



Der Einfluss der Membranproteine GPR107 und GPR108 auf die Calciumhomöostase

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Medizinische Fakultät
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025

Vorgelegt von:

Nicole Erhardt

Geb. am: 04.08.1995 in Heidenheim

Tag der Promotion: 23. Mai 2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Hannig
Berichterstatter: PD Dr. Ulrich Wissenbach
Prof. Dr. Dieter Bruns

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Der Einfluss der Membranproteine GPR107 und GPR108 auf die Calciumhomöostase	1
1.2 The influence of the membrane proteins GPR107 and GPR108 on calcium homeostasis	6
2. Einleitung.....	11
2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	11
2.2 Der G-Protein gekoppelte Rezeptor 107	12
2.3 Der G-Protein gekoppelte Rezeptor 108	15
2.4 Neuronostatin als potentieller Ligand des GPR107-Proteins.....	18
2.5 Die Rolle des GPR107-Proteins in der Medizin – Das Cervix-Karzinom	19
2.6 Die Rolle des GPR108-Proteins in der Medizin – Beeinflussung von Karzinomen	20
2.7 Ziel dieser Arbeit.....	21
3. Material und Methodik	23
3.1 Chemikalien.....	23
3.2 Lösungen für molekularbiologische Experimente.....	24
3.3 Lösungen für proteinbiochemische Experimente	25
3.4 Lösungen für Calcium Imaging Experimente.....	26
3.5 Lösungen Zellkultur	28
3.6 Vektoren	28
3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
3.8 DpnI-Verdau und Gel-Elektrophorese	35
3.9 Ligation.....	36
3.10 Transformation in Escherichia coli Bakterien	36
3.11 Mini-Plasmid-Präparation.....	37
3.12 Maxi-Plasmid-Präparation.....	38

3.13	Sequenzierung	39
3.14	SDS-Page und Western Blot	40
3.15	Zellkultur	41
3.15.1	Zelllinien und Zellmedien.....	41
3.15.2	Passagieren und Vorbereitung der Zellschalen	42
3.15.3	Transfektion	43
3.16	Fluoreszenz-Mikroskopie	43
3.17	Calcium Imaging	45
3.18	Analyse und Statistik	49
4.	Ergebnisse.....	51
4.1	Das GPR108-Protein wird durch eine Protease prozessiert.....	51
4.2	Die Lokalisation des N-Terminus des GPR108-Proteins	53
4.3	Die Lokalisation des C-Terminus des GPR108-Proteins	58
4.4	Detektion der Schnittstelle des GPR108-Proteins	59
4.5	Die Lokalisation der Schnittstelle des GPR107-Proteins	66
4.6	Das GPR107-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme	74
4.7	Das GPR108-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.....	77
4.8	Das GPR107- und das GPR108-Protein beeinflussen die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum.....	78
4.9	Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins zeigt keine eindeutigen Hinweise auf eine Interaktion.....	84
4.10	Der Einfluss der Furin-Schnittstelle auf die Funktion des GPR107-Proteins..	87
4.11	Der Einfluss der potentiellen Protease-Schnittstelle auf die Funktion des GPR108-Proteins.....	88
4.12	Der erhöhte Calciumeinstrom durch das GPR107-Protein ist unabhängig von CRAC-Kanälen	89
4.13	Die Bedeutung des Membran-Transfers des GPR107-Proteins für dessen Einfluss auf den zellulären Calciumhaushalt	91
4.14	Das GPR107-Protein erhöht die basale Calciumkonzentration	94
4.15	Suramin beeinflusst die Wirkung des GPR107-Proteins nicht.....	96
4.16	Die Wirkung des GPR107-Proteins auf den zellulären Calciumeinstrom ist nicht Phospholipase C abhängig.....	99
4.17	Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR107-Protein ergibt keinen Hinweis auf eine G _i -Kopplung des GPR107-Proteins	100

4.18	Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR108-Protein ergibt keinen Hinweis auf eine G _i -Kopplung des GPR108-Proteins	105
4.19	Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR107-Protein beeinflusst die basale Calciumkonzentration	107
4.20	Die Untersuchung einer potentiellen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins	109
4.21	Die Untersuchung des GPR107-Proteins als potentiellen Ionenkanal.....	113
4.22	Die Untersuchung des GPR107-Proteins als potentiellen Calciumsensor....	115
4.23	Die Interaktion des GPR107-Proteins mit Neuronostatin	118
4.24	Die Interaktion des GPR107-Proteins mit Glucocorticoiden	122
5.	Diskussion.....	129
5.1	Das GPR108-Protein wird durch eine Protease prozessiert.....	129
5.2	Die intrazelluläre Lokalisation des GPR108-Proteins.....	131
5.3	Mikroskopische Bestätigung der Schnittstellenposition des GPR107-Proteins	133
5.4	Das GPR107-Protein erhöht den Calciumeinstrom in die Zelle, das GPR108-Protein nicht	134
5.5	Die Proteine GPR107 und GPR108 verringern den Füllungszustand intrazellulärer Calciumspeicher	136
5.6	Das GPR107-Protein erhöht die basale zelluläre Calciumkonzentration	139
5.7	Kein eindeutiger Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine GPR107und GPR108.....	139
5.8	Das GPR107-Protein als G-Protein gekoppelter Rezeptor.....	140
5.9	Kein Hinweis auf eine Interaktion des GPR107-Proteins mit Glucocorticoiden oder Neomycin	144
5.10	Die Interaktion des GPR107-Proteins mit dem Peptidhormon Neuronostatin	145
6.	Literatur	149
6.1	Literaturverzeichnis.....	149
6.2	Internetquellen.....	158
6.3	Weitere Abbildungsquellen	158
	Danksagung.....	159
	Lebenslauf	160

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Kyte und Doolittle Hydropathieblot des GPR107-Proteins.	14
Abb. 2: Vergleich der Kyte und Doolittle Hydrophatieblots des GPR107- und GPR108-Proteins.....	16
Abb. 3: Struktur von Fura-2 isoliert und unter Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Calcium.....	46
Abb. 4: Exzitationsspektrum von Fura-2 unter verschiedenen Calciumkonzentrationen.	47
Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-GFP, schwach exprimierend. ...	52
Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-GFP, stark exprimierend.	52
Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP und GPR108-(169RFP).	53
Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP bei Koexpression mit dem Lysosomen-Marker Lamp1-GFP.	55
Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-GFP nach Färbung der Zellen mit dem Mitochondrien-Marker Mitotracker CMXRos.....	55
Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP nach Färbung der Zellen mit dem Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID Green.	56
Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP bei Koexpression mit dem ER-Marker ER-CFP.	56
Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP) bei Koexpression mit dem ER-Marker ER-CFP.	57
Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP) nach Färbung der Zellen mit dem Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID Green.....	57
Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 35-168-GFP und GPR108 Δ 35-176-GFP.	58
Abb. 15: Schematische Darstellung verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins zur Untersuchung einer möglichen Schnittstellenposition.....	60
Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP.	61
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)-GFP.....	61
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP.	62
Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP...	62
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP.	62
Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP.....	63
Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP.	63
Abb. 23: Western Blot verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins zur Lokalisierung einer möglichen Schnittstellenposition.....	66

Abb. 24: Western Blot GPR107-GFP und GPR107-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP.	67
Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179RFP)-GFP.	68
Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179RFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP.	68
Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179GFP)-RFP.	69
Abb. 28: Western Blot verschiedener Mutanten des GPR107-Proteins zur ergänzenden Untersuchung des Aminosäuremotivs KSKR an Position 179 als Schnittstellenlokalisation.	72
Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(47RFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP.	73
Abb. 30: Das GPR107-Protein verstärkt die zelluläre Calciumaufnahme.	74
Abb. 31: Der C-Terminus des GPR107-Proteins verstärkt die zelluläre Calciumaufnahme.	76
Abb. 32: Der N-Terminus des GPR107-Proteins beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.	76
Abb. 33: Das GPR108-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.	77
Abb. 34: Das GPR107-Protein verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.	79
Abb. 35: Das GPR108-Protein verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle.	80
Abb. 36: Der C-Terminus des GPR107-Proteins verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.	82
Abb. 37: Der N-Terminus des GPR107-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.	82
Abb. 38: Der C-Terminus des GPR108-Proteins verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle.	83
Abb. 39: Der N-Terminus des GPR108-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle nicht.	83
Abb. 40: Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.	86
Abb. 41: Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.	86
Abb. 42: Die Mutation der Protease-Schnittstelle KSKR des GPR107-Proteins beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.	87

Abb. 43: Die Mutation der putativen Protease-Schnittstelle KPKS des GPR108-Proteins beeinflusst die GPR108-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.	89
Abb. 44: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung von CRAC-Kanälen durch das GRP107-Protein.	90
Abb. 45: Die Inhibition von CRAC-Kanälen durch BTP2 beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	91
Abb. 46: Ein RFP-Protein unmittelbar hinter der Signalpeptid-Schnittstelle verringert die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme.	93
Abb. 47: Ein RFP-Protein unmittelbar hinter der Signalpeptid-Schnittstelle beeinflusst die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.	94
Abb. 48: Das GPR107-Protein erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration.	95
Abb. 49: Suramin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	98
Abb. 50: Suramin beeinflusst die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.	98
Abb. 51: Die Inhibition der Phospholipase C beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	100
Abb. 52: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung von TRPC4-Kanälen durch Carbachol-induzierte Aktivierung von M3-Rezeptoren bei gleichzeitiger potentieller konstitutiver Gi-Aktivierung durch das GPR107-Protein.	101
Abb. 53: Das GPR107-Protein beeinflusst den Speicher-vermittelten Calciumeinstrom nicht.	103
Abb. 54: Das GPR107-Protein und Carbachol zeigen gemeinsam keine Aktivierung des TRPC4-Kanals.	104
Abb. 55: Die Erhöhung der basalen zytosolischen Calciumkonzentration bei Koexpression des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal ist Carbachol-unabhängig.	104
Abb. 56: Das GPR108-Protein verringert den Speicher-vermittelten Calciumeinstrom.	106
Abb. 57: Das GPR108-Protein und Carbachol zeigen gemeinsam keine Aktivierung des TRPC4-Kanals.	106
Abb. 58: Das GPR107-Protein erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration.	108
Abb. 59: Die Koexpression des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration nochmals stärker.	109

Abb. 60: Schematische Darstellung des GPR107-Proteins mit Mutationen innerhalb der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle.	110
Abb. 61: Mutationen in der putativen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins verstärken die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.	112
Abb. 62: Mutationen in der putativen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins verstärken die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.	112
Abb. 63: Schematische Darstellung des GPR107-Proteins als potentieller Ionenkanal mit Mutationen innerhalb der putativen Pore.	114
Abb. 64: Mutationen in der putativen Pore des GPR107-Proteins beeinflussen die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.....	115
Abb. 65: Vergleich der Kyte und Doolittle Hydropathieblots des GPR107-Proteins und des <i>Calcium-sensing receptor</i> CaSR.	116
Abb. 66: Neomycin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	117
Abb. 67: Neomycin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme in Gegenwart physiologischer Calciumkonzentrationen nicht.....	118
Abb. 68: Neuronostatin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	121
Abb. 69: Die 24-stündige Prä-Inkubation mit Neuronostatin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	121
Abb. 70: Neuronostatin verstärkt die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.	122
Abb. 71: Beclomethason verstärkt die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.	124
Abb. 72: Corticosteron beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	124
Abb. 73: Dexamethason beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.....	125
Abb. 74: Hydrocortison beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	125
Abb. 75: Prednisolon beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.	125
Abb. 76: Verschiedene Glucocorticoide zeigen keine zusätzliche Verstärkung der GPR107-vermittelten zellulären Calciumaufnahme.	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Angabe der Hersteller.	23
Tabelle 2: Lösungen für Calcium Imaging Experimente mit Angabe der verwendeten Konzentrationen.	26
Tabelle 3: Klonierte Konstrukte mit Angabe der verwendeten PCR-Elongationszeiten.	29
Tabelle 4: Auflistung aller klonierten Konstrukte des GPR107 mit Angabe der verwendeten Primer und des Templates.	31
Tabelle 5: Auflistung aller klonierten Konstrukte des GPR108 mit Angabe der verwendeten Primer und des Templates.	32
Tabelle 6: Verwendete Primer für Konstrukte des GPR107 mit Angabe der Primer-Sequenzen und einer vorliegenden 5'-Phosphorylierung.....	33
Tabelle 7: Verwendete Primer für Konstrukte des GPR108 mit Angabe der Primer-Sequenzen und einer vorliegenden 5'-Phosphorylierung.....	33
Tabelle 8: Auflistung weiterer verwendeter Konstrukte und deren Herkunft.	34
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Primer zur Sequenzierung mit Angabe der Sequenzen.....	39
Tabelle 10: Auflistung verwendeter Zelllinien und Zellmedien mit Angabe der Hersteller.	42
Tabelle 11: Verwendete Zellmarker mit Angabe der eingesetzten Mikroskopfilter.	44

Abkürzungsverzeichnis

AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor
CCh	Carbamoylcholinchlorid, Carbachol
CFP	Cyan-fluoreszierendes Protein
CRAC	<i>Calcium release activated channel</i>
DAG	Diacylglycerin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GOLD	<i>Golgi-dynamics</i>
GOST	<i>GOLD-domain seven-transmembrane helix protein</i>
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O _{VE}	Vollentsalztes Wasser
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish</i> Peroxidase
IGFP	IRES grün-fluoreszierendes Protein
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
Lamp	Lysosom-assoziiertes Membranglykoprotein
LB	<i>Lysogeny broth</i>

LUSTR	<i>Lung seven transmembrane receptor</i>
M2R	Muskarinerger M2-Rezeptor
M3R	Muskarinerger M3-Rezeptor
MEM	<i>Minimal essential media</i>
Na ⁺	Natrium
ns	Nicht signifikant
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RGS	<i>Regulators of g-protein signaling</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	<i>Sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
STIM	<i>Stromal interaction molecule</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein

1. Zusammenfassung

1.1 Der Einfluss der Membranproteine GPR107 und GPR108 auf die Calciumhomöostase

Die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren stellt mit über 800 bekannten Rezeptoren die größte Familie unter den humanen Membranproteinen dar und bildet darüber hinaus eine der wichtigsten Zielstrukturen verschiedener medikamentöser Therapien. Dementsprechend stellt ein möglichst genaues Verständnis des Aufbaus sowie der Funktion der einzelnen G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Grundlage, unter anderem für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, dar.

Bei den beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 handelt es sich um zwei bisher nur wenig erforschte Mitglieder dieser Proteinfamilie. Dabei konnte für beide Proteine bisher weder die exakte Struktur noch ein jeweiliger Ligand oder die exakte intrazelluläre Signalkaskade, über welche die beiden Rezeptoren agieren, identifiziert werden. Entsprechend werden sowohl das GPR107- als auch das GPR108-Protein lediglich aufgrund ihrer prognostizierten Struktur mit sieben potentiellen Transmembrandomänen der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Für ein genaueres Verständnis dieser Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit einerseits die intrazelluläre Lokalisation und eine mögliche Spaltung des GPR107- und des GPR108-Proteins sowie andererseits funktionelle Aspekte, insbesondere der Einfluss der beiden Proteine auf die intrazelluläre Calciumhomöostase, näher betrachtet.

Während für das GPR107-Protein bereits eine Protease-Schnittstelle sowie eine zumindest partielle Lokalisation des Proteins im Golgi-Apparat beschrieben ist, zeigt sich dies für das GPR108-Protein noch weitgehend unklar. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des GPR108-Proteins sowie die Betrachtung potentieller Schnittstellen innerhalb des Proteins. Für die intrazelluläre Lokalisation des GPR108-Proteins stellte sich hierbei fluoreszenzmikroskopisch eine deutliche Abhängigkeit der Lokalisation des N-terminalen GPR108-Proteins von der gleichzeitigen Expression des C-terminalen Proteinabschnitts dar. Während das N-terminale GPR108-Protein ohne den C-Terminus überwiegend im endoplasmatischen Retikulum detektiert werden kann, zeigt sich bei Expression der gesamten GPR108-Proteinsequenz eine deutliche Anreicherung des N-terminalen Proteinabschnitts im Golgi-Apparat sowie in kleinen Vesikeln, welche insbesondere in den Zellausläufern lokalisiert sind. Dementsprechend scheint der C-Terminus hier eine

wichtige Voraussetzung für den Austritt des N-terminalen GPR108-Proteins aus dem endoplasmatischen Retikulum darzustellen. Für den C-terminalen Abschnitt des GPR108-Proteins, welcher die Transmembrandomänen enthält, zeigt sich hingegen unabhängig von der zeitgleichen Expression des N-terminalen Proteinabschnitts eine Lokalisation in kleinen Vesikeln, welche über große Teile der Zelle verteilt vorliegen. Lediglich in sehr stark exprimierenden Zellen lässt sich die für die Transmembrandomänen zu erwartende Lokalisation in der Zellmembran detektieren.

Hinsichtlich einer potentiellen Spaltung des GPR108-Proteins ergaben sich in der mikroskopischen Betrachtung zwar deutliche Hinweise auf eine Spaltung des GPR108-Proteins innerhalb der Zelle, jedoch konnte weder durch Fluoreszenzmikroskopie noch durch Untersuchungen mittels Western Blot ein Motiv innerhalb des Proteins als Schnittstellensequenz identifiziert werden.

Im Gegensatz hierzu scheint sich die Lokalisation der Protease-Schnittstelle innerhalb des strukturverwandten GPR107-Proteins deutlich klarer darzustellen. Vorige Arbeiten identifizierten dabei insbesondere mittels molekularbiologischer Untersuchungen im Western Blot eine KSKR-Sequenz vor den Transmembrandomänen als Schnittstelle für die Protease Furin. Ergänzend erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die mikroskopische Untersuchung dieser Schnittstelle. Unter Mutation dieser KSKR-Sequenz sowie durch Markierung beider Proteintermini mittels verschiedener Fluoreszenzproteine ließ sich diese Sequenz auch mikroskopisch als Schnittstellenmotiv des Proteins bestätigen.

Neben den Betrachtungen der beiden Rezeptoren GPR107 und GPR108 hinsichtlich einer potentiellen Spaltung sowie ihrer intrazellulären Lokalisation erfolgte im Rahmen dieser Arbeit vorrangig die Untersuchung funktioneller Aspekte der beiden Proteine, insbesondere deren Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase mittels Calcium Imaging. Hierbei zeigte sich zunächst ein gegenüber den Kontrollzellen signifikant erhöhter Calciumeinstrom in GPR107 exprimierende Zellen infolge einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration. Weiterhin ließ sich dieser Effekt des GPR107-Proteins nach separater Expression des N- sowie C-terminalen Proteinabschnitts klar dem C-terminalen Abschnitt des GPR107-Proteins zuordnen. Der N-Terminus hingegen zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf diesen Effekt.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen bei Expression des GPR107-Proteins resultiert die Expression des GPR108-Proteins lediglich in einem geringgradigen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration infolge einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration. Dementsprechend scheint das GPR108-Protein keinen wesentlichen Einfluss auf den Calciumeinstrom in Zellen aufzuweisen.

Weiterführend zeigte sich für die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 eine ausgeprägte Auswirkung auf intrazelluläre Calciumspeicher. Sowohl bei Expression

des GPR107- als auch bei Expression des GPR108-Proteins stellte sich die, durch Applikation von Carbachol oder Thapsigargin induzierte, Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern signifikant verringert gegenüber Kontrollzellen dar. Somit scheint hier ein ursächlicher, mit der Expression der beiden Rezeptoren GPR107 beziehungsweise GPR108 einhergehender, verringerter Füllungszustand dieser Speicher wahrscheinlich. Bei näherer Betrachtung dieser Auswirkungen der beiden Proteine gelang auch hier nach separater Expression der jeweiligen N- und C-Termini der Rezeptoren eine klare Zurodnung dieses Effektes zu den C-terminalen Proteinabschnitten. Während unter alleiniger Expression der C-Termini eine gleichartige, beziehungsweise im Falle des GPR108-Proteins eine nochmals signifikant stärkere Verringerung der intrazellulären Calciumfreisetzung beobachtet werden kann, zeigte sich unter alleiniger Expression der jeweiligen N-Termini diesbezüglich keine wesentliche Auswirkung.

Als dritten zu beobachtenden Effekt hinsichtlich der zellulären Calciumhomöostase ließ sich bei Expression des GPR107-Proteins eine signifikante Erhöhung der basalen intrazellulären Calciumkonzentration verzeichnen.

Aufgrund der deutlichen Strukturverwandtschaft der beiden Proteine GPR107 und GPR108 zueinander sowie lediglich sehr geringer struktureller Ähnlichkeit mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurde in dieser Arbeit des Weiteren eine mögliche Interaktion dieser beiden Proteine untersucht. Hierbei ergaben sich sowohl in Bezug auf den Calciumeinstrom in die Zellen als auch hinsichtlich der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern keine Hinweise auf eine diesbezügliche Interaktion der beiden Rezeptoren.

Neben den funktionellen Auswirkungen auf die intrazelluläre Calciumhomöostase erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zudem die Betrachtung verschiedener, den beobachteten Effekten potentiell zugrundeliegenden, G-Protein gekoppelter Signalkaskaden. In erster Linie wurde hierfür das GPR107-Protein näher untersucht. Eine erste allgemeine Untersuchung eines G-Protein gekoppelten Signalwegs des GPR107-Proteins erfolgte dabei mit Suramin, unter dessen Einfluss eine Inhibierung der Aktivierung aller G-Proteine resultiert. Da sich die Effekte des GPR107-Proteins unter diesem Einfluss jedoch nicht wesentlich veränderten, bleibt hierbei eine Bestätigung des Agierens des GPR107-Proteins über ein G-Protein aus.

Aufgrund bereits vorliegender Untersuchungen, welche keine Hinweise auf einen cAMP-vermittelten Signalweg des GPR107-Proteins erkennen ließen, erfolgte im weiteren Verlauf dieser Arbeit insbesondere die Betrachtung einer konstitutiven G_i -Aktivierung durch das GPR107- beziehungsweise das GPR108-Protein sowie eines Agierens des GPR107-Proteins über die Phospholipase C. Hierbei ergaben sich jedoch keine

Anhaltspunkte für das Wirken der beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 über eine dieser Signalkaskaden.

Für eine weiterführende Untersuchung des GPR107-Proteins hinsichtlich der Charakteristik eines G-Protein gekoppelten Rezeptors erfolgte darum die Betrachtung der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle des Proteins. Entgegen der Vermutungen resultierte hierbei nach Modifikation der wahrscheinlichen G-Protein-Bindungsposition innerhalb des dritten intrazellulären *Loops* der Transmembrandomänen keine Verringerung der Effekte des GPR107-Proteins, sondern im Gegensatz sogar eine signifikante Verstärkung. Dies ließ sich dabei sowohl für den Calciumeinstrom in GPR107 exprimierende Zellen als auch für die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung verzeichnen. Eine klare Identifikation dieser Sequenz als G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins blieb hiermit zwar aus, jedoch scheint diese Aminosäuresequenz innerhalb des dritten intrazellulären *Loops* den Einfluss des GPR107-Proteins auf die Calciumhomöostase wesentlich zu beeinflussen.

Da die exakte Anzahl an Transmembrandomänen bisher nicht bekannt ist, wurde neben der Untersuchung der einzelnen G-Protein gekoppelten intrazellulären Signalkaskaden auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass das GPR107-Protein potentiell einen Ionenkanal mit sechs putativen Transmembrandomänen darstellen könnte. Für eine diesbezügliche Untersuchung wurden innerhalb einer putativen Poren-ähnlichen Region negativ geladene Aminosäuren durch neutrale ersetzt. Diese Modifikation zeigte jedoch keinen Einfluss auf den mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden erhöhten Calciumeinstrom in Zellen. Somit scheint es eher unwahrscheinlich, dass das GPR107-Protein einen Calcium-permeablen Ionenkanal bildet.

Da sowohl für das GPR107- als auch für das GPR108-Protein bisher keine Liganden bekannt sind und diese somit der Gruppe der *orphan* G-Protein Rezeptoren zugeordnet werden, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit auch die Untersuchung einiger potentieller Liganden für das GPR107-Protein. Hierbei wurden aufgrund der erheblichen Einflüsse des GPR107-Proteins in Bezug auf den Calciumeinstrom sowie die intrazelluläre Calciumfreisetzung insbesondere Liganden untersucht, welche ebenfalls die Calciumhomöostase beeinflussen. Zunächst erfolgte die Betrachtung einer potentiellen Interaktion des GPR107-Proteins mit verschiedenen Glucocorticoiden. Die untersuchten Glucocorticoide Beclomethason, Corticosteron, Dexamethason, Hydrocortison und Prednisolon21-Acetat beeinflussten hierbei die Auswirkungen des GPR107-Proteins auf den intrazellulären Calciumhaushalt in keinem wesentlichen Ausmaß, sodass sich hierdurch kein Hinweis auf eine Interaktion beziehungsweise ein Fungieren dieser Glucocorticoide als Liganden des GPR107-Proteins ergibt.

Auch das polyvalente Kation Neomycin wurde in dieser Arbeit als potentieller Ligand des GPR107-Proteins untersucht. Neomycin aktiviert den *Calcium-sensing receptor* (CaSR), welcher durch seine Funktion als Calciumsensor an der zellulären Reaktion auf eine veränderte extrazelluläre Calciumkonzentration beteiligt ist. Untersucht wurde, inwieweit Neomycin auch das GPR107-Protein aktiviert. Hierbei ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine Interaktion des GPR107-Proteins mit dem Neomycin beziehungsweise auf eine hiermit potentiell einhergehende Charakteristik des GPR107-Proteins als Calciumsensor.

Da mehrere Arbeiten darauf hindeuten, dass das GPR107-Protein mit dem Peptidhormon Neuronostatin interagiert, wurde abschließend auch Neuronostatin als möglicher Ligand des GPR107-Proteins untersucht. Interessanterweise scheint auch Neuronostatin die intrazelluläre Calciumhomöostase zu beeinflussen, wobei die hier zugrundeliegenden intrazellulären Signalwege sowie beteiligte Rezeptoren bisher weitgehend unbekannt sind. Für den erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle, welche unter Expression des GPR107-Proteins zu beobachten ist, zeigte sich keine wesentliche Auswirkung bei Betrachtung dieses Effektes unter dem Einfluss von Neuronostatin. Im Gegensatz hierzu stellte sich die mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende Verringerung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern unter dem Einfluss von Neuronostatin zwar lediglich gering, jedoch signifikant stärker verringert dar. Inwieweit diese Auswirkung auf eine tatsächliche Interaktion des Neuronostatins mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor 107 und eine hierdurch bedingte Neuronostatin-induzierte Verstärkung des GPR107-Effekts zurückzuführen ist, ist unklar. Ein genaues Verständnis der hier zugrundeliegenden Mechanismen obliegt somit künftigen Untersuchungen.

1.2 The influence of the membrane proteins GPR107 and GPR108 on calcium homeostasis

With more than 800 known receptors, the group of G protein-coupled receptors represents the largest family of human membrane proteins and forms one of the most important target structures of various drug therapies. Therefore, a precise understanding of the structure and function of these G protein-coupled receptors is an important basis for, among others the development of new therapeutic approaches.

The two G protein-coupled receptors 107 and 108 are two members of this protein family that have been little explored so far. For both proteins neither the exact structure nor a respective ligand or the exact intracellular signaling pathway through which the two receptors act could be identified. Accordingly, the GPR107 and GPR108 protein are both assigned to the superfamily of G protein-coupled receptors solely because of their predicted structure with seven potential transmembrane domains. For a more detailed understanding of these receptors, the intracellular localization and a possible cleavage site of the GPR107 and GPR108 protein were examined in more detail in this thesis. Furthermore, functional aspects, in particular the influence of the two proteins on intracellular calcium homeostasis were explored as well.

While for the GPR107 protein a protease cleavage site and a partial localization in the Golgi apparatus have already been described, these aspects largely have yet to be determined for the GPR108 protein. For this reason, the intracellular localization of the GPR108 protein and the consideration of potential cleavage sites within the protein were investigated in this thesis. In case of the intracellular localization of the GPR108 protein, fluorescence microscopy showed a clear dependence regarding the localization of the N-terminal GPR108 protein on the simultaneous expression of the C-terminal protein segment. Without the C-terminal GPR108 protein the N-terminus can be detected predominantly in the endoplasmic reticulum. In contrast, when the entire protein sequence of the GPR108 protein is expressed, there is a clear enrichment of the N-terminal protein section in the Golgi apparatus and in small vesicles, which are localized in particular in the cell extensions. Therefore, the C-terminus seems to be an important prerequisite regarding the exit of the N-terminal GPR108 protein from the endoplasmic reticulum. The C-terminal section of the GPR108 protein, which contains the transmembrane domains, localizes in small vesicles, which are distributed over large parts of the cell whereas the localization in the cell membrane, expected for the transmembrane domains can only be seen in very strongly expressing cells. This can be found independently from the simultaneous expression of the N-terminal protein section.

With regard to a potential cleavage site of the GPR108 protein, microscopic observation revealed clear indications of a cleavage within the cell, but neither fluorescence microscopy nor Western blot investigations could identify an unambiguously cleavage sequence.

In contrast, the localization of the protease cleavage site within the structurally related GPR107 protein appears to be much clearer. Previous studies, in particular molecular-biological investigations by means of Western blots identified a KSKR sequence preceding the transmembrane domains as a cleavage site for the protease furin. As part of this thesis the cleavage site was supplementary carried out by microscopic examination. By mutating the KSKR sequence and by marking both protein termini with different fluorescent proteins, this sequence could also be confirmed microscopically as the cleavage site of the protein.

In addition to the examinations of the two receptors GPR107 and GPR108 with regard to a potential cleavage site and their intracellular localization, the functional aspects of the two proteins have been investigated. Therefor particularly their influence on the intracellular calcium homeostasis was explored by calcium imaging in this study. In comparison to the control cells, cells expressing the GPR107 protein showed a significantly strengthened calcium influx as a result of an increase in the extracellular calcium concentration. Furthermore, after separate expression of the N- and C-terminal protein section, this effect could be clearly assigned to the C-terminal section of the GPR107 protein. The N-terminus showed no significant influence on this effect.

In contrast to these observations in case of expression of the GPR107 protein, expression of the GPR108 protein results in only a slight rising of intracellular calcium concentration as a consequence of an increase in extracellular calcium concentration. Accordingly, the GPR108 protein does not appear to have any significant impact on calcium influx into cells.

Further, the two G protein-coupled receptors 107 and 108 showed a considerable effect on intracellular calcium stores. After expression of the GPR107 protein as well as after expression of the GPR108 protein, the release of calcium from intracellular stores induced by application of carbachol or thapsigargin was significantly reduced compared to control cells. This indicates a probable underlying reduced filling state of intracellular calcium stores, caused by expression of the GPR107 and GPR108 protein. On closer examination of these results, when the respective N- and C-termini of the receptors were expressed separately, it was also possible to clearly assign this effect to the C-terminal protein sections. While there can be observed a similar reduction in intracellular calcium release, or in case of the GPR108 protein a significantly stronger reduction, when the C-

termini are expressed solely, there was no significant effect when the respective N-termini were expressed alone.

The third effect to be determined with regard to cellular calcium homeostasis was a significant increase in the basal intracellular calcium concentration when the GPR107 protein was expressed.

Due to the clear structural relationship between the two proteins GPR107 and GPR108 and only very low structural similarity to other G protein-coupled receptors, a possible interaction of these two proteins was also investigated in this thesis. In this context, neither in regard to the influx of calcium into the cells nor to the release of calcium from its intracellular stores, induced by carbachol, there were any indications of an interaction between these two receptors.

In addition to the functional effects on the intracellular calcium homeostasis, this study also considered various G protein-coupled signaling pathways that potentially underlie the observed effects. First and foremost, the GPR107 protein was examined more closely for this purpose. A first general investigation of a G protein-coupled signaling pathway of the GPR107 protein was performed with suramin, under which influence an inhibition of the activation of all G proteins results. Since the effects of the GPR107 protein were not significantly different under this influence, there is no confirmation of the GPR107 protein acting via a G protein.

Based on existing studies, which did not reveal any evidence of a cAMP-mediated signaling pathway of the GPR107 protein, this thesis further focused in particular on a constitutive G_i activation by the GPR107 or GPR108 protein as well as a mechanism of the GPR107 protein via phospholipase C. As a result, no evidence for an operation of the two G protein-coupled receptors 107 and 108 via one of these signaling pathways could have been observed.

For a further investigation with regard to the characteristics of a G protein-coupled receptor, the potential G protein binding site of the GPR107 protein was explored. Contrary to assumptions, the modification of the probable G protein binding site within the third intracellular loop of the transmembrane domains did not result in a reduction in the effects of the GPR107 protein, but even in a significant increase. This was recorded both for the calcium influx into GPR107 expressing cells and for the intracellular calcium release, induced by carbachol. Although consequently, this sequence was not clearly identified as the G protein binding site of the GPR107 protein, this amino acid sequence within the third intracellular loop appears to have a significant influence on the effects of the GPR107 protein on calcium homeostasis.

Since the exact number of transmembrane domains is not yet known, the possibility that the GPR107 protein could potentially represent an ion channel with six putative

transmembrane domains was taken into consideration in addition to the examination of the different G protein-coupled intracellular signaling pathways. To investigate this, negatively charged amino acids were replaced by neutral ones within a putative pore-like region. However, this modification showed no influence on the increased calcium influx into cells associated with the expression of the GPR107 protein. Therefore, it seems rather unlikely that the GPR107 protein forms a calcium-permeable ion channel.

Since no ligands are yet known for either the GPR107 or GPR108 protein, both proteins are consequently assigned to the group of orphan G protein-coupled receptors. For this reason, this thesis also included the investigation of some potential ligands for the GPR107 protein. Due to the significant influence of the GPR107 protein on calcium influx and intracellular calcium release, ligands in particular were investigated which are also having an influence on calcium homeostasis. First, a potential interaction of the GPR107 protein with various glucocorticoids was explored. The investigated glucocorticoids beclomethasone, corticosterone, dexamethasone, hydrocortisone and prednisolone21-acetate did not influence the effects of the GPR107 protein on the intracellular calcium homeostasis to any significant extent. In consequence there is no indication of an interaction or a function of these glucocorticoids as a ligand of the GPR107 protein.

The polyvalent cation neomycin was also examined as a potential ligand of the GPR107 protein in this thesis. Neomycin activates the calcium-sensing receptor (CaSR), which, through its function as a calcium sensor, is involved in the cellular response to a changed extracellular calcium concentration. Whether neomycin also activates the GPR107 protein was investigated. There were no indications of an interaction of the GPR107 protein with neomycin or of a potentially associated characteristic of the GPR107 protein as a calcium sensor.

Since several studies indicate that the GPR107 protein interacts with the peptide hormone neuronostatin, neuronostatin was finally also examined as a possible ligand of the GPR107 protein. Interestingly, neuronostatin also appears to influence intracellular calcium homeostasis, whereby the underlying intracellular signaling pathways and the receptors involved are yet largely unknown. For the increased calcium influx into the cells, which can be observed under the expression of the GPR107 protein, there was no significant effect when this impact was explored with the influence of neuronostatin. In contrast, the calcium release from intracellular stores, which is significantly reduced under the expression of the GPR107 protein, turned out to be slightly, but significantly further reduced with neuronostatin. It is unclear to what extent this effect can be attributed to an actual interaction of neuronostatin with the G protein-coupled receptor 107 and an increase of this GPR107 effect induced by neuronostatin. A precise understanding of the underlying mechanisms is therefore a matter of future investigations.

2. Einleitung

2.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Mit mehr als 800 bekannten Rezeptoren stellt die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren die größte Familie unter den humanen Membranproteinen dar (Lv *et al.*, 2016). Sie bilden ein zentrales Element der Signaltransduktion, über welche die Weiterleitung extrazellulärer Signale verschiedener Liganden wie beispielsweise Hormone, Neurotransmitter oder Ionen nach intrazellulär ermöglicht wird (Rosenbaum *et al.*, 2009). Viele dieser Rezeptoren lassen sich dabei bereits pharmakologisch beeinflussen und dienen somit als wichtige Angriffspunkte verschiedener Medikamente (Santos *et al.*, 2017). Hiermit stellen die G-Protein gekoppelten Rezeptoren das häufigste Ziel medikamentöser Therapien dar (Rask-Andersen *et al.*, 2011).

Aufgebaut sind diese Rezeptoren jeweils aus den für diese Proteingruppe charakteristischen sieben Transmembrandomänen sowie einem extrazellulär liegenden N-Terminus und einem intrazellulär liegenden C-Terminus (Vedel *et al.*, 2020). Verbunden sind die einzelnen Transmembrandomänen über drei intrazelluläre sowie drei extrazelluläre *Loops*. Der dritte intrazelluläre *Loop* zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne scheint dabei eine zentrale Bedeutung für die Interaktion mit dem jeweiligen intrazellulär koppelnden G-Protein darzustellen (Hawes *et al.*, 1994). Die heterotrimeren Guanylnucleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) bestehen jeweils aus den drei Untereinheiten α , β und γ , wobei im inaktiven Zustand ein Guanosindiphosphat (GDP) an die α -Untereinheit gebunden vorliegt (Hilger *et al.*, 2018). Lagert sich extrazellulär ein Ligand an den Rezeptor an, so führt dies über eine Konformationsänderung des Proteins zu einer Aktivierung des Rezeptors sowie hiermit verbunden zu einer Aktivierung des intrazellulär koppelnden G-Proteins (Tuteja, 2009). Es folgt die Dissoziation des gebundenen GDPs und ein hiermit einhergehender Austausch gegen ein Guanosintriphosphat (GTP) (Hilger *et al.*, 2018). In seinem aktiven Zustand zerfällt das G-Protein in seine GTP-bindende α - und seine β/γ -Untereinheit, woraufhin die beiden Untereinheiten von dem G-Protein gekoppelten Rezeptor dissoziieren (Wettschureck *and* Offermanns, 2005). Sowohl die α - als auch die β/γ -Untereinheit sind in der Folge in der Lage, bestimmte Effektorproteine zu beeinflussen und somit eine intrazelluläre Reaktion zu induzieren.

Abhängig vom jeweiligen G-Protein unterscheiden sich die hierbei beeinflussten Effektorproteine. Dabei werden die G-Proteine in vier Gruppen eingeteilt: das stimulierende G-Protein G_s , das inhibitorische G-Protein $G_{i/o}$, das G-Protein $G_{q/11}$ sowie das G-

Protein $G_{12/13}$ (Hilger *et al.*, 2018). Wird die α -Untereinheit eines G_s -Proteins aktiviert, so aktiviert diese wiederum die Adenylylcyclase, woraus die Bildung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) resultiert (Vedel *et al.*, 2020). Infolgedessen kommt es letztendlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Im Gegensatz hierzu resultiert die Aktivierung der α -Untereinheit eines $G_{i/o}$ -Proteins in einer Hemmung der Adenylylcyclase. Über die Aktivierung der α -Untereinheit eines $G_{q/11}$ -Proteins kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C β , welche in der Folge Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP_3 stimuliert die Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums in das Zytosol. Durch DAG kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Die vierte Gruppe der G-Proteine, das $G_{12/13}$ -Protein, führt über die Aktivierung von *Rho-guanine nucleotide exchange*-Faktoren zu einem Austausch von GDP zu GTP in der GTPase Rho A.

Abschließend führt die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des G-Proteins unter Abspaltung eines Phosphosäurerestes zu einer Hydrolyse des gebundenen GTPs zu GDP (Siderovski *and* Willard, 2005). Beschleunigt wird diese Hydrolyse durch als Hilfsfaktoren agierende *regulators of g-protein signaling* (RGS)-Proteine. Nach anschließender Assoziation der α -Untereinheit mit der β/γ -Untereinheit sowie mit dem Rezeptor liegt das G-Protein wieder in seinem inaktiven Zustand vor.

Welche Liganden die einzelnen G-Protein gekoppelten Rezeptoren spezifisch aktivieren konnte für viele Rezeptoren bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht identifiziert werden (Davenport *et al.*, 2013). Diese werden somit der Gruppe der sogenannten *orphan* G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Der Identifikation möglicher Liganden sowie der jeweils koppelnden G-Proteine und der hierdurch induzierten intrazellulären Signalkaskade kommt somit eine zentrale Bedeutung in der aktuellen Forschung zu.

2.2 Der G-Protein gekoppelte Rezeptor 107

Das GPR107-Protein wird der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Dieses noch weitgehend unerforschte Protein wurde erstmalig aus einer humanen Lunge isoliert und gehört innerhalb der G-Protein gekoppelten Rezeptoren der sogenannten LUSTER (*lung seven transmembrane receptor*)-Familie an (Edgar, 2007). Diese Subfamilie besteht aus zwei Untergruppen, welche im Menschen beide jeweils lediglich zwei Vertreter aufweisen. Das GPR107-Protein, oder auch LUSTER 1, wird dabei, ebenso wie das unten beschriebene GPR108-Protein, der LUSTER A-Subfamilie zugeordnet. Betrachtet man das *GPR107*-Gen, so besteht dieses aus 18 Exons und

befindet sich auf Chromosom 9 an Position 9q34.11. Exprimiert wird dieses Gen dabei sowohl in den meisten Geweben des Menschen als auch in den meisten eukaryotischen Spezies. Beim Vergleich der Sequenzen verschiedener GPR107-Proteine zeigt sich vor allem für die LUSTER-Domäne eine hohe Konservierung, während sich die N-Termini des Proteins stark variabel darstellen. Die LUSTER-Domäne weist hierbei vermutlich sieben Transmembrandomänen auf. Die hohe Konservierung legt die Vermutung einer Beteiligung des GPR107-Proteins an fundamentalen Prozessen eukaryotischer Zellen nahe. Eine innerhalb der Transmembrandomänen lokalisierte Region mit hoher Konservierung zwischen den einzelnen LUSTER-Subfamilien stellt der dritte intrazelluläre *Loop* dar (Edgar, 2007). Diese Konservierung findet man auch bei anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Georgoussi *et al.*, 1997). Sie stellt die potentielle Bindungsstelle für G-Proteine dar (Hawes *et al.*, 1994).

Da die zelluläre Funktion des GPR107-Proteins sowie das intrazelluläre G-Protein des Rezeptors bisher unbekannt sind, erfolgte die Zuordnung zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren lediglich aufgrund der putativen Struktur. Allerdings weist die Sequenz dabei nur eine sehr geringe Homologie zu Sequenzen anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren wie dem bovinen Rhodopsin, dem Muster eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, auf (Palczewski *et al.*, 2000).

Die Struktur des GPR107-Proteins setzt sich zusammen aus einem N-terminalen hydrophoben Signalpeptid, einem langen extrazellulären Proteinabschnitt, gefolgt von sieben Transmembrandomänen und einem negativ geladenen intrazellulären C-Terminus (Edgar, 2007). Um die Anzahl der Transmembrandomänen eines Proteins zu prognostizieren kann ein Hydropathieplot behilflich sein (Abb. 1). Hierbei wird jeder Aminosäure der Proteinsequenz anhand ihrer jeweiligen Hydrophobizität ein bestimmter Wert zugeordnet. Auf diese Weise lassen sich längere Abschnitte, welche vermehrt hydrophobe Aminosäuren beinhalten, leicht erkennen und können so als potentielle Transmembrandomänen identifiziert werden (Kyte *and* Doolittle, 1982). Jedoch ergibt sich hierbei für das GPR107-Protein kein eindeutiges Ergebnis. Wie die Zahlen in dem dargestellten Hydropathieplot verdeutlichen, lassen sich dem GPR107-Protein sowohl sechs als auch sieben mögliche Transmembrandomänen zuordnen. Da hierdurch keine eindeutige Aussage über das Vorliegen von sieben Transmembrandomänen getroffen werden kann, resultiert dementsprechend keine sichere Einordnung des GPR107-Proteins in die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

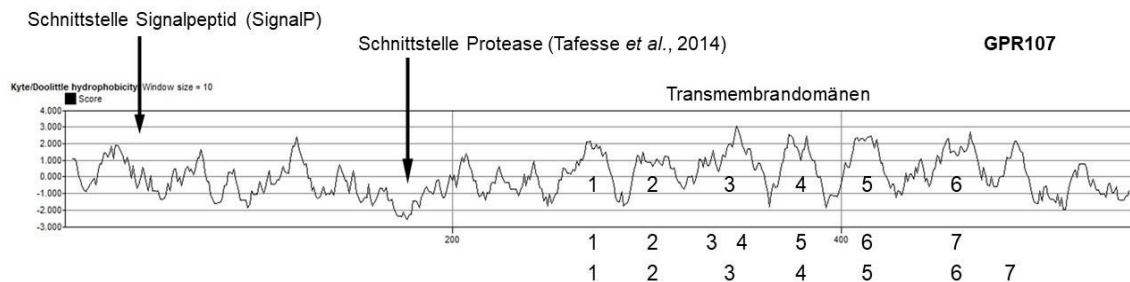


Abb. 1: Kyte und Doolittle Hydropathieplot des GPR107-Proteins.

Auf der X-Achse ist die Aminosäuresequenz des GPR107-Proteins aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren. Eine putative Signalpeptidase-Schnittstelle und eine Furin-Schnittstelle sind eingezeichnet (Pfeile). C-terminal sind drei mögliche Konstellationen der Transmembrandomänen des GPR107-Proteins dargestellt. Dabei können dem GPR107-Protein nach dieser Darstellung sowohl sechs als auch sieben Transmembrandomänen zugeordnet werden.

Abbildung: erstellt mit Accelrys Gene (Version 2.5, 2006, Accelrys Inc., San Diego, USA)

Des Weiteren ist in dem Hydropathieplot die, durch das Programm SignalP mit einer Wahrscheinlichkeit von 83 % prognostizierte, potentielle Schnittstelle des Signalpeptids dargestellt. Diese befindet sich dabei zwischen den Aminosäuren Glycin (G_{39}) und Arginin (R_{40}) (Edgar, 2007). Im N-terminalen hydrophilen Teil der Proteinsequenz ist eine potentielle Schnittstelle der Protease Furin eingezeichnet. Die Schnittstelle wird durch die Aminosäuren Lysin-Serin-Lysin-Arginin (K-S-K-R), einer Variante des klassischen Furin-Schnittstellenmotivs (R-X-K/R-R) (Molloy *et al.*, 1992), definiert (Tafesse *et al.*, 2014). Auch die vermutete Lokalisation des GPR107-Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk, sowie die dortige Kolokalisation mit der Endoprotease Furin, untermauern die Vermutung einer Spaltung des GPR107-Proteins durch Furin. Mittels zweier Cysteine und einer sich hierdurch ausbildenden Disulfidbrücke bleiben die beiden Proteinabschnitte jedoch auch nach erfolgter Spaltung miteinander assoziiert.

Sowohl durch die Kolokalisation mit der Protease Furin als auch durch die Kolokalisation mit dem Trans-Golgi-Marker TGN46 konnte zumindest eine partielle Lokalisation des GPR107-Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk identifiziert werden (Tafesse *et al.*, 2014). Hier zeigte sich darüber hinaus eine wesentliche Beteiligung des GPR107-Proteins am retrograden Transport von Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum.

Aufgrund des strukturellen Aufbaus des GPR107-Proteins, sowie auch des unten beschriebenen GPR108-Proteins, mit einer sogenannten GOLD (*golgi-dynamics*)-Domäne und den sieben Transmembrandomänen werden diese beiden Proteine auch der 2022 neu definierten Gruppe der GOST (*GOLD-domain seven-transmembrane helix protein*)-Proteine zugeordnet (Hoel *et al.*, 2022). Neben der Struktur ist den acht Mitgliedern dieser Gruppe die Lokalisation im Golgi-Apparat und die vermutete Beteiligung am intrazellulären Proteintransport von oder zu Golgi-Apparat gemein.

Weiterhin scheint die Expression des GPR107-Proteins für diverse Toxine eine essentielle Voraussetzung für deren adäquate Infektion der Zellen darzustellen. Die toxische Wirkung sowohl des *Pseudomonas* Exotoxin A (Tafesse *et al.*, 2014) als auch die des cytolethal distending toxin des *Campylobacter jejuni* (cjCDT) (Carette *et al.*, 2011; Tafesse *et al.*, 2014) und die des Lektins Ricin (Elling *et al.*, 2011) stellt sich in Zellen ohne Expression des GPR107-Proteins deutlich verringert dar.

Ebenfalls einen fundamentalen Einfluss scheint das GPR107-Protein auf die Expression diverser Membranrezeptoren auszuüben (Zhou *et al.*, 2014). Zu diesen Rezeptoren zählen zum einen Multiligandenrezeptoren wie der Cubilin-Megalin Endozytose Rezeptor Komplex oder das *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), zum anderen jedoch auch Rezeptoren, welche lediglich einen spezifischen Liganden binden, wie beispielsweise der Transferrinrezeptor 1 (TFRC1). Diese Rezeptoren weisen in *GPR107* Knockout Zellen eine signifikant verringerte Expression auf sowie eine wesentlich geringere Rezeptordichte an der Zelloberfläche. Ursächlich hierfür wird ein gestörtes intrazelluläres *Trafficking* angenommen, wobei diese Hypothese durch die partielle Kollokalisierung des GPR107-Proteins mit Clathrin, sowie mit dem Zellmarker EEA1, welcher frühe Endosomen markiert, untermauert wird. Zudem scheint das GPR107-Protein mit dem vacuolar protein sorting 35 (VPS35) assoziiert zu sein. Sowohl Clathrin als auch VPS35 sind dabei wesentlich an intrazellulären Transportmechanismen, wie beispielsweise der Clathrin-assoziierten Endozytose (Goldstein *et al.*, 1979) oder dem Transport zwischen Endosomen und dem Golgi-Apparat (Seaman *et al.*, 1998), beteiligt.

Die Relevanz des GPR107-Proteins zeigt sich letztendlich auch durch die Letalität eines homozygoten *GPR107* Knockouts (Zhou *et al.*, 2014). Hierdurch intensiviert sich zudem die Vermutung der Beteiligung des GPR107-Proteins an fundamentalen Prozessen der Zellen.

2.3 Der G-Protein gekoppelte Rezeptor 108

Auch bei dem GPR108-Protein handelt es sich um ein bisher nur wenig erforschtes Mitglied der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Ebenso wie das GPR107-Protein wird auch dieses der sogenannten LUSTER-Familie zugeordnet und bildet, gemeinsam mit dem GPR107-Protein, die im Menschen aus lediglich zwei Vertretern bestehende LUSTER A-Subfamilie (Edgar, 2007). Das aus diesem Grund auch als LUSTER 2 bezeichnete GPR108-Protein konnte erstmalig aus einer murinen Lunge isoliert werden. Das Gen des *GPR108* besteht aus 17 Exons und lokalisiert im Menschen auf Chromosom 19 an Position 19p13.3. Ebenso wie das GPR107-Protein lässt sich auch das GPR108-

Protein sowohl in den meisten Geweben des Menschen als auch in den meisten eukaryotischen Spezies nachweisen. Strukturell setzt sich das GPR108-Protein, ähnlich wie das GPR107-Protein, aus einem hydrophoben N-terminalen Signalpeptid, einem langen extrazellulären Segment, der aus vermutlich sieben Transmembrandomänen bestehenden LUSTER-Domäne sowie einem intrazellulären C-Terminus zusammen. Gleichmaßen wie das GPR107-Protein zeigt auch das GPR108-Protein lediglich eine sehr geringe Ähnlichkeit zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, weist jedoch 49 % identische Aminosäuren mit dem GPR107-Protein auf. Vergleicht man die Kyte und Doolittle Hydrophathieblots (Kyte *and* Doolittle, 1982) des GPR107- und des GPR108-Proteins miteinander, so wird deutlich, dass insbesondere die LUSTER-Domänen dieser beiden Proteine eine ausgeprägte Analogie zueinander aufweisen (Abb. 2).

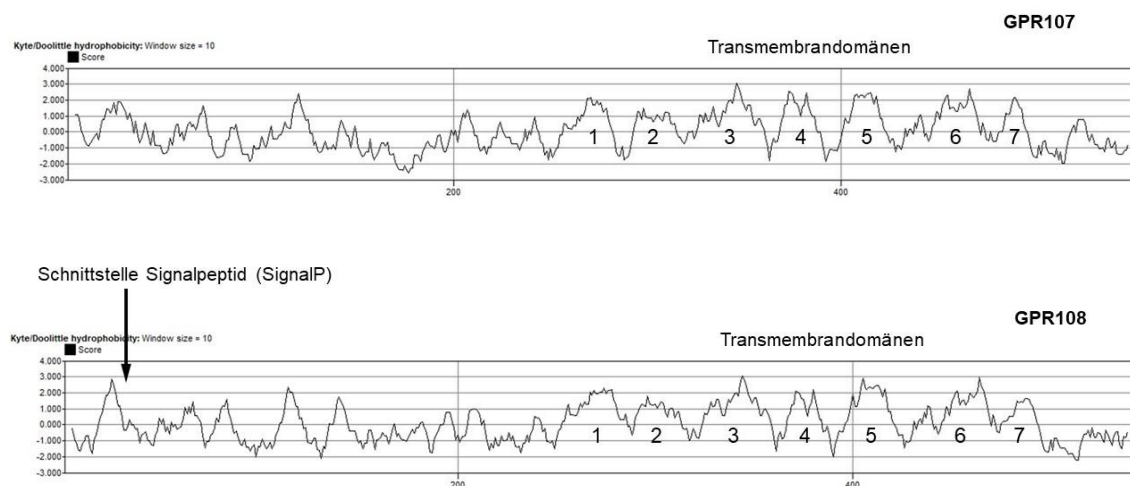


Abb. 2: Vergleich der Kyte und Doolittle Hydrophathieblots des GPR107- und GPR108-Proteins.

Auf der X-Achse sind die Aminosäuresequenzen des GPR107-, beziehungsweise des GPR108-Proteins aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren. Eine putative Signalpeptidase-Schnittstelle des GPR108-Proteins ist eingezeichnet (Pfeil). C-terminal ist für beide Proteine eine mögliche Konstellation der Transmembrandomänen dargestellt. Aufgrund dieser potentiellen sieben Transmembrandomänen werden beide Proteine der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Abbildung: erstellt mit Accelrys Gene (Version 2.5, 2006, Accelrys Inc., San Diego, USA)

Ebenso wie das GPR107-Protein besitzt auch das GPR108-Protein ein Signalpeptid am N-Terminus des Proteins. Die durch das Programm SignalP mit einer Wahrscheinlichkeit von 51 % prognostizierte Schnittstelle dieses Signalpeptids ist in dem Hydrophathieblot entsprechend gekennzeichnet. Äquivalent zu der des GPR107-Proteins befindet sich auch hier die potentielle Signalpeptidase-Schnittstelle zwischen den beiden Aminosäuren Glycin (G₃₂) und Arginin (R₃₃) (Edgar, 2007).

Ebenfalls analog zu dem GPR107-Protein konnte auch für das GPR108-Protein eine vorwiegende Lokalisation im Golgi-Apparat identifiziert werden. Dabei lässt sich diese

zum einen durch die Kolo­kalisierung mit den Markern Giantin und GM130 im Cis-Golgi-Netzwerk (Dong *et al.*, 2018), zum anderen durch die Kolo­kalisierung mit dem Marker TGN46 auch im Trans-Golgi-Netzwerk (Dudek *et al.*, 2020) nachweisen.

Über die exakte Funktion des GPR108-Proteins ist bisher sehr wenig bekannt. Im Rahmen des angeborenen Immunsystems scheint dieses Protein allerdings eine wesentliche Bedeutung in der Regulation der Immunantwort einzunehmen (Dong *et al.*, 2018). Hierbei scheint das GPR108-Protein durch seine Interaktion mit den Adapterproteinen MyD88 und TRAF6 einen wichtigen Antagonisten der Toll-like-Rezeptor vermittelten Immun­kaskade darzustellen. Die Expression des GPR108-Proteins unterliegt dabei den Regulationsmechanismen des Adapterproteins TIRAP. Auf diese Weise schützt die Expression des GPR108-Proteins in gewisser Weise vor einer überschießenden Inflammation und trägt somit zu einem adäquaten Ausmaß der Toll-like-Rezeptor vermittelten Immunantwort bei. Dem entgegengesetzt ist das GPR108-Protein bei Überexpression jedoch auch in der Lage, als Aktivator des Transkriptionsfaktors NFκB zu agieren.

Eine weitere Funktion des GPR108-Proteins hinsichtlich des angeborenen Immunsystems konnte für die antivirale Immunantwort auf eine zelluläre Infektion mit RNA- und DNA-Viren gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2023). Das GPR108-Protein stellt dabei einen wichtigen Regulator des Typ-1-Interferon-Signalweges dar. Über eine direkte Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase Smurf 1 (*Smad ubiquitylation regulatory factor 1*) und einem hieraus resultierenden vermehrten Abbau von IRF3 (*INF regulatory factor 3*) kommt es durch das GPR108-Protein durch eine verringerte Interferon-Produktion zu einer Suppression der antiviralen Immunantwort. Somit stellt das GPR108-Protein einen potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antiviraler Therapien dar.

Eine ebenfalls zentrale Bedeutung weist das GPR108-Protein für die Aufnahme Adeno-assoziiierter Viren (AAV) in die Zelle auf (Dudek *et al.*, 2020). Adeno-assoziierte Viren stellen als virale Vektoren die Grundlage der modernen AAV-basierten Gentherapie dar, mit Hilfe derer ein gezieltes Einbringen von DNA-Sequenzen in Zielzellen bei der Therapie einer Vielzahl verschiedener Erkrankungen ermöglicht wird (Kotterman *and* Schaffer, 2014). Das GPR108-Protein stellt hierbei eine essentielle Voraussetzung für die optimale Infektion nahezu aller AAV-Serotypen dar, weshalb sich die Infektion in *GPR108* Knockout Zellen erheblich verringert zeigt (Dudek *et al.*, 2020). Aufgrund seiner Lokalisation innerhalb des Golgi-Apparates wird für das GPR108-Protein dabei am ehesten eine Beteiligung bei der Freisetzung der AAVs in das Golgi-Netzwerk oder eine Beteiligung an dem dortigen *Trafficking* vermutet (Dudek *et al.*, 2020; Meisen *et al.*, 2020).

2.4 Neuronostatin als potentieller Ligand des GPR107-Proteins

Wie es bei allen Mitgliedern der LUSTER-Familie der Fall ist, sind sowohl für das GPR107- als auch für das GPR108-Protein bisher keine Liganden bekannt, weshalb diese dementsprechend den sogenannten *orphan* G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden (Edgar, 2007). Mit dem Peptidhormon Neuronostatin rückt jedoch fortwährend ein potentieller Ligand des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 in den Fokus. Dieses aus 13 Aminosäuren bestehende und C-terminal amidierter Peptidhormon wird gleichermaßen wie das Peptidhormon Somatostatin durch das Somatostatin-Gen codiert, sowie aus demselben Präprohormon gebildet (Samson *et al.*, 2008). Ebenso wie das GPR107-Protein, welches in vielen Geweben exprimiert wird, lässt sich auch Neuronostatin in vielen verschiedenen Geweben nachweisen, in welchen die Applikation dieses Hormons jedoch sehr unterschiedliche Auswirkungen zur Folge hat. Das GPR107-Protein könnte hierbei an Neuronostatin-vermittelten Effekten beteiligt sein.

Beispielsweise hat Neuronostatin einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des mittleren arteriellen Blutdrucks (Samson *et al.*, 2008). Dieser erhöht sich nach intracerebroventrikulärer Applikation von Neuronostatin signifikant, wobei die Expression des GPR107-Proteins eine hierfür essentielle Voraussetzung darstellt (Yosten *et al.*, 2012). Eine weitere Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein lässt sich im Rahmen der Glucosehomöostase beobachten. Unter Anwesenheit des GPR107-Proteins induziert die Zugabe von Neuronostatin auf α -Zellen des Pankreas sowohl eine Erhöhung der Expression des Proglukagons als auch eine verstärkte Sekretion des hieraus gebildeten Glukagons (Elrick *et al.*, 2015). In diesen Zellen lässt sich darüber hinaus, als weiterer Hinweis auf eine mögliche Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein, eine zumindest partielle Kolo-kalisation beider Proteine feststellen. Auch auf die Proliferation von Präadipozyten scheint die Interaktion dieser beiden Proteine einen wesentlichen Einfluss auszuüben (Jasaszili *et al.*, 2021). Hierbei resultiert eine fehlende Expression des GPR107-Proteins in einer wesentlich verringerten Neuronostatin-induzierten Proliferation dieser Zellen.

Die exakten Signalwege, durch welche das Peptidhormon Neuronostatin, beziehungsweise das GPR107-Protein, letztendlich ihre finalen Wirkungen erreichen, sind momentan weitgehend unbekannt. Jedoch konnte mehrfach ein durch Neuronostatin induzierter Anstieg der Phosphorylierung der Proteinkinase A sowie der Phosphorylierung der Serin/Threonin-Proteinkinase Akt festgestellt werden (Elrick *et al.*, 2015; Jasaszili *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020). Dabei scheint das GPR107-Protein in diesen Effekt involviert zu sein und möglicherweise eine wichtige Voraussetzung für diesen potentiellen Signalweg darzustellen (Elrick *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). Darüber hinaus wird die

Expression des GPR107-Proteins selbst in Folge der Applikation des Neuronostatins wesentlich erhöht.

Eine Ausnahme hierzu bildet die Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein in androgenunabhängigen Prostata-Karzinomen (Sáez-Martínez *et al.*, 2020). Hier lässt sich eine erhebliche Down-Regulierung des GPR107-Proteins durch Neuronostatin beobachten. Vorwiegend in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien weisen diese Karzinome darüber hinaus eine zunehmende Überexpression des GPR107-Proteins auf und sind in diesem Fall mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert. Sowohl klinische Parameter wie Metastasierung und Gefäßinvasion als auch molekulare Parameter wie die Expression diverser Gene, welche mit der Migration, der Inflammation oder der Angiogenese des Tumors assoziiert sind, stellen sich nach Überexpression des GPR107-Proteins wesentlich verstärkt dar. Ein direktes Gen-*Silencing* des *GPR107*, jedoch auch eine indirekte, über Neuronostatin induzierte Verringerung des GPR107-Proteins, bewirkt dabei sowohl eine Verringerung der Expression zahlreicher Gene, welche mit der Proliferation, der Migration, sowie der Aggressivität des Tumors assoziiert sind, als auch eine hieraus resultierende verringerte Proliferations- und Migrationsrate des Prostatakarzinoms. Somit deuten auch diese Beobachtungen auf eine potentielle GPR107-vermittelte Wirkung des Neuronostatins hin und bieten darüber hinaus einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Tumorthapien des androgenunabhängigen Prostata-Karzinoms.

Inwieweit die gesamten in diesem Kapitel beschriebenen Hinweise auf eine Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein auf eine tatsächliche Liganden-Rezeptor-Beziehung dieser beiden Proteine zurückzuführen sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und obliegt damit künftigen Untersuchungen.

2.5 Die Rolle des GPR107-Proteins in der Medizin – Das Cervix-Karzinom

Durch die entscheidende Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren bei der Signaltransduktion und somit bei der zellulären Reaktion auf extrazelluläre Stimuli ist es nicht verwunderlich, dass diese Rezeptoren auch wesentlich an pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind (Shenker, 1995). Auch bei der Tumorentstehung sowie dessen Proliferation scheinen Veränderungen bestimmter G-Protein gekoppelter Rezeptoren eine zentrale Bedeutung einzunehmen (Dorsam *and* Gutkind, 2007). Ein genaues Verständnis dieser Vorgänge stellt damit eine essentielle Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

Betrachtet man die zahlreichen in Tumoren auftretenden Mutationen, so ist es wichtig, sogenannte Driver-Mutationen von Passenger-Mutationen zu unterscheiden. Während sich für Driver-Mutationen ein kausaler Zusammenhang in Bezug auf die Tumorentwicklung sowie dessen Proliferation herstellen lässt, ist dies bei den Passenger-Mutationen nicht der Fall (Greenman *et al.*, 2007). Driver-Mutationen sind dabei gehäuft mit bestimmten Tumoren assoziiert und lassen sich bei Vorliegen dieser Mutation in nahezu allen Tumorzellen nachweisen. Das Gen des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 wird in einer aktuellen Studie als potentiell Driver-Gen in der Entstehung des Cervix-Karzinoms beschrieben (Xu *et al.*, 2021). In dieser Studie erfolgte eine ausgedehnte Untersuchung auf das Vorkommen unterschiedlicher Mutationen in Cervix-Karzinomen, wobei sowohl Plattenepithelkarzinome als auch Adenokarzinome und Mischformen eingeschlossen wurden. Mit Hilfe einer systematischen Klassifizierung der ermittelten Mutationen unter der Berücksichtigung der vier Kriterien somatische Mutationen, Variationen der Kopienanzahl, DNA Methylierung und dem miRNA-Profil wurde letztendlich ein multidimensionales Datenset erstellt. Eine hierauf aufbauende Mut2sigC-Analyse ermöglichte die Identifikation zehn potentieller Driver-Gene des Cervix-Karzinoms, wobei als eines dieser möglichen Driver-Gene das Gen des *GPR107* genannt wird. Da Driver-Mutationen oftmals bedeutende Möglichkeiten in der Entwicklung einer zielgerichteten Tumorthherapie bieten sowie auch eine mögliche Funktion als tumorspezifische Biomarker eröffnen ist es von Interesse, ein Verständnis dieser Driver-Gene sowie deren Translationsprodukte zu erhalten.

2.6 Die Rolle des GPR108-Proteins in der Medizin – Beeinflussung von Karzinomen

Da Veränderungen bestimmter G-Protein gekoppelter Rezeptoren eine zentrale Bedeutung in der Tumorentstehung sowie der Tumorpherifation einzunehmen scheinen (Dorham and Gutkind, 2007), wurde auch das GPR108-Protein bereits bezüglich einer möglichen Beeinflussung bestimmter Karzinome untersucht. Insbesondere in kolorektalen Karzinomen, Pankreaskarzinomen und Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte dabei ein deutlich erhöhtes Level des GPR108-Proteins in den Tumorzellen nachgewiesen werden, wobei durch das GPR108-Protein in diesen Zellen beispielsweise ein signifikant verstärktes Tumorstachstum zu resultieren scheint (Lyu *et al.*, 2022). Ursächlich zeigt sich dabei zumindest teilweise die bereits in einer früheren Arbeit nachgewiesene Aktivierung des onkogenen Transkriptionsfaktors NFkB und dessen Signalkaskade durch das GPR108-Protein (Dong *et al.*, 2018). In *GPR108* Knockout Tumorzellen

konnte dementsprechend eine deutliche Beeinträchtigung der Aktivierung von NFκB und im Weiteren auch des Tumorwachstums registriert werden (Lyu *et al.*, 2022).

Das Xanthonoid Gamboginsäure stellt dabei einen potentiellen Inhibitor des GPR108-Proteins dar (Lyu *et al.*, 2022). Durch eine direkte Interaktion des GPR108-Proteins mit der Gamboginsäure konnte in den Tumorzellen ein verstärkter Abbau des GPR108-Proteins sowie in der Folge eine signifikante Verringerung der NFκB-Aktivierung und anschließend ein verringerter Tumorprogress nachgewiesen werden. Somit ergibt sich mit dem GPR108-Protein ein wichtiger potentieller Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapien in der Karzinombehandlung. Aus diesem Grund ist es von Interesse, ein noch genaueres Verständnis des G-Protein gekoppelten Rezeptors 108 zu erlangen.

2.7 Ziel dieser Arbeit

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren stellt die größte Gruppe unter den humanen Membranproteinen dar (Lv *et al.*, 2016). Neben der Beteiligung an einer Vielzahl physiologischer Prozesse bilden diese Proteine zudem einen der wichtigsten Ansatzpunkte verschiedener medikamentöser Therapien (Santos *et al.*, 2017). Aus diesem Grund ist ein genaues Verständnis der einzelnen Rezeptoren dieser Gruppe von großer Bedeutung in der aktuellen Forschung, sowohl für den Einblick in physiologische Mechanismen als auch für die Entwicklung neuer Arzneimittel.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Mitglieder dieser Proteinfamilie untersucht werden. Die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 wurden bisher nur wenig erforscht und werden aufgrund der bislang nicht identifizierten Liganden der Gruppe der *orphan* G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Für ein genaueres Verständnis dieser Rezeptoren sollten in dieser Arbeit zum einen die intrazelluläre Lokalisation sowie eine mögliche Spaltung der beiden Proteine durch Furin-artige Proteasen näher untersucht werden, zum anderen aber auch funktionelle Aspekte der Rezeptoren beleuchtet werden. Hierfür sollten insbesondere die Einflüsse des GPR107- und des GPR108-Proteins auf die intrazelluläre Calciumhomöostase exprimierender Zellen untersucht werden. Des Weiteren sollten zudem die Kopplung der beiden Proteine an mögliche intrazelluläre G-Protein abhängige Signalkaskaden sowie der Einfluss potentieller Liganden des GPR107-Proteins untersucht werden.

3. Material und Methodik

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Angabe der Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose GTQ	Roth
Ampicillin	Sigma Aldrich
Beclomethasone	Sigma Aldrich (B0385-100MG)
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BTP2	MedChemExpress, Monmouth Junction, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbamylcholinchlorid (CCh)	Sigma Aldrich (C4382-10G)
Corticosterone	Sigma Aldrich (27840-100MG)
Dexamethasone	Sigma Aldrich (D4902-25MG)
DMSO	AppliChem BioChemica, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth
EDTA	AppliChem BioChemica
EGTA	AppliChem BioChemica (A0878,0025)
Ethanol	Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Ethidiumbromid	Roth
Fura-2-AM	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (F1221)
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
H ₂ O _{VE}	Milli-Q Millipore
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
Hydrocortisone	Sigma Aldrich (H4001-1G)
Isopropanol	Fisher Chemical
Kaliumchlorid 99,5% (KCl)	Grüssing, Filsum, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Grüssing
Kanamycin	Sigma Aldrich
Lipofectamine 3000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid (MgCl)	Roth
Methanol	Fisher Chemical
Natriumchlorid 99,5% (NaCl)	Grüssing
Neomycin	Sigma Aldrich
Neuronostatin-13	PeptaNova (4452-v), Sandhausen, Deutschland
Optimem	Gibco by Thermo Fisher Scientific
P 3000	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
Phospholipase C-Inhibitor aktiv U73122	Sigma Aldrich (U6756-5MG)
Phospholipase C-Inhibitor inaktiv U73343	Sigma Aldrich (U6881-5MG)
Poly-L-Lysine	Sigma Aldrich
Ponceau S	Roth
Prednisolone21-acetate	Sigma Aldrich (P8650-1G)
Suramin	Acros Organics (328540500), Geel, Belgien
SDS	AppliChem BioChemica
Thapsigargin	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (T7459)
Trichloressigsäure	Roth
TRIS	Roth
TRIS-HCl	Roth
Trypsin/ EDTA	Sigma Aldrich
Trypton/ Pepton aus Casein	Roth
Tween 80	AppliChem BioChemica

3.2 Lösungen für molekularbiologische Experimente

Agarose-Gel:

300 ml 1 X TBE

0,8 % (w/v) oder 2 % (w/v) Agarose GTQ

15 µl Ethidiumbromid

LB-Agar (*Lysogeny broth*):

LB-Medium

1,5 % (w/v) Agar-Agar

0,1 % (v/v) Ampicillin (50 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml)

Autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min)

LB-Medium (*Lysogeny broth*); pH 7,0:

1% (w/v) Trypton/ Pepton aus Casein

1 % (w/v) Natriumchlorid

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

Autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min)

TBE-Puffer; pH 8,0:

89 mM TRIS-Base

89 mM Borsäure

2 mM EDTA

Autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min)

3.3 Lösungen für proteinbiochemische Experimente

2 X Lämmli-Puffer:

120 mM TRIS-HCl; pH 6,8

20 % (v/v) Glycerin

10 % (v/v) β-Mercaptoethanol

8 % (w/v) SDS

0,01 % (w/v) Bromphenolblau

TBS-Puffer; pH 7,5:

50 mM TRIS-HCl

150 mM Natriumchlorid

TBST-Puffer; pH 7,5:

50 mM TRIS-HCl

150 mM Natriumchlorid

0,1 % (v/v) Tween 80

SDS-Laufpuffer:

25 mM TRIS; pH 8,3

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Stripping-Puffer:

62,5 mM TRIS-HCl; pH 6,8

2 % (w/v) SDS

0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Ponceau:

3 % (v/v) Trichloressigsäure

2 % (w/v) Ponceau

3.4 Lösungen für Calcium Imaging Experimente

B1-Puffer; pH 7,4:

115 mM Natriumchlorid

10 mM HEPES

5 mM Kaliumchlorid

2 mM Magnesiumchlorid + 6 H₂O

Autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min)

Tabelle 2: Lösungen für Calcium Imaging Experimente mit Angabe der verwendeten Konzentrationen.

Calcium-Experimente	5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer
Carbachol-Experimente	400 μ M Carbachol in B1-Puffer 100 μ M Carbachol + 5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer
TRPC4-Experimente	20 μ M Thapsigargin in B1-Puffer 1 mM Carbachol + 2,5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer
Neomycin-Experimente	0,5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer 2,5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer 2 mM Neomycin + 0,5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer
Phospholipase C-Inhibitor-Experimente	20 μ M U73122 in B1-Puffer 20 μ M U73122 + 5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer 20 μ M U73343 in B1-Puffer 20 μ M U73343 + 5 mM CaCl ₂ in B1-Puffer

BTP2-Experimente	10 μM BTP2 in B1-Puffer 10 μM BTP2 + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer
EGTA-Experimente	2 mM CaCl_2 in B1-Puffer 10 mM Na-EGTA in B1-Puffer 4 mM CaCl_2 in B1-Puffer
Neuronostatin-Experimente	100 nM Neuronostatin in B1-Puffer 100 nM Neuronostatin + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 nM Neuronostatin + 400 μM Carbachol in B1-Puffer 100 nM Neuronostatin + 100 μM Carbachol + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer
Suramin-Experimente	240 nM Suramin in B1-Puffer 240 nM Suramin + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 240 nM Suramin + 400 μM Carbachol in B1-Puffer 240 nM Suramin + 100 μM Carbachol + 5 mM CaCl_2 B1-Puffer
Glucocorticoid-Experimente	10 μM Beclomethason in B1-Puffer 10 μM Beclomethason + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 μM Beclomethason + 2,5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 10 μM Corticosteron in B1-Puffer 10 μM Corticosteron + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 μM Corticosteron + 2,5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 10 μM Dexamethason in B1-Puffer 10 μM Dexamethason + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 μM Dexamethason + 2,5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 10 μM Hydrocortison in B1-Puffer 10 μM Hydrocortison + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 μM Hydrocortison + 2,5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 10 μM Prednisolon in B1-Puffer 10 μM Prednisolon + 5 mM CaCl_2 in B1-Puffer 100 μM Prednisolon + 2,5 mM CaCl_2 in B1-Puffer

3.5 Lösungen Zellkultur

PBS-Puffer; pH 7,4:

137 mM Natriumchlorid

8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

2,7 mM Kaliumchlorid

1,5 mM KH_2PO_4

Autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min)

3.6 Vektoren

Alle Klonierungen für diese Arbeit erfolgten in den Vektoren pCAGGS-IRES-GFP (Philipp *et al.*, 2003) oder pMax (Lonza, Basel, Schweiz). Beide Vektoren ermöglichen dabei eine sehr effiziente Expression fremder DNA in Säugetierzellen.

Die Expression des pCAGGS-IRES-GFP beziehungsweise dessen klonierter cDNA-Sequenz wird durch einen CAG-Promoter, bestehend aus dem humanen CMV-IE Enhancer und einem AG Promoter, kontrolliert (Niwa *et al.*, 1991). Durch die interne ribosomale Eintrittssequenz (IRES) wird eine separate Translation der klonierten cDNA und des GFP-Proteins ermöglicht. Darüber hinaus weist der Vektor eine Resistenz gegenüber Ampicillin auf, sodass man diesen Vektor in *E. coli* vermehren kann.

Auch die Expression des pMax wird über den Promoter des Cytomegalievirus kontrolliert (bioscience.lonza.com). Im Gegensatz zu dem Vektor pCAGGS weist der pMax eine Resistenz gegenüber Kanamycin auf.

3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase Kettenreaktion lässt sich eine bestimmte DNA-Sequenz amplifizieren. Dies wird durch mehrere Zyklen rascher und spezifischer Temperaturänderungen in einem Thermocycler (T100 Thermal Cycler, Biorad, Hercules, USA) erreicht. Jeder dieser Zyklen besteht dabei aus denselben drei aufeinanderfolgenden Phasen.

Während des ersten Schritts, der Denaturierungsphase, wird der Cycler zunächst auf 98 °C erhitzt. Um hierbei eine Kondensatbildung an den Deckeln zu verhindern, müssen auch diese auf die entsprechende Temperatur erwärmt werden. Durch diese hohen Temperaturen resultiert ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-

Basen, wodurch die DNA-Doppelstränge voneinander getrennt werden. Die DNA bleibt dementsprechend als Einzelstränge zurück. In einem zweiten Schritt folgt nun die Primer-Hybridisierung. Hierzu muss die Temperatur zunächst auf etwa 60 °C gesenkt werden, um eine Anlagerung der Primer an ihre jeweiligen Sequenzen zu ermöglichen. Abhängig ist diese *Annealing*-Temperatur dabei sowohl von der Länge der Primer als auch von deren Basenfolge. Dabei erhöht sich die nötige Temperatur zum einen mit zunehmender Länge der Primer, zum anderen mit zunehmender Anzahl der in der Primer-Sequenz enthaltenen Basen Guanin und Cytosin. Die beiden Primer-Sequenzen werden so gewählt, dass diese die zu vervielfältigende Sequenz einschließen, wobei sie jeweils auf den zueinander komplementären Strängen binden. Außerdem ist es möglich, durch ein gezieltes Austauschen einer Base innerhalb der Primer-Sequenz eine Mutation in die entstehenden PCR-Amplifikate einzubauen. Im Anschluss an die Hybridisierung der Primer an ihre spezifischen Zielsequenzen folgt die dritte Phase des PCR-Zyklus, die Elongation. In diesem Schritt werden die angelagerten, zum vorliegenden Matrizenstrang komplementären Basen durch die Taq-Polymerase, beginnend am 3'-Ende des Primers, miteinander verknüpft. Um dabei für die Polymerase optimale Bedingungen herzustellen, wird die Temperatur im Cycler während dieser Phase auf 72 °C erhöht. Aus dieser letzten Phase resultiert ein neuer Doppelstrang, welcher wiederum im folgenden Zyklus als Matrize dienen kann.

Das exakte Temperaturschema der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen ist im Folgenden dargestellt.

98 °C 1 min		Einmalig zu Beginn
98 °C 5 s	(Denaturierung)	} 25 Zyklen dieser 3 Phasen
60 °C 10 s	(Primer-Hybridisierung)	
72 °C x min	(Elongation)	
72 °C 2 min		Einmalig am Ende

Die Elongationszeit ist dabei abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Dabei wurde jeweils mit etwa 20 Sekunden pro Kilobasenpaar gerechnet. Die hierdurch errechneten Elongationszeiten für die einzelnen Konstrukte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Klonierte Konstrukte mit Angabe der verwendeten PCR-Elongationszeiten.

Zu klonierendes Konstrukt	Elongationszeit
GPR107 Δ 44-178-IGFP pCAGGS	30 s
GPR107-(179GFP) pMax	1 min 30 s
GPR107-(179GFP)-RFP pMax	1 min 50 s

GPR107-(179GFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-RFP pMax	2 min
GPR107-(E ₄₂₈ A)-(D ₄₃₃ A)-GFP pMax (Pore)	1 min 50 s
GPR107-(K ₄₄₂ A)-(K ₄₄₄ A)-(R ₄₄₇ A)-GFP pMax (G-Protein-Bindungsstelle)	1 min 50 s
GPR107-(47RFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP pMax	1 min 50 s
GPR108-(169RFP)-GFP pMax	2 min
GPR108 Δ169-543-RFP pMax	1 min 40 s
GPR108 Δ35-168-GFP pMax	1 min 40 s
GPR108 Δ35-176-GFP pMax	1 min 40 s
GPR108 Δ169-543-GFP pMax	1 min 30 s
GPR108-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax	2 min
GPR108-(169RFP)-(SKPK ₁₇₃ RRAR)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP pMax	2 min
GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax	2 min
GPR108-(169RFP) pMax	1 min 50 s
GPR108 Δ169-543-IGFP pCAGGS	15 s
GPR108 Δ35-168-IGFP pCAGGS	30 s

Für die Durchführung der PCR wurden im Voraus alle benötigten Substanzen in ein gemeinsames Reaktionsgefäß pipettiert. Das hierzu verwendete Pipettierschema ist im Folgenden dargestellt.

10,0 µl GC-Puffer (Mobidiag, Espoo, Finnland)
5,0 µl GC-Enhancer (NEB, Ipswich, USA)
2,5 µl Primer forward (Eurofins Genomics, Luxemburg, Luxemburg)
2,5 µl Primer reverse (Eurofins Genomics)
1,0 µl Template
1,0 µl dNTPs (Peglab, Erlangen, Deutschland)
0,5 µl S7 Fusion Polymerase (Mobidiag)
27,5 µl H₂O

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 mittels verschiedener Konstrukte auf ihre intrazelluläre Lokalisation sowie auf ihre möglichen Funktionen untersucht. Die für diese Experimente klonierten Konstrukte der beiden Proteine sind in Tabelle 4 (GPR107) und Tabelle 5 (GPR108), zusammen mit der für die PCR verwendeten Primer und dem verwendeten Template, aufgelistet. Außerdem findet sich im Anschluss eine Auflistung der exakten Sequenzen der aufgeführten Primer mit Angabe des Vorliegens einer 5'-Phosphorylierung als 5'-Pho (Tabelle 6 (GPR107) und Tabelle 7 (GPR108)). Darüber hinaus verwendete Konstrukte sowie deren Herkunft sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 4: Auflistung aller klonierten Konstrukte des GPR107 mit Angabe der verwendeten Primer und des Templates.

Klon	Primer	Template
GPR107 Δ 44-178-IGFP pCAGGS Klon 8 und 11 (08.09.20)	UW 2329B UW 2330	GPR107 Δ 44-178-GFP pMax Klon 3 (27.07.20)
GPR107-(179GFP) pMax Klon 10 und 11 (01.10.20)	UW 2378 UW 2330 UW 2671 UW 2672	GPR107-GFP pMax Klon 11 (05.05.17)
GPR107-(179GFP)-RFP pMax Klon 4 und 11 (02.10.20)	UW 2671 UW 2672	GPR107-RFP pMax Klon 18 (16.08.20)
GPR107-(179GFP)- (KSKR ₁₇₉ AAAA)-RFP pMax Klon 3 und 5 (13.10.20)	UW 2272 UW 2724	GPR107-(179GFP)-RFP pMax Klon 11 (02.10.20)
GPR107-(E ₄₂₈ A)-(D ₄₃₃ A)-GFP pMax (Pore) Klon 2 und 4 (13.11.20)	UW 2767 UW2768	GPR107-GFP pMax Klon 6 (05.05.17)
GPR107-(K ₄₄₂ A)-(K ₄₄₄ A)-(R ₄₄₇ A)- GFP pMax (G-Protein-Bindungs- stelle) Klon 3 und 4 (15.12.20)	UW 2781 UW 2782	GPR107-GFP pMax Klon 6 (05.05.17)
GPR107-(47RFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)- GFP pMax Klon 4 (14.01.21)	UW 2779 UW 2780	GPR107-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP pMax Klon 5 (08.06.18)

Tabelle 5: Auflistung aller klonierten Konstrukte des GPR108 mit Angabe der verwendeten Primer und des Templates.

Klon	Primer	Template
GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 7 und 9 (19.05.20)	UW 2695 UW 2696	GPR108-GFP pMax Klon 21 (05.05.17)
GPR108 Δ 169-543-RFP pMax Klon 2 und 3 (25.05.20)	UW 1069 UW 2378	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108 Δ 35-168-GFP pMax Klon 5 und 6 (16.06.20)	UW 2696 UW 2697	GPR108-GFP pMax Klon 21 (05.05.17)
GPR108 Δ 35-176-GFP pMax Klon 5 und 6 (16.06.20)	UW 2697 UW 2698	GPR108-GFP pMax Klon 21 (05.05.17)
GPR108 Δ 169-543-GFP pMax Klon 4 und 5 (19.06.20)	UW 2167 UW 2695	GPR108-GFP pMax Klon 21 (05.05.17)
GPR108-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 4 (26.06.20)	UW 2467 UW 2468	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108-(169RFP)- (SKPK ₁₇₃ RRAR)-GFP pMax Klon 1 und 2 (17.07.20)	UW 2735 UW 2736	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)-GFP pMax Klon 3 und 4 (17.07.20)	UW 2740 UW 2741	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP pMax Klon 5 und 6 (17.07.20)	UW 2738 UW 2739	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 2 und 3 (27.07.20)	UW 2740 UW 2741	GPR108-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 4 (26.06.20)
GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 3 und 4 (27.07.20)	UW 2738 UW 2739	GPR108-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 4 (26.06.20)
GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)- GFP pMax Klon 2 und 3 (04.08.20)	UW 2740 UW 2741	GPR108-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)-GFP pMax Klon 6 (17.07.20)
GPR108-(R ₉₂ F)-(R ₁₆₂ F)-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 4 und 5 (04.08.20)	UW 2738 UW 2739	GPR108-(R ₉₂ F)-(169RFP)- (KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax Klon 3 (27.07.20)

GPR108-(169RFP) pMax Klon 4 und 5 (18.08.20)	UW 2333 UW 2378	GPR108-(169RFP)-GFP pMax Klon 9 (19.05.20)
GPR108 Δ 169-543-IGFP pCAGGS Klon 2 (02.09.20)	UW 2332 UW 2748	GPR108-GFP pMax Klon 21 (05.05.17)
GPR108 Δ 35-168-IGFP pCAGGS Klon 6 (15.09.20)	UW 2332 UW 2333	GPR108 Δ 35-168-GFP pMax Klon 5 (16.06.20)

Tabelle 6: Verwendete Primer für Konstrukte des GPR107 mit Angabe der Primer-Sequenzen und einer vorliegenden 5'-Phosphorylierung.

Primer	Sequenz 5' zu 3'
UW 2167	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG; 5'-Pho
UW 2272	CTTGTACAGCTCGTCCATGCC; 5'-Pho
UW 2329B	CCGCCGCCACCATGGCCGCTCTGGCGCCC; 5'-Pho
UW 2330	TCACACGGCGCCTTCCCAC; 5'-Pho
UW 2378	ATCTCGAGCTCGATGAGTTTGG; 5'-Pho
UW 2671	TCCACCATCTTGTGTCTTCTG
UW 2672	AAGTCTAAAAGAAGTACAGTGG
UW 2724	GCAGCAGCAGCAAGTACAGTGGATTCAAAGGCC; 5'-Pho
UW 2767	TGATGCAGCTTGTAATGTCTGAT; 5'-Pho
UW 2768	GCAACAGCTGGAAAAGCTGCTATT; 5'-Pho
UW 2779	GAGTGCCAGGTGATGGACG
UW 2780	AAGGATGATGTGAGGCATAAAG
UW 2781	CAGGGCTGCTAAGTTAATAGCAGCTTTTC; 5'-Pho
UW 2782	GCCCTTTTCGCCCATATTACGTCTTGATTGTGTG; 5'-Pho

Tabelle 7: Verwendete Primer für Konstrukte des GPR108 mit Angabe der Primer-Sequenzen und einer vorliegenden 5'-Phosphorylierung.

Primer	Sequenz 5' zu 3'
UW 1069	TTAGGCGCCGGTGGAGTG; 5'-Pho
UW 2167	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG; 5'-Pho
UW 2205	ATGGCCTCCTCCGAGGAC; 5'-Pho
UW 2206	GGCGCCGGTGGAGTGGC; 5'-Pho
UW 2332	CCGCCGCCACCATGGCAGTGAGCGAGAGGAGG; 5'-Pho
UW 2333	TCATAACAGTTCCCGCCCGCTG; 5'-Pho
UW 2378	ATCTCGAGCTCGATGAGTTTGG; 5'-Pho

UW 2467	GGCGGCGCTGGCTGCAGAGGTCCC; 5'-Pho
UW 2468	GCCGCCACACCCGCAGTGATTCAGG; 5'-Pho
UW 2695	CCCTCCGCCATCCACCTTGC
UW 2696	ACCTCTGCAGCCAGCAAGCC
UW 2697	GATGCGCCCGGAGCAGCCACCCAAC; 5'-Pho
UW 2698	TCAACACCCGCAGTGATTCAGG
UW 2735	GGCTGCAGAGGTGGCGCC; 5'-Pho
UW 2736	CGGCGGGCACGTTCAACACCCGCAGTGATTCAGGG; 5'-Pho
UW 2738	GGGGACTGTGGCCTGTGG; 5'-Pho
UW 2739	TTCAAGGTGGATGGCGGAGGG; 5'-Pho
UW 2740	GCCAGACCGAACCCGGCTG; 5'-Pho
UW 2741	TTTGTTGCTCCTATTCAACCCGG; 5'-Pho
UW 2748	TCACCCTCCGCCATCCACCTTGC; 5'-Pho

Tabelle 8: Auflistung weiterer verwendeter Konstrukte und deren Herkunft.

Klon	Herkunft
GPR107-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP pMax; Klon 5	Nilloofar Johari
GPR107-(179RFP)-GFP pMax; Klon 7	Nilloofar Johari
GPR107-(179RFP)-(KSKR ₁₇₉ AAAA)-GFP pMax; Klon 4	Verena Nett
GPR107 Δ 183-552-RFP pMax; Klon 8	Verena Nett
GPR107 Δ 183-552-GFP pMax; Klon 5	Verena Nett
GPR107 Δ 44-178-GFP pMax; Klon 3	Verena Nett
GPR107-(185 RFP(hinter SS))-GFP pMax; Klon 2	Verena Nett
GPR107 Δ 183-552-IGFP pCAGGS; Klon 3	Verena Nett
GPR108-(KPKS ₁₇₄ AAAA)-GFP pMax; Klon 2	Nilloofar Johari

3.8 DpnI-Verdau und Gel-Elektrophorese

Um zu gewährleisten, dass sich in dem erhaltenen PCR-Produkt lediglich jene DNA befindet, welche in der weiteren Klonierung vervielfältigt werden soll, wurde im Anschluss an die PCR ein DpnI-Verdau durchgeführt. Hierdurch ist es möglich, die ursprüngliche DNA aus den PCR-Amplifikaten zu entfernen. Die Endonuklease DpnI spaltet dabei die im PCR-Produkt vorliegende methylierte DNA in sehr kleine Fragmente, sodass diese bei der anschließenden Gel-Elektrophorese aufgrund des Längenunterschiedes nicht mehr auf Höhe der gewünschten DNA laufen. Da die PCR-Amplifikate nicht methyliert vorliegen, bleiben diese von der Endonuklease DpnI unbeeinflusst. Durchgeführt wurde der Verdau durch Zugabe von 1 µl DpnI (NEB, Ipswich, USA) in das PCR-Reaktionsgefäß und anschließender Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten.

Mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese erfolgte die Auftrennung der durch die PCR erhaltenen DNA-Amplifikate. Dabei wurde, je nach Länge der amplifizierten DNA, ein 0,8-prozentiges oder ein 2-prozentiges Agarose-Gel verwendet. In einem ersten Schritt wurden den Proben zunächst jeweils 5 µl 6X-Loading Dye (NEB) zugegeben, wodurch später die Laufmittelfront erkennbar ist. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proben in die Taschen des Agarose-Gels. Um später eine Größenzuordnung der Banden zu ermöglichen, wurde in der ersten Spur ein Marker aufgetragen. Verwendet wurden dabei die Marker M9-Marker, pUC18-Marker (Clontech, Mountain View, USA) oder der GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Das Gel befand sich dabei in einer Elektrophorese-Kammer, die mit TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt wurde. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an die Elektrophorese-Kammer werden die DNA-Proben durch die enthaltenen negativ geladenen Phosphate in Richtung der Anode gezogen. Dabei bewegen sich kleinere DNA-Fragmente deutlich schneller durch das Gel, während größere DNA-Fragmente stärker zurückgehalten werden, sodass eine Auftrennung der in der Probe enthaltenen DNA-Abschnitte entsprechend ihrer Größe resultiert. Zum Austreten der einzelnen Proben aus ihren Taschen wurde anfänglich eine Spannung von 80 Volt angelegt, später wurde diese auf 120 Volt erhöht. Durch das im Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid können die Banden nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Im Anschluss erfolgte das Ausschneiden der Banden, und damit der DNA, aus dem Agarose-Gel. Für das anschließende Lösen des Gelblocks sowie das Eluieren der DNA wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit (Promega, Madison, USA) verwendet. Nach Zugabe eines *Membrane-Binding*-Puffers erfolgte zunächst bei 60 °C die Verflüssigung des Gels, anschließend folgte das Isolieren der DNA an einer

Membran in einer Minisäule sowie das Waschen mittels verschiedener Puffer. Die Puffer wurden hierfür in die Säulen eingegeben und jeweils mit 12 900 oder 14 725 rpm (16 000 G) für zwei Minuten durch die Membran zentrifugiert. In einem letzten Schritt erfolgte die Elution der DNA in 25 µl H₂O.

3.9 Ligation

Bei der Ligation handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe die Verknüpfung zweier DNA-Enden ermöglicht wird. Hierdurch kann zum einen ein DNA-Insert in ein durch Restriktionsenzyme linearisiertes Plasmid eingebracht werden, zum anderen kann das Verfahren zur Religation eines Plasmids genutzt werden. Katalysiert wird diese Reaktion dabei durch das Enzym Ligase, welche den 3'-Hydroxy-Terminus des einen DNA-Fragments mit dem 5'-Phosphat-Terminus des anderen DNA-Fragments über eine Phosphodiesterbindung miteinander verbindet. Der für die Ligation verwendete Probenansatz ist im Folgenden aufgeführt.

3 µl DNA

2 µl 10X T4 DNA-Ligase-Puffer mit 10 mM ATP (NEB, Ipswich, USA)

1 µl T4 DNA-Ligase (NEB)

14 µl H₂O

Die Reaktion wurde dabei entweder über zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C in einem Wasserbad durchgeführt. Bei zweistündiger Inkubation erfolgte im Anschluss eine Hitzeinaktivierung für zehn Minuten bei 65 °C.

3.10 Transformation in Escherichia coli Bakterien

Für die anschließende Vervielfältigung einer klonierten DNA wird diese durch eine Transformation mittels eines Plasmids als Vektor in kompetente Zellen eingebracht. Hierfür wurde das Plasmid, welches die zu vervielfältigende DNA enthielt, zunächst mit den aufgetauten kompetenten E. coli Bakterien (5α Competent E. coli, High Efficiency, NEB, Ipswich, USA) vermischt. Für diesen Schritt wurden 20 µl der zuvor durchgeführten Ligation und 50 µl der kompetenten Zellen verwendet. Im Anschluss wurde diese Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis gestellt, wodurch es den Zellen möglich ist, die Plasmide aufzunehmen. In einem nächsten Schritt wurde zur Effizienzsteigerung ein einminütiger

Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 950 µl SOC-Medium (SOC Outgrowth Medium, NEB) und die Inkubation der Bakterien für eine Stunde bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm. Zum Schluss wurden die Bakterien auf Ampicillin oder Kanamycin enthaltenden Agar-Platten ausplattiert und über Nacht für ein optimales Wachstum bei 37 °C in einem Brutschrank gelagert. Um ein gezieltes Wachstum der transformierten Bakterien zu erreichen, wiesen die Plasmide jeweils eine spezifische Antibiotika-Resistenz auf. Die Platten wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vektoren pMax, sowie pCAGGS verwendet. Der pMax weist dabei eine Resistenz gegen Kanamycin auf, der pCAGGS gegen Ampicillin.

3.11 Mini-Plasmid-Präparation

Um die DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde eine Mini-Plasmid-Präparation durchgeführt. Zur Vorbereitung dieser erfolgte zunächst das Animpfen von Vorkulturen (5 ml LB-Medium) aus den jeweiligen Agarplatten mittels eines sterilen Zahnstochers. Dabei wurden die Vorkulturen äquivalent zu den Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt, um das Wachstum anderer Bakterien zu verhindern. Die Vorkulturen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubation erfolgte die Isolierung der DNA aus den Bakterien mittels Mini-Plasmid-Präparation. Hierfür wurde das Plasmid DNA Purification-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Zu Beginn der Plasmidpräparation wurden die Zellen für fünf Minuten bei 6000 rpm (2656 oder 3500 G) zentrifugiert, um so das LB-Medium als Überstand zu entfernen. Die Resuspension der Zellen erfolgte in einem Resuspensionspuffer, welcher zudem eine RNase enthielt, um störende RNA zu eliminieren. Im Anschluss wurden die Zellen in einem zweiten Puffer lysiert. Durch das Zentrifugieren dieser Suspension für zehn Minuten bei 10 700 oder 12 200 rpm (11 000 G) konnten die Zellreste abzentrifugiert werden und der DNA-enthaltende Überstand wurde in eine Minisäule überführt. In dieser Minisäule erfolgten zwei Waschschriffe, die Fällung der DNA mittels Ethanol sowie letztendlich das Eluieren der DNA in 60 µl Elutionspuffer. Zwischen den Schritten wurde jeweils für zwei Minuten bei 10 700 oder 12 200 rpm (11 000 G) zentrifugiert.

Durch eine Restriktionsanalyse mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese wurde die Orientierung der klonierten DNA überprüft. Hierzu wurden jeweils passende Restriktionsenzyme gewählt, um Vektoren ohne oder mit antisense-orientiertem Insert identifizieren zu können. Das Schema einer Restriktionsanalyse ist im Folgenden aufgeführt.

5 µl DNA

2 µl *Cut-Smart*-Puffer (NEB, Ipswich, USA)

1 µl Restriktionsenzym (NEB)

12 µl H₂O

Der Probenansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mittels einer Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

3.12 Maxi-Plasmid-Präparation

Um eine höhere Ausbeute an Plasmid-DNA eines gewünschten Klons zu erhalten, wurde im Anschluss an die Minipräparation eine Maxipräparation durchgeführt. Zur Vorbereitung dieser erfolgte am Vortag das Animpfen eines Kolbens (100 ml LB-Medium) mit 5 µl der Vorkultur des entsprechenden Klons. Auch hier wurde das LB-Medium zuvor mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt, um das Wachstum anderer Bakterien zu verhindern. Die Inkubation des Kolbens erfolgte über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Isolierung der DNA aus den Bakterien mittels Maxipräparation. Hierfür wurde das PureYield Plasmid Maxiprep System (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Zellsuspension wurde zunächst in ein Falcon überführt und für 15 Minuten bei 5000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in einem Puffer resuspendiert. In einem weiteren Puffer erfolgte anschließend die Lyse der Zellen. Durch erneute Zentrifugation bei 7000 G über 30 Minuten konnten die Zellreste abzentrifugiert und der DNA-enhaltende Überstand in eine Säule auf einer Vakuumpumpe überführt werden. Hier erfolgten äquivalent zur Minipräparation ein Waschschrift, das Fällern der DNA mittels Isopropanol sowie abschließend das Eluieren der DNA in 1 ml nucleasefreiem Wasser. Mit einem Nanophotometer (NanoPhotometer N60, Implen, München, Deutschland) wurde die Konzentration der DNA bestimmt.

Auch im Anschluss an die Maxipräparation wurde die Orientierung der klonierten DNA durch eine Restriktionsanalyse überprüft. Die DNA wurde hierzu mit passend ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Das Schema einer Restriktionsanalyse ist im Folgenden aufgeführt.

1 µg DNA
 2 µl *Cut-Smart*-Puffer (NEB, Ipswich, USA)
 1 µl Restriktionsenzym (NEB)
 ad 20 µl H₂O

3.13 Sequenzierung

Zur Analyse der klonierten Konstrukte erfolgte die Sequenzierung durch die LGC Genomics GmbH in Berlin. Dabei wurde durch die Verwendung mehrerer Primer als Startpunkt jeweils das gesamte Konstrukt sequenziert und im Anschluss mit Hilfe des Programms Accelrys Gene (Version 2.5, 2006, Accelrys Inc., San Diego, USA) analysiert. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind mit ihrer Sequenz in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Primer zur Sequenzierung mit Angabe der Sequenzen.

Primer	Sequenz 5' zu 3'
pMax forward	TTCTTGCGTTTCTGATAGGC
pMax revers	ATGGTTACAAATAAAGCAATAGC
UW 2711	CGACATCACGGTGATGATCCG
UW 2712	CGGACATGACCATGTAGAGC
UW 2745	GTGCGATGTAGTACATGACGG
pCAGGS forward	AACGTGCTGGTTGTTGTGC
pCAGGS revers	CATATAGACAAACGCACACC
RFP revers	GGTCACCTTCAGCTTGGC

3.14 SDS-Page und Western Blot

Mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Page) lassen sich Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts systematisch auftrennen und einem spezifischen Molekulargewicht zuordnen. Durch einen nachfolgenden Western Blot erfolgt die Übertragung der Proteine auf eine Membran, auf welcher diese qualitativ sowie quantitativ mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden können.

Zur Vorbereitung wurde die DNA, welche für das zu untersuchende Protein codiert, durch eine Transfektion (Kapitel 3.15.3) in HEK-Zellen eingebracht. Sobald die Zellen eine ausreichende Konfluenz aufwiesen, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und im Anschluss in 300 µl 2X-Lämmli-Puffer aufgenommen. Mittels fünf kurzer Ultraschallimpulse erfolgte der Aufschluss der Zellen, um das Protein freizusetzen. Anschließend wurde das Protein mittels einer 20-minütigen Inkubation bei 60 °C denaturiert.

Für die folgende SDS-Page wurde ein 4-20 prozentiges SDS-Polyacrylamid-Gradientengel (4-20 % TGX, Biorad, Hercules, USA) verwendet. Die Elektrophorese-Kammer (Mini Protean Vertical Electrophoresis Cell, Biorad, Hercules, USA) wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung, beginnend mit 80 Volt für 15 Minuten und anschließenden 200 Volt für eine Stunde, erfolgte das Auftrennen der Proteine. Dabei werden Proteine mit größerem Molekulargewicht durch das Gel stärker zurückgehalten, woraus eine Trennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes resultiert. Durch einen Marker lässt sich das Molekulargewicht näherungsweise bestimmen.

Nach der Auftrennung erfolgte durch einen Western Blot die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm). Hierzu wurde das Trans Blot Turbo Transfer System (Biorad, Hercules, USA) verwendet. Das *Blotting* erfolgte durch Anlegen von 1,3 Ampere und 25 Volt für zehn Minuten. Zur Kontrolle des Protein-Transfers sowie für das Markieren der Marker-Banden wurde die Membran für zehn Minuten in Ponceau-Rot inkubiert und somit gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit H₂O. Freie unspezifische Bindungsstellen in der Membran wurden durch eine einstündige Inkubation in 5-prozentigem Magermilchpulver/TBS-Puffer blockiert. Um die Proteine spezifisch nachzuweisen, folgte in einem nächsten Schritt die Zugabe eines Primärantikörpers, der sich je nach zu untersuchendem Konstrukt gegen das hieran fusionierte GFP- (Anti-GFP rat) oder das RFP-Protein (Anti-RFP rabbit) richtete. Diese Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe. Nicht-gebundene Antikörper wurden am folgenden Tag durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer für jeweils zehn Minuten entfernt. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte anschließend eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten

Sekundärantikörper, welcher sich gegen das Fc-Fragment des vorhandenen Primärantikörpers richtete. Dabei wurde der Antikörper Anti-rat-IgG HRP (ECL Anti-rat-IgG, Horseradish Peroxidase-linked whole antibody NA935V, GE Healthcare, Chicago, USA) in einer 1:10 000 und der Antikörper Anti-rabbit-IgG HRP (ECL Anti-rabbit-IgG, Horseradish Peroxidase-linked F(ab)₂ fragment NA9340V, GE Healthcare, Chicago, USA) in einer 1:50 000 Verdünnung in 5-prozentigem Magermilchpulver/TBS-Puffer verwendet. Hierauf folgten erneute drei Waschschritte mit TBST-Puffer für jeweils zehn Minuten, um auch hier nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

Für die Detektion wurde das Western Lightning Plus ECL-Kit (PerkinElmer, Waltham, USA) verwendet. In einem Hybridisierbeutel wurde die Membran hierzu in 5 ml Chemiluminescence-Lösung gelegt und für eine Minute inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers nach 15 Sekunden, nach einer Minute, nach fünf Minuten sowie nach einer Stunde mit dem LAS 3000 Imager (Fujifilm, Tokio, Japan).

Um bei Konstrukten, welche sowohl ein GFP- als auch ein RFP-Protein enthielten, den Nachweis durch einen zweiten Antikörper zu ermöglichen, wurden die bereits gebundenen Antikörper entfernt (*Stripping*). Hierzu wurde die Membran vorbereitend zunächst zweimal für jeweils fünf Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Durch die Inkubation der Membran mit einem *Stripping*-Puffer für 30 Minuten bei 50 °C erfolgte anschließend die Entfernung der Antikörper. Nach nochmals sechsmaligem Waschen der Membran sowie erneuter Blockierung der freien Bindungsstellen mittels 5-prozentigem Magermilchpulver/TBS-Puffer konnte die Inkubation mit einem neuen Antikörper durchgeführt werden.

3.15 Zellkultur

3.15.1 Zelllinien und Zellmedien

Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden mit adhärent wachsenden HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) Zellen durchgeführt. Durch ihre hohe Transfektionseffizienz sowie eine hohe Wachstumsrate eignen sich diese Zellen gut zur Untersuchung intrazellulärer Prozesse zuvor transfizierter Konstrukte. Für einige Untersuchungen wurden darüber hinaus HEK-Zellen verwendet, welche das *Trpc4*-Gen stabil enthalten (Miller *et al.*, 2011). Hierbei handelt es sich um das Gen des *Transient Receptor Potential* Kanals C4 (TRPC4), einen nicht-selektiven Calciumkanal (Philipp *et al.*, 1996). Kultiviert wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂-Zufuhr. Verwendete Kulturmedien und ihre Zusätze sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Zelllinien und Zellmedien mit Angabe der Hersteller.

Zelllinie	Medium	Hersteller	Zusätze
HEK 293	MEM	Gibco by Thermo Fisher Scientific	10 % FKS
HEK 293, <i>Trpc4</i> stabil	DMEM	Gibco by Thermo Fisher Scientific	10 % FKS 400 µg/ml G418

3.15.2 Passagieren und Vorbereitung der Zellschalen

Um ein fortlaufendes Wachstum der Zellkulturen zu ermöglichen, erfolgte das regelmäßige Passagieren in eine neue Kulturflasche. Hierzu wurde zunächst das Medium vollständig entfernt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Durch die Applikation von 3 ml Trypsin/ EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) konnten die Zellen vom Boden der Zellflasche gelöst werden. Hatten sich alle Zellen gelöst, erfolgte die Zugabe von 7 ml Zellmedium. Je nach Bedarf wurden anschließend ein bis 3 ml dieser Zellsuspension in eine neue Zellflasche überführt und hier mit weiteren 12 ml des Zellmediums verdünnt.

Wiesen die Zellen eine ausreichende Konfluenz auf, wurden diese für die nachfolgende Transfektion auf kleine Zellschalen aufgeteilt. Für das spätere Einspannen in das Mikroskop wurde zunächst jeweils ein 25 mm großes Glas-Plättchen in die Schalen gegeben. Um dabei später eine bessere Adhäsion der Zellen zu erreichen, erfolgte die Beschichtung der Glas-Plättchen mit Poly-L-Lysin für 30 Minuten. Im Anschluss wurden die Plättchen dreimal gewaschen, einmal mit H₂O sowie zweimal mit Zellmedium. Die Schalen wurden mit 2 ml Medium gefüllt.

Ebenso wie beim Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von 3 ml Trypsin/ EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) von dem Boden der Zellflasche gelöst. Auch hier wurde die Zellsuspension mit 7 ml Zellmedium versetzt. Im Anschluss konnten die Zellen in die vorbereiteten Zellschalen gegeben werden.

3.15.3 Transfektion

Durch eine Transfektion wird im Anschluss das Genmaterial in Form eines Plasmids in die vorbereiteten Zellen eingebracht. Dies erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch eine Liposomentransfektion mittels Lipofektamine 3000. Grundlage stellt dabei die Bildung von Komplexen zwischen den im Lipofektamine enthaltenen Liposomen und der einzubringenden DNA dar. Diese Komplexe können anschließend durch Endozytose mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle freisetzen.

Für die Transfektion wurden zunächst die folgenden zwei Ansätze vorbereitet.

125 µl Optimem	125 µl Optimem
4 µl Lipofektamine 3000	4 µl P 3000 Reagenz
2,5 µg DNA	

Nach leichtem Mischen dieser Ansätze erfolgte eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Inhalt beider Reaktionsgefäße zusammengeführt, wiederum leicht gemischt und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In den vorbereiteten Zellschalen wurde das Medium gewechselt und der Transfektionsansatz zugegeben. Anschließend folgte die Inkubation der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂-Zufuhr in einem Brutschrank.

3.16 Fluoreszenz-Mikroskopie

Fluoreszenz beschreibt die Eigenschaft bestimmter Stoffe, Photonen einer spezifischen Wellenlänge zu absorbieren und sie daraufhin in einer anderen, längeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird sich dieser Eigenschaft bedient um beispielsweise Proteine, die an ein solches Fluorophor gebunden vorliegen, in der Zelle zu lokalisieren. Durch einen Filter wird dabei gewährleistet, dass lediglich Licht mit der spezifischen Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluorophors auf die Zellen trifft. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fluoreszierenden Proteine GFP, CFP und RFP verwendet, welche in verschiedenen Konstrukten als Markierung einzelner Proteinabschnitte sowie als Markierung der Zellkompartimente fungierten. Bei dem GFP-Protein handelt es sich um ein aus 239 Aminosäuren bestehendes Protein, wobei für diese Arbeit mit dem *enhanced* GFP-Protein (eGFP) eine leicht modifizierte Variante des klassischen GFP-Proteins verwendet wurde. Angeregt wird dieses durch eine Wellenlänge von 488 nm, die emittierte Wellenlänge liegt bei 507 nm. Die Struktur des CFP-Proteins

leitet sich von der Struktur des GFP-Proteins ab, wobei das CFP-Protein mit einer Wellenlänge von 456 nm angeregt wird, die emittierte Wellenlänge lässt sich bei 480 nm detektieren. Das monomerische RFP-Protein (mRFP), welches eine Länge von 225 Aminosäuren umfasst, weist eine Anregungswellenlänge von 584 nm sowie eine Emissionswellenlänge von 607 nm auf. Durch Detektion dieser fluoreszierenden Proteine in der Fluoreszenzmikroskopie, konnten Rückschlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation der jeweils fusionierten Proteinabschnitte gezogen werden. Für eine genauere Zuordnung der Lokalisationen zu bestimmten Zellkompartimenten wurden darüber hinaus fluoreszent-markierte Zellmarker verwendet. Diese wurden dabei entweder mit dem jeweiligen Konstrukt kotransfiziert oder es erfolgte die Färbung der Zellen unmittelbar vor der Mikroskopie. In Tabelle 11 sind die verwendeten Marker mit dem jeweils zugehörigen Zellkompartiment und dem verwendeten Filter dargestellt.

Tabelle 11: Verwendete Zellmarker mit Angabe der eingesetzten Mikroskopfilter.

Marker	Art	Kompartiment	Filter
ER-CFP	Plasmid	Endoplasmatisches Retikulum	HE CFP/ YFP
Golgi-ID Green assay kit (Enzo Life Science, Farmingdale, USA)	Farbstoff	Golgi-Apparat	Wild Type GFP
Lamp1 (Kloniert im Labor von Prof. Dr. Martin Biel, LMU München)	Plasmid	Lysosomen, Zellmembran	Wild Type GFP
Mitotracker CMXRos (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	Farbstoff	Mitochondrien	Texas Red

Die Kotransfektion der als Plasmid vorliegenden Zellmarker ER-CFP und Lamp1 erfolgte mit 1,25 µg des Zellmarkers sowie 1,25 µg DNA des zu untersuchenden Konstrukts.

Die Färbung der Mitochondrien erfolgte mit dem Mitotracker CMXRos. Dieser lag hierfür zunächst mit einer Konzentration von 1 M in DMSO gelöst vor, die weitere Verdünnung auf eine Zielkonzentration von 100 nM erfolgte in B1-Puffer. Nach Erwärmung dieses Ansatzes auf 37 °C wurden die Zellen in 2 ml dieser Lösung für 20 Minuten bei weiterhin 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Mikroskopie wurde die Färbelösung entfernt.

Für die Färbung des Golgi-Apparates mit Hilfe des Golgi-ID Green Assay Kits wurde zunächst ein 12 mm Glas-Plättchen, auf welchem die Zellen zuvor mit dem zu untersuchenden Konstrukt transfiziert worden waren, in eine 24-Wellplatte gelegt. Es folgte das Waschen der Zellen in 1x Assay Solution und im Anschluss eine 30-minütige Inkubation der Zellen in 200 µl Dual Detection Reagenz bei 37 °C. Unmittelbar vor der Mikroskopie wurde das Färbereagenz abgenommen und die Zellen nochmals mit 1x Assay Solution gewaschen.

Für die Mikroskopie (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) wurde, mit Ausnahme der Untersuchung mittels Golgi-ID Green, ein 25 mm großes Glas-Plättchen, auf welchem die Zellen zuvor mit dem zu untersuchenden Konstrukt transfiziert worden waren, verwendet. Um das Austrocknen der Zellen während des Mikroskopierens zu verhindern, erfolgte diese in 300 µl B1-Lösung. Konstrukte, welche an ein GFP-Protein fusioniert vorlagen, wurden mit dem Wild Type GFP-Filter mikroskopiert, RFP-Protein enthaltende Konstrukte mit dem Texas Red-Filter. Mit dem Programm AxioVision (Version 4.9.1.0, 2013, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) erfolgte die Aufnahme einzelner Zellen.

3.17 Calcium Imaging

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Einflusses der Proteine GPR107 und GPR108 auf die zelluläre Calciumhomöostase wurde in erster Linie die Methode des Calcium Imaging angewendet. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, die Calciumkonzentration im Zytosol quantitativ zu bestimmen. Grundlage hierfür stellt der Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2 dar, welcher mit seinen vier Carboxylgruppen in der Lage ist, einen Chelatkomplex mit freien Calciumionen zu bilden. Dabei weist diese Chelatkomplex-Bildung eine hohe Selektivität für Calcium auf, sodass diese weitgehend unbeeinflusst von anderen Ionen bleibt. Darüber hinaus enthält Fura-2 eine Stilbengruppe, welche als Chromophor des Farbstoffs fungiert. In Abb. 3 ist zunächst das Fura-2 Molekül ohne Calcium, daneben der Calcium-Chelatkomplex des Fura-2 dargestellt.

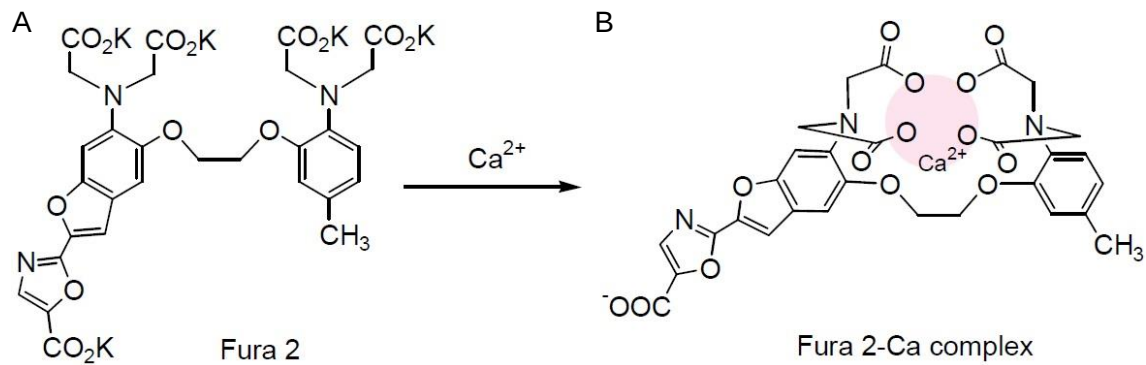


Abb. 3: Struktur von Fura-2 isoliert und unter Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Calcium.

A: Struktur des Fura-2 Moleküls ohne Anlagerung eines Calciumions. B: Struktur des Fura-2 Moleküls unter Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Calcium.

(Abbildung: Dojindo.eu.com, Cell based assay, Intracellular Fluorescent Probes, Fura 2 Product Description, Chemical Structure)

Zu Beginn liegt das Fura-2 an einen Acetoxymethylester (Fura-2-AM) gebunden vor. Hierdurch wird das Molekül membrangängig und es wird eine passive Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht. Im Zytosol erfolgt die Abspaltung des Acetoxymethylesters durch endogene Esterasen, wodurch eine Diffusion zurück aus der Zelle verhindert wird. Die Acetoxymethylester-Bindung verhindert darüber hinaus, dass sich Calciumionen bereits vor dem Eintritt in die Zelle an das Fura-2 anlagern. Je nach Konzentration des Calciums im Zytosol kann nun eine bestimmte Anzahl der intrazellulär vorliegenden Fura-2-Moleküle Chelatkomplexe mit den Calciumionen ausbilden.

Für die Messung der zytosolischen Calciumkonzentration wird die Eigenschaft des Fura-2 genutzt, dass durch Anlagerung des Calciums die Wellenlänge, mit welcher die maximale Fluoreszenzintensität erreicht wird, in einen kleineren Wellenlängenbereich verschoben wird.

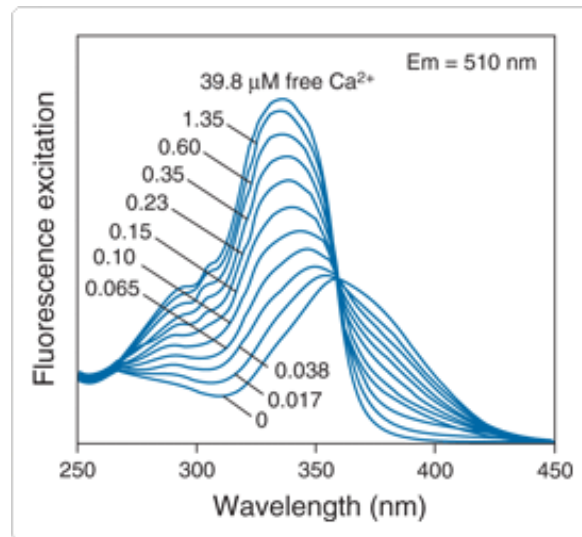


Abb. 4: Exzitationsspektrum von Fura-2 unter verschiedenen Calciumkonzentrationen.

Auf der X-Achse ist die Wellenlänge aufgetragen, mit welcher der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 angeregt wird, auf der Y-Achse die hierdurch entstehende Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der verschiedenen Anregungswellenlängen. Die einzelnen Linien zeigen dabei das Verhalten der Fluoreszenzintensität unter verschiedenen Calciumkonzentrationen.

(Abbildung: Thermo Fisher Scientific.com, Fluorescence excitation spectra of fura-2 in solutions containing 0–39.8 μM free Ca^{2+})

In Abb. 4 ist die Fluoreszenzintensität des Fura-2 in vollständiger Abwesenheit von Calciumionen bis zu einer Calciumkonzentration von 39,8 $\mu\text{mol/l}$ dargestellt. Dabei weist ungebundenes Fura-2 ein Fluoreszenzmaximum bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm auf. Bei Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Calciumionen verschiebt sich diese Wellenlänge, bei welcher die maximale Fluoreszenzintensität erreicht wird, in einen kürzeren Bereich und zeigt sich bei 340 nm.

Während der Messung erfolgt die Anregung der Fura-2-Moleküle durch jeweils zwei kurz aufeinanderfolgende Impulse. Dabei werden die Wellenlängen der Impulse mit 340 nm und 380 nm so gewählt, dass die Emissionsintensität der calciumbindenden und calciumfreien Form des Fura-2 deutlich differieren. Bei 340 nm überwiegt die Fluoreszenz der calciumbindenden Fura-2 Moleküle, bei 380 nm hingegen die der calciumfreien Form. Es resultiert dementsprechend bei Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität unter Anregung mit 340 nm, bei zeitgleicher Abnahme der Fluoreszenz unter Anregung mit 380 nm. Detektiert werden die emittierten Wellen unter beiden Anregungswellenlänge bei 510 nm. Um anschließend einen Rückschluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration ziehen zu können, wird der Quotient beider Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} gebildet.

Neben der Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]$ ist die Fluoreszenzintensität beider Anregungswellenlängen abhängig von der zytosolischen Konzentration des Fura-2 (c), der Zelldicke (d) sowie einer Konstanten der Messapparatur (K). Es ergibt sich für die Messung folgender Zusammenhang:

$$\frac{F_{340} = f([Ca^{2+}]) * c * d * K}{F_{380} = f'([Ca^{2+}]) * c * d * K}$$

Da die Konzentration des Fura-2, die Zelldicke und die Konstante der Messapparatur während der unmittelbar aufeinanderfolgenden Impulse als identisch angenommen werden können, lassen sich diese aus der Gleichung herauskürzen. Damit ist der Quotient F_{340}/F_{380} proportional zur intrazellulären Calciumkonzentration.

Für die Durchführung des Calcium Imaging wurde zunächst das zu untersuchende Konstrukt in HEK-Zellen transfiziert (Kapitel 3.15.3). Um die Zellen mit Fura-2 zu beladen, wurde zunächst das Zellmedium vollständig entfernt und 4 µl einer 1 mM Fura-2-AM/DMSO Lösung in 1,5 ml B1-Puffer in die Zellschalen gegeben. Hieraus resultierte eine Endkonzentration des Fura-2 von 2,66 µM. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss, während dieser das Fura-2-AM in die Zellen diffundieren konnte. Um überschüssiges Fura-2 außerhalb der Zellen zu entfernen, wurden die Zellen viermal in B1-Puffer gewaschen. Sowohl die Fura-2-Inkubation als auch das anschließende Waschen der Zellen und der Beginn der Messaufzeichnung wurden unter calciumfreien Bedingungen und ohne Zugabe eines Calcium-Chelators durchgeführt.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert S100, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) wurde das transfizierte Konstrukt anschließend mit Hilfe eines GFP-Filters beziehungsweise eines RFP-Filters betrachtet, die transfizierten Zellen hierdurch identifiziert und letztendlich eine geeignete Stelle für die Messung bestimmt. Es erfolgte die Markierung der zu messenden Zellen im Programm Live Acquisition Real-time image recording (Version 2.7.0.16, 2017, FEI Munich GmbH, Gräfelfing, Deutschland). Um sicherzustellen, dass die Zellen ausreichend mit Fura-2 geladen sind, wurden diese zudem mit einem Filter der Wellenlänge 360 nm betrachtet. Bei dieser Wellenlänge, dem isosbestischen Punkt, ist die Emission der Fura-2 Moleküle unabhängig von der vorliegenden Calciumkonzentration, weshalb bei dieser Anregungswellenlänge das reine Vorliegen intrazellulärer Fura-2 Moleküle am besten zu beurteilen ist. Gemessen wurden somit lediglich Zellen, welche sowohl das transfizierte Konstrukt exprimierten als auch den Fluoreszenz-Farbstoff enthielten. Um Messungen besser miteinander vergleichen zu können, wurde außerdem der Hintergrund definiert, sodass dieser von jeder einzelnen Messung abgezogen werden konnte.

Je nach Experiment erfolgte die Messung von 600 oder 1200 Doppel-Impulsen (jeweils ein Impuls mit 340 nm und ein Impuls mit 380 nm). Die Messkurve wurde hierbei direkt aufgezeichnet. Während der Messung erfolgte die Zugabe unterschiedlicher Lösungen, um den Einfluss der Proteine GPR107 und GPR108 auf die zelluläre Calciumhomöostase zu untersuchen. Die zugegebenen Lösungen sind in Tabelle 2 (Lösungen für Calcium Imaging Experimente) aufgelistet.

3.18 Analyse und Statistik

Für die Analyse der klonierten Sequenzen sowie zur Erstellung der Kyte und Doolittle Hydrophathie-Blots (Kyte *and* Doolittle, 1982) wurde das Programm Accelrys Gene (Version 2.5, 2006, Accelrys Inc., San Diego, USA) verwendet. Vorhersagen eines möglichen Signalpeptids wurden mit dem Programm SignalP (Version 5.0, 2019, DTU Health Tech, Lyngby, Dänemark) analysiert.

Die Bildaufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie erfolgten mit dem Programm AxioVision (Version 4.9.1.0, 2013, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland), die anschließende Bearbeitung ebenfalls mit AxioVision sowie ergänzend mit ImageJ (Version 1.53a, 2020, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Die Calciummessungen mittels Calcium Imaging wurden durch die Programme Offline Analysis und Live Acquisition Real-time image recording (Version 2.7.0.16, 2017, FEI Munich GmbH, Gräfelfing, Deutschland) aufgezeichnet. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist unter den Graphen jeweils mit „n“ angegeben, die Anzahl der Versuche mit „N“. Die Auswertung der Messungen mit Berechnung der Mittelwerte sowie der Standardabweichungen erfolgte in Excel (Version 1809, 2019, Microsoft, Redmond, USA). Für den statistischen Vergleich zweier Datensätze wurde der Student's t-Test angewandt, der statistische Vergleich von mehr als zwei Datensätzen erfolgte durch eine ANOVA (*one-way analysis of variance*) Varianzanalyse, gefolgt von einem Bonferroni Post-Test. Für alle statistischen Analysen wurde das Programm Prism (Version 5.0, 2007, GraphPad, San Diego, USA) verwendet, wobei das Signifikanzniveau jeweils auf $p < 0,05$ festgelegt wurde. p -Werte $> 0,05$ sind in den Diagrammen mit ns (nicht signifikant) angegeben. Bei statistischer Signifikanz sind p -Werte $< 0,05$ mit *, p -Werte $< 0,01$ mit ** und p -Werte $< 0,001$ mit *** gekennzeichnet. Im Allgemeinen erfolgte im Falle eines *Peak*-artigen Anstiegs der Messkurven die statistische Analyse der jeweiligen *Peak*-Maxima zueinander, im Falle eines langsamen Kurvenanstiegs hingegen die statistische Analyse ausgewählter und exakt zeitgleicher Messpunkte.

4. Ergebnisse

4.1 Das GPR108-Protein wird durch eine Protease prozessiert

Bei dem G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 handelt es sich um ein Protein, für welches weder die genaue intrazelluläre Lokalisation noch potentielle posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise eine proteolytische Spaltung, genau bekannt sind. Im Gegensatz hierzu wurde für das strukturverwandte GPR107-Protein eine Spaltung in zwei Proteine durch die Protease Furin beschrieben (Tafesse *et al.*, 2014). Hierauf aufbauend soll im Folgenden auch das GPR108-Protein auf eine mögliche Schnittstelle untersucht werden.

Im Fall des GPR107-Proteins wird eine kurze polare Sequenz unmittelbar vor den Transmembrandomänen als Schnittstelle aufgeführt (Tafesse *et al.*, 2014). Genauer handelt es sich hierbei um ein Lysin-Serin-Lysin-Arginin-Motiv (K-S-K-R), welches durch die Protease Furin geschnitten wird. *Aligned* man das GPR107-Protein mit dem GPR108-Protein in diesem Bereich vor den Transmembrandomänen, so findet sich auch hier eine polare Region. Die genaue Aminosäuresequenz an analoger Position lautet Lysin-Prolin-Lysin-Serin (K-P-K-S). Diese weist jedoch mit dem allgemeinen Furinschnittstellen-Konsensus R-X-K/R-R (Molloy *et al.*, 1992) kaum Übereinstimmungen auf.

Um das GPR108-Protein mikroskopisch auf diese Schnittstelle zu untersuchen, wurde ein Konstrukt kloniert, in welchem zunächst eine GFP-cDNA an das C-terminale Ende der GPR108-Sequenz fusioniert wurde. Im Anschluss erfolgte das Einfügen einer RFP-cDNA an Position 169 unmittelbar vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS. Sollte das GPR108-Protein an dieser Position beziehungsweise anderweitig im Bereich zwischen den fluoreszierenden Proteinen GFP und RFP geschnitten werden, wäre dementsprechend eine getrennte Lokalisation dieser beiden Fluoreszenzfarben im Mikroskop zu erwarten. Der GPR108-Abschnitt, welcher die Transmembranregion enthält, würde hierbei an das GFP-Protein fusioniert vorliegen, wobei sich aufgrund der Transmembrandomänen eine Lokalisation in der Zellmembran vermuten lässt. Für den N-terminalen löslichen Proteinabschnitt, welcher an das RFP-Protein fusioniert vorliegen würde, lässt sich hingegen eine zytosolische Lokalisation erwarten. Somit würde in diesem Fall die Plasmamembran grün, zytosolische Bereiche hingegen rot gefärbt erscheinen.

In Abb. 5 und Abb. 6 sind beispielhaft zwei mikroskopische Aufnahmen dieses GPR108-(169RFP)-GFP-Konstruktes dargestellt.

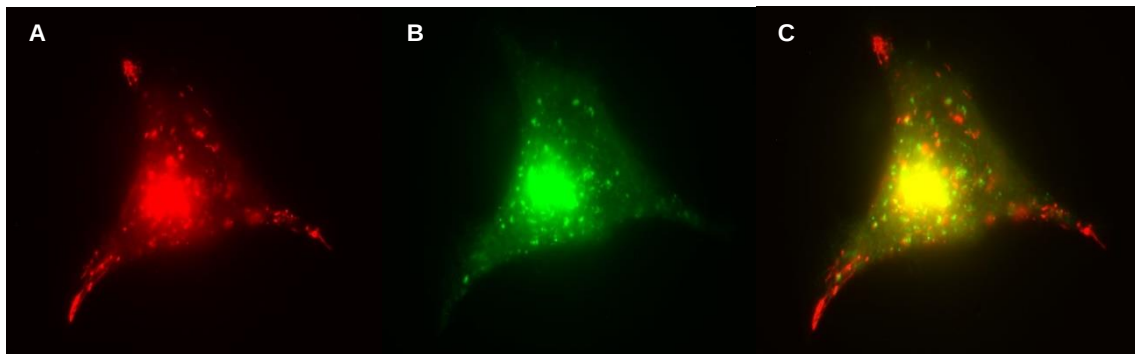


Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-GFP, schwach exprimierend.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

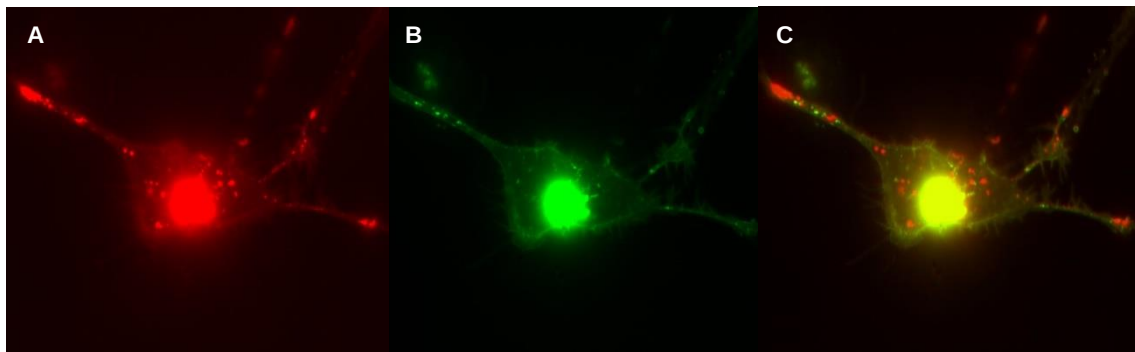


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-GFP, stark exprimierend.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

In den Aufnahmen A ist jeweils zunächst der RFP-markierte N-Terminus des GPR108-Proteins dargestellt. Dieser zeigt sich hierbei allerdings in Vesikeln, welche verstärkt in den Zellausläufern zu finden sind. Die in B dargestellten Aufnahmen des GFP-markierten C-Terminus hingegen lassen eine Lokalisation dieses Proteinabschnitts in eher zentrumsnahen Vesikeln, sowie teilweise bei starker Expression des Proteins auch in der Zellmembran, erkennen. Die in den Aufnahmen C dargestellten übereinandergelegten Bilder dieser beiden Proteinabschnitte zeigen deutlich, dass der N- und C-Terminus des GPR108-Proteins in verschiedenen Zellarealen lokalisieren. Lediglich der Bereich, in welchem sehr große Mengen des Proteins vorhanden sind, stellt sich gelb dar und zeigt hiermit ein gleichzeitiges Vorliegen beider Proteinanteile an. Diese Tatsache könnte einer Überexpression des GPR108-Proteins geschuldet sein, wodurch die Spaltung der gesamten Proteinmenge nicht erreicht werden konnte. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation des RFP- und GFP-Proteins und damit verbunden des N- beziehungsweise C-Terminus des GPR108-Proteins lässt sich eine Spaltung des GPR108-Proteins im Bereich zwischen den klonierten Fluoreszenzproteinen vermuten.

4.2 Die Lokalisation des N-Terminus des GPR108-Proteins

Um die Lokalisation des N- und C-Terminus nach erfolgter Spaltung des GPR108-Proteins genauer zu untersuchen, sollten diese beiden Proteinabschnitte separat voneinander betrachtet werden. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt kloniert, welches lediglich den N-Terminus (bis Aminosäureposition 168) des GPR108-Proteins, fusioniert an ein RFP-Protein (an Position 169), enthält (GPR108 Δ 169-543-RFP). Um darüber hinaus einen potentiellen Einfluss des C-terminalen Proteins auf die Lokalisation des N-Terminus festzustellen, wurde außerdem ein Konstrukt kloniert, in welchem die gesamte Sequenz des GPR108-Proteins vorliegt. Hierbei wurde ebenfalls eine RFP-cDNA an gleicher Position unmittelbar vor der vermuteten Schnittstelle (Position 169) eingefügt, der C-Terminus blieb unmarkiert (GPR108-(169RFP)). Abb. 7 zeigt diese beiden Konstrukte in der Fluoreszenz-Mikroskopie.

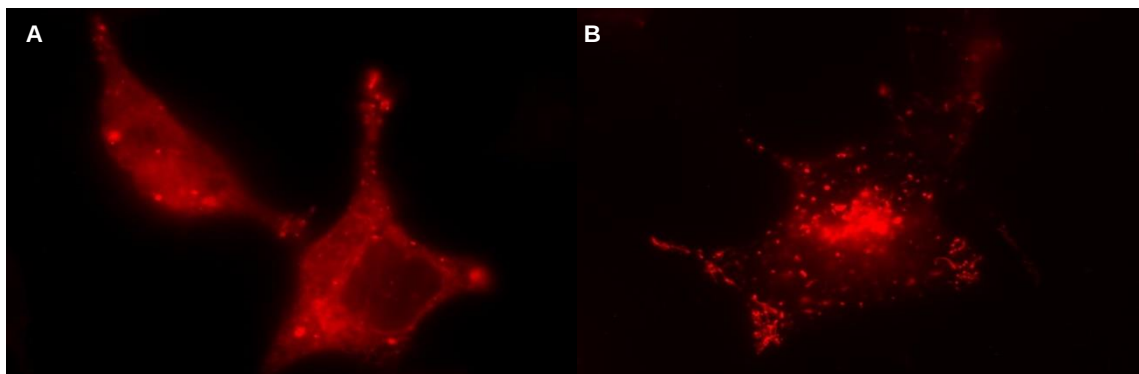


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP und GPR108-(169RFP).

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS und Deletion der folgenden C-terminalen Proteinsequenz. B: Gesamte Proteinsequenz des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169.

In Aufnahme A sind zwei Zellen dargestellt, welche lediglich den N-terminalen Abschnitt des GPR108-Proteins (bis Position 168) beinhalten. Dabei stellt sich dieser im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Expression des gesamten Proteins nicht mehr in kleinen Vesikeln dar. Das RFP-Protein und damit der N-Terminus des GPR108-Proteins scheint sich diffus über die Zelle zu verteilen, lediglich der Kern bleibt dabei ausgespart. Bei genauerer Betrachtung lässt sich außerdem eine feine netzartige Struktur der rot-fluoreszierenden Bereiche erkennen.

Im Vergleich hierzu zeigt Aufnahme B das Konstrukt, in welchem sich das RFP-Protein zwar an derselben Position (Position 169) innerhalb der Proteinsequenz befand, jedoch darüber hinaus auch der C-Terminus exprimiert wurde. Erwartungsgemäß lokalisiert der N-Terminus in diesem Konstrukt vergleichbar mit den Beobachtungen in Kapitel 4.1 in

kleinen Vesikeln, die insbesondere in den Zellausläufern zu finden sind. Da sich die Lokalisation dieser beiden Konstrukte deutlich unterscheidet, scheint der C-Terminus des GPR108-Proteins die Lokalisation des N-Terminus wesentlich zu beeinflussen.

Für eine genauere Untersuchung dahingehend, in welchen Kompartimenten der Zelle diese beiden Konstrukte konkret lokalisieren, wurde eine Kotransfektion beziehungsweise eine Färbung mit verschiedenen Zellmarkern durchgeführt. Untersucht wurde dabei, ob eine Lokalisation in Golgi-Apparat, endoplasmatischem Retikulum sowie im Falle des alleinigen N-Terminus ohne Expression des C-Terminus ergänzend auch, ob eine Lokalisation in Lysosomen oder Mitochondrien vorliegt. In Abb. 8 bis Abb. 11 sind zunächst die Ergebnisse der Untersuchung des alleinigen N-Terminus bis Position 168 dargestellt.

Abb. 8 zeigt hierbei die mikroskopischen Aufnahmen nach Kotransfektion der Zellen mit dem N-terminalen GPR108-Protein (GPR108 Δ 169-543-RFP) und dem Marker Lamp1, welcher Lysosomen, aber auch die Zellmembran markiert. Der in Aufnahme A dargestellte, mit einem RFP-Protein markierte N-Terminus des GPR108-Proteins, lokalisiert dabei erwartungsgemäß diffus verteilt in der Zelle. Im Gegensatz hierzu lassen sich in Aufnahme B die GFP-markierten Lysosomen sowie die Zellmembran klar abgrenzen. Dementsprechend zeigt sich in der übereinandergelegten Aufnahme C keine Kolo-kalisation des N-terminalen GPR108-Proteins mit dem Lysosomenmarker Lamp1. Es lassen sich lediglich kleine gelbe Areale erkennen, welche vermutlich auf überexpressionsbedingte Proteinkonglomerate zurückzuführen sind und so eine geringe Kolo-kalisation vorspiegeln.

Die Ergebnisse der Untersuchung des N-terminalen GPR108-Proteins auf eine Lokalisation in den Mitochondrien sind in Abb. 9 aufgezeigt. Dabei liegt, in Aufnahme A dargestellt, in diesem Fall eine GFP-Markierung des N-terminalen GPR108-Proteins vor (GPR108 Δ 169-543-GFP), der sich entsprechend der vorigen Untersuchungen auch hier als diffuse und netzartige Struktur erkennen lässt. In Aufnahme B sind die Mitochondrien nach Färbung mit dem Mitochondrienmarker Mitotracker CMXRos dargestellt. Bei Betrachtung der übereinandergelegten Bilder lässt sich auch hier keine Kolo-kalisation nachweisen. Wiederrum zeigen sich lediglich kleine gelbe Areale in der Zelle, welche überexpressionsbedingte Proteinkonglomerate vermuten lassen und so eine geringe Kolo-kalisation vorspiegeln.

Die Untersuchung auf eine mögliche Lokalisation des N-terminalen GPR108-Proteins im Golgi-Apparat erfolgte durch eine Färbung der GPR108 N-Terminus (GPR108 Δ 169-543-RFP) exprimierenden Zellen mit dem Marker Golgi ID Green. Abb. 10 zeigt die entsprechenden Aufnahmen hierzu. Dabei ist zunächst in Aufnahme A

das RFP-markierte N-terminale GPR108-Protein dargestellt, welches wiederum erwartungsgemäß diffus und netzartig erscheint. Der Golgi-Apparat, welcher sich zentral in der Nähe des Kerns sowie zum Teil in Vesikeln manifestiert, ist in Aufnahme B dargestellt. Nach Übereinanderlegen dieser Bilder lässt sich keine Lokalisation des N-terminalen GPR108-Proteins im Golgi-Apparat registrieren.

Abschließend zeigt Abb. 11 die Untersuchung des N-Terminus auf eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum. Hierfür erfolgte die Kotransfektion des N-terminalen GPR108-Proteins (GPR108 Δ 169-543-RFP) mit dem Marker ER-CFP. Erneut stellt sich dabei in Aufnahme A das N-terminale GPR108-Protein als netzartige Struktur dar, welche diffus über die Zelle verteilt vorliegt. Der CFP-markierte ER-Marker zeigt ein hierzu nahezu identisches Bild in Aufnahme B. Bestätigen lässt sich diese auffällige Übereinstimmung bei Betrachtung der übereinandergelegten Aufnahme C, in welcher sich eine klare Kolo-kalisation des RFP-markierten N-terminalen GPR108-Proteins mit dem CFP-markierten ER-Marker erkennen lässt. Somit scheint der N-Terminus des GPR108-Proteins bei alleiniger Expression ohne den C-Terminus im endoplasmatischen Retikulum zu lokalisieren.

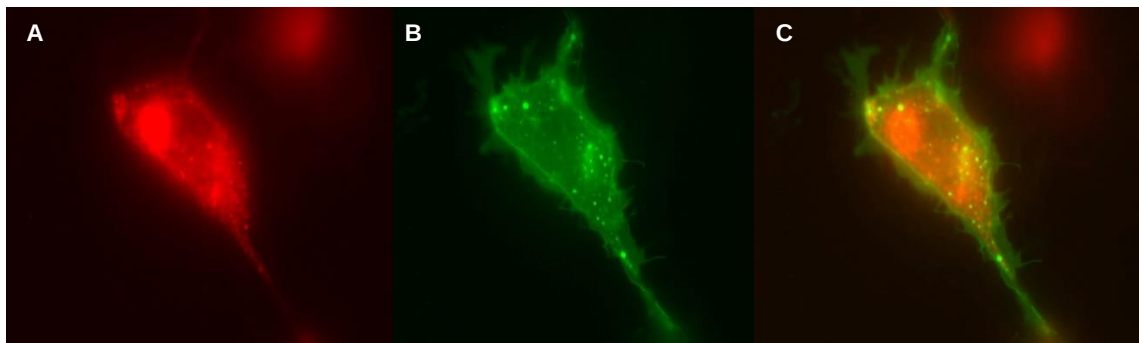


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP bei Koexpression mit dem Lysosomen-Marker Lamp1-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS und Deletion der folgenden C-terminalen Proteinsequenz. B: Lysosomenmarker Lamp1 mit GFP-Markierung. C: Merged

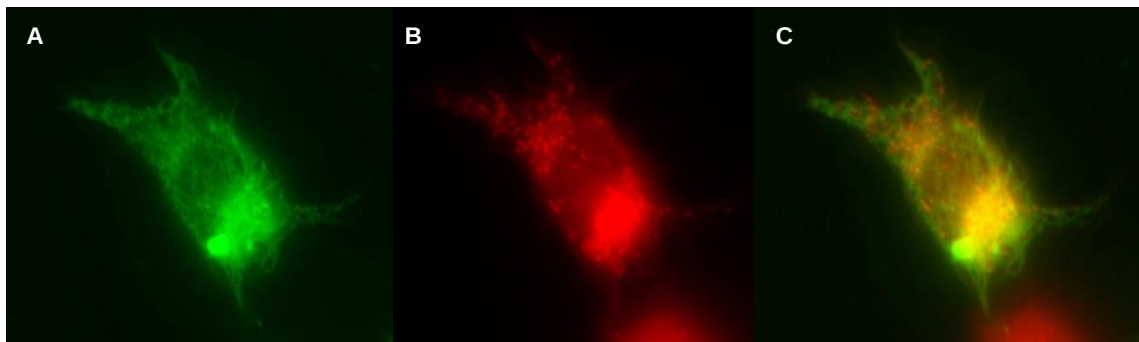


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-GFP nach Färbung der Zellen mit dem Mitochondrien-Marker Mitotracker CMXRos.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS und Deletion der folgenden C-terminalen Proteinsequenz. B: Mitochondrienmarker Mitotracker CMXRos. C: Merged

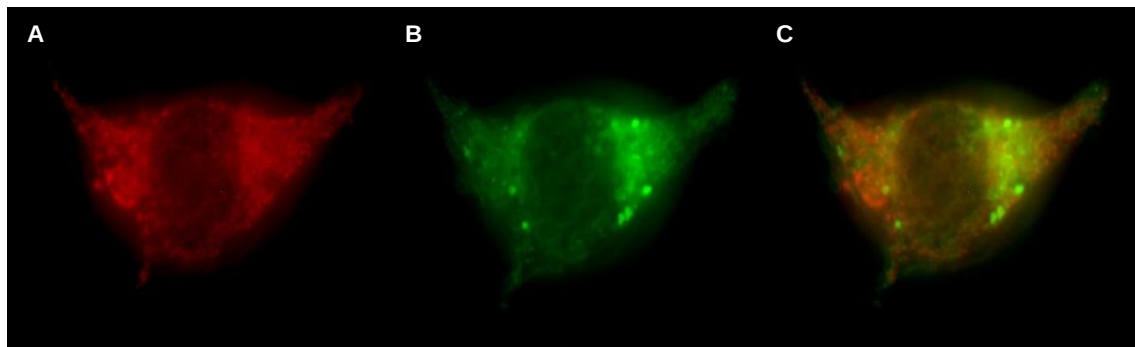


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP nach Färbung der Zellen mit dem Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID Green.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS und Deletion der folgenden C-terminalen Proteinsequenz. B: Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID-Green. C: Merged

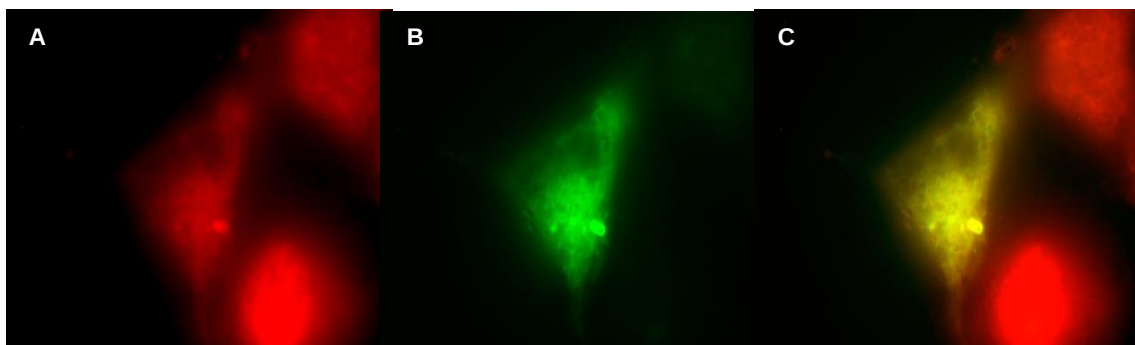


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 169-543-RFP bei Koexpression mit dem ER-Marker ER-CFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS und Deletion der folgenden C-terminalen Proteinsequenz. B: ER-Marker ER-CFP. C: Merged

Um ergänzend eine Aussage über die Lokalisation des N-Terminus bei Expression des gesamten GPR108-Proteins treffen zu können, erfolgte zudem die mikroskopische Untersuchung des GPR108-Volllängenproteins, welches hinter der Aminosäure 168 mit einem RFP-Protein markiert wurde (GPR108-(169RFP)). Dabei wurde dieses Konstrukt sowohl nach Kotransfektion mit dem ER-CFP- als auch nach Färbung mit dem Golgi ID Green-Marker betrachtet. In Abb. 12 und Abb. 13 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Dabei zeigen die Aufnahmen A jeweils den N-terminalen Abschnitt des GPR108-Proteins, die Aufnahmen B das endoplasmatische Retikulum beziehungsweise den Golgi-Apparat. Erwartungsgemäß lokalisiert das N-terminale GPR108-Protein entsprechend den Ergebnissen in Kapitel 4.1 in kleinen Vesikeln, welche sich zum einen zentral innerhalb der Zelle, zum anderen aber auch in den Zellausläufern nachweisen lassen. Bei Betrachtung der übereinandergelegten Aufnahme C lässt sich im Falle der Kotransfektion mit dem ER-CFP-Marker keine Lokalisation des GPR108-Proteins in diesem Zellkompartiment nachweisen. Im Gegensatz hierzu zeigt sich in der

übereinandergelegten Aufnahme in Abb. 13 eine klare Kolokalisation der zentralen Anreicherung des N-terminalen GPR108-Proteins mit dem Marker des Golgi-Apparates. Insbesondere die Vesikel in den Zellausläufern bleiben jedoch außerhalb des Golgi-Apparates sichtbar.

Zusammenfassend lässt sich hiermit feststellen, dass sich der N-terminale Abschnitt des GPR108-Proteins bei alleiniger Expression ohne den C-Terminus vorrangig innerhalb des endoplasmatischen Retikulums nachweisen lässt. Bei Expression des gesamten GPR108-Proteins hingegen scheint sich der N-Terminus zu großen Teilen im Golgi-Apparat zu befinden.

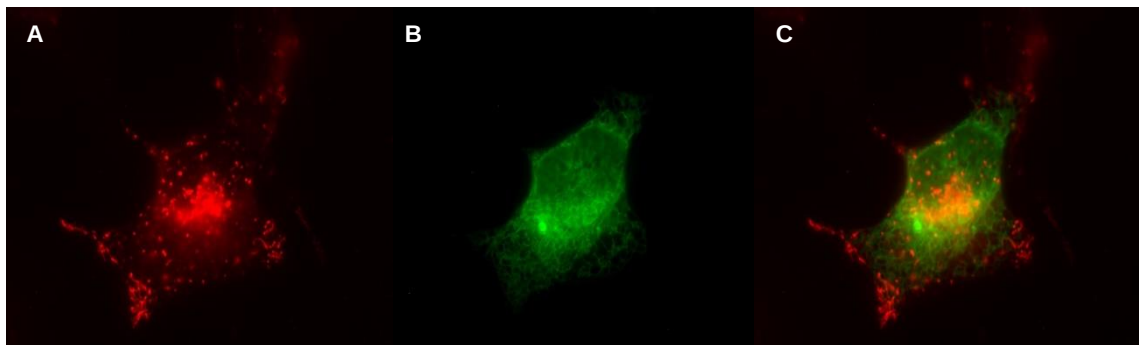


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP) bei Koexpression mit dem ER-Marker ER-CFP.
A: Gesamte Proteinsequenz des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. B: ER-Marker ER-CFP. C: Merged

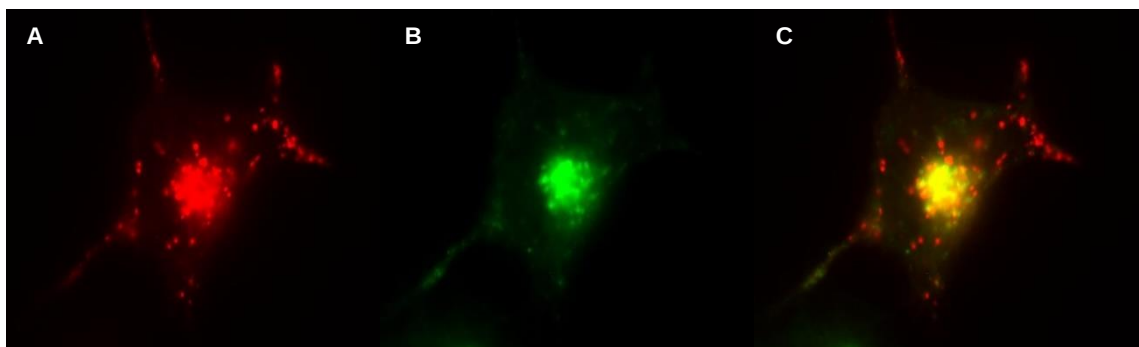


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP) nach Färbung der Zellen mit dem Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID Green.
A: Gesamte Proteinsequenz des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. B: Golgi-Apparat-Marker Golgi-ID Green. C: Merged

4.3 Die Lokalisation des C-Terminus des GPR108-Proteins

Da es sich bei dem C-Terminus des GPR108-Proteins um den Transmembrandomänen enthaltenen Abschnitt des Proteins handelt, wurde dieser vorrangig auf eine Lokalisation in der Zellmembran untersucht. Hierzu erfolgte die Klonierung zwei verschiedener Konstrukte. In beiden Konstrukten wurde die Sequenz des Signalpeptids über eine Deletions-PCR direkt mit dem C-Terminus des Proteins verbunden. Fusioniert wurden diese Konstrukte dabei C-terminal an eine GFP-cDNA. Alleiniger Unterschied der beiden Konstrukte stellte das Vorhandensein des potentiellen Schnittstellenmotivs dar. In einem Konstrukt verblieb dieses Motiv in der Proteinsequenz (GPR108 Δ 35-168-GFP), in dem anderen wurde dieses Motiv ebenfalls deletiert (GPR108 Δ 35-176-GFP). Abb. 14 zeigt die beiden Konstrukte im Vergleich.

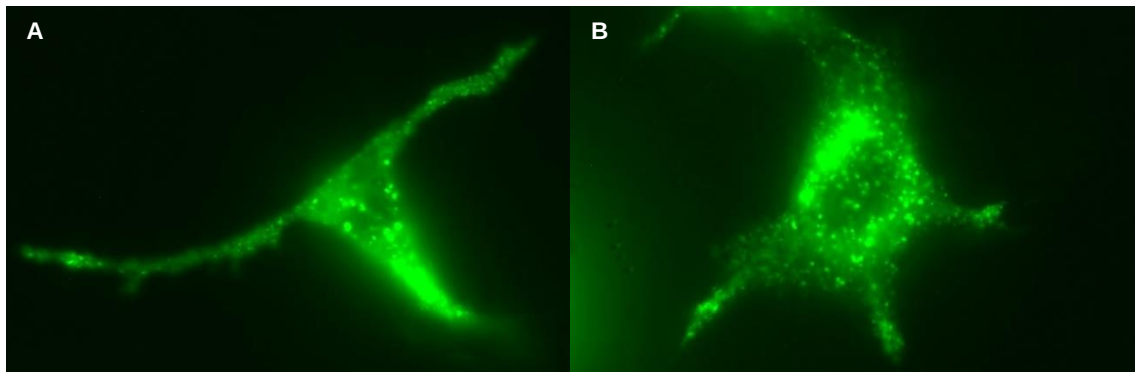


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopie GPR108 Δ 35-168-GFP und GPR108 Δ 35-176-GFP.

A: C-Terminus des GPR108-Proteins ab Position 169 (Deletion der Positionen 35-168) einschließlich des potentiellen Schnittstellenmotivs KPKS. N-terminal liegt die Proteinsequenz unmittelbar fusioniert an das Signalpeptid vor, C-terminal weist das Protein eine GFP-Markierung auf. B: C-Terminus des GPR108-Proteins ab Position 177 (Deletion der Positionen 35-176) ohne das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS. N-terminal liegt die Proteinsequenz unmittelbar fusioniert an das Signalpeptid vor, C-terminal weist das Protein eine GFP-Markierung auf.

Vergleicht man diese beiden Konstrukte in der Fluoreszenzmikroskopie wird ersichtlich, dass sich die Lokalisation im Wesentlichen nicht zu unterscheiden scheint. In beiden Fällen konnte das Protein in keiner der betrachteten Zellen in der Zellmembran gesehen werden. Es zeigt sich teilweise eine Lokalisation in Vesikeln, wie dies auch bei Betrachtung des C-Terminus unter Expression des Volllängenproteins (Kapitel 4.1) der Fall gewesen war.

4.4 Detektion der Schnittstelle des GPR108-Proteins

Für eine genauere Untersuchung auf die mögliche Lokalisation einer Schnittstelle innerhalb des G-Protein gekoppelten Rezeptors 108 wurde durch das Programm ProP (Version 1.0, DTU Health Tech, Lyngby, Dänemark) eine Vorhersage möglicher Schnittstellen getroffen. Eine Wahrscheinlichkeit von 0,126 ergab sich für die KPKS-Sequenz unmittelbar vor den Transmembrandomänen (Position 174), welche bereits in Kapitel 4.1 beschrieben wurde. Diese liegt dabei an analoger Position wie die Schnittstelle KSKR des GPR107-Proteins. Darüber hinaus identifizierte das Programm zwei weitere potentielle Schnittstellen weiter N-terminal in der Sequenz des GPR108-Proteins. Diese wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,367 im Bereich der Position 92 und von 0,283 im Bereich der Position 162 angegeben. Dabei zeigt sich an diesen Stellen jeweils, für Schnittstellen typisch, eine geladene Aminosäure. Im Falle der KPKS-Sequenz handelt es sich dabei um die positiv geladene Aminosäure Lysin (K), in den beiden anderen Fällen hingegen jeweils um das positiv geladene Arginin (R). Für die Untersuchung dieser möglichen Schnittstellen erfolgte die Klonierung verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins, in welchen die besagten positiven Aminosäuren durch neutrale Aminosäuren ausgetauscht wurden, um somit eine Spaltung des Proteins an diesen Positionen zu verhindern. An Stelle der KPKS-Sequenz erfolgte der Einbau von vier Alaninen (A), die weiter vorn liegenden Arginine R₉₂ und R₁₆₂ wurden jeweils durch ein Phenylalanin (F) ersetzt. Darüber hinaus sollten außerdem alle möglichen Kombinationen dieser Schnittstellenmutationen untersucht werden, sodass insgesamt sieben verschiedene Mutanten des GPR108-Proteins kloniert wurden. Der schematische Aufbau mit den jeweiligen Mutationspositionen und der entsprechenden Konstrukt-Benennung ist in Abb. 15 dargestellt.

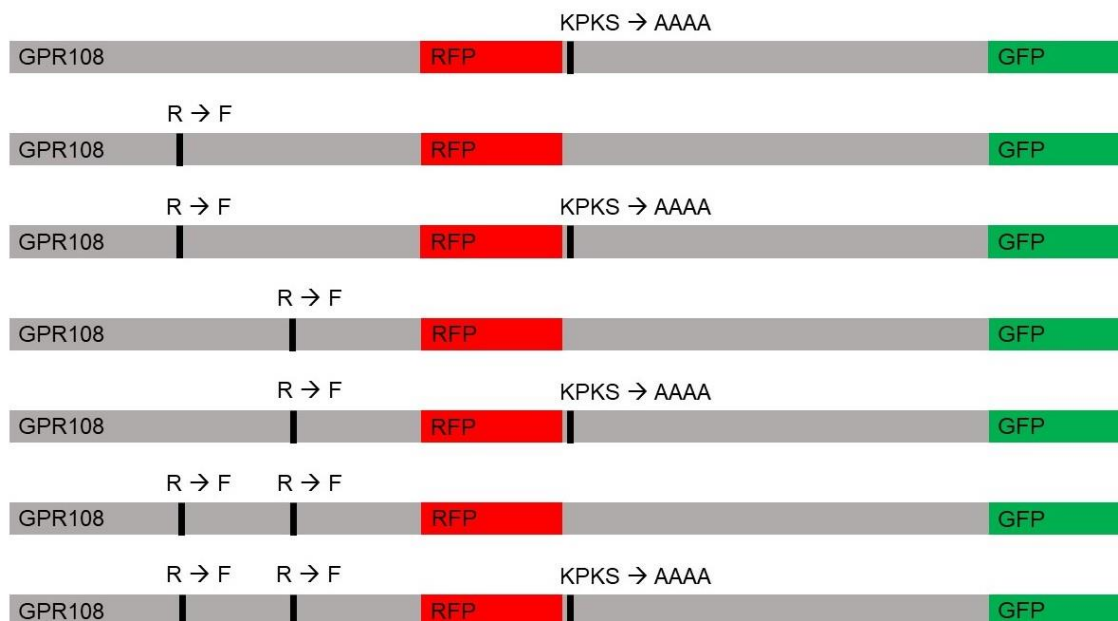


Abb. 15: Schematische Darstellung verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins zur Untersuchung einer möglichen Schnittstellenposition.

Nach diesem Schema erfolgte die Klonierung sieben verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins, um dieses auf potentielle Schnittstellenpositionen innerhalb der Proteinsequenz zu untersuchen. Die drei untersuchten möglichen Schnittstellen an Position 92, 162 und 174 wurden jeweils einzeln sowie in allen möglichen Kombinationen durch ungeladene Aminosäuren ausgetauscht ($R_{92}F$, $R_{162}F$, $KPKS_{174}AAAA$), um eine Spaltung des Proteins an den jeweiligen Positionen zu verhindern. Entsprechend wurden die Konstrukte benannt: GPR108-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP, GPR108-($R_{92}F$)-(169RFP)-GFP, GPR108-($R_{92}F$)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP, GPR108-($R_{162}F$)-(169RFP)-GFP, GPR108-($R_{162}F$)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP, GPR108-($R_{92}F$)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP und GPR108-($R_{92}F$)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP.

Die eingebauten Fluoreszenzproteine GFP (C-terminal) und RFP (Position 169) ermöglichen in diesen Konstrukten eine Detektion der beiden Proteinabschnitte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie aller sieben Konstrukte sind in Abb. 16 bis Abb. 22 dargestellt. Dabei ist für jede Mutante des GPR108-Proteins jeweils in Aufnahme A der RFP-markierte N-terminale Proteinabschnitt gezeigt, in Aufnahme B im Vergleich hierzu der GFP-markierte C-Terminus. Für die bessere Beurteilung einer gemeinsamen Lokalisation der beiden Proteinabschnitte und damit einer potentiellen Verhinderung der Spaltung des Proteins in diesem Konstrukt, sind in Aufnahme C jeweils die übereinandergelegten Bilder dargestellt. Sollten die eingebauten Mutationen eine Spaltung des Proteins verhindern, wäre dementsprechend eine übereinstimmende Lokalisation beider Abschnitte und somit eine durchgehend gelbe Färbung der Zelle zu erwarten. Betrachtet man die übereinandergelegten Bilder unter diesem Aspekt, lässt sich bei jeder Mutante weiterhin eine separate Lokalisation des N- und C-terminalen Proteins erkennen. Es zeigt sich dabei jeweils äquivalent zu dem RFP- und GFP-enthaltenden Wildtyp des GPR108-Proteins (Kapitel 4.1) eine Lokalisation des N-Terminus in kleinen Vesikeln, die gehäuft in den Zellausläufern zu

finden sind. Der C-Terminus stellt sich ebenfalls in Vesikeln, jedoch eher zentral in der Zelle dar. Lediglich bei stark exprimierenden Zellen lässt sich, erkennbar durch eine deutliche Gelbfärbung, zentral eine gemeinsame Anhäufung beider Proteinabschnitte identifizieren. Dies entspricht ebenfalls den Beobachtungen des Wildtyp-Konstruktes und könnte auf eine überexpressionsbedingte unvollständige Spaltung des Proteins zurückzuführen sein.

Da alle untersuchten Mutanten keine veränderte Lokalisation des GPR108-Proteins erkennen lassen und weiterhin eine getrennte Verteilung des RFP- und GFP-Proteins zu beobachten ist, kann somit keine der drei vorhergesagten potentiellen Schnittstellen als solche bestätigt werden.

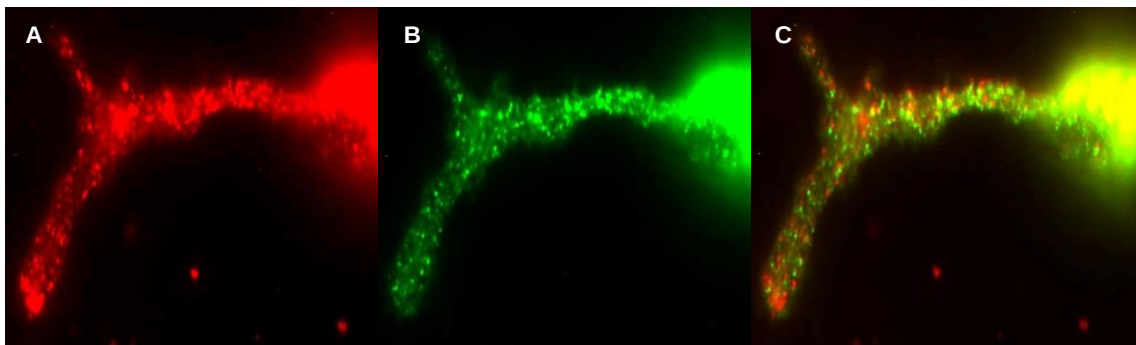


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS an Position 174 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged

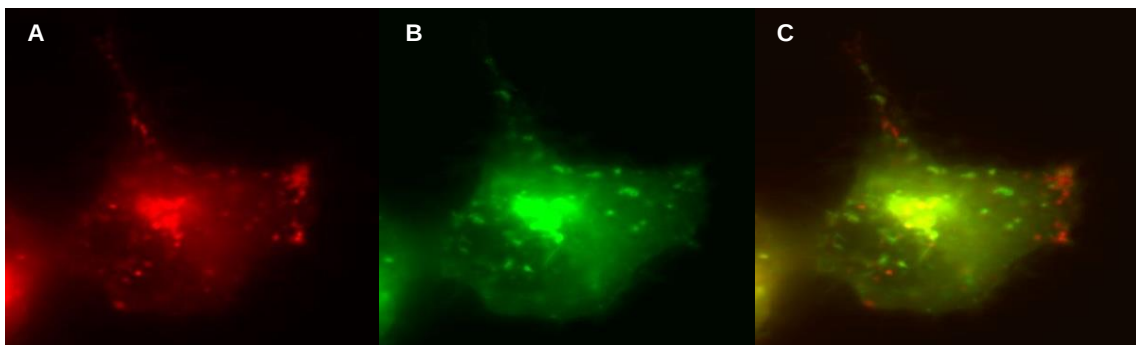


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₉₂F)-(169RFP)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 92 ist zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

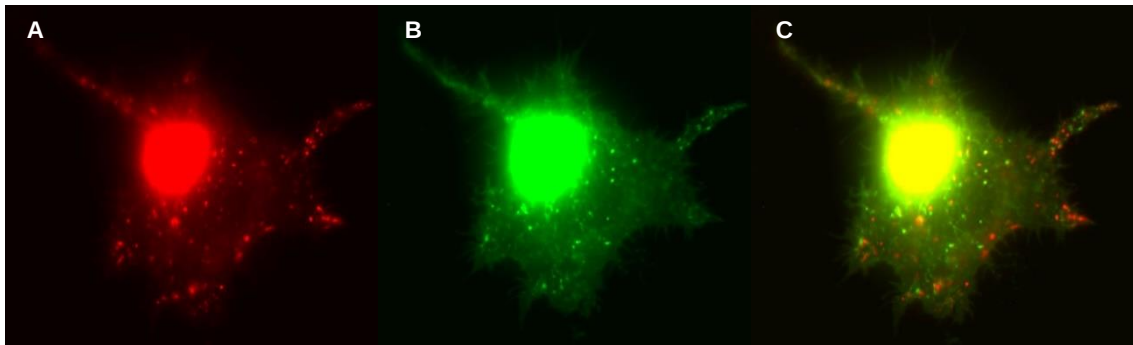


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₁₆₂F)-(169RFP)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 162 ist zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

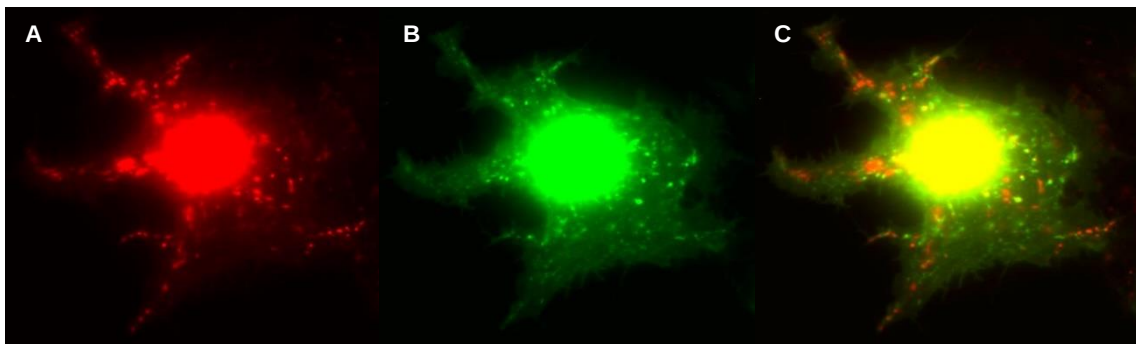


Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₉₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 92 ist zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS an Position 174 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged

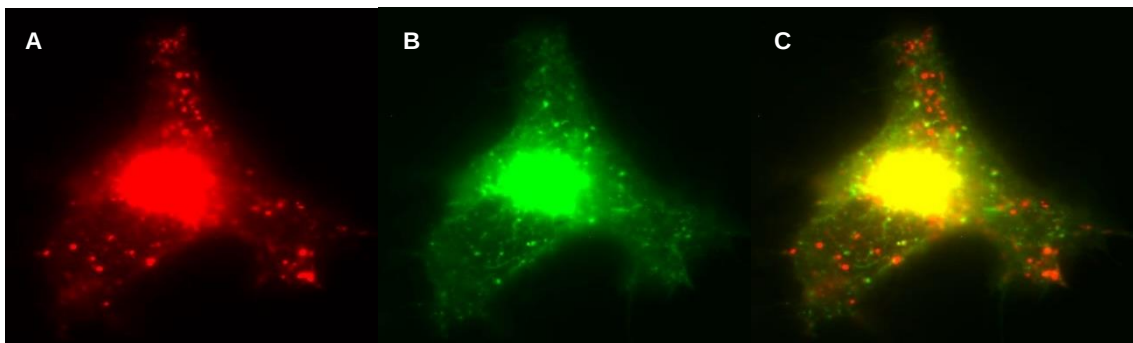


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₁₆₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 162 ist zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS an Position 174 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged

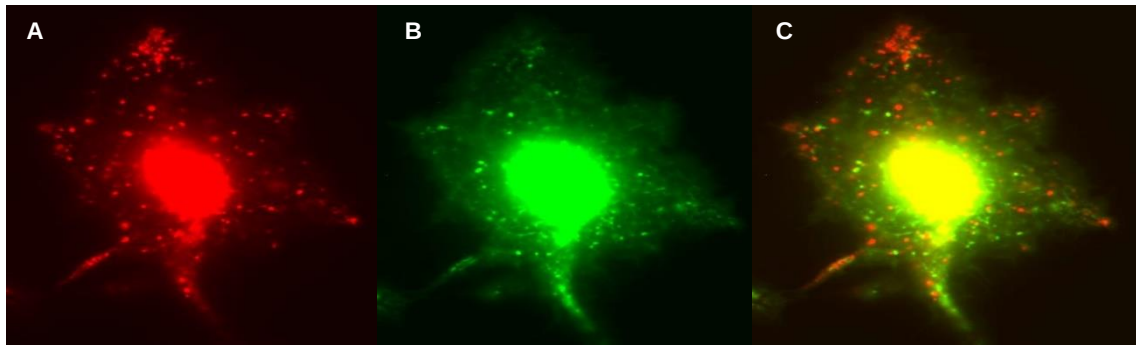


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₉₂F)-(R₁₆₂F)-(169RFP)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 92 und 162 ist jeweils zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an diesen Positionen eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

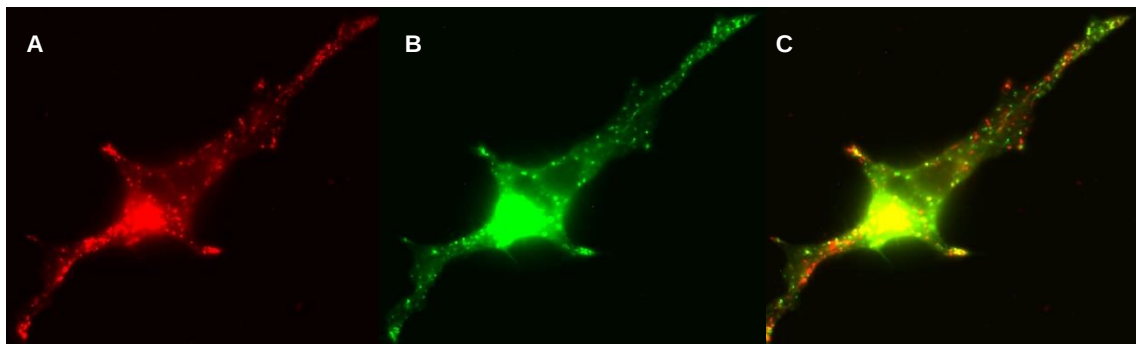


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie GPR108-(R₉₂F)-(R₁₆₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR108-Proteins mit RFP-Markierung an Position 169. Die Aminosäure Arginin an Position 92 und 162 ist jeweils zu einem ungeladenen Phenylalanin mutiert, um an diesen Positionen eine Spaltung des Proteins zu verhindern. B: C-Terminus des GPR108-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS an Position 174 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged

Ergänzend zu den mikroskopischen Untersuchungen dieser GPR108 Mutanten wurde anschließend ein Western Blot dieser Konstrukte angefertigt. Das Ergebnis dieses Western Blots ist in Abb. 23 gezeigt. Dabei wurde in Aufnahme A ein gegen das jeweils C-terminal lokalisierte GFP-Protein gerichteter Antikörper, in Aufnahme B ein gegen das jeweils an Position 169 und damit vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KPKS einklo-nierten RFP-Protein gerichteter Antikörper verwendet. Zur Kontrolle einer sicheren De-tek-tion des GFP- sowie des RFP-Proteins durch die jeweils verwendeten Antikörper wur-den in den Spuren 2 und 3 das GPR107-Konstrukt beziehungsweise das GPR108-Kon-strukt aufgetragen, in welchen der N-Terminus vor der KSKR-Sequenz (Position 179), beziehungsweise im Falle des GPR108-Proteins vor der KPKS-Sequenz (Position 174), mit einem RFP-Protein (an Position 179 beziehungsweise an Position 169) und der C-Terminus C-terminal mit einem GFP-Protein markiert worden waren (GPR107-(179RFP)-GFP, GPR108-(169RFP)-GFP). Zum Ausschluss einer unspezifischen

Interaktion der Antikörper mit anderen Proteinen aus den HEK-Zellen sind in Spur 4 nicht-transfizierte HEK-Zellen dargestellt.

Spur 5 des Western Blots zeigt den separat transfizierten C-Terminus des GPR108-Proteins mit N-terminalem Signalpeptid sowie einem C-terminal fusionierten GFP-Protein (GPR108 Δ 35-168-GFP). Der großen Bande lässt sich dabei ungefähr eine Länge von 69 kDa zuordnen, sodass diese dem gesamten C-Terminus des GPR108-Proteins mit fusioniertem GFP-Protein entspricht. Ob das N-terminale Signalpeptid abgespalten wurde (69 kDa) oder noch mit dem C-Terminus verbunden vorliegt (73 kDa), lässt sich dabei nicht sicher differenzieren. Die Entsprechung der darunter liegenden kürzeren Bande ist unklar. In Spur 6 wurde das GPR108-Konstrukt aufgetragen, in welchem das potentielle und am ehesten dem Schnittstellenmotiv des GPR107-Proteins entsprechende Schnittstellenmotiv KPKS an Position 174 vor den Transmembrandomänen zu vier Alaninen (A) mutiert wurde (GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP). Durch die hiermit verbundene Modifikation der geladenen Aminosäuren sollte eine Spaltung des Proteins an dieser Position verhindert werden. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls am C-Terminus an eine GFP-cDNA fusioniert. Mit einer ungefähren Länge von 88 kDa kann die längste Bande dieser Spur am ehesten dem Volllängenprotein des GPR108-Proteins mit fusioniertem GFP-Protein zugeordnet werden. Für die hierunter liegende Bande mit etwa 68 kDa lässt sich der C-Terminus mit dem GFP-Protein nach Spaltung des Proteins vermuten. Die Größe des resultierenden C-terminalen Proteinabschnitts stellt sich dabei passend zu einer Spaltung des Proteins im Bereich der KPKS-Sequenz an Position 174 dar, wobei das GPR108-Protein, entsprechend den mikroskopischen Untersuchungen desselben Konstruktes, auch nach Mutation des KPKS-Motivs weiterhin gespalten zu werden scheint. Die unklare kürzere Bande, welche sich bereits bei alleiniger Untersuchung des C-Terminus in Spur 5 präsentierte, zeigt sich in gleicher Weise auch für dieses Konstrukt. Auffällig stellt sich darüber hinaus eine deutliche Anreicherung des Proteins in dem Bereich des Western Blots dar, welcher einer Größe oberhalb des gesamten GPR108-Proteins entspricht. Diese Banden könnten aus einer Multimerisierung des GPR108-Proteins resultieren.

Für die weitere Untersuchung der potentiellen Lokalisation der Schnittstelle wurde in Spur 7 das GPR108-Konstrukt aufgetragen, bei welchem vor die KPKS-Sequenz an Position 169 eine RFP-cDNA inkliniert wurde (GPR108-(169RFP)-GFP), um so eine separate Detektion des N- und C-Terminus im Western Blot mit verschiedenen Antikörpern zu ermöglichen. Interessanterweise resultiert in dieser Spur, welche zwar die beiden Fluoreszenzproteine, jedoch keine Mutation der GPR108-Sequenz beinhaltet keine Bande mehr, welche dem C-Terminus des GPR108-Proteins entsprechen könnte. Die Spuren 8 bis 14 zeigen die bereits in Abb. 15 schematisch aufgeführten verschiedenen

Mutationen des GPR108-Proteins. Insgesamt erfolgte mit diesen Mutationen die Untersuchung von drei potentiellen Schnittstellen: zum einen die Positionen 92 und 162, an welchen jeweils ein positiv geladenes Arginin (R) zu einem Phenylalanin (F) mutiert worden war, zum anderen die oben bereits beschriebene KPKS-Sequenz an Position 174. Jede Mutation wurde dabei sowohl alleine als auch in allen hierbei möglichen Kombinationen betrachtet. In allen Konstrukten lag das RFP-Protein ebenfalls an Position 169 vor, das GFP-Protein C-terminal fusioniert. Beim Vergleich dieser GPR108-Konstrukte mit jenem Konstrukt, bei welchem das RFP- und GFP-Protein an der gleichen Position lokalisiert waren, jedoch keine Mutation der GPR108-Sequenz vorgenommen wurde, zeigen sich die resultierenden Banden aller untersuchten Konstrukte weder bei alleiniger Mutation der drei potentiellen Schnittstellen noch unter Kombination dieser Mutationen wesentlich different hierzu. In allen Spuren stellt sich sowohl unter Detektion mit einem gegen das GFP-Protein (Aufnahme A) als auch mit einem gegen das RFP-Protein gerichteten Antikörper (Aufnahme B) eine Bande dar, welche mit etwa 113 kDa am ehesten dem Volllängenprotein des GPR108-Proteins mit den Proteinen RFP und GFP entspricht. Des Weiteren zeigt sich in allen Spuren, ebenfalls in beiden Aufnahmen, eine kürzere Bande, welche keinem bestimmten Proteinabschnitt zugeordnet werden kann. Somit scheinen diese Mutationen keinen wesentlichen Einfluss auf die Spaltung des GPR108-Proteins auszuüben.

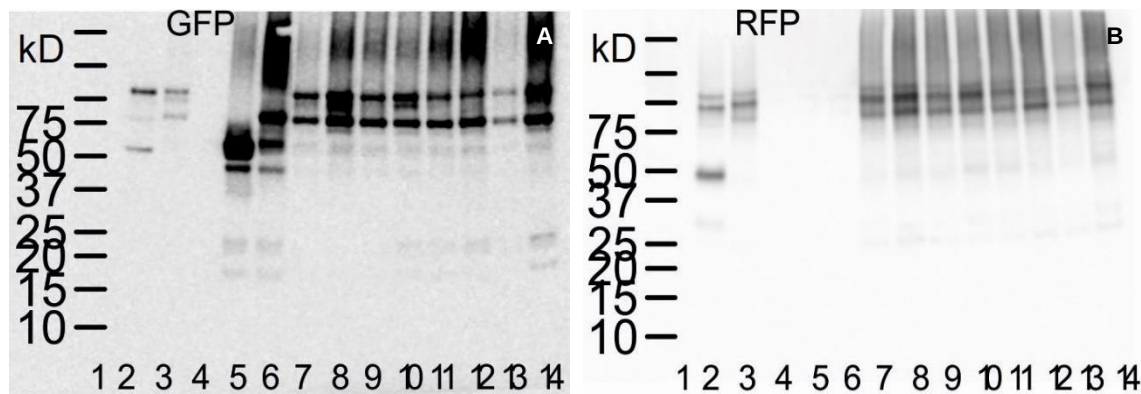


Abb. 23: Western Blot verschiedener Mutanten des GPR108-Proteins zur Lokalisierung einer möglichen Schnittstellenposition.

A: Der verwendete Antikörper ist gegen GFP gerichtet. B: Der verwendete Antikörper ist gegen RFP gerichtet.

Spur 1: Marker in kDa. Spur 2: Kontrolle, GPR107-(179RFP)-GFP transfiziert. Spur 3: Kontrolle, GPR108-(169RFP)-GFP transfiziert. Spur 4: Kontrolle, nicht transfiziert. Spur 5: GPR108 Δ 35-168-GFP (C-Terminus), GFP-Markierung C-terminal. Spur 6: GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP mit Mutation des Aminosäuremotivs KPKS an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen, GFP-Markierung C-terminal. Spur 7: GPR108-(169RFP)-GFP. Spur 8: GPR108-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP mit Mutation des Aminosäuremotivs KPKS an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen. Spur 9: GPR108-(R₉₂F)-(169RFP)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 92 zu einem ungeladenen Phenylalanin. Spur 10: GPR108-(R₁₆₂F)-(169RFP)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 162 zu einem ungeladenen Phenylalanin. Spur 11: GPR108-(R₉₂F)-(R₁₆₂F)-(169RFP)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 92 und 162 zu einem ungeladenen Phenylalanin. Spur 12: GPR108-(R₉₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 92 zu einem ungeladenen Phenylalanin sowie Mutation des Aminosäuremotivs KPKS an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen. Spur 13: GPR108-(R₁₆₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 162 zu einem ungeladenen Phenylalanin sowie Mutation des Aminosäuremotivs KPKS an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen. Spur 14: GPR108-(R₉₂F)-(R₁₆₂F)-(169RFP)-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP mit Mutation der Aminosäure Arginin an Position 92 und 162 zu einem ungeladenen Phenylalanin sowie Mutation des Aminosäuremotivs KPKS an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen.

In den Konstrukten der Spuren 7 bis 14 befindet sich die RFP-Markierung jeweils an Position 169 und die GFP-Markierung C-terminal.

4.5 Die Lokalisation der Schnittstelle des GPR107-Proteins

Im Gegensatz zu dem G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 scheint sich für das GPR107-Protein die Lokalisation der Schnittstelle deutlich klarer darzustellen. Dabei scheint in erster Linie das KSKR-Motiv an Position 179 unmittelbar vor den Transmembranomänen für die Spaltung des Proteins verantwortlich zu sein (Tafesse *et al.*, 2014). Für eine genauere Untersuchung wurde ein Konstrukt kloniert, in welchem dieses positiv geladene Schnittstellenmotiv durch vier ungeladene Aminosäuren, genauer vier Alanine (A), ersetzt wurde (GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP) (Nillofar Johari, Masterarbeit 2019). Mit Hilfe des in Abb. 24 dargestellten Western Blots erfolgte durch Nillofar Johari die Analyse dieses Konstrukts sowie dessen Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Sequenz des GPR107-Proteins. Der verwendete Antikörper richtete sich dabei jeweils gegen das C-terminal fusionierte GFP-Protein.

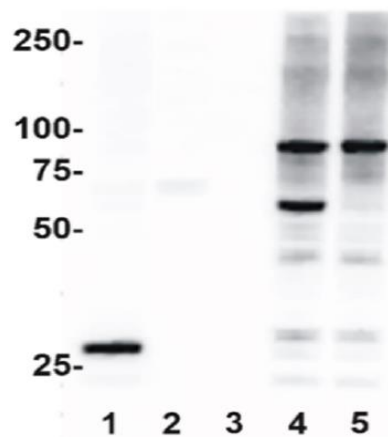


Abb. 24: Western Blot GPR107-GFP und GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP.

Spur 1: Kontrolle, GPR107-IRES-GFP transfiziert. Spur 2: Kontrolle, nicht transfiziert. Spur 3: leer. Spur 4: GPR107-GFP, GFP-Markierung C-terminal. Spur 5: GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP mit Mutation des Schnittstellenmotivs KSKR an Position 174 zu vier ungeladenen Alaninen, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern, GFP-Markierung C-terminal.

Der verwendete Antikörper ist gegen GFP gerichtet.

(Abbildung: Johari Niloofar, Masterarbeit 2019)

Zur Kontrolle einer sicheren Detektion des GFP-Proteins durch den verwendeten Antikörper wurde in Spur 1 das GPR107-Protein als IRES-GFP-Konstrukt aufgetragen. Zudem erfolgte zum Ausschluss einer unspezifischen Interaktion des Antikörpers mit anderen Proteinen aus den HEK-Zellen in Spur 2 eine Kontrolle mit nicht-transfizierten HEK-Zellen. In Spur 4 wurde der Wildtyp des GPR107-Proteins mit C-terminaler GFP-Markierung aufgetragen. Die zwei entstehenden Banden lassen sich zum einen mit etwa 85 kDa dem Volllängenprotein ohne Signalpeptid, jedoch mit fusioniertem GFP-Protein zuordnen und zum anderen mit etwa 69 kDa dem C-Terminus nach erfolgter Spaltung im Bereich des KSKR-Motivs (Position 179) und ebenfalls fusioniertem GFP-Protein. Da der N-Terminus des Proteins nicht markiert wurde, ist dieser nach Abspaltung nicht detektierbar und erscheint nicht auf dem Western Blot. In der letzten Spur ist das Konstrukt des GPR107-Proteins dargestellt, bei welchem das vermutete Schnittstellenmotiv durch vier Alanine (A) ersetzt wurde. Dass hierbei lediglich die Bande des Volllängenproteins sichtbar ist, untermauert, dass dieses KSKR-Motiv einen Teil der Schnittstelle darstellt.

Zur weiteren Bestätigung sollte zusätzlich ein mikroskopischer Nachweis dieser Schnittstelle erfolgen. Hierzu erfolgte die Klonierung eines Konstrukts, welches unmittelbar vor der vermuteten Schnittstelle mittels eines RFP-Proteins markiert wurde (GPR107-(179RFP)-GFP), C-terminal blieb die GFP-Markierung erhalten (Niloofar Johari, Masterarbeit 2019). Äquivalent zu den oben beschriebenen Klonen wurde auch hier die positiv geladene Schnittstellensequenz zu vier Alaninen (A) mutiert (GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP) (Verena Nett, Bachelorarbeit 2020). Beide Konstrukte wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht und sind in Abb. 25 und Abb. 26 gezeigt.

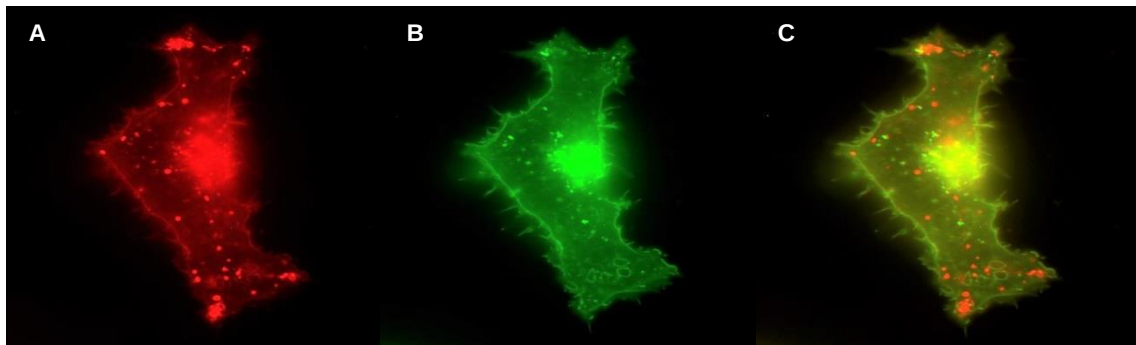


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179RFP)-GFP.

A: N-Terminus des GPR107-Proteins mit RFP-Markierung an Position 179 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KSKR. B: C-Terminus des GPR107-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. C: Merged

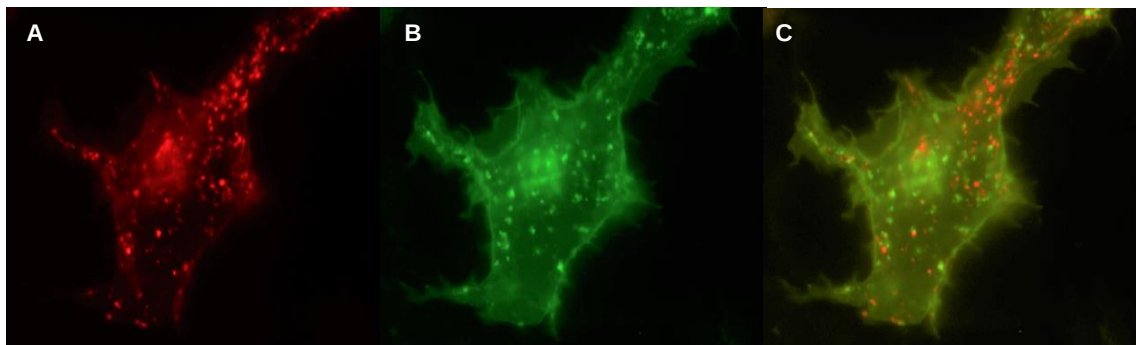


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR107-Proteins mit RFP-Markierung an Position 179 vor dem potentiellen Schnittstellenmotiv KSKR. B: C-Terminus des GPR107-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das Schnittstellenmotiv KSKR an Position 179 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged
(Abbildung: Nett Verena, Bachelorarbeit 2020)

In den Aufnahmen A sind jeweils die rot-fluoreszierend markierten N-Termini der Konstrukte dargestellt, die Aufnahmen B zeigen die grün-fluoreszierend markierten C-Termini. Für die Überprüfung einer Kolo-kalisation dieser Proteinabschnitte und damit eines ungespaltenen Vorliegens des Proteins, sind jeweils in den Aufnahmen C die übereinandergelegten Bilder des N- und C-Terminus dargestellt.

Betrachtet man zunächst das Wildtyp-Konstrukt des GPR107-Proteins (GPR107-(179RFP)-GFP) lässt sich deutlich erkennen, dass der RFP-markierte N-Terminus keine identische Lokalisation mit dem GFP-markierten C-Terminus aufweist. Während das GFP-Protein in erster Linie in der Membran und eher zentralen Vesikeln sichtbar wird, ist das RFP-Protein hauptsächlich in Vesikeln in den Zellausläufern zu finden. Es scheint dementsprechend zu einer Spaltung des Proteins im Bereich zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen zu kommen. Betrachtet man das KSKR-mutierte Konstrukt (GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP) lässt sich hierzu kein wesentlicher Unterschied erkennen. Nach wie vor lokalisieren das GFP- und RFP-Protein an verschiedenen Positionen,

sodass von einer weiterhin bestehenden Spaltung des Proteins ausgegangen werden muss.

Da dies im Widerspruch zu den im Western Blot gezeigten Ergebnissen steht, stellte sich die Frage, inwieweit das einklonierte rot-fluoreszierende Protein an dieser Position die Schnittstelle beeinflusst oder gar eine zusätzliche Schnittstelle einbringt. Aus diesem Grund erfolgte das Klonieren eines Konstruktes, in welchem die beiden Proteine RFP und GFP gegeneinander ausgetauscht wurden (GPR107-(179GFP)-RFP). Wiederum sollte hierbei das Wildtyp-Konstrukt mit der KSKR-mutierten Variante verglichen werden. Die mikroskopische Beobachtung ist in Abb. 27 dargestellt.



Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179GFP)-RFP.

A: C-Terminus des GPR107-Proteins mit RFP-Markierung C-terminal. B: N-Terminus des GPR107-Proteins mit GFP-Markierung an Position 179 vor dem Schnittstellenmotiv KSKR. C: Merged

In Aufnahme A ist der nun RFP-markierte C-Terminus des GPR107-Proteins dargestellt, wobei für eine bessere Übersicht eine geringere Vergrößerung gewählt wurde. Aufnahme B zeigt die Mikroskopie mit einem GFP-Filter, in welcher auch unter langen Belichtungszeiten nahezu keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte. Das GFP-Protein scheint an dieser Position innerhalb des Proteins (Position 179) derart beeinflusst zu werden, dass dessen fluoreszierende Eigenschaft nahezu gänzlich verloren geht. In beiden Konstrukten konnte lediglich die Lokalisation des RFP-markierten C-Terminus detektiert werden, wodurch die Beurteilung einer Spaltung nicht möglich war.

Für eine nähere Untersuchung dieser Beobachtung wurde für diese Konstrukte ergänzend ein Western Blot erstellt. Dabei erfolgte sowohl die Untersuchung der Konstrukte, welche an Position 179 RFP- sowie C-terminal GFP-markiert vorlagen, als auch die Untersuchung der Konstrukte, welche an Position 179 GFP- und C-terminal RFP-markiert vorlagen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 28 dargestellt. Dabei wurde in Aufnahme A ein gegen das GFP-Protein gerichteter Antikörper, in Aufnahme B ein Antikörper gegen das RFP-Protein verwendet. Zum Ausschluss einer unspezifischen Interaktion der

Antikörper mit anderen Proteinen aus den HEK-Zellen sind in Spur 3 nicht-transfizierte HEK-Zellen dargestellt. Zur Kontrolle einer sicheren Detektion des GFP- sowie des RFP-Proteins durch die jeweils verwendeten Antikörper wurde in Spur 2 das GPR107-Konstrukt aufgetragen, in welchem der N-Terminus an Position 179 vor der KSKR-Sequenz (Position 179) mit einem RFP-Protein und der C-Terminus C-terminal mit einem GFP-Protein markiert wurde (GPR107-(179RFP)-GFP). Es zeigt sich hierbei in beiden Aufnahmen zunächst eine Bande, welche mit etwa 114 kDa dem Volllängenprotein des GPR107-Proteins mit dem GFP- und RFP-Protein entspricht. Die ebenfalls in beiden Aufnahmen erkennbare Bande unmittelbar unter der Volllängenbande könnte das gesamte GPR107-Protein nach Abspaltung des Signalpeptids darstellen (111 kDa). Eine weitere deutliche Bande stellt sich in Aufnahme A bei einer Länge von etwa 69 kDa dar und ist somit passend zu dem C-terminalen Abschnitt des GPR107-Proteins mit fusioniertem GFP-Protein. In Aufnahme B zeigt sich hier eine Bande von etwa 41 kDa, welche sich somit dem N-Terminus des GPR107-Proteins mit fusioniertem RFP-Protein zuordnen lässt. Die Längen des N- und C-Terminus entsprechen hierbei den erwarteten Größen bei Spaltung des GPR107-Proteins an der KSKR-Sequenz an Position 179 vor den Transmembrandomänen. Die feine Bande zwischen 75 und 100 kDa in Aufnahme A lässt sich keinem bestimmten Abschnitt des GPR107-Proteins zuordnen, sodass deren Entsprechung unklar ist.

In Spur 4 wurde ein Konstrukt des GPR107-Proteins aufgetragen, in welchem die Protease-Schnittstelle KSKR des GPR107-Proteins (Position 179) zu vier Alaninen (A) mutiert vorlag (GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP). Durch die hiermit einhergehende Modifikation der ursprünglich geladenen Sequenz in eine neutrale Ladung sollte die Spaltung des Proteins an dieser Position verhindert werden. Wiederum befand sich hierbei das RFP-Protein vor dem Schnittstellenmotiv an Position 179 und das GFP-Protein C-terminal fusioniert, um die separate Detektion der beiden Proteinabschnitte zu ermöglichen. Es zeigt sich sowohl in Aufnahme A als auch in Aufnahme B eine Bande, welche mit etwa 114 kDa dem gesamten GPR107-Protein mit den beiden Fluoreszenzproteinen RFP und GFP zugeordnet werden kann. Die Bande unmittelbar darunter lässt wiederum das gesamte GPR107-Protein nach Abspaltung des Signalpeptids vermuten (111 kDa). Auch hier zeigt sich in Aufnahme A, sogar deutlich stärker, die bereits in Spur 2 resultierende Bande zwischen 75 und 100 kDa. Die Bande, welche zuvor dem GFP-markierten C-Terminus zugeordnet werden konnte, zeigt sich hingegen kaum mehr. Auch in Aufnahme B stellt sich die Bande bei 41 kDa, welche am ehesten dem RFP-markierten N-Terminus entspricht, deutlich schwächer im Vergleich zu dem in Spur 2 gezeigten GPR107-Protein ohne Mutation des KSKR-Motivs dar. Somit scheint die Spaltung des GPR107-Proteins hier nur noch in geringem Ausmaß möglich zu sein, sodass sich die

KSKR-Sequenz als Schnittstellensequenz des Proteins bestätigt. In Spur 5 wurde ein Konstrukt des GPR107-Proteins aufgetragen, in welchem die RFP-cDNA direkt hinter dem KSKR-Motiv an Position 185 einkloniert wurde (GPR107-(185RFP)-GFP). Die GFP-cDNA lag weiterhin C-terminal fusioniert vor. Es zeigt sich erneut sowohl in Aufnahme A als auch in Aufnahme B mit ungefähr 114 kDa das gesamte GPR107-Protein mit den Fluoreszenzproteinen RFP und GFP. Ebenfalls in beiden Aufnahmen stellt sich mit etwa 95 kDa der C-Terminus nach Abspaltung des N-Terminus dar, wobei sowohl das RFP- als auch das GFP-Protein an diesen Proteinabschnitt gebunden vorliegen. Unklar bleibt jedoch die resultierende nochmals etwas kürzere Bande in beiden Aufnahmen.

Zur näheren Untersuchung des Einflusses der Fluoreszenzproteine auf das GPR107-Protein an den jeweiligen Positionen zeigt Spur 6 das GPR107-Konstrukt, in welchem das RFP- und GFP-Protein gegeneinander ausgetauscht wurden (GPR107-(179GFP)-RFP). Somit lag hier vor der Schnittstelle an Position 179 das GFP-Protein, C-terminal hingegen das RFP-Protein vor. Mit ungefähr 114 kDa stellt sich in beiden Aufnahmen abermals die Bande dar, welche dem Volllängenprotein des GPR107-Proteins mit dem GFP- und RFP-Protein entspricht. Der nun GFP-markierte N-Terminus zeigt sich mit etwa 43 kDa in Aufnahme A, der RFP-markierte C-Terminus mit etwa 68 kDa in Aufnahme B. In Spur 7 ist ergänzend ein Konstrukt des GPR107-Proteins dargestellt, welches lediglich vor der KSKR-Schnittstelle mit einem GFP-Protein (an Position 179) markiert wurde (GPR107-(179GFP)). Der C-Terminus blieb hierbei unmarkiert. Es zeigt sich in Aufnahme A eine Bande bei etwa 89 kDa, welche dem gesamten GPR107-Protein mit GFP-Protein entspricht sowie eine kürzere Bande, welche mit ungefähr 43 kDa den GFP-markierten N-Terminus nach Abspaltung des C-Terminus vermuten lässt. Spur 8 zeigt abschließend das GPR107-Konstrukt, in welchem äquivalent zu Spur 6 N-terminal vor der Schnittstellensequenz ein GFP-Protein an Position 179 vorlag, sowie am C-Terminus ein RFP-Protein fusioniert wurde. Entsprechend dem Konstrukt in Spur 4 erfolgte auch hier die Mutation der KSKR-Sequenz an Position 179 zu vier Alaninen (A), um eine Spaltung des Proteins an dieser Position zu verhindern (GPR107-(179GFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-RFP). Da in dieser Spur sowohl in Aufnahme A die dem N-Terminus entsprechende Bande bei 43 kDa als auch in Aufnahme B die dem C-Terminus entsprechende Bande bei 68 kDa nicht detektiert werden konnten, sondern in beiden Aufnahmen lediglich die dem Volllängenprotein mit GFP- und RFP-Protein entsprechende Bande bei etwa 114 kDa erkennbar ist, scheint die Spaltung des GPR107-Proteins auch in diesem Konstrukt nahezu komplett verhindert zu werden. Dementsprechend bestätigt sich auch bei Austausch der Fluoreszenzproteine RFP und GFP gegeneinander die KSKR-Sequenz als Schnittstellenmotiv des GPR107-Proteins.

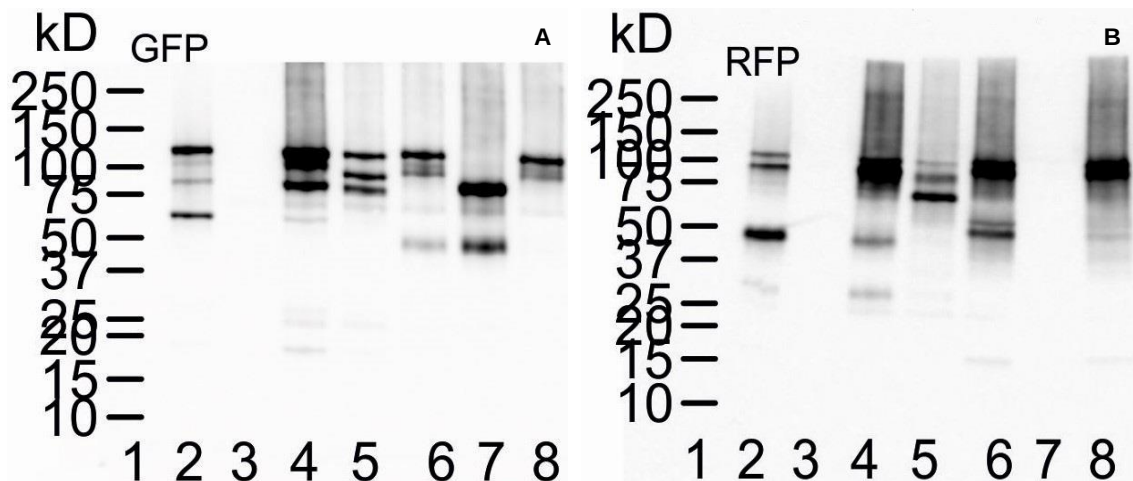


Abb. 28: Western Blot verschiedener Mutanten des GPR107-Proteins zur ergänzenden Untersuchung des Aminosäuremotivs KSKR an Position 179 als Schnittstellenlokalisierung.

A: Der verwendete Antikörper ist gegen GFP gerichtet. B: Der verwendete Antikörper ist gegen RFP gerichtet.

Spur 1: Marker in kDa. Spur 2: Kontrolle, GPR107-(179RFP)-GFP transfiziert. Spur 3: Kontrolle, nicht transfiziert. Spur 4: GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP mit Mutation des Schnittstellenmotivs KSKR an Position 179 zu vier ungeladenen Alaninen. Die RFP-Markierung befindet sich vor dem KSKR-Motiv an Position 179, die GFP-Markierung C-terminal. Spur 5: GPR107-(185RFP)-GFP. Die RFP-Markierung befindet sich hinter dem KSKR-Motiv an Position 185, die GFP-Markierung C-terminal. Spur 6: GPR107-(179GFP)-RFP. Die GFP-Markierung befindet sich vor dem KSKR-Motiv an Position 179, die RFP-Markierung C-terminal. Spur 7: GPR107-(179GFP). Die GFP-Markierung befindet sich vor dem KSKR-Motiv an Position 179. Spur 8: GPR107-(179GFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-RFP mit Mutation des Schnittstellenmotivs KSKR an Position 179 zu vier ungeladenen Alaninen. Die GFP-Markierung befindet sich vor dem KSKR-Motiv an Position 179, die RFP-Markierung C-terminal.

Ein weiterer Versuch zeigte ergänzend auch mikroskopisch, dass das KSKR-Motiv als Protease-Schnittstelle des GPR107-Proteins fungiert. Es wurde ein Konstrukt kloniert, bei welchem sich die RFP-Markierung bereits unmittelbar im Anschluss an die Signalpeptidsequenz an Position 47 befindet. Durch diese, von der zu untersuchenden Schnittstelle weit entfernte, Position des Fluoreszenzproteins sollte dessen Einfluss auf das Schnittstellenmotiv möglichst geringgehalten werden. Äquivalent zu den bisherigen Untersuchungen erfolgte auch hierbei die Mutation des KSKR-Motivs an Position 179 zu vier Alaninen (A), um eine Spaltung des Proteins an dieser Position zu verhindern. Die mikroskopischen Aufnahmen dieser Mutante des GPR107-Proteins (GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP) sind in Abb. 29 dargestellt.

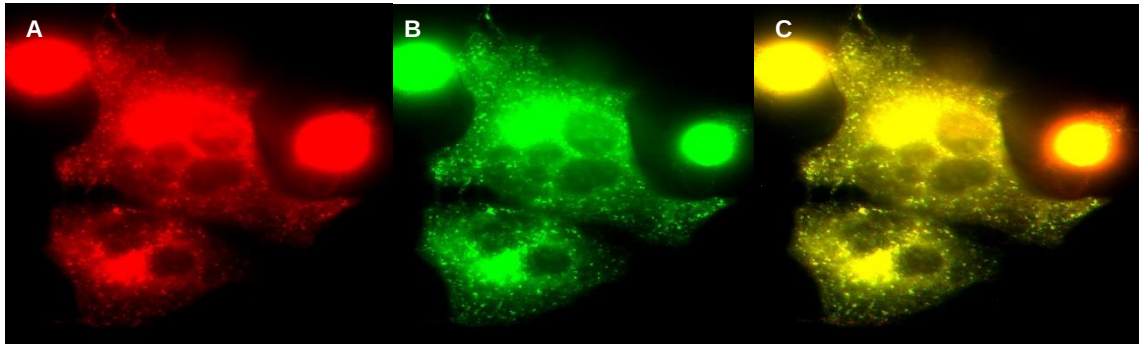


Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP.

A: N-Terminus des GPR107-Proteins mit RFP-Markierung an Position 47 hinter dem Schnittstellenmotiv des Signalpeptids. B: C-Terminus des GPR107-Proteins mit GFP-Markierung C-terminal. Das Schnittstellenmotiv KSKR an Position 179 ist zu vier ungeladenen Alaninen mutiert, um an dieser Position eine Spaltung des Proteins zu verhindern. C: Merged

Aufnahme A zeigt den an Position 47 RFP-markierten N-Terminus, in Aufnahme B ist der GFP-markierte C-Terminus des GPR107-Proteins dargestellt. Nach Übereinanderlegen dieser Aufnahmen wird eine nahezu identische Verteilung der beiden Proteinabschnitte in der Zelle ersichtlich. Dies legt die Vermutung eines zusammenhängenden Vorliegens des N- und C-Terminus nahe. Somit scheint es innerhalb dieses Konstruktes nicht zu einer Spaltung des Proteins zu kommen. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass das ungespaltene Protein nicht mehr in die Zellmembran zu gelangen scheint, sondern in Vesikeln beziehungsweise diffus über die Zelle verteilt vorliegt. Durch dieses Ergebnis lässt sich die KSKR-Sequenz vor den Transmembrandomänen somit auch mikroskopisch als Protease-Erkennungssequenz des GPR107-Proteins bestätigen.

4.6 Das GPR107-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 zu erhalten, wurde das Protein unter verschiedenen Bedingungen mittels Calcium Imaging funktionell untersucht. Hierzu wurde zunächst das Verhalten GPR107 exprimierender Zellen auf eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration beobachtet, wobei mit einer 2,5 mM Calciumlösung eine etwa physiologische extrazelluläre Konzentration gewählt wurde. Um in der Messung sicherzustellen, dass ausschließlich Zellen betrachtet werden, welche das GPR107-Protein tatsächlich exprimieren, wurden Zellen mit einem GPR107-IRES-GFP-Konstrukt transfiziert, sodass beide Proteine, das GPR107-Protein und das GFP-Protein, in exprimierenden Zellen gebildet werden. Durch die aus der IRES-Sequenz resultierende separate Translation findet eine mögliche Interaktion des GPR107-Proteins mit dem GFP-Protein nicht statt. Um mögliche Effekte eindeutig auf die Expression des GPR107-Proteins zurückführen zu können, erfolgte der Vergleich mit Kontrollzellen, welche lediglich mit dem IRES-GFP-Vektor transfiziert worden waren. Während der Messung erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung. Wie bei Betrachtung der Messergebnisse in Abb. 30 deutlich wird, zeigt sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen den GPR107 exprimierenden Zellen (rot) und den Kontrollzellen (grau). Während die extrazelluläre Applikation des Calciums auf die GFP-Kontrollzellen erwartungsgemäß lediglich einen geringen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Folge hat, resultiert die Applikation in GPR107 exprimierenden Zellen in einem deutlich höheren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dementsprechend scheint die Expression des GPR107-Proteins den Calciumeinstrom in die Zellen erheblich zu verstärken.

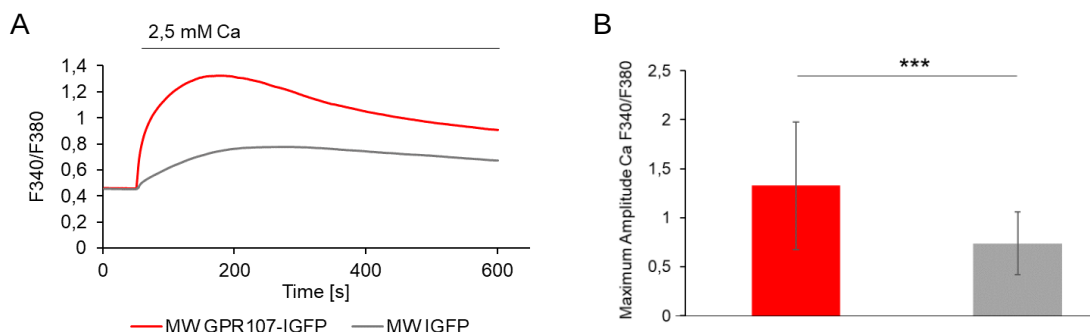


Abb. 30: Das GPR107-Protein verstärkt die zelluläre Calciumaufnahme.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen (n=325/ N=8, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=322/ N=8, grau) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,33 $\pm$ 0,65, für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 0,74 $\pm$ 0,32. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt $p < 0,0001$.

Um zu untersuchen, welcher Teil des GPR107-Proteins diese Calciumänderung hervorruft, wurden vergleichbare Experimente mit Deletionsmutanten des GPR107-Proteins durchgeführt. Hierfür wurde zum einen der N-terminale und zum anderen der C-terminale Abschnitt, jeweils einschließlich der Schnittstellensequenz, betrachtet. Die Klonierung beider Konstrukte erfolgte dabei ebenfalls in einen IGFP-Vektor. Verglichen wurden diese Zellen mit Kontrollzellen, welche entweder mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Während der Messung erfolgte die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

Die Ergebnisse für den C-Terminus des GPR107-Proteins (GPR107 Δ 44-178-IGFP) sind der Abb. 31, die des N-Terminus (GPR107 Δ 183-552-IGFP) der Abb. 32 zu entnehmen. Zunächst lässt sich feststellen, dass die Expression des GPR107-Proteins (rot), entsprechend dem vorigen Experiment, in einem signifikant erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen resultiert. Vergleicht man hierzu die Messergebnisse des C-terminalen GPR107-Proteinabschnitts (orange), so stellt sich der Calciumeinstrom in diese Zellen nochmals signifikant verstärkt gegenüber den GPR107-Volllängenprotein exprimierenden Zellen dar. Im Gegensatz hierzu zeigt sich für den Calciumeinstrom in Zellen, welche lediglich den N-Terminus des GPR107-Proteins exprimieren (orange), kein signifikanter Unterschied verglichen mit GFP-Kontrollzellen (grau).

Da somit der N-terminale Abschnitt des Proteins keinen Einfluss auf den Calciumeinstrom in die Zellen aufzuweisen scheint, die Expression des C-Terminus hingegen einen nochmals verstärkten Calciumeinstrom gegenüber dem GPR107-Volllängenprotein zur Folge hat, lässt sich der, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende, erhöhte Calciumeinstrom klar dem C-terminalen Abschnitt des Proteins zuordnen.

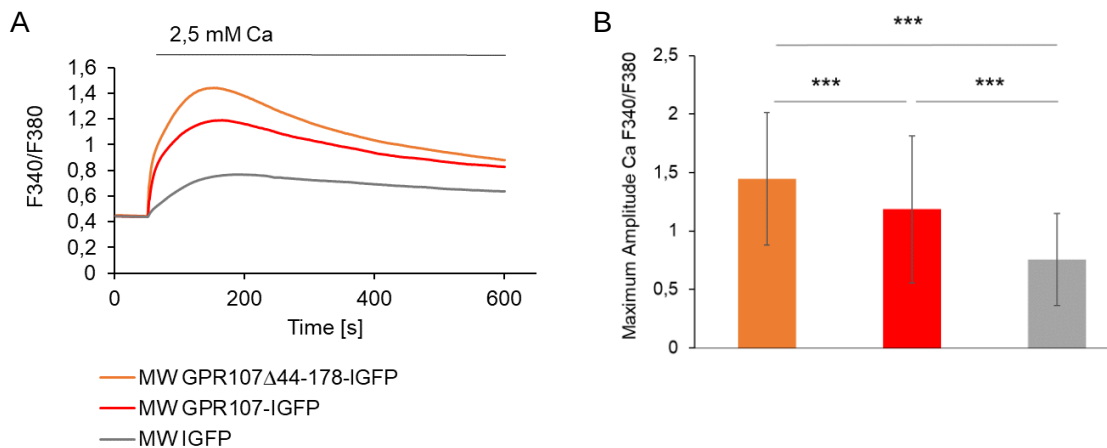


Abb. 31: Der C-Terminus des GPR107-Proteins verstärkt die zelluläre Calciumaufnahme.

A: Messkurven GPR107 Δ 44-178-IGFP transfizierter Zellen (n=306/ N=6, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=321/ N=6, rot) und IGFP transfizierten (n=279/ N=6, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107 Δ 44-178-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,44 $\pm$ 0,57, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,18 $\pm$ 0,63 und für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 0,75 $\pm$ 0,40. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 44-178-IGFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001, der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 44-178-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen ebenfalls p < 0,001 und der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen ebenfalls p < 0,001.

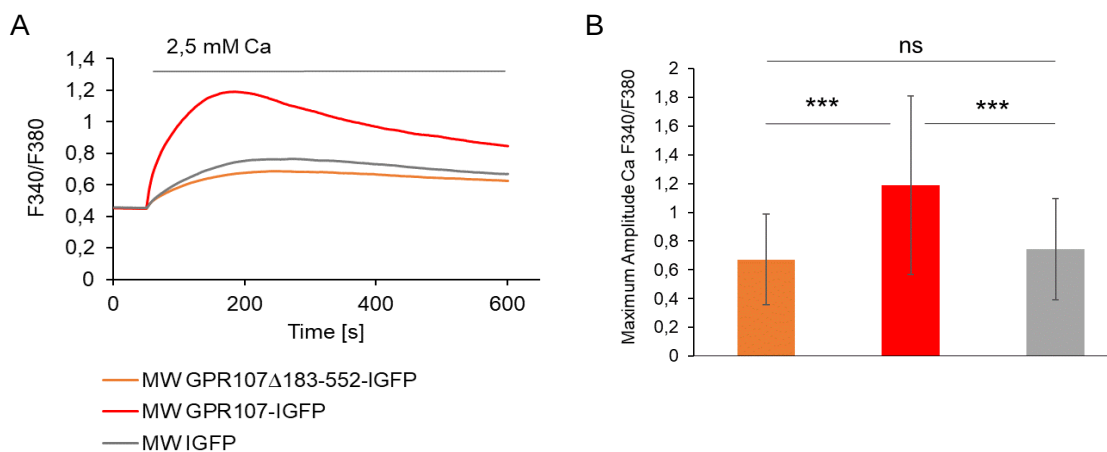


Abb. 32: Der N-Terminus des GPR107-Proteins beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107 Δ 183-552-IGFP transfizierter Zellen (n=277/ N=7, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=148/ N=4, rot) und IGFP transfizierten (n=212/ N=6, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107 Δ 183-552-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,67 $\pm$ 0,32, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,19 $\pm$ 0,62 und für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 0,74 $\pm$ 0,35. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 183-552-IGFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001, der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 183-552-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen p > 0,05 und der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen p < 0,001.

4.7 Das GPR108-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht

Um zu untersuchen, ob auch der G-Protein gekoppelte Rezeptor 108 die zelluläre Calciumaufnahme beeinflusst, wurden mit den in Kapitel 4.6 vergleichbare Experimente durchgeführt. Hierfür wurden Zellen mit einem GPR108-IGFP-Konstrukt transfiziert und wiederum mit IGFP transfizierten Kontrollzellen verglichen. Während der Messungen erfolgte die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 33 dargestellt. Hierbei zeigt sich zwar ein rechnerisch signifikant erhöhter Calciumeinstrom in jene Zellen, welche das GPR108-Protein exprimieren (rot), allerdings fiel dieser mit einer Differenz der F340/ F380-Ratio von 0,11 zum Zeitpunkt der maximalen intrazellulären Calciumkonzentration gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) lediglich sehr gering aus. Bei diesem äußerst geringen Unterschied bleibt somit ein zugrundeliegender biologischer Mechanismus fraglich und die Expression des GPR108-Proteins scheint den Calciumeinstrom in die Zelle, im Gegensatz zu dem verwandten GPR107-Protein, nur unwesentlich zu beeinflussen.

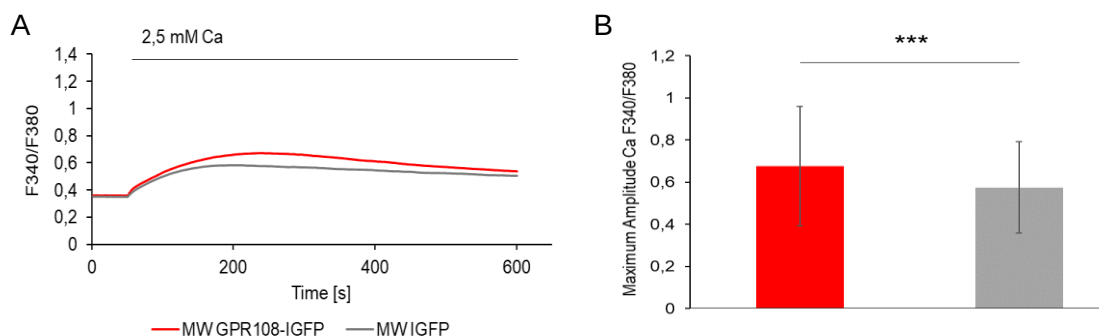


Abb. 33: Das GPR108-Protein beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR108-IGFP transfizierter Zellen (n=176/ N=4, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=146/ N=4, grau) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,68 $\pm$ 0,28, für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 0,57 $\pm$ 0,22. Der p-Wert zwischen den GPR108-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p = 0,0005.

4.8 Das GPR107- und das GPR108-Protein beeinflussen die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum

Aufgrund der Hinweise aus den vorigen Experimenten auf einen Einfluss des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 auf die zelluläre Calciumhomöostase wurde im Folgenden untersucht, inwieweit die Expression der Proteine GPR107 und GPR108 intrazelluläre Calciumspeicher beeinflusst. Hierzu wurde mittels Calcium Imaging die Reaktion GPR107 sowie GPR108 exprimierender Zellen auf eine Carbachol-induzierte Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher beobachtet. Carbachol, als synthetisches Analogon des Acetylcholins, bindet wie dieses an G_q -gekoppelte muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren (M3-Rezeptoren) in der Zellmembran und führt so, vermittelt über die $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, zu einer Aktivierung der Phospholipase C (Caulfield, 1993). Hierdurch kommt es, entsprechend der Signalkaskade G_q -Protein gekoppelter Rezeptoren, zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und einer damit verbundenen Freisetzung des im endoplasmatischen Retikulum gespeicherten Calciums ins Zytosol. Hieraus resultiert folglich ein schneller Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Nachdem diese anschließend wieder auf etwa die anfängliche Konzentration abgesunken ist, sollte im selben Experiment zudem die Reaktion der GPR107 sowie GPR108 exprimierenden Zellen auf eine nachfolgende Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration bei entleerten Speicherzuständen untersucht werden. Dieser Calciumeinstrom wird als Speicher-vermittelter Calciumeinstrom bezeichnet (SOCE, *store-operated calcium entry*) (Putney, 1986) und durch die konzertierte Aktion von im ER lokalisierten STIM- (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005) und in der Plasmamembran lokalisierten Orai-Proteinen (Zhang *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Feske *et al.*, 2006) verursacht.

Gemessen wurden für diese Untersuchung Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP- beziehungsweise mit dem GPR108-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Zum Vergleich wurden dabei jeweils Kontrollzellen mit transfiziertem IGFP-Vektor herangezogen. Während der Messungen erfolgte zunächst die Applikation einer B1-Lösung inklusive Carbachol (100 μ M), im Anschluss die Zugabe einer B1-Lösung inklusive Calcium (2,5 mM).

In Abb. 34 sind zunächst die Ergebnisse des GPR107-Proteins dargestellt. Dabei stellt sich die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung ins Zytosol in GPR107 exprimierenden Zellen (rot) signifikant verringert gegenüber GFP-Kontrollzellen (grau) dar. Für die anschließende extrazelluläre Calciumapplikation hingegen zeigt sich kein signifikanter Unterschied für den hieraus resultierenden erneuten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Auch bei der Untersuchung des GPR108-Proteins (Abb. 35) resultiert die Applikation des Carbachols in Zellen, welche das GPR108-Protein exprimieren (rot), in einer signifikant verringerten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, verglichen mit GFP-Kontrollzellen (grau). Im Gegensatz zu den Messungen des GPR107-Proteins zeigt sich hierbei jedoch ebenso für den anschließenden Calciumeinstrom nach extrazellulärer Calciumzugabe ein signifikant verringerter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in GPR108 exprimierenden Zellen.

Zusammenfassend scheint somit sowohl die Expression des GPR107-Proteins als auch die des GPR108-Proteins in einer signifikant verringerten Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol zu resultieren. Für die anschließende Calciumzugabe ergibt sich lediglich bei Expression des GPR108-Proteins ein verringerter Calciumeinstrom in die Zellen. Letztendlich zeigt sich hierdurch erneut ein erheblicher Einfluss beider Rezeptoren auf die zelluläre Calciumhomöostase.

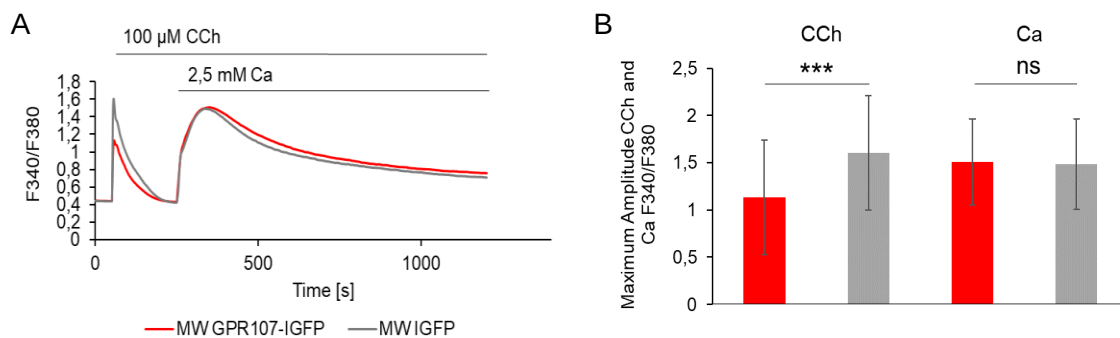


Abb. 34: Das GPR107-Protein verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen (n=387/ N=9, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=396/ N=9, grau) während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,13 $\pm$ 0,61 nach Applikation des Carbachols und von 1,51 $\pm$ 0,45 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,60 $\pm$ 0,60 nach Applikation des Carbachols und von 1,48 $\pm$ 0,48 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt $p < 0,001$ für den Carbachol-Peak und $p > 0,05$ für das Maximum nach Calciumzugabe.

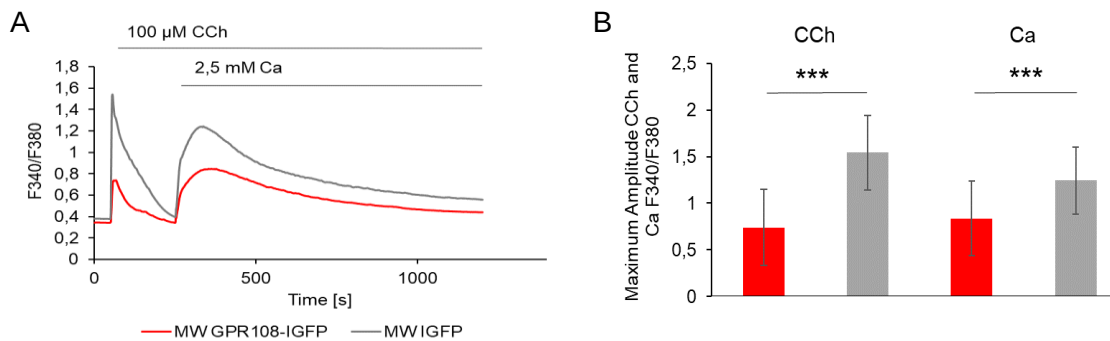


Abb. 35: Das GPR108-Protein verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle.

A: Messkurven GPR108-IGFP transfizierter Zellen (n=89/ N=4, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=99/ N=4, grau) während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,74 $\pm$ 0,41 nach Applikation des Carbachols und von 0,84 $\pm$ 0,40 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,54 $\pm$ 0,40 nach Applikation des Carbachols und von 1,24 $\pm$ 0,36 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR108-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,0001 für den Carbachol-Peak und ebenfalls p < 0,0001 für das Maximum nach Calciumzugabe.

Um den Effekt des verringerten Carbachol-induzierten Calciumausstroms aus dem ER bei Expression des GPR107- oder GPR108-Proteins, sowie im Falle des GPR108-Proteins auch den anschließend verringerten Calciumeinstrom in die Zelle, genauer zu betrachten und einem Abschnitt der Proteine zuordnen zu können, wurden äquivalent zu den vorigen Calciumexperimenten auch hier der N- und C-Terminus beider Proteine separat voneinander untersucht. Dabei erfolgte die Transfektion entsprechend den Untersuchungen, welche in Kapitel 4.6 beschrieben sind, unter Verwendung von IGFP-Vektoren. Verglichen wurden diese Zellen einerseits mit Zellen, welche mit dem GPR107-IGFP- beziehungsweise dem GPR108-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren und andererseits mit Zellen mit transfiziertem IGFP-Vektor. Im Verlauf der Messungen erfolgte gleichermaßen die Applikation der 100 μ M Carbachol/B1-Lösung sowie im Anschluss die Zugabe der 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

Abb. 36 zeigt hierzu die Messergebnisse des C-terminalen (GPR107 Δ 44-178-IGFP), Abb. 37 des N-terminalen (GPR107 Δ 183-552-IGFP) GPR107-Proteins. Dabei wird ersichtlich, dass der C-Terminus des Proteins (orange) eine nahezu identische Wirkung wie das GPR107-Volllängenprotein (rot) aufzuweisen scheint. Beide zeigen nach Carbacholapplikation eine signifikant verringerte Calciumfreisetzung aus dem ER im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen (grau). Die Expression des C-terminalen GPR107-Proteins resultiert hierbei in einer nochmals signifikant verringerten Calciumfreisetzung gegenüber des Volllängenproteins. Für den anschließenden Calcium-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration stellt sich der C-Terminus weder gegenüber dem

GPR107-Volllängenprotein noch gegenüber den GFP-Kontrollzellen signifikant verschieden dar.

Zellen, welche den N-terminalen Bereich des GPR107-Proteins exprimieren (orange), zeigen nach Carbacholapplikation keine verringerte Calciumfreisetzung aus dem ER und verhalten sich dementsprechend wie GFP-Kontrollzellen. Nach anschließender Calciumzugabe ergibt sich jedoch im Vergleich zu GPR107-Volllängenprotein exprimierenden Zellen und den GFP-Kontrollzellen ein etwas verringerter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Für das GPR108-Protein lässt sich ein vergleichbares Resultat beobachten. Abb. 38 zeigt hierbei die Messergebnisse des C-terminalen (GPR108 Δ 35-168-IGFP), Abb. 39 die des N-terminalen (GPR108 Δ 169-543-IGFP) GPR108-Proteins. Äquivalent zu den Messungen des GPR107-Proteins resultiert auch hier die Expression des C-Terminus (orange) in einer signifikant verringerten Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus dem ER. Diese stellt sich im Vergleich zu dem GPR108-Volllängenprotein (rot) nochmals etwas stärker verringert dar. In Folge der anschließenden Calciumapplikation zeigt die Expression des C-terminalen GPR108-Proteins, gleichermaßen wie das Volllängenprotein, einen verringerten Calciumeinstrom gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau). Hierbei unterscheiden sich der alleinige C-Terminus des GPR108-Proteins und das GPR108-Volllängenprotein nicht signifikant voneinander. Ebenfalls äquivalent zu den Beobachtungen des GPR107-Proteins weist die Expression des N-terminalen GPR108-Proteins (orange) weder im Anschluss an die Carbachol- noch im Anschluss an die Calciumapplikation einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen auf. Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass sowohl die verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER bei Expression des GPR107- oder GPR108-Proteins, als auch im Falle des GPR108-Proteins der anschließend verringerte Calciumeinstrom in die Zellen, jeweils durch die C-Termini dieser Proteine verursacht zu werden scheint. Die N-Termini beider Rezeptoren scheinen hingegen nicht an diesen Wirkungen beteiligt zu sein, sodass eine klare Zuordnung dieser Effekte zu den C-terminalen Proteinabschnitten resultiert.

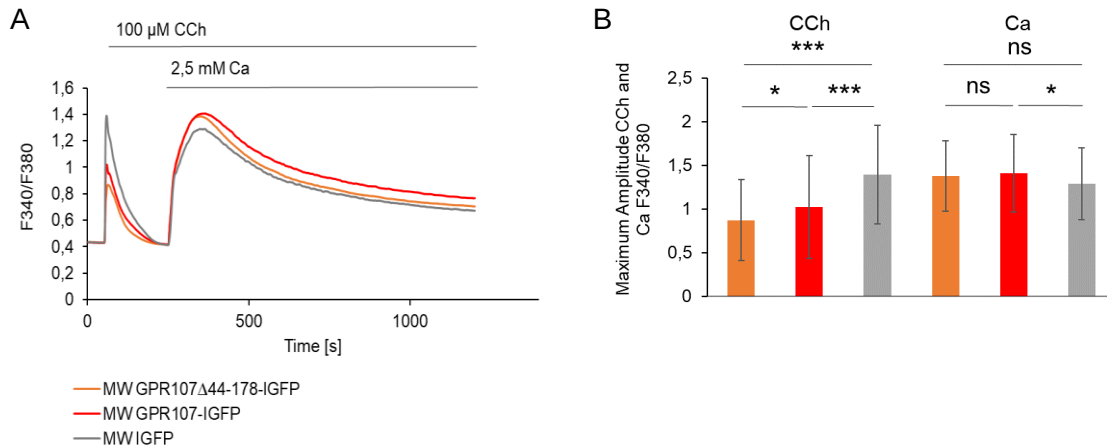


Abb. 36: Der C-Terminus des GPR107-Proteins verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.

A: Messkurven GPR107 Δ 44-178-IGFP transfizierter Zellen (n=213/ N=6, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=195/ N=6, rot) und IGFP transfizierten (n=179/ N=5, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107 Δ 44-178-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,87 $\pm$ 0,46 nach Applikation des Carbachols und von 1,37 $\pm$ 0,40 nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,02 $\pm$ 0,59 nach Applikation des Carbachols und von 1,41 $\pm$ 0,44 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,39 $\pm$ 0,56 nach Applikation des Carbachols und von 1,29 $\pm$ 0,41 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 44-178-IGFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,05 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 44-178-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe.

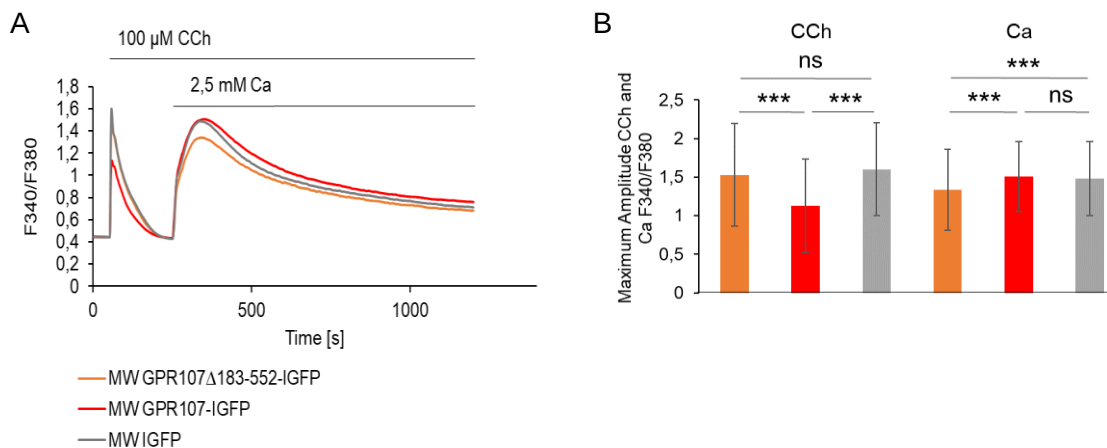


Abb. 37: Der N-Terminus des GPR107-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.

A: Messkurven GPR107 Δ 183-552-IGFP transfizierter Zellen (n=373/ N=9, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=387/ N=9, rot) und IGFP transfizierten (n=396/ N=9, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107 Δ 183-552-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,53 $\pm$ 0,67 nach Applikation des Carbachols und von 1,34 $\pm$ 0,53 nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,13 $\pm$ 0,61 nach Applikation des Carbachols und von 1,51 $\pm$ 0,45 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,60 $\pm$ 0,60 nach Applikation des Carbachols und von 1,48 $\pm$ 0,48 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 183-552-IGFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p < 0,001 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107 Δ 183-552-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p > 0,05 für den Carbachol-Peak und p < 0,001 für das Maximum nach Calciumzugabe.

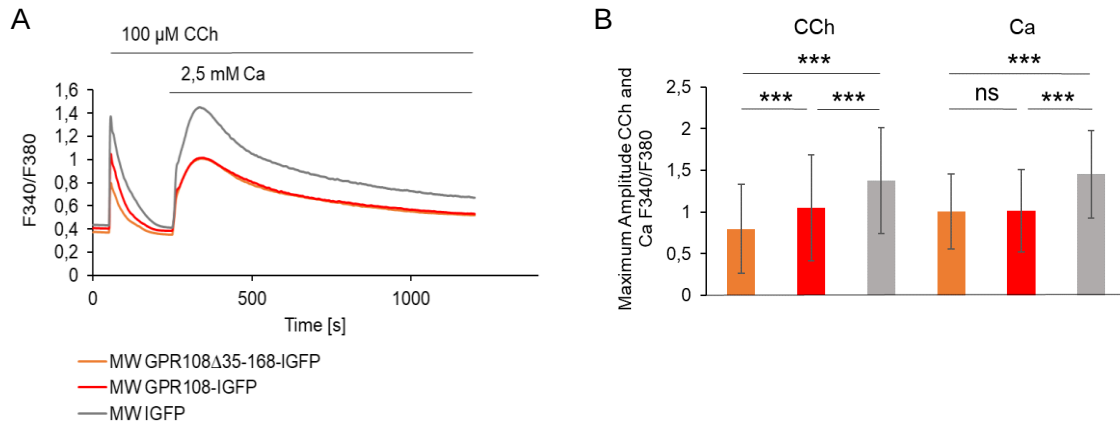


Abb. 38: Der C-Terminus des GPR108-Proteins verringert die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle.

A: Messkurven GPR108Δ35-168-IGFP transfizierter Zellen (n=158/ N=5, orange) im Vergleich zu GPR108-IGFP transfizierten (n=173/ N=5, rot) und IGFP transfizierten (n=202/ N=5, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108Δ35-168-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,80 ± 0,53 nach Applikation des Carbachols und von 1,01 ± 0,45 nach Zugabe des Calciums. Für GPR108-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,05 ± 0,64 nach Applikation des Carbachols und von 1,01 ± 0,50 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,38 ± 0,64 nach Applikation des Carbachols und von 1,45 ± 0,53 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR108Δ35-168-IGFP und den GPR108-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR108Δ35-168-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p < 0,001 für das Maximum nach Calciumzugabe.

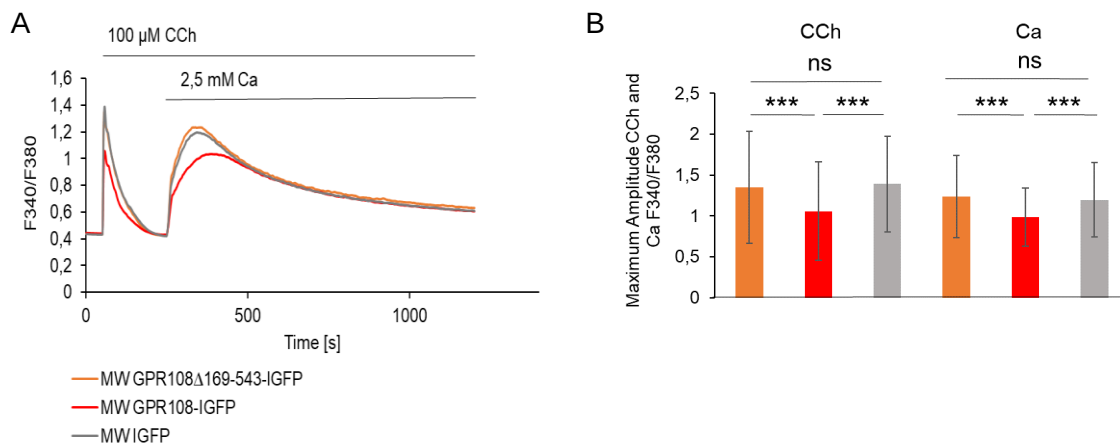


Abb. 39: Der N-Terminus des GPR108-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und den anschließenden Calciumeinstrom in die Zelle nicht.

A: Messkurven GPR108Δ169-543-IGFP transfizierter Zellen (n=193/ N=6, orange) im Vergleich zu GPR108-IGFP transfizierten (n=180/ N=6, rot) und IGFP transfizierten (n=196/ N=5, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108Δ169-543-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,35 ± 0,68 nach Applikation des Carbachols und von 1,24 ± 0,50 nach Zugabe des Calciums. Für GPR108-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,06 ± 0,61 nach Applikation des Carbachols und von 0,98 ± 0,36 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,39 ± 0,59 nach Applikation des Carbachols und von 1,20 ± 0,46 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR108Δ169-543-IGFP und den GPR108-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p < 0,001 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR108Δ169-543-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p > 0,05 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.9 Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins zeigt keine eindeutigen Hinweise auf eine Interaktion

Da die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 sowohl eine starke strukturelle Ähnlichkeit zueinander als auch zumindest teilweise ähnliche funktionelle Effekte aufweisen, sollte auch die Auswirkung einer gemeinsamen Expression dieser Proteine in den Zellen untersucht werden. Hierbei sollte in erster Linie beleuchtet werden, inwieweit eine Koexpression die bisher beobachteten Auswirkungen der beiden Rezeptoren in Bezug auf die Calciumhomöostase beeinflusst. Untersucht wurden Zellen, welche zuvor mit einem GPR107-IRFP- und mit einem GPR108-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Die unterschiedliche farbliche Markierung der beiden Proteine ermöglichte dabei die gezielte Messung von Zellen, welche sowohl das GPR107- als auch das GPR108-Protein exprimieren. Verglichen wurden diese Zellen mit Zellen, welche lediglich mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt, dem GPR108-IGFP-Konstrukt oder dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Dabei sollte zunächst die Auswirkung der Koexpression auf den, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden, erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen untersucht werden. Hierzu erfolgte während der Messungen jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 40 sind die Messergebnisse hierzu dargestellt. Erwartungsgemäß lässt sich hierbei zunächst für die GPR107-IGFP exprimierenden Zellen (rot) der bereits in vorigen Experimenten beobachtete erhebliche Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge der Calciumapplikation beobachten. Zellen, welche das GPR108-IGFP-Konstrukt (orange) exprimieren weisen hingegen, ebenfalls äquivalent zu den vorigen Untersuchungen einen lediglich geringen Anstieg der Calciumkonzentration auf, wobei sich dieser nicht signifikant verschieden zu den GFP-Kontrollzellen (grau) darstellt. Die Koexpression des GPR107- und GPR108-Proteins (blau) resultiert in einem intermediären Effekt. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration stellt sich signifikant verringert gegenüber einer alleinigen Expression des GPR107-Proteins, jedoch signifikant verstärkt gegenüber einer alleinigen Expression des GPR108-Proteins dar. Da dieser Effekt somit am ehesten auf das parallele Vorliegen dieser Proteine zurückzuführen ist, lassen sich hierdurch keine Rückschlüsse auf eine potentielle Interaktion des GPR107-Proteins mit dem GPR108-Protein ziehen.

Ergänzend sollte darüber hinaus die Auswirkung einer Koexpression auf die, bei Expression des GPR107- und GPR108-Proteins, beobachtete verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER untersucht werden. Ebenso wie bei dem vorigen Experiment erfolgte dabei der Vergleich zwischen Zellen, welche entweder die Proteine

einzelnen oder die Kombination beider Rezeptoren exprimierten. Während der Messung wurde zunächst eine 100 μ M Carbachol/B1-Lösung, im weiteren Verlauf eine 2,5 mM Calcium/B1-Lösung appliziert.

Abb. 41 zeigt die Ergebnisse dieser Messreihen. Zunächst lässt sich dabei festhalten, dass sich, entsprechend den vorigen Experimenten, abermals die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung sowohl bei alleiniger Expression des GPR107-Proteins (rot) als auch bei alleiniger Expression des GPR108-Proteins (orange) gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) signifikant verringert darstellt. Dabei weisen die GPR108 exprimierenden Zellen eine nochmals geringfügig ausgeprägtere Verringerung der Calciumfreisetzung ins Zytosol im Vergleich zu GPR107 exprimierenden Zellen auf. Betrachtet man hierzu die Messungen der Koexpression des GPR107- und GPR108-Proteins (blau), so zeigt sich eine nahezu identisch ausgeprägte und damit nicht signifikant verschiedene Verringerung der Calciumfreisetzung aus dem ER wie bei alleiniger Expression des GPR108-Proteins. Im Anschluss an die nachfolgende Applikation der Calciumlösung lässt sich, wiederum erwartungsgemäß, für die GPR107 exprimierenden Zellen sowie für die GFP-Kontrollzellen ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration registrieren. Die Koexpression der beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren resultiert hierbei in einem ebenso hohen Anstieg der Calciumkonzentration, wobei sich dieser nicht signifikant verschieden gegenüber den GFP-Kontrollzellen darstellt. Lediglich bei alleiniger Expression des GPR108-Proteins lässt sich, äquivalent zu vorigen Experimenten, ein signifikant verringerter Calciumeinstrom in die Zellen verzeichnen.

Schlussendlich lässt sich dementsprechend bei Koexpression der Proteine GPR107 und GPR108 einmal derselbe Effekt wie bei alleiniger Expression des GPR108-Proteins (nach Carbacholapplikation) sowie einmal ein nahezu identischer Effekt wie bei alleiniger Expression des GPR107-Proteins (nach Calciumapplikation) beobachten. Somit ist hier eine Interaktion der beiden Proteine nicht auszuschließen, eindeutige Hinweise auf eine Interaktion des GPR107- und des GPR108-Proteins ergeben sich jedoch nicht.

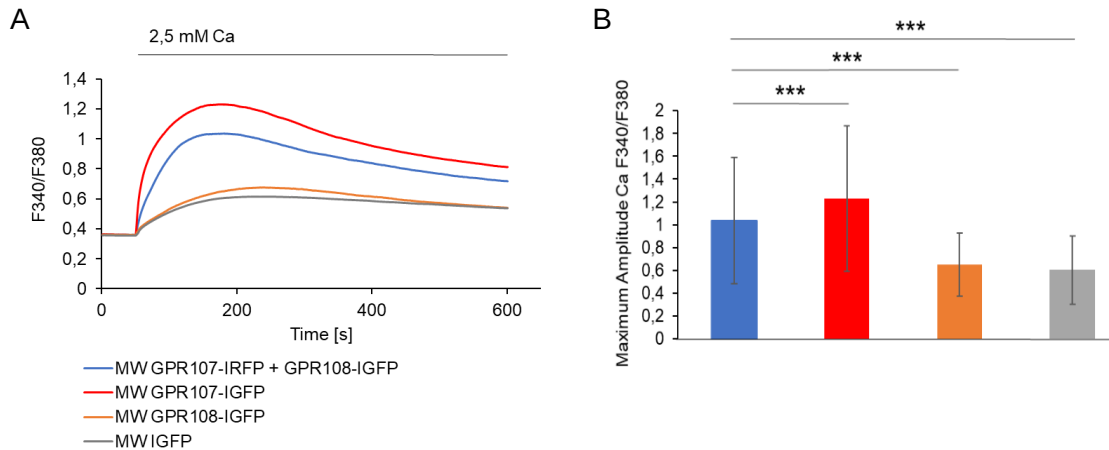


Abb. 40: Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins beeinflusst die zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IRFP+GPR108-IGFP transfizierter Zellen (n=224/ N=7, blau) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=325/ N=8, rot), GPR108-IGFP transfizierten (n=176/ N=4, orange) und IGFP transfizierten (n=762/ N=20, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IRFP+GPR108-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von $1,03 \pm 0,55$, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von $1,23 \pm 0,64$, für GPR108-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von $0,65 \pm 0,28$ und für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von $0,60 \pm 0,30$. Der p-Wert zwischen den GPR107-IRFP+GPR108-IGFP transfizierten Zellen und allen drei Kontrollzellarten beträgt $p < 0,001$.

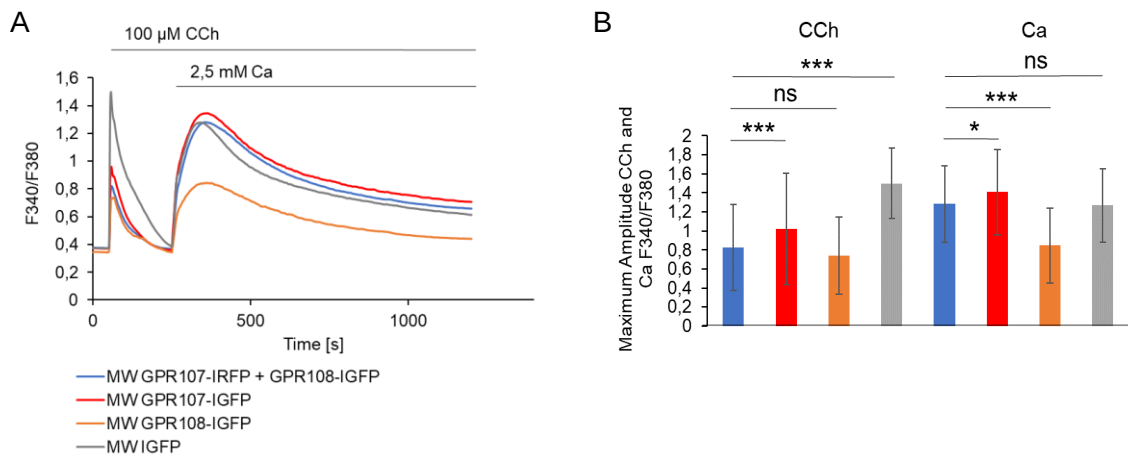


Abb. 41: Die Koexpression des GPR107- und des GPR108-Proteins beeinflusst die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.

A: Messkurven GPR107-IRFP+GPR108-IGFP transfizierter Zellen (n=219/ N=8, blau) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=195/ N=6, rot), GPR108-IGFP transfizierten (n=89/ N=4, orange) und IGFP transfizierten (n=391/ N=12, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IRFP+GPR108-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von $0,82 \pm 0,45$ nach Applikation des Carbachols und von $1,28 \pm 0,41$ nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von $1,02 \pm 0,59$ nach Applikation des Carbachols und von $1,41 \pm 0,45$ nach Zugabe des Calciums. Für GPR108-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von $0,74 \pm 0,41$ nach Applikation des Carbachols und von $0,85 \pm 0,39$ nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von $1,50 \pm 0,37$ nach Applikation des Carbachols und von $1,27 \pm 0,38$ nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-IRFP+GPR108-IGFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt $p < 0,001$ für den Carbachol-Peak und $p < 0,05$ für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107-IRFP+GPR108-IGFP und den GPR108-IGFP transfizierten Zellen beträgt $p > 0,05$ für den Carbachol-Peak und $p < 0,001$ für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107-IRFP+GPR108-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt $p < 0,001$ für den Carbachol-Peak und $p > 0,05$ für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.10 Der Einfluss der Furin-Schnittstelle auf die Funktion des GPR107-Proteins

Für die weitere Untersuchung des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 sollte auch die Relevanz der vermuteten Furin-Schnittstelle für den mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen untersucht werden. Hierzu erfolgte die Untersuchung einer GPR107-Mutante, bei welcher die Aminosäuresequenz KSKR der Furin-Schnittstelle (Tafesse *et al.*, 2014) zu vier Alaninen (A) mutiert wurde. Durch die hieraus resultierende ungeladene Aminosäuresequenz sollte eine Spaltung des GPR107-Proteins an dieser Position möglichst verhindert werden. Verglichen wurden in den folgenden Messungen die Auswirkungen einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf Zellen, welche entweder mit dem GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP- oder mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Während der Messungen erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 42 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Dabei weisen Zellen, die das GPR107-Wildtypprotein (rot) exprimieren, den zu erwartenden deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge der Calciumapplikation auf. Vergleicht man hierzu Zellen, bei welchen die Furin-Schnittstelle des GPR107-Proteins mutiert vorlag (orange), so resultiert, entgegen der ursprünglichen Annahme, ein nochmals etwas gesteigerter und rechnerisch signifikant erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen. Da sich somit der Calciumeinstrom bei Mutation der vermuteten Furin-Schnittstelle nicht verringert präsentiert, scheint die Spaltung des GPR107-Proteins keine wesentliche Voraussetzung für diesen Effekt darzustellen.

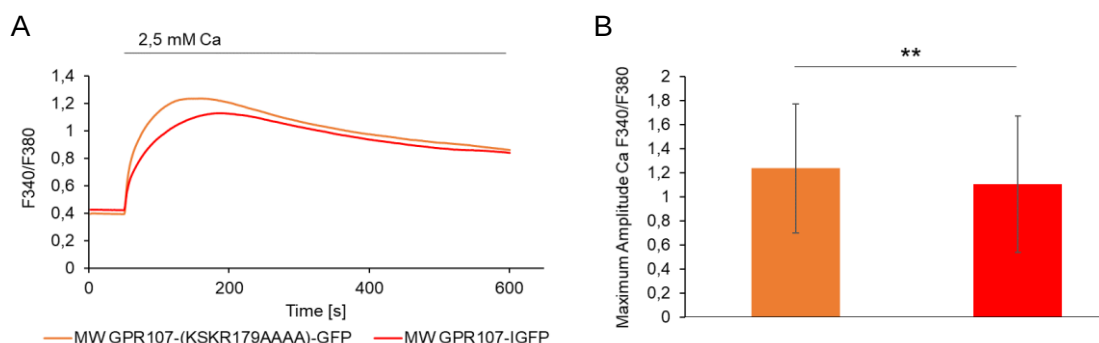


Abb. 42: Die Mutation der Protease-Schnittstelle KSKR des GPR107-Proteins beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.

A: Messkurven GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierter Zellen (n=293/ N=8, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=315/ N=8, rot) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,24 +/- 0,54, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,11 +/- 0,57. Der p-Wert zwischen den GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p = 0,0038.

4.11 Der Einfluss der potentiellen Protease-Schnittstelle auf die Funktion des GPR108-Proteins

Entsprechend dem vorigen Experiment sollte auch die funktionelle Relevanz der potentiellen Protease-Schnittstelle des G-Protein gekoppelten Rezeptors 108 genauer untersucht werden. Hierzu erfolgte, äquivalent zu den Messungen mit dem GPR107-Protein, die Mutation der entsprechenden positiv geladenen Aminosäuresequenz, im Falle des GPR108-Proteins ein KPKS-Motiv, zu vier Alaninen (A). Durch die hieraus resultierende ungeladene Sequenz sollte die Spaltung des Proteins an dieser Position verhindert werden. Betrachtet wurde in dieser Untersuchung der Einfluss dieser Mutation auf die, mit der Expression des GPR108-Proteins einhergehende, verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. Verglichen wurden Zellen, welche entweder mit dem GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP-Konstrukt, dem GPR108-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Während der Messungen erfolgte zunächst die Applikation einer 100 µM Carbachol/B1-Lösung, im Anschluss die Zugabe einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 43 dargestellt. Dabei lässt sich zunächst festhalten, dass erwartungsgemäß jene Zellen, welche das GPR108-Wildtypprotein exprimieren (rot), einen signifikant verringerten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration nach Carbachol-induzierter Freisetzung des Calciums aus dem ER gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) aufweisen. Vergleicht man hiermit Zellen, welche die GPR108-Variante mit mutierter Protease-Schnittstelle exprimieren (orange), so ergibt sich ebenfalls eine erheblich verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wobei sich diese nicht signifikant von den GPR108-Wildtypprotein exprimierenden Zellen unterscheidet. Bei anschließender Applikation der Calciumlösung resultiert durch die Expression des GPR108-Wildtypproteins, entsprechend den vorigen Untersuchungen in Kapitel 4.8, ein signifikant verringerter Calciumeinstrom im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen. Die Mutation der potentiellen Schnittstelle des GPR108-Proteins scheint auch hierauf keinen Einfluss auszuüben, sodass der Calciumeinstrom in diesen Zellen ebenso verringert gegenüber den GFP-Kontrollzellen, aber nicht signifikant verschieden zu den GPR108-Wildtypprotein exprimierenden Zellen ist. Dementsprechend scheint die potentielle Spaltung des GPR108-Proteins an dieser Position keine wesentliche Voraussetzung für die in GPR108 exprimierenden Zellen zu beobachtende verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER darzustellen.

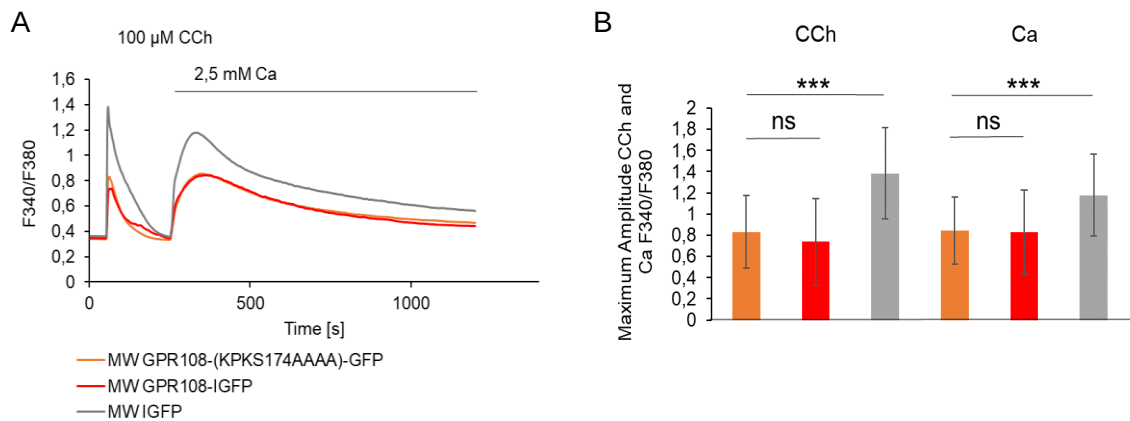


Abb. 43: Die Mutation der putativen Protease-Schnittstelle KPKS des GPR108-Proteins beeinflusst die GPR108-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.

A: Messkurven GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP transfizierter Zellen (n=275/ N=8, orange) im Vergleich zu GPR108-IGFP transfizierten (n=89/ N=4, rot) und IGFP transfizierten (n=413/ N=12, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 µM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,83 ± 0,34 nach Applikation des Carbachols und von 0,84 ± 0,32 nach Zugabe des Calciums. Für GPR108-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,74 ± 0,41 nach Applikation des Carbachols und von 0,83 ± 0,40 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,38 ± 0,43 nach Applikation des Carbachols und von 1,18 ± 0,39 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP und den GPR108-IGFP transfizierten Zellen beträgt p > 0,05 für den Carbachol-Peak und ebenfalls p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR108-(KPKS₁₇₄AAAA)-GFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und ebenfalls p < 0,001 für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.12 Der erhöhte Calciumeinstrom durch das GPR107-Protein ist unabhängig von CRAC-Kanälen

Bei Betrachtung der bisher durchgeführten Untersuchungen für den G-Protein gekoppelten Rezeptor 107 lassen sich in erster Linie zwei Effekte einer Expression dieses Proteins festhalten. Zum einen zeigt sich ein deutlich erhöhter Calciumeinstrom von extrazellulär, zum anderen lässt sich eine stark verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern registrieren. Dabei könnte diese verringerte Freisetzung das Resultat eines geringeren Füllungszustandes dieser Speicher darstellen. Mit diesen beiden erheblichen Einflüssen des GPR107-Proteins auf die zelluläre Calciumhomöostase stellte sich die Frage, inwieweit die Auswirkungen auf die intrazellulären Calciumspeicher auf der einen Seite und den Calciumeinstrom in die Zellen auf der anderen Seite in Zusammenhang zueinanderstehen beziehungsweise sich gegenseitig bedingen.

Eine Hypothese hierzu wäre, dass der geringer gefüllte Calciumspeicher, bedingt durch das GPR107-Protein, als direkter Trigger membranständiger Calciumkanäle fungiert, wodurch mittels eines höheren Calciumeinstroms durch diese Kanäle eine ausreichende Speicherfüllung erreicht werden soll (Hoth and Penner, 1993). Diese endogenen

Calcium-release activated Calcium (CRAC)-Kanäle werden dabei innerhalb weniger Sekunden nach Erschöpfung der intrazellulären Calciumspeicher aktiviert und führen in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration zu einem verstärkten CalciumEinstrom in die Zelle (Abb. 44).

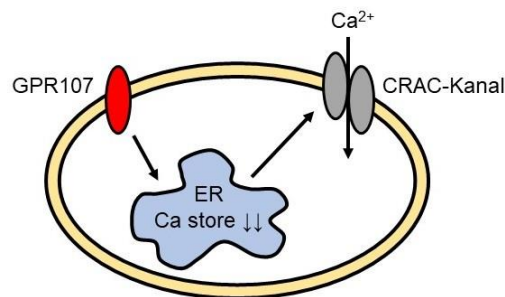


Abb. 44: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung von CRAC-Kanälen durch das GPR107-Protein.

Der potentiell mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende verringerte Füllungsstatus des ER wirkt in dieser Hypothese als Trigger membranständiger Calciumkanäle (*Calcium-release activated Calcium* (CRAC) Kanäle), wodurch mittels erhöhtem CalciumEinstrom durch diese Kanäle eine ausreichende Speicherfüllung erreicht werden soll.

Um zu prüfen, ob der verstärkte CalciumEinstrom in GPR107 exprimierende Zellen Resultat eines durch diesen Rezeptor bedingten verringerten Füllungsstatus des ER und einer hierdurch bedingten Aktivierung endogener CRAC-Kanäle ist, wurden Messungen mit BTP2 durchgeführt. Das BTP2 fungierte dabei als Inhibitor der endogenen CRAC-Kanäle. Verglichen wurden für diese Messungen Zellen, welche mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Hierbei erfolgte für beide Konstrukte jeweils sowohl die Messung mit als auch ohne den Einfluss des BTP2. Im Falle der Messungen unter Einfluss des BTP2 wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung, parallel zu deren Beladung mit Fura-2, für 30 Minuten in einer 10 μM BTP2/B1-Lösung inkubiert. Während der Messungen erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

Bei Betrachtung der Messergebnisse in Abb. 45 lässt sich zunächst für die Untersuchungen ohne den Einfluss des BTP2 der zu erwartende erheblich erhöhte CalciumEinstrom in GPR107 exprimierende Zellen (rot) gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) feststellen. Vergleicht man hierzu die Messungen, bei welchen zuvor eine Inkubation der Zellen in der BTP2-Lösung erfolgte und somit eine Inhibierung der endogenen CRAC-Kanäle vorlag, so zeigt sich sowohl für die GPR107 exprimierenden Zellen (orange) als auch für die GFP-Kontrollzellen (blau) ein deutlich differenter Kurvenverlauf gegenüber den jeweiligen Messungen ohne Einfluss des BTP2. Zum einen fällt der initiale Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration für beide Konstrukte wesentlich geringer aus, zum

anderen zeigt sich im Anschluss ein kontinuierlicher Anstieg der Calciumkonzentration, wohingegen ohne den Einfluss des BTP2 stets ein rasches Absinken der Calciumkonzentration nach Erreichen des Maximums registriert werden konnte. Da diese Effekte jedoch gleichermaßen für GPR107 exprimierende Zellen sowie für GFP-Kontrollzellen beobachtet werden können und sowohl mit als auch ohne den Einfluss des BTP2 ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in Zellen, welche das GPR107-Protein exprimieren, registriert werden kann, scheinen diese Effekte eher ein alleiniges Resultat des BTP2 darzustellen. Da dementsprechend auch unter Inhibierung der endogenen CRAC-Kanäle dieser erhöhte Calciumeinstrom bestehen bleibt, scheinen diese Kanäle nicht fundamental an diesem Effekt des GPR107-Proteins beteiligt zu sein.

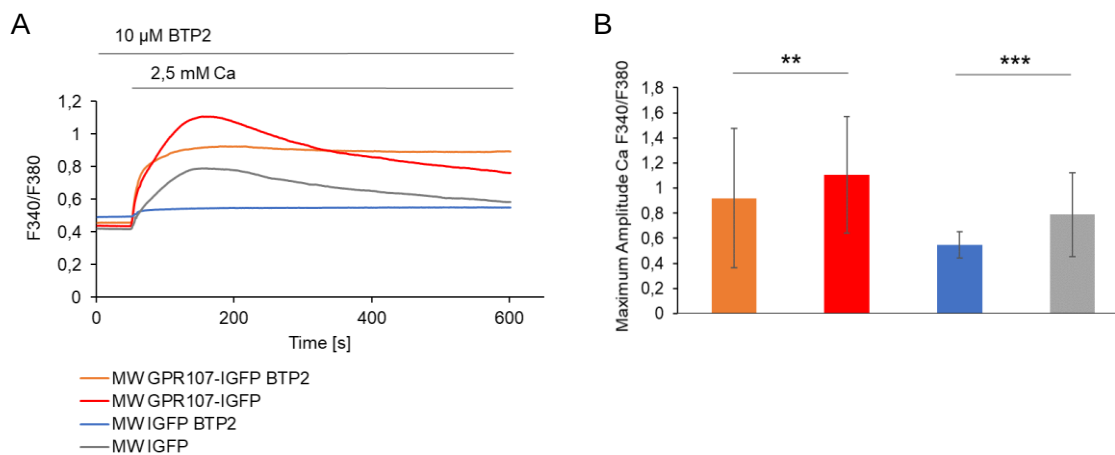


Abb. 45: Die Inhibition von CRAC-Kanälen durch BTP2 beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=126/ N=3, orange) und ohne (n=144/ N=4, rot) vorige 30-minütige Prä-Inkubation mit BTP2 (10 μ M) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen mit (n=69/ N=2, blau) und ohne (n=67/ N=2, grau) vorige 30-minütige Prä-Inkubation mit BTP2 (10 μ M) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich mit BTP2 ein mittleres Maximum von $0,92 \pm 0,56$ und ohne BTP2 ein mittleres Maximum von $1,12 \pm 0,46$. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich mit BTP2 ein mittleres Maximum von $0,55 \pm 0,11$ und ohne BTP2 ein mittleres Maximum von $0,79 \pm 0,34$. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne BTP2 beträgt $p = 0,0028$, der p-Wert zwischen den IGFP transfizierten Zellen mit und ohne BTP2 beträgt $p < 0,0001$.

4.13 Die Bedeutung des Membran-Transfers des GPR107-Proteins für dessen Einfluss auf den zellulären Calciumhaushalt

Für eine mikroskopische Untersuchung der Schnittstelle des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 war die Klonierung eines Konstrukts erfolgt, bei welchem unmittelbar im Anschluss an die, durch das Programm Signal P vorhergesagte, Signalpeptid-Schnittstelle eine RFP-cDNA einkloniert wurde. Durch das Integrieren des RFP-Proteins an dieser weit N-terminal gelegenen Position innerhalb der Sequenz des GPR107-Proteins

sollte dessen Einfluss auf die potentielle Furin-Schnittstelle möglichst geringgehalten werden. Überdies erfolgte in diesem Konstrukt die Mutation der Furin-Schnittstelle mit der Aminosäuresequenz KSKR (Tafesse *et al.*, 2014) zu vier ungeladenen Alaninen (A), wodurch eine Spaltung an dieser Position möglichst gänzlich verhindert werden sollte. Bei der mikroskopischen Betrachtung dieses GPR107-Konstruktes (Kapitel 4.5) fiel neben einer identischen Lokalisation des N- und C-Terminus und einer hiermit verbundenen höchstwahrscheinlichen Unterbindung der Spaltung des Proteins zudem auf, dass der C-Terminus nicht mehr in der Membran detektiert werden konnte. Der Transfer des Proteins in die Zellmembran scheint dementsprechend bei diesem GPR107-Konstrukt erheblich beeinträchtigt zu sein. Inwieweit diese Beobachtung möglicherweise durch eine Interaktion des RFP-Proteins mit dem Signalpeptid oder durch die nun zusammenhängend vorliegenden Proteinabschnitte bedingt ist, bleibt dabei unklar.

Um die Auswirkung dieses erheblich gestörten Membran-Transfers genauer zu beleuchten, sollte dieses Konstrukt auch funktionell mittels Calcium Imaging untersucht werden. Dabei wurde sowohl der Einfluss dieses GPR107-Konstrukts auf den Calciumeinstrom in die Zelle als auch dessen Einfluss auf die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER betrachtet. Verglichen wurden hierfür Zellen, welche entweder mit dem oben beschriebenen GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstrukt, dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Für die Betrachtung der Auswirkung auf den Calciumeinstrom erfolgte während der Messungen die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung, für die Untersuchung der Auswirkung auf die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus dem ER wurde zunächst eine 100 µM Carbachol/B1-Lösung und im Anschluss eine 2,5 mM Calcium/B1-Lösung appliziert. In Abb. 46 ist zunächst die Reaktion der Zellen auf die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration dargestellt. Erwartungsgemäß resultiert hierbei ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in GPR107-Wildtypprotein exprimierenden Zellen (rot), verglichen mit GFP-Kontrollzellen (grau). Zellen, welche das GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstrukt exprimieren (orange), weisen hierzu einen intermediären Effekt auf. Es zeigt sich ein signifikant verringerter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gegenüber den GPR107-Wildtypprotein Zellen sowie ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen.

Da jedoch zwischen den GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP exprimierenden Zellen und den GFP-Kontrollzellen eine lediglich sehr geringe Differenz der F340/ F380-Ratio (0,11) zu beobachten ist, scheint der, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende, erhöhte Calciumeinstrom durch die hier vorgenommenen Mutationen und der hiermit mutmaßlich verbundenen Beeinträchtigung des Membran-Transfers erheblich eingeschränkt zu werden.

Ergänzend wurde ebenfalls der Einfluss dieses GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstrukts auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung aus Carbachol-sensitiven Speichern untersucht (Abb. 47). Hierbei stellt sich zunächst, wie aus vorigen Experimenten zu erwarten, die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung in Zellen, welche das GPR107-Wildtypprotein exprimieren (rot), signifikant verringert gegenüber GFP-Kontrollzellen (grau) dar. Analog hierzu weisen jene Zellen, welche das GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstrukt exprimieren (orange), ebenso einen signifikant verringerten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Carbacholapplikation, verglichen mit GFP-Kontrollzellen, auf. Dabei unterscheiden sich die resultierenden Calciumkonzentrationen des GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstruktes und des GPR107-Wildtypproteins nicht signifikant voneinander. Derselbe Effekt lässt sich auch nach anschließender Zugabe der Calciumlösung feststellen. Auch hierbei stellt sich der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Zellen, die das GPR107-Wildtypprotein oder das GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP-Konstrukt exprimieren als nahezu identisch sowie rechnerisch nicht signifikant verschieden heraus.

Schlussendlich könnte somit die mikroskopisch sichtbare geringere Membranfärbung des GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP Fusionskonstruktes (Kapitel 4.5) den veränderten Calciumeinstrom widerspiegeln. Der Einfluss des GPR107-Proteins auf die Carbachol-vermittelte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern scheint in diesem Konstrukt hingegen nicht beeinflusst zu werden.

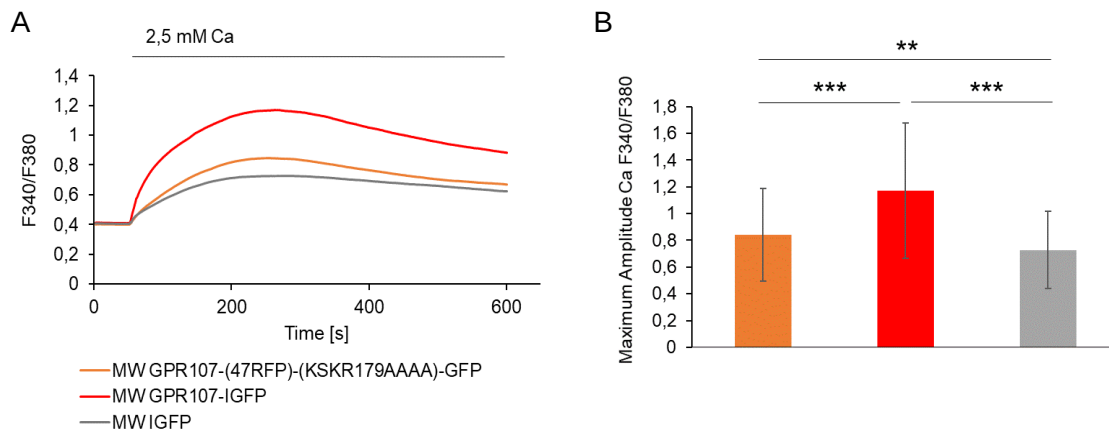


Abb. 46: Ein RFP-Protein unmittelbar hinter der Signalpeptid-Schnittstelle verringert die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme.

A: Messkurven GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierter Zellen (n=214/ N=8, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=322/ N=8, rot) und IGFP transfizierten (n=230/ N=7, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,84 ± 0,35, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,17 ± 0,51 und für IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 0,73 ± 0,29. Der p-Wert zwischen den GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001, der p-Wert zwischen den GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,01.

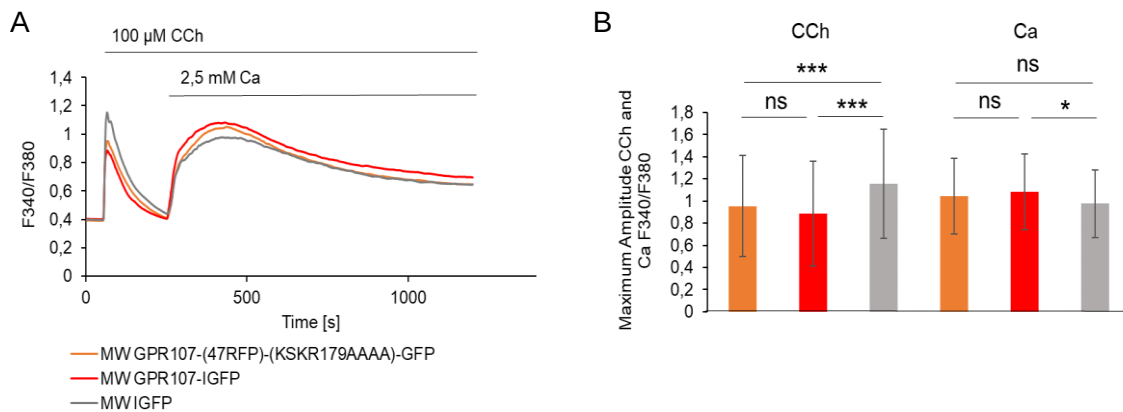


Abb. 47: Ein RFP-Protein unmittelbar hinter der Signalpeptid-Schnittstelle beeinflusst die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.

A: Messkurven GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierter Zellen (n=181/ N=6, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=120/ N=5, rot) und IGFP transfizierten (n=159/ N=5, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 µM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,95 +/- 0,46 nach Applikation des Carbachols und von 1,05 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,89 +/- 0,47 nach Applikation des Carbachols und von 1,08 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,16 +/- 0,49 nach Applikation des Carbachols und von 0,98 +/- 0,31 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p > 0,05 für den Carbachol-Peak und ebenfalls p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107-(47RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.14 Das GPR107-Protein erhöht die basale Calciumkonzentration

Da in den bisherigen Experimenten die Fura-2-Inkubation der Zellen stets in calciumfreier Lösung erfolgte, konnte in diesen Versuchen eine potentielle Auswirkung des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 auf die basale intrazelluläre Calciumkonzentration nicht beurteilt werden. Aus diesem Grund sollte dieser Einfluss des GPR107-Proteins im Folgenden ergänzend untersucht werden. Hierfür erfolgte während der vorbereitenden Fura-2-Beladung zeitgleich die 30-minütige Inkubation der Zellen in einer Calcium/B1-Lösung, wobei mit 2 mM eine etwa physiologische extrazelluläre Calciumkonzentration gewählt wurde. Verglichen wurden dabei Zellen, welche zuvor entweder mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem Leervektor IGFP transfiziert worden waren. Im Anschluss an die Präinkubation der Zellen in Gegenwart von 2 mM Calciumionen wurde zunächst die intrazelluläre basale Calciumkonzentration aufgezeichnet und anschließend eine 2 mM EGTA/B1-Lösung hinzugegeben. Durch diese EGTA-Zugabe wird das gesamte extrazelluläre Calcium gebunden, wodurch folglich die intrazelluläre Calciumkonzentration unter calciumfreien Bedingungen gemessen werden kann. Nachdem

die intrazelluläre Calciumkonzentration auf ein neues konstantes Niveau abgefallen war, wurde durch Zugabe einer 2 mM Calcium/B1-Lösung die Ausgangssituation wieder hergestellt und die Reaktion der Zellen hierauf untersucht.

In Abb. 48 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Dabei lässt sich zunächst festhalten, dass sich die initiale basale Calciumkonzentration in GPR107 exprimierenden Zellen (rot) signifikant erhöht gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) darstellt. Die anschließende Applikation der EGTA-Lösung resultiert erwartungsgemäß sowohl in den GPR107 exprimierenden Zellen als auch in den GFP-Kontrollzellen in einem deutlichen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration, wobei sich die hierauf neu eingestellten basalen Calciumkonzentrationen nahezu identisch zeigen und nicht signifikant unterscheiden. Durch die anschließende Calciumzugabe lässt sich wiederum in jenen Zellen, welche das GPR107-Protein exprimieren, ein signifikant stärkerer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration beobachten. Die hieraus resultierende neue basale Calciumkonzentration der Zellen bleibt dabei bis zum Ende der Messung konstant über dem Niveau der GFP-Kontrollzellen.

Schlussendlich lässt sich durch die hier durchgeführte Untersuchung ein deutlicher Einfluss der Expression des GPR107-Proteins auf die basale Calciumkonzentration der Zellen erkennen.

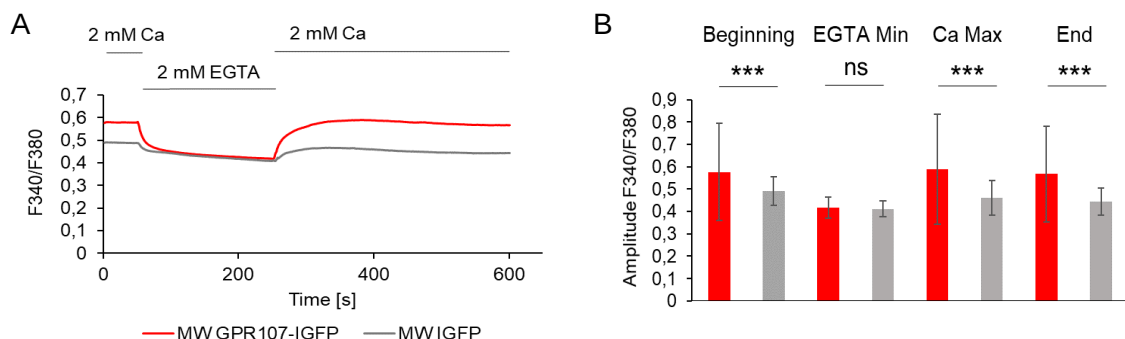


Abb. 48: Das GPR107-Protein erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen (n=216/ N=6, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=202/ N=5, grau) nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium (2 mM) und während extrazellulärer Zugabe von EGTA (2 mM) und Calcium (2 mM). B: Statistische Auswertung der Amplituden zu ausgewählten Zeitpunkten. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von 0,58 +/- 0,22, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von 0,42 +/- 0,05, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von 0,59 +/- 0,25 und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von 0,57 +/- 0,22. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von 0,49 +/- 0,06, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von 0,41 +/- 0,04, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von 0,46 +/- 0,08 und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von 0,44 +/- 0,06. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,0001 für den Beginn der Messung, p = 0,2168 für das Minimum nach EGTA-Zugabe, p < 0,0001 für das Maximum nach Calciumzugabe und ebenfalls p < 0,0001 für das Ende der Messung.

4.15 Suramin beeinflusst die Wirkung des GPR107-Proteins nicht

Sowohl das GPR107- als auch das GPR108-Protein weisen keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Proteinen auf. Zudem ist nicht bekannt, an welche intrazellulären Signalwege die beiden Proteine koppeln. Lediglich aufgrund ihrer potentiellen Struktur werden diese Proteine den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet. Aufgrund dieser Tatsache wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob sich auch experimentell Hinweise auf eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade des GPR107-Proteins aufzeigen lassen. Untersucht wurde dies zunächst mit Hilfe von Suramin, in dessen Anwesenheit der Austausch des G-Protein gebundenen GDPs gegen ein GTP und somit die hierdurch bedingte Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins verhindert wird (Hohenegger *et al.*, 1998). Dies ist dabei gleichermaßen für G_s - und G_i -Proteine sowie in deutlich höheren Suraminkonzentrationen für G_q -Proteine beschrieben. Folglich ist es somit möglich, eine Beteiligung dieser G-Proteine an den bisher aufgezeigten zellulären Auswirkungen einer Expression des GPR107-Proteins genauer zu betrachten. Im hier dargestellten Experiment erfolgte unmittelbar vor Messbeginn eine 15-minütige Inkubation der Zellen in einer 240 nM Suramin/B1-Lösung (Freissmuth *et al.*, 1996). Dabei sollte zunächst dessen Einfluss auf den, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden, erhöhten Calciueinstrom in die Zellen untersucht werden. Für einen besseren Vergleich der Messergebnisse wurden die Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren, sowohl mit als auch ohne den Einfluss des Suramins gemessen. Während der Messung erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 49 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Dabei zeigen sowohl die Zellen, welche unter dem Einfluss des Suramins gemessen wurden (orange) als auch die Zellen ohne diesen Einfluss (rot) einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge der Calciumapplikation. Hierbei unterscheiden sich die resultierenden Maxima der Calciumkonzentrationen nicht signifikant voneinander. Dementsprechend scheint das Suramin den Effekt des erhöhten Calciueinstroms des GPR107-Proteins sowie den hierfür nötigen zellulären Signalweg nicht zu beeinträchtigen.

Ergänzend sollte darüber hinaus ebenso der Einfluss des Suramins auf die, bei Expression des GPR107-Proteins festgestellte, verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern untersucht werden. Äquivalent zu dem vorigen Experiment wurden auch hierfür GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit sowie ohne den Einfluss des Suramins betrachtet. Im Falle der Untersuchung unter Einfluss des

Suramins erfolgte wiederum unmittelbar im Voraus eine 15-minütige Inkubation der Zellen in einer 240 nM Suramin/B1-Lösung. Für einen ergänzenden Vergleich wurden darüber hinaus Zellen gemessen, welche lediglich mit einem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Während der Messungen erfolgte zunächst die Applikation einer 100 μ M Carbachol/B1-Lösung, im weiteren Verlauf die Zugabe einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 50 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Dabei resultiert in den GPR107 exprimierenden Zellen, sowohl mit dem Einfluss des Suramins (orange) als auch ohne diesen Einfluss (rot) eine signifikant verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau). Die Anstiegshöhen der zytosolischen Calciumkonzentrationen unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander, gleich ob die GPR107 exprimierenden Zellen zuvor in der Suramin-Lösung inkubiert worden waren oder nicht. Auch nach anschließender Applikation der Calciumlösung stellen sich die GPR107 exprimierenden Zellen mit beziehungsweise ohne den Einfluss des Suramins nicht signifikant verschieden in Bezug auf den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration dar. Im weiteren Verlauf der Messung zeigt sich jedoch in den Zellen, welche zuvor mit der Suramin-Lösung inkubiert worden waren, ein geringeres Absinken der Calciumkonzentration und ein hieraus resultierendes signifikant höheres Calciumendniveau als bei den GPR107 exprimierenden Zellen ohne Einfluss des Suramins oder den GFP-Kontrollzellen.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass ebenso wie bei der oben dargestellten Untersuchung des Calciumeinstroms, sich die verringerte intrazelluläre Calciumfreisetzung bei Expression des GPR107-Proteins durch das Suramin nicht beeinträchtigt zeigt. Dies legt die Vermutung nahe, dass diesen Effekten des GPR107-Proteins Suramin-unsensible Mechanismen und Signalkaskaden zugrunde liegen. Lediglich die sich zum Ende der Messung einstellende Calciumkonzentration stellt sich unter dem Einfluss von Suramin signifikant erhöht dar.

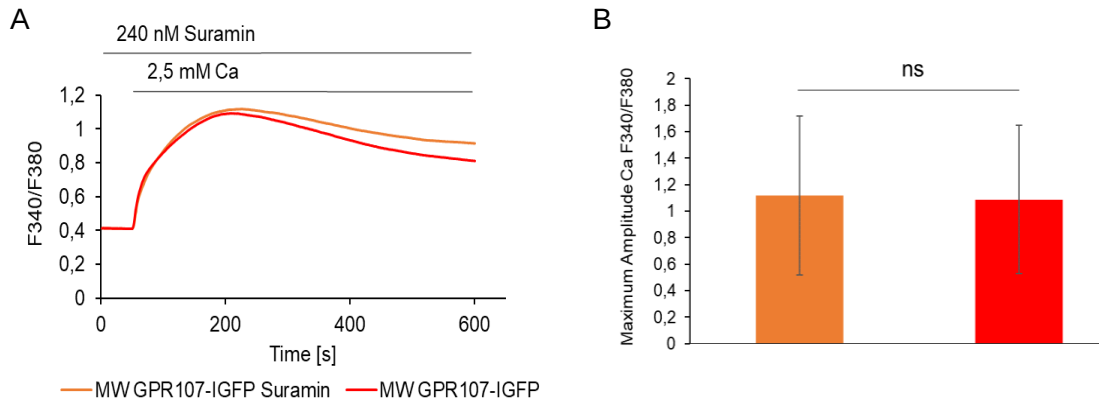


Abb. 49: Suramin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=319/ N=12, orange) und ohne (n=348/ N=12, rot) vorige 30-minütige Prä-Inkubation mit Suramin (240 nM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Suramin zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,12 +/- 0,60, ohne Suramin ein mittleres Maximum von 1,09 +/- 0,56. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Suramin beträgt p = 0,5032.

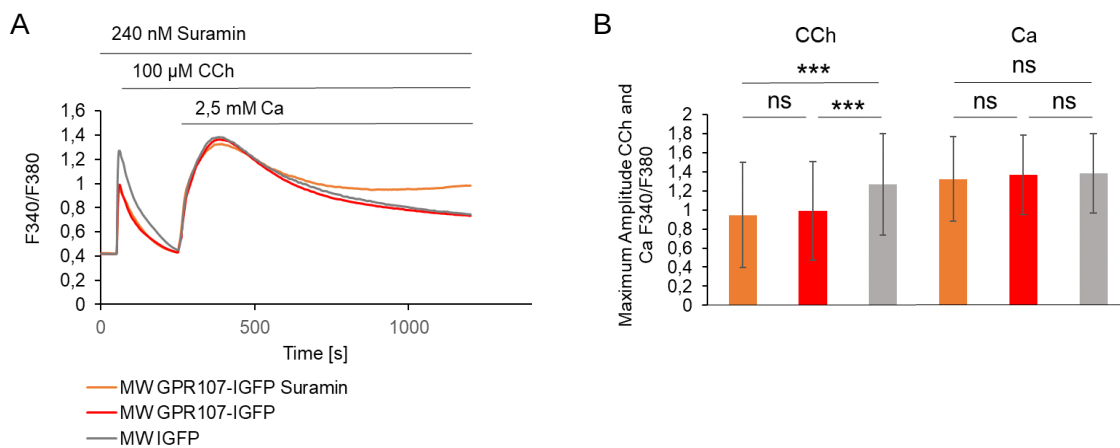


Abb. 50: Suramin beeinflusst die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=140/ N=5, orange) und ohne (n=151/ N=5, rot) vorige 30-minütige Prä-Inkubation mit Suramin (240 nM) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=167/ N=6, grau) während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 µM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Suramin zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,95 +/- 0,55 nach Applikation des Carbachols und von 1,33 +/- 0,44 nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen ohne Suramin zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,99 +/- 0,52 nach Applikation des Carbachols und von 1,37 +/- 0,42 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,27 +/- 0,53 nach Applikation des Carbachols und von 1,38 +/- 0,42 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Suramin beträgt p > 0,05 für den Carbachol-Peak und ebenfalls p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit Suramin und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.16 Die Wirkung des GPR107-Proteins auf den zellulären Calciumeinstrom ist nicht Phospholipase C abhängig

Zur genaueren Untersuchung des GPR107-Proteins im Hinblick auf seine Einkategorisierung als G-Protein gekoppelten Rezeptor sollten durch Beeinflussung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden Rückschlüsse auf potentielle Signalwege des GPR107-Proteins gezogen werden. Dabei wurde zunächst durch einen Phospholipase C-Inhibitor ein mögliches Agieren über ein G_q -Protein untersucht. Hierzu erfolgte unmittelbar vor Beginn der Messung eine 15-minütige Inkubation GPR107-IGFP transfizierter Zellen in Gegenwart eines Phospholipase C-Inhibitors, U73122 (20 μ M), in B1-Lösung. Um potentiell entstehende Effekte sicher auf die Inhibition der Phospholipase C zurückführen zu können und eine anderweitige Interaktion des Inhibitors mit dem GPR107-Protein ausschließen zu können, wurden Kontrollzellen, welche ebenfalls mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren, unmittelbar vor der Messung für ebenfalls 15 Minuten mit 20 μ M eines inaktiven Strukturanalogs, U73343, des Phospholipase C-Inhibitors inkubiert. Ergänzend erfolgte darüber hinaus ein Vergleich mit GPR107-IGFP transfizierten Zellen, welche weder mit der aktiven noch mit der inaktiven Form des Phospholipase C-Inhibitors behandelt worden waren. Beobachtet werden sollte in diesem Experiment, inwieweit der erhöhte Calciumeinstrom in GPR107 exprimierende Zellen unter Inhibition der Phospholipase C und einer hiermit verbundenen Verhinderung eines G_q -gekoppelten Signalweges weiterhin nachweisbar bleibt. Hierzu wurde während der Messung jeweils eine 2,5 mM Calcium/B1-Lösung appliziert.

In Abb. 51 sind die Ergebnisse der drei Messreihen dargestellt. Erwartungsgemäß lässt sich hierbei zunächst der bereits in vorigen Experimenten beobachtete deutliche Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Calciumapplikation in den unbehandelten GPR107 exprimierenden Zellen (rot) feststellen. Zellen, welche zuvor mit der aktiven Form des Phospholipase C-Inhibitors inkubiert worden waren (orange), unterscheiden sich hierzu jedoch nicht signifikant in Bezug auf die resultierende Anstiegshöhe der zellulären Calciumkonzentration. Des Weiteren stellt sich auch für die Zellen unter Einfluss des inaktiven Strukturanalogs des Phospholipase C-Inhibitors (grau), kein signifikanter Unterschied zu den Messungen mit der aktiven Form dar.

Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine G_q -vermittelte intrazelluläre Signalkaskade des GPR107-Proteins.

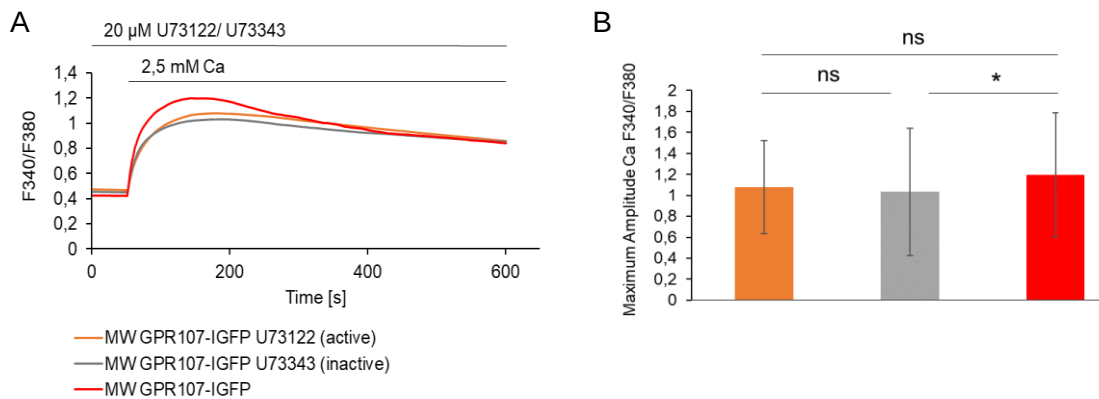


Abb. 51: Die Inhibition der Phospholipase C beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen nach voriger 15-minütiger Prä-Inkubation mit einem aktiven PLC-Inhibitor (U73122, 20 μ M) (n=256/ N=7, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten Zellen nach voriger 15-minütiger Prä-Inkubation mit einem inaktiven PLC-Inhibitor (U73343, 20 μ M) (n=259/ N=7, grau) und GPR107-IGFP transfizierten Zellen ohne vorige Prä-Inkubation mit einem PLC-Inhibitor (n=127/ N=4, rot). Während den Messungen erfolgte jeweils die extrazelluläre Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit aktivem PLC-Inhibitor zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,08 $\pm$ 0,44, für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit inaktivem PLC-Inhibitor ein mittleres Maximum von 1,03 $\pm$ 0,61 und für GPR107-IGFP transfizierte Zellen ohne PLC-Inhibitor ein mittleres Maximum von 1,20 $\pm$ 0,59. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit aktivem und inaktivem PLC-Inhibitor beträgt p > 0,05, der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit aktivem PLC-Inhibitor und ohne PLC-Inhibitor beträgt ebenfalls p > 0,05.

4.17 Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR107-Protein ergibt keinen Hinweis auf eine G_i-Kopplung des GPR107-Proteins

Da sich im zuvor beschriebenen Experiment kein Hinweis auf eine G_q-Kopplung des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 ergeben hatte, wurde dieser im Anschluss auf einen möglichen G_i-Protein gekoppelten Signalweg untersucht. Hierzu wurden Zelllinien verwendet, die einen Calcium-permeablen Ionenkanal, TRPC4, stabil exprimieren (Philipp *et al.*, 1996; Plant and Schaefer, 2003). Bei diesem Ionenkanal der *Transient Receptor Potential*-Familie (TRP) handelt es sich um einen nicht-selektiven Calcium-permeablen Kationen-Kanal der mittels direkter Stimulierung durch ein aktiviertes G_i-Protein sowie gleichzeitiger Stimulierung durch Diacylglycerin als Resultat eines aktivierten G_q-Proteins aktiviert werden kann (Thakur *et al.*, 2016). Unter der Annahme, dass es sich bei dem GPR107-Protein potentiell um einen G_i-Protein gekoppelten Rezeptor handeln könnte und dieser zumindest eine teilweise konstitutive Aktivität aufweist, da die oben beschriebenen Calcium- und Carbachol-Effekte auch ohne Stimulation durch einen spezifischen Liganden des GPR107-Proteins zu beobachten sind, wurde die GPR107 cDNA für die erforderliche G_i-Aktivierung zur Stimulation des TRPC4-Kanals transfiziert. Für die zusätzlich notwendige Stimulierung des G_q-gekoppelten Signalwegs wurde sich des

endogen in HEK-Zellen vorhandenen M3-Rezeptors bedient, welcher durch Zugabe von Carbachol aktiviert werden kann (Caulfield, 1993). Die einzelnen Schritte der Stimulierung sind in Abb. 52 schematisch dargestellt.

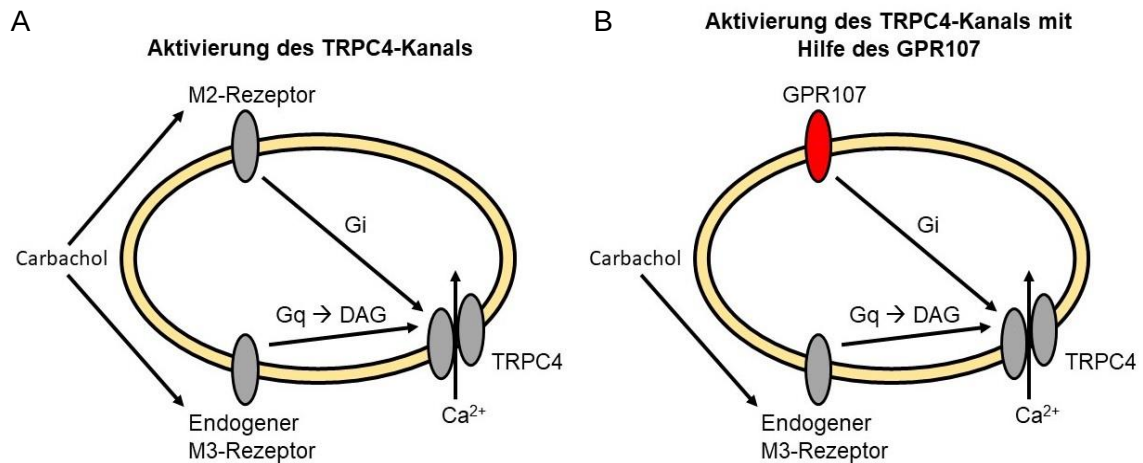


Abb. 52: Schematische Darstellung einer möglichen Aktivierung von TRPC4-Kanälen durch Carbachol-induzierte Aktivierung von M3-Rezeptoren bei gleichzeitiger potentieller konstitutiver Gi-Aktivierung durch das GPR107-Protein.

A: Darstellung der Stimulierung von TRPC4-Kanälen mittels Aktivierung eines Gi-Proteins nach Carbachol-induzierter M2- Aktivierung bei gleichzeitig vorliegender Gq-vermittelter Bildung von DAG nach Carbachol-induzierter Aktivierung endogener M3-Rezeptoren. Die Aktivierung des TRPC4-Kanals resultiert dabei in einem gesteigerten Calciumeinstrom in die Zelle. B: Im Falle einer konstitutiven Gi-Aktivierung durch das GPR107-Protein würde in diesem Modell durch das GPR107-Protein die nötige Gi-Aktivität für die Stimulierung des TRPC4-Kanals erreicht werden. Bei gleichzeitiger Aktivierung des M3-Rezeptors mittels Carbachol und der hieraus resultierenden Bildung von DAG würde nach diesem Modell eine vollständige Stimulierung des TRPC4-Kanals folgen. Dies würde wiederum zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle führen.

Des Weiteren wurde, um eine möglichst gute Beurteilung des zu untersuchenden Calciumeinstroms durch die TRPC4-Kanäle zu erreichen und eine Überlagerung durch CRAC-Ströme zu verhindern, das Experiment so geplant, dass sich endogen vorhandene CRAC-Kanäle während der TRPC4-Kanal Stimulierung möglichst in einem inaktiven Zustand befinden (Hoth *and* Penner, 1992). Hierfür wurden nach Messbeginn zunächst die intrazellulären Calciumspeicher mittels einer 5 μ M Thapsigargin/B1-Lösung entleert. Da es sich bei Thapsigargin um einen nicht-kompetitiven Inhibitor der endoplasmatischen Ca-ATPase (SERCA) handelt, wird hierdurch ein aktiver Transport von Calcium in das endoplasmatische Retikulum verhindert (Lytton *et al.*, 1991). Da der Ausstrom des Calciums aus diesen Speichern jedoch passiv verläuft, bleibt dieser hiervon unbeeinflusst. Dementsprechend entleeren sich die Speicher und die zytosolische Calciumkonzentration steigt langsam an. Um nun die durch die geleerten Calciumspeicher aktiven CRAC-Kanäle (Hoth *and* Penner, 1993) zu inaktivieren, wurde im Anschluss eine 2,5 mM Calcium/B1-Lösung appliziert. Der resultierende Calciumeinstrom durch die CRAC-Kanäle führt nachfolgend zu einer Inaktivierung dieser Kanäle (Zweifach *and*

Lewis, 1995). In dieser Phase wurden nun mittels einer 100 μ M Carbachol/B1-Lösung die endogenen M3-Rezeptoren stimuliert, wodurch eine G_q -Protein vermittelte Bildung von Diacylglycerin erfolgt (Caulfield, 1993). Sollte nun zeitgleich durch das GPR107-Protein konstitutiv eine Aktivierung von G_i -Proteinen vorliegen, wäre eine zusätzliche Verstärkung des Calcium-Influges über TRPC4-Kanäle zu erwarten.

Um zu kontrollieren, inwieweit entstehende Effekte auf die Koexpression des TRPC4-Kanals und des GPR107-Proteins zurückgeführt werden können, wurden vier verschiedene Messreihen durchgeführt. Zunächst wurden Zellen gemessen, die sowohl die TRPC4-Kanäle als auch das GPR107-IGFP-Konstrukt exprimierten. Verglichen wurden diese Zellen direkt mit Zellen, welche ebenfalls die TRPC4-Kanäle enthielten und mit einem Kontrollplasmid, IGFP, transfiziert worden waren. Diese Messungen wurden mit GPR107-IGFP beziehungsweise IGFP-Vektor transfizierten HEK293 Zellen verglichen, welche die TRPC4-Kanäle nicht exprimierten.

Bei Betrachtung der Messergebnisse in Abb. 53 und Abb. 54 fällt zunächst auf, dass bei Expression des GPR107-Proteins (rot), unabhängig vom Vorhandensein des TRPC4-Proteins, ein signifikant verringerter passiver Ausstrom von Calcium aus dem ER nach Thapsigarginapplikation gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) registriert werden kann. Dies könnte dabei Resultat eines geringeren Füllungszustandes der Calciumspeicher durch Expression des GPR107-Proteins sein. Betrachtet man den weiteren Verlauf der Messung, lässt sich bei anschließender Zugabe der Calciumlösung kein signifikanter Unterschied des Anstiegs der zellulären Calciumkonzentration zwischen den GPR107 exprimierenden Zellen und den GFP-Kontrollzellen verzeichnen. Dies ist sowohl in den TRPC4 exprimierenden Zellen als auch in den Zellen ohne Expression dieses Calciumkanals der Fall. Den Calciumeinstrom durch die CRAC-Kanäle scheint die Expression des GPR107-Proteins dementsprechend nicht wesentlich zu beeinflussen. Während der anschließend wieder abnehmenden zytosolischen Calciumkonzentration erfolgte nun die Zugabe von Carbachol zur Stimulierung endogener M3-Rezeptoren. Da sich hierbei für alle Konstellationen kein verstärkter Calciumeinstrom zeigt, ergibt sich in Zellen, welche sowohl das TRPC4- als auch das GPR107-Protein exprimieren, kein Hinweis auf eine Kopplung des GPR107-Proteins an G_i .

Auffällig stellen sich jedoch die Calciumkonzentrationen am Ende der Messungen dar. Während die Calciumkonzentrationen in Zellen ohne Expression des TRPC4-Proteins auf ein ähnliches Niveau abfallen, gleich ob diese das GPR107-Protein exprimieren oder lediglich das GFP-Protein, lässt sich hingegen in *Trpc4*-Zellen beobachten, dass die Endkonzentration des zytosolischen Calciums signifikant verschieden ist, je nachdem ob diese Zellen das GPR107-Protein exprimieren oder nicht. Dabei fällt die Calciumkonzentration der GPR107 transfizierten Zellen deutlich geringer ab und resultiert

dementsprechend in einer signifikant höheren Calciumendkonzentration gegenüber den GFP-Kontrollzellen. Da dieser Effekt lediglich in Zellen zu beobachten ist, die sowohl das TRPC4- als auch das GPR107-Protein exprimieren, könnte es sich hierbei um eine potentielle Interaktion dieser beiden Proteine handeln.

Um ergänzend eine Abhängigkeit der entstehenden Differenz der Calciumendkonzentration in den TRPC4 exprimierenden Zellen von der vorigen Carbacholapplikation und der hiermit verbundenen Stimulierung endogener M3-Rezeptoren zu prüfen, wurde das selbe Experiment nochmals ohne diese Carbacholzugabe durchgeführt (Abb. 55). Hierbei ergibt sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Calciumendkonzentration in GPR107 exprimierenden Zellen (rot) gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau). Dementsprechend scheint die Carbacholapplikation keine erforderliche Voraussetzung für diesen Effekt darzustellen.

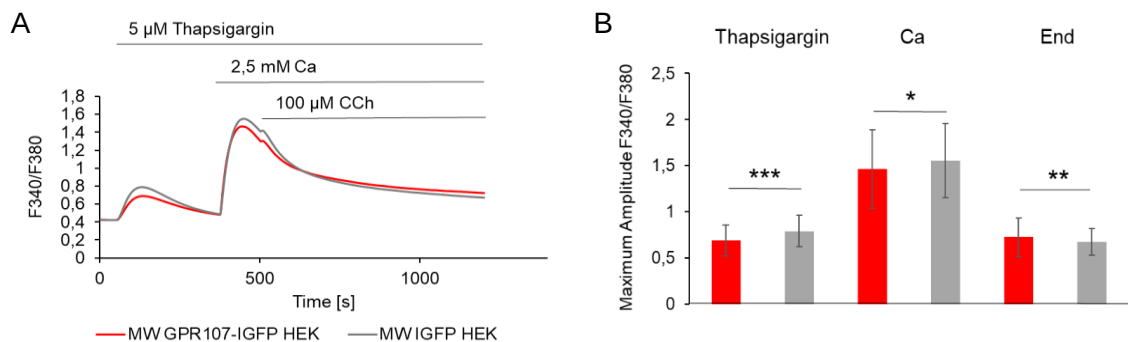


Abb. 53: Das GPR107-Protein beeinflusst den Speicher-vermittelten Calciumeinstrom nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter HEK-Zellen (n=243/ N=7, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-Kontrollzellen (n=288/ N=8, grau) während extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin (5 μ M), Calcium (2,5 mM) und Carbachol (100 μ M). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte HEK-Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,69 $\pm$ 0,17 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,47 $\pm$ 0,43 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,72 $\pm$ 0,21 am Ende der Messung. Für IGFP transfizierte HEK-Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,79 $\pm$ 0,17 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,55 $\pm$ 0,40 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,67 $\pm$ 0,14 am Ende der Messung. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten HEK-Zellen beträgt p < 0,0001 für das Maximum nach Thapsigargin-Zugabe, p = 0,0157 für das Maximum nach Calciumzugabe und p = 0,0011 für das Ende der Messung.

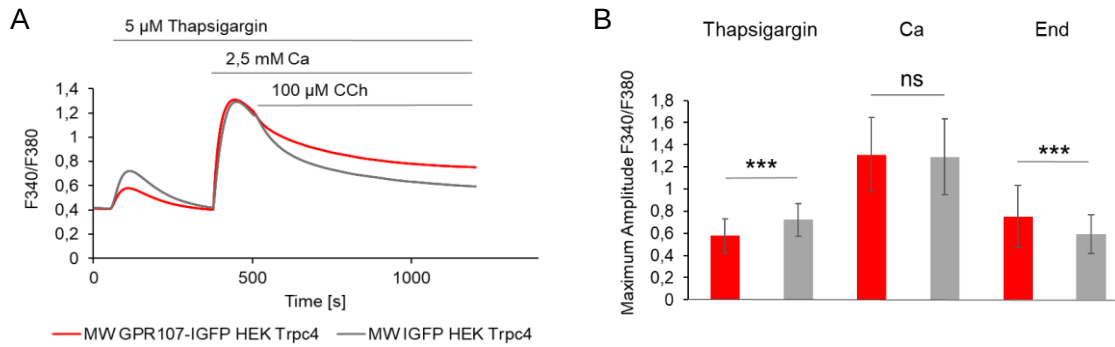


Abb. 54: Das GPR107-Protein und Carbachol zeigen gemeinsam keine Aktivierung des TRPC4-Kanals.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter HEK-*Trpc4*-Zellen (n=612/ N=14, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen (n=600/ N=13, grau) während extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin (5 µM), Calcium (2,5 mM Calcium) und Carbachol (100 µM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,58 +/- 0,15 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,31 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,75 +/- 0,28 am Ende der Messung. Für IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,72 +/- 0,15 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,29 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,59 +/- 0,18 am Ende der Messung. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Zellen beträgt p < 0,0001 für das Maximum nach Thapsigargin-Zugabe, p = 0,3310 für das Maximum nach Calciumzugabe und p < 0,0001 für das Ende der Messung.

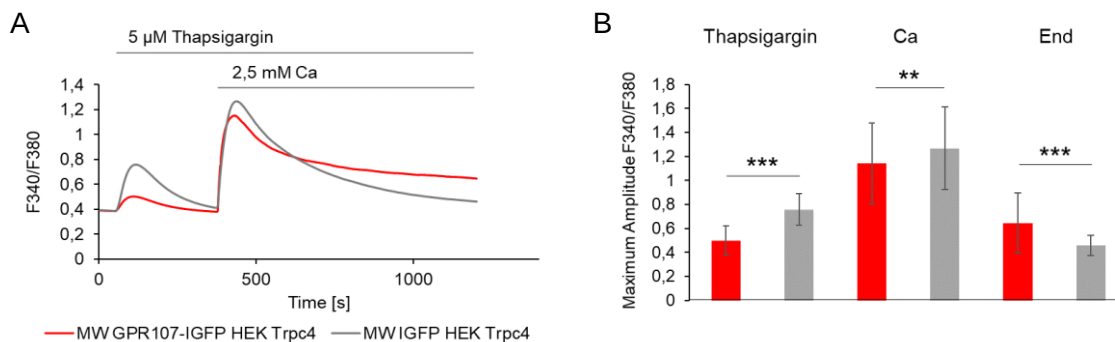


Abb. 55: Die Erhöhung der basalen zytosolischen Calciumkonzentration bei Koexpression des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal ist Carbachol-unabhängig.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter HEK-*Trpc4*-Zellen (n=108/ N=3, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen (n=128/ N=3, grau) während extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin (5 µM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,50 +/- 0,12 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,14 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,65 +/- 0,23 am Ende der Messung. Für IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,76 +/- 0,13 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,27 +/- 0,35 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,46 +/- 0,08 am Ende der Messung. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Zellen beträgt p < 0,0001 für das Maximum nach Thapsigargin-Zugabe, p = 0,0059 für das Maximum nach Calciumzugabe und p < 0,0001 für das Ende der Messung.

4.18 Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR108-Protein ergibt keinen Hinweis auf eine G_i -Kopplung des GPR108-Proteins

Um auch den G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 auf eine mögliche G_i -Kopplung zu untersuchen, wurde das zuvor beschriebene Experiment gleichermaßen für das GPR108-Protein durchgeführt. Äquivalent zu den Untersuchungen des GPR107-Proteins wurden auch hier vier verschiedene Messreihen durchgeführt. Dabei wurden wiederum zunächst Zellen gemessen, welche sowohl den TRPC4-Kanal als auch das GPR108-IGFP-Konstrukt exprimierten. Zur Kontrolle wurden Zellen herangezogen, welche ebenfalls *Trpc4* stabil enthalten, jedoch zuvor lediglich mit einem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Die weiteren Messreihen erfolgten in HEK-Zellen, welche *Trpc4* nicht enthalten, wobei auch hier Zellen verglichen wurden, welche entweder das GPR108-IGFP-Konstrukt oder lediglich das GFP-Protein exprimierten. Während der Messungen erfolgte jeweils analog zu der Untersuchung des GPR107-Proteins die Applikation einer 5 μ M Thapsigargin/B1-Lösung, einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung und einer 100 μ M Carbachol/B1-Lösung.

Abb. 56 und Abb. 57 zeigen die aufgezeichneten Messkurven. Äquivalent zu den Untersuchungen des GPR107-Proteins wird auch hier deutlich, dass die Expression des GPR108-Proteins (rot) gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau) einen signifikant verringerten passiven Ausstrom des Calciums aus dem endoplasmatischen Retikulum zur Folge hat. Dieses Phänomen zeigt sich dabei gleichermaßen in beiden Zellreihen und damit unabhängig von der Expression des TRPC4-Kanals. Entsprechend scheint dieser Effekt von der Expression des GPR108-Proteins abzuhängen. Bei der hierauf folgenden Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration fällt der Einstrom des Calciums durch endogene CRAC-Kanäle in GPR108 exprimierenden Zellen signifikant geringer gegenüber den GFP-Kontrollzellen aus, wobei sich auch dies wiederum unabhängig von dem Vorhandensein des TRPC4-Kanals präsentiert. Die anschließende Applikation der Carbachollösung führt äquivalent zu den Beobachtungen des GPR107-Proteins auch hier in allen vier Messreihen zu keinem zusätzlichen Calciumeinstrom über die TRPC4-Kanäle. Damit ergibt sich in diesem Experiment analog zu den Untersuchungen des GPR107-Proteins kein Hinweis auf eine Kopplung des GPR108-Proteins an G_i .

Die Calciumendkonzentrationen fallen im Verlauf nahezu auf das gleiche Niveau ab. Zwar ergibt sich auch hier in den *Trpc4*-Zellen ein rechnerisch signifikanter Unterschied zwischen den GPR108-IGFP exprimierenden Zellen und den GFP-Kontrollzellen, dieser fällt jedoch lediglich sehr gering aus, sodass ein zugrundeliegender biologischer Effekt fraglich scheint.

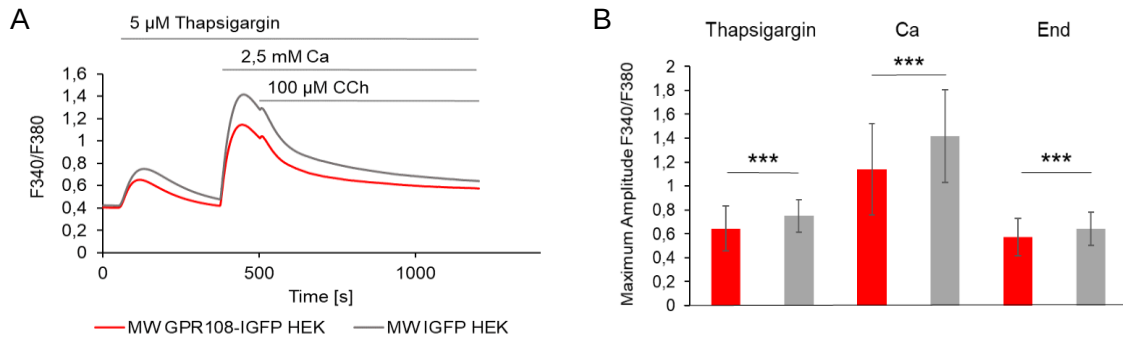


Abb. 56: Das GPR108-Protein verringert den Speicher-vermittelten Calciumeinstrom.

A: Messkurven GPR108-IGFP transfizierter HEK-Zellen (n=234/ N=6, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-Kontrollzellen (n=339/ N=8, grau) während extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin (5 μ M), Calcium (2,5 mM) und Carbachol (100 μ M). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108-IGFP transfizierte HEK-Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,64 $\pm$ 0,19 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,14 $\pm$ 0,38 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,57 $\pm$ 0,16 am Ende der Messung. Für IGFP transfizierte HEK-Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,75 $\pm$ 0,14 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,42 $\pm$ 0,39 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,64 $\pm$ 0,14 am Ende der Messung. Der p-Wert zwischen den GPR108-IGFP und den IGFP transfizierten HEK-Zellen beträgt p < 0,0001 für das Maximum nach Thapsigargin-Zugabe, ebenfalls p < 0,0001 für das Maximum nach Calciumzugabe und ebenfalls p < 0,0001 für das Ende der Messung.

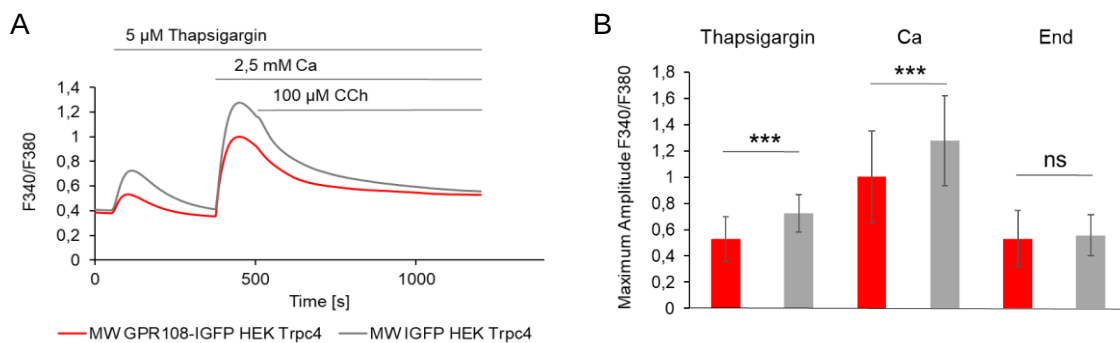


Abb. 57: Das GPR108-Protein und Carbachol zeigen gemeinsam keine Aktivierung des TRPC4-Kanals.

A: Messkurven GPR108-IGFP transfizierter HEK-*Trpc4*-Zellen (n=272/ N=6, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen (n=423/ N=8, grau) während extrazellulärer Zugabe von Thapsigargin (5 μ M), Calcium (2,5 mM) und Carbachol (100 μ M). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR108-IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,53 $\pm$ 0,17 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,00 $\pm$ 0,35 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,53 $\pm$ 0,21 am Ende der Messung. Für IGFP transfizierte HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,73 $\pm$ 0,14 nach Applikation des Thapsigargins, ein mittleres Maximum von 1,28 $\pm$ 0,34 nach Zugabe des Calciums und ein mittlerer Wert von 0,56 $\pm$ 0,16 am Ende der Messung. Der p-Wert zwischen den GPR108-IGFP und den IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Zellen beträgt p < 0,0001 für das Maximum nach Thapsigargin-Zugabe, ebenfalls p < 0,0001 für das Maximum nach Calciumzugabe und p = 0,0527 für das Ende der Messung.

4.19 Die Koexpression des Ionenkanals TRPC4 mit dem GPR107-Protein beeinflusst die basale Calciumkonzentration

Nachdem sich im vorigen Experiment, in welchem die Auswirkung einer Koexpression des GPR107-Proteins mit dem Calcium-permeablen Kationenkanal TRPC4 betrachtet wurde, Hinweise auf einen möglichen *Crosstalk* dieser beiden Proteine ergeben hatten, sollte dies in einem weiteren Experiment genauer untersucht werden. In obigem Experiment war dabei in erster Linie eine resultierende signifikant erhöhte Calciumendkonzentration bei Koexpression des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal aufgefallen, wobei weder die alleinige Expression des GPR107-Proteins noch die des TRPC4-Kanals diesen Effekt gezeigt hatten. Aus diesem Grund sollte der Einfluss dieser Koexpression auf die basale Calciumkonzentration der Zellen nochmals intensiver beleuchtet werden. Hierfür erfolgten äquivalent zum oben beschriebenen Experiment ebenfalls vier verschiedene Messreihen. Zum einen wurden wiederum HEK-Zellen verwendet, welche *Trpc4* stabil enthalten und zum anderen HEK-Zellen, die diesen Calciumkanal nicht exprimieren. Beide Zelllinien wurden entsprechend des vorigen Experiments entweder mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder zur Kontrolle lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert. Vor Messbeginn erfolgte bei allen Zellen, gleich welche Proteinkonstellation diese exprimierten, parallel zu der Fura-2-Beladung eine 30-minütige Inkubation in einer 2 mM Calcium/B1-Lösung. Währenddessen konnte sich in den Zellen eine stabile basale Calciumkonzentration einstellen. Nachdem anschließend mittels Calcium Imaging zunächst für kurze Zeit die Aufzeichnung dieser sich eingestellten basalen Calciumkonzentrationen erfolgte, wurde durch Zugabe einer 2 mM Na-EGTA/B1-Lösung nahezu das gesamte Calcium aus der Lösung gebunden. Nach Erreichen eines neuen stabilen Calciumniveaus wurde durch Applikation einer 2 mM Calcium/B1-Lösung die Ausgangssituation wiederhergestellt und die Reaktion der Zellen hierauf beobachtet.

Betrachtet man die Messergebnisse in Abb. 58 und Abb. 59, wird zunächst nochmals der alleinige Effekt des GPR107-Proteins auf die basale Calciumkonzentration deutlich. Sowohl in den Zellen mit als auch in jenen ohne Expression des TRPC4-Kanals zeigt sich die Anfangskonzentration an Calcium in den GPR107 transfizierten Zellen (rot) signifikant erhöht gegenüber den GFP-Kontrollzellen (grau). Des Weiteren wird in den Messungen ersichtlich, dass die initiale Calciumkonzentration der IGFP-Vektor transfizierten Kontrollzellen in den Zellen mit oder ohne Expression des TRPC4-Kanals kaum differiert. Dementsprechend hat die alleinige Expression des TRPC4-Kanals keinen Einfluss auf die basale Calciumkonzentration der Zellen. Nach Zugabe des Na-EGTA und der hiermit verbundenen Bindung nahezu der gesamten freien Calciumionen kommt es in allen Zellen, gleich welche Proteinkonstellation diese exprimieren, erwartungsgemäß zu einem

Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration auf ein neues stabiles Calciumniveau. Hierbei zeigen die Messungen sowohl für die stabile *Trpc4* Zelllinie als auch für die Zellen ohne Expression des TRPC4-Kanals keinen signifikanten Unterschied zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP-Vektor transfizierten Zellen. Auf die basale Calciumkonzentration in calciumfreier Umgebung hat somit weder die Expression des GPR107-Proteins noch dessen Koexpression mit dem TRPC4-Kanal einen signifikanten Einfluss. Im weiteren Verlauf der Messung wurde durch Zugabe einer 2 mM Calciumlösung die Ausgangssituation wiederhergestellt. Hierbei zeigt sich für die lediglich das GFP-Protein exprimierenden Kontrollzellen, äquivalent zum Beginn der Messungen, kein Unterschied zwischen der stabilen HEK *Trpc4* Zelllinie und den HEK-Zellen, welche den TRPC4-Kanal nicht exprimieren. Auch hier hat dementsprechend die alleinige Expression des TRPC4-Kanals keinen Einfluss auf die basale Calciumkonzentration. Die Expression des GPR107-Proteins resultiert erneut entsprechend des Messbeginns in einer signifikant höheren Calciumkonzentration gegenüber den GFP-Kontrollzellen, wobei dies wiederum sowohl mit als auch ohne Expression des TRPC4-Kanals zu beobachten ist. Vergleicht man abschließend die Messergebnisse der Zellen mit Koexpression des GPR107-Proteins und des TRPC4-Kanals mit Zellen, welche lediglich das GPR107-Protein exprimieren, lässt sich eine nochmals stärker erhöhte Calciumkonzentration bei Koexpression beider Proteine vermuten.

Dementsprechend ergibt sich in dieser Untersuchung ein weiterer Hinweis auf eine potentielle Interaktion des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal und eine hiermit einhergehende Beeinflussung der basalen Calciumkonzentration.

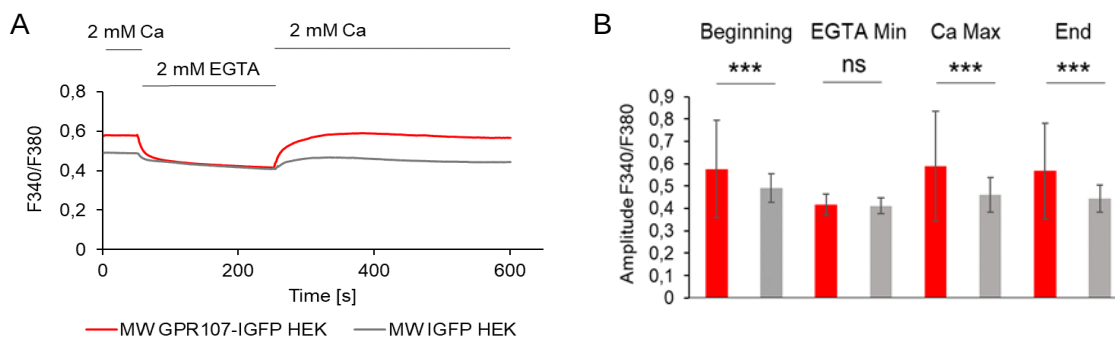


Abb. 58: Das GPR107-Protein erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter HEK-Zellen (n=216/ N=6, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-Kontrollzellen (n=202/ N=5, grau) nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium (2 mM) und während extrazellulärer Zugabe von EGTA (2 mM) und Calcium (2 mM). B: Statistische Auswertung der Amplituden zu ausgewählten Zeitpunkten. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von $0,58 \pm 0,22$, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von $0,42 \pm 0,05$, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von $0,59 \pm 0,25$ und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von $0,57 \pm 0,22$. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von $0,49 \pm 0,06$, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von $0,41 \pm 0,04$, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von $0,46 \pm 0,08$ und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von $0,44 \pm 0,06$. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt $p < 0,0001$ für den Beginn der Messung, $p = 0,2168$ für das Minimum nach EGTA-Zugabe, $p < 0,0001$ für das Maximum nach Calciumzugabe und ebenfalls $p < 0,0001$ für das Ende der Messung.

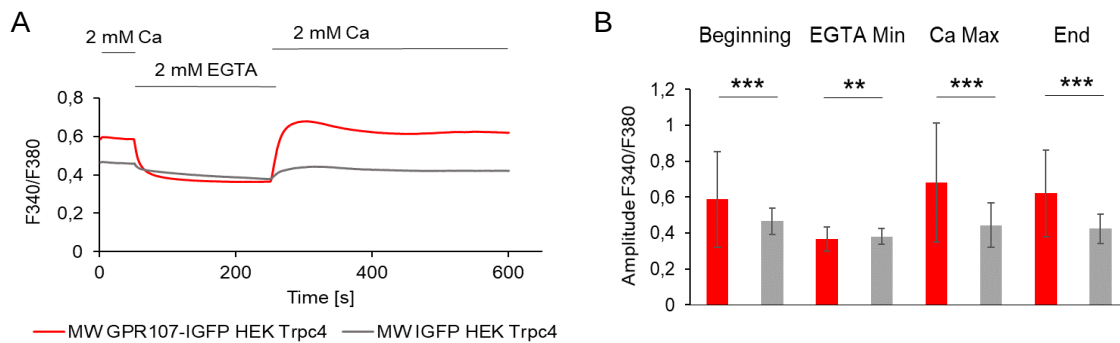


Abb. 59: Die Koexpression des GPR107-Proteins mit dem TRPC4-Kanal erhöht die basale zytosolische Calciumkonzentration nochmals stärker.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter HEK-*Trpc4*-Zellen (n=293/ N=8, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten HEK-*Trpc4*-Kontrollzellen (n=315/ N=7, grau) nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium (2 mM) und während extrazellulärer Zugabe von EGTA (2 mM) und Calcium (2 mM). B: Statistische Auswertung der Amplituden zu ausgewählten Zeitpunkten. Für GPR107-IGFP transfizierte *Trpc4*-Zellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von 0,59 +/- 0,27, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von 0,37 +/- 0,07, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von 0,68 +/- 0,33 und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von 0,62 +/- 0,24. Für IGFP transfizierte *Trpc4*-Kontrollzellen zeigt sich nach 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium zu Beginn der Messung ein mittlerer Wert von 0,47 +/- 0,07, nach Applikation des EGTA ein mittleres Minimum von 0,38 +/- 0,04, nach Zugabe des Calciums ein mittleres Maximum von 0,44 +/- 0,12 und am Ende der Messung ein mittlerer Wert von 0,42 +/- 0,08. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten *Trpc4*-Zellen beträgt p < 0,0001 für den Beginn der Messung, p = 0,0014 für das Minimum nach EGTA-Zugabe, p < 0,0001 für das Maximum nach Calciumzugabe und ebenfalls p < 0,0001 für das Ende der Messung.

4.20 Die Untersuchung einer potentiellen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins

Neben den bisherigen Untersuchungen auf verschiedene G-Protein gekoppelte Signalkaskaden des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 sollte zudem die potentielle Bindungsstelle des G-Proteins innerhalb des Rezeptors näher betrachtet werden.

Der dritte intrazelluläre *Loop* zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs stellt dabei in anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Struktur für die Bindung des G-Proteins dar (Hawes *et al.*, 1994). Da überdies die Sequenz dieser Schleife innerhalb der jeweiligen LUSTER-Subfamilie eine hohe Konservierung aufweist, lässt sich dementsprechend auch für das GPR107-Protein die G-Protein-Bindungsstelle an dieser Position vermuten (Edgar, 2007). In der Sequenz des dritten intrazellulären *Loops* verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren wird dabei an spezifischen Positionen das Vorkommen positiv geladener Aminosäuren beschrieben, wobei diese eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Interaktion zwischen G-Protein, insbesondere bei G_{i/o} oder G_{q/11}-Proteinen, und dem jeweiligen Rezeptor darzustellen scheinen (Muramatsu *and* Suwa, 2006). Auch das GPR107-Protein weist in dem entsprechenden Bereich drei benachbarte positiv geladene Aminosäuren, zweimal Lysin (K) und einmal Arginin (R), auf.

Um die Relevanz dieser potentiellen G-Protein-Bindungsstelle im Rahmen einer vollständigen Wirkungsentfaltung des GPR107-Proteins näher zu beleuchten, erfolgte die Mutation dieser drei Aminosäuren zu jeweils einem ungeladenen Alanin (A). Hierdurch sollte die Bindung des G-Proteins an das GPR107-Protein verhindert und somit die Effekte des Rezeptors in der Zelle möglichst unterbunden werden. Die Positionen dieser Mutationen sind schematisch in Abb. 60 dargestellt.

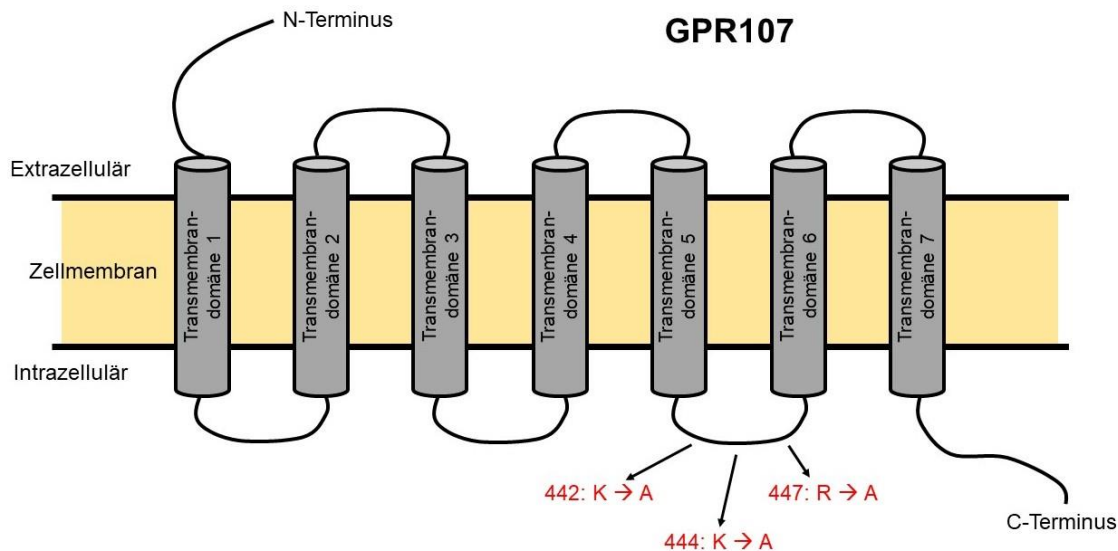


Abb. 60: Schematische Darstellung des GPR107-Proteins mit Mutationen innerhalb der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle.

Darstellung des GPR107-Proteins als G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Dabei liegen die positiv geladenen Aminosäuren Lysin (Position 442 und 444) und Arginin (Position 447) im Bereich des dritten intrazellulären *Loops* und damit im Bereich einer potentiellen G-Protein-Bindungsstelle jeweils mutiert zu der ungeladenen Aminosäure Alanin vor. Hierdurch soll die potentielle intrazelluläre Bindung des G-Proteins an den GPR107-Rezeptor verhindert werden.

Zunächst erfolgte die Untersuchung dieser GPR107-Mutante im Hinblick auf den erhöhten Calciumeinstrom GPR107 exprimierender Zellen. Verglichen wurden dabei Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP-, beziehungsweise mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Während der Messung erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 61 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Erwartungsgemäß führt die Calciumapplikation hierbei in den GPR107-Wildtypprotein exprimierenden Zellen (rot) zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Vergleicht man hierzu jedoch die Zellen, welche die GPR107-Mutante (orange) exprimieren, so lässt sich entgegen der Erwartungen sogar ein nochmals signifikant stärkerer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verzeichnen.

Ergänzend sollte darüber hinaus auch der Einfluss dieser Mutation auf die, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende, verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern untersucht werden. Hierbei erfolgte äquivalent zu dem vorigen Experiment der Vergleich des GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP-Konstruktes mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt, sowie zudem der Vergleich mit IGFP-Vektor transfizierten Kontrollzellen. Im Verlauf der Messung wurde zunächst eine 100 µM Carbachol/B1-Lösung appliziert, im Anschluss folgte die Zugabe einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung. In Abb. 62 sind die Ergebnisse dieser drei Messreihen abgebildet. Bei Betrachtung der Kurven lässt sich dabei zunächst festhalten, dass die Expression des GPR107-Wildtypproteins (rot), wie bereits aus vorigen Experimenten bekannt, im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen (grau) in einer signifikant verringerten Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern resultiert. Entgegen der ursprünglichen Erwartung, allerdings konform mit den obigen Beobachtungen bezüglich des Calciumeinstroms in die Zellen, zeigt die GPR107-Mutante (orange) eine nochmals signifikant verringerte intrazelluläre Calciumfreisetzung im Vergleich zu GPR107-Wildtypprotein exprimierenden Zellen. Somit führt auch in diesem Fall die Mutation der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle zu einer signifikanten Verstärkung der Wirkung des GPR107-Proteins. Bei anschließender Applikation der Calciumlösung zeigt sich erwartungsgemäß kein signifikanter Unterschied in der Anstiegshöhe der Calciumkonzentration zwischen den GPR107-Wildtypprotein-Kontrollzellen und den GFP-Kontrollzellen. Hierzu stellt sich auch die Anstiegshöhe der Calciumkonzentration in Zellen, welche die GPR107-Mutante exprimieren, nicht signifikant verschieden dar.

Letztendlich scheint die Mutation der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle die Wirkung des GPR107-Proteins in gewisser Weise zu beeinflussen. Allerdings wäre bei einer durch die Mutation bedingten Verhinderung der Interaktion des G-Proteins mit dem GPR107-Protein eine Verringerung der mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden Effekte zu erwarten gewesen. Dementsprechend lassen sich hiermit keine sicheren Rückschlüsse auf eine sich an dieser Position befindende G-Protein-Bindungsstelle und somit auf die Charakterisierung des GPR107-Proteins als G-Protein gekoppelten Rezeptor ziehen. Weshalb die Mutation im Bereich des dritten intrazellulären *Loops* und die hiermit einhergehende Modifikation der Ladung an dieser Position in einer Verstärkung der Effekte resultiert, bedarf entsprechend weiterer Untersuchungen.

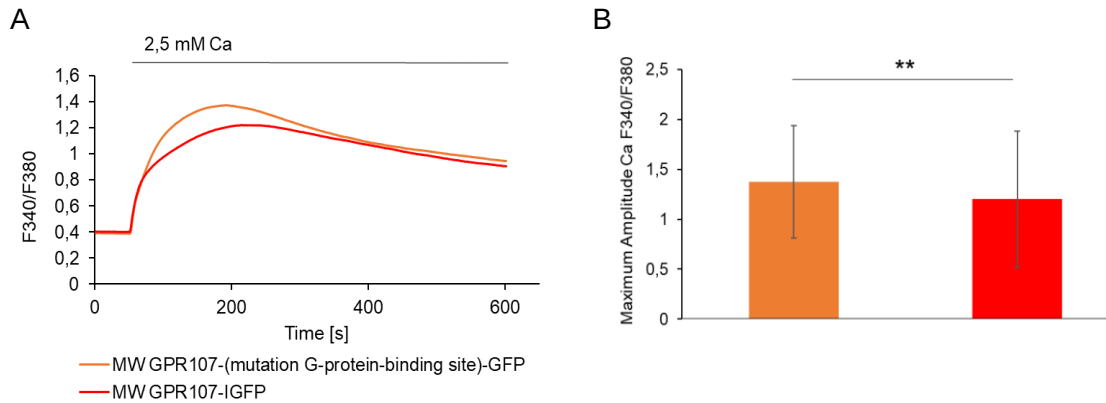


Abb. 61: Mutationen in der putativen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins verstärken die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.

A: Messkurven GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP transfizierter Zellen (n=221/ N=8, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=279/ N=8, rot) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,37 +/- 0,56, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,20 +/- 0,68. Der p-Wert zwischen den GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p = 0,0025.

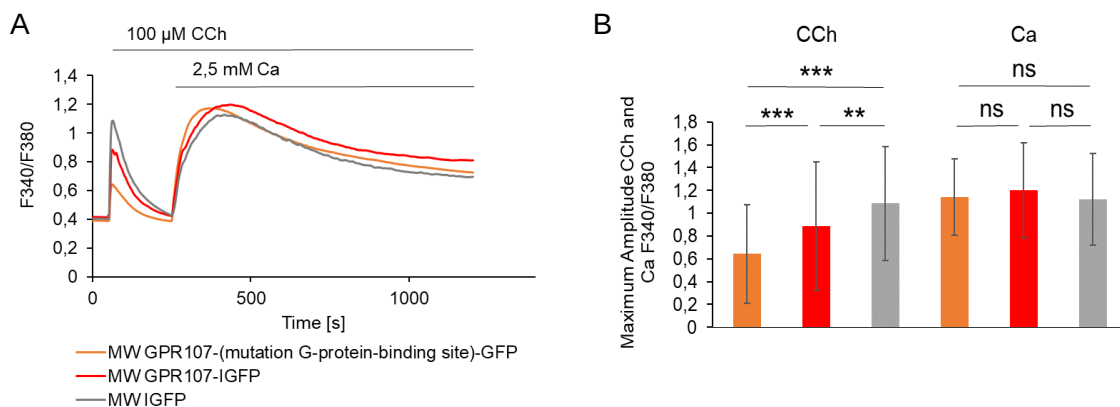


Abb. 62: Mutationen in der putativen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins verstärken die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.

A: Messkurven GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP transfizierter Zellen (n=186/ N=6, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten (n=116/ N=5, rot) und IGFP transfizierten (n=121/ N=5, grau) Kontrollzellen während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 µM) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,64 +/- 0,43 nach Applikation des Carbachols und von 1,14 +/- 0,34 nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 0,88 +/- 0,56 nach Applikation des Carbachols und von 1,20 +/- 0,42 nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,09 +/- 0,50 nach Applikation des Carbachols und von 1,12 +/- 0,40 nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den GPR107-(K₄₄₂A)-(K₄₄₄A)-(R₄₄₇A)-GFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt p < 0,001 für den Carbachol-Peak und p > 0,05 für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.21 Die Untersuchung des GPR107-Proteins als potentiellen Ionenkanal

Um den Effekten des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107 einen potentiellen intrazellulären Mechanismus zuordnen zu können, erfolgte in den vorigen Experimenten bereits die Untersuchung verschiedener G-Protein gekoppelter Signalkaskaden. Da sich hierbei jedoch kein eindeutiger Hinweis auf die Interaktion des GPR107-Proteins mit den betrachteten G-Proteinen ergab und zudem die Struktur dieses Rezeptors lediglich sehr geringe Ähnlichkeit zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren aufweist, sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es sich bei dem GPR107-Protein um einen Calcium-permeablen Ionenkanal handelt. Bei Betrachtung eines Kyte und Doolittle Hydropathieblots (Kyte *and* Doolittle, 1982) des GPR107-Proteins lässt sich überdies die Anzahl der Transmembrandomänen des GPR107-Proteins nicht sicher vorhersagen, so dass sowohl sieben Transmembrandomänen, wie sie in einem G-Protein gekoppelten Rezeptor vorkommen, als auch sechs Transmembrandomänen, wie sie häufig in Ionenkanälen vorhanden sind, gezählt werden können. Infolgedessen könnte es sich bei dem beobachteten erhöhten Calciumeinstrom in GPR107 exprimierenden Zellen ebenso um eine direkte Wirkung des GPR107-Proteins als Calciumionen-Kanal handeln. Calciumkanäle bestehen dabei aus vier oder fünf Untereinheiten, wobei die Ionen-leitende Untereinheit typischerweise aus vier Einheiten besteht, die jeweils sechs Transmembrandomänen aufweisen (Catterall *et al.*, 2005). Die in der Membran liegende Schleife zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs ist dabei für die Ionenleitfähigkeit von zentraler Bedeutung. Vergleicht man die Sequenz dieser Schleife verschiedener Calciumkanäle miteinander, lässt sich ein gehäuftes Auftreten negativ geladener Aminosäuren feststellen, wobei diese wiederum wesentlich an der Leitfähigkeit des Kanals beteiligt sind (Tang *et al.*, 1993). Auch das GPR107-Protein weist in dem entsprechenden Bereich zwischen den vorhergesagten Transmembrandomänen fünf und sechs zwei negativ geladene Aminosäuren, zum einen Glutaminsäure (E) und zum anderen Asparaginsäure (D), auf. Um die Calciumleitfähigkeit des GPR107-Proteins im Falle einer tatsächlichen Funktion als Ionenkanal möglichst gänzlich zu verhindern, erfolgte für die folgende Messung die Mutation dieser beiden Aminosäuren zu jeweils einem ungeladenen Alanin (A). Die Positionen dieser Mutationen sind in Abb. 63 schematisch dargestellt.

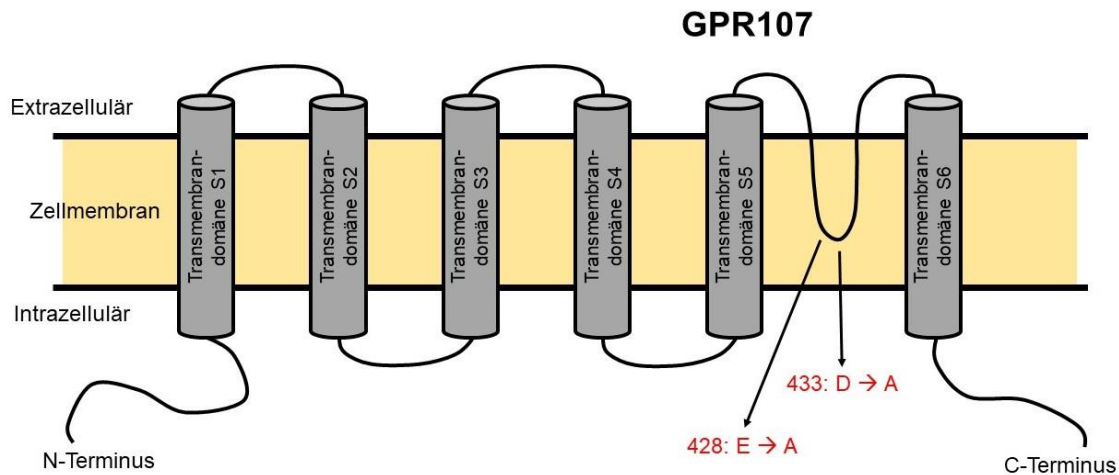


Abb. 63: Schematische Darstellung des GPR107-Proteins als potentieller Ionenkanal mit Mutationen innerhalb der putativen Pore.

Darstellung des GPR107-Proteins als potentieller Ionenkanal mit 6 Transmembrandomänen. Dabei liegen die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure (Position 428) und Asparaginsäure (Position 433) im Bereich zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne und damit im Bereich einer putativen Pore des Ionenkanals jeweils mutiert zu der ungeladenen Aminosäure Alanin vor. Hierdurch soll die potentielle Ionen-Leitfähigkeit des GPR107-Proteins beeinflusst werden.

Mittels Calcium Imaging erfolgte die Untersuchung dieser GPR107-Mutante. Verglichen wurden dabei Zellen, welche entweder mit diesem GPR107-(E₄₂₈A)-(D₄₃₃A)-GFP- oder mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. In beiden Fällen erfolgte im Verlauf der Messung die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 64 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Sowohl für die GPR107 exprimierenden Zellen, bei welchen die potentielle Pore mutiert vorliegt (orange), als auch für die GPR107-Wildtypprotein-Kontrollzellen (rot) lässt sich dabei ein erheblicher Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Calciumapplikation registrieren. Die jeweiligen Anstiegshöhen der intrazellulären Calciumkonzentration unterscheiden sich hierbei nicht signifikant voneinander.

Da dementsprechend die Mutation der negativ geladenen Aminosäuren innerhalb des dritten intrazellulären Loops nicht in einer Verringerung des, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden, erhöhten Calciumeinstroms resultiert, ergibt sich hierdurch kein Anhaltspunkt dafür, dass es sich bei dem GPR107-Protein um einen Calcium-permeablen Ionenkanal handelt.

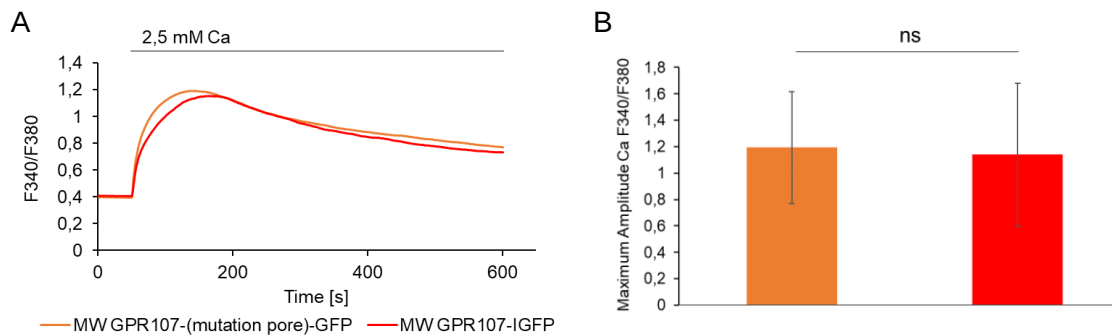


Abb. 64: Mutationen in der putativen Pore des GPR107-Proteins beeinflussen die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-(E₄₂₈A)-(D₄₃₃A)-GFP transfizierter Zellen (n=108/ N=3, orange) im Vergleich zu GPR107-IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=117/ N=3, rot) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-(E₄₂₈A)-(D₄₃₃A)-GFP transfizierte Zellen zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,19 +/- 0,42, für GPR107-IGFP transfizierte Kontrollzellen ein mittleres Maximum von 1,14 +/- 0,54. Der p-Wert zwischen den GPR107-(E₄₂₈A)-(D₄₃₃A)-GFP und den GPR107-IGFP transfizierten Zellen beträgt p = 0,4094.

4.22 Die Untersuchung des GPR107-Proteins als potentiellen Calciumsensor

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weist der G-Protein gekoppelte Rezeptor 107 einen wesentlichen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase auf. Weiterhin wurde in den vorigen Experimenten auf unterschiedliche Weisen untersucht, ob sich diesen aufgezeigten Effekten ein zugrundeliegender funktioneller Mechanismus zuordnen lässt. Hierfür wurden zum einen verschiedene G-Protein gekoppelte Signalkaskaden untersucht, zum anderen jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es sich bei dem GPR107-Protein um einen Calcium-permeablen Ionenkanal handeln könnte. Dabei hatten sich jedoch für keine dieser Möglichkeiten eindeutige Anhaltspunkte finden lassen.

Mit dem *Calcium-sensing receptor* (CaSR) wurde ein G-Protein gekoppelter Rezeptor identifiziert, welcher durch seine Funktion als Calciumsensor an der zellulären Reaktion auf eine veränderte extrazelluläre Calciumkonzentration beteiligt ist (Brown *et al.*, 1993). Der Rezeptor detektiert hierbei extrazelluläre Calciumionen und ist daraufhin beispielsweise wesentlich in die Regulation der Calcitoninsekretion involviert (Freichel *et al.*, 1996). Dabei lässt sich dieser Rezeptor sowohl in Geweben, welche maßgeblich am Calciumhaushalt des Körpers beteiligt sind, wie der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Niere oder dem Ileum als auch in Geweben welche keine vorwiegende Beteiligung am Calciumhaushalt aufweisen, wie dem Hoden oder dem Gehirn, nachweisen (Brown *et al.*, 1993; Freichel *et al.*, 1996). Erfolgt eine Aktivierung dieses Rezeptors, beispielsweise in Folge einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration, so resultiert

hieraus eine über Phosphoinositid vermittelte Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher sowie folglich ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration (Brown *et al.*, 1993). Auch durch das polyvalente Kation Neomycin lässt sich eine Aktivierung des Rezeptors registrieren.

Da für das GPR107-Protein ebenso ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden kann, sollte auch das GPR107-Protein auf die Charakteristik eines solchen Calciumsensors untersucht werden. Zu erwähnen bleibt diesbezüglich jedoch, dass neben der Struktur, bestehend aus einem N-terminalen hydrophoben Signalpeptid, einem hierauf folgenden langen extrazellulären Proteinabschnitt, den hieran anschließenden sieben Transmembrandomänen, sowie einem intrazellulären C-Terminus (Brown *et al.*, 1993), das CaSR- und das GPR107-Protein lediglich eine sehr geringe Ähnlichkeit zueinander aufweisen. Zur Verdeutlichung sind in Abb. 65 die Kyte und Doolittle Hydropathieblots (Kyte and Doolittle, 1982) des CaSR- und des GPR107-Proteins im Vergleich dargestellt.

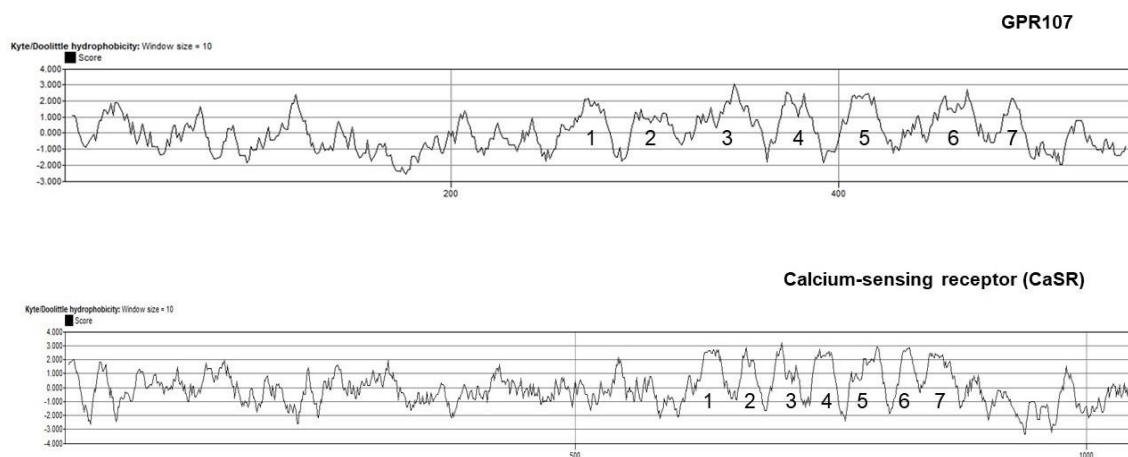


Abb. 65: Vergleich der Kyte und Doolittle Hydropathieblots des GPR107-Proteins und des Calcium-sensing receptor CaSR.

Auf der X-Achse sind die Aminosäuresequenzen des GPR107-Proteins, beziehungsweise des Calcium-sensing receptor CaSR aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren. C-terminal sind die sieben Transmembrandomänen des CaSR-Proteins dargestellt. Im Falle des GPR107-Proteins markieren die Zahlen ebenfalls sieben potentielle Transmembrandomänen, weshalb auch dieser den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet wird.

Abbildung: erstellt mit Accelrys Gene (Version 2.5, 2006, Accelrys Inc., San Diego, USA)

Die Untersuchung des GPR107-Proteins auf eine potentielle Funktion als Calciumsensor erfolgte durch die Stimulation mittels Neomycin. Verglichen wurden hierzu Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Simultan mit der Fura-2-Beladung im Voraus der Messungen erfolgte die Inkubation der Zellen in einer 0,5 mM oder 2,5 mM Calcium/B1-Lösung. Die

anschließenden Messungen erfolgten ebenfalls bei diesen extrazellulären Calciumkonzentrationen, wobei im Verlauf jeweils eine 0,5 mM Neomycin/B1-Lösung appliziert wurde.

In Abb. 66 sind die Messungen unter einer anfänglichen extrazellulären Calciumkonzentration von 0,5 mM, in Abb. 67 unter einer anfänglichen Calciumkonzentration von 2,5 mM dargestellt. Erwartungsgemäß lässt sich dabei zunächst entsprechend den bereits durchgeführten Untersuchungen in den GPR107 exprimierenden Zellen (rot) zu Beginn eine signifikant erhöhte basale Calciumkonzentration im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen (grau) registrieren. Im Gegensatz zu den Beobachtungen des CaSR-Proteins resultiert die anschließende Neomycin-Applikation in den GPR107 exprimierenden Zellen jedoch nicht in einem *Peak*-artigen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, sondern führt konträr sogar zu einer geringgradigen Verringerung. Dies lässt sich dabei gleichermaßen für die extrazelluläre Calciumkonzentration von 0,5 mM und 2,5 mM beobachten. Demnach ergeben sich im Rahmen dieser Untersuchung keine Hinweise auf eine Stimulierbarkeit des GPR107-Proteins durch Neomycin sowie folglich keine Anhaltspunkte für eine potentielle Funktionsweise des GPR107-Proteins als Calciumsensor.

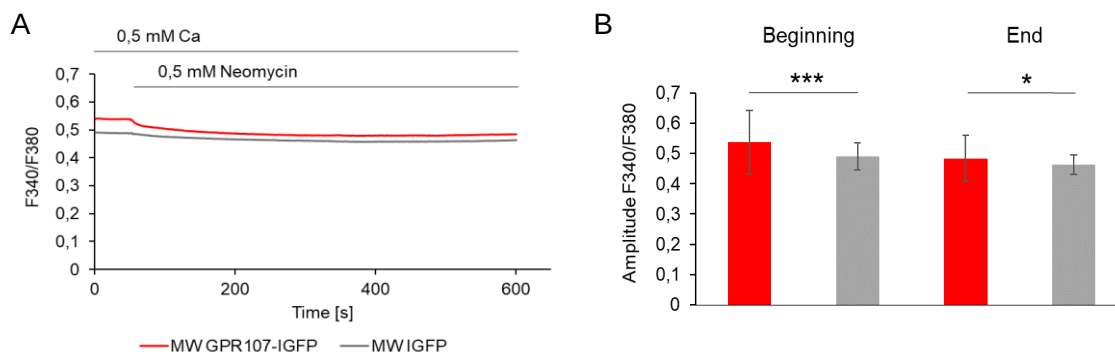


Abb. 66: Neomycin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen (n=93/ N=3, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=77/ N=3, grau) nach voriger 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium (0,5 mM) und während extrazellulärer Zugabe von Neomycin (0,5 mM). B: Statistische Auswertung der Amplituden zu Beginn und am Ende der Messungen. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich zu Beginn ein mittlerer Wert von 0,54 +/- 0,10 und am Ende ein mittlerer Wert von 0,48 +/- 0,08. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich zu Beginn ein mittlerer Wert von 0,49 +/- 0,05 und am Ende ein mittlerer Wert von 0,46 +/- 0,03. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt zu Beginn p = 0,0003 und am Ende p = 0,0291.

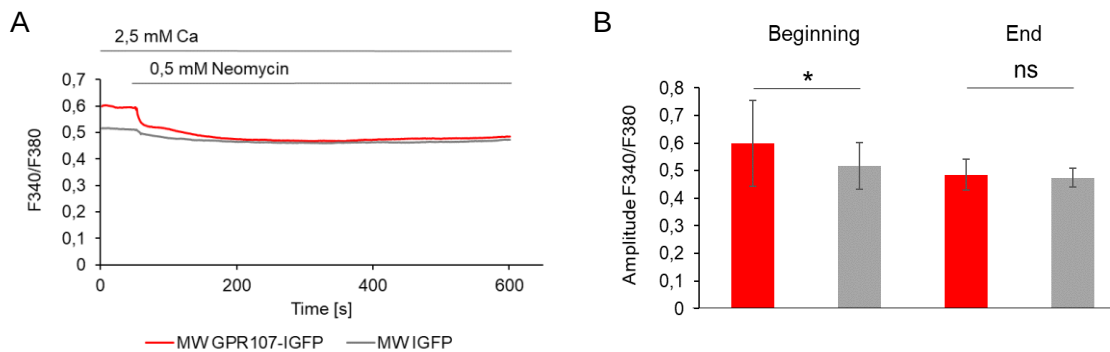


Abb. 67: Neomycin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme in Gegenwart physiologischer Calciumkonzentrationen nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen (n=30/ N=1, rot) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen (n=25/ N=1, grau) nach voriger 30-minütiger Prä-Inkubation mit Calcium (2,5 mM) und während extrazellulärer Zugabe von Neomycin (0,5 mM). B: Statistische Auswertung der Amplituden zu Beginn und am Ende der Messungen. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen zeigt sich zu Beginn ein mittlerer Wert von 0,60 +/- 0,16 und am Ende ein mittlerer Wert von 0,49 +/- 0,06. Für IGFP transfizierte Kontrollzellen zeigt sich zu Beginn ein mittlerer Wert von 0,52 +/- 0,09 und am Ende ein mittlerer Wert von 0,47 +/- 0,03. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP und den IGFP transfizierten Zellen beträgt zu Beginn $p = 0,0229$ und am Ende $p = 0,3612$.

4.23 Die Interaktion des GPR107-Proteins mit Neuronostatin

Sowohl für den G-Protein gekoppelten Rezeptor 107 als auch für den G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 konnten bisher keine Liganden identifiziert werden, sodass diese dementsprechend den sogenannten *orphan* G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden. Mit dem aus 13 Aminosäuren bestehenden sowie C-terminal amidierten Peptidhormon Neuronostatin (Samson *et al.*, 2008) rückt jedoch ein interessanter potentieller Ligand des GPR107-Proteins in den Fokus. Dieses induziert in verschiedenen Geweben sehr unterschiedliche Wirkungen und beeinflusst hierdurch sowohl den Metabolismus als auch die kardiovaskuläre Regulation. Das GPR107-Protein lässt sich dabei in allen Geweben nachweisen, in welchen auch Neuronostatin-vermittelte Effekte registriert werden können (Yosten *et al.*, 2012). Mehrfach konnte das GPR107-Protein hierbei als Voraussetzung für eine vollständige Wirkungsentfaltung des Neuronostatins identifiziert werden (Elrick *et al.*, 2015; Jasaszewski *et al.*, 2021; Yosten *et al.*, 2012). Ein Fehlen des GPR107-Proteins war in diesen Fällen maßgeblich mit einer verringerten beziehungsweise teilweise sogar gänzlich aufgehobenen Wirkung des Neuronostatins assoziiert. Aufgrund dieser Hinweise auf eine potentielle Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein sollte im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss dieses Peptidhormons auf die bisher festgestellten Effekte des GPR107-Proteins in Bezug auf die zelluläre Calciumhomöostase analysiert werden.

Hierfür erfolgte zunächst die Untersuchung des Einflusses von Neuronostatin auf den bei GPR107 exprimierenden Zellen zu beobachtenden erhöhten Calciumeinstrom in die

Zellen. Verglichen wurden dabei Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Des Weiteren erfolgten die Messungen für beide Konstrukte sowohl mit als auch ohne den Einfluss des Neuronostatins. Um dabei einerseits einen unmittelbar einsetzenden Effekt des Neuronostatins, andererseits jedoch ebenso einen verzögerten, beispielsweise über Genexpression vermittelten Effekt, identifizieren zu können, erfolgten die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Für die Beurteilung eines sich direkt auswirkenden Effekts wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung für 40 Minuten in einer 100 nM Neuronostatin/B1-Lösung inkubiert. Für die Betrachtung eines, potentiell durch modifizierte Genexpression hervorgerufenen, verzögert einsetzenden Effekts hingegen erfolgte bereits 24 Stunden im Voraus der Messung die Neuronostatin-Inkubation. Während der Messungen wurde jeweils eine 2,5 mM Calcium/B1-Lösung appliziert.

Abb. 68 zeigt die Messkurven nach lediglich 40-minütiger Inkubation der Zellen mit Neuronostatin, in Abb. 69 sind die Ergebnisse nach 24-stündiger Inkubation dargestellt. Erwartungsgemäß lässt sich hierbei für beide Inkubationszeiträume zunächst ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in GPR107 exprimierende Zellen gegenüber den GFP-Kontrollzellen registrieren. Vergleicht man hierbei jedoch die GPR107 exprimierenden Zellen mit (orange) und ohne (rot) Einfluss des Neuronostatins miteinander, so ergibt sich hierfür weder nach 40 Minuten noch nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied bezüglich des Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration nach Applikation der Calciumlösung. Ebenso weisen die Messungen der GFP-Kontrollzellen mit (blau) beziehungsweise ohne (grau) Einfluss des Neuronostatins zu beiden Zeitpunkten keine signifikante Differenz der Anstiegshöhe der intrazellulären Calciumkonzentration auf. Zusammengefasst führt die Anwesenheit des Neuronostatins dementsprechend weder zu einer signifikanten Verstärkung noch zu einer Verringerung des mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden verstärkten Calciumeinstroms in die Zelle, wodurch sich kein Hinweis auf eine diesbezügliche Interaktion des GPR107-Proteins mit dem Neuronostatin ergibt.

Ergänzend wurde darüber hinaus die Auswirkung des Neuronostatins auf die bei Expression des GPR107-Proteins zu beobachtende verringerte Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher untersucht. Hierzu wurden wiederum Zellen verglichen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt oder lediglich mit dem IGFP-Vektor transfiziert worden waren. Dem zuvor beschriebenen Experiment entsprechend erfolgte sowohl für die GPR107 exprimierenden Zellen als auch für die GFP-Kontrollzellen die Messung mit sowie ohne den Einfluss des Neuronostatins. Im Falle der Untersuchungen unter Einfluss des Neuronostatins wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung für 40 Minuten

in einer 100 nM Neuronostatin/B1-Lösung inkubiert. Während der Messungen erfolgte zunächst die Applikation einer 100 μ M Carbachol/B1-Lösung, im weiteren Verlauf die Zugabe einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 70 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Betrachtet man den anfänglichen, Carbachol-induzierten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, so zeigt sich zunächst erwartungsgemäß eine signifikant verringerte intrazelluläre Calciumfreisetzung GPR107 exprimierender Zellen gegenüber den GFP-Kontrollzellen. Vergleicht man dabei jene GPR107 exprimierenden Zellen, welche zuvor mit dem Neuronostatin inkubiert worden waren (orange), mit jenen ohne Einfluss dieses Peptidhormons (rot), so stellt sich die intrazelluläre Calciumfreisetzung durch das Neuronostatin nochmals geringfügig, jedoch signifikant, verringert dar. Im Gegensatz hierzu weisen die GFP-Kontrollzellen keinen signifikanten Unterschied zwischen Neuronostatin-behandelten (blau) und unbehandelten (grau) Zellen auf. Äquivalente Beobachtungen zeigen sich nach Applikation des Calciums. Auch hier resultiert die vorige Neuronostatin-Inkubation der GPR107 exprimierenden Zellen in einem gering, jedoch signifikant verringerten Calciumeinstrom von extrazellulär, während für die GFP-Kontrollzellen kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anstiegs der Calciumkonzentration zwischen Neuronostatin-behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden kann. Anzumerken bleibt jedoch, dass es sich sowohl bei der verringerten intrazellulären Calciumfreisetzung als auch bei dem anschließend verringerten Calciumeinstrom in die Zellen um lediglich sehr geringe Auswirkungen des Neuronostatins auf die Effekte des GPR107-Proteins handelt, wodurch der Rückschluss auf eine zugrundeliegende potentielle Interaktion dieser beiden Proteine nur vage möglich ist.

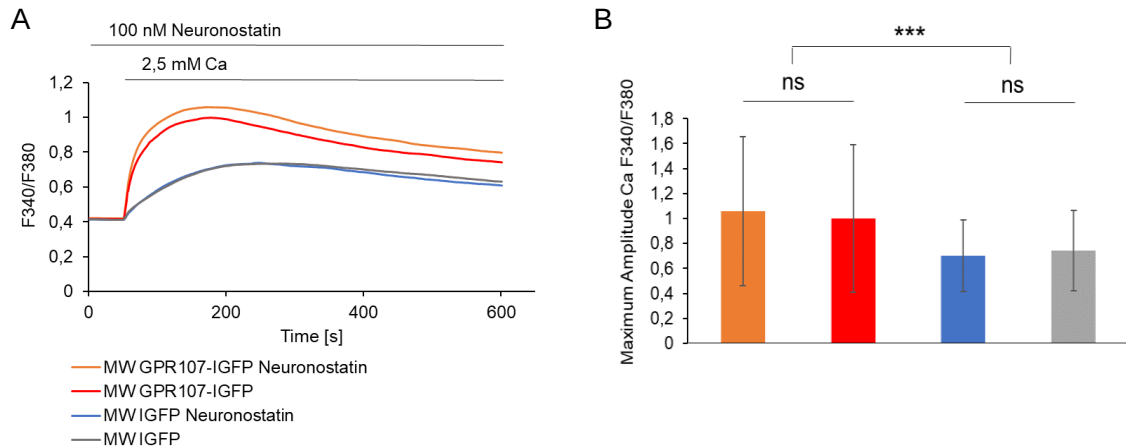


Abb. 68: Neuronostatin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=245/ N=7, orange) und ohne (n=206/ N=7, rot) vorige 40-minütige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen mit (n=105/ N=3, blau) und ohne (n=322/ N=8, grau) vorige 40-minütige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierten Zellen zeigt sich mit Neuronostatin ein mittleres Maximum von $1,06 \pm 0,60$ und ohne Neuronostatin ein mittleres Maximum von $1,00 \pm 0,59$. Für IGFP transfizierten Kontrollzellen zeigt sich mit Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,70 \pm 0,29$ und ohne Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,74 \pm 0,32$. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt $p > 0,05$, der p-Wert zwischen den IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt ebenfalls $p > 0,05$.

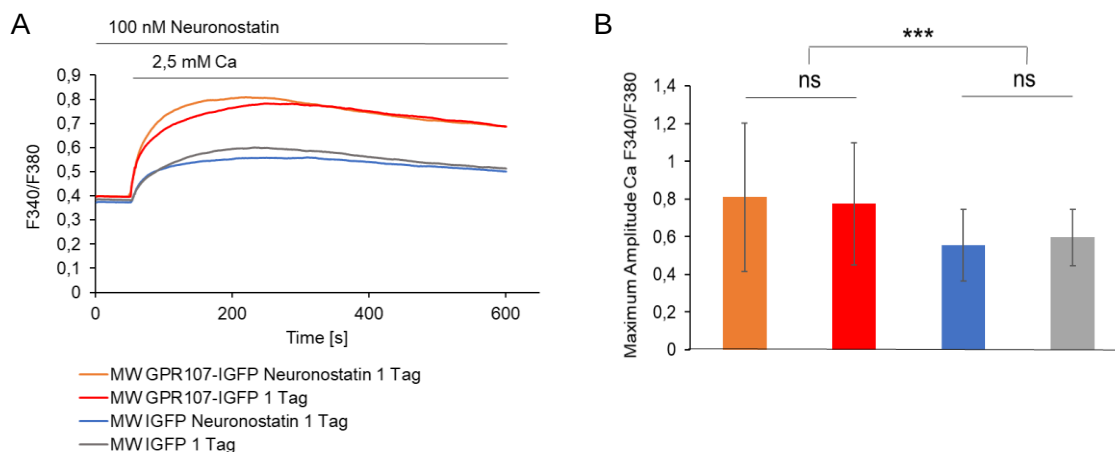


Abb. 69: Die 24-stündige Prä-Inkubation mit Neuronostatin beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=85/ N=3, orange) und ohne (n=74/ N=3, rot) vorige 24-stündige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen mit (n=70/ N=2, blau) und ohne (n=68/ N=2, grau) vorige 24-stündige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierten Zellen zeigt sich mit Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,81 \pm 0,39$ und ohne Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,77 \pm 0,32$. Für IGFP transfizierten Kontrollzellen zeigt sich mit Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,55 \pm 0,19$ und ohne Neuronostatin ein mittleres Maximum von $0,60 \pm 0,15$. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt $p > 0,05$, der p-Wert zwischen den IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt ebenfalls $p > 0,05$.

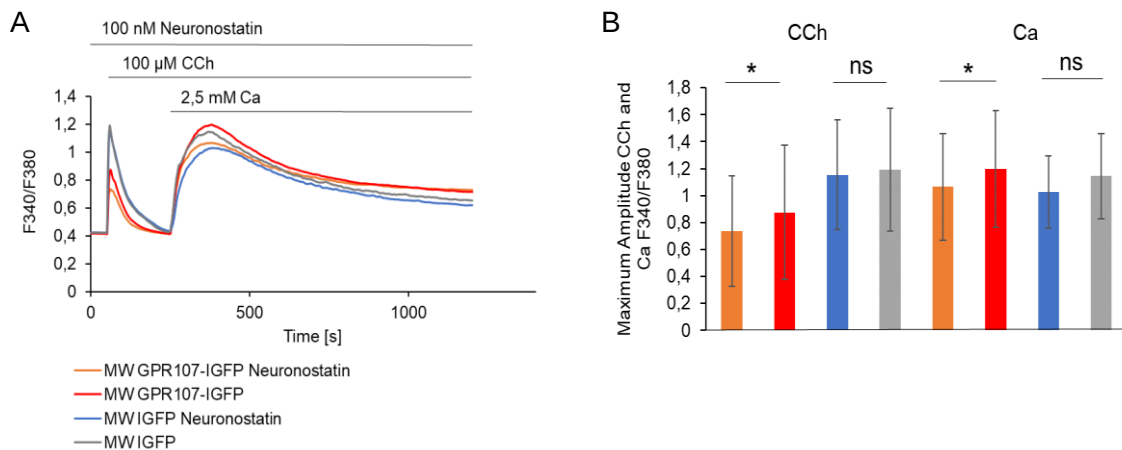


Abb. 70: Neuronostatin verstärkt die GPR107-vermittelte Verringerung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=149/ N=6, orange) und ohne (n=147/ N=6, rot) vorige 40-minütige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) im Vergleich zu IGFP transfizierten Kontrollzellen mit (n=144/ N=5, blau) und ohne (n=80/ N=3, grau) vorige 40-minütige Prä-Inkubation mit Neuronostatin (100 nM) während extrazellulärer Zugabe von Carbachol (100 μ M) und Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit Neuronostatin zeigt sich ein mittleres Maximum von $0,73 \pm 0,41$ nach Applikation des Carbachols und von $1,07 \pm 0,40$ nach Zugabe des Calciums. Für GPR107-IGFP transfizierten Zellen ohne Neuronostatin zeigt sich ein mittleres Maximum von $0,87 \pm 0,50$ nach Applikation des Carbachols und von $1,20 \pm 0,43$ nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierten Kontrollzellen mit Neuronostatin zeigt sich ein mittleres Maximum von $1,15 \pm 0,41$ nach Applikation des Carbachols und von $1,03 \pm 0,27$ nach Zugabe des Calciums. Für IGFP transfizierten Kontrollzellen ohne Neuronostatin zeigt sich ein mittleres Maximum von $1,19 \pm 0,45$ nach Applikation des Carbachols und von $1,15 \pm 0,32$ nach Zugabe des Calciums. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt $p < 0,05$ für den Carbachol-Peak und ebenfalls $p < 0,05$ für das Maximum nach Calciumzugabe. Der p-Wert zwischen den IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Neuronostatin beträgt $p > 0,05$ für den Carbachol-Peak und ebenfalls $p > 0,05$ für das Maximum nach Calciumzugabe.

4.24 Die Interaktion des GPR107-Proteins mit Glucocorticoiden

Für die weitere Untersuchung potentieller Liganden des G-Protein gekoppelten Rezeptors 107, sollte der Einfluss verschiedener Glucocorticoide auf den, mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden, erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen betrachtet werden. Neben ihrer in erster Linie genomisch-vermittelten Effekte, induziert durch die Bindung an intrazelluläre Glucocorticoidrezeptoren (Schmidt *and* Litwack, 1982), sind für viele Glucocorticoide darüber hinaus direkte, nicht-genomisch vermittelte Wirkungen bekannt (Panettieri *et al.*, 2018). Dabei weisen diese, ebenso wie die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigten Effekte des GPR107-Proteins, zum Teil einen wesentlichen Einfluss auf die Calciumhomöostase verschiedener Zelltypen auf. Je nach Zelltyp und Glucocorticoid kann die Applikation des Glucocorticoids dabei sowohl in einer Erhöhung als auch in einer Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration resultieren. Beispielsweise reagieren murine Sammelrohrzellen bereits kurze Zeit nach Stimulation mittels Dexamethason mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Harvey

and Higgins, 2000). Ein ähnlicher Effekt lässt sich für Corticosteron in spinalen Astrozyten beobachten (Zeng *et al.*, 2013). Hierbei zeigt sich unmittelbar in Folge der Applikation des Corticosterons ein *Peak*-artiger Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. In humanen bronchialen Epithelzellen resultiert die Applikation von Dexamethason darüber hinaus in einer signifikant verringerten ATP-induzierten Calciumfreisetzung aus Thapsigargin-sensitiven Speichern (Urbach *et al.*, 2006). Zusammenfassend zeigt sich dementsprechend zum einen eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und zum anderen eine verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern bei Zugabe bestimmter Glucocorticoide auf Zellen. Die genauen zellulären Signalwege, über welche diese Effekte vermittelt werden, sowie hieran möglicherweise beteiligte Rezeptoren sind weitgehend unbekannt.

Ein erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen von extrazellulär sowie eine verringerte Calciumfreisetzung aus Thapsigargin-sensitiven Speichern konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bei Expression des GPR107-Proteins beobachtet werden. Aufgrund dieser ähnlichen Auswirkungen stellt sich die Frage nach einer potentiellen Interaktion von Glucocorticoiden mit dem GPR107-Protein in Bezug auf die zelluläre Calciumhomöostase. Aus diesem Grund sollten im folgenden Experiment fünf Glucocorticoide als mögliche Liganden des GPR107-Proteins untersucht werden.

Beobachtet wurden hierfür die Auswirkungen der Glucocorticoide Beclomethason, Corticosteron, Dexamethason, Hydrocortison und Prednisolon21-Acetat auf Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren. Dabei erfolgte jeweils die Messung mit sowie ohne den Einfluss des jeweiligen Glucocorticoids. Bei Untersuchung unter Einfluss des Glucocorticoids wurden die Zellen hierfür unmittelbar vor der Messung für 10 Minuten in einer 10 μ M Glucocorticoid/B1-Lösung inkubiert. Während der Messung erfolgte jeweils die Applikation einer 2,5 mM Calcium/B1-Lösung.

In Abb. 71 bis Abb. 75 sind die Messungen der GPR107 exprimierenden Zellen mit (orange) sowie ohne (rot) den Einfluss des jeweiligen Glucocorticoids dargestellt. Dabei resultiert die Applikation der Calciumlösung sowohl in jenen Zellen, welche unter Anwesenheit des Glucocorticoids gemessen wurden als auch in den entsprechenden Kontrollzellen in einem erheblichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Allerdings scheint die Anwesenheit der Glucocorticoide dabei keinen wesentlichen Einfluss auf diesen Effekt auszuüben. Die Anstiegshöhe zeigt sich in den Zellen nach erfolgter Glucocorticoid-Inkubation nicht signifikant verändert im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen. Eine Ausnahme hierzu stellt lediglich die Untersuchung unter dem Einfluss von Beclomethason dar, bei welcher ein geringer, jedoch signifikant verstärkter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gegenüber der Messung ohne das Glucocorticoid registriert werden kann. Diese sehr geringe Differenz der F340/ F380-Ratio

von lediglich 0,1 lässt hierbei allerdings an einem tatsächlich zugrundeliegenden biologischen Mechanismus zweifeln.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Glucocorticoide zwar teilweise eine ähnliche Wirkung auf die zelluläre Calciumhomöostase wie das GPR107-Protein aufzuweisen scheinen, sich in den dargestellten Untersuchungen jedoch kein Hinweis auf eine zugrundeliegende Interaktion der Glucocorticoide mit dem GPR107-Protein ergibt. Dem entsprechend resultiert hierdurch kein Hinweis auf eine Funktion dieser Glucocorticoide als potentielle Liganden des GPR107-Proteins.

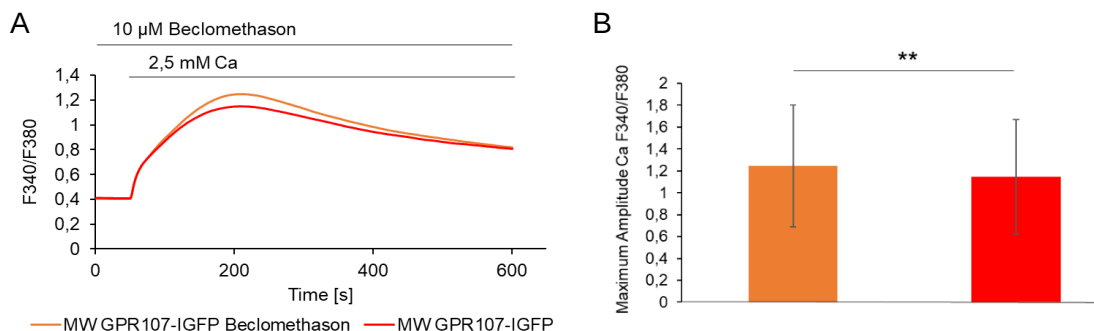


Abb. 71: Beclomethason verstärkt die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme geringfügig.
A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=399/ N=11, orange) und ohne (n=411/ N=11, rot) vorige 10-minütige Prä-Inkubation mit Beclomethason (10 µM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Beclomethason zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,25 +/- 0,56, ohne Beclomethason ein mittleres Maximum von 1,15 +/- 0,52. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Beclomethason beträgt p = 0,0097.

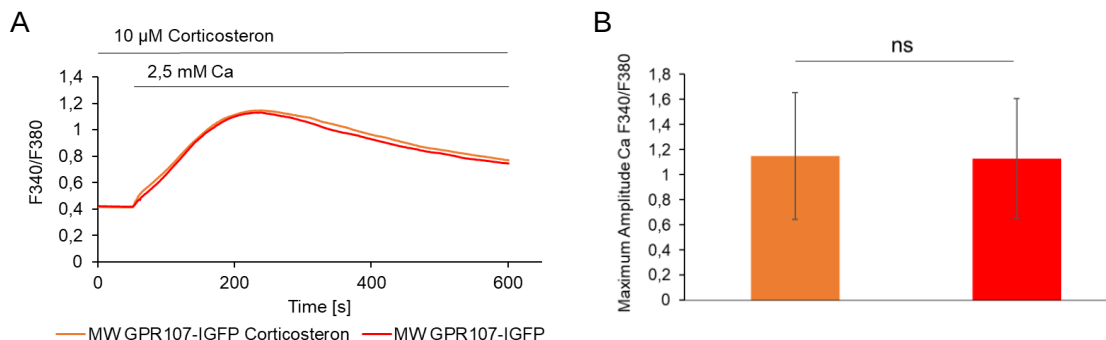


Abb. 72: Corticosteron beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.
A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=95/ N=3, orange) und ohne (n=99/ N=3, rot) vorige 10-minütige Prä-Inkubation mit Corticosteron (10 µM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Corticosteron zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,15 +/- 0,51, ohne Corticosteron ein mittleres Maximum von 1,13 +/- 0,48. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Corticosteron beträgt p = 0,7988.

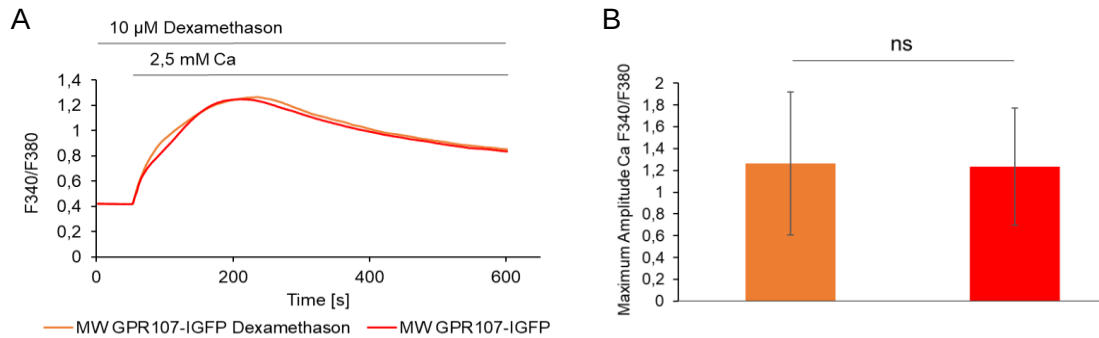


Abb. 73: Dexamethason beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=91/ N=3, orange) und ohne (n=144/ N=4, rot) vorige 10-minütige Prä-Inkubation mit Dexamethason (10 µM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Dexamethason zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,26 +/- 0,65, ohne Dexamethason ein mittleres Maximum von 1,23 +/- 0,54. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Dexamethason beträgt p = 0,7053.

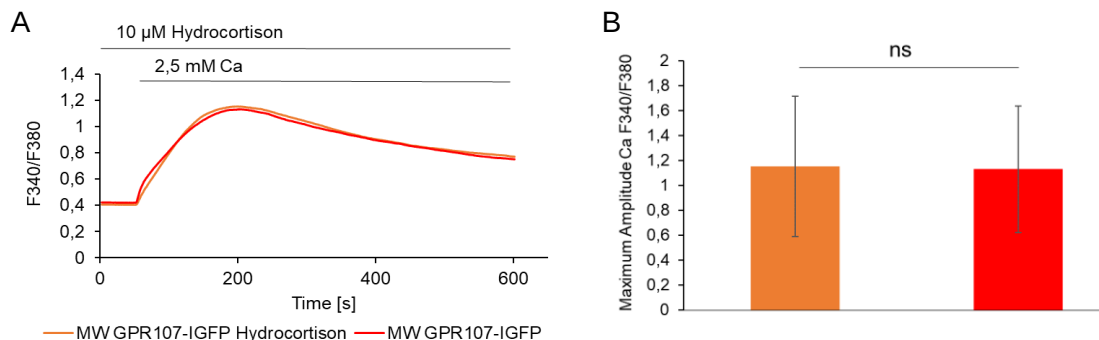


Abb. 74: Hydrocortison beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=113/ N=3, orange) und ohne (n=138/ N=4, rot) vorige 10-minütige Prä-Inkubation mit Hydrocortison (10 µM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Hydrocortison zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,15 +/- 0,56, ohne Hydrocortison ein mittleres Maximum von 1,13 +/- 0,51. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Hydrocortison beträgt p = 0,7233.

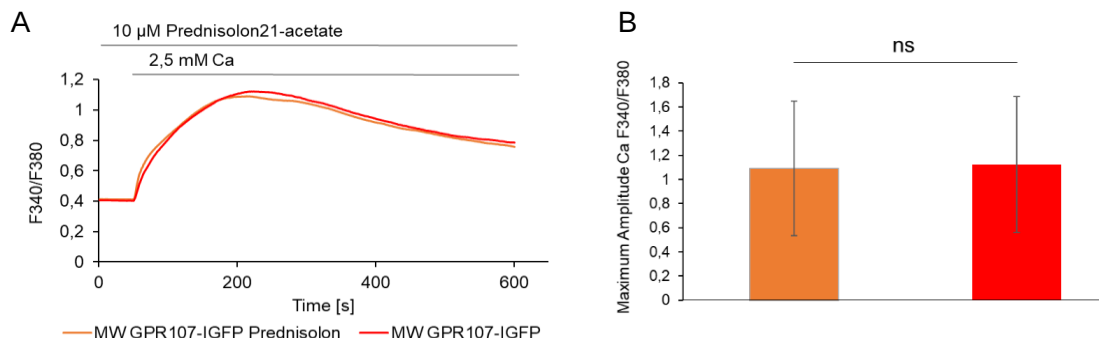


Abb. 75: Prednisolon beeinflusst die GPR107-vermittelte zelluläre Calciumaufnahme nicht.

A: Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen mit (n=80/ N=3, orange) und ohne (n=105/ N=3, rot) vorige 10-minütige Prä-Inkubation mit Prednisolon21-acetat (10 µM) und während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM). B: Statistische Auswertung der maximalen Amplituden. Für GPR107-IGFP transfizierte Zellen mit Prednisolon21-acetat zeigt sich ein mittleres Maximum von 1,09 +/- 0,56, ohne Prednisolon21-acetat ein mittleres Maximum von 1,12 +/- 0,56. Der p-Wert zwischen den GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit und ohne Prednisolon21-acetat beträgt p = 0,7187.

Ergänzend erfolgten darüber hinaus Messreihen, in welchen die jeweils 10 µM Glucocorticoid/B1-Lösungen erst im Anschluss an den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge der Applikation der 2,5 mM Calciumlösung zugegeben wurden. Eine vorige Inkubation der Zellen mit den Glucocorticoiden war dabei nicht erfolgt. Hierdurch sollte untersucht werden, inwieweit durch diese Glucocorticoide ein weiterer Calciumeinstrom in die Zellen resultiert. Betrachtet wurden dabei wiederum die fünf Glucocorticoide Beclomethason, Corticosteron, Dexamethason, Hydrocortison und Prednisolon21-Acetat und deren Auswirkung auf Zellen, welche zuvor mit dem GPR107-IGFP-Konstrukt transfiziert worden waren.

In Abb. 76 sind die Ergebnisse dieser Messreihen dargestellt. Äquivalent zu dem vorigen Experiment erfolgte die Messung sowohl mit (orange) als auch ohne (rot) den Einfluss der jeweiligen Glucocorticoide. Dabei lässt sich bei Applikation keines der fünf Glucocorticoide ein weiterer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration registrieren. Dementsprechend ergibt sich auch in dieser Untersuchung kein Hinweis auf eine Interaktion dieser Glucocorticoide mit dem GPR107-Protein.

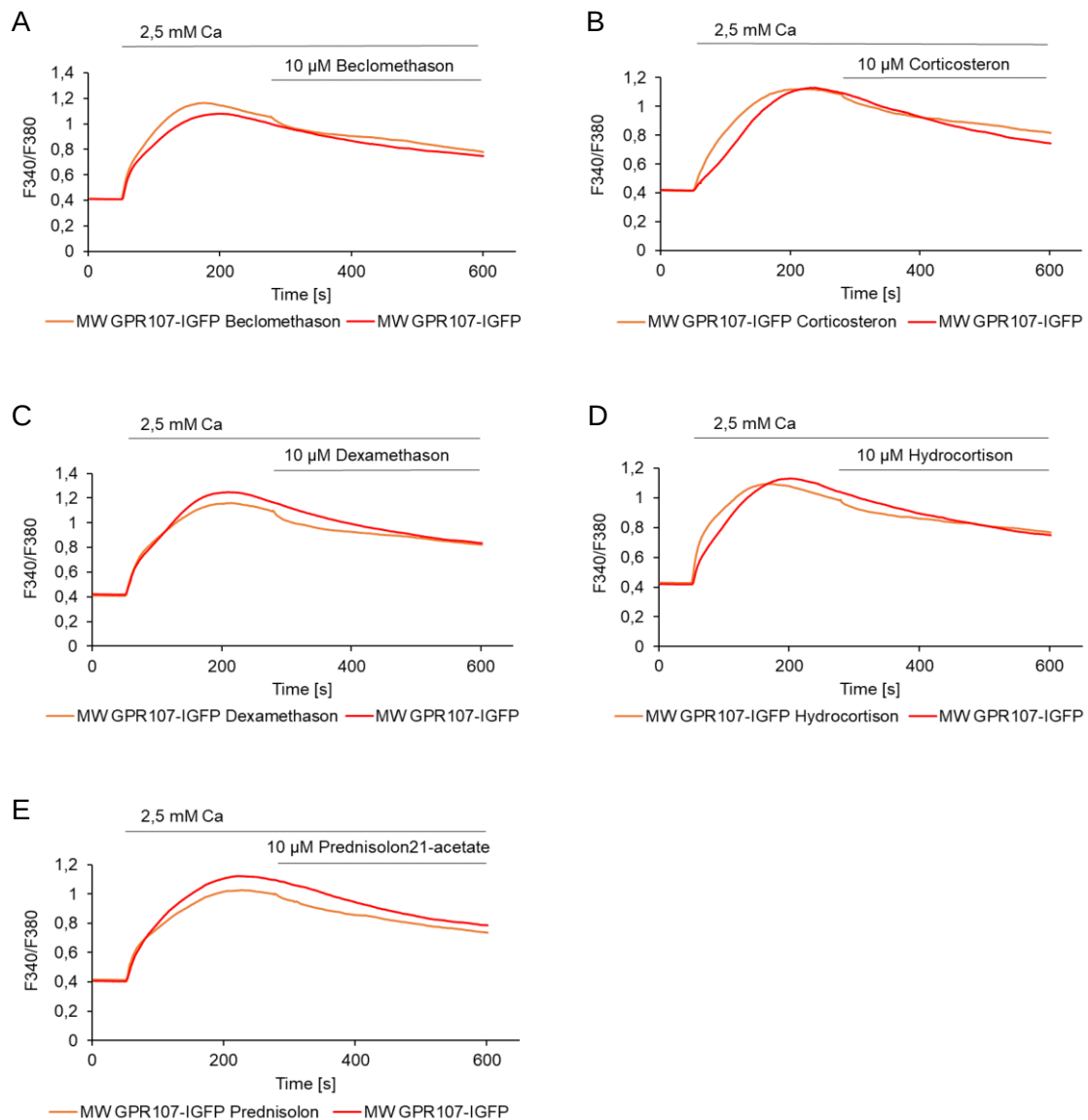


Abb. 76: Verschiedene Glucocorticoide zeigen keine zusätzliche Verstärkung der GPR107-vermittelten zellulären Calciumaufnahme.

Messkurven GPR107-IGFP transfizierter Zellen während extrazellulärer Zugabe von Calcium (2,5 mM) und eines Glucocorticoids (10 μM). A: Messung der GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit (n=98/ N=3, orange) und ohne (n=164/ N=4, rot) Beclomethason. B: Messung der GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit (n=84/ N=3, orange) und ohne (n=99/ N=3, rot) Corticosteron. C: Messung der GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit (n=64/ N=2, orange) und ohne (n=144/ N=4, rot) Dexamethason. D: Messung der GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit (n=116/ N=3, orange) und ohne (n=138/ N=4, rot) Hydrocortison. E: Messung der GPR107-IGFP transfizierten Zellen mit (n=73/ N=3, orange) und ohne (n=105/ N=3, rot) Prednisolon21-acetat.

5. Diskussion

5.1 Das GPR108-Protein wird durch eine Protease prozessiert

Bei dem G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 handelt es sich um ein Protein, welches sowohl in Bezug auf seine Struktur als auch hinsichtlich seiner Funktion weitgehend unerforscht ist. Auch eine potentielle Modifizierung des Proteins, beispielsweise eine Spaltung, wurde für diesen Rezeptor bisher nur wenig untersucht. Betrachtet man diesbezüglich hingegen das strukturverwandte GPR107-Protein, so konnte für dieses mittels eines Western Blots die Aminosäuresequenz Lysin-Serin-Lysin-Arginin (K-S-K-R), eine Variante des klassischen Furin-Schnittstellenmotivs Arginin-X-Lysin/Arginin-Arginin (R-X-K/R-R) (Molloy *et al.*, 1992), als Schnittstelle sowie eine hieraus resultierende Spaltung des GPR107-Proteins in zwei Proteinabschnitte identifiziert werden (Tafesse *et al.*, 2014 und Niloofar Johari, Masterarbeit 2019). Für einen entsprechenden Vergleich mit dem GPR108-Protein war im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung einer Spaltung des GPR108-Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot erfolgt. Die am ehesten äquivalente Sequenz zu dem Furin-Schnittstellenmotiv des GPR107-Proteins stellt dabei das Motiv Lysin-Prolin-Lysin-Serin (K-P-K-S) dar, welches ebenfalls unmittelbar vor den Transmembrandomänen lokalisiert ist. Anzumerken bleibt für dieses Motiv jedoch zum einen die durch das Programm ProP (Version 1.0, DTU Health Tech, Lyngby, Dänemark) mit 0,126 angegebene eher geringe Wahrscheinlichkeit als potentielle Schnittstelle des GPR108-Proteins, zum anderen die lediglich sehr geringe Ähnlichkeit dieser Sequenz mit dem klassischen Furin-Schnittstellenmotiv R-X-K/R-R (Molloy *et al.*, 1992).

Unter Annahme dieser Sequenz als potentielles Schnittstellenmotiv des GPR108-Proteins lässt sich in der Fluoreszenzmikroskopie, bei welcher die hierbei zu erwartenden Proteinabschnitte jeweils durch ein Fluoreszenzprotein markiert vorlagen, eine klar differente Lokalisation des N- und C-Terminus verzeichnen. Dementsprechend lässt sich eine Spaltung des GPR108-Proteins an einer Position zwischen diesen Fluoreszenzproteinen (Position 169 und C-terminal) vermuten. Durch Mutation der potentiellen Schnittstellensequenz KPKS zu vier Alaninen (A) und der hiermit einhergehenden Ladungsänderung sollte im Anschluss die Spaltung des Proteins an dieser Position möglichst gänzlich verhindert und so dieses Motiv als Schnittstelle weiter überprüft werden. Da sich in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung dieser GPR108-Mutante jedoch weiterhin eine klar differente Lokalisation der beiden Proteinabschnitte zeigt, konnte dieses KPKS-Motiv hierdurch nicht als eindeutige Schnittstellenposition bestätigt werden.

Anzumerken bleibt in Bezug auf dieses Resultat jedoch, dass hierbei eine potentielle Beeinflussung der Schnittstellensequenz durch das benachbarte RFP-Protein in dieser Mutante in Betracht gezogen werden muss, da dies bereits in ähnlicher Weise in den entsprechenden Untersuchungen des GPR107-Proteins registriert werden konnte (Vereina Nett, Bachelorarbeit 2020).

Da somit eine Bestätigung der KPKS-Sequenz als Schnittstelle des GPR108-Proteins ausblieb, war ergänzend die Untersuchung weiterer Mutanten dieses Proteins erfolgt. In diesen Mutanten lagen drei durch das Programm ProP prognostizierte potentielle Schnittstellen (an Position 92, 162 und 174 (KPKS-Motiv)) jeweils alleine sowie in allen hierbei möglichen Kombinationen mutiert vor. Aufgrund der in der Fluoreszenzmikroskopie jedoch ebenfalls nicht wesentlich differenten Lokalisation dieser Konstrukte gegenüber des Wildtyps ließen sich auch diese Sequenzen nicht als eindeutige Schnittstellenpositionen des GPR108-Proteins identifizieren.

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung einer Spaltung des GPR108-Proteins war diese darüber hinaus mittels eines Western Blots untersucht worden. Im Gegensatz zu den Resultaten einer bereits vorangegangenen Arbeit, in welcher sich keine Hinweise auf eine Spaltung des GPR108-Proteins ergeben hatten (Dudek *et al.*, 2020), zeigte sich im Rahmen der zunächst durchgeführten Untersuchung des GPR108-Wildtypproteins im Western Blot neben einer Bande, welche sich am ehesten dem Volllängenprotein zuordnen lässt, zudem eine kürzere Bande. Somit lässt sich hier entsprechend der mikroskopischen Beobachtung des GPR108-Proteins ebenfalls eine Spaltung des Proteins vermuten. Für eine genaue Lokalisierung dieser Schnittstelle innerhalb der Proteinsequenz erfolgte äquivalent zu der mikroskopischen Betrachtung auch im Western Blot die Untersuchung der verschiedenen GPR108-Mutanten, in welchen die oben genannten potentiellen Schnittstellen einzeln beziehungsweise in Kombination miteinander mutiert vorlagen. Hierbei ließ sich jedoch ebenfalls keine dieser Sequenzen als eindeutige Schnittstelle des GPR108-Proteins bestätigen. Es stellte sich jedoch in nahezu allen Mutanten eine auffällige Anreicherung des Proteins oberhalb der Volllängenbande dar. Dieses Resultat stellt sich dabei konform mit der Arbeit Dudeks dar, in welcher diesbezüglich eine mögliche Proteinaggregation aufgrund der hohen Hydrophobizität des N-Terminus sowie der Transmembrandomänen diskutiert worden war (Dudek *et al.*, 2020). Zusammenfassend scheint das GPR108-Protein dementsprechend äquivalent zu dem strukturverwandten GPR107-Protein gespalten zu werden, eine spezifische Sequenz innerhalb des GPR108-Proteins, welche dieser Spaltung zugrunde liegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht identifiziert werden.

5.2 Die intrazelluläre Lokalisation des GPR108-Proteins

Nachdem sich im Rahmen dieser Arbeit für den G-Protein gekoppelten Rezeptor 108 sowohl im Western Blot als auch in der Fluoreszenzmikroskopie Hinweise auf eine Spaltung des Proteins ergeben hatten, waren die potentiell resultierenden Proteinabschnitte separat auf ihre intrazelluläre Lokalisation untersucht worden.

Bei Betrachtung des N-terminalen GPR108-Proteins konnte dabei zunächst eine erheblich differierende Lokalisation dieses Proteinabschnitts in Abhängigkeit von dem gleichzeitigen Vorhandensein des C-Terminus beobachtet werden. Bei Expression der gesamten GPR108-Proteinsequenz zeigt sich für den N-terminalen Proteinabschnitt eine vorwiegende Lokalisation in kleinen Vesikeln, wobei zum einen eine zentrale Akkumulation der Vesikel, zum anderen jedoch auch eine vermehrte Anreicherung dieser Vesikel in den Zellausläufern registriert werden kann. Im Gegensatz hierzu resultiert eine Expression des alleinigen N-Terminus bis zu dem am ehesten GPR107-äquivalenten Schnittstellenmotiv des GPR108-Proteins Lysin-Prolin-Lysin-Serin (K-P-K-S) und dementsprechender kompletter Deletion des C-terminalen Abschnitts in einer diffusen Lokalisation über die Zelle mit lediglich deutlicher Aussparung des Kernareals. Zudem lässt sich hierbei größtenteils eine feine netzartige Struktur des Proteins beobachten. Durch Koexpression beziehungsweise Färbung mit Markern für verschiedene Zellkompartimente konnte im Anschluss eine spezifischere Zuordnung der Lokalisation des N-Terminus zu Zellkompartimenten erzielt werden. Dabei zeigt sich ohne den C-Terminus eine überwiegende Lokalisation des N-terminalen GPR108-Proteinabschnitts im endoplasmatischen Retikulum, während sich bei Expression des gesamten Proteins zumindest teilweise eine Lokalisation im Golgi-Apparat nachweisen lässt. Diese Lokalisation des N-terminalen GPR108-Proteinabschnitts im Golgi-Apparat zeigt sich dabei konform zu bereits existierenden Forschungsergebnissen, welche ebenfalls eine überwiegende Lokalisation des GPR108-Proteins im Cis-Golgi-Apparat (Dong *et al.*, 2018) oder im Trans-Golgi-Apparat (Dudek *et al.*, 2020) identifizieren konnten. Des Weiteren zeigt sich diese Lokalisation äquivalent mit der Lokalisation des verwandten GPR107-Proteins, welches ebenfalls im Golgi-Apparat vermutet wird (Tafesse *et al.*, 2014 und Verena Nett, Bachelorarbeit 2020). Insbesondere die in den Zellfortsätzen lokalisierten Vesikel des N-terminalen GPR108-Proteinabschnitts konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch keinem spezifischen Zellkompartiment zugeordnet werden.

Die zu beobachtende Abhängigkeit der Lokalisation des N-Terminus von der simultanen Expression des C-Terminus lässt eine essentielle Funktion des C-Terminus in Bezug auf ein regelrechtes *Trafficking* des N-Terminus vermuten. So scheint der N-terminale GPR108-Proteinabschnitt bei alleiniger Expression nicht vom endoplasmatischen

Retikulum weiter in den Golgi-Apparat transportiert werden zu können, wodurch ein Verbleiben dieses Proteinabschnitts im endoplasmatischen Retikulum resultiert. Auch für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren konnte dieses Phänomen bereits in ähnlicher Weise beobachtet werden. So zeigt sich die Expression des C-Terminus des α_{2B} -Adrenorezeptors oder des AT1-Rezeptors ebenfalls als wesentliche Voraussetzung für den Transport dieser Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum in weitere Zellkompartimente (Duvernay *et al.*, 2004). Hierbei konnte die Sequenz F-X-X-X-X-X-L/I-L/I innerhalb des C-Terminus als entscheidendes Motiv für den Austritt der Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum identifiziert werden. Diese ER-Austrittssequenz weist dabei eine hohe Konservierung zwischen den C-Termini verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren auf, wobei auch der C-Terminus des GPR108-Proteins, genauso wie der des GPR107-Proteins, das Motiv F-X-X-X-X-X-L-L im Bereich der sechsten potentiellen Transmembrandomäne (Edgar, 2007) enthält. Äquivalent zu den Beobachtungen des α_{2B} -Adrenorezeptors sowie des AT1-Rezeptors, bei welchen unter fehlender Expression dieses Motivs innerhalb des C-Terminus ein Verbleiben des Proteins im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden konnte (Duvernay *et al.*, 2004), lässt sich somit auch für das GPR107- und das GPR108-Protein dieses Motiv als Voraussetzung für ein regelrechtes *Trafficking* des N-terminalen Proteins aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat und weitere Vesikel vermuten. Hierdurch ließe sich das Verbleiben des N-Terminus im endoplasmatischen Retikulum bei Deletion des C-Terminus erklären.

Auch für den C-Terminus des GPR108-Proteins war die Betrachtung der Lokalisation sowohl mit als auch ohne eine gleichzeitige Expression des N-Terminus erfolgt. Aufgrund der vorrangigen Funktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren, Informationen von extrazellulär über die Initiierung verschiedenster intrazellulärer Signalkaskaden in die Zelle weiter zu transportieren, lassen sich die Transmembrandomänen beinhaltenden C-Termini der meisten G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Zellmembran nachweisen. Für den C-Terminus des GPR108-Proteins zeigt sich jedoch bei Expression der gesamten GPR108-Proteinsequenz lediglich vereinzelt in sehr stark exprimierenden Zellen die für die Transmembrandomänen zu erwartende Lokalisation in der Zellmembran. Vorrangig zeigt sich hingegen eine Akkumulation dieses Proteinabschnitts in kleinen Vesikeln, welche über große Teile der Zelle verteilt vorliegen. Da sich die C-terminale Lokalisation des GPR108-Proteins bei alleiniger Expression des C-Terminus unter Deletion des N-terminalen Proteinabschnitts nicht wesentlich different gegenüber der Expression der gesamten Proteinsequenz darstellt, ergeben sich hierbei keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Lokalisation des C-Terminus durch den N-Terminus.

5.3 Mikroskopische Bestätigung der Schnittstellenposition des GPR107-Proteins

Äquivalent zu dem GPR108-Protein handelt es sich auch bei dem G-Protein gekoppelten Rezeptor 107 um ein Protein, welches lediglich aufgrund seiner prognostizierten Struktur mit sieben Transmembrandomänen der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet wird. Jedoch scheint sich für das GPR107-Protein die Lokalisation der Schnittstellensequenz mit einer Lysin-Serin-Lysin-Arginin-Sequenz (K-S-K-R) unmittelbar vor den Transmembrandomänen deutlich klarer darzustellen (Tafesse *et al.*, 2014). Dieses Motiv stellt dabei eine Modifikation des klassischen Furin-Schnittstellenmotivs Arginin-X-Lysin/Arginin-Arginin (R-X-K/R-R) dar (Molloy *et al.*, 1992), wobei eine Spaltung des GPR107-Proteins durch die Protease Furin zudem durch die Kolo-kalisation des GPR107-Proteins mit dieser Protease untermauert wird (Tafesse *et al.*, 2014). Der Nachweis einer Spaltung des GPR107-Proteins an dieser Position war dabei bisher lediglich mittels eines Western Blots erfolgt (Tafesse *et al.*, 2014 und Niloofar Johari, Masterarbeit 2019). Durch eine Mutante des GPR107-Proteins, bei welcher die beiden resultierenden Proteinabschnitte jeweils an ein Fluoreszenzprotein fusioniert vorlagen, konnte im Rahmen dieser Arbeit ergänzend eine mikroskopische Bestätigung dieser Schnittstellenposition erreicht werden. Entscheidend zeigte sich hierbei die Position der Fluoreszenzproteine innerhalb der Proteinsequenz, wobei mit einer möglichst distalen Position (das RFP-Protein unmittelbar hinter der Signalpeptid-Schnittstelle und das GFP-Protein C-terminal) die Beeinflussung der Schnittstelle durch die Fluoreszenzproteine möglichst geringgehalten werden konnte. Durch Mutation der Schnittstelle und hiermit einhergehender Modifikation der Ladung ließ sich eine Spaltung des Proteins an dieser Position weitgehend verhindern, sodass die Fluoreszenzproteine und hiermit die beiden Abschnitte des GPR107-Proteins in der Mikroskopie nahezu analog zueinander detektiert werden konnten. Dementsprechend lässt sich die KSKR-Sequenz unmittelbar vor den Transmembrandomänen hierdurch ergänzend auch fluoreszenzmikroskopisch als Schnittstelle des GPR107-Proteins bestätigen. Anzumerken bleibt, dass in dieser GPR107-Mutante das regelrechte *Trafficking* des GPR107-Proteins erheblich beeinträchtigt zu werden scheint. So lässt sich insbesondere die für das GPR107-Wildtypprotein festgestellte Lokalisation des C-terminalen Proteins in der Zellmembran (Niloofar Johari, Masterarbeit 2019) in dieser Mutante nicht mehr detektieren. Inwieweit dies durch die fehlende Spaltung oder möglicherweise auch eine potentielle Beeinflussung des Signalpeptids durch das RFP-Protein bedingt ist, bleibt dabei unklar.

5.4 Das GPR107-Protein erhöht den Calciumeinstrom in die Zelle, das GPR108-Protein nicht

Neben der Untersuchung einer Spaltung sowie der intrazellulären Lokalisation der resultierenden Proteinabschnitte war im Rahmen dieser Arbeit zudem eine funktionelle Untersuchung des GPR107- und GPR108-Proteins erfolgt, wobei in erster Linie deren Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase betrachtet worden war. Zunächst sollte dabei die Auswirkung einer Expression dieser beiden Proteine auf eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration und des hierdurch induzierten Calciumeinstroms über die Zellmembran untersucht werden. Dabei stellen sich die Messergebnisse bei Expression des GPR107- und des GPR108-Proteins deutlich different zueinander dar. Während unter der Expression des GPR107-Proteins ein signifikant stärkerer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Folge der Erhöhung des extrazellulären Calciums resultiert und das GPR107-Protein somit den Calciumeinstrom über die Membran deutlich zu verstärken scheint, zeigt die Expression des GPR108-Proteins keinen wesentlichen Einfluss auf den Calciumeinstrom in die Zelle.

Ergänzend war für diese Auswirkung des GPR107-Proteins auf den Calciumeinstrom eine mögliche Zuordnung zu einem Proteinabschnitt untersucht worden. Bei separater Betrachtung des N- beziehungsweise des C-Terminus des GPR107-Proteins ließ sich dabei eine klare Zuordnung zu dem C-terminalen Proteinabschnitt treffen. Während sich der Calciumeinstrom unter alleiniger Expression des N-Terminus nicht signifikant different gegenüber den Kontrollzellen darstellt, ist unter alleiniger Expression des C-Terminus ein sogar nochmals etwas verstärkter Calciumeinstrom in Folge der Erhöhung des extrazellulären Calciums zu verzeichnen. Dieser verstärkte Effekt des alleinigen C-Terminus gegenüber der Expression des gesamten Proteins könnte dabei beispielsweise auf eine durch die Überexpression bedingte unzureichende Spaltung des Volllängenproteins und eine hierdurch geringere Menge an gespaltenen C-Termini zurückzuführen sein.

Im weiteren Verlauf war im Rahmen dieser Arbeit zudem untersucht worden, inwieweit die Spaltung des GPR107-Proteins eine essentielle Voraussetzung für den hier festgestellten erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle darstellt. Hierfür wurde eine GPR107-Mutante betrachtet, bei welcher das Schnittstellenmotiv KSKR unmittelbar vor den Transmembrandomänen zu vier Alaninen (A) und hiermit zu einer neutralen Ladung mutiert vorlag. Hierdurch sollte eine Spaltung des Proteins an dieser Sequenz möglichst gänzlich verhindert werden. Unter Expression dieser GPR107-Mutante zeigt sich der Calciumeinstrom nach Erhöhung des extrazellulären Calciums jedoch nicht wesentlich different gegenüber dem GPR107-Wildtypprotein, sodass eine Spaltung des Proteins für

diesen Effekt keine wesentliche Voraussetzung darzustellen scheint. Dass die Spaltung des Proteins keine essentielle Voraussetzung für eine Wirkungsentfaltung des GPR107-Proteins darstellt, hatte dabei auch eine vorangegangene Untersuchung gezeigt, in welcher der Einfluss des GPR107-Proteins auf die Intoxikation der Zellen mit dem Pseudomonas-Toxin näher beleuchtet worden war (Tafesse *et al.*, 2014). Auch hier hatte sich die Wirkung des GPR107-Proteins unter Verhinderung der Spaltung nicht wesentlich differiert dargestellt. Allerdings konnte Tafesse *et al.* in dieser Untersuchung die posttranslationale Ausbildung einer Cysteinbrücke zwischen dem resultierenden N- und C-Terminus als essentielle Voraussetzung einer vollständigen Wirkungsentfaltung des GPR107-Proteins identifizieren. Dementgegen konnte im Rahmen dieser Arbeit die Erhöhung des Calciueinstroms in die Zelle durch das GPR107-Protein ebenso unter alleiniger Expression des C-terminalen Proteins registriert werden, sodass hier die posttranslationale Ausbildung der Cysteinbrücke sowie die Expression des N-Terminus keine Voraussetzungen für eine Wirkungsentfaltung des GPR107-Proteins darzustellen scheinen.

Eine signifikante und erhebliche Einschränkung des mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden erhöhten Calciueinstroms in die Zelle zeigte im weiteren Verlauf jedoch eine Mutante des GPR107-Proteins, in welcher neben der zu vier Alaninen (A) mutierten Schnittstelle außerdem unmittelbar hinter dem Signalpeptid eine RFP-cDNA einkloniert vorlag. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung dieser Mutante lässt sich dabei zunächst eine deutlich differente intrazelluläre Lokalisation verzeichnen (Kapitel 5.3). Insbesondere die für das GPR107-Wildtypprotein festgestellte Lokalisation des C-terminalen Proteins in der Zellmembran (Nilloofar Johari, Masterarbeit 2019) lässt sich hierbei nicht mehr detektieren, sodass sich eine erhebliche Störung des regelrechten *Traffickings* des GPR107-Proteins vermuten lässt. In der funktionellen Untersuchung dieser Mutante des GPR107-Proteins präsentiert sich der Calciueinstrom in die Zellen nahezu identisch im Vergleich zu GFP-Kontrollzellen, sodass es durch diese Mutationen zu einer signifikanten Verringerung der GPR107-vermittelten Verstärkung des Calciueinstroms zu kommen scheint. Möglicherweise spiegelt sich hier die mikroskopisch sichtbare geringere Membranfärbung dieses Fusionskonstruktes wider.

5.5 Die Proteine GPR107 und GPR108 verringern den Füllungs- zustand intrazellulärer Calciumspeicher

Im Rahmen weiterer funktioneller Untersuchungen war in dieser Arbeit neben dem Einfluss auf den Calciumeinstrom in die Zelle auch die Auswirkung des GPR107- sowie des GPR108-Proteins auf die Carbachol-induzierte Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum betrachtet worden. Hierbei resultiert sowohl die Expression des GPR107- als auch die Expression des GPR108-Proteins in einer signifikant verringerten Freisetzung des Calciums aus diesen Carbachol-sensiblen Speichern, wobei das GPR108-Protein einen nochmals geringgradig stärkeren Effekt aufweist.

Anzumerken ist hierbei, dass sich dieser Effekt, wie auch schon bei Betrachtung des GPR107-Proteins in Bezug auf den Calciumeinstrom in die Zelle, ohne eine vorausgegangene Stimulation der beiden Rezeptoren durch einen Liganden verzeichnen lässt. Somit ist hier von einer konstitutiven Aktivität des GPR107- und des GPR108-Proteins auszugehen. Hiermit konform war für das GPR107-Protein bereits im Rahmen einer Untersuchung eines *GPR107-Silencing* und dessen Auswirkung auf Tumoreigenschaften von Prostatakarzinomen eine konstitutive Aktivität dieses Rezeptors diskutiert worden (Saez-Martinez *et.al.*, 2020).

Im Gegensatz zu der signifikant verringerten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern ergaben sich bei Betrachtung des anschließenden Calciumeinstroms von extrazellulär deutlich differente Ergebnisse für das GPR107- und das GPR108-Protein. Induziert wurde dieser Calciumeinstrom dabei durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration, wobei aufgrund der vorigen Carbacholapplikation eine Betrachtung dieses Calciumeinstroms unter vorliegenden entleerten Calciumspeichern erfolgte. Der Calciumeinstrom stellt sich dabei in GPR107 exprimierenden Zellen deutlich ausgeprägter sowie nahezu identisch im Vergleich zu den Kontrollzellen dar, während GPR108 exprimierende Zellen einen signifikant geringeren Calciumeinstrom aufweisen. Dieser Beobachtung entsprechend hatte sich der Calciumeinstrom in die Zellen bereits ohne eine vorige Entleerung intrazellulärer Speicher in GPR107 exprimierenden Zellen signifikant erhöht gegenüber GPR108 exprimierenden Zellen dargestellt (Kapitel 5.4).

Nachdem in Bezug auf die Auswirkungen des GPR107- und des GPR108-Proteins auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung durch die Carbacholapplikation stets lediglich eine aktive Freisetzung des Calciums aus dem endoplasmatischen Retikulum untersucht worden war, war durch den SERCA-Inhibitor Thapsigargin im Rahmen dieser Arbeit ergänzend auch die Untersuchung der Auswirkung beider Proteine auf den passiven Calciumausstrom aus diesen Speichern erfolgt. Der nicht-kompetitive Inhibitor der endoplasmatischen Ca-ATPase (SERCA) Thapsigargin unterbindet dabei den aktiven

Transport des Calciums in das endoplasmatische Retikulum (Lytton *et al.*, 1991), wohingegen der Ausstrom des Calciums aus diesen Calciumspeichern aufgrund der hierfür verantwortlichen passiven Mechanismen unbeeinflusst bleibt. Äquivalent zu den Messungen unter der Carbachol-induzierten aktiven intrazellulären Freisetzung des Calciums zeigt sich auch der passive Calciumausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum sowie die hiermit einhergehende Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration bei Expression des GPR107- und GPR108-Proteins signifikant verringert gegenüber den Kontrollzellen. Somit zeigt sich sowohl die aktive als auch die passive Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern durch diese beiden Proteine signifikant verringert, sodass sich hier ein zugrundeliegender geringerer Füllungszustand dieser Speicher durch das GPR107- beziehungsweise das GPR108-Protein vermuten lässt.

Ergänzend war für das GPR107-Protein ein potentieller Zusammenhang des hier zu beobachtenden geringeren Füllungszustands der intrazellulären Speicher und des bei Expression des GPR107-Proteins ebenfalls zu verzeichnenden erhöhten Calciumeinstroms von extrazellulär (Kapitel 5.4) untersucht worden. Beispielweise könnte hierbei der geringer gefüllte intrazelluläre Calciumspeicher als direkter Trigger membranständiger Calciumkanäle fungieren, wodurch mittels eines höheren Calciumeinstroms durch diese Kanäle eine ausreichende Speicherfüllung erreicht werden soll (Hoth *and* Penner, 1993). Diese endogenen *Calcium-release activated Calcium* (CRAC)-Kanäle werden dabei innerhalb weniger Sekunden nach Erschöpfung der intrazellulären Calciumspeicher aktiviert und führen in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration zu einem verstärkten Calciumeinstrom in die Zelle. Da sich jedoch unter dem Einfluss von BTP2, einem Inhibitor dieser endogenen CRAC-Kanäle, der Calciumeinstrom in die GPR107 exprimierenden Zellen nach Erhöhung des extrazellulären Calciums weiterhin signifikant erhöht gegenüber den Kontrollzellen darstellt, scheinen diese Kanäle nicht fundamental an diesem Effekt des GPR107-Proteins beteiligt zu sein. Dementsprechend ergibt sich hier kein Hinweis auf einen potentiellen Zusammenhang des bei Expression des GPR107-Proteins zu beobachtenden verringerten Füllungszustands intrazellulärer Calciumspeicher und des erhöhten Calciumeinstroms von extrazellulär.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit war darüber hinaus eine mögliche Zuordnung des Einflusses des GPR107- beziehungsweise des GPR108-Proteins auf den Füllungszustand intrazellulärer Calciumspeicher zu einem Abschnitt des jeweiligen Proteins untersucht worden. Durch separate Expression der N-beziehungsweise C-Termini der beiden Proteine konnte hierbei sowohl für die verringerte Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung als auch im Falle des GPR108-Proteins für den anschließend verringerten Calciumeinstrom in die Zellen eine klare Zuordnung zu den jeweiligen C-terminalen Proteinabschnitten, welche die Transmembranregion beinhalten, getroffen werden. Bei

Expression der C-Termini zeigt sich dabei ein entweder identischer oder im Falle des GPR108-Proteins sogar ein geringfügig verstärkter Effekt gegenüber der jeweiligen Voll-längenprotein-Expression. Äquivalent zu den Beobachtungen des C-terminalen GPR107-Proteinabschnitts in Bezug auf den erhöhten Calciumeinstrom in die Zellen (Kapitel 5.4) könnte der signifikant verstärkte Effekt bei alleiniger Expression des C-terminalen GPR108-Proteinabschnitts gegenüber dem gesamten GPR108-Protein hier ebenfalls auf eine durch die Überexpression bedingte unzureichende Spaltung des Voll-längenproteins und eine hierdurch geringere Menge an gespaltenen C-Termini zurück-zuführen sein. Die Expression der N-Termini des GPR107- beziehungsweise des GPR108-Proteins führen hingegen zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich mit den Kontrollzellen. Dementsprechend scheint sowohl der erhöhte Calciumeinstrom durch das GPR107-Protein (Kapitel 5.4) als auch die verringerte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern bei Expression des GPR107- und GPR108-Proteins klar durch den C-terminalen Abschnitt des jeweiligen Proteins verursacht zu werden, während die jeweiligen N-Termini hierauf keinerlei Einfluss auszuüben scheinen.

Für eine anschließend genauere Betrachtung des GPR108-Proteins und dessen Ein-fluss auf die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung war im Rahmen die-ser Arbeit zudem die Relevanz der potentiellen Schnittstelle des GPR108-Proteins Ly-sin-Prolin-Lysin-Serin (K-P-K-S) hinsichtlich dieses Effekts untersucht worden. Im Falle des GPR107-Proteins hatte sich diesbezüglich bereits, äquivalent zu den Untersuchen-gen hinsichtlich des erhöhten Calciumeinstroms in die Zelle (Kapitel 5.4), die Spaltung des Proteins als keine essentielle Voraussetzung für die mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende verringerte intrazelluläre Calciumfreisetzung gezeigt (Nilloofar Johari, Masterarbeit 2019). Auch für das GPR108-Protein erfolgte diese Unter-suchung anhand einer GPR108-Mutante, bei welcher das potentielle Schnittstellenmotiv KPKS zu vier Alaninen (A) und hiermit einhergehend zu einer neutralen Ladung mutiert vorlag. Entsprechend den Untersuchungen des GPR107-Proteins lässt sich auch für das GPR108-Protein unter dieser Schnittstellenmutation keine funktionelle Beeinträchtigung der Wirkungsentfaltung verzeichnen. Somit scheint diese potentielle Schnittstelle keine essentielle Voraussetzung für den Einfluss des GPR108-Proteins auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung darzustellen.

Abschließend wurde auch jene GPR107-Mutante, in welcher die Protease-Schnittstelle KSKR zu vier Alaninen (A) mutiert vorlag sowie zudem direkt nach der Signalpeptid-Schnittstelle eine RFP-cDNA einkloniert und C-terminal eine GFP-cDNA fusioniert wor-den war, in Bezug auf deren Einfluss auf die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calci-umfreisetzung untersucht. Im mikroskopischen Bild dieser GPR107-Mutante hatte sich gezeigt, dass sich die GFP-Fluoreszenz und hiermit verbunden das GPR107-Protein

nicht mehr in der Zellmembran detektieren lässt (Kapitel 5.3). Bezüglich des Calciumeinstroms in die Zelle kommt es bei Expression dieser GPR107-Mutante, wie bereits beschrieben, zu einer signifikanten Verringerung der GPR107-vermittelten Verstärkung des Calciumeinstroms (Kapitel 5.4). Im Gegensatz hierzu ergibt sich bei Betrachtung der Carbachol-induzierten intrazellulären Calciumfreisetzung kein signifikanter Unterschied zwischen dieser GPR107-Mutante und dem GPR107-Wildtypprotein. Somit scheint diese Mutante zwar den GPR107-vermittelten Calciumeinstrom in die Zelle zu beeinflussen, nicht jedoch die Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern.

5.6 Das GPR107-Protein erhöht die basale zelluläre Calciumkonzentration

Im Rahmen der funktionellen Untersuchung des GPR107-Proteins in Bezug auf dessen Auswirkung auf die intrazelluläre Calciumhomöostase war neben der Betrachtung des Einflusses auf den Calciumeinstrom in die Zelle und die intrazelluläre Calciumfreisetzung auch untersucht worden, inwieweit sich die Expression des GPR107-Proteins auf die basale intrazelluläre Calciumkonzentration auswirkt. Unter einer extrazellulären Calciumkonzentration von 2 mmol/l und einer hiermit etwa physiologischen Konzentration lässt sich dabei nach Einstellung eines konstanten intrazellulären Calciumniveaus in GPR107 exprimierenden Zellen eine signifikant höhere Calciumkonzentration beobachten. Somit scheint das GPR107-Protein auch die basale Calciumkonzentration zu beeinflussen. Nach Applikation von EDTA erreichen GPR107 transfizierte Zellen das gleiche Calciumlevel wie entsprechende Kontrollzellen.

5.7 Kein eindeutiger Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine GPR107 und GPR108

Aufgrund der deutlichen Strukturverwandtschaft der beiden Proteine GPR107 und GPR108 sowie lediglich nur sehr geringer struktureller Ähnlichkeit mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren war in dieser Arbeit auch eine mögliche Interaktion dieser beiden Proteine untersucht worden. Sowohl der Calciumeinstrom in die Zellen als auch die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung wurden hierfür in GPR107 und GPR108 kotransfizierten Zellen untersucht. Für den Calciumeinstrom in die Zellen ergibt

sich unter dieser Koexpression ein intermediärer Effekt im Vergleich zu einer separaten Expression der beiden Proteine, am ehesten als Resultat eines parallelen Vorliegens der Proteine in der Zelle. Bei Betrachtung der intrazellulären Calciumfreisetzung hingegen resultiert nach Carbacholapplikation derselbe Effekt wie bei alleiniger Expression des GPR108-Proteins, nach der anschließenden Calciumapplikation ein nahezu identischer Effekt wie bei alleiniger Expression des GPR107-Proteins. Somit ist in Bezug auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung eine Interaktion der beiden Proteine nicht auszuschließen, eindeutige Hinweise auf eine Interaktion der Rezeptoren GPR107 und GPR108 ergeben sich jedoch nicht.

5.8 Das GPR107-Protein als G-Protein gekoppelter Rezeptor

Bei den G-Protein gekoppelten Rezeptoren 107 und 108 handelt es sich um Proteine, welche lediglich aufgrund ihrer prognostizierten Struktur mit jeweils sieben potentiellen Transmembrandomänen der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden. Die exakten intrazellulären Signalkaskaden des GPR107- sowie des GPR108-Proteins sind bisher weitgehend unerforscht. Mit den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Auswirkungen des GPR107- und des GPR108-Proteins auf die intrazelluläre Calciumhomöostase waren daher ergänzend auch potentiell zugrundeliegende zellulärer Mechanismen dieser Effekte betrachtet worden. In erster Linie war diesbezügliche eine Untersuchung des GPR107-Proteins erfolgt.

Eine zunächst allgemeine Untersuchung eines möglichen zugrundeliegenden G-Protein gekoppelten Signalwegs erfolgte dabei mit Suramin, in dessen Anwesenheit der Austausch des G-Protein gebundenen GDPs gegen ein GTP und die hierdurch induzierte Aktivierung der $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins verhindert wird (Hohenegger *et al.*, 1998). Da dies gleichermaßen für G_s -, G_i - sowie in deutlich höheren Suraminkonzentrationen für G_q -Proteine beschrieben ist, wurde hierdurch eine erste Untersuchung der Beteiligung dieser G-Proteine an den aufgezeigten zellulären Auswirkungen des GPR107-Proteins ermöglicht. Aufgrund der hierunter unverändert zu beobachtenden Auswirkungen des GPR107-Proteins sowohl in Bezug auf den Calciumeinstrom von extrazellulär als auch auf die Carbachol-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung ergaben sich hierbei jedoch keine Hinweise auf die Beteiligung dieser G-Proteine an diesen Effekten des GPR107-Proteins.

Für eine erweiterte Betrachtung erfolgte darüber hinaus eine nochmals genauere und spezifischere Untersuchung einzelner G-Protein gekoppelter Signalkaskaden. Die nähere Betrachtung eines potentiellen G_s -Protein gekoppelten Signalwegs war dabei

bereits durch Niloofar Johari im Rahmen ihrer Masterarbeit (2019) erfolgt. Da sich hierbei die intrazelluläre cAMP-Konzentration unter Expression des GPR107-Proteins nicht signifikant erhöht gezeigt hatte, hatte sich hier kein Hinweis auf einen G_s -Protein vermittelten Signalweg des GPR107-Proteins ergeben.

Für die Betrachtung weiterer potentieller Signalkaskaden war im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit dem Phospholipase C-Inhibitor U73122 ein G_q -Protein gekoppelter Signalweg des GPR107-Proteins näher untersucht worden. Da sich der mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehende erhöhte Calciumeinstrom unter dem Einfluss dieses Phospholipase C-Inhibitors jedoch nicht signifikant verändert darstellt, ergibt sich hieraus kein Hinweis auf eine essentielle Beteiligung der Phospholipase C und eine Kopplung des GPR107-Proteins an die G_q -Protein vermittelte Signalkaskade.

Aufgrund dieser negativen Ergebnisse bezüglich eines G_q -Protein gekoppelten Signalwegs erfolgte weiterhin auch die nähere Betrachtung einer potentiell zugrundeliegenden G_i -Protein gekoppelten Signalkaskade. Unter der Annahme einer zumindest teilweise konstitutiven Aktivität des GPR107-Proteins, da dessen Auswirkungen auf den zellulären Calciumeinstrom sowie auf die intrazelluläre Calciumfreisetzung ohne eine vorherige Stimulation des Rezeptors mittels eines Liganden registriert werden können, erfolgte hierfür die Prüfung eines durch das GPR107-Protein dauerhaft aktivierten G_i -Proteins. Als *Readout* dieses aktivierten G_i -Proteins diente dabei der *Transient Receptor Potential* (TRP) Kanal TRPC4, für dessen vollständige Aktivierung die Stimulierung durch ein aktiviertes G_i -Protein eine essentielle Voraussetzung darstellt (Thakur *et al.*, 2016). Da eine eindeutige Aktivierung dieses Kanals hierbei ausblieb, resultiert aus diesen Untersuchungen ebenso kein Hinweis auf eine G_i -Protein gekoppelte Signalkaskade des GPR107-Proteins. Dieses Ergebnis stellte sich dabei gleichermaßen für eine Koexpression des GPR108-Proteins mit dem TRPC4-Kanal dar.

Anzumerken bleibt jedoch eine auffällige Calciumendkonzentration bei Koexpression des GPR107-Proteins und des TRPC4-Kanals. Lediglich bei gleichzeitiger Expression dieser beiden Proteine resultiert eine signifikant erhöhte Calciumendkonzentration im Vergleich zu Kontrollzellen, wobei eine Abhängigkeit dieser Auswirkung von der im Rahmen der TRPC4-Kanal-Stimulation erfolgten Carbacholapplikation ausgeschlossen werden konnte. Somit lässt sich hier ein potentieller *Crosstalk* des GPR107-Proteins mit dem nicht-selektiven Calciumkanal TRPC4 (Plant *and* Schaefer, 2003) vermuten. Für ein genaueres Verständnis der hierbei zugrundeliegenden zellulären Mechanismen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ergeben sich somit im Rahmen dieser Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise auf eine cAMP-vermittelte Signalkaskade des GPR107-Proteins (Niloofar Johari, Masterarbeit 2019), eine konstitutive G_i -Aktivierung des GPR107-

beziehungsweise des GPR108-Proteins sowie keine Hinweise auf ein Agieren des GPR107-Proteins über die Phospholipase C. Konform stellt sich dies mit einer Arbeit dar, in welcher die Interaktion des Peptidhormons Neuronostatin mit dem GPR107-Protein untersucht worden war. Da sich das GPR107-Protein hier als essentielle Voraussetzung für einen durch Neuronostatin induzierten Anstieg der Phosphorylierung der Proteinkinase A hatte nachweisen lassen, war hier eine potentielle Wirkung des GPR107-Proteins über eine cAMP-unabhängige Aktivierung der Proteinkinase A diskutiert worden (Elrick *et al.*, 2015).

Neben der Untersuchung einzelner potentieller Signalkaskaden war im Rahmen dieser Arbeit zudem eine genauere Betrachtung der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle des GPR107-Proteins erfolgt. Mittels Mutation sowie hiermit einhergehender Modifikation der positiven Ladung im Bereich des dritten intrazellulären *Loops* wurde die Bedeutung dieser potentiellen Bindungsstelle in Bezug auf die bei Expression des GPR107-Proteins identifizierten Effekte auf die intrazelluläre Calciumhomöostase geprüft. Entgegen der Vermutungen resultiert durch diese Modifikation jedoch sowohl hinsichtlich des Calciumeinstroms in Zellen als auch bezüglich der Carbachol-induzierten intrazellulären Calciumfreisetzung keine Verringerung dieser Effekte, sondern im Gegensatz sogar eine signifikante Verstärkung. Dementsprechend scheint diese Modifikation der potentiellen G-Protein-Bindungsstelle zu keiner Verhinderung der Bindung des G-Proteins beziehungsweise zu keiner Einschränkung der intrazellulären Signalmechanismen des GPR107-Proteins zu führen. Aufgrund der signifikant verstärkten Effekte des GPR107-Proteins scheint diese Aminosäuresequenz innerhalb des dritten intrazellulären *Loops* die Wirkung des GPR107-Proteins jedoch wesentlich zu beeinflussen. Für ein Verständnis der genauen Mechanismen, welche dieser Wirkungsverstärkung des GPR107-Proteins in Bezug auf die intrazelluläre Calciumhomöostase zugrundeliegen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Da bislang keine eindeutigen Hinweise auf einen G-Protein gekoppelten Signalweg des GPR107-Proteins identifiziert werden konnten, erfolgt die Zuordnung dieses Rezeptors zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren lediglich aufgrund der prognostizierten Struktur mit sieben Transmembrandomänen. Da die exakte Anzahl an Transmembrandomänen dabei bisher ebenfalls nicht eindeutig bestimmt werden konnte, war im Rahmen dieser Arbeit neben der Untersuchung einzelner G-Protein gekoppelter intrazellulärer Signalkaskaden auch eine potentielle Charakteristik des GPR107-Proteins als Ionenkanal betrachtet worden. Unter Mutation der möglichen Porenregion des GPR107-Proteins lässt sich hierbei jedoch kein Einfluss auf den mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle beobachten.

Somit scheint es eher unwahrscheinlich, dass dieser erhöhte Calciumeinstrom auf eine Funktion dieses Proteins als Calciumkanal zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ergeben sich somit im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutigen Hinweise auf ein Agieren des GPR107-Proteins als G-Protein gekoppelter Rezeptor oder als Ionenkanal. Eine diesbezüglich gleichartige Vermutung geht aus einer Arbeit hervor, in welcher insbesondere die Struktur des TMEM87A-Proteins, einem Mitglied der sogenannten GOST (*GOLD-domain seven-transmembrane helix protein*)-Proteinfamilie, zu welcher auch das GPR107- sowie das GPR108-Protein gezählt werden, untersucht wurde (Hoel *et al.*, 2022). Diese kleine Proteinfamilie ist über einen gemeinsamen strukturellen Aufbau, bestehend aus einer GOLD (*golgi-dynamics*)-Domäne und sieben Transmembrandomänen, definiert. Innerhalb der Gruppe besteht darüber hinaus eine evolutionäre Verwandtschaft der vier Proteine TMEM87A, TMEM87B, GPR107 und GPR108 (Edgar, 2007). Im Rahmen der oben genannten Arbeit war das TMEM87A-Protein zum einen auf eine Funktion als Ionenkanal, zum anderen auch auf eine, aufgrund der sieben Transmembrandomänen vermuteten, Funktion als G-Protein gekoppelter Rezeptor untersucht worden, wobei sich in beiden Fällen keine entsprechenden Hinweise ergaben (Hoel *et al.*, 2022). Eine Funktion als G-Protein gekoppelter Rezeptor war dabei insbesondere aufgrund der mittels *cryo-EM* aufgezeigten Struktur der zytosomatischen Helix 8, welche bei Muster-G-Protein gekoppelten Rezeptoren eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion mit dem entsprechenden G-Protein darstellt (De los Santos *et al.*, 2006), angezweifelt worden. Die Helix 8 stellt sich im TMEM87A-Protein strukturell deutlich verschieden zu anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und nicht kompatibel mit einer G-Protein-Interaktion dar (Hoel *et al.*, 2022). Beim Vergleich der Helix 8-Struktur der anderen GOST-Proteine hatte sich auch für alle anderen Proteine eine homologe Struktur und damit eine mit einer G-Protein-Bindung eher inkompatible Struktur gezeigt. Somit wurde, passend zu den Resultaten der Untersuchungen des GPR107-Proteins in dieser Arbeit, die Vermutung aufgestellt, dass alle GOST-Proteine und somit auch das GPR107- und das GPR108-Protein weder eine Funktion als Ionenkanal noch eine Funktion als G-Protein gekoppelter Rezeptor aufweisen.

5.9 Kein Hinweis auf eine Interaktion des GPR107-Proteins mit Glucocorticoiden oder Neomycin

Da sowohl für das GPR107- als auch für das GPR108-Protein bisher keine eindeutigen Liganden identifiziert werden konnten, werden diese beiden Rezeptoren der Gruppe der *orphan* G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugeordnet (Edgar, 2007). Aus diesem Grund war im Rahmen dieser Arbeit neben der Betrachtung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden des GPR107-Proteins auch die Untersuchung einiger potentieller Liganden für diesen Rezeptor erfolgt. Hierbei wurden aufgrund der erheblichen Einflüsse des GPR107-Proteins in Bezug auf den Calciueinstrom sowie die intrazelluläre Calciumfreisetzung insbesondere Liganden untersucht, für welche ebenfalls Einflüsse auf die intrazelluläre Calciumhomöostase bekannt sind. Zunächst erfolgte hierbei die Betrachtung einer potentiellen Interaktion verschiedener Glucocorticoide mit dem GPR107-Protein. Neben ihrer in erster Linie genomisch-vermittelten Effekte, induziert durch die Bindung an intrazelluläre Glucocorticoidrezeptoren (Schmidt *and* Litwack, 1982), weisen diese darüber hinaus zumindest teilweise auch direkte, nicht-genomisch vermittelte Wirkungen auf (Panettieri *et al.*, 2018). In Bezug auf die intrazelluläre Calciumhomöostase lässt sich beispielsweise nach einer Stimulation mittels Dexamethason bereits nach kurzer Zeit ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in murinen Sammelrohrzellen registrieren (Harvey *and* Higgins, 2000). Ein ähnlicher Effekt stellt sich für Corticosteron in spinalen Astrozyten dar (Zeng *et al.*, 2013). Hinsichtlich der intrazellulären Calciumfreisetzung resultiert die Applikation von Dexamethason in humanen bronchialen Epithelzellen in einer signifikant verringerten ATP-induzierten Calciumfreisetzung aus Thapsigargin-sensitiven Speichern (Urbach *et al.*, 2006). Die genauen zellulären Signalwege, über welche diese Effekte jeweils vermittelt werden, sowie hieran möglicherweise beteiligte Rezeptoren sind dabei weitgehend unerforscht. Mittels einer Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit, bei welcher der Einfluss der fünf Glucocorticoide Beclomethason, Corticosteron, Dexamethason, Hydrocortison und Prednisolon21-Acetat auf den mit der Expression des GPR107-Proteins einhergehenden erhöhten Calciueinstrom betrachtet wurde, lässt sich jedoch keine eindeutige Beeinflussung des GPR107-Proteins durch diese Glucocorticoide verzeichnen. Somit ergibt sich hierdurch kein Hinweis darauf, dass diese Glucocorticoide als Liganden des GPR107-Proteins fungieren.

Da das GPR107-Protein in dieser Arbeit auch auf eine mögliche Charakteristik als Calciumsensor untersucht werden sollte, war des Weiteren das polyvalente Kation Neomycin als potentieller Ligand des GPR107-Proteins betrachtet worden. Neomycin stellt dabei einen Aktivator des *Calcium-sensing receptor* (CaSR) dar, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher durch seine Funktion als Calciumsensor an der zellulären

Reaktion auf eine veränderte extrazelluläre Calciumkonzentration beteiligt ist (Brown *et al.*, 1993). Erfolgt eine Aktivierung dieses Rezeptors, beispielsweise in Folge einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration, so resultiert hieraus eine über Phosphoinositid vermittelte Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher sowie folglich ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich jedoch nach Applikation von Neomycin auf GPR107 exprimierende Zellen in calciumhaltiger extrazellulärer Umgebung kein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verzeichnen. Dementsprechend ergibt sich hierdurch kein Hinweis auf eine Wirkung von Neomycin als Ligand des GPR107-Proteins oder eine dem erhöhten Calciumeinstrom in GPR107 exprimierende Zellen zugrundeliegende Charakteristik dieses Rezeptors als Calciumsensor.

5.10 Die Interaktion des GPR107-Proteins mit dem Peptidhormon Neuronostatin

Auch das aus 13 Aminosäuren bestehende Peptidhormon Neuronostatin rückt fortwährend als interessanter potentieller Ligand des GPR107-Proteins in den Fokus der aktuellen Forschung. Mehrfach konnte dabei die Expression des GPR107-Proteins als Voraussetzung für eine vollständige Wirkungsentfaltung dieses Peptidhormons nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte im Rahmen einer Untersuchung des Einflusses von Neuronostatin auf die Regulation des mittleren arteriellen Blutdrucks die Expression des GPR107-Proteins als Voraussetzung für eine Neuronostatin-induzierte Erhöhung dieses Blutdrucks identifiziert werden (Yosten *et al.*, 2012). Eine weitere Arbeit, in welcher die Wirkung von Neuronostatin auf α -Zellen des Pankreas betrachtet wurde, zeigt die Expression des GPR107-Proteins ebenfalls als essentiell für eine vollständige Wirkungsentfaltung des Peptidhormons (Elrick *et al.*, 2015). Die genauen Signalwege, über welche das Neuronostatin letztendlich wirksam wird, sind weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit war in erster Linie die funktionelle Untersuchung des GPR107-Proteins in Bezug auf dessen Einfluss auf die intrazelluläre Calciumhomöostase erfolgt, wobei vorrangig drei Effekte identifiziert werden konnten. Zunächst zeigt sich unter Expression des GPR107-Proteins ein signifikant erhöhter Calciumeinstrom in die Zellen nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration (Kapitel 5.4). Des Weiteren lässt sich unter Applikation von Carbachol und der hierdurch induzierten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch das GPR107-Protein ein signifikant verringerter Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration verzeichnen (Kapitel 5.5). Da diese verringerte Calciumfreisetzung ebenfalls unter Applikation des SERCA-Inhibitors

Thapsigargin und damit sowohl unter aktiver als auch unter passiver Freisetzung des Calciums aus den intrazellulären Speichern registriert werden kann, lässt sich hier ein ursächlicher geringerer Füllungszustand dieser Speicher bei Expression des GPR107-Proteins vermuten. Als dritten wesentlichen Effekt des GPR107-Proteins in Bezug auf die intrazelluläre Calciumhomöostase lässt sich eine signifikant erhöhte basale Calciumkonzentration in den Zellen registrieren (Kapitel 5.6). Die Beobachtung dieser Effekte ohne eine vorherige Stimulation des GPR107-Proteins mittels eines Liganden lässt dabei eine zumindest teilweise konstitutive Aktivität des Rezeptors vermuten.

Interessanterweise scheint auch das Peptidhormon Neuronostatin deutliche und teilweise sehr ähnliche Auswirkungen auf die intrazelluläre Calciumhomöostase aufzuweisen. Beispielsweise lässt sich in murinen Kardiomyozyten nach elektrischer Stimulation und hierdurch induzierter Calciumfreisetzung aus dem sarcoplasmatischen Retikulum unter dem Einfluss von Neuronostatin ebenfalls ein signifikant verringerter Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration registrieren (Zhu *et al.*, 2014). Aufgrund der dabei außerdem zu beobachtenden verringerten Expression sowie verminderten Phosphorylierung der SERCA 2a wird auch hier ein zugrundeliegender verringerter Füllungszustand der intrazellulären Calciumspeicher, vermittelt durch das Neuronostatin, diskutiert. Zudem konnte in dieser Untersuchung ebenfalls ein signifikanter Einfluss des Neuronostatins auf die basale Calciumkonzentration der Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen des GPR107-Proteins im Rahmen dieser Arbeit hatte sich in den murinen Kardiomyozyten unter dem Einfluss des Neuronostatins jedoch eine signifikante Verringerung der basalen Calciumkonzentration präsentiert. Weiterhin zeigt eine andere Untersuchung, in welcher der Einfluss des Neuronostatins auf die intrazelluläre Calciumhomöostase in Hypothalamus-Zellen der Ratte betrachtet wurde, eine signifikante Auswirkung des Neuronostatins auf den Calciumeinstrom in die Zellen (Dun *et al.*, 2010). Hierbei ließ sich im Anschluss an die Applikation des Neuronostatins ein schneller transients Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration registrieren, wobei aufgrund einer signifikanten Verstärkung dieses Anstiegs bei Messung in calciumhaltiger Umgebung zumindest teilweise ein zugrundeliegender erhöhter Calciumeinstrom von extrazellulär angenommen wird.

Zusammenfassend lassen sich somit zum einen in verschiedenen Untersuchungen Hinweise auf eine Interaktion des Neuronostatins mit dem GPR107-Protein finden, zum anderen scheinen diese beiden Proteine zudem zumindest teilweise ähnliche Effekte in Bezug auf die intrazelluläre Calciumhomöostase aufzuweisen. Aus diesem Grund war im Rahmen dieser Arbeit auch die Betrachtung der Auswirkung von Neuronostatin auf die in dieser Arbeit beobachteten Effekte des GPR107-Proteins auf die intrazelluläre Calciumhomöostase erfolgt. Dabei wurde sowohl der bei Expression des GPR107-

Proteins zu beobachtende erhöhte Calciueinstrom in die Zelle als auch die bei Expression des GPR107-Proteins resultierende verringerte Carbachol-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern betrachtet. In Bezug auf den Calciueinstrom von extrazellulär zeigt sich hierbei weder nach 40-minütiger noch nach 24-stündiger Inkubation GPR107 exprimierender Zellen mit Neuronostatin eine signifikante Erhöhung des Calciueinstroms im Vergleich zu GPR107 exprimierenden Zellen ohne den Einfluss des Peptidhormons. Somit ergibt sich kein Hinweis darauf, dass Neuronostatin diesen durch die Expression des GPR107-Proteins erzeugten Effekt beeinflusst. Bei der Untersuchung der Carbachol-induzierten Calciumfreisetzung hingegen resultiert die vorige Inkubation GPR107 exprimierender Zellen mit Neuronostatin in einer minimalen, jedoch rechnerisch signifikanten weiteren Verringerung der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. Inwieweit diese Auswirkung tatsächlich durch eine Neuronostatin-induzierte Verstärkung des GPR107-Proteins und eine hiermit verbundene Interaktion dieser Proteine bedingt ist, bleibt dabei jedoch zunächst unklar. Beispielweise lässt sich eine zugrundeliegende Addition ähnlicher, jedoch separater Wirkungen des GPR107-Proteins und des Neuronostatins hinsichtlich einer Verringerung des Füllungszustands des endoplasmatischen Retikulums hier nicht ausschließen. Für ein genaues Verständnis der hier zugrundeliegenden Mechanismen bedarf es somit weiterer Untersuchungen.

6. Literatur

6.1 Literaturverzeichnis

1. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, et al. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366(6455), 575-580, DOI: 10.1038/366575a0
2. Carette JE, Guimaraes CP, Wuethrich I, Blomen VA, Varadarajan M, Sun C, *et al.* (2011) Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nature biotechnology*, 29(6), 542-546, DOI: 10.1038/nbt.1857
3. Caterrall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 411-425, DOI: 10.1124/pr.57.4.5
4. Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 58(3), 319-379, DOI: 10.1016/0163-7258(93)90027-b
5. Davenport AP, Alexander SPH, Sharman JL, Pawson AJ, Benson HE *et al.* (2013) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacological Reviews*, 65(3), 967-986, DOI: 10.1124/pr.112.007179
6. Delos Santos NM, Gardner LA, White SW, Bahouth SW (2006) Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12896-12907, DOI: 10.1074/jbc.M508500200
7. Dong D, Zhou H, Na S, Niedra R, Peng Y, Wang H, Seed B, Zhou GL (2018) GPR108, an NF- κ B activator suppressed by TIRAP, negatively regulates TLR-triggered immune responses. *PLOS ONE*, 13(10), e0205303, DOI: 10.1371/journal.pone.0205303

8. Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews cancer*, 7(2), 79-94, DOI: 10.1038/nrc2069
9. Dudek AM, Zabaleta N, Zinn E, Pillay S, Zengel J, Porter C, Franceschini JS, *et al.* (2020) GPR108 Is a Highly Conserved AAV Entry Factor. *Molecular Therapy*, 28(2), 367-381, DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.11.005
10. Dun SL, Brailoiu GC, Tica AA, Yang J, Chang JK, Brailoiu E, Dun NJ (2010) Neuro-nostatin is co-expressed with somatostatin and mobilizes calcium in cultured rat hy-pothalamic neurons. *Neuroscience*, 166(2), 455-463, DOI: 10.1016/j.neuro-science.2009.12.059
11. Duvernay MT, Zhou F, Wu G (2004) A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Journal of Bi-ological Chemistry*, 279(29), 30741-30750, DOI: 10.1074/jbc.M313881200
12. Edgar AJ (2007) Human GPR107 and murine Gpr108 are members of the LUSTR family of proteins found in both plants and animals, having similar topology to G-protein coupled receptors. *DNA Sequence*, 18(3), 235-241, DOI: 10.1080/10425170701207182
13. Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers S, Vanhaelen Q, *et al.* (2011) Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse emb-ryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9(6), 563-574, DOI: 10.1016/j.stem.2011.10.012
14. Elrick MM, Samson WK, Corbett JA, Salvatori AS, Stein LM, Kolar GR, Naatz A, Yosten GLC (2015) Neuronostatin acts via GPR107 to increase cAMP-independent PKA phosphorylation and proglucagon mRNA accumulation in pancreatic α -cells. *American Journal of Physiology*, 310(2), 143-155, DOI: 10.1152/ajpregu.00369.2014
15. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S, Tanasa B, Hogan PG *et al.* (2006) A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179-185, DOI: 10.1038/nature04702

16. Freichel M, Zink-Lorenz A, Holloschi A, Hafner M, Flockerzi V, Raue F (1996) Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion. *Endocrinology*, 137(9), 3842-3848, DOI: 10.1210/endo.137.9.8756555
17. Freissmuth M, Boehm S, Beindl W, Nickel P, Ijzerman AP, Hohenegger M, Nanoff C (1996) Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors. *Molecular Pharmacology*, 49(4), 602-611, PMID: 8609887
18. Georgoussi Z, Merkouris M, Mullaney I, Megaritis G, Carr C, Zioudrou C, Milligan G (1997) Selective interactions of μ -opioid receptors with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1359(3), 263-274, DOI: 10.1016/s0167-4889(97)00097-9
19. Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 279(5715), 679-685, DOI: 10.1038/279679a0
20. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H *et al.* (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*, 446(7132), 153-158, DOI: 10.1038/nature05610
21. Harvey BJ, Higgins M (2000) Nongenomic effects of aldosterone on Ca^{2+} in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney International*, 57(4), 1395-1403, DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00981.x
22. Hawes BE, Luttrell LM, Exum ST, Lefkowitz RJ (1994) Inhibition of G-Protein-coupled Receptor Signaling by Expression of Cytoplasmic Domains of the Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(22), 15776-15785, PMID: 8195232
23. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 4-12, DOI: 10.1038/s41594-017-0011-7

24. Hoel CM, Zhang L, Brohawn SG (2022) Structure of the GOLD-domain seven-transmembrane helix protein family member TMEM87A. *eLife*, 11, e81704, DOI: 10.7554/eLife.81704
25. Hohenegger M, Waldhoer M, Beindl W, Böing B, Kreimeyer A, Nickel P, Nanoff C, Freissmuth M (1998) G α -selective G protein antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), 346-351, DOI: 10.1073/pnas.95.1.346
26. Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), 353-356, DOI: 10.1038/355353a0
27. Hoth M, Penner R (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *Journal of Physiology*, 465, 359-386, DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019681
28. Jasaszwilli M, Wojciechowicz T, Strowski M, Nowak KW, Skrzypski M (2021) The effects of neuronostatin on proliferation and differentiation of rat primary preadipocytes and 3T3-L1 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1866(11), 159018, DOI: 10.1016/j.bbailip.2021.159018
29. Kotterman MA, Schaffer DV (2014) Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature reviews genetics*, 15(7), 445-451, DOI: 10.1038/nrg3742
30. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132, DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0
31. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr., Meyer T (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology*, 15(13), 1235-1241, DOI: 10.1016/j.cub.2005.05.055
32. Lv X, Liu J, Shi Q, Tan Q, Wu D, Skinner JJ, Walker AL, Zhao L, Gu X, Chen N *et al.* (2016) In vitro expression and analysis of the 826 human G protein-coupled receptors. *Protein Cell*, 7(5), 325-337, DOI: 10.1007/s13238-016-0263-8

33. Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17067-17071, PMID: 1832668
34. Lyu S, Zhang X, Tu Z, Zhou H, Ke X, Qu Y (2022) GPR108 is required for gambogic acid inhibiting NF- κ B signaling in cancer. *Pharmacological Research*, 182, 106279, DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106279
35. Meisen WH, Nejad ZB, Hardy M, Zhao H, Oliverio O, Wang S, Hale C *et al.* (2020) Pooled Screens Identify GPR108 and TM9SF2 as Host Cell Factors Critical for AAV Transduction. *Molecular Therapy*, 17, 601-611, DOI: 10.1016/j.omtm.2020.03.012
36. Miller M, Shi J, Zhu Y, Kustov M, Tian J, Stevens A, Wu M, Xu J, Long S, Yang P *et al.* (2011) Identification of ML204, a novel potent antagonist that selectively modulates native TRPC4/C5 ion channels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33436-33446, DOI: 10.1074/jbc.M111.274167
37. Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16396-16402, PMID: 1644824
38. Muramatsu T, Suwa M (2006) Statistical analysis and prediction of functional residues effective for GPCR-G-protein coupling selectivity. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(6), 277-283, DOI: 10.1093/protein/gzl010
39. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193-199, DOI: 10.1016/0378-1119(91)90434-d
40. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Trong IL *et al.* (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289(5480), 739-745, DOI: 10.1126/science.289.5480.739
41. Panettieri RA, Schaafsma D, Amrani Y, Koziol-White C, Ostrom R, Tliba O (2018), Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(1), 38-49, DOI: 10.1016/j.tips.2018.11.002

42. Philipp S, Cavalié A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A *et al.* (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *The EMBO Journal*, 15(22), 6166-6171, PMID: PMC452437
43. Philipp S, Strauss B, Hirnet D, Wissenbach U, Mery L, Flockerzi V, Hoth M (2003) TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26629-26638, DOI: 10.1074/jbc.M304044200
44. Plant TD, Schaefer M (2003) TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channels. *Cell Calcium*, 33(5-6), 441-450, DOI: 10.1016/s0143-4160(03)00055-1
45. Putney JW Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1-12, DOI: 10.1016/0143-4160(86)90026-6
46. Rask-Andersen M, Almén MS, Schiöth HB (2011) Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(8), 579-590, DOI: 10.1038/nrd3478
47. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O *et al.* (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435-445, DOI: 10.1083/jcb.200502019
48. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363, DOI: 10.1038/nature08144
49. Sáez-Martínez P, Jiménez-Vacas JM, León-González AJ, Herrero-Aguayo V *et al.* (2020) Unleashing the Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Potential of the Neuronostatin/GPR107 System in Prostate Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1703, DOI: 10.3390/jcm9061703
50. Samson WK, Zhang JV, Avsian-Kretchmer O, Cui K, Yosten GLC, Klein C, Lyu R *et al.* (2008) Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31949-31959, DOI: 10.1074/jbc.M804784200

51. Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A *et al.* (2017) A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19-34, DOI: 10.1038/nrd.2016.230
52. Siderovski DP, Willard FS (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences*, 1(2), 51-66, DOI: 10.7150/ijbs.1.51
53. Schmidt TJ, Litwack G (1982) Activation of the glucocorticoid-receptor complex. *Physiological Reviews*, 62(4 Pt 1), 1131-1192, DOI: 10.1152/physrev.1982.62.4.1131
54. Seaman MN, McCaffery JM, Emr SD (1998) A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *Journal of Cell Biology*, 142(3), 665-681, DOI: 10.1083/jbc.142.3.665
55. Shenker A (1995) G protein-coupled receptor structure and function: the impact of disease-causing mutations. *Ballière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 9(3), 427-451, DOI: 10.1016/s0950-351x(95)80519-2
56. Tafesse FG, Guimaraes CP, Maruyama T, Carette JE, Lory S, Brummelkamp TR *et al.* (2014) GPR107, a G-protein-coupled receptor essential for intoxication by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, localizes to the Golgi and is cleaved by furin. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24005–24018, DOI: 10.1074/jbc.M114.589275
57. Tang S, Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Varadi G, Schwartz A (1993) Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13026-13029, PMID: 8099908
58. Thakur DP, Tian J, Jeon J, Xiong J, Huang Y, Flockerzi V, Zhu MX (2016) Critical roles of $G_{i/o}$ proteins and phospholipase C- δ 1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(4), 1092-1097, DOI: 10.1073/pnas.1522294113
59. Tuteja N (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling & Behaviour*, 4(10), 942-947, DOI: 10.4161/psb.4.10.9530

60. Urbach V, Verriere V, Grumbach Y, Bousquet J, Harvey BJ (2006) Rapid anti-secretory effects of glucocorticoids in human airway epithelium. *Steroids*, 71(4), 323-328, DOI: 10.1016/j.steroids.2005.09.014
61. Vedel L, Nøhr AC, Gloriam DE, Bräuner-Osborne H (2020) Pharmacology and function of the orphan GPR139 G protein-coupled receptor. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 126(6), 35-46, DOI: 10.1111/bcpt.13263
62. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S *et al.* (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*, 312(5777), 1220-1223, DOI: 10.1126/science.1127883
63. Wettschureck N, Offermanns S (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159-1204, DOI: 10.1152/physrev.00003.2005
64. Xu Y, Luo H, Hu Q, Zhu H (2021) Identification of Potential Driver Genes Based on Multi-Genomic Data in Cervical Cancer. *Frontiers in Genetics*, 12, 598304, DOI: 10.3389/fgene.2021.598304
65. Yang S, Shao T, Yu P, Cao R, Zhang M, Wen K, Fan M, He B (2019) Neuronostatin promotes soluble A β 1-42 oligomers-induced spatial learning and memory impairments in mice. *Behavioural Brain Research*, 364, 62-74, DOI: 10.1016/j.bbr.2019.01.047
66. Yang S, Zhou F, Ma M, Yuan Y, Zhao S, Yu P (2020) Neuronostatin Promotion Soluble A β 1-42 Oligomers: Induced Dysfunctional Brain Glucose Metabolism in Mice. *Neurochemical Research*, 45(10), 2474-2486, DOI: 10.1007/s11064-020-03106-y
67. Yosten GLC, Redlinger LJ, Samson WK (2012) Evidence for an interaction of neuronostatin with the orphan G protein-coupled receptor GPR107. *American journal of physiology*, 303(9), 941-949, DOI: 10.1152/ajpregu.00336.2012
68. Zeng J, Li M, Xiao Z, Chen Y, Chang Q, Tian H, Jin H, Liu X (2013) Rapid elevation of calcium concentration in cultured dorsal spinal cord astrocytes by corticosterone. *Neurochemical Research*, 38(2), 382-388, DOI: 10.1007/s11064-012-0929-4

69. Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J *et al.* (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9357-9362, DOI: 10.1073/pnas.0603161103
70. Zhao M, Zhang Y, Qiang L, Lu Z, Zhap Z, Fu Y, Wu B, Chai Q, Ge P, Lei Z *et al.* (2023) A Golgi-resident GPR108 cooperates with E3 ubiquitin ligase Smurf1 to suppress antiviral innate immunity. *Cell Reports*, 42(6), 112655, DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112655
71. Zhou GL, Na S, Niedra R, Seed B (2014) Deficits in receptor-mediated endocytosis and recycling in cells from mice with Gpr107 locus disruption. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 18), 3916-3927, DOI: 10.1242/jcs.135269
72. Zhu X, Hu N, Chen X, Zhu M, Dong H, Xu X, Luo F, Hua Y, Nair S *et al.* (2014) Neuronostatin attenuates myocardial contractile function through inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in murine heart. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(6), 1921-1932, DOI: 10.1159/000362969
73. Zweifach A, Lewis RS (1995) Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *Journal of General Physiology*, 105(2), 209-226, DOI: 10.1085/jgp.105.2.209

6.2 Internetquellen

bioscience.lonza.com, pmaxCloning Vector, Product Overview, Vector description

Online unter:

bioscience.lonza.com/lonza_bs/DE/en/Transfection/p/000000000000191671/pmaxCloning-Vector (Zugriff am 23.07.2021)

Abbildungen:

Abb. 3: Struktur von Fura-2 isoliert und unter Ausbildung eines Chelatkomplexes mit Calcium.

Dojindo.eu.com, Cell based assay, Intracellular Fluorescent Probes, Fura 2 Product Description, Chemical Structure

Online unter:

www.dojindo.eu.com/store/p/543-Fura-2.aspx (Zugriff am 26.07.2021)

Abb. 4: Exzitationsspektrum von Fura-2 unter verschiedenen Calciumkonzentrationen.

Thermo Fisher Scientific.com, Fluorescence excitation spectra of fura-2 in solutions containing 0–39.8 μM free Ca^{2+}

Online unter:

www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/indicators-for-ca2-mg2-zn2-and-other-metal-ions/fluorescent-ca2-indicators-excited-with-uv-light.html (Zugriff am 26.07.2021)

6.3 Weitere Abbildungsquellen

Abb. 24: Western Blot GPR107-GFP und GPR107-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP.

Johari Niloofar (2019) Masterarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Master of Science

Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopie GPR107-(179RFP)-(KSKR₁₇₉AAAA)-GFP.

Nett Verena (2020) Bachelorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, PD Dr. Ulrich Wissenbach, für die ausgezeichnete fachliche und stets motivierende Betreuung. Auch bei Fragen oder Problemen stand seine Tür immer für mich offen.

Prof. Dr. Veit Flockerzi danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Promotion in der Arbeitsgruppe.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Karin Wolske, Heidi Löhr, Christine Wesely, Stefanie Buchholz und Ute Soltek, die mir den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert und mich stets mit hilfreichen Tipps unterstützt haben.

Weiterhin danke ich Martin Simon-Thomas für die zuverlässige technische Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie für ihre Unterstützung und die freundliche Atmosphäre.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Verena Nett, mit der ich mich jederzeit austauschen konnte und mit der mir die Laborarbeit viel Spaß bereitet hat.

Bei meinen Freunden und Kommilitonen bedanke ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Anregungen.

Meiner Familie und dabei ganz besonders meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.