



**Untersuchungen zur ATP-vermittelten
Sensitivierung der Ovarialkarzinom-Zelllinien
HEY und OVCAR-3 gegenüber Cisplatin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nicole Brockmann
aus Osnabrück

Düsseldorf, Dezember 2019

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Matthias U. Kassack
2. Prof. Dr. Gerhard Fritz

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2020

Verfassererklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die meisten Methoden, die zur Anfertigung dieser Arbeit erforderlich waren, wurden von mir ausgeführt.

Die Selektivitätsuntersuchungen an den P2X-Rezeptor-exprimierenden Zellen sowie die Auswertung der Ergebnisse wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Hausmann und Prof. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen durchgeführt.

Die Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Gerhard Fritz unter der Anleitung von Frau Dr. Tatiana Hennicke durchgeführt.

Die Versuche mit dem P2X₇-Rezeptor-Antagonisten A740003 und dem P2Y₂-Rezeptor-antagonisten AR-C118925 wurden in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Parichat Sur rechtchataiyan und die Versuche zur Caspase 3/7-Aktivierung von Frau Chenyin Wang durchgeführt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 19.12.2019

(Nicole Brockmann)

Dokumentation des Eigenanteils

Einige der in dieser Dissertation gezeigten Daten wurden von mir als Erstautorin bereits im Journal *Purinergic Signalling* unter dem Titel „Profiling of a suramin-derived compound library at recombinant human P2Y receptors identifies NF272 as a competitive but non-selective P2Y₂ receptor antagonist“ veröffentlicht.

Die Expressionsnachweise des P2Y₂-Rezeptors auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, siehe Kapitel 4.3.1.2, wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Fritz, Institut für Toxikologie des Universitätsklinikums Düsseldorf, gewonnen. Prof. Fritz stellte dabei sowohl seine Laborräume als auch Geräte und Materialien zur Verfügung. Die Durchführung und Auswertung der Versuche, unter Anleitung von Frau Tatiana Hennicke, aber lag bei mir.

Die Selektivitätsuntersuchungen an den P2X-Rezeptor-exprimierenden Zellen sowie die Auswertung der Ergebnisse, siehe Kapitel 4.2.7.1, wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Hausmann und Prof. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen durchgeführt und mir zur Verfügung gestellt.

Darauf wird in dieser Arbeit ganz zu Beginn entsprechend hingewiesen. Alle anderen gezeigten Versuche in der Publikation wurden von mir durchgeführt.

Zusammenfassung

Extrazelluläre Nukleotide, vorwiegend ATP, wirken als Transmitter im purinergen Signaltransduktionssystem, einem ubiquitär vorkommenden Kommunikationssystem von Zellen. Dabei interagieren die Nukleotide mit purinergen P1- oder P2-Rezeptoren. Fundamentale physiologische und auch pathophysiologische Prozesse wie die Zell-Homöostase (Proliferation/Apoptose), glattmuskuläre Kontraktilität, Thrombozytenaggregation, Wundheilung, Neurodegeneration, Immunaktivität oder Entzündungen werden durch die purinerge Zellkommunikation gesteuert. Aktuell rückt die Rolle von ATP und der dazugehörigen P2-Rezeptoren bei Krebserkrankungen in den Fokus der Forschung. Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Fragestellung, ob die Chemosensitivität von Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Zytostatika wie Cisplatin durch ATP via P2Y₂-Rezeptoren moduliert werden kann. Der P2Y₂-Rezeptor ist ein ubiquitär im menschlichen Körper vorkommender purinergen Rezeptor. Seine genauen (patho-) physiologischen Funktionen konnten lange Zeit aufgrund fehlender selektiver und potenter Liganden nicht eindeutig bestimmt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zunächst acht verschiedene P2Y-Rezeptor-exprimierende Zelllinien (P2Y₁ – P2Y₁₄) etabliert und charakterisiert, um im zweiten Teil eine Arbeitskreis-eigene vom Suramin-abgeleitete chemische Substanz-Bibliothek auf mögliche P2Y₂-Rezeptor-selektive Liganden zu screenen. Dies führte zur Entdeckung und Charakterisierung des kompetitiven und nicht-zytotoxischen P2Y₂-Antagonisten NF272 mit einem K_i-Wert von 19 µM. Damit ist NF272 14-fach potenter im Vergleich zum unselektiven P2-Antagonisten Suramin (K_i = 265 µM). Ferner zeigte NF272 eine moderate Präferenz gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor innerhalb der Uracilnukleotid-selektiven Rezeptorsubtypen (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆). Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von ATP auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität an den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 untersucht. Die Expression des P2Y₂-Rezeptors wurde in beiden Zelllinien mittels PCR und Western Blot nachgewiesen. Ferner wurde seine funktionelle Aktivität mittels Calcium-Studien bestätigt. ATP selbst zeigte nach 72-stündiger Behandlung eine moderate Toxizität mit einer IC₅₀ von 145 µM (HEY) bzw. 240 µM (OVCAR-3). Eine Präinkubation der Zellen mit 100 µM oder 200 µM ATP für 48 Stunden vor der 72-stündigen Coinkubation mit Cisplatin führte zu einer signifikanten Abnahme der IC₅₀ von Cisplatin im Vergleich zu den alleine mit Cisplatin behandelten Kontrollzellen. Dabei wurden je nach Zelllinie und Bedingung Shift-Faktoren zwischen 1,5 und 4,5 beobachtet. Der Einsatz von NF272 oder des literaturbekannten P2Y₂-Antagonisten AR-C118925 revidierte die durch ATP verstärkte Zytotoxizität von Cisplatin an beiden Zelllinien vollständig. Die Modulation der Cisplatinchemosensitivität durch ATP wurde somit nachweislich über den P2Y₂-Rezeptor vermit-

telt. Die Berechnung der Kombinations-Indizes (CI-Werte) nach Chou-Talalay, welche $< 0,9$ waren, bestätigte einen synergistischen Effekt für die Kombination von ATP und Cisplatin. Zellzyklusanalysen deuteten auf einen ATP-induzierten Zellzyklusarrest in der S-Phase hin. Die gleichzeitige Gabe von ATP und Cisplatin verstärkte synergistisch die Apoptose-Induktion durch Aktivierung der Caspasen 3/7. Es gibt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des EGF-Rezeptors und von mTOR an den ATP-Effekten auf die Ovarialkarzinom-Zelllinien. Unter ATP-Behandlung kam es in HEY-Zellen zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors und durch die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin wurde die Expression von mTOR stärker reduziert als durch Cisplatin alleine.

Zusammengefasst hat diese Arbeit den kompetitiven P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF272 hervorgebracht. Trotz der nur moderaten Selektivität für den P2Y₂-Rezeptor kann NF272 aufgrund seiner geringen Zytotoxizität als Leitstruktur für die Entwicklung Suramin-basierter P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten dienen. Ferner zeigt diese Arbeit, dass ATP P2Y₂-Rezeptor-vermittelt die Cisplatin-Wirksamkeit in synergistischer Weise in den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 erhöht. Dies geht mit einer verstärkten Aktivierung der Caspasen 3/7 und Induktion der Apoptose einher, möglicherweise durch verringerte Expression des proliferationsfördernden mTOR. Stimulation des P2Y₂-Rezeptors könnte somit eine neue therapeutische Option für die Behandlung des Ovarialkarzinoms darstellen, um die Sensitivität gegenüber Platin-haltigen Zytostatika zu erhöhen.

Abstract

Extracellular nucleotides, mainly ATP, act as transmitters in the purinergic signalling system, an ubiquitous occurring system of cell communication. Nucleotides interact with purinergic P1- or P2-receptors. Fundamental physiological and pathophysiological processes such as cell homeostasis (proliferation/apoptosis), smooth muscles contractility, platelet aggregation, wound healing, neurodegenerative disorders, immune activity or inflammation are modulated by purinergic signalling. Currently, the role of ATP and its plasma membrane P2-receptors in cancer proliferation enter the focus of P2-receptor research. Starting point of this work was to clarify the question, if chemosensitivity of cytostatic agents like cisplatin could be modulated through ATP via P2Y₂ receptors in ovarian cancer cells. The P2Y₂ receptor is an ubiquitous occurring purinergic receptor in humans. Evaluation of its complete (patho-) physiological role has long been hampered due to the lack of selective and potent ligands. In the first part of this work, eight different P2Y-receptor-expressing cell lines (P2Y₁ – P2Y₁₄) were established and characterized, in order to screen an in-house synthesized suramin-derived compound library for possible P2Y₂-receptor selective ligands in the second part. This resulted in the discovery and characterization of NF272, a competitive and non-cytotoxic P2Y₂-receptor antagonist with a K_i-value of 19 µM. NF272 is 14-fold more potent than the unselective P2-receptor antagonist suramin (K_i = 265 µM). Further, NF272 showed a moderate selectivity for P2Y₂ among uracilnucleotide-selective P2-receptor subtypes (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆). The third part of this work aimed to investigate the effect of ATP upon cisplatin-induced cytotoxicity in ovarian cancer cell lines HEY and OVCAR-3. P2Y₂-receptor expression in both cell lines was verified by PCR and western blot analysis. Furthermore, its functional activity was confirmed by calcium studies. ATP itself displayed moderate cytotoxicity with IC₅₀-values of 145 µM (HEY) and 240 µM (OVCAR-3) in cell viability assays after 72 h of treatment. However, pre-incubation with 100 µM or 200 µM ATP for 48 h prior to 72 h incubation with cisplatin resulted in a significant decrease of cisplatin IC₅₀-values compared to cisplatin treatment alone. Depending on conditions and cell line, shift factors between 1.5 and 4.5 were observed. Presence of NF272 or the known P2Y₂ receptor antagonist AR-C118925 completely abrogated the ATP-enhanced cisplatin cytotoxicity in both cell lines. Therefore in ovarian cancer cells, the modulation of cisplatin chemosensitivity by ATP was demonstrably mediated by P2Y₂ receptors. By determining combination index values (CI-values) according to Chou-Talalay of less than 0.9, the combination of cisplatin and ATP was found to be synergistic. Cell cycle analysis showed cell cycle arrest in S-phase induced by ATP. Combined treatment of ATP and cisplatin significantly enhanced the induction of apoptosis by

activation of caspases 3/7 in a synergistic manner. Likewise, there is first evidence of possible involvement of EGF receptors and mTOR upon ATP treatment in ovarian cancer cells. After treatment of HEY cells with ATP, transactivation of EGF receptors was observed and moreover, expression of mTOR was more reduced after treatment with ATP plus cisplatin as compared to cisplatin treatment alone.

In conclusion, this work identifies the competitive P2Y₂ receptor antagonist NF272. Despite an only moderate selectivity for P2Y₂ receptors NF272 may serve as a lead structure for the development of suramin-derived P2Y₂ receptor antagonists due to its low cytotoxicity. In addition this work demonstrates that in the ovarian cancer cell lines HEY and OVCAR-3, ATP enhances cisplatin potency via P2Y₂ receptors in a synergistic manner. This goes along with an increased activation of caspases 3/7 and induction of apoptosis, possibly through a decreased expression of mTOR. Therefore, stimulation of P2Y₂ receptors may be a new therapeutic option for treatment of ovarian cancer to increase the sensitivity towards platinum-based cytostatic agents.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis	XVIII
Formelverzeichnis	XXV
1 Einleitung	1
1.1 ATP, purinerge Rezeptoren und Tumorerkrankungen	1
1.1.1 Purinerge Rezeptoren	3
1.1.2 P2Y ₂ -Rezeptor	9
1.1.3 P2-Rezeptoren und Krebserkrankungen	12
1.2 Ovarialkarzinome	15
2 Zielsetzung dieser Arbeit	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Reagenzien und Chemikalien	20
3.1.2 Verwendete Kits	24
3.1.3 Primer	24
3.1.4 cDNA, Plasmide und Vektoren	26
3.1.5 Antikörper	26
3.1.6 Geräte	27
3.1.7 Verbrauchsmaterialien und sonstiges Arbeitsmaterial	29
3.1.8 Programme und Software	30
3.1.9 Zelllinien und Nährmedien	31
3.2 Puffer und Lösungen	34
3.2.1 Zellkultur	34
3.2.2 Bakterienkultur	35
3.2.3 β -Galactosidase Test (Blau-Weiß-Färbung)	36
3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA	37
3.2.5 RNA-Isolierung	37
3.2.6 PCR	38
3.2.7 Protein-Präparation	38

3.2.8	BCA-Protein-Assay.....	39
3.2.9	Elektrophorese	39
3.2.10	Western Blot	41
3.2.11	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	42
3.2.12	Calcium-Assay.....	42
3.2.13	cAMP-Reportergen-Assay	43
3.2.14	MTT-Assay	44
3.2.15	Apoptose-Assay.....	45
3.2.16	Zellzyklusanalyse	45
3.3	Methoden	47
3.3.1	Zellkultur	47
3.3.1.1	Zellkultivierung.....	47
3.3.1.2	Ernten und Passagieren	47
3.3.1.3	Zellzahlbestimmung	48
3.3.1.4	Einfrieren von Zellen	48
3.3.1.5	Ausfrieren von Zellen	48
3.3.2	Etablierung P2Y-Rezeptor-exprimierender Zelllinien mittels FlpIn TM -System	49
3.3.2.1	FlpIn TM -System	49
3.3.2.2	Transformation, Vermehrung und Aufreinigung von Vektoren in <i>E. coli</i>	50
3.3.2.3	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung.....	51
3.3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Extraktion.....	52
3.3.2.5	Ligation.....	53
3.3.2.6	Transfektion in die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie	54
3.3.2.7	Klonselektion.....	55
3.3.2.8	β-Galactosidase Test (Blau-Weiß-Färbung)	56
3.3.2.9	Funktionelle Charakterisierung der Einzelzellklone.....	58
3.3.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzanalyse	58
3.3.3	Kombinatorisches Screening der NF-Substanzbibliothek	59
3.3.3.1	NF-Substanzen	59
3.3.3.2	Kombinatorisches Screening.....	59
3.3.4	Nachweis von Zielstrukturen auf mRNA-Ebene	61
3.3.4.1	DNA-Microarray-Analyse	61
3.3.4.2	RNA-Isolierung	61
3.3.4.3	Reverse Transkription	62
3.3.4.4	Primerdesign	63
3.3.4.5	PCR	64
3.3.4.6	Nukleinsäure-Gel-Elektrophorese.....	65

3.3.5	Nachweis von Zielstrukturen auf Proteinebene	65
3.3.5.1	Protein-Präparation	65
3.3.5.2	BCA-Protein-Assay	66
3.3.5.3	Sodium-Dodecylsulfat-Polyarylamid-Gel-Elektrophorese	67
3.3.5.4	Western Blot	68
3.3.5.5	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	69
3.3.6	Funktionelle Assays	70
3.3.6.1	Calcium-Assay	70
3.3.6.2	Elektrophysiologische Spannungsmessung an P2X-Rezeptoren	79
3.3.6.3	cAMP-Luciferase-Reportergen-Assay	79
3.3.6.4	MTT-Assay	82
3.3.6.5	Versuche am Durchflusszytometer	84
3.3.6.6	Apoptose-Assay.....	88
3.3.6.7	Zellzyklusanalyse	90
3.3.6.8	Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen	92
3.3.6.9	Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay	94
3.3.7	Statistik.....	94
4	Ergebnisse	95
4.1	Etablierung und Charakterisierung P2Y-Rezeptor-exprimierender Zelllinien	95
4.1.1	Überprüfung der klonierten Expressionsvektoren	95
4.1.2	Leervektor	98
4.1.3	P2Y-Rezeptor-exprimierende Zelllinien	100
4.1.3.1	P2Y ₁ -Rezeptor	100
4.1.3.2	P2Y ₂ -Rezeptor	103
4.1.3.3	P2Y ₄ -Rezeptor	106
4.1.3.4	P2Y ₆ -Rezeptor	109
4.1.3.5	P2Y ₁₁ -Rezeptor	112
4.1.3.6	P2Y ₁₂ -Rezeptor	115
4.1.3.7	P2Y ₁₃ -Rezeptor	117
4.1.3.8	P2Y ₁₄ -Rezeptor	118
4.2	Pharmakologische Evaluierung möglicher P2Y ₂ -Rezeptor-Antagonisten	121
4.2.1	Charakterisierung des verwendeten Zellsystems	121
4.2.2	Ergebnis des kombinatorischen Grobscreenings	123
4.2.3	Ergebnis des Einzelsubstanz-Screenings	133
4.2.4	Testung von NF198 und NF272 in den nativen Zellsystemen HEY und OVCAR-3	138
4.2.5	Zytotoxizität von NF198 und NF272.....	142

4.2.6	Funktionelle Charakterisierung von NF272.....	145
4.2.6.1	<i>Schild</i> -Analyse von NF272	145
4.2.6.2	Auswertung nach <i>Lew and Angus</i>	147
4.2.7	Selektivität von NF272	147
4.2.7.1	Selektivität gegenüber P2X-Rezeptoren	147
4.2.7.2	Selektivität gegenüber P2Y-Rezeptoren	148
4.3	Sensitivierung von Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Cisplatin durch Nukleotide.....	152
4.3.1	Expressionsprofil purinerger Rezeptoren	155
4.3.1.1	mRNA-Ebene	155
4.3.1.2	Proteinebene.....	157
4.3.2	Pharmakologische Charakterisierung der exprimierten P2Y-Rezeptoren mittels Calcium-Assay.....	161
4.3.3	Bestimmung der Zytotoxizität verschiedener Testsubstanzen.....	168
4.3.3.1	Vorversuche	168
4.3.3.2	Bestimmung der Zytotoxizität von ATP, UTP, Suramin und NF272	171
4.3.4	Effekte extrazellulärer Nukleotide	172
4.3.4.1	Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte von ATP	172
4.3.4.2	Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte von UTP und ADP	176
4.3.4.3	Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin, Paclitaxel bzw. Topotecan.....	178
4.3.4.4	Einfluss von ADP, UTP und UDP auf die Zytotoxizität von Cisplatin.....	185
4.3.4.5	Zeitabhängiger Einfluss von ATP bzw. ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin.....	188
4.3.4.6	Inhibierung der ATP- bzw. ADP-induzierten erhöhten Cisplatin-Zytotoxizität durch P2Y-Rezeptor-Antagonisten ..	197
4.3.4.7	Synergismus von ATP und Cisplatin	212
4.3.4.8	Effekt von ATP auf das Apoptoseverhalten bzw. den Zellzyklus	214
4.3.5	Untersuchungen zum möglichen Mechanismus des sensitivierenden Effektes von ATP auf die Cisplatin-Zytotoxizität	226
4.3.5.1	Effekt von ATP auf die Cisplatin-induzierte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen	226
4.3.5.2	Effekt von ATP auf die Expression ausgewählter Proteine ..	229
5	Diskussion.....	234
5.1	Etablierung der einzelnen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien	234
5.2	Antagonisten am P2Y ₂ -Rezeptor.....	236

5.2.1	Struktur-Wirkungs-Beziehung der getesteten Antagonisten	237
5.2.2	NF198 und NF272.....	240
5.2.3	NF272 – ein kompetitiver P2Y ₂ -Rezeptor-Antagonist.....	241
5.3	Sensitivierung von Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Cisplatin durch Nukleotide.....	244
5.3.1	Funktionelle Integrität exprimierter P2Y ₂ -Rezeptoren	244
5.3.2	Effekte extrazellulärer Nukleotide	246
5.3.2.1	Zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von Nukleotiden.....	246
5.3.2.2	Synergismus von ATP und Cisplatin	252
5.3.2.3	Mechanistische Untersuchungen zur ATP-vermittelten Wirkung	253
	Literaturverzeichnis	256
	Anhang.....	273
A	Vektorkarten	273
B	cDNA-Sequenzen	276
C	Sequenzierungs-Ergebnisse	279
D	Ergebnis kombinatorisches Screening	299
E	Ovarialkarzinom-Zelllinien — Expressionsdaten	313
	Lebenslauf.....	316
	Publikationen.....	317
	Danksagung	318

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	ATP-binding cassette
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, entspricht der Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
Ampuwa	Wasser für Injektionszwecke
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
Asp	Asparaginsäure
AU	„Arbitrary Units“ (willkürliche Einheiten)
BBG	Brilliant Blue G
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure) = 2,2'-Bichinolyl-4,4'-dicarbonsäure
Bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
BRCA ₁	Breast cancer Type 1 susceptibility protein
BRCA ₂	Breast cancer Type 2 susceptibility protein
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Caspase	Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen (= Cysteinyl aspartate specific proteinas)
cDNA	Copy-DNA
CDS	Coding DNA Sequence
CI	Kombinationsindex (= Combination index)
cpd	Verbindung (= compound)
CREB	cAMP-response element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonucleotid-Triphosphat(e)
ds	doppelsträngig
DTT	DL-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia Coli
EC ₅₀	Effektive Konzentration, die 50% der Zellantwort hervorruft,
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (= epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (= epidermal growthfFactor receptor)
Em	Emissionswellenlänge
E _{max}	Maximaler (Agonist-induzierter) Effekt bzw. Wirkhöhe
ENTPDase	Ekto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
et al.	Et altera (und andere)
Ex	Extinktionswellenlänge
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FKS	Fötale Kälberserum
FLNa	Filamin A, alpha
FRT	Flp Recombination Target
FSC	Forward scatter
G	Guanin
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GOI	Gene of interest
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	G-Proteine, inhomogene Gruppe von Proteinen innerhalb von Zellen, welche in der Lage sind, GDP und GTP zu binden
Gy	Gray
h	Stunde (hour)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HKG	Housekeeping-Gene

HRP	Meerrettichperoxidase (= Horse Radish Peroxidase)
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration, die 50% der Zellantwort hervorruft
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
L	Liter
LV	Leervektor
M	Molar (mol/L)
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCS	Multiple Cloning Site
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kinasen
MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/L)
mM	Millimolar (mmol/L)
mRNA	Messenger-RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nmol/L)
NP-40	Nonoxinol 40
NTPdase	Siehe ENTPDase
OG	Oregon Green®488 BAPTA-1
P	Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. Signifikanzniveau (= Probability)
p53	Tumor protein p53
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (=Polymerase Chain Reaction)
pEC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus von EC ₅₀
Pen.	Penicillin
pH	Wasserstoffion-Exponent
PI	Propidiumbromid
pIC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus von IC ₅₀
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	Photomultiplier (=photomultiplier tube)
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QVD	Q-VD-OPh (unspezifischer Caspase-Inhibitor)
RB-2	Reactive Blue 2
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungszahl pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SE(M)	Standardfehler (des Mittelwerts)
sec	Sekunden
SF	Shift-Faktor
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
SSC	Side scatter
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription-3
Strep.	Streptomycin
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween 20
TE	Tris-EDTA-Puffer
tech.	Technisch
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin

TNP-ATP	2'(3')-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)ATP
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U/mL	Units/Milliliter
UDP	Uridindiphosphat
UICC	Union internationale contre le cancer
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor receptor
vs.	Versus
v/v	Volumenkonzentration
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
ZCL	Zentrales Chemikalienlager

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der P1-Rezeptoren	4
Tabelle 2: Charakteristische Merkmale der P2X-Rezeptoren	5
Tabelle 3: Charakteristische Merkmale der P2Y-Rezeptoren	6
Tabelle 4: P2Y-Rezeptor-Expression in diversen Krebszelllinien.....	13
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	20
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien-Kits.....	24
Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Primer.....	25
Tabelle 8: Verwendete Vektoren.	26
Tabelle 9: Liste der kommerziell erworbenen Plasmide.	26
Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper.	26
Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper.	27
Tabelle 12: Verwendete Geräte und Zubehör.	27
Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	29
Tabelle 14: Verwendete Programme und Software.	30
Tabelle 15: Verwendete Zelllinien.....	32
Tabelle 16: Pipettierschema für den Restriktionsverdau.....	52
Tabelle 17: Pipettierschema für die Agarose-Gelelektrophorese.....	52
Tabelle 18: Pipettierschema für die Ligationsreaktion.	54
Tabelle 19: Pipettierschema der Transfektionsmischung.	54
Tabelle 20: Pipettierschema der reversen Transkription.....	62
Tabelle 21: Kriterien für das Konzipieren von Primern.....	63
Tabelle 22: Pipettierschema für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	64
Tabelle 23: Protokoll der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	64
Tabelle 24: Pipettierschema für die Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR- Produkte.....	65
Tabelle 25: Zusammensetzung des Trengels.	67
Tabelle 26: Zusammensetzung des Sammelgels.	67
Tabelle 27: Verwendete Zellzahlen im Calcium-Assay.....	73
Tabelle 28: Zeitlicher Verlauf der Messung im NOVOSTar®	74
Tabelle 29: Konzentration der eingesetzten Standardagonisten für den Antagonist-Modus im Calcium-Assay.....	74
Tabelle 30: Pipettierschema für den cAMP-Assay.	81
Tabelle 31: Verwendete Zellzahlen im MTT-Assay.	83
Tabelle 32: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der PCR vermehrten Fragmente der acht klonierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-GOI.....	96
Tabelle 33: Strukturformeln der näher charakterisierten NF-Substanzen.	125
Tabelle 34: Inhibitorische Potenz der Suramin-Derivatebestimmt im Calcium-Assay für den P2Y ₂ -Rezeptor, welcher rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen vorlag (1321N1-P2Y ₂).	137

Tabelle 35: Inhibitorische Potenz der Suramin-Derivate bestimmt im Calcium-Assay für den P2Y ₂ -Rezeptor, welcher nativ in HEY-Zellen exprimiert war.....	140
Tabelle 36: Inhibitorische Potenz von Suramin und NF272 bestimmt im Calcium-Assay für den P2Y ₂ -Rezeptor, welcher nativ in OVCAR-3-Zellen exprimiert war.....	142
Tabelle 37: Zytotoxizität der beiden P2Y ₂ -Antagonisten NF198 und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien 1321N1, HEK293 und OVCAR-3.....	145
Tabelle 38: Einfluss von NF272 auf die EC ₅₀ bzw. den pEC ₅₀ von ATP an der Zelllinie 1321N1-P2Y ₂ im Calcium-Assay.....	146
Tabelle 39: IC ₅₀ von NF272 an den P2X-Rezeptorsubtypen, rekombinant exprimiert in <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten.....	148
Tabelle 40: Inhibitorische Potenz von NF272 ermittelt im Calcium-Assay für den P2Y ₁ -, P2Y ₂ -, P2Y ₄ -, P2Y ₆ -, P2Y ₁₁ - und P2Y ₁₂ -Rezeptor, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen.....	148
Tabelle 41: Untersuchte Gene im DNA-Microarray.....	152
Tabelle 42: Übersicht zu den im Calcium-Assay ermittelten EC ₅₀ - und pEC ₅₀ -Werte für die Agonisten ATP, UTP, ADP und UDP an der Zelllinie HEY.....	162
Tabelle 43: Übersicht zu den im Calcium-Assay ermittelten EC ₅₀ - und pEC ₅₀ -Werte für die Agonisten ATP, UTP, ADP und UDP an der Zelllinie OVCAR-3.....	162
Tabelle 44: Vergleich der mittels Calcium-Assay bestimmten EC ₅₀ -Werte für die Nukleotide ATP, UTP, ADP und UDP an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 mit den EC ₅₀ -Werten der jeweiligen rekombinanten P2Y-Rezeptorsubtyp-exprimierenden 1321N1-Zelllinie.....	163
Tabelle 45: IC ₅₀ - und pIC ₅₀ -Werte von ATP und UTP bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3.....	168
Tabelle 46: Zytotoxizität von ATP, UTP, Suramin und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay nach 72-stündiger Inkubationszeit an den Zelllinien HEY und OVCAR-3.....	172
Tabelle 47: Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay.....	180
Tabelle 48: Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan bzw. Paclitaxel bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	181
Tabelle 49: Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan bzw. Paclitaxel bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.....	184
Tabelle 50: Effekt von UTP, ADP und UDP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	188
Tabelle 51: Effekt von UTP, ADP und UDP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.....	188
Tabelle 52: Zeitabhängiger Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	189
Tabelle 53: Zeitabhängiger Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.....	192
Tabelle 54: Zeitabhängiger Effekt von ADP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	194
Tabelle 55: Zeitabhängiger Effekt von ADP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.....	195

Tabelle 56: Konzentrationsabhängige Effekte von Suramin auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	197
Tabelle 57: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	200
Tabelle 58: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	200
Tabelle 59: Effekt von NF272 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3.....	202
Tabelle 60: Effekt von 250 µM NF272 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.	203
Tabelle 61: Effekt von 250 µM NF272 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.	204
Tabelle 62: Effekt von AR-C118925 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3.....	205
Tabelle 63: Effekt von 5 µM AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	206
Tabelle 64: Effekt von 50 µM AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	207
Tabelle 65: Effekt von 5 µM AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.	208
Tabelle 66: Effekt von 50 µM AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay.	210
Tabelle 67: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF272 auf die ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	211
Tabelle 68: Konzentrationsabhängiger Effekt von MRS2211 auf die ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay.....	212
Tabelle 69: Kombinationsindizes (CI) berechnet mit Hilfe der Software CalcuSyn® nach der Chou-Talalay-Methode für die verschiedenen Kombinationen an ATP und Cisplatin an der Zelllinie HEY.....	213
Tabelle 70: Kombinationsindizes (CI) berechnet mit Hilfe der Software CalcuSyn® nach der Chou-Talalay-Methode für die verschiedenen Kombinationen an ATP und Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3.	213
Tabelle 71: Vergleich zwischen in dem Rahmen dieser Arbeit bestimmten EC ₅₀ -Werte der verschiedenen Agonisten an den P2Y-Rezeptorsubtypen und den EC ₅₀ -Werten aus der Literatur.	234
Tabelle 72: Vergleich der in den verschiedenen Zellsystemen bestimmten charakteristischen Werte für NF272.	242
Tabelle 73: Vergleich der mittels Calcium-Assay bestimmten EC ₅₀ -Werte für die Nukleotide ATP, UTP, ADP und UDP an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 mit den EC ₅₀ -Werten der jeweiligen rekombinanten P2Y-Rezeptorsubtyp-exprimierenden 1321N1-Zelllinie.	245

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Adenosintriphosphat.....	1
Abbildung 2: Schematische zelluläre Modellvorstellung zum auto- bzw. parakrinen purinergen Signaltransduktionsweg.....	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung der purinergen Signaltransduktionswege.	5
Abbildung 4: Schematische Übersicht zu den Mechanismen der purinergen Signaltransduktionswege.....	7
Abbildung 5: Zweidimensionale Struktur des humanen P2Y ₂ -Rezeptors.	9
Abbildung 6: Strukturformeln literaturbekannter P2Y ₂ Rezeptor-Antagonisten.....	11
Abbildung 7: Schematische Darstellung zum möglichen Mechanismus wie die einzelnen P2-Rezeptorsubtypen die Zellfunktionen in Krebszellen verändern.	12
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014.....	15
Abbildung 9: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle für das Ovarialkarzinom, Deutschland, 1999 - 2014/2015, je 100.000 (Europastandard).	16
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Generierung einer FlpIn-Host-Zelllinie, sowie des Einbaus des Expressionsvektors mit dem enthaltenen GOI in diese Host-Zelllinie.	50
Abbildung 11: Schematische Belegung der Taschen für die Agarose-Gelelektrophorese.....	53
Abbildung 12: Zytotoxizität von Hygromycin B bestimmt an der 1321N1-FlpIn Host-Zelllinie mittels MTT-Assay.....	55
Abbildung 13: Vergleich der Zeocin-Sensitivität.	56
Abbildung 14: β -Galactosidase-Nachweis-Reaktion.	57
Abbildung 15: Mikroskopische Bilder nach dem Test auf β -Galactosidase-Aktivität.	58
Abbildung 16: Assay-Layout der Reagenzienplatte, welche die potentiellen Antagonisten in den Kombilösungen enthält.	60
Abbildung 17: Layout der zweiten Reagenzienplatte.	60
Abbildung 18: Finales Layout des Calcium-Assays für das kombinatorische Grobscreening.	61
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zum Nachweis der P2Y ₂ -Rezeptorexpression in HEY-Zellen.	70
Abbildung 20: Strukturformel des Oregon Green®488 BAPTA-1/AM.....	70
Abbildung 21: Fluoreszenz-Zeit-Kurven am Beispiel der Zelllinie 1321N1-FlpIn-P2Y ₆ detektiert im NOVOSTAR® während des Calcium-Assays.....	71
Abbildung 22: Reaktionsgleichung der Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase unter Freisetzung eines Lichtquants.	80
Abbildung 23: Lumineszenz-Zeit-Kurven am Beispiel der Zelllinie 1321N1-FlpIn-P2Y ₁₁ detektiert im LUMIstar® während des cAMP-Reporterogen-Assay.....	82
Abbildung 24: Reduktionsreaktion des MTT.....	83
Abbildung 25: Aufbau eines Durchflusszytometers.....	84
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Lichtstreuung im Durchflusszytometer.....	85
Abbildung 27: Signalmessung am Durchflusszytometer.....	85

Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten.....	86
Abbildung 29: FSC-SSC-Dotplot.....	87
Abbildung 30: Identifizierte Population der Zellkerne innerhalb des Polygons im Dotplot SSC gegen FSC.....	88
Abbildung 31: Propidiumiodid-Histogramme.....	89
Abbildung 32: Dubletten-Diskriminierung am Beispiel von unbehandelten HEY-Zellen.....	91
Abbildung 33: Zellzyklus-Histogramme.....	91
Abbildung 34: Zellzyklusanalyse am Beispiel von HEY-Zellen.....	92
Abbildung 35: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von γ H2AX-Foci.....	93
Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pcDNA5/FRT-P2Y ₂ nach der Restriktionsanalyse.....	95
Abbildung 37: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der PCR vermehrten Fragmente der acht klonierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-GOI.....	96
Abbildung 38: Calcium-Signale an der Leervektorzelllinie.....	99
Abbildung 39: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-Host-Zelllinie und der 1321N1-FplIn- C2-Leervektor-Zelllinie.....	100
Abbildung 40: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₁ -Einzelzellklone.....	100
Abbildung 41: Untersuchung der Testsubstanzen ATP und ADP an den 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₁ - Einzelzellklonen B6 und F7 im Calcium-Assay.....	101
Abbildung 42: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP und ATP am P2Y ₁ -Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₁	102
Abbildung 43: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von MRS2211 an der Zelllinie 1321N1-FplIn- C2-P2Y ₁	103
Abbildung 44: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₂ -Einzelzellklone.....	103
Abbildung 45: Untersuchung der Testsubstanzen ATP und UTP an den 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₂ - Einzelzellklonen B10, D3 und H9 im Calcium-Assay.....	104
Abbildung 46: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP am P2Y ₂ -Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₂	104
Abbildung 47: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von Suramin an der Zelllinie 1321N1-FplIn-C2- P2Y ₂	105
Abbildung 48: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₄ -Einzelzellklone.....	106
Abbildung 49: Untersuchung der Testsubstanzen UTP und ATP an den 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₄ - Einzelzellklonen D3 und D6 im Calcium-Assay.....	107
Abbildung 50: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP an den P2Y ₄ -Rezeptor- exprimierenden Zellklonen.....	108
Abbildung 51: Inhibition von Suramin und Reactive Blue 2 an den P2Y ₄ -Rezeptor- exprimierenden Zellklonen.....	109
Abbildung 52: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₆ -Einzelzellklone.....	109
Abbildung 53: Untersuchung der Testsubstanzen UDP und UTP an den 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₆ - Einzelzellklonen H3, H4 und H6 im Calcium-Assay.....	110
Abbildung 54: Konzentrations-Effekt-Kurven von UTP und UDP an den P2Y ₆ -Rezeptor- exprimierenden Zellklonen.....	111
Abbildung 55: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FplIn-C2-P2Y ₁₁ -Einzelzellklone.....	112

Abbildung 56: Untersuchung der Testsubstanz ATP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₁ - Einzelzellklonen F6 und F8 im Calcium-Assay.....	112
Abbildung 57: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an den P2Y ₁₁ -Rezeptor-exprimierenden Zellklonen.....	113
Abbildung 58: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF157 an den P2Y ₁₁ -Rezeptor- exprimierenden Zellklonen.	114
Abbildung 59: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₂ -Einzelzellklone.....	115
Abbildung 60: Untersuchung der Testsubstanz ADP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₂ - Einzelzellklonen B2 und C5 im Calcium-Assay.	115
Abbildung 61: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP an den P2Y ₁₂ -Rezeptor-exprimierenden Zellklonen im Calcium-Assay.....	116
Abbildung 62: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₃ -Einzelzellklone.....	117
Abbildung 63: Untersuchung der Testsubstanz ADP an dem 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₃ - Einzelzellklon C5 im Calcium-Assay.....	117
Abbildung 64: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP an der P2Y ₁₃ -Rezeptor-exprimierenden Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₃ im Calcium-Assay.	118
Abbildung 65: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₄ -Einzelzellklone.....	118
Abbildung 66: Untersuchung der Testsubstanz UDP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₄ - Einzelzellklonen F4 (A) und F8 (B) im cAMP-Assay.	119
Abbildung 67: Untersuchung der Testsubstanz UDP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₄ - Einzelzellklonen F4 (A) und F8 (B) im Calcium-Assay.....	120
Abbildung 68: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP am P2Y ₂ -Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-P2Y ₂	121
Abbildung 69: Inhibition des ATP- bzw. UTP-Signals durch Suramin an den Zelllinien 1321N1- FlpIn-C2-P2Y ₂ (A) und 1321N1-P2Y ₂ (B).....	122
Abbildung 70: Ergebnis des kombinatorischen Grobscreenings für die Substanzen NF266 - NF282 ermittelt im Calcium-Assay.....	124
Abbildung 71: Chemisches Grundgerüst der NF-Substanzen mit den möglichen Variationen. 132	
Abbildung 72: Ergebnisse der Einzelscreenings der NF-Substanzen im Calcium-Assay im Antagonist-Modus.....	134
Abbildung 73: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF198, NF272, NF292 und Suramin an der Zelllinie 1321N1-P2Y ₂	136
Abbildung 74: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198, NF272 und NF292 im Calcium-Assay an der Zelllinie 1321N1-P2Y ₂	137
Abbildung 75: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198 und NF272 im Calcium- Assay an der Zelllinie HEY.	139
Abbildung 76: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF198, NF272 und Suramin an der Zelllinie HEY.....	139
Abbildung 77: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198 und NF272 im Calcium- Assay an der Zelllinie OVCAR-3.	141
Abbildung 78: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF272 und Suramin an der Zelllinie OVCAR-3.....	141
Abbildung 79: Zytotoxizität von NF198 und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien 1321N1, HEK293 und OVCAR-3.	143

Abbildung 80: Konzentrations-Effekt-Kurven von NF198 und NF272 an den Zelllinien 1321N1 (A), HEK293 (B) und OVCAR-3 (C) bestimmt mittels MTT-Assay.	144
Abbildung 81: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an der Zelllinie 1321N1-P2Y ₂ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an NF272 bestimmt im Calcium-Assay.	145
Abbildung 82: <i>Schild</i> -Plot von NF272.	146
Abbildung 83: Nicht-lineare Regression der ATP-pEC ₅₀ -Werte gegen steigende Konzentrationen an NF272.	147
Abbildung 84: <i>Clark</i> -Plot, der den Einfluss von NF272 auf den log (EC ₅₀) von ATP wider spiegelt.	147
Abbildung 85: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁	149
Abbildung 86: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₄	150
Abbildung 87: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₆	150
Abbildung 88: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₁	151
Abbildung 89: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₂	151
Abbildung 90: Ergebnis der DNA-Microarray-Analyse der Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B) hinsichtlich der Expression purinerger Rezeptoren und Nukleotidasen.	154
Abbildung 91: Agarose-Gelelektrophorese der in der PCR vermehrten Zielstrukturen (P2Y ₂ und β-Actin) für die beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3.	155
Abbildung 92: Agarose-Gelelektrophorese der in der PCR vermehrten einzelnen P2X- und P2Y-Rezeptor-Fragmente.	156
Abbildung 93: Agarose-Gelelektrophorese der durch PCR vermehrten einzelnen P2X- und P2Y-Rezeptor-Fragmente.	157
Abbildung 94: Western Blot Analyse zum Nachweis der P2Y ₁ -, P2Y ₂ - und P2X ₇ -Rezeptorproteine.	158
Abbildung 95: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien HEY und OVCAR-3 zum Nachweis der verschiedenen Rezeptorproteine (P2Y ₁ , P2Y ₂ und P2X ₇).	160
Abbildung 96: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll-Zelllinien 1321N1- FlpIn-C2-LV, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁ und 1321N1-P2Y ₂ zum Nachweis der verschiedenen Rezeptorproteine (P2Y ₁ , P2Y ₂ und P2X ₇).	160
Abbildung 97: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, ADP und UDP bestimmt an der Zelllinie HEY.	161
Abbildung 98: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, ADP und UDP bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3.	163
Abbildung 99: Inhibitorische Effekte von Suramin, NF340, NF272, AR-C118925 und A740003 im Calcium-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).	166
Abbildung 100: Konzentrations-Inhibition-Kurven von AR-C118925 an den Zelllinien HEY und OVCAR-3.	167

Abbildung 101: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP (A) und UTP (B) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.....	169
Abbildung 102: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP (A) und UTP (B) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.....	170
Abbildung 103: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, Suramin und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).....	171
Abbildung 104: Sidescatter vs. Forwardscatter Dotplot.....	173
Abbildung 105: Auswirkung einer 48-stündigen Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen ATP auf das Wachstum, hier die Zellzahl aus Quadrant II (Q II), der HEY-Zellen (A) und OVCAR-3-Zellen (B).	174
Abbildung 106: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von ATP auf die Viabilität der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen.....	175
Abbildung 107: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von UTP und ADP auf die Viabilität der HEY-Zellen.	176
Abbildung 108: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von UTP und ADP auf die Viabilität der OVCAR-3-Zellen.....	177
Abbildung 109: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.....	178
Abbildung 110: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.	179
Abbildung 111: Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin (A), Topotecan (B) oder Paclitaxel (C) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.	182
Abbildung 112: Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin (A), Topotecan (B) oder Paclitaxel (C) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.....	183
Abbildung 113: Einfluss von UTP (A), ADP (B) bzw. UDP (C) auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.....	186
Abbildung 114: Einfluss von UTP (A), ADP (B) bzw. UDP (C) auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.	187
Abbildung 115: Zeitabhängiger Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.	189
Abbildung 116: Zeitabhängiger Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.....	191
Abbildung 117: Zeitabhängiger Einfluss von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.	193
Abbildung 118: Zeitabhängiger Einfluss von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3.....	195
Abbildung 119: Effekt von Suramin auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.....	198
Abbildung 120: Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY.....	200
Abbildung 121: Effekt von NF272 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).	201
Abbildung 122: Effekt von 250 µM NF272 auf die durch 200 µM ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.	203

Abbildung 123: Effekt von 250 μ M NF272 auf die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.204	
Abbildung 124: Effekt von AR-C118925 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).....	205
Abbildung 125: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die durch 100 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.206	
Abbildung 126: Effekt von 50 μ M AR-C118925 auf die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.207	
Abbildung 127: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die durch 100 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay.....	208
Abbildung 128: Effekt von 50 μ M AR-C118925 auf die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay.....	209
Abbildung 129: Effekt von 200 μ M NF272 auf die durch 200 μ M ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.211	
Abbildung 130: Effekt von 100 μ M MRS2211 auf die durch 100 μ M ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay.212	
Abbildung 131: Effekt von ATP auf die Apoptose-Induktion in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).....	214
Abbildung 132: Induktion von Apoptose in der Zelllinie HEY.	215
Abbildung 133: Induktion von Apoptose in der Zelllinie HEY.	216
Abbildung 134: Untersuchungen zur Caspase 3/7-Aktivierung in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).....	217
Abbildung 135: Untersuchungen zur Caspase 3/7-Aktivierung in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B).....	218
Abbildung 136: Zellzyklusverteilung in der Zelllinie HEY.	220
Abbildung 137: Effekt von ATP (A) bzw. von Cisplatin + ATP (B) auf die Zellzyklusverteilung in der Zelllinie HEY.....	221
Abbildung 138: Zellzyklusverteilung in der Zelllinie OVCAR-3	223
Abbildung 139: Effekt von ATP (A) bzw. von Cisplatin + ATP (B) auf die Zellzyklusverteilung in der Zelllinie OVCAR-3.....	225
Abbildung 140: Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen in HEY-Zellen mittels Markierung von γ H2AX-Foci.....	227
Abbildung 141: Anzahl der γ H2AX Foci pro Zellkern.....	227
Abbildung 142: Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen in OVCAR-3-Zellen mittels Markierung von γ H2AX-Foci.....	228
Abbildung 143: Anzahl der γ H2AX Foci pro Zellkern.....	228
Abbildung 144: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine EGF-R und pEGF-R an der Zelllinie HEY.	229
Abbildung 145: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine EGF-R und pEGF-R an der Zelllinie OVCAR-3.....	230
Abbildung 146: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine pEGF-R und mTOR an der Zelllinie HEY.	231

Abbildung 147: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine pEGF-R und mTOR an der Zelllinie OVCAR-3.....	231
Abbildung 148: Strukturformeln der sechs potentiellen P2Y ₂ -Rezeptor-Antagonisten NF059, NF099, NF198, NF272, NF292 und NF293.....	237
Abbildung 149: Unterschied zwischen dem „großen“ Harnstoff vom Suramin-Typ und dem „kleinen“ Harnstoff vom NF340-Typ.	238
Abbildung 150: Computer-generiertes Modell des P2Y ₂ -Rezeptors.....	239
Abbildung 151: Zusammenfassung dieser Arbeit.	255

Formelverzeichnis

Formel 1	34
Formel 2	48
Formel 3	54
Formel 4	66
Formel 5	66
Formel 6	75
Formel 7	76
Formel 8	76
Formel 9	76
Formel 10	77
Formel 11	77
Formel 12	77
Formel 13	77
Formel 14	78
Formel 15	78
Formel 16	78

1 Einleitung

1.1 ATP, purinerge Rezeptoren und Tumorerkrankungen

Adenosintriphosphat, kurz ATP (siehe Abbildung 1), wurde über Jahre ausschließlich im Rahmen seiner Funktion als Energielieferant in lebenden Zellen betrachtet. ATP besteht aus der Purinbase Adenin, welche N-glykosidisch mit einer β -D-Ribose verknüpft ist. An diesen Adenosinbaustein sind wiederum drei Phosphatreste gebunden, wodurch zwei energiereiche Phosphorsäureanhydrid-Bindungen im Molekül enthalten sind, so dass ATP über ein hohes Übertragungspotential für Phosphatgruppen verfügt.

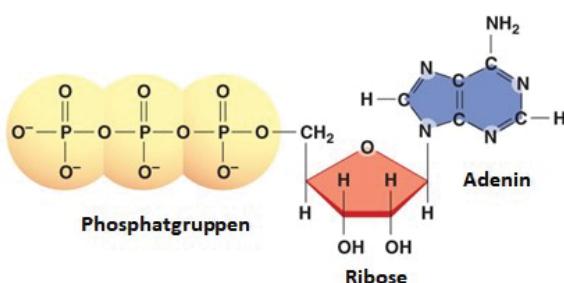


Abbildung 1: Chemische Struktur von Adenosintriphosphat. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (1).

Heute ist bekannt, dass ATP mehrere Aufgaben und Funktionen im lebenden Organismus übernimmt. Extrazelluläres ATP spielt ebenso eine Rolle im Bereich der Neurotransmission, bei der endokrinen und exokrinen Sekretion, bei der Kontraktion glatter Muskelzellen, des Knochenmetabolismus, im Rahmen der Zellproliferation bzw. im Entzündungsgeschehen oder im Bereich der Immunität. Ihm wird aber auch eine fundamentale physiologische Funktion als pleiotroper, extrazellulärer Signaltransmitter im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation zugesprochen. Hier wirkt ATP über Plasmamembranrezeptoren, den sogenannten purinergen Rezeptoren (2,3). Die Familie dieser purinergen Rezeptoren besteht aus den Adenosin-sensitiven P1- und den Nukleotid-sensitiven P2-Rezeptoren, wobei die P2-Rezeptoren in die P2Y- und die P2X-Unterfamilien gegliedert werden (3–7).

Die Affinität extrazellulärer Nukleotide für die einzelnen Rezeptorsubtypen bewegt sich vom unteren nanomolaren Bereich (P2Y-Rezeptoren) bis hin zum oberen mikromolaren bzw. unteren millimolaren Bereich (beispielsweise für den P2X₇-Rezeptor) (2,3,8). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der einzelnen P2-Rezeptoren in den verschiedensten Gewebetypen (siehe Tabelle 2 - Tabelle 3) stellt dieses Kommunikationssystem eines der vielseitigsten und häufig

verwendeten Signaltransduktionssysteme im menschlichen Körper dar. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass extrazelluläres ATP, Adenosindiphosphat (ADP) oder auch Uridintriphosphat (UTP) an verschiedenen Vorgängen wie der Zellproliferation, der Migration und Differenzierung von Zellen, der Neurotransmitter- bzw. Zytokinfreisetzung oder auch an nekrotischen bzw. apoptotischen Vorgängen beteiligt sind. Darüber hinaus spielt das purinerge Kommunikationssystem bei wichtigen (patho-) physiologischen Vorgängen wie der embryonalen Entwicklung, der Reifung des Immunsystems, der Neurodegeneration oder auch bei der Entstehung von Entzündungen oder Karzinomen eine Rolle (3,7,9,10). Nukleotide stellen ideale Signalmoleküle dar. Sie kommen hoch konzentriert im Zytoplasma der Zelle vor, sind aber nahezu abwesend im extrazellulären Raum (2,3,11,12). Nukleotide sind geladene Moleküle, welche durch spezifische Enzymsysteme rasch abgebaut werden können. Das System, welches die Nukleotide abbaut, spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der purinernen Zellkommunikation. Denn durch den Abbau von ATP wird einerseits die P2-Rezeptor-assoziierte Kommunikation beendet, anderseits entsteht mit dem Abbauprodukt Adenosin ein weiteres starkes Signalmolekül, welches mit den P1-Rezeptoren interagiert. An der Hydrolyse von ATP und somit an der Entstehung von Adenosin sind unter anderem die ubiquitär vorkommenden Ektonukleotidasen CD39 und CD73 beteiligt. CD39 (= ENTPDase 1), als plasmamembrangebundenes Enzym, wandelt ATP und auch ADP zu Adenosinmonophosphat (AMP) um. CD73 (= 5'Ektonukleotidase), welche auf der Außenseite der Plasmamembran exprimiert wird, wandelt dann AMP zu Adenosin um, siehe Abbildung 2 (2,3,12,13). Die Konzentration an extrazellulärem ATP kann somit infolge einer erhöhten ATP-Freisetzung aus dem Zellinneren oder einer verminderten ATP-Hydrolyse variieren. Intrazellulär liegt ATP in einer Konzentration von 3 - 10 mM vor, die extrazelluläre ATP-Konzentration liegt deutlich darunter (2,3,8,14). Beispielweise wurde beschrieben, dass die physiologische ATP-Konzentration im menschlichen Blut bei 10 - 100 nM liegt (8,12,15–17). ATP kann aufgrund des zuvor beschriebenen chemischen Konzentrationsgradienten sowohl per passiven Efflux in den extrazellulären Raum gelangen (2,8) als auch durch eine ganze Reihe ATP-permeabler Kanäle, siehe Abbildung 2. Hierzu zählen unter anderem spannungsgesteuerte Anionenkanäle (z.B. Chloridkanäle) (2,3,12,18), ABC-Transporter (2,3,12,19), Connexine (3,12,20,21) und Pannexine (3,12,22) oder auch der P2X₇-Rezeptor (3,23) selbst. Außerdem kann ATP durch vesikuläre Abschnürung aus Mastzellen, Thrombozyten und Neuronen oder per Exozytose aus jeder entsprechend stimulierten Zelle freigesetzt werden (3,8,21). Die extrazelluläre ATP-Konzentration kann somit als Folge jedweder Zellbeeinflussung, sei es durch physiologische, chemische oder biologische Stimuli oder durch verletzte bzw. nekrotische Zellen auf mikromolare Konzentration erhöht werden. Dies ist oft auch der Fall bei ver-

schiedenen krankhaften Zuständen wie beispielsweise Ischämie, Hypoxie, Krebs oder Entzündungen (2,3,8,12).

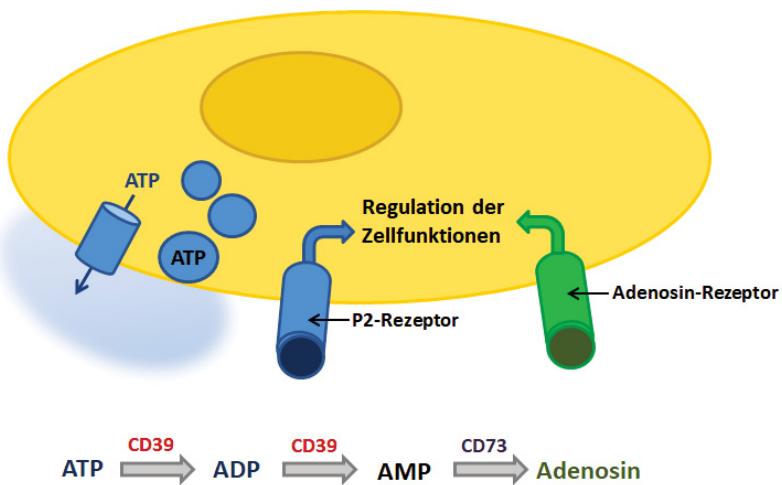


Abbildung 2: Schematische zelluläre Modellvorstellung zum auto- bzw. parakrinen purinergen Signaltransduktionsweg. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (13).

Die Zellen kommunizieren so entweder durch autokrine oder durch parakrine Freisetzung von ATP. Autokrin bedeutet in dem Fall, dass ATP mit purinergen Rezeptoren interagiert, welche sich selbst auf der Membran der ATP-freisetzenden Zelle befinden. Bei der parakrinen Kommunikation werden entsprechende P2-Rezeptoren auf anderen als der ATP-freisetzenden Zelle aktiviert (13) .

1.1.1 Purinerge Rezeptoren

Das Konzept der purinergen Zellkommunikation postulierte *Geoffery Burnstock* erstmals im Jahr 1972 (3,13,24,25). Bereits 1978 beschrieb er die beiden verschiedenen purinergen Rezeptorfamilien, die P1- (Adenosin-) und die P2- (ATP- / ADP-) Rezeptoren (25). Letztere wurden im Jahr 1985 in die ionotropen P2X- und in die metabotropen P2Y-Rezeptoren weiter untergliedert (26). Zu Beginn der 1990er Jahre wurden die ersten purin- und pyrimidin-sensitiven Rezeptoren geklont und charakterisiert, so dass gut 20 Jahre später das Konzept der purinergen Zellkommunikation weltweite Anerkennung fand (3,25–27). Bis heute wurden vier P1-Rezeptorsubtypen (P1A₁, P1A_{2A}, P1A_{2B}, P1A₃), sieben P2X-Rezeptorsubtypen (P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇) sowie acht P2Y-Rezeptorsubtypen (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) kloniert und charakterisiert (3,7,25,26). Außerdem wurden bereits für einzelne Rezeptorsubtypen selektive Agonisten und Antagonisten identifiziert, siehe Tabelle 1 - Tabelle

3. Die P1-Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die beiden Subtypen P1A₁ und P1A₃ koppeln an ein G_{i/o}-Protein. Ihre Aktivierung inhibiert die Adenylylzyklase und reduziert somit die Aktivität der Proteinkinase A, so dass in der Folge die intrazelluläre Konzentration an cyclischem AMP (cAMP) sinkt. Ebenso stehen diese beiden Rezeptorsubtypen mit weiteren Signalwegen (wie PI3K, MAPK, PKC) in Verbindung (3,28). Der P1A_{2A}- und der P1A_{2B}-Rezeptor koppeln an ein G_s-Protein, wodurch die Adenylylzyklase und die Proteinkinase A aktiviert werden, so dass der intrazelluläre Spiegel an cAMP steigt. Weiter werden der MAPK- und der PKC-Signalweg ebenfalls aktiviert. Normalerweise werden die Adenosin-Rezeptoren bereits durch physiologisch vorliegende Konzentrationen an Adenosin (30 - 300 nM) stimuliert. Nur der P1A_{2B}-Rezeptor erfordert für seine Aktivierung deutlich höhere Adenosin-Konzentrationen von 1000 nM, so wie sie üblicherweise unter pathologischen Bedingungen entstehen (3,28).

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der P1-Rezeptoren (29).

Rezeptor-Subtyp	Hauptvorkommen im menschlichen Gewebe	Potenz von Adenosin (EC ₅₀)	Antagonisten
P1A ₁	Gehirn, Herz, Niere, Lunge	1 - 10 nM	WRC-0571, PSB-36
P1A _{2A}	ZNS, Thymus, Herz, Lunge, Milz, Leukozyten	30 nM	SCH442416
P1A _{2B}	Glatte Muskelzellen der Bronchien, Jejunum, Ileum, Kolon	1000 nM	PSB-603, MRS1754
P1A ₃	Leber, Lunge, Plazenta, Milz, Nebennieren	100 nM	MRS1523, MRS1191,

Den P2-Rezeptoren ist gemein, dass ihre Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration führt. Über P2X-Rezeptoren gelangt extrazelluläres Calcium (Ca²⁺) in die Zelle und über P2Y-Rezeptoren werden Calciumionen (Ca²⁺) aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum, in das Zytosol freigesetzt (3,25).

Die Familie der ligandgesteuerten P2X-Ionenkanäle reagieren alle vornehmlich auf ATP als nativen Liganden (2,3,29), sie weisen aber unterschiedliche Affinitäten für ATP von niedrigen mikromolaren bis hin zu unteren millimolaren Konzentrationen auf (siehe Tabelle 2). Sie sind hauptsächlich verantwortlich für die schnelle Kommunikation der Astrozyten untereinander. Drei P2X-Rezeptoreinheiten, entweder als homo- oder als heterotrimer vorliegend, formen dabei eine Kationenpore, so dass Natrium- als auch Calciumionen in die Zelle und Kaliumionen aus der Zelle gelangen können (3,25,28), siehe Abbildung 3. Bislang sind sechs Homomere (P2X₁₋₅ und P2X₇) und sechs Heteromere (P2X_{1/2}, P2X_{1/4}, P1X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} und P2X_{4/6}) beschrieben (28). Der als Homotrimer vorliegende P2X₇-Rezeptor stellt einen etwas atypischen Vertreter dar. Zum einen verfügt er über einen längeren Carboxylterminus und zum anderen existieren deutlich mehr Polymorphismen bzw. Splicevarianten für dieses Gen (28). Durch

niedrige ATP-Konzentrationen wird der P2X₇-Rezeptor aktiviert und bildet eine für kleine Ionen durchlässige Pore. Höhere Konzentrationen an ATP bewirken, dass sich eine Pore formiert, welche für Moleküle bis zu einer Größe von 900 kDa durchlässig ist und so schlussendlich den apoptotischen Untergang der Zelle einleitet (3,8,12,28).

Tabelle 2: Charakteristische Merkmale der P2X-Rezeptoren (8,26,29,30). „/“ = nicht bekannt.

Rezeptor-Subtyp	Hauptvorkommen im menschlichen Gewebe	Potenz von ATP (EC_{50})	Antagonisten
P2X ₁	Glatte Muskelzellen, ZNS, Thrombozyten, Kleinhirn	0,1 - 0,7 μ M	TNP-ATP, IP51, NF023, NF449
P2X ₂	Glatte Muskelzellen, ZNS, Retina, Pankreas, Ganglien (autonome und sensorische)	2 - 8 μ M	Suramin, RB-2, NF770, PSB-1011, NF778
P2X ₃	Sensorische Neuronen, ZNS	~1 μ M	TNP-ATP, Iso-PPADS, A317491, NF110, RN-1838, Spinorphin, AF353, AF219
P2X ₄	ZNS, Hoden, Kolon, Endothelzellen	1 - 10 μ M	TNP-ATP, BBG, Paroxetin, Phenolphthalein
P2X ₅	Skelettmuskelzellen, Thymus, Haut, Blase, Darm	0,5 μ M	Suramin, PPADS, BBG
P2X ₆	ZNS, periphere Nerven	/	/
P2X ₇	Immunzellen, Haut, Pankreas	2 - 4 mM	MRS2427, BBG, A-740003, A-438079, GSK-1370319

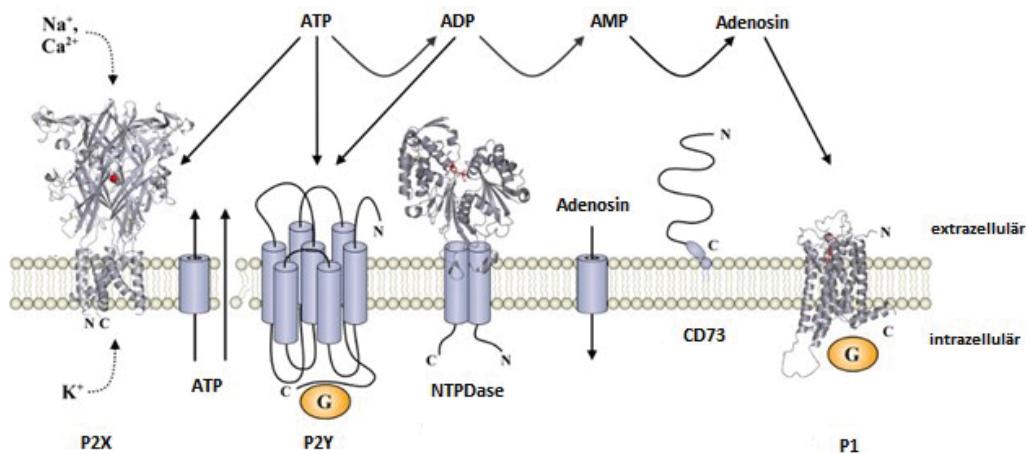


Abbildung 3: Schematische Darstellung der purinergen Signaltransduktionswege. ATP bindet entweder an P2X- oder P2Y-Rezeptoren oder wird durch NTPDase (CD39) und CD73 zu Adenosin abgebaut, welches wiederum an P1-Rezeptoren bindet. Adenosin kann außerdem durch entsprechende Uptake-Mechanismen ins Zellinnere gelangen, ATP kann wiederrum durch Transporter oder andere Mechanismen in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (31).

Die metabotropen P2Y-Rezeptoren vermitteln vorwiegend Langzeiteffekte im Rahmen der Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder des Zelltods sowie bei der embryonalen Entwicklung, der Knochenbildung bzw. -resorption, dem vaskulären Umbau arteriosklerotischer Stenosen oder auch in Teilen des Tumorgeschehens. Ebenso werden aber auch Kurzzeiteffekte im Bereich der Neurotransmission, Neuromodulation, der Sekretion oder der Thrombozytenaggregation vermittelt (26). Diese GPCRs bestehen aus sieben hydrophoben transmembranären Einheiten, welche über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (6). Die Proteine dieser Rezeptoren bestehen aus 328 – 377 Aminosäuren, wobei das C-terminale Ende intrazellulär und das N-terminale Ende extrazellulär liegt, und weisen eine molekulare Masse von 41 - 53 kDa auf (5), siehe Abbildung 3. Sie formen sowohl Homo- als auch Heteromere. Beispielsweise ist ein Dimer bestehend aus dem P2Y₁- und dem P1A₁-Rezeptor in der Literatur beschrieben und es gibt Hinweise, dass P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆- und auch P2Y₁₁-Rezeptoren als Homodimere vorliegen können (6). Die P2Y-Rezeptoren werden weiter unterteilt in die fünf Subtypen (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁), welche an ein G_q/G₁₁-Protein koppeln, die durch Aktivierung des Phospholipase C- und des Inositoltriphosphat-Signalwegs die intrazelluläre Konzentration an Calciumionen erhöhen. Und in die drei Subtypen (P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄), welche an ein G_{i/o}-Protein koppeln, die durch Inhibierung der Adenylylzyklase den cAMP-Spiegel in der Zelle senken bzw. Ionenkanäle modulieren (3,28).

Tabelle 3: Charakteristische Merkmale der P2Y-Rezeptoren (6,8,26,32).

Rezeptor-Subtyp	Hauptvorkommen im menschlichen Gewebe	Agonisten	Antagonisten
P2Y ₁	Epithel- und Endothelzellen, Thrombozyten, Immunzellen, Gehirn, Osteoklasten	MRS2365 > 2-MeSADP > ADP = ADP β S	MRS2500 > MRS2279 > MRS2179
P2Y ₂	Epithel- und Endothelzellen, Immunzellen, Niere, Osteoblasten	PSB1114 > UTP = MRS2698 \geq ATP > INS37217 > Ap4A > ATP γ S	AR-C118925 > Suramin > RB-2, PBS-716
P2Y ₄	Endothelzellen, Plazenta, Milz, Thymus	UTP > UTP γ S	RB-2 > Suramin > MRS2577, PPADS
P2Y ₆	Plazenta, T-Zellen, Thymus, Epithelzellen	5-OMe-UDP(a-B) > MRS2693 > PSB0474 > UDP > UTP > ATP	MRS2578 > RB-2, PPADS
P2Y ₁₁	Milz, Gehirn, Granulozyten,	ATP γ S = BzATP > NF546 > ARC67085 > ATP	NF340 > NF157 > Suramin > RB-2
P2Y ₁₂	Thrombozyten, Gehirn, Gliazellen	2-Methylthio-ADP > ADP > ATP	Clopidogrel, Ticlopidin, Ticagrelor, Cangrelor Prasugrel
P2Y ₁₃	Milz, Gehirn, Lymphknoten, Knochenmark, Erythrozyten	ADP = 2-Methylthio-ADP > ADP β S	MRS2211
P2Y ₁₄	Plazenta, adipöses Gewebe, Magen	α, β -Methyl-2-thio-UDP > MRS2690 > UDP = UDP-Glucose	PPTN

Der P2Y₁-Rezeptor wird durch ADP aktiviert, demgegenüber stellen am P2Y₂-Rezeptor ATP und UTP ungefähr äquipotente physiologische Agonisten dar. Der P2Y₄- und der P2Y₆-Rezeptor

reagieren bevorzugt auf eine Stimulation mit Uridinnukleotiden, d. h. UTP am P2Y₄-Rezeptor bzw. Uridindiphosphat (UDP) am P2Y₆-Rezeptor. Der P2Y₁₁-Rezeptor wird selektiv durch ATP und die Rezeptoren P2Y₁₂ und P2Y₁₃ werden selektiv durch ADP aktiviert. Der P2Y₁₄-Rezeptor wiederum ist sensitiv für UDP-Glucose oder UDP-Galactose (2–5).

Abbildung 4 veranschaulicht schematisch, inwieweit purinerge Rezeptoren zur Vermittlung von Langzeiteffekten mit verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden verbunden sind. Nach Bindung eines Liganden werden je nach G-Protein-Kopplung verschiedene Effektormoleküle wie die Adenylylzyklase, GTPasen, Phospholipase C, D oder A aktiviert. Dadurch werden wiederum verschiedene Second-Messenger-Moleküle generiert und bzw. oder verschiedene Proteinkinasen stimuliert, welche über Modulation einzelner Transkriptionsfaktoren im Zellkern die Genexpression beeinflussen. Effekte wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration, Wachstumsstopp, Apoptose oder auch Nekrose werden so gesteuert (3,25,33).

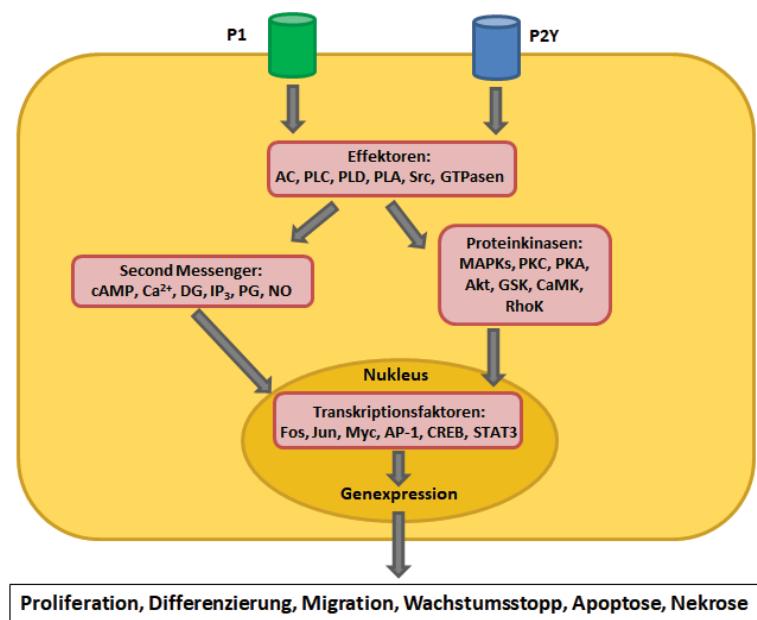


Abbildung 4: Schematische Übersicht zu den Mechanismen der purinergen Signaltransduktionswege. Auszüge sind hier gezeigt, die involvierten Transkriptionsfaktoren sind deutlich komplexer als hier dargestellt. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (25,33).

AC: Adenylylzyklase, AP-1: Aktivatorprotein-1, CaMK: Calcium/Calmodulin-Proteinkinase, CREB: cAMP-response binding element, DG: Diacylglycerol, GSK: Glycogensynthasekinase, IP₃: Inositoltriphosphat, MAPKs: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, NO: Stickstoffmonoxid, PG: Prostaglandin, PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase, PLC: Phospholipase C, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PLD: Phospholipase D, PLA: Phospholipase A, STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in nahezu allen menschlichen Geweben, siehe Tabelle 1 - Tabelle 3, sind die purinergen Rezeptoren an einer Vielzahl physiologischer und wahrscheinlich auch pathophysiologischer Vorgänge im Körper beteiligt. Beispielsweise wird die

Aggregation der Thrombozyten im Blut ADP-vermittelt über den P2Y₁- und den P2Y₁₂-Rezeptor auf den Thrombozyten gesteuert. Der P2Y₁-Rezeptor ist dabei verantwortlich für die initiale Formänderung des Thrombozyten und die vorübergehende Aggregation. Der P2Y₁₂-Rezeptor demgegenüber steuert die anhaltende Thrombozytenaggregation (34). Ebenso wird die epitheliale Hydratation durch P2Y-Rezeptoren reguliert. ATP und UTP stimulieren hier die Sekretion von Chlorid und Wasser aus epithelialen Zellen. In Maus-Knockout-Modellen wurde gezeigt, dass diese Effekte in den Atemwegen über den P2Y₂-Rezeptor und im Darm über den P2Y₄-Rezeptor vermittelt werden (34). Im Bereich der Knochenresorption und -formation sind ebenfalls einzelne P2Y-Rezeptoren involviert. So wird die Mineralisierung des Knochens durch ATP über den P2Y₂ Rezeptor inhibiert. Die Aktivität der Osteoklasten sowie die Knochenresorption wird über P2Y₁-Rezeptoren gesteuert (25). In P2Y₁₃-Knockout-Mäusen wurde eine erniedrigte Anzahl an Osteoblasten und Osteoklasten beobachtet (34). Aufgrund weitgehend fehlender potenter und selektiver P2-Rezeptorliganden war es bis dato nur schwer möglich, die physiologischen und auch pathophysiologischen Funktionen der einzelnen Rezeptorsubtypen eindeutig zu evaluieren (26,35,36). Eine Auswahl bereits veröffentlichter Liganden ist in Tabelle 1 - Tabelle 3 gezeigt. Aktuell gibt es nur einige wenige klinisch relevante P2-Liganden. Mit Clopidogrel (Plavix®) als irreversiblem P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonist wurde nach Ticlopidin (Tyklid®, 1993) 1998 einer der heute meist verordneten Thrombozytenaggregationshemmer in Deutschland in den Arzneimittelmarkt eingeführt. Clopidogrel ist indiziert zur Sekundärprävention atherothrombotischer Ereignisse, wie Herzinfarkt, ischämischer Schlaganfall, nachgewiesener peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder zur Prävention atherothrombotischer und thrombotischer Ereignisse bei Vorhofflimmern. Weitere Verbindungen wurden seit dem erfolgreich entwickelt und mit Cangrelor (Kengrexal®, 2015), Ticagrelor (Brilique®, 2010) und Prasugrel (Efient®, 2009) erhielten bereits drei weitere P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten in Deutschland eine entsprechende Zulassung als Arzneimittel (37). Diquafosol (Diquas®, 2010) ist ein Agonist am P2Y₂-Rezeptor und sowohl in Japan als auch in Korea zur Behandlung der Keratoconjunctivitis sicca (= Syndrom des trockenen Auges) zugelassen (37). Verschiedenste oral bioverfügbare P2X₃-Rezeptor-Antagonisten befinden sich derzeit in klinischen Studien. Mit Gefapixant (AF-219) steht ein aussichtsreicher Kandidat zur Behandlung des refraktären chronischen Hustens aktuell kurz vor der Zulassung (30,38,39). Klinische Interventionen, welche purinerge Rezeptoren als Zielstrukturen aufweisen und somit das purinerge Signaltransduktionssystem modulieren, bergen ein großes therapeutisches Potential.

1.1.2 P2Y₂-Rezeptor

Der P2Y₂-Rezeptor wurde 1993 erstmals von *Lustig et al.* kloniert (26) und wird durch die beiden physiologischen Agonisten ATP und UTP aktiviert (5,6,32,40). Abbildung 5 zeigt die hypothetische zweidimensionale Struktur des P2Y₂-Rezeptors, aus der auch der typische Aufbau eines GPCRs mit seinen sieben transmembranären Domänen, den drei extra- und drei intrazellulären Schleifen und dem N-terminalen Ende auf der extrazellulären bzw. dem C-terminalen Ende auf der intrazellulären Seite hervorgeht. Die an der G-Protein-Bindung beteiligten intrazellulären Schleifen sowie die positiv geladenen Aminosäurereste, welche in die Agonistbindung involviert sind (in Orange dargestellt), sind ebenfalls gekennzeichnet. Das Rezeptorprotein ist außerdem dazu befähigt zwei Disulfidbrücken zwischen entsprechenden Cysteinresten auszubilden (C25 – C278 bzw. C106 – C183, in der Abbildung nicht gezeigt), welche wiederum essential für die Rezeptorfunktion sind (5,41).

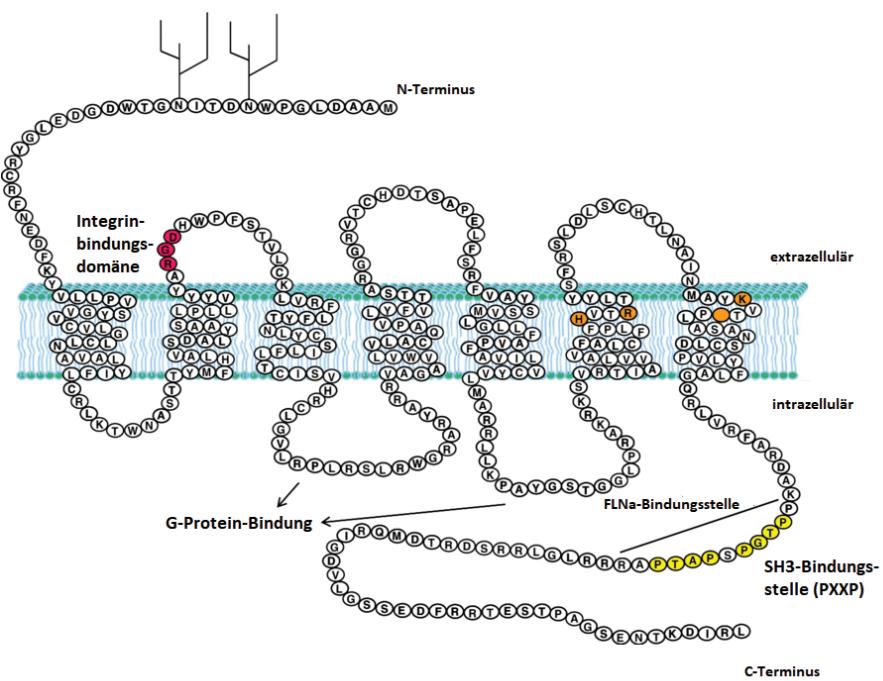


Abbildung 5: Zweidimensionale Struktur des humanen P2Y₂-Rezeptors. Hervorgehoben ist die RGD-Integrin-bindungsdomäne in Rot; die positiv geladenen Aminosäurereste, welche an der Bindung von ATP/UTP beteiligt sind, in Orange; die beiden PXXP-Motive der SH3-Bindungstellen in Gelb; sowie die FLNa-Bindungsstelle als auch die beiden intrazellulären Schleifen, welche die Bindung des G-Proteins regulieren. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (14,42).

Die Aktivierung dieses G_q-gekoppelten Rezeptors stimuliert die Phospholipase C, was zur Produktion der Second-Messenger-Moleküle IP₃ und DAG führt, welche wiederum die Proteinkinase C aktivieren oder veranlassen, dass Calciumionen aus intrazellulären Speichern wie dem

endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden (14). Außerdem verfügt der P2Y₂-Rezeptor über ein Arg-Gly-Asp (RGD)-Motiv in der ersten extrazellulären Schleife (in Rot dargestellt, siehe Abbildung 5), weshalb er Integrine ($\alpha\beta_{3/5}$) binden kann. So werden nach Agonist-Bindung nun ebenfalls G₀- und G₁₂-Proteine stimuliert, welche zur Aktivierung von kleineren GTPasen wie Rac und Rho führen. In der Folge wird das Zytoskelett neu bzw. umgeordnet und die Zellmigration erhöht (14,42,43). In der intrazellulären C-terminalen Domäne finden sich zwei prolinreiche Peptidsequenzen PXXP (P = Prolin, X = eine beliebige Aminosäure), welche als Bindungsstelle für Src-Homologie-3 (SH3) fungieren (in Gelb dargestellt, siehe Abbildung 5). Hierüber wird die Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGF-R) induziert (14,42,43). Bekannt ist weiter, dass Src-vermittelt über die Transaktivierung des phosphorylierten EGF-Rezeptors das MAP-Kinasen-System stimuliert wird, welches wiederum die Gentranskription reguliert (14,43). Außerdem wurde gezeigt, dass der P2Y₂-Rezeptor direkt mit Filamin A (FLNa) interagiert, welches an der Quervernetzung der Aktinfilamente im Zytoskelett beteiligt ist (14). *Peterson et al.* zeigten, dass in Gliazellen P2Y₂-Rezeptor-vermittelt verschiedene Signalwege via Aktivierung von Integrinen, des EGF-Rezeptors oder der Phospholipase C reguliert werden, was wiederum die Zellproliferation bzw. Zellmigration und die Umstrukturierung des Zytoskeletts fördert (14). P2Y₂-Rezeptoren sind ubiquitär im menschlichen Körper vorkommend. Sie wurden auf Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und auf Kardiomyozyten aber auch im Gehirn, Herz, Leber, Milz oder der Plazenta nachgewiesen (6,14). Somit ist es nicht verwunderlich, dass die P2Y₂-Rezeptoren an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen im Körper beteiligt sind. In epithelialen Geweben wird die Regulation des Ionentransports über den P2Y₂-Rezeptor gesteuert. In den Atemwegen ist er weitgehend verantwortlich für die mukoziliäre Clearance (6,44). Des Weiteren übernimmt er wichtige Aufgaben im Bereich des Immunsystems (6) und des Knochenmetabolismus (25). Außerdem scheint der P2Y₂-Rezeptor die Zellproliferation zu modulieren und den Zellzyklus zu regulieren (41,45). Aktuell wird der P2Y₂-Rezeptor als klinisch therapeutisches Target im Bereich der Arteriosklerose (46–48), im Entzündungsgeschehen (inklusive Lungenentzündungen) (49–52), Zystischer Fibrose (53,54), Syndrom des trockenen Auges (55,56), bei Bluthochdruck (57), Schmerz (58,59) sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen (42) oder Krebserkrankungen (60–67) diskutiert. Derzeit gibt es mit dem Dinukleosidtetraphosphat Diquafosol (Diquas®, 2010), siehe Kapitel 1.1.1, nur einen zugelassen Arzneistoff auf dem ausländischen Markt. Mit Denufosol, welches zur Behandlung der Zystischen Fibrose eingesetzt wurde, um die mukozilliäre Clearance zu verbessern, befand sich ein weiterer aussichtsreicher P2Y₂-Rezeptoragonist in klinischen Studien (53,54). Allerdings wurden die klinischen Untersuchungen in Phase 3 aufgrund

ausbleibender signifikanter Effekte letztendlich abgebrochen (34,68).

Um die genauen (patho-) physiologischen Funktionen des P2Y₂-Rezeptors und sein therapeutisches Potenzial zu evaluieren, stehen derzeit nur wenige potente und selektive Liganden, vorwiegend Antagonisten, zur Verfügung. Suramin und Reactive Blue 2 (RB-2), siehe Abbildung 6, sind zwei literaturbekannte Antagonisten am P2Y₂-Rezeptor (5,36,40), welche allerdings weder potent noch selektiv sind (40).

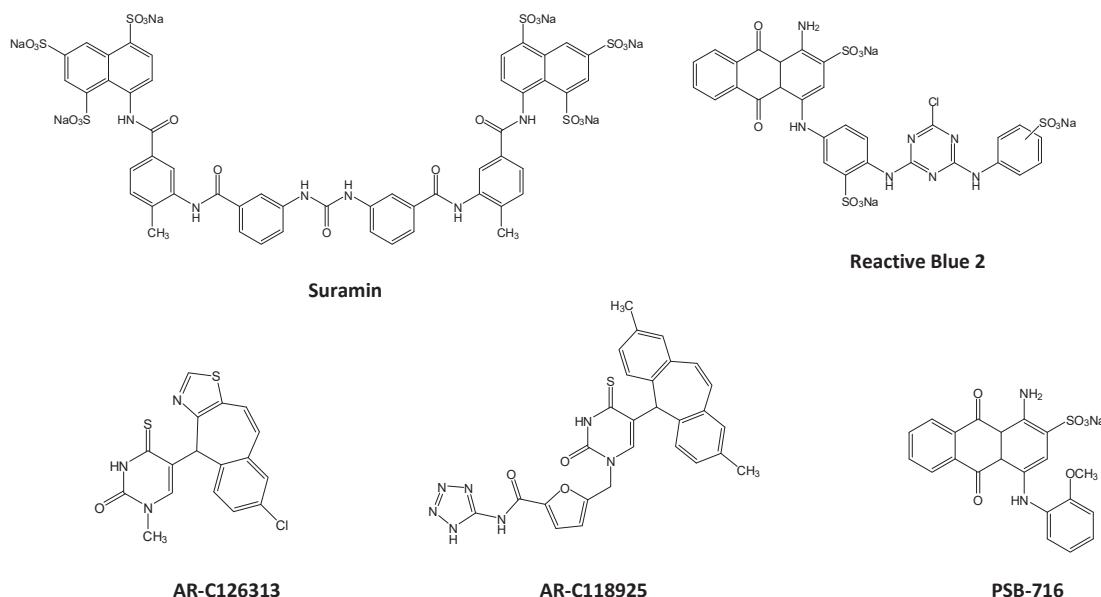


Abbildung 6: Strukturformeln literaturbekannter P2Y₂ Rezeptor-Antagonisten.

Suramin, ein polysulfonierte Naphthalenderivat, weist eine IC₅₀ von 50 µM am P2Y₂-Rezeptor auf. RB-2, ein polysulfonierte Anthrachinon-Derivat, ist dagegen ein potenterer P2Y₂-Antagonist mit einer IC₅₀ von etwa 1 µM (40). Alle bis dato bekannten Vorbild-Strukturen zur Entwicklung von P2Y₂-Rezeptorliganden weisen verschiedene Nachteile wie Instabilität (ATP, UTP), fehlende Selektivität (Suramin, RB-2), hohes Molekulargewicht (Suramin), eine permanente negative Ladung (ATP, UTP, Suramin, RB-2) oder eine hohe chemische Reaktivität (RB-2) auf (40). Nach *Lipinski* sind Moleküle, welche über hohe molekulare Massen und permanente Ladung verfügen, aufgrund ihrer schlechten Membranpermeabilität, ihrer schlechten Desolvatation und damit verbundenen mangelnden Resorbierbarkeit als klinische Wirkstoffe ungeeignet, da solche Substanzen im aktiven Zentrum nicht ausreichend anflutten können (44,69). Erstrebenswerte Eigenschaften neuer P2Y₂-Rezeptorliganden sind unter anderem ein niedriges Molekulargewicht, hohe Stabilität, keine enthaltenen Phosphat-, Phosphonat- oder Sulfonatgruppen sowie eine hohe perorale Bioverfügbarkeit (40). *Weyler et al.* (70) veröffentlichten 2008 mit dem RB-2-Derivat PSB-716 einen moderat potenteren P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten, welcher eine IC₅₀ von 9 µM aufweist, siehe Abbildung 6. Abgeleitet vom UTP wurden das Thio-

uracil-Derivat AR-C126313 und sein Analogon AR-C118925 als selektive und potente Antagonisten am P2Y₂-Rezeptor 2002 von *Meghani et al.* beschrieben (36,40,45,71). 2017 wurden weitere Details zu dem Antagonisten AR-C118925 veröffentlicht. *Rafehi et al.* stellen die Verbindung als nanomolar-potenten ($IC_{50} = 57,4$ nM) und selektiven Antagonisten vor, welcher kompetitiv den P2Y₂-Rezeptor blockiert ($pA_2 = pK_B = 10^{-7,43}$ nM, entsprechend 37,2 nM) (45). Die Entwicklung weiterer bzw. das Durchsuchen großer Substanzbibliotheken nach potenzen, selektiven und nicht toxischen P2Y₂-Liganden ist immer noch von großem Interesse, denn der P2Y₂-Rezeptor scheint ein neues vielversprechendes therapeutisches Target für eine Reihe von Erkrankungen darzustellen.

1.1.3 P2-Rezeptoren und Krebserkrankungen

Aktuell wird die Rolle verschiedener P2-Rezeptoren im Tumorgeschehen, d. h. bei der Entstehung von Krebs und der Migration bzw. Metastasierung von Krebszellen diskutiert (siehe Abbildung 7) (8,12,66). Abbildung 7 fasst zusammen, durch welche möglichen Mechanismen einzelne P2-Rezeptorsubtypen die Zellfunktionen in Krebszellen verändern können.

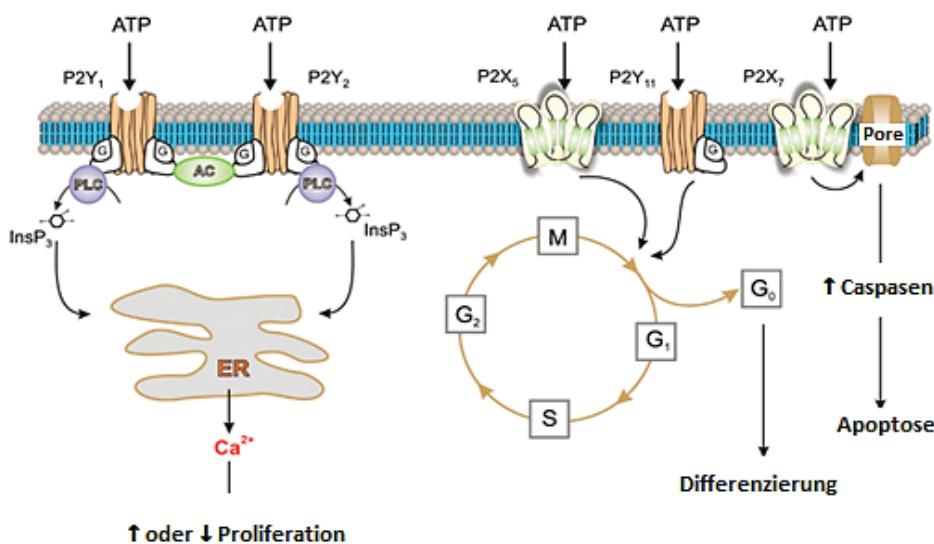


Abbildung 7: Schematische Darstellung zum möglichen Mechanismus wie die einzelnen P2-Rezeptorsubtypen die Zellfunktionen in Krebszellen verändern. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (66). Eine Aktivierung des P2Y₁- oder des P2Y₂-Rezeptors kann gewebeabhängig zu einer gesteigerten oder einer verminderten Zellproliferation führen durch Beeinflussung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration als Folge der Modulation des Phospholipase C-(PLC)-Signalwegs. Über den P2X₅- und den P2Y₁₁-Rezeptor kann der Zellzyklus von Proliferation in ein Stadium zur Zelldifferenzierung umgeschaltet werden. Der P2X₇-Rezeptor aktiviert das Caspase-System, welche den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten.

Über den P2Y₁- und auch den P2Y₂-Rezeptor wird die Zellproliferation moduliert. Hier kann es abhängig von der Krebsart und dem Gewebetyp zu einer gesteigerten oder auch verminderten Proliferation kommen. Demgegenüber modulieren der P2X₅- und auch der P2Y₁₁-Rezeptor die Zelldifferenzierung. Vermutet wird, dass der Zellzyklus vom Status der Proliferation in ein Stadium der Differenzierung umgeschaltet wird, was antiproliferative Effekte nach sich zieht. Der P2X₇-Rezeptor vermittelt wahrscheinlich sowohl zellproliferationsfördernde Effekte als auch den durch Apoptose-induzierten Zelluntergang. Erste Untersuchungen zeigen, dass niedrige Konzentrationen an freigesetztem ATP dabei die Zellproliferation fördern und hohe ATP-Konzentrationen das Apoptose-einleitende Caspasen-System aktivieren (25,26,33,66).

Tabelle 4: P2Y-Rezeptor-Expression in diversen Krebszelllinien. Modifiziert nach (66).

Krebsart	Zelllinie	mRNA	Protein	Proliferation
Melanom	A375	P2X ₇	P2X ₇	↑ P2Y ₂
		P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆	↓ P2Y ₁ , P2X ₇
Haut	A431	—	P2X ₅ , P2X ₇	↑ P2Y ₂
			P2Y ₁ , P2Y ₂	↓ P2Y ₁ , P2X ₅ , P2X ₇
Kolorektal	HT29	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇	P2X ₁ , P2X ₄ , P2X ₇	↑ oder ↓ P2Y ₂
	HCT8	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆	P2Y ₁ , P2Y ₂	↓ P2Y ₁ , P2X ₇
	CaCo-2			
Ösophagal	Kyse-140	P2X ₄ , P2X ₅ P2Y ₂	P2Y ₂	↓ P2Y ₂
Lunge	A459	P2Y ₂ , P2Y ₆	—	↑ P2Y ₂ , P2Y ₆
Prostata	PC-3	P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇	P2X ₄ , P2X ₅ , P2X ₇	? P2Y ₂
	DU145	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	P2Y ₂	↓ P2X ₅ , P2X ₇
Gehirn	1321N1	P2Y ₁	P2Y ₁	↑ oder ↓ P2Y ₁
	C6	P2Y ₁₂		↑ P2Y ₁₂
	U-251 MG			
	U-138 MG			
	U-87 MG			
Zervikal	CaSki	—	P2X ₄ , P2X ₇ P2Y ₂	↓ P2X ₇
Brust	MCF-7	P2Y ₂	P2X ₇	↑ P2Y ₂
	Hs578T	P2X ₇		
	SK-Br3			
	T47-D			
	MDA-MB-231			
Ovarial	OVCAR-3	P2Y ₂	—	↑ oder ↓ P2Y ₂
	EFO-21			
	EFO-27			
Endometrial	HEC-1A	P2Y ₂	—	↑ P2Y ₂
Blut	HL-60	P2X ₇	P2X ₇	↓ P2X ₇
	NB-4	P2Y ₁₁		
Blase	HAT_1376	—	—	↓ P2Y ₁₁ , P2X ₄ , P2X ₅
Schilddrüse	ARO	P2Y ₁ , P2Y ₂	—	↑ P2Y ₁ , P2Y ₂

In Tabelle 4 ist gezeigt, welche P2-Rezeptorsubtypen in verschiedensten Krebszelllinien auf mRNA- oder auf Proteinebene bereits nachgewiesen wurden. Von Kopf-Hals-Tumoren über Kolorektal-, Blut- und Hautkrebs bis hin zu Karzinomen, welche das reproduktive System betreffen, wurden hier Daten erhoben und ermittelt, wie die Zellproliferation durch den exprimierten purinergen Rezeptor beeinflusst wird. Der P2Y₂-Rezeptor scheint hier eine Schlüsselrolle zu spielen. Extrazelluläres ATP vermag beispielsweise die Metastasierung von Tumorzellen über die Öffnung der endothelialen Barriere zu fördern (12,45). Ebenso wird die Proliferation verschiedener Krebszelllinien nach Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors moduliert (45,67) sowie der Zellzyklus reguliert (41,45). In der Literatur ist beschrieben, dass extrazelluläres ATP das Zellwachstum von nasopharyngealen (61) bzw. ösophagealen (65) Krebszelllinien, ebenfalls P2Y₂-Rezeptor-vermittelt, inhibiert. Auf der anderen Seite berichten *Di Virgilio et. al.*, dass das Wachstum von Krebszellen über P2Y₂-Rezeptoren durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und die Aktivierung der PI3K/AKT- und ERK/MAPK-Signalwege gelenkt wird (8). Weiter beschrieben *Li et al.* für zwei Prostatakarzinom-Zelllinien eine Förderung der Zellinvasion sowie der Metastasierung nach Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors (43,60). In Ovarialkarzinom-Zelllinien stimuliert extrazelluläres ATP zwar teilweise das Zellwachstum, vermag aber ebenso den Zellzyklus zu kontrollieren als auch die Chemosensitivität von Zytostatika wie Doxorubicin oder Cisplatin zu erhöhen (67). Die genauen Hintergründe bzw. Mechanismen sind noch größtenteils unbekannt. Weitere Forschungsarbeit ist erforderlich um herauszufinden, welche Schlüsselfunktion der P2Y₂-Rezeptor dabei im Tumorgeschehen einnimmt.

1.2 Ovarialkarzinome

Ovarialkarzinome zählen zu den am häufigsten tödlich verlaufenden gynäkologischen Erkrankungen der westlichen Welt (72–74). 2014 entfielen in Deutschland 3,2% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen auf das Ovarialkarzinom und sogar 5,3% aller Krebssterbefälle, siehe Abbildung 8.

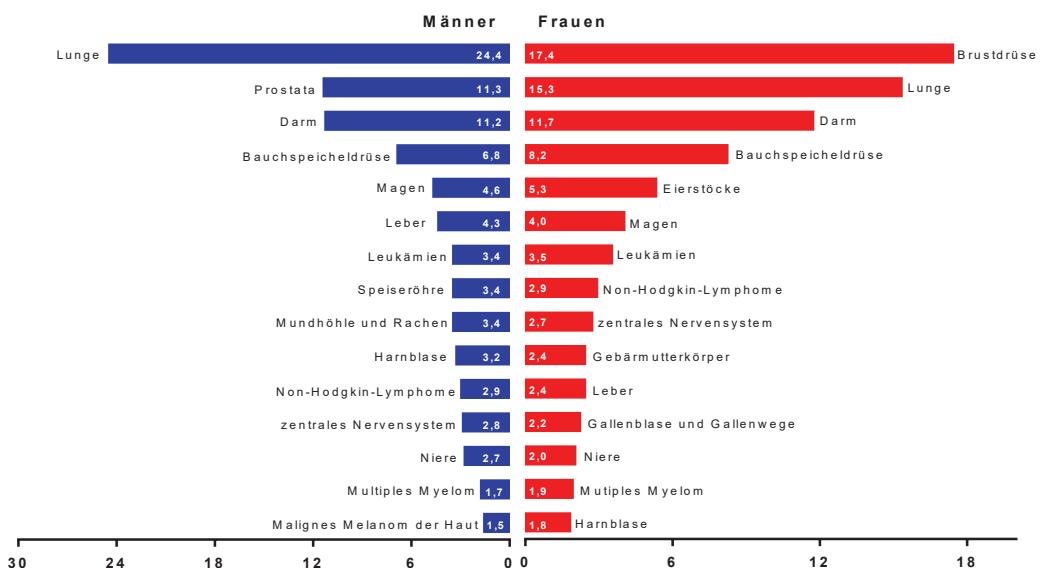


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisierungen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2014. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (76).

Die altersspezifische Erkrankungsrate steigt dabei kontinuierlich bis zum 85. Lebensjahr an, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei etwa 70 Jahren liegt (75). Histologisch betrachtet handelt es sich bei bösartigen Tumoren der Eierstöcke vorwiegend um mäßig bis schlecht differenzierte seröse Adenokarzinome epithelialen Ursprungs (75). Einige seltene Formen von Eierstockkrebs, z.B. Keimzell- (2% - 3%) oder Keimstrangtumore (5% – 6%) (74), können aber auch schon bei Kindern und jungen Frauen auftreten (73,75). Laut der „Krebs In Deutschland“-Statistik, veröffentlicht vom Robert-Koch-Institut, erkrankt 1 von 71 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem Ovarialkarzinom (75). Zwar sind seit der Jahrtausendwende Erkrankungs- und Sterberaten sowie die Anzahl an Neuerkrankungen in Deutschland leicht rückläufig, doch die Überlebensaussichten von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen gestalten sich eher schlecht (75). Das relative 5-Jahres-Überleben liegt aktuell bei nur 41% aufgrund der oft sehr spät gestellten Diagnose und damit verbundenen schlechten Prognose (74,75,77), siehe Abbildung 9. Der oft symptomlose Verlauf der Erkrankung bzw. die recht unspezifische Symptomatik (wie Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominelle Beschwerden oder die Zunahme der Miktionssfre-

quenz) sowie der Mangel an Früherkennungsstrategien erschweren dabei die Diagnosestellung (73,77).

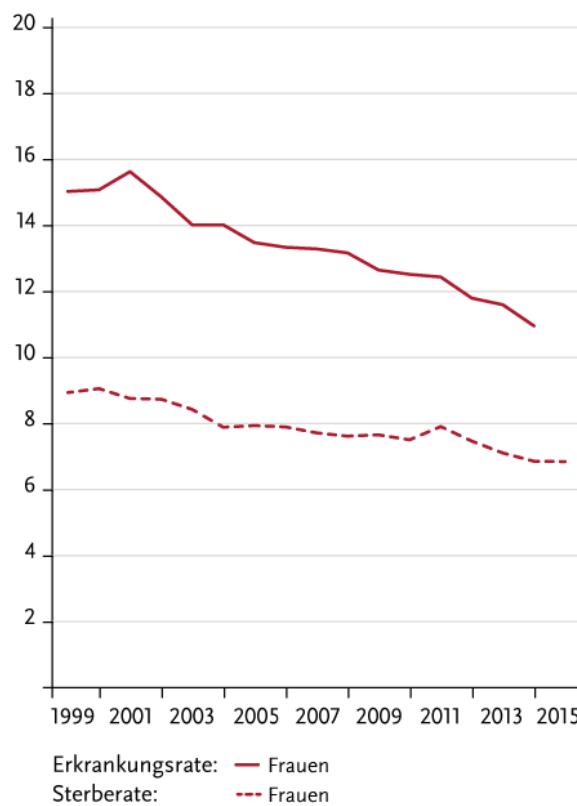


Abbildung 9: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle für das Ovarialkarzinom, Deutschland, 1999 - 2014/2015, je 100.000 (Europastandard). Abbildung entnommen aus (75).

Generell steigt das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken sowohl mit zunehmenden Lebensalter als auch mit vorhandenem Übergewicht an. Hormonelle Faktoren üben auch einen Einfluss aus: Kinderlosigkeit bzw. Unfruchtbarkeit bei Frauen erhöhen, viele Geburten bzw. längere Stillzeiten reduzieren dabei das Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken. Die Einnahme von Hormonersatzpräparaten, insbesondere von Östrogenmonopräparaten, bei Frauen nach der Menopause stellt hier einen weiteren Risikofaktor dar. Demgegenüber scheint die längfristige Einnahme von Ovulationshemmern einen schützenden Effekt auszuüben. Auch eine Sterilisation durch Verschluss der Eileiter reduziert das Risiko für ein Ovarialkarzinom entsprechend (74,77,78). Retrospektiv betrachtet erkranken Frauen häufiger an Eierstockkrebs, wenn sie entweder selbst schon an einem Brust-, Gebärmutterkörper- oder Darmkarzinom oder Verwandte ersten Grades an Brust- oder Eierstockkrebs erkrankt waren (78). Oft liegen bei diesen Frauen bestimmte genetische Veränderungen vor, welche das Erkrankungsrisiko deutlich erhöhen. Dabei handelt es sich vorwiegend um Mutationen, welche bei den Genen BRCA₁

und BRCA₂ beobachtet wurden (74,77,78).

Shih et al. führten 2004 eine duale Charakterisierung von Ovarialkarzinomen ein (79). Etwa 25% aller Karzinome entfallen dabei auf die sogenannten Typ I-Tumore. Diese sind häufig auf das Organ begrenzt und entwickeln sich über definierte Vorstufen. Demgegenüber handelt es sich bei den Typ II-Tumoren (etwa 75% aller Ovarialkarzinome) um hoch-maligne Karzinome, welche schnell wachsen, sich aggressiv verhalten und meist erst spät diagnostiziert werden. Die Mortalität dieser Typ-II-Karzinome liegt bei etwa 90% (77). Seit 2017 werden Ovarialkarzinome nun gemeinsam nach WHO und FIGO durch die TNM-Klassifikation (T0, T1, T2 oder T3) nach UICC (= *Union international contre le cancer*) eingestuft. Typ I-Tumore werden meist im TNM-Stadium 1 diagnostiziert, was mit einer relativ guten Prognose und mit einem 5-Jahres-Überleben von durchschnittlich 80% einhergeht. Die high-grade serösen Tumore vom zweiten Typ werden meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Die Prognose hängt hier weitestgehend vom verbleibenden Resttumor nach dem operativen Eingriff ab. Dabei gibt es große Verlaufsunterschiede und noch keine erkennbaren Prognosefaktoren. Weltweit liegt das 5-Jahres-Überleben bei Vorliegen eines solchen Tumors nur bei 20%, in Deutschland bei etwa 30% (77). Undifferenzierte Karzinome haben eine extrem schlechte Prognose. Als bereits etablierte Prognosefaktoren für das Ovarialkarzinom gelten laut Leitlinie generell das Tumorstadium, der postoperative Tumorrest, das Alter, der Allgemeinzustand, der histologische Befund, das Tumorgrading und die leitliniengerechte Therapie (77).

Das First-Line-Therapieregime besteht derzeit aus dem chirurgischen Eingriff, bei dem alles sichtbare Tumorgewebe entfernt wird und der sich daran anschließenden Chemotherapie. Hierbei wird vorzugweise die Kombination von Paclitaxel mit einer Platin-Verbindung, beispielsweise Cisplatin oder das vorzugweise klinisch eingesetzte Carboplatin, verabreicht (73,77,80,81). Initial sprechen 60% - 80% der Patientinnen mit einem fortgeschrittenen Ovarialkarzinom auf eine Platin- und Taxan-basierende Chemotherapie an und erreichen eine vollständige klinische Remission. Demgegenüber stehen 20% - 30% der Patientinnen, welche von vornehmerein einen Platin-resistenten Tumor aufweisen oder unter der Therapie einen Platin-resistenten Tumor entwickeln, so dass die Erkrankung weiter progressiv fortschreitet (73). Doch auch trotz des großen Ansprechens auf die initiale Chemotherapie erfahren viele Patientinnen typischerweise innerhalb der ersten zwei Jahre ein Tumorrezidiv (81). In Abhängigkeit von dem Zeitintervall, welches zwischen Beendigung der ersten Platin-enthaltenden Chemotherapie und dem Wiederauftreten des Tumors liegt, werden verschiedene Therapiewege verfolgt. Tritt das Rezidiv nach frühestens sechs Monaten auf, wird eine erneute Platin-haltige First-Line-Chemotherapie verabreicht. Zeigt sich das Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach Abschluss der initialen Therapie, wird von einem Platin-resistenten Ovarialkarzinom

ausgegangen. Die Durchführung einer nicht-platinhaltigen Monotherapie mit pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin oder Paclitaxel wird in diesem Fall favorisiert (73,77). Aktuell werden weitere Therapieoptionen für das Ovarialkarzinom diskutiert. Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF (= vascular endothelial growth factor), wird derzeit schon als Zusatztherapie verabreicht. Dabei richtet er sich nicht gegen die Tumorzelle selbst, sondern gegen die umliegenden Zellen, welche die Angiogenese fördern. Bevacizumab inhibiert den Wachstumsfaktor VEGF, die Angiogenese wird unterbunden und die Tumorzelle nicht mehr ausreichend versorgt (82). Inhibitoren der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen, kurz PARP-Inhibitoren wie Olaparib, Rucaparib oder auch Niraparib werden primär zur Erhaltungstherapie nach einer Chemotherapie eingesetzt, um zu verhindern, dass die PARP-Enzyme die durch das Zytostatikum hervorgerufenen DNA-Schäden reparieren (82). Des Weiteren gibt es in der Literatur Hinweise, dass in Ovarialkarzinomzellen wichtige Pfade wie der PI3K/AKT/mTOR- oder auch der MAP-Kinasen-Signalweg verändert sind (80,82). Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle, wenn es um zelluläre Prozesse, wie Proliferation, das Zellüberleben, die Angiogenese oder die Proteinsynthese geht. Demgegenüber steuert der MAP-Kinasen-Signalweg den Verlauf des Zellzyklus, die Differenzierung und die Migration sowie den Metabolismus (82). Entsprechende Inhibitoren gegen mTOR (z.B. Temsirolimus), gegen PI3K (z.B. Pictilisib) oder auch gegen MEK, wie Selumetinib, befinden sich derzeit in klinischen Untersuchungen (82). Die größten Hindernisse bei der Therapie eines Ovarialkarzinoms sind zum einen die Entwicklung von Resistzenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika, vorwiegend gegenüber Platin-Verbindungen, und zum anderen die hohe Rezidivrate. Dabei sind die wiederkehrenden Tumore in vielen Fällen ebenfalls Platin-resistent. Wie oben bereits erörtert, stehen zwar bei Vorliegen eines Platin-resistenten Tumors neue Therapieoptionen (z.B. der Einsatz von pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Topotecan oder Gemcitabin) zur Verfügung; doch wurde das 5-Jahres-Überleben der Patientinnen dadurch bislang nicht entsprechend verbessert (83). Die Überlebensraten für an Eierstockkrebs erkrankte Frauen haben sich in den letzten 20 Jahren somit nicht deutlich verändert bzw. verbessert. Sowohl neue Therapiestrategien für das Ovarialkarzinom als auch weitere Untersuchungen zur Resistenzentwicklung gegenüber den eingesetzten Zytostatika sind dringend erforderlich, um die Therapie und somit das Überleben betroffener Patientinnen entscheidend zu verbessern (83).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Der P2Y₂-Rezeptor stellt ein interessantes und vielversprechendes therapeutisches Target dar. Aktuelle Publikationen rücken die Rolle des P2Y₂-Rezeptors bei Tumorerkrankungen, hier vor allem im Bereich der Ovarialkarzinome, in den Fokus. Extrazelluläres ATP kann bei Ovarialkarzinomen in Abhängigkeit vom Tumorgewebe P2Y₂-Rezeptor-vermittelt entweder zu einer Ab- oder einer Zunahme der Zellproliferation führen (66,67). Die beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3, welche den P2Y₂-Rezeptor nativ und funktionell exprimieren, wurden für diese Arbeit ausgewählt, um zu klären, welchen Einfluss Nukleotide, insbesondere ATP, auf das Wachstumsverhalten der beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien ausüben. Suramin und Reactive Blue 2 sind als wenig selektive Antagonisten des P2Y₂-Rezeptors beschrieben (5). AR-C118925 wurde 2016 als nanomolar-potenter und selektiver P2Y₂-Rezeptor-Antagonist etabliert (45). In der Vergangenheit wurden bereits Suramin-Analoga erfolgreich als Liganden für verschiedene P2-Rezeptorsubtypen vorgestellt (84–87). Eine Arbeitskreis-eigene vom Suramin-abgeleitete chemische Substanz-Bibliothek sollte getestet werden, um Antagonisten für den P2Y₂-Rezeptor mittels funktionellem Calcium-Assay zu identifizieren. Dafür wurden im ersten Teil dieser Arbeit zunächst acht Zelllinien etabliert und charakterisiert, welche jeweils einen P2Y-Rezeptorsubtyp rekombinant in 1321N1-Zellen exprimierten. Im zweiten Teil wurden Antagonisten auf die Art des Antagonismus und auf ihre Selektivität und Toxizität hin untersucht. Auf diese Weise stand neben dem kommerziell erwerblichen P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten AR-C118925 ein weiterer arbeitskreiseigener P2Y₂-Ligand als zusätzliches Werkzeug zum Studieren der durch ATP hervorgerufenen Effekte in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 zur Verfügung. Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die über P2Y₂-Rezeptoren vermittelten Effekte von ATP auf die Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin untersucht. Begleitend wurde betrachtet, ob ATP einen Einfluss auf das Apoptoseverhalten sowie den Zellzyklus der Zellen hatte. Die These, dass sich der P2Y₂-Rezeptor als potentielle neue Zielstruktur zur Therapie des Ovarialkarzinoms eignet, sollte überprüft werden. Dazu wurde untersucht, ob die Behandlung mit ATP das Wachstum der Zellen reduziert und ob die gleichzeitige Gabe von ATP und Chemotherapeutika wie Cisplatin die Chemosensitivität des Zytostatikums erhöht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.

Name	Artikelnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol 99% p.a.	4227.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
A740003	3701	TOCRIS bioscience, Bristol, UK
Adenosin-5'triphosphat-Dinatriumsalz	A7699	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Adenosin-5'diphosphat-Natriumsalz	A2754	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat p.a. (APS)	1012010500	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin-Natrium	K029.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa (Aqua ad injectabilia)	6340429	AlleMan Pharma GmbH, Pfullingen
Aprotinin	A162.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
AR-C118925	4890	TOCRIS bioscience, Bristol, UK
Bacto TM Agar	214010	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bacto TM Tryptone	211705	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bacto TM Yeast Extract (Hefeextrakt)	212750	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	A0850	AppliChem GmbH, Darmstadt
Broad Range DNA Mass Ladder	11447-100	Mariligen Biosciences INC, Rockville, USA
Bromphenolblau-Natriumsalz	A512.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	C3306	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CellEvent Caspase-3/7 green detection reagent	10423	Thermo Scientific, Wesel
CIAP Phosphatase	F-201S	Finnzymes, Espoo, Finnland
CIAP Phosphatase Reaktionspuffer 10x	F-201B	Finnzymes, Espoo, Finnland
Cisplatin (cDDP)	P4393	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coenzym A (Trilithiumsalz)	A0813	AppliChem GmbH, Darmstadt
D-(+)-Glucose wasserfrei Riedel-de Haen	16325	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Name	Artikelnummer	Hersteller
D-(+)-Glucose-Monohydrat	49158	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
D-Luciferin (Kaliumsalz)	BC219	Synchem OHG, Felsberg/Altenburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	K028.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	23.500.297	VWR International GmbH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	28.029.292	VWR International GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	6908.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNAse freie RNase A	10753721	Thermo Scientific/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	P04-04510	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
E. coli XL-1 Blue competent cells	200249	Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Eosin B (C.I. 45400)	0306.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure p.a.	3738.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol AnalRaR NORMAPUR	20.821.310	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethanol tech.	/	Abfüllung durch das ZCL der HHU
Ethylendiamintetraessigsäure	0530	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz- Dihydrat	A3553	AppliChem GmbH, Darmstadt
Formaldehydlösung 37% p.a., stabilisiert mit etwa 10% Methanol	KMF 08-220	KMF Laborchemie Handels GmbH, Köln
Forskolin	A2165	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	3302-P112112	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10.000x in water	730-2958	VWR International GmbH, Langenfeld
GeneRuler 1 kp DNA Ladder	SM0311	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	SM0373	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Geneticinsulfat (G418)	345810	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin wasserfrei p.a.	3783.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin p.a.	A1377	AppliChem GmbH, Darmstadt
Helipur®	18895	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure	A1069	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hind III	ER0501	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Hoechst33342 (20 µM)	62249	Thermo Scientific, Wesel
Hygromycin B	CP 13.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol p.a.	34863	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol tech.	/	Abfüllung durch das ZCL der HHU

Name	Artikelnummer	Hersteller
Kaliumchlorid AnalR NORMAPUR	26764.298	VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	3904.1	Carl Roth GmbH & Co. KH, Karlsruhe
Kaliumhexacyanidoferat(II)-Trihydrat	104984	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferat(III)	104971	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Kristallviolett	T123.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	8157.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Leupeptin	L9783	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	11668-027	Invitrogen™/Life Technologies, Carlsbad, USA
Loading dye 6x	R0611	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	2189.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	63140	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol tech.	/	Abfüllung durch das ZCL der HHU
Milchpulver Blotting Grade	T145.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MRS2211	2402	TOCRIS bioscience, Bristol, UK
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid	20395	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumacetat Trihydrat AnalR NORMAPUR	27652.298	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumazid 99%	190381000	ACROS ORGANICS™, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Natriumchlorid AnalR NORMAPUR	27810.295	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung 0,9% (isotonisch)	809109	Fresenius Kabi Deutschlang GmbH, Langenhagen
Natriumcitrat tribasisch Dihydrat	27831.297	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat AnalR NORMAPUR	27778.293	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid p.a.	0402	J.T. Baker / VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumorthovandat	S6505	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NP-40	11332473001	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Oligo(dT) anchored Primer	04387	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
OregonGreen®488 BAPTA-1, AM, cell permanent – special packaging	O-6807	Life Technologies, Carlsbad, USA
pCRE-Luc-Plasmid	219076	Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, USA
pOG44-Plasmid	V6005-20	Invitrogen, Carlsbad, USA
Paclitaxel (Taxol®)	MT1646-1	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln

Name	Artikelnummer	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 – 180 kDa	26616	Thermo Scientific/ Life Technologies, Carlsbad, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 – 250 kDa	26619	Thermo Scientific/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/mL / 10 mg/mL in 0,9% NaCl	P06-07050	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pepstatin A	P5318	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce® BCA Protein Assay Reagents	23227	Thermo Scientific/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Pluronic F-127	P2443	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PolyFect® Transfektionsreagenz	301105	QIAGEN, Hilden
Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x	4368702	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Propidiumiodid	sc-3541	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
QuantiTect-SYBR® Green Master Mix 2x	204141	QIAGEN, Hilden
QVD-OPh Hydrat	SML0063	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reactive Blue-2 (RB-2)	R-115	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reaktionspuffer R	BR 5	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Reinstwasser		eigene Herstellung
RLT-Buffer	79216	QIAGEN, Hilden
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)	P04-18500	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Rotiphorese® Gel 30 (37,5 : 1)	3029.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 37% AnalR NORMAPUR	20252.244	VWR International GmbH, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat) Ultra pure	20765	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SeaKem® LE Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Suramin (Germanin ® Bayer 205)	FX922K	Bayer AG, Leverkusen
T4 DNA-Ligase	EL001	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
T4 DNA-Ligase-Puffer 10x	EL001	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
TEMED p.a.	2367.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Topotecan	Hycamtin®	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
Tricin	A3954	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-Base	441514A	VWR International GmbH, Darmstadt
Tris-HCl	A1087	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton®X-100	A4975	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin/EDTA 0,05% / 0,02% in PBS	P10-0231 SP	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

Name	Artikelnummer	Hersteller
Tween®20	9127.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uridin-5'-diphosphat-Natriumsalz (UDP)	U4125	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Uridin-5'-triphosphat-Trinatriumsalz-Hydrat (UTP)	U6625	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI	H-1200	VECTOR LABORATORIES, LTD, Peterborough, UK
X-Gal	R0401	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Xho I	ER0691	Fermentas/Life Technologies, Carlsbad, USA
Zeocin™-Lösung [100 mg/mL]	R250-01	Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.2 Verwendete Kits

In der nachstehenden Tabelle sind die verwendeten Reagenzien-Kits bzw. daraus verwendeten Bestandteile aufgezeigt.

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien-Kits.

Kit / Kitbestandteil	Artikelnummer	Hersteller
EndoFree® Plasmid Purification Maxi Kit	12362	QIAGEN, Hilden
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4328814	Applied Biosystems, Warrington, UK
innuPREP DOUBLEpure Kit	845-KS-5050010	Analytikjena, Jena
innuPREP Gel Extraction Kit	845-KS-5030010	Analytikjena, Jena
Lysispuffer No.6 aus dem Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit	ARY003B	R&D Systems, Wiesbaden
my-Budget Double Pure Kit	55-3000-010	Bio-Budget, Krefeld
my-Budget RNA Mini Kit	56-2000-050	Bio-Budget, Krefeld
QuantiTect™SYBR® Green PCR Kit	2041413	QIAGEN, Hilden
RNase-free DNase I-Set	79254	QIAGEN, Hilden
Western Blotting Luminol Reagent	sc-2048	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg

3.1.3 Primer

Die in dieser Arbeit für die verschiedenen PCR-Experimente verwendeten Primer sind nachstehend tabellarisch unter Angabe der Primer-Bezeichnung, der Accession Number, der Sequenz und der vorausgesagten PCR-Produkt-Größe angegeben. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer BLAST konzipiert.

Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Primer. * vgl. Dissertation von S. Eberle (88), ** entnommen aus (64).
F: Forward Primer, R: Reverse Primer.

Primer-Bezeichnung	Gen	Accession Number	Sequenz (5' --> 3')	PCR-Produkt-Größe
β-Actin-F *	ACTB	NM_001101	TCCTTCCTGGGCATGGAGT	103 bp
β-Actin-R *			GCACTGTGTTGGCGTACAG	
GAPDH-F *	GAPDH	NM_002046	TCCACCACCCCTGTTGCTGTA	500 bp
GAPDH-R *			ACCACAGTCCATGCCATCAC	
P2X1-F	P2RX1	NM_002558	AATGACCACCATCGGCTCTG	133 bp
P2X1-R			CCCCATGTCTCAGCGTATT	
P2X2-F	P2RX2	NM_170682	GACCCCTGCCCGTGTATTGG	111 bp
P2X2-R			CCACACTCTGCCCTTGTGTT	
P2X3-F	P2RX3	NM_002559	TCCGTTCCCCCTCTCAAC	113 bp
P2X3-R			CAAGATGGGGCAGAAAGGGT	
P2X4-F	P2RX4	NM_002560	GTCATCGGGTGGGTGTTGT	105 bp
P2X4-R			AGAAGTGTGGTCACAGCCA	
P2X5-F	P2RX5	NM_175080	TGATGGACGTCAAGGACAGA	148 bp
P2X5-R			ATT CCTATCACGCCACCCCTC	
P2X6-F	P2RX6	NM_005446	CGTGGTCTATGTGGTAGGGT	111 bp
P2X6-R			TGAGTGACGGAAACCCCTTTG	
P2X7-F	P2RX7	NM_002562	ACACCGCAGACTACACCTTC	104 bp
P2X7-R			GGGATACTCGGGACACAACC	
P2Y1-F	P2RY1	NM_002563	TTACGACACCACCTCAGACG	115 bp
P2Y1-R			TGAAAGTATCTCCGCCAAG	
P2Y2-F	P2RY2	NM_002564	CGACTGCTAAAGGCCAGCCTA	188 bp
P2Y2-R			ATGTTGATGGCGTTGAGGGT	
P2Y4-F	P2RY4	NM_002565	ACAACCAGCAACAAAGGGACCACC	136 bp
P2Y4-R			AGCAAACAAGAGTGACCAGGCAGG	
P2Y6-F **	P2RY6	NM_176798	ACGGCAGCATCCTCTTCCTCACC	256 bp
P2Y6-R **			CAGCAGGAAGCCGATGACAGTGA	
P2Y11-F	P2RY11	NM_002566	GCCAACGTCTGGGTGCCAAG	121 bp
P2Y11-R			CGGCCACCAGGAACTCAACCAC	
P2Y12-F	P2RY12	NM_176876	ATGCCAAACTGGGAACAGGACCAC	139 bp
P2Y12-R			AATGGCCTGGTGGTCTCTGGTAG	
P2Y13-F	P2RY13	NM_176894	ACTCACACCTGGCACCCCTGG	100 bp
P2Y13-R			AGCCCTAACAGCACGATGCC	
P2Y14-F	P2RY14	NM_014879	ACGTCAAGCATTGTGTTCTGGGC	146 bp
P2Y14-R			AACAGCAAGGAGGAGCATGAGC	

3.1.4 cDNA, Plasmide und Vektoren

Für die Klonierungsarbeiten wurden folgende Vektoren verwendet. Die Vektorkarten sind im Anhang gezeigt (siehe Anhang A).

Tabelle 8: Verwendete Vektoren.

Name	Hersteller
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA5/FRT	Invitrogen, Carlsbad, USA

Nachstehend aufgelistet sind die kommerziell erworbenen Plasmide mit den jeweils enthaltenen cDNA-Sequenzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Detaillierte Angaben zu den Plasmid-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (siehe Anhang B).

Tabelle 9: Liste der kommerziell erworbenen Plasmide.

Name	Artikelnummer	Hersteller
pcDNA3.1(+)-P2Y1	P2Y0100000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y2	P2Y0200000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y4	P2Y0400000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y6	P2Y0600000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y11	P2Y1100000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y12	P2Y1200000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y13	P2Y1300000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
pcDNA3.1(+)-P2Y14	P2Y1400000	Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA

3.1.5 Antikörper

Nachfolgend sind die im Western Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet. Die jeweiligen Verdünnungen sind bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper	Artikelnummer	Hersteller
Mouse Anti- β -Actin (C4)	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit Anti-P2Y1 (H-120)	sc-20123	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit Anti-P2Y2 (H-70)	sc-20124	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat Anti-P2X7 (L-20)	sc-15200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat Anti-mTOR	AF15371	R&D Systems, Wiesbaden
Goat Anti-EGF-R/ErbB1	AF231	R&D Systems, Wiesbaden

Primärantikörper	Artikelnummer	Hersteller
Rabbit Anti-Phospho-EGF-R/ErbB1	AF1095	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse Anti-Phospho-Histone H2AX (Ser139)	05-636	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Artikelnummer	Hersteller
Donkey Anti-Goat IgG conjugated to Cy2TM (488)	A50-201C2	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Goat Anti-Rabbit IgG HRP Affinity Purifies PAb, Goat IgG	HAF008	R&D Systems, Wiesbaden
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488 conjugated	A-11008	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Goat Anti-Mouse IgG HRP Affinity Purifies PAb, Goat IgG	HAF007	R&D Systems, Wiesbaden
Rabbit Anti-Goat IgG HRP Affinity Purifies PAb, Rabbit IgG	HAF017	R&D Systems, Wiesbaden
Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488 conjugated	A-11001	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA

3.1.6 Geräte

Folgende Geräte wurden zum Durchführen der einzelnen Experimente verwendet.

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Zubehör.

Gerät	Hersteller
Array-Scan XTI	Thermo Fisher,
Autoclav Systec V-65	Systec GmbH, Wettenberg
Blottingapparatur Semi-Dry-Blotter	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Blottingapparatur Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CyFlow Space	Partec GmbH, Münster
Feinwaage ABS 220-4	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Feinwaage BP 221S	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Olympus Bx43	Olympus Deutschlang GmbH, Hamburg
Geldetektionssystem Gel iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelelektrophorese-Apparatur Mini PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelelektrophorese-Kammer Bio-Rad MINI SUB® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Ednison, USA
Inkubator Heraeus® Function-line	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich
Laminar air flow Werkbank Hera Safe,	Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich

Gerät	Hersteller
Laminar air flow Werkbank MSC-advantage,	Thermo Scientific, Dreieich
Magnetrührer IKA® RCT basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Microplate-Reader FLUOstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Microplate-Reader LUMIstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Microplate-Reader NOVOfstar	BMG Labtechnologies, Offenburg
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikrowelle Intellowave	LG Electronics GmbH, Seoul, Südkorea
Motic®AE 20/21 Inverted Microscope	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
NanoKüvette IMPLEN	Implen GmbH, München
NanoPhotometer P300	Implen GmbH, München
Neubauerzählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Orbitalschüttler TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
PCR-Werkbank	BIO-FLOW Technik, Meckenheim
pH-Meter 713	Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt
Radioactive Source Cs-137	PASCOE scientific, Roseville, USA
Roller mixer SRT6	Bibby Scientific LTD, Stone (Staffordshire), UK
Schwenker Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwalbach
Schüttelinkubator Typ SM 30A	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Spannungsquellen: Power Pack 200 und 3000 Standard Power Pack P25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen
Trockenschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex Super RK514BH,	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Waage SBA52	SACLTAC Instruments GmbH, Heiligenstadt
Wasserbad mit Heizelement Julabo 19/ED	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Western Blot-Detektionssystem INTAS ChemiLux ECL Imager HR16 Pro	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Zentrifuge Rotina 420R Typ 4706	Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifugiergefäße	Beckmann, Brea, USA

3.1.7 Verbrauchsmaterialien und sonstiges Arbeitsmaterial

Folgendes Arbeitsmaterial wurde verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Biosphere® Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 10 µL 100 µL 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell Scraper	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Chromatographie Filterpapiere 3 mm	Whatman® International Ltd, Maldstone, UK
Entsorgungsbeutel PP, Plastibrand®	Brand GmbH & Co. KG
Gewebekulturflasche T25 T75 T175	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Immobilon-P Transfer Membran; Porengröße 0,45 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Microtiterplatte (96-Well), U-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microtiterplatte (96-Well), F-Form, weiß mit transparentem Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Omnifix® 2 mL 10 mL 20 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäß MicroAmp Tubes 0,2 mL 0,5 mL	Applied Biosystems, Darmstadt
Petrischalen	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen mit Kapillare für Gelbeladung	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen 10 µL 200 µL 1000 µL 5000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhre 15 mL 50 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Präzisions-Dispenser-Tips, Plastibrand® 0,5 mL 1,25 mL	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reagenzreservoir	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reaktionsgefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhren 3,5 mL; 55 x 12 mm, PS	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Material	Hersteller
Safe Seal Reaktionsgefäß	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Star Frost® Objektträger	Knittel Gläser
Sterile Einmalpipetten 10 mL	VWR, Darmstadt
Sterilfilter aus Celluloseacetat 0,2 µm	VWR, Darmstadt
Zellkultur Multi-Well-Plates Costar® 96-Well	Corning Inc., Corning, USA
Zellkultur Multi-Well-Platten, F-Form 6-Well 24-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.8 Programme und Software

Nachfolgend aufgeführte Programme wurden sowohl für die Detektion als auch die Auswertung der erhobenen Daten herangezogen.

Tabelle 14: Verwendete Programme und Software.

Programm	Hersteller/Quelle
Chem Draw Ultra 10.0	CambridgeSoft, Cambridge, USA
Clustal Omega	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
FloMax 2.82	Partec GmbH, Münster
FLUOstar® Software 4.31-0	BMG Labtechnologies, Offenburg
GraphPad Prism® 6	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ V1.47h	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
INTAS Capture Software	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
INTAS ChemoStar	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Office Word 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Picture It	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Motic® Images Plus	Motic Deutschland GmbH
NOVOSTAR® Software 1.20-0	BMG Labtechnologies, Offenburg
Primer Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Sequence Scanner 1.0	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.9 Zelllinien und Nährmedien

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien näher beschrieben.

1321N1

Bei der Zelllinie 1321N1 handelt es sich um eine humane Astrozytom-Zelllinie. Astrozytome, welche den Gliomen zugeordnet werden, zählen mit einem Anteil von über 60% zu den häufigsten Tumoren des Gehirns (89). Diese Tumore gehen aus pathologisch veränderten Astrozyten hervor, welche zum Stützgewebe, den Gliazellen, des Zentralnervensystems gehören. 1972 wurde die 1321N1-Zelllinie als Subklon der Zelllinie 1181N1 isoliert (90), welche wiederum 1968 von *Pontén and Macintyre* (91) aus einem humanen, zerebralen Glioblastom isoliert wurde.

Die 1321N1-Zellen wachsen adhären und werden mit DMEM-Medium kultiviert.

HEY

Die Zelllinie HEY wurde 1985 durch *Buick et al.* von dem humanen Ovarialkrebs-Xenograft HX-62 abgeleitet (92). Bei Xenografts (= Xenotransplantaten) werden lebende und funktionsfähige Zellen zwischen verschiedenen Spezies übertragen. In diesem Fall wurden humane Zellen einer Peritonealmetastase eines mäßig differenzierten, serös-papillarem Zystadenokarzinoms des Ovars in eine Maus injiziert. Wie von *Selby et al.* (93) beschrieben, wurde daraus das Xenograft HX-62 etabliert.

Die Zellen wachsen adhären und werden mit RPMI-Medium kultiviert. Die HEY-Zellen verfügen über ein Wildtyp p53-Gen (94). Außerdem wurde in der Literatur bereits eine gewisse Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin beschrieben (92).

OVCAR-3

Die Zelllinie OVCAR-3 wurde 1982 von *Hamilton et al.* (95) aus einem bösartigen Aszites einer 60-jährigen Patientin mit einem progressiven Adenokarzinoms des Ovars etabliert. Die Patientin hatte sich zu dem Zeitpunkt bereits einer kombinierten Chemotherapie bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin und Cisplatin unterzogen.

„Aszites“ bezeichnet eine pathologische Ansammlung von freier Flüssigkeit in der Peritonealhöhle. Bei OVCAR-3-Zellen handelt es sich demnach um eine humane Ovarialkarzinom-Zelllinie epithelialen Ursprungs, welche *in-vitro* als resistent gegenüber klinisch relevanten Cisplatin-Konzentrationen gilt (95). Die Zellen wachsen adhären und werden ebenfalls mit RPMI-Medium kultiviert. Das p53-Gen in den Zellen weist eine G zu A Punktmutation an Stelle 743 auf, so dass aus der Aminosäure Arginin die Aminosäure Glutamin wird (94,96).

HEK293

Bei dieser humanen und nativen Zelllinie, d.h. sie ist nicht bösartigen Ursprungs, handelt es sich um ein Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kindney) mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5, welches Anfang der 1970er-Jahre etabliert wurde (97). Durch den Einbau des Adenovirus in das Erbgut der Nierenzelle wurde diese immortalisiert, was zur Folge hat, dass diese Zellen stetig proliferieren und über längere Zeit kultivierbar sind. Die Zellen sind epithelialen Ursprungs, wachsen adhärent und werden mit RPMI-Medium kultiviert. Neben denen in dieser Arbeit verwendeten malignen Krebszelllinien dient die HEK293 Zelllinie als Kontrolle, um Effekte auch an nativen, Nicht-Krebs-Zellen beobachten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachfolgend aufgeführten Zelllinien verwendet. Mit „*“ markierte Zellen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Brigitte Royer-Pokora aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Tabelle 15: Verwendete Zelllinien. Die Angabe in den Klammern verweist auf den jeweiligen Zellklon.

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
1321N1(WT)	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium	ECACC, Salisbury, Wiltshire, England
1321N1-P2Y ₂	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + G418	Kloniert von S. Meis (98)
1321N1-Flpln C2	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Zeocin 400 µg/ml	Kloniert von S. Meis (98)
1321N1-Flpln-LVB	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Kloniert von Ch. Urban (99)
3121N1-Flpln-C2-P2Y ₁	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-Flpln-C2-P2Y ₂	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-Flpln-C2-P2Y ₄ (D3 und D6)	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-Flpln-C2-P2Y ₆ (E3, H4 und H6)	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-Flpln-C2-P2Y ₁₁ (F6 und F8)	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert

Zelllinie	Gewebetyp	Nährmedium	Herkunft
3121N1-FIPIn-C2-P2Y ₁₂ (B12 und C5)	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-FIPIn-C2-P2Y ₁₃	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
3121N1-FIPIn-C2-P2Y ₁₄	Gehirntumor (Astrozytom)	DMEM-Medium + Hygromycin B 200 µg/ml	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert
HEY *	Ovarialkarzinom (serös)	RPMI-Medium	CEDARLANE Laboratories Ltd., Burlington, CA
OVCAR 3 *	Ovarialkarzinom (Adenokarzinom)	RPMI-Medium	ATCC/LGC Standards GmbH, Wesel
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM-Medium	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig

3.2 Puffer und Lösungen

3.2.1 Zellkultur

Eosinlösung 0,4% (w/V) für die Zellzahlbestimmung

40 mg Eosin wurden in 10 mL 0,9%-iger (m/V) Natriumchlorid-Lösung gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

Geneticinsulfat (G418)-Stammlösung

5,0 g G418 wurden abgewogen und in Aqua bidest. gelöst. Das zuzugebende Volumen berechnet sich unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität nach Formel 1:

Formel 1

$$V [\mu\text{L}] = \frac{\text{Aktivität} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right] * \text{G418} [\mu\text{g}]}{100 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

Die fertige Lösung wurde steril filtriert und à 1 mL aliquotiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20°C.

Hygromycin B-Stammlösung [100 mg/mL]

Pro mL Lösung wurden 100 mg Hygromycin B eingewogen, in PBS 1x gelöst und nach dem sterilen Filtrieren à 1000 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäß aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

PBS-Puffer 10x

Natriumchlorid	81,8 g	1400 mM
Kaliumchlorid	2,2 g	30 mM
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	14,2 g	80 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	2,04 g	15 mM

Die Substanzen wurden in einem Becherglas eingewogen und mit Aqua bidest. auf etwa 800 mL aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit verd. NaOH auf pH = 7 eingestellt. Die Lösung wurde in einem Messkolben überführt und bis zur Marke mit Aqua bidest. auf 1000,0 mL aufgefüllt. Die hergestellte Menge wurde zu 50,0 mL aliquotiert und bei -20°C gelagert.

PBS-Puffer 1x

50,0 mL PBS 10x wurden mit Aqua bidest. zu 500,0 mL verdünnt, autoklaviert und das verdunstete Wasser durch steriles Aqua bidest. ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C im Kühlschrank.

DMEM-Medium

Das von PAN-Biotech bezogene DMEM-Medium wurde mit 10% FKS sowie 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

RPMI-1640-Medium

Das von PAN-Biotech bezogene RPMI-1640-Medium wurde mit 10% FKS sowie 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

3.2.2 Bakterienkultur

Ampicillin-Stammlösung 50 mg/mL

Ampicillin-Natrium	250 mg
Reinstwasser	5,0 mL

Ampicillin wird in 5 mL Reinstwasser gelöst, die Lösung steril filtriert und nach dem Aliquotieren bei -20°C gelagert.

Glucose-Lösung 1 M

D-Glucose-Monohydrat wurde zu 1 M in Reinstwasser gelöst (1,98 g auf 10 mL Reinstwasser). Die Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 2 - 8°C gelagert.

Glycerin-Lösung 60%ig

30,3 mL Glycerin p.a. wurden mit 19,7 mL Reinstwasser gemischt. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und im Kühlschrank bei 2 - 8°C gelagert.

LB-Agar-Platten [1,5% m/V] mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum

Zu 100,0 mL frisch hergestellten LB-Medium wurde Agar-Agar in einer Konzentration von 1,5% m/V (1,5 g) zugesetzt. Zum Auflösen des Agars wurde die Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 45°C wurde die Ampicillin-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL (100 µL der Stammlösung) zugesetzt. Die so hergestellte noch warme Lösung wurde

in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und bis zur weiteren Verwendung auf dem Kopf im Kühlschrank bei 2 - 8°C gelagert. Vor dem Auftragen des Transformationsansatzes inkubierten die Agar-Platten min. sechs Stunden im Trockenschrank auf 37°C.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

Trypton	5,0 g
Hefeextrakt	2,5 g
Natriumchlorid	5,0 g
Reinstwasser	ad 500,0 mL

Die Substanzen wurden in etwa 400 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Mit Reinstwasser wurde auf 500,0 mL aufgefüllt und die Lösung autoklaviert. Das Medium wurde bei Bedarf frisch hergestellt und bei 2 - 8°C gelagert.

SOB-Medium (Super-Optimal-Broth-Medium)

Trypton	2,0 g
Hefeextrakt	0,5 g
Natriumchlorid	0,05 g
Kaliumchlorid-Lösung 250 mM	1,0 mL
Magnesiumchlorid-Lösung 2 M	0,5 mL
Reinstwasser	ad 100,0 mL

Die Feststoffe wurden in Reinstwasser gelöst und nach dem Zusatz der Magnesiumchlorid-Lösung 2 M und der Kaliumchlorid-Lösung autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde das Medium mit autoklaviertem Aqua bidest. auf 100,0 mL aufgefüllt.

SOC-Medium (Super-Optimal-Catabolite-Repression-Medium)

Frisch hergestelltes SOB-Medium wurde dazu nach dem Autoklavieren mit 2 mL einer steril filtrierten 1 M-Glucoselösung versetzt und mit autoklavierten Aqua bidest. auf 100,0 mL aufgefüllt.

3.2.3 β-Galactosidase Test (Blau-Weiß-Färbung)

Formaldehyd-Lösung 4%ig für X-Gal-Färbung

Formaldehyd 37% wurde mit PBS 1x zu einer finalen Konzentration von 4% verdünnt. Dazu wurden 2,16 mL Formaldehyd 37% mit 17,84 mL PBS 1x verdünnt.

Reaktionspuffer für X-Gal-Färbung

Kaliumhexacyanido (III) ferrat	645 mg	1,9 mM
Kaliumhexacyanido (II) ferrat-Trihydrat	844 mg	0,5 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	37 mg	0,15 mM

Die Substanzen wurden in PBS 1x aufgelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal wurde in einer Konzentration von 20 mg/mL in DMSO gelöst.

Reaktionslösung für X-Gal-Färbung [1 mg/mL]

Die X-Gal-Stammlösung wurde im Reaktionspuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt.

3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Ethanol 70% (V/V) in DEPC-Wasser

35 mL Ethanol p.a. wurden mit 15 mL DEPC-Wasser verdünnt.

Natriumacetat-Lösung 3 M

Natriumacetat wurde in einer Konzentration von 3 M in Reinstwasser gelöst und im Anschluss steril filtriert.

3.2.5 RNA-Isolierung

DEPC-Wasser 0,1 %-ig

0,1 % (V/V) Diethylpyrocarbonat (DEPC) wurden in Reinstwasser gelöst. Das Reinstwasser inkubierte für 1 - 2 Stunden mit DEPC im Wasserbad bei 37°C. Zur Inaktivierung des DEPCs wurde die Lösung autoklaviert, das DEPC zerfiel dabei rückstandlos. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8 C.

RNase-freie DNase

Das RNase-freie DNase I Lyophylisat (QIAGEN-Kit) wurde in 550 µL RNase-freiem Wasser gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

Tris-HCl	10 mM
EDTA	0,1 mM

Die Substanzen wurden in DEPC-Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden entsprechend abgefasste Aliquots bei 2 - 8°C gelagert.

3.2.6 PCR**Primer-Stammlösung**

Das Primerlyophylisat wurde zu 125 µM in TE-Puffer 1x pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten gelöst und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Primer-Arbeitslösung [12,5 µM]

Die Primer-Stammlösung wurde 1:10 mit TE-Puffer 1x pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten verdünnt und aliquotiert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.7 Protein-Präparation**NP-40 Lysis-Buffer**

NP-40	1% (V/V)
Tris	20 mM
Natriumchlorid	137 mM
Glycerol	10% (V/V)
EDTA	2 mM
Natriumorthovanadat	1 mM
Reinstwasser	ad 100,0 mL

Nach dem Lösen der Substanzen in Reinstwasser wurde ein pH-Wert der Lösung von 8 eingestellt. Kurz vor der Verwendung des Lyse-Puffers wurden die Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin in einer Endkonzentration von 10 µg/mL zugesetzt.

3.2.8 BCA-Protein-Assay

BCA-Assay-Reagenzmischung

1 Teil *Reagent B* wurde mit 50 Teilen *Reagent A* (BCATM ProteinAssay) gemischt. Die Mischung wurde stets frisch kurz vor der Verwendung hergestellt.

BSA-Standard

Der BSA-Standard wurde in Aqua bidest. zu einer Konzentration von 2 mg/mL gelöst. Für die Standard-Verdünnungsreihe wurden folgende Konzentrationen in Aqua bidest. hergestellt: 1500, 1000, 700, 500, 250, 125 und 25 µg/mL. Die Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert.

3.2.9 Elektrophorese

A) Nukleinsäuren

Agarose-Lösung 1%-ig oder 2%-ig

Die berechnete Menge an Agarose wurde unter Aufkochen in der Mikrowelle in dem entsprechenden Volumen an TAE-Puffer 1x in Lösung gebracht. Im Anschluss wurde für 10 - 15 min auf dem Magnetrührer zum Abkühlen gerührt. Pro 100 mL Lösung wurden 2 - 3 Tropfen der Kristallviolett-Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde im Trockenschrank bei 50°C aufbewahrt, um so ein Aushärten des Gels zu verhindern.

Kristallviolett-Lösung

1 Spatelspitze Kristallviolett wurde in 500 µL TAE-Puffer 1x gelöst.

TAE-Puffer 10 x

Tris	400 mM
Essigsäure	200 mM
EDTA	10 mM
Reinstwasser	ad 1000,0 mL

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und ein pH-Wert von 8,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

TAE-Laupuffer 1x

Der TAE-Puffer 10x wurde 1:10 mit Reinstwasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

GelRed®-Färbelösung

15 µL der GelRed®-Stocklösung 10.000x wurden zu 50 mL Wasser gegeben. Vor Licht geschützt konnte diese Färbelösung 2 - 3 Wochen gelagert werden.

B) Proteine

APS-Lösung 10%ig

Ammoniumperoxodisulfat (APS) wurde in einer Konzentration von 10% in Reinstwasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Dazu wurden 1 g APS eingewogen und auf 10,0 mL mit Reinstwasser aufgefüllt.

Laemmli-Puffer 2x

Tris-HCl	125 mM
SDS	6%
β-Mercaptoethanol	10% (V/V)
Glycerin	30% (V/V)
Bromphenolblau	1 Pipettenspitze
Reinstwasser	ad 10,0 mL

SDS und Tris-HCl wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 6,7 eingestellt. Die verbliebenen Bestandteile wurden hinzugefügt und der Puffer bei 2 - 8°C gelagert.

SDS-Lösung (20%)

500 g SDS wurden in 2500 mL Aqua bidest. gelöst.

Sammelgelpuffer 4x

Tris	0,5 M
SDS	0,4%
Reinstwasser	ad 1000,0 mL

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10x

Tris	25 mM
SDS	10,0%
Reinstwasser	ad 1000,0 mL

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst.

SDS-Laupuffer 1x

Der Puffer wurde vor Gebrauch aus SDS-Laupuffer 10x durch eine 1:10-Verdünnung mit Reinstwasser hergestellt.

Trenngelpuffer 4x

Tris	1,5 M
SDS	0,4%
Reinstwasser	ad 1000,0 mL

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

3.2.10 Western Blot

Semi-Dry-Puffer

SDS-Laupuffer 1x wurde mit 10% Methanol versetzt.

TBS 10x

Tris	200 mM
Natriumchlorid	9%
Reinstwasser	ad 1000,0 mL

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

TBS 1x

Der Puffer wurde vor Gebrauch aus TBS 10x durch eine 1:10-Verdünnung mit Reinstwasser hergestellt.

TBST

TBS 1x wurde mit 0,1% Tween 20 versetzt.

Blocking-Puffer

3% Milchpulver (m/V) wurden in TBST gelöst.

3.2.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

Formaldehyd-Lösung 4%ig für Fluoreszenzmikroskopie

Formaldehyd 37% wurde mit PBS 1x zu einer finalen Konzentration von 4% verdünnt. Dazu wurden 2,16 mL Formaldehyd 37% mit 17,84 mL PBS 1x verdünnt.

PBS 1x high salt

PBS 1x wurde hergestellt, wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben. Allerdings betrug die Konzentration von Natriumchlorid hier 400 mM für diesen Puffer.

PBST 1x

PBS 1x wurde mit 0,3% (V/V) Triton X-100 versetzt.

Blocking-Puffer

PBST 1x wurde mit 5% (m/V) BSA versetzt.

3.2.12 Calcium-Assay

Calciumchlorid-Lösung 1 M

Calciumchlorid-Dihydrat wurde zu 1 M in Reinstwasser gelöst (1,47 g auf 10,0 mL Reinstwasser).

Magnesiumsulfat-Lösung 1 M

Magnesiumsulfat-Heptahydrat wurde zu 1 M in Reinstwasser gelöst (2,46 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat auf 10,0 mL Reinstwasser).

KHP-Puffer 5x (Krebs-HEPES-Puffer)

Natriumchlorid	17,33 g	118,6 mM
Kaliumchlorid	0,87 g	4,7 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,41 g	1,2 mM
Natriumhydrogencarbonat	0,88 g	4,2 mM
D-(+)-Glucose	5,27 g	11,7 mM
HEPES (freie Säure)	5,96 g	10,0 mM

Die Substanzen wurden in einem 500 mL Becherglas eingewogen, in etwa 450 mL Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde im Messkolben auf 500,0 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

KHP-Puffer 1x + Calcium und Magnesium

100,0 mL KHP 5x wurden in einen Messkolben überführt und mit 650 µL der 1 M Calciumchlorid-Lösung versetzt. Mit Reinstwasser wurde auf etwa 400 mL aufgefüllt, danach wurden 600 µL der 1 M Magnesiumsulfat-Lösung zugegeben und entsprechend mit Reinstwasser bis zur Messmarke (500,0 mL) aufgefüllt. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Oregon-Green®488 BAPTA-1/AM Aliquotierung

39,7 µL DMSO wurden zu 50 µg Oregon Green ®488 BAPTA-1/AM (special packing der Firma Molecular Probes) gegeben, 1 - 2 min bei 1500 rpm geschüttelt und zu je 3 µL aliquotiert. Die hergestellte Lösung hat eine Konzentration von 1 mM und wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Da das Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM sehr lichtempfindlich ist, wurde es immer erst kurz vor Gebrauch aus dem Kühlschrank genommen.

Pluronic F-127-Lösung 20%ig

0,2 g Pluronic F-127 wurden in ein 1,5 mL Tube eingewogen und mit DMSO auf 1 g Gesamtgewicht aufgefüllt.

3.2.13 cAMP-Reportergen-Assay

Luciferase-Assay-Reagenz (LAR) pH 7,8

Tricin	5,376 g	30 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,233 g	10 mM
EDTA	0,075 g	0,5 mM
DTT	0,771 g	10 mM
Reinstwasser	ad 500,0 mL	
ATP	0,5 mM	
Coenzym A	0,5 mM	
D-Luciferin	0,5 mM	

Zu 400 mL Reinstwasser wurden das Tricin und das EDTA gegeben. Zum vollständigen Lösen der Substanzen wurde der Ansatz für 15 min auf der Magnetheizplatte erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit der entsprechenden Menge an Magnesiumsulfat und dem DTT versetzt.

Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt und die Lösung auf 500,0 mL aufgefüllt. Die Lösung wurde à 40 mL aliquotiert und die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Vor der Messung wurde der LAR aufgetaut und die noch fehlenden Bestandteile ATP,

Coenzym A und D-Luciferin wurden stets frisch zugesetzt (jeweils 1 mL der jeweiligen 10 mM Stocklösungen auf 20 mL LAR).

Luciferase-Lyse-Reagenz (LLR) pH 7,8

Tricin	0,717 g	8 mM
DTT	0,077 g	1 mM
EDTA	0,292 g	2 mM
Triton X-100	25 g	5%
Reinstwasser	ad 500,0 mL	

Tricin und EDTA wurden mit 400 mL Reinstwasser versetzt und für etwa 15 min auf der Magnethitzplatte erhitzt, um die Substanzen zu lösen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde Triton X-100 und DTT zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt und auf 500,0 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Die fertige Lösung wurde à 40 mL aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.2.14 MTT-Assay

Cisplatin-Stammlösung 5 mM

15 mg Cisplatin wurden in 10 mL Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/V) im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde zu 1 mL in 1,5 mL Reaktionsgefäß aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Cisplatin-Verdünnungsreihen

Die Cisplatin-Verdünnungsreihe wurde aus der Stammlösung durch Verdünnen mit 0,9% Natriumchlorid-Lösung hergestellt. Um eine $10^{-2,5}$ M Cisplatin-Lösung zu erhalten, wurden 632 µL der 5 mM Cisplatin-Stammlösung mit 368 µL 0,9%ige Natriumchlorid verdünnt. Für die 10^{-3} M Cisplatin-Lösung wurden 200 µL der Stammlösung mit 800 µL Natriumchlorid-Lösung verdünnt. Die beiden Lösungen wurden anschließend weiter 1:10 mit der 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung bis zu den Konzentrationen $10^{-5,5}$ M und 10^{-7} M verdünnt. Die fertige Verdünnungsreihe wurde bei -20°C gelagert.

Die 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung wurde im MTT-Assay als Kontroll-Lösung verwendet. Die verwendeten finalen Konzentrationen von Cisplatin auf den Zellen betrugen 316 µM, 100 µM, 31,6 µM, 10 µM, 3,16 µM, 1 µM, 316 nM, 100 nM und 10 nM.

MTT-Stammlösung [5 mg/mL]

250 mg MTT wurden in 50 mL PBS 1x gelöst. Die fertige Lösung wurde im Dunkeln bei 2 - 8°C gelagert.

Natriumchlorid-Lösung 0,9% ig (m/v)

9 g Natriumchlorid wurden in 1000,0 mL Reinstwasser gelöst. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Paclitaxel-Verdünnungsreihe

Die Paclitaxel-Verdünnungsreihe wurde aus der fertigen Stocklösung (1,17 mM) durch Verdünnen mit RPMI-Medium hergestellt. Zunächst wurde eine 100 µM Lösung hergestellt, indem 43 µL der Stocklösung mit 457 µL RPMI-Medium versetzt wurden. Aus dieser Verdünnung wurden alle weiteren Verdünnungen hergestellt. Die gewählten Konzentrationen richteten sich hierbei nach den unterschiedlichen Sensitivitäten der Zelllinien.

RPMI-Medium diente im MTT-Assay als Kontroll-Lösung.

Topotecan-Verdünnungsreihe

Die Topotecan-Verdünnungsreihe wurde aus der fertigen Stocklösung (2,37 mM) durch Verdünnen mit RPMI-Medium hergestellt. Zunächst wurde eine 100 µM Lösung hergestellt, indem 21 µL der Stocklösung mit 479 µL RPMI-Medium versetzt wurden. Aus dieser Verdünnung wurden alle weiteren Verdünnungen hergestellt. Die gewählten Konzentrationen richteten sich hierbei nach den unterschiedlichen Sensitivitäten der Zelllinien.

RPMI-Medium diente im MTT-Assay als Kontroll-Lösung.

3.2.15 Apoptose-Assay

Hypotoner PI-Lysebuffer I

Natriumcitrat	0,1% (m/V)
Triton X-100	0,1% (V/V)
Propidiumiodid	100 µg/mL

Für den hypotonen Lyse-Puffer wurde Aqua dest. verwendet, welches zuvor steril filtriert wurde, um mögliche Partikel zu entfernen. Die Substanzen wurden in dem Aqua dest. gelöst und die fertige Lösung wurde bei 2 - 8 C im Dunklen aufbewahrt.

3.2.16 Zellzyklusanalyse

Ethanol 70% (V/V)-Lösung

35 mL Ethanol p.a. wurden mit 15 mL Aqua bidest. verdünnt und bei 2 - 8°C gelagert.

Propidiumiodid-Lösung [500 µg/mL]

Propidiumiodid wurde in Aqua dest., welches zuvor steril filtriert wurde, zu einer Konzentration von 500 µg/mL gelöst. Die fertige Lösung wurde bei 2 - 8°C im Dunkeln aufbewahrt.

Hypotoner PI-Lysepuffer II

Triton X-100	0,1% (V/V)
Propidiumiodid-Lösung	400 µL
DNase-freie RNase A	2 mg

Zunächst wurde Triton X-100 in 10 mL PBS 1x gelöst. Die anderen Substanzen wurde im Anschluss hinzugefügt. Die Lösung wurde stets frisch hergestellt und vor Licht geschützt bei 2 - 8°C gelagert.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur

3.3.1.1 Zellkultivierung

Sämtliche Arbeiten im Rahmen der Zellkultur wurden unter Laminar-Airflow-Sterilwerkbänken durchgeführt, um eine Kontaminationen der Zellen mit Keimen zu vermeiden. Dabei wurden Helipur® 1,5% (V/V) oder Isopropanol 70% (V/V) zur Flächendesinfektion sowie zur Desinfektion der Arbeitsmaterialien und der Handschuhe verwendet.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zusammen mit dem im Medium enthaltenen Hydrogencarbonat konnte über den eingestellten CO₂-Gehalt im Inkubator die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes im Medium von 7,2 - 7,4 gewährleistet werden, um so den Zellen möglichst optimale Wachstumsbedingungen zu bieten.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und alle 2 - 3 Tage mit frischem Nährmedium versorgt. Je nach geplantem Experiment wurden Zellen auch in T25-Zellkulturflaschen, beispielsweise für die Isolierung von RNA oder in T175-Zellkulturflaschen für Proteinpräparationen herangezogen.

3.3.1.2 Ernten und Passagieren

Die Zellen wurden einmal in der Woche passagiert, etwa bei einer Konfluenz von 80% - 90%. Um die Zellen aus einer T75-Zellkulturflasche zu ernten wurde zunächst das gesamte Nährmedium entfernt, dann wurde der Zellrasen mit 3 mL PBS 1x gewaschen und anschließend trypsinisiert. D.h. die Zellen wurden durch enzymatische Spaltung der Oberflächenproteine, über welche die Zellen am Boden der Zellkulturflasche anhaften, abgelöst. Nach Zugabe von 3 mL Trypsin/EDTA wurden die beiden Ovarialkarzinomzelllinien HEY und OVCAR 3 für ca. 4 Minuten im Inkubator bei 37°C trypsinisiert. Die verschiedenen P2Y-exprimierenden-1321N1-Zelllinien sowie die HEK293-Zellen wurden bei Raumtemperatur inkubiert, hier konnte der Ablösevorgang vom Boden der Zellkulturflasche direkt unter dem Mikroskop verfolgt werden; sobald sich die normalerweise länglich aussehenden Astrozytomzellen abkugelten, konnte die Enzymreaktion gestoppt werden. Dazu wurden die Zellen in 7 mL des jeweiligen Nährmediums aufgenommen und mehrmals durchmischt. Diese Zellsuspension wurde in eine 50 mL PP-Röhre überführt, welche anschließend bei 4°C und 266 rpm für 4 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 5 mL frischen Nährmedium aufgenommen und resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde für die weitere Kultivierung als

Zellbackup in eine neue Zellkulturflasche ausgesät, die restlichen Zellen wurden für die geplanten Experimente verwendet.

3.3.1.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, geerntet. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurden 20 μL der Zellsuspension mit 80 μL der Eosinlösung 0,4% verdünnt (der Verdünnungsfaktor beträgt in diesem Fall $\text{VF} = 1:5$) und mit Hilfe einer Neubauerzellkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurde sich folgender Sachverhalt zu Nutze gemacht: der rote Farbstoff Eosin ist in der Lage durch geschädigte Zellmembranen in nicht mehr lebende Zellen einzudringen und diese entsprechend tief rot zu färben. Lebende Zellen mit noch intakter Zellmembran erscheinen dagegen hell im mikroskopischen Bild, da der rote Farbstoff in diese Zellen nicht eindringen kann. Auf diese Weise kann zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Die hell erscheinenden Zellen in der Zählkammer, welche aus vier Quadranten (n_{1-4}) mit jeweils 16 Kleinquadrate bestehen, wurden meanderförmig ausgezählt. Berücksichtigt wurden dabei nur die Zellen in den Teilquadranten und auf den jeweiligen linken und oberen Begrenzungen, um zu verhindern, dass Zellen auf Grenzlinien zwischen Teilquadranten doppelt gezählt werden. Um die Zellzahl pro mL Zellsuspension berechnen zu können wurde Formel 2 zu Grunde gelegt, in die der Kammerfaktor von 0,4 und der Verdünnungsfaktor VF mit eingeht.

Formel 2

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{L} = \frac{\sum n_{1-4}}{0,4} \times \text{VF}$$

3.3.1.4 Einfrieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80 - 90% wurden die Zellen, wie unter Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, geerntet und zum Schluss das Zellpellet in 1 mL Nährmedium (aus T75-Zellkulturflasche) resuspendiert. 900 μL dieser Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert und sofort mit 100 μL DMSO versetzt. Durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren wurde alles gut durchmischt und zunächst über Nacht bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in die -80°C Tiefkühltruhe zur weiteren Lagerung überführt. Für die Langzeitlagerung erfolgte dann eine erneute Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C).

3.3.1.5 Ausfrieren von Zellen

Um Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, wurde das jeweilige Kryoröhrchen rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension anschließend direkt in eine Zellkulturflasche, gefüllt mit bereits auf 37°C vorgewärmten Nährmedium, überführt. Nach etwa sechs Stunden wurde das Nährmedium getauscht.

3.3.2 Etablierung P2Y-Rezeptor-exprimierender Zelllinien mittels FlpIn™-System

3.3.2.1 FlpIn™-System

Um die verschiedenen P2Y-Rezeptorsubtypen jeweils stabil in eine Wunsch-Host-Zelllinie transfizieren und somit neue, das GOI (= Gene of Interest)-exprimierende Zelllinien generieren zu können, wurde das von Invitrogen entwickelte FlpIn™-System verwendet (100). Dieses erlaubt die Integration des GOI an einer spezifischen Stelle im Genom der gewählten Säugetier-Host-Zelllinie mittels Rekombination von Erp-Recombination-Target (FRT)-sites (101). Während bei der herkömmlichen Art der Transfektion das GOI beliebig häufig an verschiedenen Stellen im Genom eingebaut sein kann, so dass die Expression der transfizierten Gene in den klonierten Zelllinien nicht unbedingt miteinander vergleichbar ist, so weist das FlpIn™-System einen entscheidenden Vorteil auf. Zwar ist auch hier nicht bekannt, wie oft die FlpIn™-Kassette in das Genom der Host-Zelllinie integriert wurde, aber da sie immer an denselben Stellen eingebaut wurde und für die Transfektionsarbeiten immer diese eine Host-Zelllinie herangezogen wird, ist davon auszugehen, dass alle GOIs immer an denselben Stellen mit derselben Häufigkeit eingebaut werden, so dass die Gen-Expressionsdaten klonierte Zelllinien untereinander vergleichbar wären.

Zunächst wurde die Zeocin-resistente Host-Zelllinie generiert, indem der pFRT/*lacZeo*-Vektor stabil in die ausgesuchte Zelllinie, hier die 1321N1 Astrozytom-Zelllinie, transfiziert wurde. Diese Arbeiten wurden bereits von S. Meis aus dem Arbeitskreis von Prof. Kassack durchgeführt, so dass die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie im Arbeitskreis bereits zur Verfügung stand. Die einzelnen Schritte zur Generierung der P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien werden detaillierter in den nachfolgenden Kapiteln erläutert. Die schematische Darstellung der einzelnen Schritte ist in Abbildung 10 gezeigt.

Um das gewünschte Gen stabil in die FlpIn-Host-Zelllinie transfizieren zu können, wurde zunächst das GOI in den Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde das Plasmid mit der enthaltenen CDS (Coding DNA Sequence) in *E. coli* transformiert, vermehrt und aus den Bakterien wieder isoliert. Im nächsten Schritt wurde das zuvor vermehrte Plasmid einem Restriktionsverdau unterzogen, um die CDS herauszuschneiden. Der Expressionsvektor pcDNA5/FRT wurde ebenfalls einem Restriktionsverdau mit den zuvor gewählten Restriktionsenzymen unterzogen, um diesen in der offenen Form zu erhalten. Um zu verhindern, dass der offene Expressionsvektor mit sich selbst religiert, wurde dieser dephosphoryliert. Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die herausgeschnittenen DNA-Fragmente von den offenen Plasmiden getrennt, die benötigten Strukturen [cDNA-Sequenz des GOI (= Insert) und der offene Expressionsvektor] wurden aus dem Gel herausgeschnitten und im nächsten Schritt daraus extrahiert.

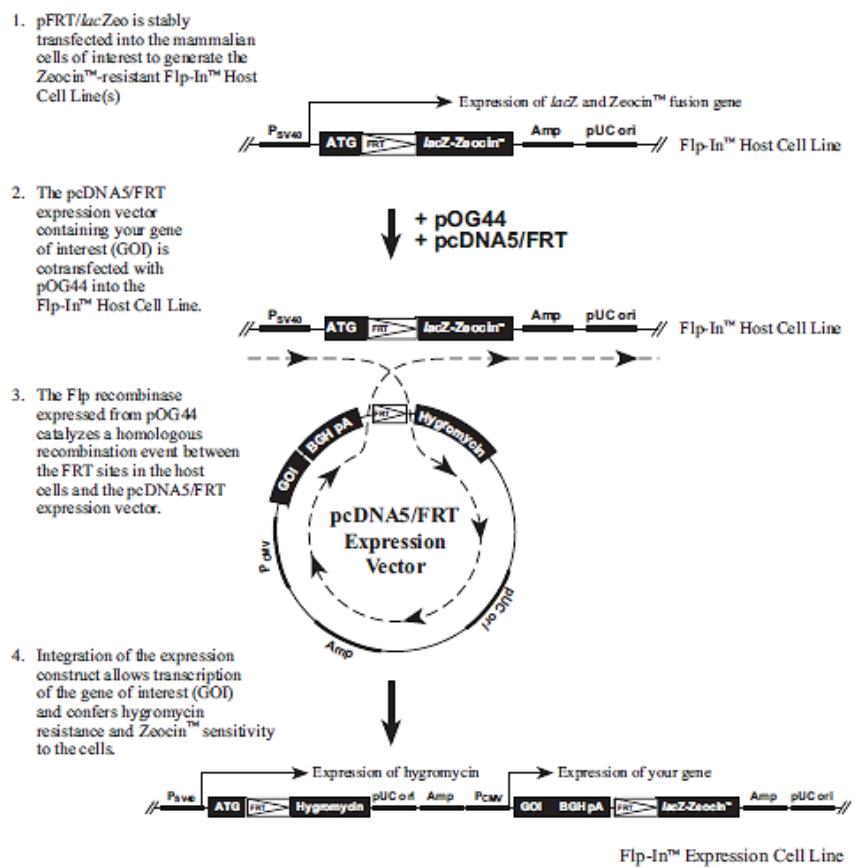


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Generierung einer FlpIn-Host-Zelllinie, sowie des Einbaus des Expressionsvektors mit dem enthaltenen GOI in diese Host-Zelllinie. Die Abbildung wurde entnommen aus dem Manual „FlpIn™ System: For Generating Stable Mammalian Expression Cell Lines by Flp Recombinase-Mediated Integration“ (Version E, 2010) von Invitrogen (100).

Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Insert in den offenen Expressionsvektor ligiert. Nun wurde der, das GOI tragende Expressionsvektor, in die Host-Zelllinie transfiziert, die Zellklone selektiert und die stabil transfizierten Zelllinien sowohl funktionell im Calcium-Assay bzw. cAMP-Assay als auch über eine sogenannte Blau-Weiß-Färbung charakterisiert. Um sicher zu gehen, dass durch die Klonierungsarbeiten keine Spontan-Mutationen hervorgerufen wurden, wurden die hergestellten Expressionsvektoren sequenziert.

3.3.2.2 Transformation, Vermehrung und Aufreinigung von Vektoren in *E. coli*

Die acht kommerziell erworbenen P2Y-cDNA-Sequenzen lagen alle in dem pcDNA3.1(+)-Vektor vor. Aus der Vektorkarte im Anhang (siehe Anhang A) wird ersichtlich, dass dieser Vektor über ein Ampicillin-Resistenzgen verfügt. Dies hat zur Folge, dass nach der Transformation durch den Zusatz des Antibiotikums Ampicillin nur die gewünschten, plasmidtragende *E. coli*-Bakterien vermehrt werden. Vor Transformationsbeginn wurden Ampicillin-haltige LB-Agar-Platten, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit einer Konzentration von 50 µg/mL, frisch herge-

stellt und über Nacht im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Das zu transformierende Plasmid lag in einer Konzentration von 5 - 20 ng/µL vor und wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Die kompetenten *E. coli*-Bakterien (hier vom Stamm XL1-Blue) wurden ebenfalls zum Auftauen für etwa eine Stunde auf Eis gestellt und das bereits vorbereitete SOC-Medium wurde auf 37°C erwärmt. Die Transformation wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (102). Dazu wurden 100 µL der aufgetauten *E. coli*-Suspension in eine 50 mL Schraubröhre gegeben, etwa 2 µL der Plasmidlösung zugegeben und durch leichtes Röhren mit der Pipettenspitze miteinander vermischt. Nachdem die Mischung für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurde, wurde sie für den Hitzeschock exakt 45 Sekunden in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad gehalten und umgehend wieder für zwei Minuten auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 500 µL vorgewärmten SOC-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator (150 - 175 rpm) geschüttelt. Danach wurde der Transformationsansatz auf die Ampicillin-haltigen Agarplatten durch Austreichen mithilfe einer ausgeglühten Impföse aufgebracht. Die beschickten Agarplatten wurden bei 37°C und hoher Luftfeuchte über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden wiederrum mithilfe der ausgeglühten Impföse Einzelzellklone gepickt und einzeln in Schraubröhren überführt, in denen sich 12 mL auf 37°C vorgewärmtes Ampicillin-haltiges LB-Medium befand. Dieser neue Ansatz wurde so lange bei 37°C und 150 - 175 rpm geschüttelt bis eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen war. Dann wurde der Ansatz in einen Zweilitermesskolben überführt, welcher mit etwa 250 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium gefüllt war und über Nacht weiter inkubiert (37°C und 150 - 175 rpm). Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung und Aufreinigung des vermehrten Plasmids aus den *E. coli*-Bakterien mithilfe des EndoFree® Plasmid Purification Maxi Kits nach Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte cDNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration unter Verwendung des Nanophotometers der Firma Implen bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte cDNA bei -20°C gelagert.

3.3.2.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Um die cDNA des GOI, sprich das Insert, in den pcDNA5/FRT-Expressionsvektor einbauen zu können, wurden zunächst das in *E. coli* vermehrte und aufgereinigte Plasmid sowie der Expressionsvektor einem DNA-Doppelverdau unterzogen. Als Restriktionsenzyme wurden dafür Hind III und Xho I gewählt, denn beide Vektoren, sowohl der pcDNA3.1(+) als auch der pcDNA5/FRT-Vektor verfügen in ihren Multiple Cloning Sites (= MCS) über Schnittstellen für Hind III und Xho I (siehe Vektorkarten, Anhang A). Um eine Religation des offenen Expressionsvektors zu verhindern wurde dieser im Anschluss an den Restriktionsverdau mit einer alkalischen Phosphatase (CIAP) behandelt, welche entsprechend die 5'-Phosphatgruppe dephos-

phoryliert und somit die Rezyklisierung unterbindet. Die Ansätze für den Restriktionsverdau wurden gemäß Tabelle 16 pipettiert.

Tabelle 16: Pipettierschema für den Restriktionsverdau.

Komponente	Menge
Plasmid-DNA	10 µg
Hind III [10 U/µL]	2 µL
Xho I [10 U/µL]	2 µL
Puffer R 10x	5 µL
Ampuwa	ad 50 µL

Im Anschluss daran wurden die Ansätze für mindestens drei Stunden bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurde die Temperatur im Thermocycler am Ende für 10 Minuten auf 65°C angehoben. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Expressionsvektor noch mit der alkalischen Phosphatase behandelt. Dazu wurden 4 µL der CIAP (40 U)-Lösung und 6 µL des CIAP-Reaktionspuffers 10x zugesetzt. Nach einer erneuten Inkubation für 45 Minuten bei 37°C im Thermocycler wurde das Enzym am Ende durch Erhitzen auf 85°C für 10 Minuten inaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze bei -20°C gelagert.

3.3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Extraktion

Um die durch den Restriktionsverdau herausgeschnittenen DNA-Fragmente vom restlichen Plasmid abzutrennen, wurden die Ansätze mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die gewünschten Fragmente wurden dann aus dem Gel heraus geschnitten und die Plasmid-DNA mithilfe eines Gel-Extraktions-Kits aufgereinigt. Dazu wurde zunächst ein 10 cm langes, 1%-iges Agarosegel verwendet, welches zusätzlich mit Kristallviolett angefärbt wurde. Das Pipettierschema für die jeweiligen Ansätze ist in Tabelle 17 angegeben.

Tabelle 17: Pipettierschema für die Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Menge
Restriktionsansatz / DNA-Leiter	25 µL / 10 µL
Loading dye 6x	6 µL
TAE 1x	ad 36 µL

Das Gel wurde entsprechend Abbildung 11 beschickt und für eine Stunde bei 80 Volt entwickelt, anhand des Beladungspuffers wurde das Fortschreiten der DNA im Gel überwacht.

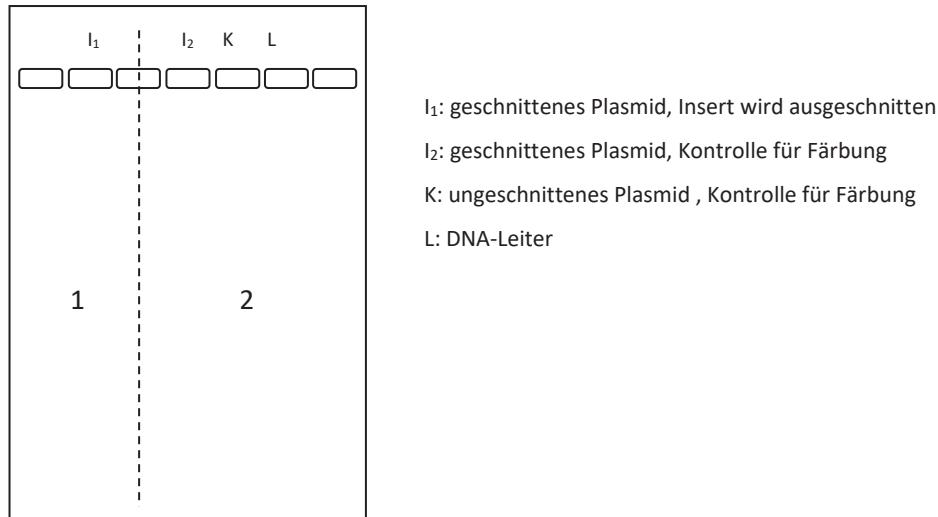


Abbildung 11: Schematische Belegung der Taschen für die Agarose-Gelelektrophorese. Das Gel wurde an der gestrichelten Linie geschnitten, dabei kennzeichnet 1) die Fläche, aus der das Insert herausgeschnitten und nicht gefärbt wurde und 2) die Fläche, welche in die GelRed®-Färbelösung eingelegt wurde.

Durch den Zusatz von Kristallviolett (2 - 3 Tropfen einer 1%-igen Kristallviolett-Lösung) wurden die DNA-Banden auch ohne den Einsatz von GelRed® oder von DNA-schädigendem UV-Licht sichtbar gemacht, da die negativ geladene DNA das positiv geladene Kristallviolett „vor sich her schob“. Anhand dieser Markierung wurde dann das gewünschte Insert mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten (in Abbildung 11 als Fläche 1 bezeichnet) und direkt in ein Mikroreaktionsgefäß überprüft. Die mit 2 gekennzeichnete Fläche aus Abbildung 11 wurde für 30 Minuten in die GelRed®-Färbelösung eingelegt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Banden im Geldektionssystem Gel iX Imager der Firma INTAS sichtbar gemacht und für die Auswertung betrachtet.

Unter zur Hilfenahme des innuPREP DOUBLE pure Kits der Firma Analytikjena wurde die DNA nach Angaben des Herstellers aus dem heraus geschnittenen Gelstück extrahiert. Die DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen, die Konzentration mit dem Nanophotometer der Firma Implen bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2.5 Ligation

Im nächsten Schritt wurde das gewünschte Insert, welches die CDS des GOI enthält, in den offenen pcDNA5/FRT-Expressionsvektor hinein ligiert. Da beide Plasmide über die Restriktionsenzyme Hind III und Xho I geschnitten wurden, wurde für die Ligation die T4-DNA-Ligase, welche die „sticky ends“ der jeweils komplementären Enden beider Fragmente miteinander verknüpft, verwendet. Für die Ligation lag ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 vor. Die einzusetzenden Plasmidmengen wurden anhand der Formel 3 berechnet.

Formel 3: Gleichung zur Berechnung der einzusetzenden Plasmidmengen für die Ligation.

$$m_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] \times 3}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

Der Ansatz für die Ligation wurde nach dem Schema in Tabelle 18 pipettiert und dann für eine Stunde im Thermocycler bei 22°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Ligation durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 Minuten beendet.

Tabelle 18: Pipettierschema für die Ligationsreaktion.

Komponente	Menge
DNA Insert	Berechnet nach Formel 2
DNA Vektor	100 ng
Ligationspuffer 10x	2 µL
T4-DNA-Ligase [5u/µL]	1 µL
Ampuwa	ad 20 µL

Der Ligationsansatz wurde, wie unter Kapitel 3.3.2.2 beschrieben, in *E. coli* transformiert und vermehrt. Nach der Aufreinigung und der Konzentrationsbestimmung wurde der Ansatz für die Transfektion in die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie verwendet.

3.3.2.6 Transfektion in die 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie

Für die eigentliche Transfektion der klonierten Expressionvektoren in die gewünschte Zelllinie, wurde zunächst die bereits im Arbeitskreis Kassack vorliegende 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie in Kultur genommen. Dafür wurde diese in Zeocin-haltigem Selektionsmedium (400 µg/mL Zeocin) kultiviert. An Tag 1 der Transfektionsarbeiten wurden je 500.000 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. An Tag 2 wurde zunächst die Transfektionsmischung, wie in Tabelle 19 angegeben, hergestellt.

Tabelle 19: Pipettierschema der Transfektionsmischung.

Komponente	Menge
pOG44	25 µg
pcDNA5/FRT-GOI bzw. -LV	2,5 µg
reines DMEM	ad 250 µL

Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin verwendet, davon wurden 6 µL zu 250 µL reinen DMEM-Medium ohne weitere Zusätze gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Lipofectaminansatz wurde dann mit dem Transfektionsansatz gemischt und für

weiter 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexmischung zu erhalten. Nun wurde das Nährmedium vorsichtig von den am Vortag vorbereiteten Wells der 6-Well-Platte entfernt und erneut mit 1,5 mL DMEM-Nährmedium (enthält 10% FKS und Penicillin/Streptomycin) versetzt. Nachdem die Wells mit dem jeweils zu transfizierenden GOIs gekennzeichnet waren, wurde die entsprechende Komplexmischung hinzugegeben und vorsichtig verteilt. Ein Kontrollwell wurde mit 500 μ L reinem DMEM (ohne weitere Zusätze gefüttert). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten bzw. am übernächsten Tag wurden die Zellen je nach Konfluenz auf T75-Kulturflaschen ausgesät und zunächst nur mit reinem DMEM-Nährmedium ohne weitere Zusätze an Selektionsantibiotikum kultiviert. Am 4. bzw. 5. Tag wurden die Zellen erstmalig mit Hygromycin-B-haltigen Nährmedium versorgt.

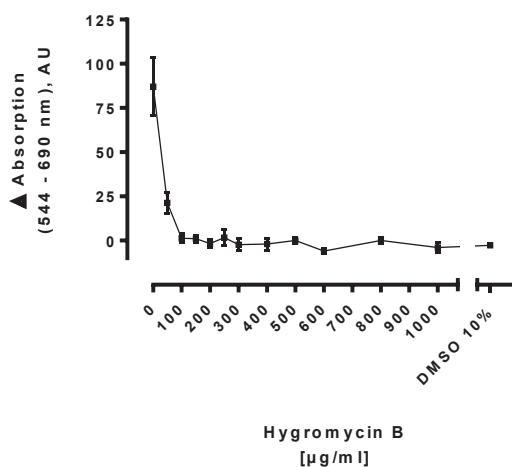


Abbildung 12: Zytotoxizität von Hygromycin B bestimmt an der 1321N1-FlpIn Host-Zelllinie mittels MTT-Assay. DMSO 10% wurde als Kontrolle verwendet, bei der es zu keinem Zellwachstum mehr kommen sollte. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

In Vorversuchen an der 1321N1-FlpIn Host-Zelllinie wurde mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) die zu verwendende Konzentration an Hygromycin B bestimmt. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis des hierzu durchgeföhrten MTT-Assays, 250 μ g/mL wurden als Konzentration für das Hygromycin B-haltige Selektionsmedium bestimmt.

3.3.2.7 Klonselektion

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen für 1 - 2 Wochen in Hygromycin B-haltigem (Konzentration 250 μ g/mL) Medium kultiviert um sicher zu stellen, dass nur erfolgreich transfizierte Zellen sich vermehren. Die Zellen wurden geerntet und für die Klonselektion eine Zelle pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät, um eine Einzelklonzelllinie zu generieren. Die Zellen

wurden über mehrere Wochen im Selektionsantibiotikum-haltigem Medium kultiviert und am Ende nur die Wells, in denen sich augenscheinlich nur eine Zellkolonie ausgebildet hatte, in Kultur gehalten und weiter vermehrt. Mithilfe von zwei Tests wurde überprüft, ob die Zellen das gewünschte GOI enthielten. Erstens wurde mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) untersucht, ob die Zellen sensiv auf das Antibiotikum Zeocin reagieren (siehe Abbildung 13) und zweitens wurde mittels β -Galactosidase-Test (siehe Kapitel 3.3.2.8) nachgewiesen, ob die Zellen in der Lage waren, das Enzym β -Galactosidase zu exprimieren. Nur Zeocin-sensitive Zellklone, die ebenso einen Verlust der β -Galactosidase-Aktivität zeigten, wurden in den funktionellen Assays (Calcium-Assay bzw. cAMP-Assay, siehe Kapitel 3.3.6.1 und 3.3.6.3) weiter untersucht.

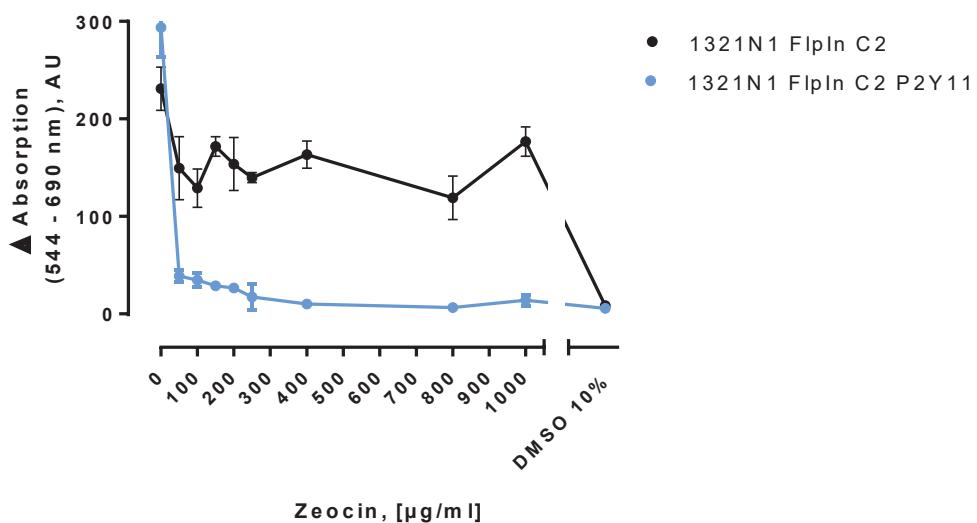


Abbildung 13: Vergleich der Zeocin-Sensitivität. Zwischen der Zeocin-resistenten 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie (schwarz) und einem bereits transfizierten, Zeocin-sensitiven Zellklons (blau). DMSO 10% wurde als Kontrolle verwendet bei der es zu keinem Zellwachstum mehr kommen sollte. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

3.3.2.8 β -Galactosidase Test (Blau-Weiß-Färbung)

Die Blau-Weiß-Färbung diente als Nachweis der β -Galactosidase Aktivität. Bei Transformations- bzw. Transfektionsarbeiten wird das *LacZeo*-Gen, welches für die Expression der β -Galactosidase verantwortlich ist (99), oft verwendet, um über diese Nachweisreaktion (siehe Abbildung 14) Informationen über das Vorliegen eines zur Ausbildung des Enzyms β -Galactosidase fähigen Zellklons zu bekommen. Dadurch wurde überprüft, ob das Plasmid korrekt eingebaut wurde. Durch die Zugabe des Stoffes X-Gal färbten sich Zellklone, die zur Expression der β -Galactosidase befähigt sind, unter Ausbildung eines Indigo-Farbstoffes blau.

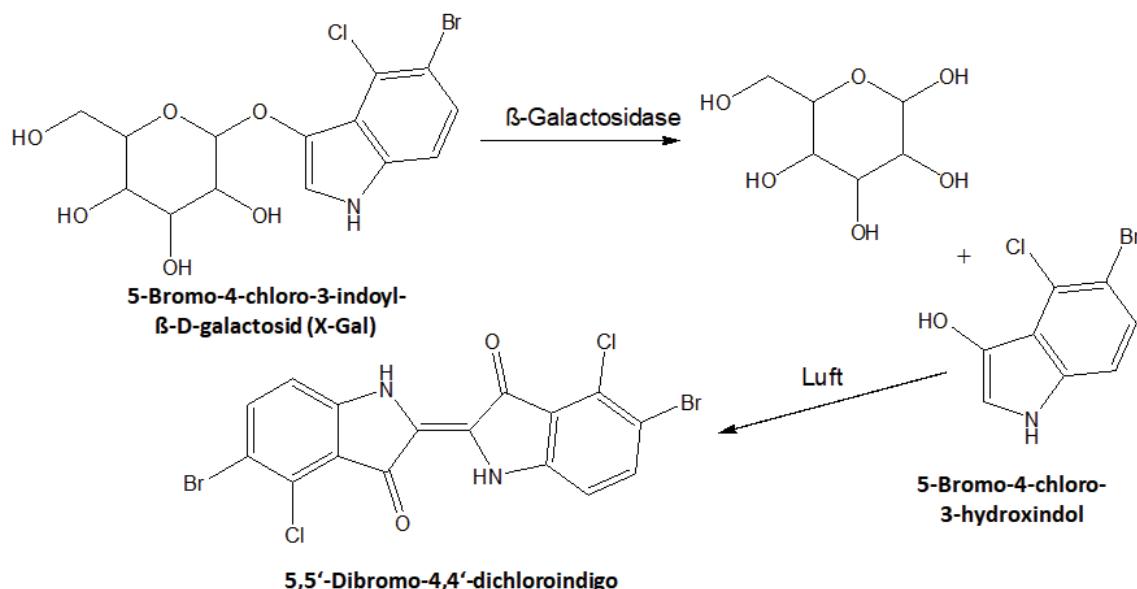


Abbildung 14: β-Galactosidase-Nachweis-Reaktion. Die Substanz X-Gal wird durch β-Galactosidase hydrolysiert und anschließend unter Verbrauch von Luftsauerstoff in einen blauen Indigo-Farbstoff oxidiert.

Hier wurde zunächst durch die Transfektion mit dem pFRT/*lacZeo*-Vektor eine 1321N1-FlpIn-Host-Zelllinie generiert (99), die sowohl resistent gegenüber dem Antibiotikum Zeocin war als auch zur Expression der β-Galactosidase befähigt war und somit eine Blaufärbung beobachtet werden konnte. Durch die folgende Transfektion mit dem pcDNA5/FRT-Expressionsvektor, welcher das GOI trägt, verliert der neue Zellklon die Fähigkeit zur Ausbildung der β-Galactosidase. Somit kann keine Blaufärbung mehr beobachtet werden.

Für den β-Galactosidase-Test wurden 10.000 Zellen pro Well auf einer 24-Well-Platte ausgesät und für 1 - 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Versuchstag wurde der Reaktionspuffer (siehe Kapitel 3.2.3) frisch hergestellt. Der Überstand in den Wells wurde entfernt und der Zellrasen mit 500 µL PBS 1x gewaschen. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit der 4%-igen Formaldehyd-Lösung fixiert und anschließend zweimal mit PBS 1x gewaschen. Beim zweiten Waschschritt verblieb der PBS 1x-Puffer für 10 Minuten auf den Zellen. Zuletzt wurden 220 µL Reaktionslösung pro Well hinzugegeben und die 24-Well-Platte für min. 3 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Auswertung erfolgte qualitativ mit Hilfe des Mikroskops. Dabei wurde nach reiner Weiß- bzw. Blaufärbung oder Mischfärbung unterschieden. Klone, die eine Mischfärbung aufwiesen, wurden nicht weiter verwendet. In Abbildung 15 sind beispielhaft Aufnahmen rein weißer (A), rein blauer (B) und misch (C) gefärbter Zellklone gezeigt.



Abbildung 15: Mikroskopische Bilder nach dem Test auf β -Galactosidase-Aktivität. A) zeigt einen rein weißen Klon, hier hat der Einbau des Expressionsvektors in die FlpIn-Kassette stattgefunden, B) zeigt die blau gefärbte 1321N1-FlpIn-Hostzelllinie, welche durch den Einbau des pFRT/lacZeo-Vektors die Fähigkeit zur Ausbildung der β -Galactosidase besitzt und C) zeigt beispielhaft einen blau-weiß-gefärbten Mischklon. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

3.3.2.9 Funktionelle Charakterisierung der Einzelzellklone

Für die funktionelle Charakterisierung wurden Zellklone verwendet, welche Zeocin-sensitiv waren und eine Weiß-Färbung zeigten. Zudem wurde mittels Calcium-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.1) überprüft, ob die Rezeptoren P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₁ in den Zellklonen aktiv vorlagen. Desweitern wurde die Aktivität der G_s- bzw. G_i-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ mittels cAMP-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.3) untersucht. Für weitere Experimente wurden nur Zelllinien verwendet, die EC₅₀-und pEC₅₀-Werte entsprechend der Literatur (36,85,103–108) aufwiesen.

3.3.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA für die Sequenzanalyse

Um zu überprüfen, dass durch die Klonierungsarbeiten keine Mutationen in den Plasmidsequenzen hervorgerufen wurden und um zu bestätigen, dass die jeweiligen P2Y-Rezeptorsequenzen richtig herum in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT eingebaut wurden, wurde die Sequenzierung der acht hergestellten Expressionsvektoren beim Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Auftrag gegeben. Die Plasmidfällung wurde, wie bereits von S. Meis im Rahmen ihrer Thesis beschreiben (98), durchgeführt. Um sicherzustellen, dass nach der Fällung min. 1 μ g DNA vorhanden ist, wurden jeweils 2,5 μ g Plasmid-DNA eingesetzt. Die Plasmid-Lösung wurde mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumenanteilen Ethanol versetzt. Im Anschluss daran wurde das Mikroreaktionsgefäß für 10 Minuten bei -80°C inkubiert, um die DNA zu fällen. Nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 12.000 $\times g$ wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die ausgefällte Plasmid-DNA einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das DNA-Pellet mit 50 μ L Ethanol 70% gewaschen und erneut unter den oben angegebenen Bedingungen für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet so lange an der Luft getrocknet bis kein Ethanol mehr vorhanden war. Für

die Sequenzierung des pcDNA5/FRT-Vektors wurden die Standardprimer T7 und BGH_{rev}, wie in der Vektorkarte (siehe Anhang A) ausgewiesen, verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzanalyse unter Angabe des Alignments zwischen Referenzsequenz des Gens und der vom BMFZ ermittelten Sequenz sind im Anhang (siehe Anhang C) aufgeführt.

3.3.3 Kombinatorisches Screening der NF-Substanzbibliothek

3.3.3.1 NF-Substanzen

Die rund 450 untersuchten Substanzen der NF-Substanzbibliothek wurden im Arbeitskreis von Prof. Nickel bzw. im Arbeitskreis von Prof. Kassack entsprechend bereits veröffentlichten Protokollen (84,85) synthetisiert. Sowohl vom Suramin-abgeleitete große Harnstoffe als auch kleine Harnstoffe vom NF340-Typ und unsymmetrische Verbindungen wurden hergestellt. Getestet wurden neben den Endsubstanzen auch die jeweiligen Nitro- und Aminovorstufen.

Suramin (Germanin®) wurde freundlicherweise von der Firma Bayer zur Verfügung gestellt.

3.3.3.2 Kombinatorisches Screening

In einem ersten Screening wurden bis zu 16 Testsubstanzen in vierer Kombinationen pro Assay auf ihre antagonistische Aktivität am P2Y₂-Rezeptor hin mittels Calcium-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.1) getestet. Jede Substanz wurde dabei zweimal pro Platte in jeweils unterschiedlicher Kombination untersucht. Die Zelllinien 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ und 1321N1-P2Y₂ wurden hierbei als Zellsysteme verwendet. Die grundsätzlichen Abreiten mit der Zelllinie im Rahmen des Calcium-Assays werden ebenfalls in Kapitel 3.3.6.1 ausführlich beschrieben.

Zunächst wurden von den Testsubstanzen 10 mM Stammlösungen angesetzt, woraus dann die acht Kombinationslösungen, A – H, hergestellt wurden (100 µM und 1 mM):

Kombi A: Substanzen 1,2,3,4

Kombi B: Substanzen 5,6,7,8

Kombi C: Substanzen 9,10,11,12

Kombi D: Substanzen 13,14,15,16

Kombi E: Substanzen 1,5,9,13

Kombi F: Substanzen 2,6,10,14

Kombi G: Substanzen 3,7,11,15

Kombi H: Substanzen 4,8,12,16

Die Stammlösungen und die jeweiligen Verdünnungen wurden alle in KHP 1x-Puffer hergestellt. Die Reagenzienplatte, welche die zu untersuchenden Kombinationslösungen für die 30-minütige Präinkubation enthielt, wurde analog zu der in Abbildung 16 abgebildeten Vorlage pipettiert. Suramin wurde als Positiv-Kontrolle verwendet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							Puffer					
B			Kombi A 10 μ M		Kombi D 10 μ M		Kombi G 10 μ M					
C	P	P		100 μ M			100 μ M		100 μ M		P	
D	u	u	Kombi B 10 μ M		Kombi E 10 μ M		Kombi H 10 μ M				u	f
E	f	f		100 μ M			100 μ M		100 μ M		f	e
F	r	r	Kombi C 10 μ M		Kombi F 10 μ M				Suramin 1 mM		r	
G				100 μ M			100 μ M		Puffer			
H						Puffer						

Abbildung 16: Assay-Layout der Reagenzienplatte, welche die potentiellen Antagonisten in den Kombilösungen enthält.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			ATP 10 nM		ATP 100 nM		ATP 316 nM					
B												
C	P											ATP 1 μ M
D	u	f		Agonist 2x EC ₅₀								
E	f	e										
F	r											ATP 10 μ M
G									UTP 1 μ M			
H			UTP 10 nM		UTP 100 nM		UTP 316 nM					

Abbildung 17: Layout der zweiten Reagenzienplatte. Diese enthält die ATP- und UTP-Kontrollen und als Standardagonist wird ATP in der zweifachen EC₅₀ vorgelegt.

Weiter wurde die zweite Reagenzienplatte mit den Agonisten entsprechend der Vorlage in Abbildung 17 vorbereitet. Auf dieser Platte befanden sich sowohl die ATP- und UTP-Kontrollen, als auch der Standardagonist ATP in seiner zweifachen EC₅₀ (finale Konzentration). Auch hier ist zu beachten, dass durch den 1:10-Verdünnungsschritt im NOVOSTAR®, die Lösungen 10-fach höher als final gewünscht vorgelegt werden müssen. Die genaue Auswertung der erhobenen Daten wird in Kapitel 3.3.6.1 beschrieben. Die dazu herangezogene endgültige Belegung der Assayplatte ist in Abbildung 18 gezeigt. Bestand der Verdacht, dass eine Substanz antagonistische Aktivität am P2Y₂-Rezeptor aufwies, indem das ATP-vermittelte Calcium-Signal durch zwei

Kombinationen, welche dieselbe Substanz enthielten, inhibiert wurde, so wurde die betreffende in den beiden Kombinationslösungen vorkommende Substanz im Einzelscreening untersucht und näher charakterisiert hinsichtlich ihrer IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			A	ATP 10 nM		ATP 100 nM		ATP 316 nM				
B			g	Kombi A 10 μ M		Kombi D 10 μ M		Kombi G 10 μ M				
C			n		100 μ M			100 μ M		100 μ M		ATP 1 μ M
D			l	Kombi B 10 μ M		Kombi E 10 μ M		Kombi H 10 μ M				
E			t		100 μ M			100 μ M		100 μ M		
F			r	Kombi C 10 μ M		Kombi F 10 μ M		Suramin 1 mM				ATP 10 μ M
G			E		100 μ M			100 μ M	UTP 1 μ M			
H			5	UTP 10 nM		UTP 100 nM		UTP 316 nM				
			0									

Abbildung 18: Finales Layout des Calcium-Assays für das kombinatorische Grobscreening. An dieser Belegung orientiert sich die Auswertung der Daten.

3.3.4 Nachweis von Zielstrukturen auf mRNA-Ebene

3.3.4.1 DNA-Microarray-Analyse

Die Arbeiten der Gen-Expressionsanalyse wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Brigitte Royer-Pokora aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, nach bereits veröffentlichten Protokollen durchgeführt (109). Verwendet wurden dabei Agilent 44k whole genome micro-array-Platten, welche im Agilent Microarray Scanner vermessen wurden. Die mit Hilfe der Rosetta Luminator Software analysierten Daten für die Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden dem Arbeitskreis Kassack für die Expressionsanalyse der purinergen Rezeptoren zur Verfügung gestellt.

3.3.4.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde das my-Budget RNA Mini Kit verwendet. Dazu wurde die zu untersuchende Zelllinie auf T25-Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80 - 90% kultiviert. Dann wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt und diese zweimal mit PBS 1x gewaschen. Die Zellen wurden trypsinisiert und mit frischen Nährmedium vorsichtig vom Flaschenboden herab gelöst. Nach dem Zentrifugie-

ren wurde der Überstand entfernt, das erhaltene Zellpellet in dem Lysepuffer aus dem my-Budget RNA Mini Kit aufgenommen und nach der in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeit auf die erste Zentrifugationssäule D gegeben. Die weiteren Arbeitsschritte wurden wie in der Arbeitsanleitung beschrieben ausgeführt. Außerdem wurde der im Protokoll als optional ausgewiesene DNase-Verdau vor dem zweiten Waschschnitt mit dem Puffer HS durchgeführt. Hierzu wurde das RNase-free DNase I-Set der Firma QIAGEN verwendet. Die Lösung für den DNase-Verdau wurde dabei direkt auf dem Filter der Zentrifugationssäule R gegeben und die vorgeschriebene Inkubationszeit bei Raumtemperatur abgewartet, bevor laut Gebrauchsanweisung weiter gearbeitet wurde. Am Ende wurde die RNA mit dem im Kit enthaltenen RNase-freiem Wasser eluiert. Nach dem ersten Eluierungsschritt wurde das gesamte Eluat aufgenommen und erneut auf die Säule für einen zweiten Eluierungsschritt gegeben, um so die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Ab diesem Schritt wurde die RNA auf Eis gelagert.

Um die Konzentration der erhaltenen RNA zu bestimmen, wurde das NanoPhotometer der Firma Implen benutzt. Die Absorptionen der Proben wurden bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) gegen die von RNase-freiem Wasser gemessen. Des Weiteren wurde der Quotient A_{260}/A_{280} ermittelt, um eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA treffen zu können. Denn Nukleinsäuren absorbieren bei 260 nm und Verunreinigungen, wie Proteine, Phenol oder andere Kontaminationen, die möglicherweise während des Isolationsvorganges eingetragen werden, absorbieren üblicherweise bei 280 nm. Bei einem Verhältnis A_{260}/A_{280} von etwa 2,0 gilt RNA als „rein“ [14].

Die RNA wurde à 1 µg aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4.3 Reverse Transkription

Für die weitere Expressionsanalyse wurde die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde, wie in Tabelle 20 angegeben, pipettiert (88).

Tabelle 20: Pipettierschema der reversen Transkription.

Komponente	Menge
RNA	1 µg
Reaktionspuffer 10x	1 µL
dNTPs 25x	0,4 µL
Oligo(dT) ₂₃ -Primer	0,5 µL
Reverse Transkriptase [1:5 verdünnt in Ampuwa]	2,5 µL
Ampuwa	ad 10 µL

Die einzelnen Komponenten wurden bis auf das Ampuwa langsam und vor Licht geschützt auf

Eis aufgetaut. Der Reaktionspuffer 10x, die dNTPs und die Reverse Transkriptase stammen aus dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems. Als Primer wurden die Oligo(dT)23 von Sigma Aldrich verwendet, da diese über einen Poly-Thymidin-Rest verfügen und dadurch gewährleistet wurde, dass aus der Gesamt-RNA nur die polyadenyliert vorliegende mRNA umgeschrieben wurde. Zunächst wurde ein Mastermix, bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs und Oligo-Primer, für $n + 1$ (n = Anzahl der in cDNA umzuschreibenden Proben) vorgemischt. Jeweils 1,9 μ L Mastermix wurde in die PCR-Reaktionsgefäße, welche sich auf einem Eis-Rack befanden, pipettiert und mit der jeweils berechneten Menge an Ampuwa versetzt. Nachdem die RNA zugefügt wurde, wurde zuletzt die verdünnte Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Ansätze wurden vorsichtig durch Röhren mit der Pipettenspitze gemischt. Die Proben wurden in den Thermocycler (Mastercycler der Eppendorf AG) überstellt. Zunächst wurden die Ansätze für 10 Minuten auf 25°C temperiert und dann für 120 Minuten auf 37°C erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben mit den cDNA-Produkten je mit 100 μ L TE-Puffer 1x verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4.4 Primerdesign

Für das Primerdesign das Programm Primer Blast der NCBI Datenbank verwendet. Dabei wurden die in Tabelle 21 aufgeführten Kriterien berücksichtigt.

Tabelle 21: Kriterien für das Konzipieren von Primern.

Primerlänge	18 - 24 bp
Melting Temperature (Tm)	55°C – 72°C
PCR-Produkt-Länge	100 – 200 bp
G/C-Gehalt	45% - 55%
G/C-Clamp	1
Poly-X	max. 5
Spezifität	möglichst hoch
Self-Complementary	möglichst niedrig

Für eine ausreichende Spezifität des Primers beträgt seine Länge zwischen 18 bp und 24 bp. Die Schmelztemperatur der Primer (Melting Temperature) liegt entsprechend der Annealing-temperatur zwischen 55°C und 72°C und ist in etwa gleich für den rechten und den linken Primer. Des Weiteren ist die Annealingtemperatur abhängig von dem Gehalt an Guanin und Cytosin. Ein G/C-Clamp von 1 bedeutet, dass der Primer auf Guanin (G) oder Cytosin (C) endet. Dies gewährleistet, dass der Primer an das Template über die drei Wasserstoffbrückenbindungen der Basen fest bindet. Die jeweilige Länge des resultierenden PCR-Produktes liegt zwischen 100 bp - 200 bp, was für eine Quantifizierung mit SYBR® Green-I optimal ist. Die Self-

Complementary, also die Tendenz eines Primers entweder an sich selbst oder an den zweiten Primer zu binden, ist möglichst klein. Das Überspannen von Exon-Exon-Schnittstellen seitens des Primers wurde hier nicht berücksichtigt, da die Gruppe der P2Y-Rezeptoren aufgrund fehlender Introns in der Gensequenz diese nicht aufweisen (4). Durch den DNase I-Verdau, wie in Kapitel 3.3.4.3 beschrieben, wurde gewährleitet, dass Verunreinigen mit genomicscher DNA, welche während der RNA-Isolation nicht ausreichend abgetrennt wurden, zerstört und in der PCR nicht mit erfasst wurden.

Die so konzipierten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt. Die Primer-Sequenzen sind in Kapitel 3.1.3 angegeben.

3.3.4.5 PCR

Nachdem RNA aus den zu untersuchenden Zelllinien isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, wurde mit Hilfe der PCR die Expressionsanalyse bestimmter Zielgene durchgeführt. Das Pipettierschema für die PCR ist in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Pipettierschema für die Polymerase-Ketten-Reaktion.

Komponente	Menge
cDNA	1,5 µL
Rechter Primer (125 µM)	0,8 µL
Linker Primer (125 µM)	0,8 µL
QuantiTect-SYBR® Green Master Mix 2x	10 µL
Ampuwa	ad 20 µL

Tabelle 23: Protokoll der Polymerase-Ketten-Reaktion.

Schritt Nr.	Teilreaktion	Temperatur [°C]	Zeit
1	Erste Denaturierung Polymerase-Aktivierung	95	2 min.
2	Denaturierung	94	20 sec.
3	Annealing	57	30 sec.
4	Elongation	72	1 min.
39 Wiederholungen ab Schritt 2			
5	Kühlung	16	HOLD

Zunächst wurde ein Mastermix bestehend aus cDNA, QuantiTect-SYBR®Green Master Mix 2x und Ampuwa für n + 2 Proben hergestellt und in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Nun wurden rechter und linker Primer des jeweils zu untersuchenden Zielgens entsprechend Tabelle 22

hinzugefügt. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren leicht gemischt und die Reaktion laut Protokoll (siehe Tabelle 23) ausgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurden die PCR-Produkte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4.6 Nukleinsäure-Gel-Elektrophorese

Wie bereits in Kapitel 3.3.2.4 beschrieben, wurde zum Nachweis der mithilfe der PCR vervielfältigten Zielgene (= Gene of Interest, GOI, hier die P2-Rezeptoren) die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund der zu erwartenden PCR-Produktgröße (siehe Tabelle 7) von 100 - 256 bp für die jeweiligen PCR-Produkte wurde in diesem Fall ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Die aufzutragenden Ansätze wurden entsprechend Tabelle 24 vorbereitet und dann in die Taschen des ausgehärteten Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 125 Volt durchgeführt.

Tabelle 24: Pipettierschema für die Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte.

Komponente	Menge
PCR-Produkt / DNA-Leiter	10 µL / 5 µL
Loading dye 6x	5 µL
TAE 1x	ad 20 µL

Anhand des mit aufgetragenen Beladungspuffers und der DNA-Leiter wurde der Vorschritt der PCR-Produkte im Gel während der Elektrophorese verfolgt. Um die PCR-Produkte sichtbar zu machen, wurde das gesamte Gel im Anschluss an die Elektrophorese für 30 Minuten in das GelRed®-Färbebad gelegt. Die DNA-Banden wurden im Geldetektionssystem Gel iX Imager der Firma INTAS sichtbar gemacht und für die Auswertung betrachtet.

3.3.5 Nachweis von Zielstrukturen auf Proteinebene

3.3.5.1 Protein-Präparation

In Abhängigkeit von dem geplanten Experiment-Aufbau, der Zelllinie oder des im Western Blot zu untersuchenden Proteins wurde die auszusäende Zellzahl individuell angepasst und entweder T75 oder T175-Flaschen verwendet. Während der Proteinisolierung wurde generell auf Eis gearbeitet.

War die gewünschte Konfluenz von 80 – 90% erreicht, so wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt, diese einmal mit eiskalten PBS 1x gewaschen, anschließend der NP-40-Lysis-Puffer hinzugegeben und durch vorsichtiges Umschwenken auf den Zellen verteilt. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber herab gelöst und das erhaltene Lysat in ein Eppendorf-Reaktions-

gefäß überführt. Zunächst wurde das Lysat für 30 Minuten bei 4°C gerollt, bevor es dann für 10 - 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde, um so weitere Bestandteile, wie enthaltende DNA durch Ausfällen, abzutrennen, während die Proteine in Lösung blieben. Der Überstand wurde anschließend in eine neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Western Blot-Experimente wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer 2x verdünnt und dann für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dies führte sowohl zur Denaturierung der Proteine als auch zur Anlagerung von SDS in stöchiometrischen Mengen. Dadurch wurde die Nettoladung der Proteine negativ und alle Proteine wiesen dasselbe Masse/Ladungs-Verhältnis auf. Bis zur weiteren Verwendungen wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.3.5.2 BCA-Protein-Assay

Zunächst wurde ein Teil des Lysats aus der Protein-Präparation im Verhältnis 1:10 mit steril filtriertem Aqua dest. verdünnt. Jeweils 25 µL dieser Verdünnung wurden in Duplikaten in eine 96-Well-Mikrotiterplatte, welche auf Eis gelagert wurde, pipettiert. Nachdem die BSA-Standard-Verdünnungsreihe langsam auf Eis aufgetaut war, wurde diese ebenfalls in Duplikaten auf die zu vermessende Platte pipettiert. Zu den Protein-Proben wurde nun je 200 µL des frisch hergestellten BCA-Protein-Assay-Reagenz gegeben und die Platte im Anschluss daran für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption im FLUOStar® bei 544 nm gemessen. Eine Farbänderung in den einzelnen Wells der Mikrotiterplatte von grün (Farbe des BCA-Protein-Assay-Reagenz) zu violett bedeutete, dass Protein in der Probe vorhanden war. Die gemessene Absorption wurde gegen die jeweilige Konzentration der BSA-Standardreihe aufgetragen. Es wurde eine Kalibriergerade durch die aufgetragenen Punkte gelegt und eine Gleichung nach dem Vorbild in Formel 4 ermittelt.

Formel 4

$$y = mx + b$$

y = Absorption bei 544 nm

x = Proteinkonzentration [µg/mL]

m = Steigung der Geraden

b = Schnittpunkt mit der y-Achse

Durch Umformen erhält man Formel 5, anhand derer sich die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probe rechnerisch bestimmen lässt.

Formel 5

$$x = \frac{y - b}{m}$$

3.3.5.3 Sodium-Dodecylsulfat-Polyarylamid-Gel-Elektrophorese

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyarylamid-Gel-Elektrophorese) wurde verwendet, um die Expression von Zielproteinen nachzuweisen. Dazu wurde ein 10%-iges Trengel verwendet. Die Zusammensetzung für Trenn- bzw. Sammelgel sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 25: Zusammensetzung des Trengels.

Komponente	Menge
Rotiphorese Gel 30	2,0 mL
Reinstwasser.	2,5 mL
Trenngelpuffer 4x	1,5 mL
APS-Lösung 10%	60 µL
TEMED p.a.	6 µL

Tabelle 26: Zusammensetzung des Sammelgels.

Komponente	Menge
Rotiphorese Gel 30	1,0 mL
Reinstwasser.	3,5 mL
Sammelgelpuffer 4x	1,5 mL
APS-Lösung 10%	60 µL
TEMED p.a.	6 µL

Zunächst wurde das Trengel in einer 15 mL PP-Röhre hergestellt und nach dem Mischen vorsichtig mit der Pipette zwischen die Glasplatten der Gelgießapparatur (Mini-Protean® System von Bio-Rad) gegeben. Das Gel wurde vorsichtig mit 1 mL Isopropanol überschichtet, um eine glatte Grenze zwischen den beiden Gelen zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren des Trengels wurde der Isopropanol vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trengel pipettiert. Der Kamm zum Definieren der 10 Taschen wurde umgehend eingesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurden die Glasplatten in angefeuchtetes Papier eingewickelt und konnten zur vollständigen Polymerisation der Gele einige Stunden oder über Nacht bei 2 - 8°C gelagert werden.

Für die Elektrophorese wurden die Glasplatten mit dem Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und das Innere der Kammer mit SDS-Laufpuffer 1x gefüllt. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel entfernt und die so entstehenden Taschen mit Laufpuffer gespült. Nachdem die mit Laemmlipuffer versetzten Proteinproben auf Eis aufgetaut waren, wurden die gewünschten Proteinmengen (max. 20 µL pro Tasche) und 10 µL der vorgefärbten Proteinleiter

(PageRuler™ Prestained Protein Ladder oder PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) in die Taschen pipettiert. Zunächst wurde die Elektrophorese bei 80 Volt gestartet. Nach 30 Minuten wurde die Spannung auf 160 Volt erhöht und die Elektrophorese so lange durchgeführt bis die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht war.

3.3.5.4 Western Blot

Zum Durchführen des Western Blot wurde in dieser Arbeit die Semi-Dry-Methode verwendet, welche bereits in der Arbeit von S. Eberle beschrieben wurde (88). Zunächst wurde die zurechtgeschnittene Polyvinylidenfluorid (PVDF) Folie für etwa 15 Sekunden mit Methanol aktiviert, um diese anschließend für min. 15 Minuten mit Semi-Dry-Puffer zu äquilibrieren. Ebenfalls in Größe des Gels zugeschnittene Filterpapiere (3 Stück) werden kurz mit Semi-Dry-Puffer getränkt und dann auf die Anode gelegt, etwaige Luftblasen wurden entfernt. Die PVDF-Membran wurde mittig auf die Filterpapiere gelegt. Nachdem die obere Glasplatte vom Gel entfernt und das Sammelgel abgetrennt war, wurde das Trenngel aus der SDS-PAGE auf die PVDF-Membran aufgelegt. Zum Abdecken wurden wiederrum 3 mit Semi-Dry-Puffer getränkte Filterpapiere verwendet und mögliche Luftblasen ausgestrichen. Die Apparatur wurde mit dem Kathodendeckel verschlossen und das Blotting gestartet (40 mA pro Membran, für 1 Stunde). Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran entnommen und für 1 Stunde in Blocking-Puffer (3% Milch in TBST 1x) bei Raumtemperatur geschwenkt. Im Anschluss daran wurde der jeweilige Primär-Antikörper (ebenfalls verdünnt in Blocking-Puffer) zugegeben und über Nacht bei 2 - 8°C geschwenkt. Folgende Primär-Antikörper-Verdünnungen wurden dabei gewählt: P2Y₁/P2Y₂/P2X₇ = 1:200, EGFR = 1:250, pEGFR = 1:250, mTOR = 1:1000, β-Actin 1:2000. Am nächsten Tag wurde der Primär-Antikörper von der Membran entfernt und diese im Folgenden bei Raumtemperatur zunächst zweimal für je 30 Minuten mit TBST und einmalig für 30 Minuten mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper (1:3000 verdünnt in Blocking-Puffer, stets frisch zubereitet) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur ebenfalls auf dem Schwenker. Die zuvor bereits beschriebenen Waschschritte wurden nach dem Entfernen des Sekundär-Antikörpers erneut durchgeführt. Dann wurde die gewaschene Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und das überschüssige TBS ausgestrichen. Die beiden Reagenzien aus dem Western Blotting Luminol Reagent Kit wurden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt. Je 1 mL der Reagenzienmischung wurde pro Membran auf der Membran verteilt und für 2 Minuten inkubiert. Nach dem Ausstreichen des überschüssigen Luminol-Reagenzes wurde die Membran durch Messen der Chemolumineszenz direkt im INTAS Imager ausgewertet. Dazu wurde der 1x1-Binning-mode/Signal verwendet, um die erhaltenen Banden semi-quantitativ auszuwerten. Am Ende wurde bei eingeschalteter Lampe im gleichen Modus die Leiter mit den angefärbten Proteinen aufgenommen. Diese wurde dann direkt in die Auf-

nahme mit den Lumineszenz-Banden einfügt, um die detektierten Banden den entsprechenden Proteingrößen zu zuordnen. Das Housekeeping-Protein β -Actin wurde zusätzlich mit detektiert, um die gleichmäßige Beladung der Taschen mit Protein überprüfen zu können.

3.3.5.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich zum Western Blot wurde auch die Immunfluoreszenzmikroskopie herangezogen, um die Expression von Zielproteinen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein bestimmter P2Y-Rezeptoren (P2RY₁, P2RY₂, P2RX₇) überprüft. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen in 6-Well-Paltten ausgesät, auf deren Boden sich vorbehandelte Deckgläschen befanden. Die Oberfläche der sonst glatten Deckgläschen wurde zuvor aufgeraut, damit die Zellen darauf anwachsen können. Die Deckgläschen wurden dafür 15 Minuten in Diethylether geschwenkt, dieser dann abgegossen, um die Gläschen erst mit 100% Ethanol und dann 70% Ethanol zu waschen. Der Alkohol wurde entfernt und ein erneuter Waschschritt mit Wasser durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen für 20 min mit 1 M Salzsäure behandelt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die behandelten Deckgläschen in 70% Ethanol aufbewahrt. Bevor die Deckgläschen in die 6-Well-Paltten gelegt wurden, wurden diese unter der Sterilwerkbank gut getrocknet, damit der anhaftende Ethanol sich verflüchtigte. Anschließend wurden die Deckgläschen in die Wells einer 6-Well-Platte gelegt. Die ausgesäten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS 1x gewaschen und die Zellen durch 15-minütiges Behandeln bei Raumtemperatur mit einer 4%-igen Formaldehyd-Lösung fixiert. Im Anschluss daran wurde eiskalter Methanol (-20°C) hinzugegeben und alles für mindestens 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach dem Entfernen des Methanols wurde einmal mit PBS 1x gewaschen und der Blocking-Puffer für 60 Minuten auf den Zellen belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Puffer von den Zellen entfernt und die Deckgläschen wurden über Nacht mit dem Primärantikörper (1:200 verdünnt in PBST 1x) bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst zweimal für je 5 Minuten mit PBS 1x gewaschen, dann für 2 Minuten mit PBS high salt und zuletzt noch einmal für 5 Minuten mit PBST 1x. Der jeweilige Sekundärantikörper (1:500 verdünnt in PBST 1x, Alexa488-konjugiert) wurde zugesetzt und dann für 1 - 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal, ebenfalls im Dunkeln, für 5 Minuten mit PBS 1x gewaschen und zweimal mit PBST gespült.

In die Mitte des Objektträgers wurde ein Tropfen VECTASHIELD (Mounting-Medium, welches bereits mit DAPI versetzt war) gegeben. Die Deckgläschen mit den fixierten und gefärbten Zellen wurden mit der Zellseite voran auf den Tropfen VECTASHIELD gelegt und wurden, indem außen um das Deckgläschen herum Nagellack aufgetragen wurde, versiegelt. Die so vorbereiteten Objektträger konnten bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop Olym-

pus Bx43 im Dunkeln bei 2 - 8°C gelagert werden. Nach Aufnahme der Bilder mit den jeweiligen Filtern der entsprechenden Fluoreszenzen (DAPI: Ex = 405 nm, Em = 461 nm; Alexa Fluor®488: Ex = 488 nm, Em = 520 nm) wurden diese mithilfe der Software Image J blau bzw. grün eingefärbt und dann übereinander gelegt. In Abbildung 19 ist ein fertig bearbeitetes Bild gezeigt.

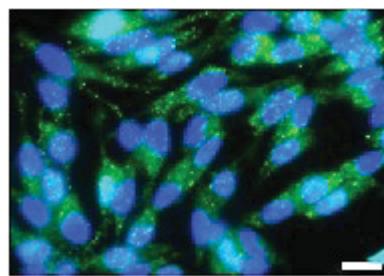


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zum Nachweis der P2Y₂-Rezeptorexpression in HEY-Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und die P2Y₂-Rezeptoren mit Alexa Fluor 488 (grün) angefärbt. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme. Der weiße Balken entspricht 20 µm.

3.3.6 Funktionelle Assays

3.3.6.1 Calcium-Assay

Der Calcium-Assay wurde, wie bereits mehrfach beschrieben (98,99,110,111), durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen funktionellen Assay, der es ermöglicht mit Hilfe des membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green®488 BAPTA-1/AM (OG) den direkten Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) zu bestimmen. Die Struktur des OG ist in Abbildung 20 gezeigt.

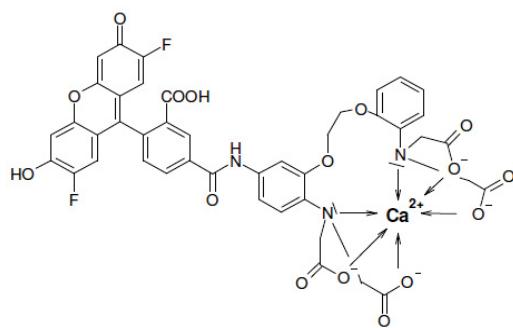


Abbildung 20: Strukturformel des Oregon Green®488 BAPTA-1/AM. Das Molekül besteht aus zwei Teilen: dem Fluoreszenzfarbstoff (2',7'-difluoro-Fluorescein) und dem Calciumionen-Chelator BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraacetoxy). In dieser Form hat die Substanz schon intrazelluläre Ca²⁺-Ionen komplexiert, da die Acetoxyethylreste bereits durch unspezifische intrazelluläre Esterasen gespalten wurden. Abbildung entnommen aus (99).

Dieser „Ein-Wellenlängen-Farbstoff“ besteht aus dem für die Fluoreszenz verantwortlichen Strukturelement 2',7'-difluoro-Fluorescein und der Ca^{2+} -komplexierenden Komponente 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA), was zur Folge hat, dass durch die Chelation von Calciumionen die Fluoreszenz verstärkt wird. Da die Carbonsäuren zunächst als Acetoxymethylester (AM) vorliegen, ermöglicht dies beim Beladen der Zelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff, dass dieser aufgrund seiner Lipophilie durch passive Diffusion ins Zellinnere gelangt. Hier werden die Ester durch unspezifische Esterasen gespalten, was zu einer Erhöhung der Hydrophilie führt, so dass der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Nach der Estersspaltung werden Ca^{2+} -Ionen komplexiert, wodurch die Fluoreszenz verstärkt wird. Die Fluoreszenzintensität ist in diesem Fall direkt proportional zur intrazellulären Calciumionenkonzentration. Das Anregungsmaximum des OG liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 525 nm. Die Durchführung des Calcium-Assays wurde im Arbeitskreis bereits etabliert (98,99,110) und an die verwendeten Zelllinien angepasst. Um die Änderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu ermitteln, wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des NOVOSTAR® Plate Reader mit eingebauten Pipettiersystem bestimmt. Durch Injektion steigender Konzentrationen des Agonisten zu den mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen werden in Folge der G_q -Kopplung der Rezeptoren Ca^{2+} -Ionen in der Zelle freigesetzt, was sich als konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenz detektieren lässt. Abbildung 21 zeigt beispielhafte Verläufe zweier verschiedener Fluoreszenz-Zeit-Kurven.

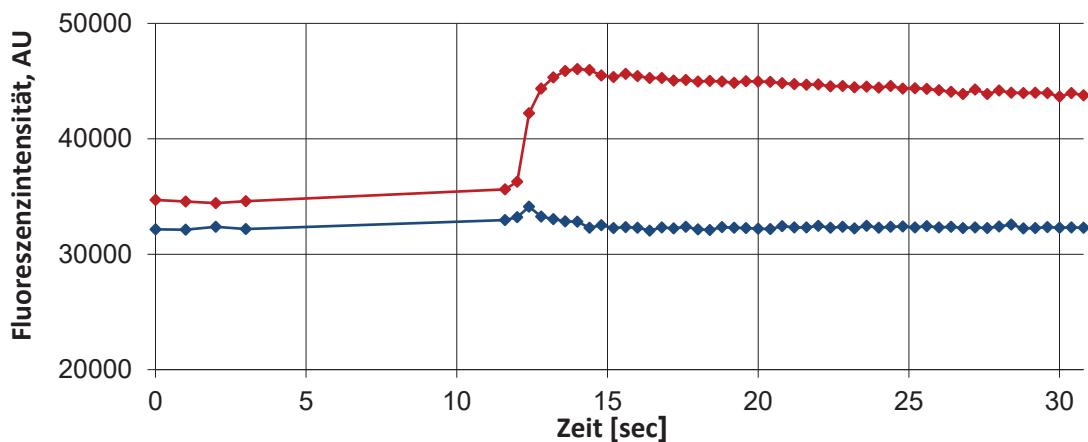


Abbildung 21: Fluoreszenz-Zeit-Kurven am Beispiel der Zelllinie 1321N1-FlpIn-P2Y₆ detektiert im NOVOSTAR® während des Calcium-Assays. Aufgetragen wurde hier die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. Zunächst wurde die Grundfluoreszenz bestimmt (4 Anfangswerte). Danach erfolgten die Injektion und die Detektion der resultierenden Fluoreszenzintensitätsverläufe. Die blaue Kurve spiegelt hier den Verlauf einer Fluoreszenz-Zeit-Kurve nach der Injektion von KHP-Puffer, als Kontrolle, wider. Bei der roten Kurve wurden 10 μM UTP injiziert.

Zunächst wurde die Grundfluoreszenz bestimmt, veranschaulicht anhand der ersten vier Punkte der Kurven. Danach erfolgte die Injektion mit dem Agonisten, so dass im Anschluss daran wieder die Fluoreszenzintensität detektiert wurde. Wurde ein Antagonist zu den Zellen injiziert, bedeutete dies, dass weniger Rezeptoren aktiviert wurden, was wiederum mit einer geringeren Calcium-Freisetzung in der Zelle und einem geringeren Fluoreszenzanstieg einher ging. Wurde nun eine fixe Konzentration des Standardagonisten zu den mit steigender Konzentration an Antagonisten vorbehandelten Zellen gegeben, ließ sich eine Abnahme des durch den Agonisten hervorgerufenen Fluoreszenzsignals detektieren. Hierbei konkurrierten der Agonist und der Antagonist um die Bindungsstelle am Rezeptor. Durch zunehmende Antagonist-Konzentrationen wurde der Rezeptor weniger stark durch den Agonisten aktiviert, was zu einer geringeren Freisetzung an Calciumionen führte und sich schließlich in abnehmenden Fluoreszenzsignalen äußerte. Aufgrund dessen wurde mit Hilfe des Calcium-Assay auch funktional zwischen Agonist und Antagonist unterschieden.

Probenvorbereitung

Zunächst wurden von den verwendeten Substanzen (sowohl von den Standardagonisten als auch -antagonisten und den NF-Substanzen) 10 mM Stammlösungen durch Lösen derer in Reinstwasser hergestellt. War eine Substanz nicht wasserlöslich, so wurde die Stammlösung in DMSO hergestellt. Die so hergestellten Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert. Die jeweiligen Verdünnungsreihen wurden durch Lösen in KHP-Puffer 1x hergestellt und wurden ebenfalls bei -20°C gelagert.

Durchführung

Der Calcium-Assay wurde, wie zuvor beschrieben (98,99,110,111), durchgeführt. Am Tag vor dem Assay wurden die Zellen, wie bereits unter Kapitel 3.3.1.2 beschrieben, geerntet, gezählt (siehe Kapitel 3.3.1.3) und auf 96-Well-Platten ausgesät. Die hier verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 27 angegeben. Die so mit Zellen bestückten Platten wurden für etwa 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Tag des Assays wurden die benötigten Reagenzien wie KHP-Puffer 1x, OG-Aliquot und auch die zu untersuchenden Substanzen aufgetaut. Der KHP-Puffer 1x wurde im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Zu dem OG-Aliquot wurden erst 3 µL der 20%-igen Pluronic F127-Lösung zu pipettiert und dann mit 2 mL KHP-Puffer 1x versetzt. Diese Lösung wurde kurz auf dem Vortexer homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung vor Licht geschützt am Arbeitsplatz gelagert. Das Nährmedium wurde von den Zellen entfernt. Um dabei so wenig Zellen wie möglich mit abzusaugen wurde eine gelbe 200 µL-Pipettenspitze auf die verwendete Pasteurpipette aufgesetzt, was den Luftstrom beim Absaugen verringerte.

Tabelle 27: Verwendete Zellzahlen im Calcium-Assay.

Zelllinie	Zellzahl [c/w]
1321N1-FlpIn-C2-LV	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₂	35.000
1321N1-P2Y ₂	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₄	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₆	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₁	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₂	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₃	35.000
1321N1-FlpIn-C2-P2Y ₁₄	35.000
HEY	40.000
OVCAR-3	45.000

Nach zweimaligem Waschen mit dem auf 37°C erwärmten KHP-Puffer 1x (200 µL pro Well) zum Entfernen des im Nährmedium enthaltenen Phenolrots, welches die Messung im NOVOSTAR® stören würde, wurden die Zellen mit der zuvor hergestellten OG-Lösung beladen. Pro Well wurden 20 µL dieser Lösung mit Hilfe eines Dispensers zugegeben, indem diese gegen die Wand des Wells pipettiert wurde. Während der nun folgenden 60-minütigen Inkubation der beladenen Zellplatte bei 37°C und 5% CO₂ wurde entweder die Reagenzienplatte mit den Agonisten (Agonist-Modus) oder die Reagenzienplatten mit den Antagonisten und die dazugehörige Platte mit den Standardagonist (Antagonist-Modus) vorbereitet. Da es durch den Injektionsvorgang im NOVOSTAR® zu einem 1:10-Verdünnungsschritt kam, wurden an dieser Stelle die gewählten Substanzverdünnungen auf der Reagenzienplatte 10-fach höher als final gewünscht vorgelegt. Die hergestellten Verdünnungen wurden mit 50 µL pro Well entsprechend dem ausgewählten Pipettierschema in die 96-Well-Platte (U-Form) pipettiert. Pro Substanz wurden immer 3 Wells nebeneinander bestückt, so dass in Triplikaten vermessen wurde. Am Ende der Beladungszeit mit dem Fluoreszenzfarbstoff OG wurde der Überstand von den Zellen entfernt. Auf einen erneuten Waschschritt wurde an dieser Stelle verzichtet, um die Zellen nicht weiter zu stressen. Im Antagonist-Modus wurden an dieser Stelle 160 µL KHP 1x, im Agonist-Modus 180 µL KHP 1x zugesetzt. Im Agonist-Modus wurden die Zell- und die Reagenzienplatte mit den Agonisten direkt in den NOVOSTAR® gestellt. Im Antagonist-Modus wurden die Zellen zunächst mit den zu testenden Substanzen beladen, indem je 20 µL pro Well aus der vorbereiteten Antagonisten-Reagenzienplatte zu den Zellen pipettiert und für weitere 30 Mi-

nuten bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zell- und die Agonist-Platten in den NOVOSTAR® gestellt. Nach 15-minütiger Inkubation beider Platten im NOVOSTAR®-Gerät bei 37°C wurde der Gain (d.h. die Verstärkung) bei einem Required Value von 50% (Required Value: Prozentumsatz des maximalen dynamischen Bereichs) in fünf zufällig gewählten Wells der Messplatte bestimmt. Der aus diesen fünf Werten bestimmte Mittelwert wurde in die NOVOSTAR®-Software eingegeben, die Messung gestartet und ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Die Exzitation erfolgte bei 485 nm, die Fluoreszenzintensität wurde bei 520 nm gemessen. Der genaue zeitliche Verlauf der Messung für ein Well ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Zeitlicher Verlauf der Messung im NOVOSTAR®- beschrieben für ein Well.

Schritt	Anzahl der Intervalle	Intervallzeit [sec.]	Anzahl der Lichtblitze	Zeitpunkt [sec.]
Messung der Grundfluoreszenz	4	1	10	0 – 4
Injektion	–	–	–	11,5
Messung der Fluoreszenz nach Injektion	45	0,4	10	11,6 – 29,6

Tabelle 29: Konzentration der eingesetzten Standardagonisten für den Antagonist-Modus im Calcium-Assay. Die Angabe in den Klammern verweist auf den jeweils verwendeten Zellklon.

Zelllinie	Rezeptor	Agonist	EC ₅₀	Konzentration im Antagonist-Modus
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₁	P2Y ₁	ADP	400 nM	800 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₂	P2Y ₂	ATP	140 nM	280 nM
	P2Y ₂	UTP	1 nM	2 nM
1321N1-P2Y ₂	P2Y ₂	ATP	25 nM	50 nM
	P2Y ₂	UTP	10 nM	20 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₄ (D3)	P2Y ₄	UTP	2 nM	4 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₆ (H6)	P2Y ₆	UDP	9 nM	18 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₁₁ (F6)	P2Y ₁₁	ATP	53 nM	100 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₁₂ (B12)	P2Y ₁₂	ADP	136 nM	300 nM
1321N1-FlpIn C2-P2Y ₁₃	P2Y ₁₃	ADP	500 nM	1 μM
HEY	P2Y ₂	ATP	107 nM	200 nM
	P2Y ₂	UTP	64 nM	150 nM
OVCAR-3	P2Y ₂	ATP	86 nM	200 nM
	P2Y ₂	UTP	30 nM	80 nM

Die Grundfluoreszenz wurde in den ersten vier Sekunden der Messung für jedes einzelne Well bestimmt. Dies entsprach dem Grundspiegel an Calciumionen in den mit OG beladenen Zellen. Während der Messung im NOVOSTAR® wurden im Agonist-Modus die zu untersuchenden Substanzen direkt durch einen eingebauten Pipettor überführt und der resultierende Effekt direkt über Messung der Fluoreszenzintensitäten, wie in Tabelle 28 beschrieben, detektiert. Im Antagonist-Modus wurde an dieser der Standardagonist in zweifacher EC₅₀ zu den Zellen pipettiert. Die Fluoreszenzen wurden ebenfalls direkt gemessen. In Tabelle 29 sind für die jeweils verwendeten Zelllinien bzw. für die jeweiligen Rezeptorsubtypen die eingesetzten Konzentrationen des Standardagonisten für den Antagonist-Modus angegeben.

Auswertung

Für die Auswertung der so erhobenen Daten wurde sowohl die auf Excel-basierende Auswertesoftware des NOVOSTAR® als auch Excel selbst herangezogen. Die Fluoreszenzintensität F wurde dabei als Differenz zwischen der maximalen Fluoreszenzintensität nach Injektion einer Substanz und der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität vor Injektion der Substanz bestimmt, siehe Formel 6.

Formel 6

$$F = F_{max} - F_{min}$$

F: Fluoreszenzintensität der Substanz

F_{max}: maximaler Fluoreszenzintensität nach Injektion einer Substanz

F_{min}: minimale, durchschnittliche Fluoreszenzintensität vor Injektion einer Substanz

Bei jedem durchgeführten Calcium-Assay wurde sowohl der Puffer alleine als auch der Standardagonist alleine als Kontrollen mit getestet. Für die Auswertung wurde dann die Fluoreszenzintensität des Standardagonisten als maximale Stimulation, d.h. als 100% (Positiv-Kontrolle) gesetzt. Daraus wurde die prozentuale Antwort der zu untersuchenden Substanz bestimmt, indem ihr Fluoreszenzsignal ins Verhältnis zum durchschnittlichen Fluoreszenzsignal des mit vermessenen Standardagonisten gesetzt wurde. Die Aktivität sowohl für Agonisten als auch für Antagonisten wurde als „% der Kontrollantwort ± SEM“ angegeben.

In dem NF-Grobscreening wurden die Kombinationslösungen in den Konzentrationen von 10 und 100 µM getestet. Bestand die Vermutung, dass eine Substanz antagonistische Aktivität aufwies, so wurde diese nochmals einzeln in den oben angebenden Konzentrationen vermesssen und letztendlich weiter charakterisiert. Analog wie für Agonisten wurden hier Konzentrations-Inhibition-Kurven generiert, indem Fluoreszenzsignale bei verschiedenen Konzentrationen

nen derselben Substanz bestimmt wurden. Der Effekt (Fluoreszenzintensität) wurde gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen, nachdem die Werte, bezogen auf den Standardagonisten, normalisiert wurden.

Diese so normalisierten Werte wurden in das Programm GraphPad Prism® übertragen und mit den Daten von mindestens zwei weiteren Experimenten dieser Form gepoolt. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe des Programms einer Auswertung nach der „Vier-Parameter logistischen Gleichung“, nachstehend gezeigt, unterzogen.

Formel 7

$$Y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X)Hillslope}}$$

X: Logarithmus der Substanzkonzentration

Y: Zellantwort nach Substanzstimulation

max: maximale Zellantwort nach Substanzstimulation

min: minimale Zellantwort

Hillslope: Steigung der Kurve im Wendepunkt

Die effektive Konzentration (EC₅₀-Wert), welche 50% der Zellantwort hervorruft, wurde bei agonistisch aktiven Substanzen bestimmt und stellt den Wendepunkt der sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Effekt-Kurve dar. Für antagonistisch wirksame Substanzen wurde analog die inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert), welche 50% der Zellantwort hervorruft, ermittelt. Daraus wiederrum wurden die einheitslosen charakteristischen Werte pEC₅₀ für Agonisten und pIC₅₀ für Antagonisten folgendermaßen berechnet:

Formel 8

$$pEC_{50} = -\log EC_{50}$$

bzw.

Formel 9

$$pIC_{50} = -\log IC_{50}$$

Zusätzlich zum pIC₅₀-Wert wurde für Antagonisten unter Verwendung der *Cheng-Prusoff*-Gleichung (siehe Formel 10) ein apparterer funktioneller K_i-Wert berechnet (112,113).

Formel 10

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{EC_{50}}}$$

IC₅₀: inhibitorische Konzentration des Antagonisten, die 50% der Zellantwort hervorruft

EC₅₀: effektive Konzentration des Agonisten, die 50% der Zellantwort hervorruft

[L]: molare Konzentration des Agonisten

Der pK_i-Wert wurde als negativer dekadischer Logarithmus des K_i-Wertes bestimmt:

Formel 11

$$pK_i = -\log K_i$$

Schild-Analyse

Eine Analyse nach *Schild* wurde durchgeführt, um das antagonistische Verhalten einer gefundenen Substanz näher zu beschreiben und zu untersuchen, ob ein kompetitiver Antagonismus vorlag (112–114). Dabei wurden Konzentrations-Effekt-Kurven des Standardagonisten in Abwesenheit und bei Anwesenheit verschiedenster Konzentrationen des zu untersuchenden Antagonisten ermittelt und die daraus resultierenden EC₅₀-Werte für den Agonisten abgeleitet.

Anhand von Formel 12 wurden die Verschiebungsfaktoren (VF) berechnet:

Formel 12

$$VF = \frac{EC_{50} \text{ mit Antagonist}}{EC_{50} \text{ ohne Antagonist}}$$

Im nächsten Schritt wurde im *Schild*-Plot der dekadische Logarithmus der Differenz (VF - 1) gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Antagonisten aufgetragen. Der pA₂-Wert, sprich der Schnittpunkt mit der X-Achse, wurde anhand der folgenden Gleichung bestimmt:

Formel 13

$$\log(VF - 1) = pA_2 + \log[A]$$

VF: Verschiebungsfaktor

[A]: molare Konzentration des Standardagonisten

Der pA₂-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus derjenigen Antagonistkonzentration, bei der der Verschiebungsfaktor des Agonisten zwei beträgt. Für den Fall, dass die Steigung der linearen Ausgleichsgeraden nicht signifikant verschieden von eins ist, kann das Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus angenommen und der pA₂-Wert mit dem pK_d-Wert gleichgesetzt werden.

Lew and Angus

Um über die lineare Regressionsmethode nach *Schild* hinausgehend auch eine nicht-lineare Auswertung für die Form des Antagonismus zu haben, wurde eine Berechnung nach *Lew and Angus* durchgeführt (110,115). Hierbei wurden die pEC_{50} -Werte des Standardagonisten gegen die Konzentration des anwesenden bzw. abwesenden zu untersuchenden Antagonisten aufgetragen. Unter zu Hilfenahme der nachstehenden Gleichung :

Formel 14

$$pEC_{50} = -\log ([B] + 10^{-pK_d}) - \log c$$

EC_{50} : molare Konzentration des Standardagonisten, die den halbmaximalen Effekt hervorruft

$[B]$: Konzentration des Antagonisten

K_d : Dissoziationskonstante

c : Konstante

lässt sich der pK_d -Wert direkt als gefitteter Parameter ermitteln.

Die oben stehende Gleichung (Formel 14) wurde dafür mit zwei weiteren unten aufgeführten Gleichungen, Formel 15 und Formel 16, welche eine Abweichung vom kompetitiven Charakter erlauben, verglichen, um zu bestimmen, ob der Antagonist einen kompetitiven Charakter aufweist.

Formel 15

$$pEC_{50} = -\log([B]^n + 10^{-pK_d}) - \log c$$

Formel 15 erlaubt dem Exponenten n von eins abzuweichen, vergleichbar mit einer Abweichung der Steigung von eins in der *Schild*-Analyse.

Formel 16

$$pEC_{50} = -\log \{[B](1 + n[B]/10^{-pK_d}) + 10^{-pK_d}\} - \log c$$

In Formel 16 ist eine quadratische Abweichung zulässig, was einem nicht-linearen *Schild*-Plot entsprechen würde.

Durch einen Vergleich des Goodness-of-Fit der Ursprungs-Formel 14 mit den beiden Vergleichsgleichungen Formel 15 und Formel 16 wurde die Signifikanz der Abweichung von einem kompetitiven Charakter ermittelt. War hier keine signifikante Abweichung bestimmbar, so wurde ein kompetitiver Antagonismus angenommen und der pK_d -Wert somit direkt aus der Gleichung (siehe Formel 14) entnommen.

Analog zum *Schild*-Plot wurde im *Clark*-Plot der $\log [EC_{50}]$ des Standardagonisten gegen den $\log [Antagonist + K_d]$ aufgetragen. Dieser Plot veranschaulichte den Zusammenhang zwischen

den experimentell ermittelten Daten und dem Ideal für einen einfachen kompetitiven Charakter.

3.3.6.2 Elektrophysiologische Spannungsmessung an P2X-Rezeptoren

Diese Versuche wurden am Universitätsklinikum der RWTH Aachen in der Arbeitsgruppe von Dr. Hausmann und Prof. Dr. Schmalzing durchgeführt. Dort wurden die Selektivitätsdaten für die potentiellen P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten gegenüber verschiedenen P2X-Rezeptoren, welche rekombinant in *Xenopus-laevis-Oozyten* exprimiert waren, erhoben. Dazu wurden die durch Stimulation mit einem Agonisten verursachten elektrischen Ströme mit Hilfe einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch bestimmt. Die verwendete Messmethode ist in der Literatur mehrfach beschrieben (85,86). Die so bestimmten und bereits ausgewerteten Daten wurden dem Arbeitskreis Kassack entsprechend zur Verfügung gestellt.

3.3.6.3 cAMP-Luciferase-Reportergen-Assay

Der cAMP-Luciferase-Reportergen-Assay zur Messung der interzellulären cAMP-Konzentration ($[cAMP]_i$) war in Arbeitskreis Kassack bereits etabliert und wurde wie bereits mehrfach beschrieben (98,99,116) durchgeführt.

Durch die Aktivierung eines G_s-gekoppelten Rezeptors (z. B. der P2Y₁₁-Rezeptor) steigt in der Zelle die Konzentration an cAMP an, da die Synthese von cAMP aus ATP gefördert wird. Auf der anderen Seite wird die Umwandlung von ATP zu cAMP bei Aktivierung eines G_i-gekoppelten Rezeptors (z.B. P2Y₁₂-, P2Y₁₃- oder auch P2Y₁₄-Rezeptor) gehemmt. Hierzu wurde zuvor die Adenylylzyklase unspezifisch durch Zugabe einer fixen Konzentration an Forskolin aktiviert, was zu einem künstlich erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle führt, so dass dieser durch die Stimulation eines G_i-gekoppelten Rezeptors wieder reduziert werden kann. Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zu einer Aktivierung des Enzyms Proteinkinase A, was wiederum mit einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (= cAMP Responsive Element Binding Protein) einhergeht. Dafür wurden die Rezeptor-exprimierenden Zellen zuvor mit dem pCRE-luc-Plasmid transfiziert. Die Vektorkarte dieses Plasmids ist in Anhang A gezeigt. Die Aktivierung des cAMP-Signalweges lässt sich somit über die Bindung des Transkriptionsfaktors Phospho-CREB an den Promoter CRE (cAMP responsive element) auf dem Plasmid verfolgen. Nach der Phosphorylierung von CREB lagert sich dieses zu einem Dimer zusammen, was wiederum an den Promotor CRE bindet, welcher auf dem pCRE-luc-Plasmid enthalten ist. Infolgedessen wird die Transkription des ebenfalls auf dem Plasmid vorhandenen Gens für das Enzym Luciferase aus *Photinus pyralis* angeregt. Die dann so in den Zellen exprimierte Luciferase setzt in Gegenwart von ATP als Energiefieberant nun D-Luciferin

zu Oxyluciferin und einem Lichtquant um (siehe Abbildung 22).

Die Chemolumineszenz wurde direkt im LUMIstar® bestimmt.

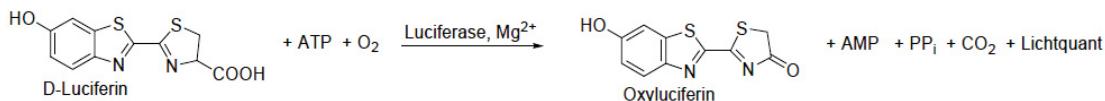


Abbildung 22: Reaktionsgleichung der Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase unter Freisetzung eines Lichtquants. Reaktionsgleichung entnommen aus (98).

Probenvorbereitung

Hier wurden die gleichen 10 millimolaren Stammlösungen verwendet, welche auch für den Calcium-Assay hergestellt wurden. Abweichend davon wurden die weiteren Verdünnungen nicht in KHP-Puffer 1x, sondern in reinem DMEM ohne weitere Antibiotikazusätze hergestellt.

Durchführung

Die zu untersuchenden, Rezeptor-exprimierenden Zellen mussten für dieses Experiment zuvor transient mit dem pCRE-luc-Plasmid transfiziert werden. Dazu wurden die Zellen so auf T25-Flaschen ausgesät, dass diese am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50% – 60 % aufwiesen. Für den Transfektionsansatz wurden 300 µg Plasmid mit FKS- und antibiotikafreien DMEM auf ein Volumen von 300 µL ergänzt. 80 µL Polyfect-Reagenz wurde dem Ansatz zugesetzt, vorsichtig durch Röhren mit der Pipettenspitze gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Nährmedium wurde von den Zellen entfernt und diese mit 4 mL neuem DMEM-Medium versetzt. Dem Transfektionsansatz wurden weitere 200 µL DMEM-Medium zugesetzt, die Lösung vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vermischt und zu den Zellen hinzugegeben. Durch vorsichtiges Umschwenken der Kulturflasche wurde die Lösung gleichmäßig verteilt wurde. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen, wie bereits zuvor beschrieben, geerntet, gezählt und mit 25.000 Zellen pro Well auf weiße 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden ausgesät. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Tag des Experiments wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt. Je nach Koppelung des zu untersuchenden P2Y-Rezeptorsubtyps und nach Messmodus (Agonist- oder Antagonist-Modus) wurde, wie in Tabelle 30 weiter beschrieben, vorgegangen. Im Falle des G_s-gekoppelten P2Y₁₁-Rezeptors wurden im Agonist-Modus 90 µL Nährmedium ohne Antibiotikazusätze und je 10 µL der zu testenden Substanz zugesetzt. Auch hier wurden aufgrund des 1:10-

Verdünnungsschrittes durch den Pipettievorgang die Verdünnungen auf der Reagenzienplatte 10-fach höher als final gewünscht vorgelegt.

Tabelle 30: Pipettierschema für den cAMP-Assay. Es ist das zu verwendende Volumen pro Well angeben.

	G _s -Kopplung		G _i -Kopplung	
	Agonist-Modus	Antagonist-Modus	Agonist-Modus	Antagonist-Modus
Inkubationsmedium	90 µL	80 µL	80 µL	70 µL
Testsubstanz	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Forskolin 10 µM	/	/	10 µL	10 µL
Standardagonist	/	10 µL	/	10 µL

Die Platte wurde für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Antagonisten-Modus wurden 80 µL Nährmedium ohne Antibiotikazusätze und je 10 µL der vorbereiteten Testsubstanzen zupipettiert. Nach einer 30-minütigen Präinkubation im Inkubator (37°C und 5% CO₂) wurden anschließend 10 µL des Standardagonisten ATP zugesetzt und die Platte für weitere drei Stunden inkubiert. Wurde ein G_i-gekoppelter Rezeptor, wie der P2Y₁₂-, P2Y₁₃- oder P2Y₁₄-Rezeptor, untersucht, so wurde im Agonist-Modus vor der dreistündigen Inkubation 80 µL Nährmedium, 10 µL der Testsubstanz und 10 µL Forskolin zugesetzt. Im Antagonist-Modus waren es 70 µL Nährmedium, 10 µL Testsubstanz und 10 µL Forskolin. Nach der 30-minütigen Präinkubation wurden je 10 µL des Standardagonisten hinzu gesetzt.

Nach Ablauf der dreistündigen Inkubation wurde das Medium von den Zellen entfernt und pro Well 100 µL des frisch zubereiteten Luciferase-Lyse-Reagenzes (LLR) zugesetzt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation der Platte bei 2 - 8°C im Dunkeln. Während dieser Zeit wurde das Luciferase-Assay-Reagenz (LAR) vorbereitet und der LUMIstar® auf 25°C vorgewärmt. Nachdem die Vollständigkeit der Zellyse durch Betrachten unter dem Mikroskop überprüft wurde, wurde die Platte in das Messgerät überführt. Jedes Well wurde einzeln vermessen, dazu wurden 100 µL/Well an Luciferase-Assay-Reagenz (LAR) durch das Injektionssystem zupipettiert und die Lumineszenz für 13 Sekunden vermessen. Bei vorliegender Luciferase-Aktivität wurde direkt nach der Injektion ein Anstieg der Lumineszenz detektiert.

Auswertung

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe der LUMIstar® Software.

Hierbei handelt es sich um ein Excel®-basiertes System, was einem ermöglicht den Mittelwert der Lumineszenzsignale pro Well ab Sekunde 2,4 bis Sekunde 13 zu bestimmen. Die Lumineszenz-Zeit-Kurven wiesen zwischen den Messsekunden 4 und 13 eine konstante Signalintensität auf (siehe Abbildung 23). In diesem Bereich wurde der Signalmittelwert gebildet. Von diesem

Mittelwert wurde die Grundlumineszenz, welche vor Injektion des Assay-Reagenz detektiert wurde, abgezogen. Die weitere Auswertung wurde, wie bereits in Kapitel 3.3.6.1 Auswertung Calcium-Assay beschrieben, durchgeführt.

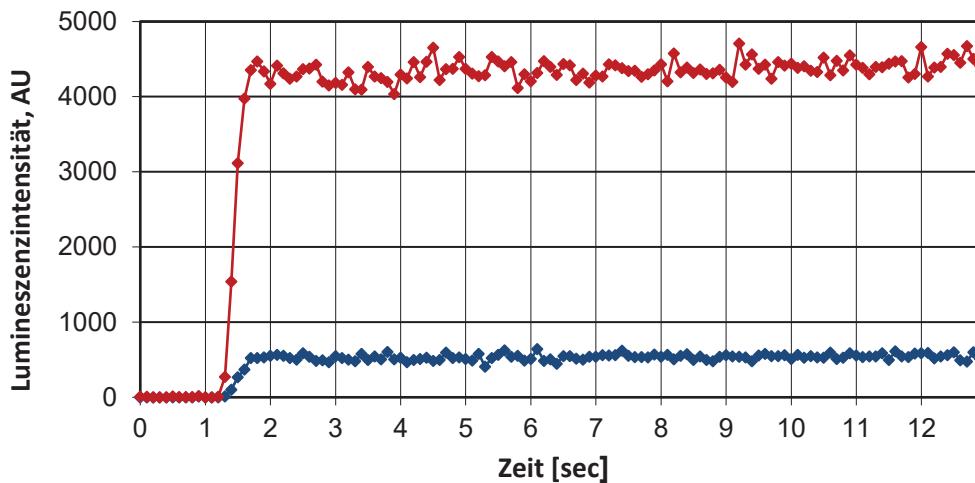


Abbildung 23: Lumineszenz-Zeit-Kurven am Beispiel der Zelllinie 1321N1-FlpIn-P2Y₁₁ detektiert im LUMIstar® während des cAMP-Reportergen-Assay. Aufgetragen wurde hier die gemessene Lumineszenzintensität gegen die Zeit. Zunächst wurde die Grundlumineszenz bestimmt, was durch die ersten Messpunkte ausgedrückt wird. Danach erfolgten die Injektion und die Detektion der resultierenden Lumineszenzintensitätsverläufe. Die blaue Kurve spiegelt hier den Verlauf einer Lumineszenz-Zeit-Kurve nach der Injektion von Nährmedium, als Kontrolle, wider. Bei der roten Kurve wurde 1 μ M ATP injiziert.

3.3.6.4 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays wurde entweder die Zytotoxizität einzelner Substanzen an verschiedenen Zelllinien oder deren Proliferationsverhalten untersucht. Die Methode wurde, wie bereits in (88,117) beschrieben, durchgeführt. In diesem Assay wird der Nachweis der Zellviabilität über das Reduktionsvermögen mitochondrialer Dehydrogenasen, welche gelbes, wasserlösliches MTT in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan umwandeln (siehe Abbildung 24), bestimmt. Somit kann über die Messung der Absorption des Formazans das Ausmaß der Reduktion des MTTs ermittelt werden, was wiederum ein Maß für die Zellviabilität darstellt. Um die resultierenden sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurven zu erhalten, wurde die Absorption des Formazans gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden molaren Konzentration aufgetragen. Hierzu wurde das Programms GraphPad Prism® eingesetzt. Um die nicht-lineare Regression für diese Kurve zu bestimmen wurde die Hillgleichung mit variabler Steigung herangezogen (88). Der Wendepunkt dieser Kurve entspricht dem IC₅₀-Wert (= Konzentration, bei der nur noch 50% der Zellen leben). Des Weiteren wurde der pIC₅₀-Wert als negati-

ver dekadischer Logarithmus des IC_{50} -Werts bestimmt und für statistische Tests herangezogen, da dieser als normal verteilt gilt (88).

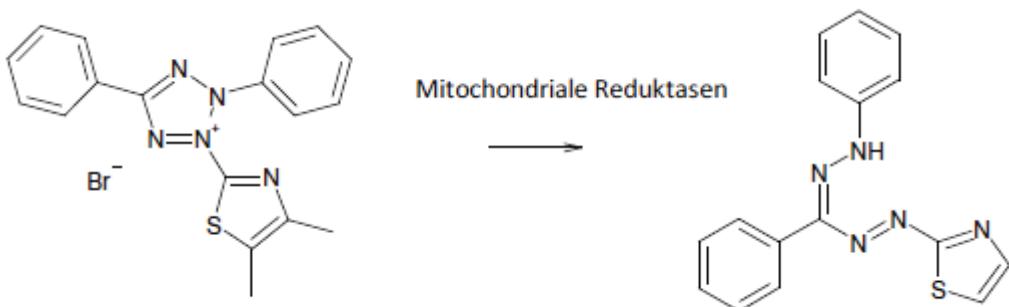


Abbildung 24: Reduktionsreaktion des MTT. Grundlage des MTT-Assays bildet die Reduktion von gelbem, wasserlöslichem MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan. Abbildung entnommen aus (99).

Tabelle 31: Verwendete Zellzahlen im MTT-Assay.

Zelllinie	Zellzahl [c/w]	
	72 h	48 h + 72 h
HEY	6000	1500
OVCAR-3	8000	2000
HEK293	4000	/
1321N1-FlpIn-LV	3000	750

Der MTT-Assay wurde wie folgt durchgeführt. Die in Tabelle 31 für die entsprechende Zelllinie angegebene Zellzahl wurde auf 96-Well-Platten ausplattiert und die ausplattierten Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das alte Nährmedium entfernt, die Zellen mit frischen, auf 37°C vorgewärmten Nährmedium versorgt und dann mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Nach Ablauf der im jeweiligen Experiment angegebenen Behandlungszeit wurden 25 µL MTT-Lösung in jedes einzelne Well pipettiert und erneut bis zur Ausbildung des Formazans bei 37°C inkubiert. Diese Zeit konnte je nach Zelllinie variieren, deshalb wurde die Ausbildung der Formazan-Kristalle auch unter dem Mikroskop kontrolliert. Im Anschluss daran wurde der Überstand von den Zellen entfernt und das gebildete Formazan mittels 75 µL DMSO pro Well freigesetzt (die Zellen wurden hierbei lysiert) und gelöst. Die Absorption der Platte wurde im FLUOstar® vermessen. Zunächst wurde die Absorption des Formazans bei 544 nm vermessen und dann der Hintergrund bei 690 nm bestimmt, da bei 544 nm auch Zelltrümmer mit erfasst wurden. Die um den Hintergrund bereinigten Absorpti-

onswerte ($= A_{544 \text{ nm}} - A_{690 \text{ nm}}$) wurden gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten molaren Konzentration aufgetragen, um die Konzentration-Effekt-Kurven zu erhalten.

3.3.6.5 Versuche am Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird sowohl partikel- als auch zellgebundene Fluoreszenz ermittelt. Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 25 gezeigt. Es besteht aus einem Flüssigkeitssystem, welches für den Transport und die Fokussierung der Partikel in der Messküvette verantwortlich ist. Bei dieser Methode passieren die in einer Suspension befindlichen Zellen einzeln eine Kapillare mittels Unterdruck und werden von einem Laserstrahl im Bereich der Messküvette erfasst. Das ausgesendete monochromatische Licht regt die passierenden Zellen an, und das Streu- bzw. Fluoreszenzlicht wird über das optische System mittels verschiedener Spiegel und Filter in einzelne Wellenlängenpakte zerlegt und den unterschiedlichen Detektoren zugeführt (siehe Abbildung 25).

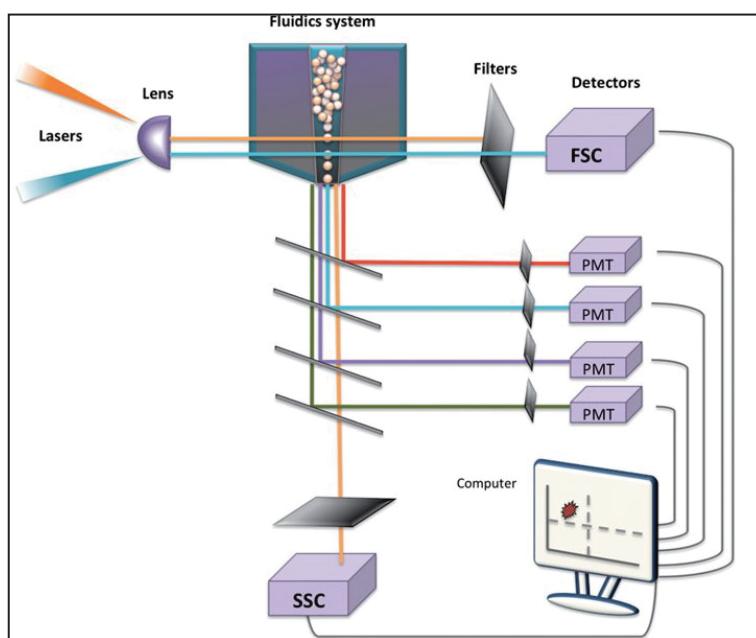


Abbildung 25: Aufbau eines Durchflusszytometers. Die schematische Anordnung des Lasers und der verschiedenen Detektoren sind hier gezeigt. Die Abbildung wurde entnommen aus (118).

Dort wird das Licht in elektronische Signale umgewandelt, welche entsprechend registriert werden können. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, kurz FSC), stellt ein Maß für die Größe der Zelle dar und das in einem 90° -Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, kurz SSC), trifft eine Aussage über die Granularität der Zelle (98,118) (siehe Abbildung 26).

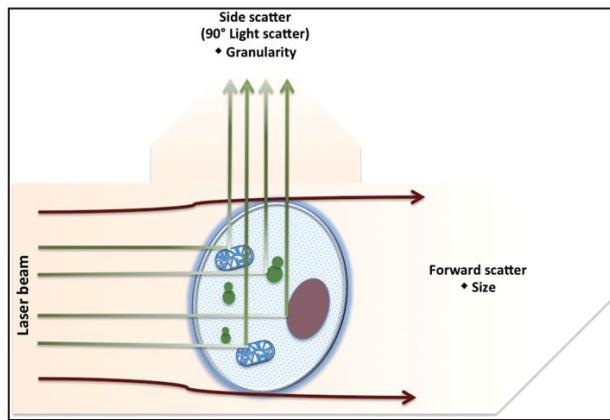


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Lichtstreuung im Durchflusszytometer. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) ist ein Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) wiederum ein Maß für die Granularität (beispielsweise Vesikel, Zellkern, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum) der Zelle. Abbildung entnommen aus (118).

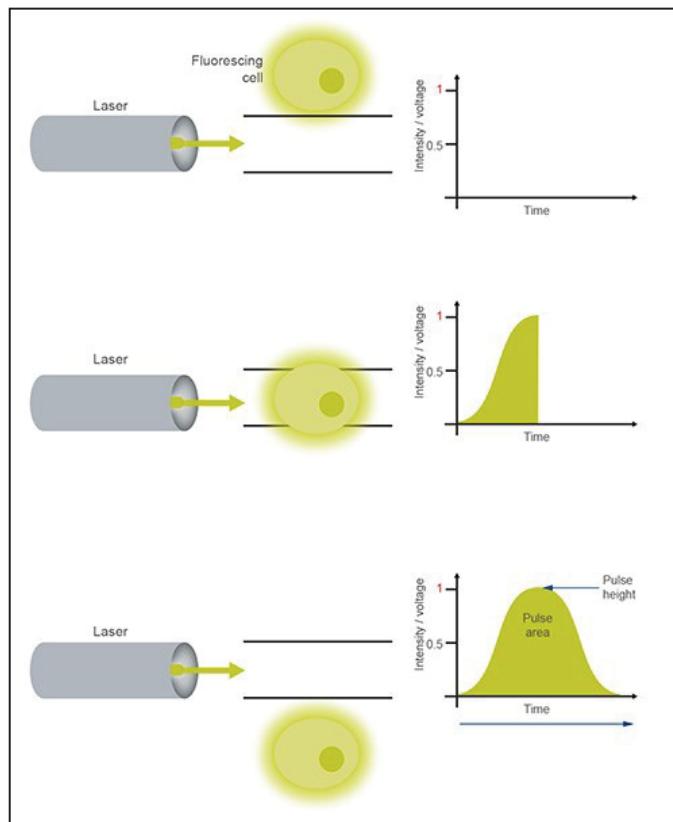


Abbildung 27: Signalmessung am Durchflusszytometer. Abbildung entnommen aus (119).

Sowohl das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht als auch das Fluoreszenzlicht werden so gefiltert und gespiegelt, dass es von speziellen Detektoren erfasst wird. Jeder Detektor (PMTs) detektiert nur Signale einer bestimmten Wellenlänge. Das Signal wird dabei wie folgt gemessen (siehe Abbildung 27): Wenn eine Zelle den Laserstrahl durchwandert, wird über die Zeit am Detek-

tor ein Signal in Form einer Spannung registriert, welches am Computer in einen Messwert, wie die Fläche unter der Spannungskurve („area“, Pulsfläche) oder in die maximale Höhe der Kurve („peak“, Pulshöhe) umgewandelt wird (Abbildung 27)

Auf diese Weise kann sowohl zwischen einer Zellpopulation und in der Probe ebenfalls möglicherweise vorhandenen Zelltrümmern unterschieden werden, als auch eine Abgrenzung zwischen unterschiedlichen Zelltypen in einer Probe vorgenommen werden. Abbildung 28 zeigt beispielhaft, wie anhand des FSC-SSC-Dotplots eindeutig über Größe und Granularität der Zellen zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden wird.

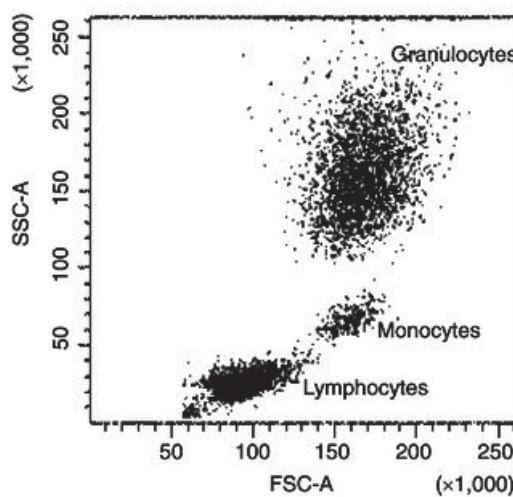


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse von Leukozyten. Aufgetragen wurden die Signale des SSC gegen die des FSC. Anhand der Größe und der Granularität der Zelle können die Lymphozyten eindeutig von den Monozyten bzw. den Granulozyten unterschieden werden. Abbildung entnommen aus (120).

In dieser Arbeit wurden Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät (HEY: 300.000 c/w; OVCAR-3: 350.000 c/w) und über Nacht im Inkubator gelagert. Am nächsten Tag erhielten die Zellen frisches, auf 37°C erwärmtes Nährmedium und wurden dann mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (0, 10, 100, 200, 500 µM) behandelt. Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wurde das Medium inklusive Floater (= bereits abgestorbene Zellen, welche nicht mehr am Boden anhaften, sondern sich im Medium befinden) abgesaugt und die Wells mit PBS 1x gewaschen. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben geerntet, mit kalten PBS 1x gewaschen und das erhaltene Zellpellet vorsichtig bis zur Analyse im Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Natriumchlorid-Lösung (0,9%) resuspendiert und dann in CyFlow Space vermessen. Die Einstellungen am Gerät wurden wie folgt gewählt: Fließgeschwindigkeit: 2 µL/s; Zählvolumen: 0,2 mL; Gain (FSC) = 100,0; Skalierung log 3; Gain (SSC) = 210,0, Skalierung log 3. Die Parameter wurden so gewählt, dass die Zellpopulation in der Kontrolle mittig im

Dotplot erschien (siehe Abbildung 29). Anhand des Farbverlaufes von Blau über Rot zu Schwarz wird die Häufigkeit der registrierten Ereignisse dargestellt. Je mehr Ereignisse registriert werden, desto dunkler (schwarz) erscheint das Signal. Des Weiteren wurde auch die Anzahl der registrierten Ereignisse ermittelt und daraus eine Konzentration berechnet. Für die Auswertung wird der Dotplot der Kontroll-Probe in vier Quadrante (I, II, III und IV) eingeteilt, siehe Abbildung 29, so dass die Population der lebenden, intakten Zellen in Quadrant II erscheint. Dieses Raster wird gespeichert und auf die Diagramme der anderen Proben einer Experimentreihe übertragen. Für jeden Quadranten werden die Konzentration und ebenfalls die Anzahl der registrierten Ereignisse angezeigt, wodurch aus der Anzahl der Partikel in Quadrant II die prozentualen Werte bestimmt werden, indem der Wert für die Kontroll-Probe gleich 100% gesetzt wird und alle anderen darauf bezogen werden.

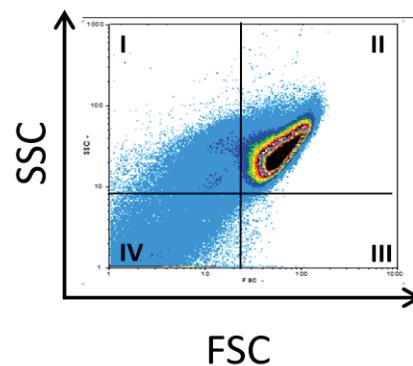


Abbildung 29: FSC-SSC-Dotplot. Vermessen wurden HEY-Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation mit Medium. Die Quadranten wurden so gewählt, dass die gesamte HEY-Zellpopulation in Quadrant II liegt.

Des Weiteren können auch Zellen, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert werden. Dies kann entweder über an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper erfolgen, um Oberflächenstrukturen, wie Rezeptoren oder Enzyme, zu bestimmen oder durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes wie Propidiumiodid, das direkt in die Zell-DNA interkaliert. Letzteres wird bei der Bestimmung von apoptotischen Zellen (siehe Kapitel 3.3.6.6) oder der Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 3.3.6.7), verwendet. Ein Teil des Laserlichts wird hierbei durch das Fluorochrom absorbiert und das wiederum emittierte Fluoreszenzlicht mit einer längeren Wellenlänge von den Detektoren registriert (siehe Abbildung 25).

3.3.6.6 Apoptose-Assay

Um bestimmen zu können, ob eine Substanz oder die Kombination von mehreren zu untersuchenden Substanzen einen Einfluss auf das Apoptose-Verhalten einer Zelllinie hat oder sogar Apoptose induziert, wurde der bereits in der Literatur von *Riccardi* und *Nicoletti* beschriebene Apoptose-Assay heran gezogen (121,122). In diesem Assay wurde die Anzahl der apoptotischen Zellkerne, nach Propidiumiodid-Färbung (Exzitation = 488 nm, Emission > 600 nm) im hypotonen PI-Lysispuffer I, durchflusszytometrisch untersucht. Durch das im Lysepuffer enthaltene Detergens Triton X-100 wurde die Membran des Zellkerns permabilisiert, so dass der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid die entweder noch intakte oder bereits fragmentierte DNA entsprechend markierte.

Für diesen Assay wurden Zellen in einer 24-Well-Platte ausplattiert (HEY: 50.000 c/w; OVCAR-3: 60.000 c/w) und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischen, auf 37°C erwärmten Nährmedium versorgt und mit den zu untersuchenden Substanzen für 24 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde die Platte bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Jedes Well wurde dann mit 500 µL hypotonen PI-Lysispuffer I versetzt und über Nacht (mindestens 6 - 18 Stunden) bei 2 - 8°C im Dunkeln lysiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde die jeweilige Zelllysat-Probe mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (0,9%) verdünnt und dann im Durchflusszytometer CyFlow Space vermessen. Bei dieser Methode wurde im 1024-Channel gemessen und die Messung auf FL2 PI getriggert, was bedeutet, dass nur Signale, deren Fluoreszenz in den FL2 PI-Detektor strahlen, beachtet wurden (117).

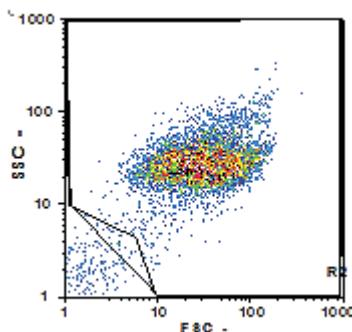


Abbildung 30: Identifizierte Population der Zellkerne innerhalb des Polygons im Dotplot SSC gegen FSC. In diesem Beispiel wurden unbehandelte HEY-Zellen lysiert. Die Signale in der Mitte innerhalb des Polygons stellen die isolierten Zellkerne dar, die Signale im linken unteren Bildrand zeigen die Zelltrümmer.

Für die Auswertung der Daten wurde zunächst die Population der Zellkerne identifiziert und von den restlichen Zelltrümmern abgetrennt. Dazu wurden die Signale des SSC-Detektors gegen die des FSC-Detektors im Dotplot aufgetragen, siehe Abbildung 30. Durch das Legen eines Polygons im Dotplot gehen für die Auswertung der PI-Fluoreszenzsignale nur die Signale der zuvor identifizierten Zellkerne in das PI-Histogramm mit ein. Im FL 2 PI-Histogramm wurden die Fluoreszenzsignale der mit Propidiumiodid-markierter DNA aufgetragen. Zur Auswertung der Daten wurden zunächst anhand der unbehandelten Kontrollzellen die Signale in vier unterschiedliche Bereiche (Ranges = RN) unterteilt. In den Bereichen RN1 und RN4 wurden die zu niedrigen bzw. die zu hohen Fluoreszenzsignale aus der Auswertung herausgenommen. In RN2 wurde der Bereich der Zellkerne mit bereits fragmentierter DNA und dementsprechend geringeren Fluoreszenzen definiert. In RN3 sind die noch intakten Zellkerne, mit den teilweise jeweils einzelnen Zellzyklusphasen in gestauchter Form dargestellt; hier lässt sich somit keine fragmentierte DNA detektieren. Nachdem die Bereiche festgelegt wurden, wurden diese für die anderen Messungen in dieser Experimentreihe übernommen (117).

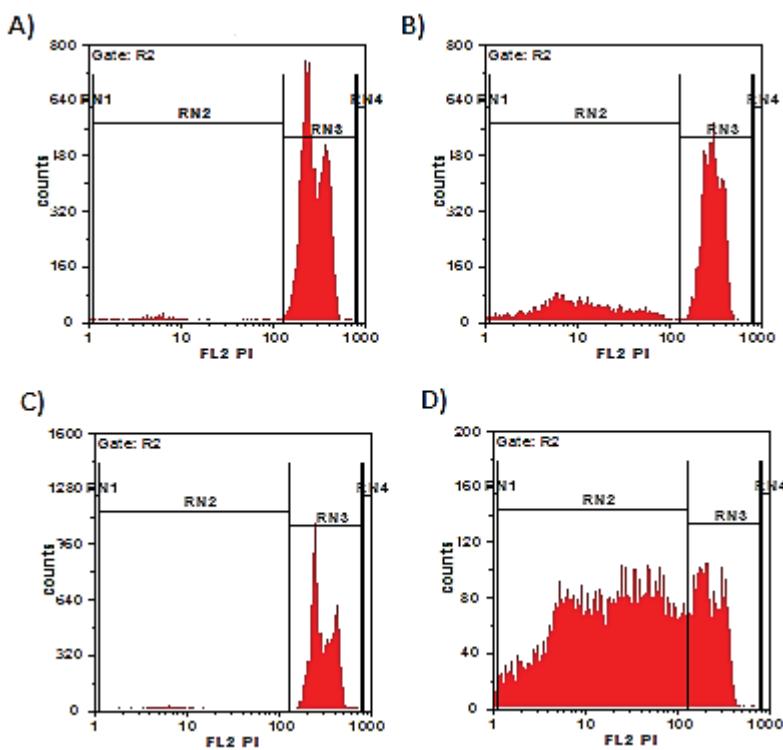


Abbildung 31: Propidiumiodid-Histogramme. Im Beispiel sind Propidiumiodid-Signale verschiedener HEY-Zell-Proben zu sehen. A) sind die unbehandelten Kontrollzellen, B) Zellen, die mit $15 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt wurden, C) Zellen, die mit $10 \mu\text{M}$ ATP behandelt wurden und in D) Zellen, die mit 10% DMSO behandelt wurden. Die Zellen wurden jeweils für 24 Stunden behandelt. In RN1 und RN4 wurden die zu niedrigen bzw. die zu hohen PI-Fluoreszenzsignale ausgeschlossen. In RN2 sind die Signale apoptotischer Zellkerne, d.h. mit bereits fragmentierter DNA, zu sehen und in RN3 sind die ‚intakten‘ noch nicht apoptotischen Zellkerne, mit den einzelnen Zellzyklusphasen in gestauchter Form zu erkennen.

Abbildung 31 zeigt dies am Beispiel von HEY-Zellen, welche entweder unbehandelt waren (A) oder für jeweils 24 Stunden mit 15 μ M Cisplatin (B), 10 μ M ATP (C) oder 10% DMSO (D) behandelt wurden. Der unspezifische Caspase-Inhibitor QVD-POh wurde, wenn eingesetzt, jeweils eine Stunde vor Zugabe der Testsubstanzen zugefügt.

3.3.6.7 Zellzyklusanalyse

Der Einfluss von ATP auf den Zellzyklus der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen wurde ebenfalls durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodid-Färbung, wie bereits beschrieben (117,123), bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten (HEY: 300.000 c/w; OVCAR-3: 350.000 c/w) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit neuem Nährmedium versorgt und dann für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Nährmedium alleine und Cisplatin (IC₅₀ für die jeweilige Zelllinie) dienten dabei als Kontrollen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand von den Zellen abgenommen, in eine PP-Röhre überführt und dort mit den restlichen, abgeernteten Zellen wieder vereinigt. Nach einem Waschschritt mit PBS 1x wurden zwei Millionen Zellen in eiskaltem PBS 1x resuspendiert. Diese Suspension wurde langsam in 9 mL kalten, 70%-igen Ethanol getropft und die so fixierten Proben für 24 Stunden bei -20°C gelagert. Danach wurden die Proben für 20 - 30 Minuten, je nach Zelltyp, bei 4 °C und 266 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, aber nicht vollständig entfernt, da die ggf. oben aufschwimmenden Zellen mit vermessen werden sollten. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS 1x, um sämtliches Ethanol zu entfernen, wurden die Zellen mit 500 μ L der Färbelösung versetzt. Das auch hier enthaltene Triton X-100 permeabilisierte die Zellmembranen, so dass das Propidiumiodid eindringen und mit der DNA interkalieren konnte. Damit enthaltene RNA nicht ebenfalls durch das Propidiumiodid mit angefärbt wurde, wurde DNase-freie RNAse A der Färbelösung zugesetzt, um die RNA abzubauen. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit wurde das CyFlow Space für die Messung vorbereitet. Als Sheath-Fluid diente eine 0,9%-ige Natriumchlorid-Lösung, welche mit 0,01% Natriumazid versetzt war und zuvor für mindestens 15 Minuten im Ultraschallbad entgast wurde. Im Anschluss daran wurden die Proben im Dunklen auf Eis gelagert und einzeln analysiert. Hier wurden wieder neben Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) auch die Fluoreszenzsignale für Propidiumiodid detektiert, indem die Pulshöhe und die Pulsfläche des PI-Signals erfasst wurden. Auch bei dieser Methode wurde im 1024-Channel gemessen und die Messung auf FL2 PI getriggert. Nachdem die Zellpopulation, wie unter Kapitel 3.3.6.6 beschrieben, von den Zelltrümmern abgetrennt wurde, mussten hier zusätzlich die einzelnen Zellen von Zelldoublets oder -clustern unterschieden werden, damit keine falsch-positiven Signale mit ausgewertet wurden. Beispielsweise würden zwei aneinanderheftende Zellen, welche sich

beide in der G₀/G₁-Phase befänden, anhand der Signalhöhe wie eine Zelle, die sich in der G₂/M-Phase befindet, erscheinen. In Abbildung 32 ist die Dubletten-Diskriminierung beispielhaft anhand unbehandelten HEY-Zellen gezeigt. Indem in einem Dotplot die PI-Signalfläche gegen die PI-Signalhöhe aufgetragen wurde, konnte die Population mit den einzelnen Zellen eindeutig bestimmt und mit Hilfe eines Polygons abgegrenzt werden. Die Signale oberhalb des schwarzen Polygons wurden in diesem Fall von Zelldoubletten bis hin zu Zellclustern hervorgerufen.

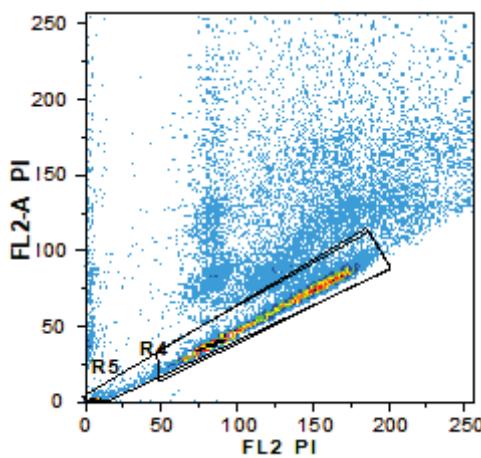


Abbildung 32: Dubletten-Diskriminierung am Beispiel von unbehandelten HEY-Zellen. Durch Auftragen der Pulsfläche (FL2-A PI) gegen die Pulshöhe (FL2 PI) der PI-Signale lassen sich die Zelldoubletten bzw. -cluster von den einzelnen Zellen unterscheiden. Die linear verteilten Signale, markiert durch das Polygon, spiegeln die einzelnen Zellen wider, alle Signale oberhalb davon sind auf Zelldoubletten oder Zellcluster zurückzuführen.

Die Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen fand über das Histogramm der PI-Höhe statt (siehe Abbildung 33) in das nur die zuvor identifizierten Einzelzellen einbezogen wurden.

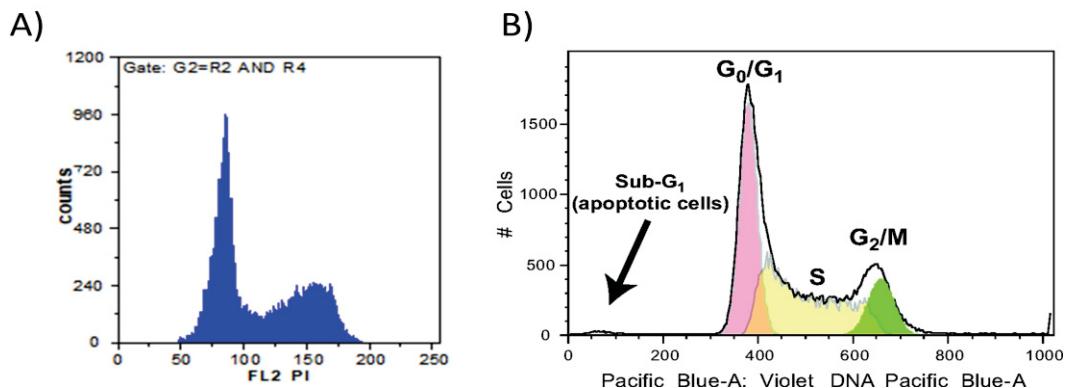


Abbildung 33: Zellzyklus-Histogramme. A) Resultierendes PI-Histogramm der unbehandelten HEY-Zellen, gezeigt ist nur die Population mit den einzelnen Zellen und deren Zellzyklusphasenverteilung. B) Schematische Darstellung eines Zellzyklus, Abbildung entnommen aus (124)

Abbildung 33 A zeigt das für die unbehandelten HEY-Zellen erhaltene Histogramm, und in Abbildung 33 B ist eine typische Zellzyklusverteilung veranschaulicht (Abbildung 33 B entnommen aus (124)). Anhand der mitvermessenen Kontrollen der unbehandelten und der mit 1 nM Paclitaxel behandelten Zellen wurden Ranges, RN1 - RN4, definiert, welche die einzelnen Zellzyklusphasen widerspiegeln und auf die anderen Histogramme für die weitere Auswertung der Daten übertragen wurden. RN1 beinhaltete Zellen, welche sich in der G₀/G₁-Phase befanden. RN2 stellte die in der S-Phase befindlichen Zellen und RN3 die Zellen in der G₂/M-Phase dar. Im Range 4 befanden sich die apoptotischen Zellen, also Zellen in der Sub G₁-Phase.

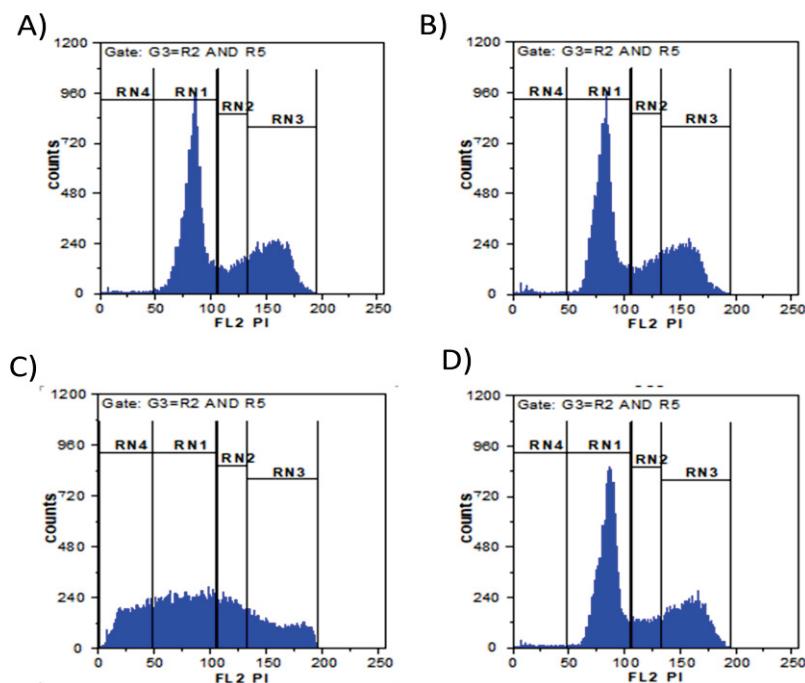


Abbildung 34: Zellzyklusanalyse am Beispiel von HEY-Zellen. In A) sind unbehandelte, in B) mit 10 μ M ATP behandelte, in C) mit 5 μ M Cisplatin und in D) mit 1 nM Paclitaxel behandelte Zellen gezeigt. Mit RN1 = G₀/G₁-Phase; RN2 = S-Phase; RN3 = G₂/M-Phase; RN4 = Sub G₁-Phase.

In Abbildung 34 sind verschiedene Histogramme, so wie sie für HEY-Zellen erhalten und bereits ausgewertet wurden, dargestellt. In A) sind unbehandelte, in B) mit 10 μ M ATP behandelte, in C) mit 5 μ M Cisplatin und in D) mit 1 nM Paclitaxel behandelte HEY-Zellen gezeigt. Die verwendete FloMax-Software gab für die einzelnen Bereiche direkt die prozentuale Verteilung an.

3.3.6.8 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen

Wie bereits in (125) beschrieben, macht man sich zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen das Auftreten von Foci im Zellkern, bestehend aus Serin139-phosphoryliertem Histone H2AX (γ H2AX), zu Nutze. Diese können mikroskopisch analysiert werden und sind als Surrogatparameter für das Bestimmen von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Literatur bekannt.

Für dieses Experiment wurden Zellen wie bereits in Kapitel 3.3.5.5 beschrieben in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät. Nachdem diese über Nacht angewachsen waren, wurden die Zellen am nächsten Tag mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt.

Die Zellen wurden, wie bereits in Kapitel 3.3.5.5 beschrieben, mehrmals gewaschen und fixiert, bevor sie mit dem Primärantikörper (Mouse Anti-Phospho-Histone H2AX (Ser139), 1:500 verdünnt in PBST 1x, über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Zellen wieder mehrmals gewaschen (siehe Kapitel 3.3.5.5) und dann für 1 - 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488-konjugiert, 1:500 verdünnt in PBST 1x) inkubiert. Danach wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS 1x gewaschen und zweimal mit PBST 1x gespült. Diese Waschschritte wurden ebenfalls im Dunklen durchgeführt. Die jeweilige Anzahl an benötigten Objektträgern wurde bereitgestellt und entsprechend beschriftet. In die Mitte des Objektträgers wurde ein Tropfen VECTASHIELD gegeben. Die Deckgläschen mit den fixierten und gefärbten Zellen wurden mit der Zellseite voran auf den Tropfen VECTASHIELD gelegt und mit Nagellack versiegelt. Die so vorbereiteten Objektträger wurden bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop Olympus Bx43 im Dunkeln bei 2 - 8°C gelagert. Abbildung 35 zeigt beispielsweise die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEY-Zellen, welche für 30 Minuten mit 2 Gy bestrahlt wurden, um die Formation von DNA-Doppelstrangbrüchen zu induzieren.

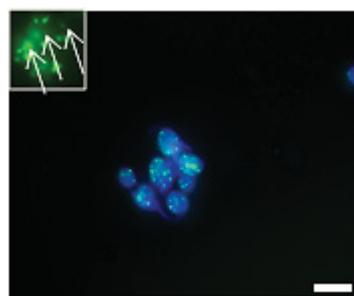


Abbildung 35: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von γ H2AX-Foci. Zu sehen sind HEY-Zellen, welche für 30 Minuten mit 2 Gy bestrahlt wurden, um die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen zu induzieren. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) und γ H2AX-Foci mit Alexa Fluor 488 (grün) angefärbt. Die weißen Pfeile zeigen auf die Foci, der weiße Balken entspricht 20 μ m.

Die Aufnahmen wurden wie bereits in Kapitel 3.3.5.5 beschrieben mit Hilfe der Software Image J gefärbt und die zusammengehörigen Bilder dann übereinander gelegt. Für die Auswertung wurde die Anzahl der Foci pro Zellkern bestimmt, indem insgesamt die Foci von 35 Zellkernen pro Experiment ausgezählt wurden.

3.3.6.9 Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay

Um beurteilen zu können, ob eine Substanz oder die Kombination von mehreren zu untersuchenden Substanzen zu einer Caspase-Aktivierung führt, wurde der Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay unter Verwendung des CellEvent-3/7 green detection-Reagenz herangezogen. Der Assay wurde, wie von *Bandolik et. al.* (126) beschrieben, durchgeführt. HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen wurden mit 3000 c/w in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand abgenommen und jedes Well mit 50 µL des CellEvent-Caspase-3/7 green detection-Reagenz (2 µM in PBS 1x, versetzt mit 5% hitzeinaktiviertem FKS) versetzt. Die Zellen wurde für 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und danach im Array Scan XTI high content screening (HCS) System der Firma Thermo Fisher analysiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 blau angefärbt.

3.3.7 Statistik

Die Experimente wurden alle mindestens dreimal durchgeführt, bis auf die Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen, der Apoptose-Assay mit QVD-POh-Vorbehandlung oder die Bestimmung der Kombinations-Indizes nach Chou-Talalay. Die drei genannten Ausnahmen wurden nur zweimal durchgeführt. Die gesamten statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism® durchgeführt. Wie genau die einzelnen Experimente ausgewertet wurden, ist am Ende der jeweiligen Kapitel beschrieben. Allen ist gemein, dass die Werte auf die entsprechenden Kontrollen normalisiert wurden. Die so erhaltenen Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden gemittelt und mit Standardfehler angegeben. Die Siftfaktoren in den MTT-Experimenten wurden bestimmt als Quotient aus den IC₅₀-Werten zwischen der behandelten und der unbehandelten Probe. Über den two-tailed Student's t-test, ohne Welsh-Korrektur, wurde die statistische Signifikanz für die Versuche mittels der Software GraphPad Prism® berechnet. Bei einem Signifikanzwert von p < 0,05 wurde das Resultat als statistisch signifikant angesehen. Sofern nicht anders angeben sind die Ergebnisse der Experimente in Form von Mittelwerten und Standardfehlern angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung P2Y-Rezeptor-exprimierender Zelllinien

4.1.1 Überprüfung der klonierten Expressionsvektoren

Die Plasmide, welche die Gensequenzen für die acht P2Y-Rezeptorsubtypen (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄) enthielten, wurden vom Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org) bezogen.

Nach dem Einbau der cDNA-Sequenzen in den Expressionsvektor (siehe Kapitel 3.3.2.1 – 3.3.2.6) wurden die erhaltenen acht Plasmide einer Restriktionsanalyse unterzogen. Zunächst wurde überprüft, ob der Vektor und das Insert die korrekten Größen aufwiesen. Weiter wurde so sichergestellt, dass sich die Inserts über die verwendeten Schnittstellen mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III und Xho I wieder heraus schneiden ließen (siehe Kapitel 3.3.2.3 und 3.3.2.4). Dazu wurden die Plasmide einem Restriktionsverdau unterzogen, wie in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben. In Abbildung 36 ist die gelelektrophoretische Auftrennung für das Plasmid pcDNA5/FRT-P2Y₂ nach dem Verdau beispielhaft dargestellt.

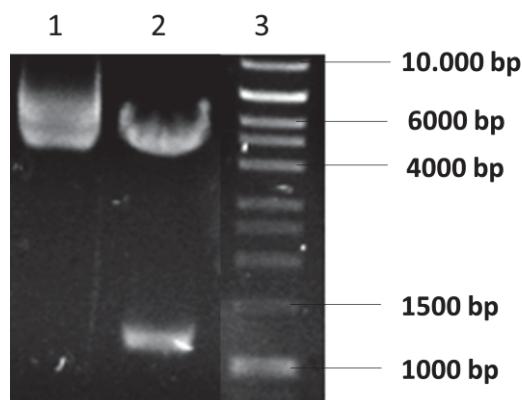


Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung des Expressionsvektors pcDNA5/FRT-P2Y₂ nach der Restriktionsanalyse. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1%-igen Agarosegel. Die Detektion erfolgte mit GelRed®. Bahn 1: pcDNA5/FRT-P2Y₂, ungeschnitten; Bahn 2: pcDNA5/FRT-P2Y₂, geschnitten mit Hind III und Xho I; Bahn 3: DNA-Vergleichsleiter. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, wies der Expressionsvektor pcDNA5/FRT-P2Y₂ in seiner geschlossenen Form eine Größe zwischen 5000 bp – 6000 bp auf (siehe Bahn 1). Die berechne-

te Größe liegt bei 6157 bp. Da die ringförmige Plasmid-DNA oft in einer kompakteren, superhelikalen Form anstatt in der linearen Form vorliegt, wird die Plasmid-DNA im Gel zwischen 5000 bp und 6000 bp detektiert (127–129). Der offene Expressionsvektor pcDNA5/FRT weist nach dem Restriktionsverdau eine Größe von 4996 bp auf. In Bahn 2 ist deutlich eine Bande zwischen 4000 bp – 5000 bp zu erkennen, die dem offenen Plasmid zuzuordnen ist. Das herausgeschnittene Insert ist in Bahn 2 als Bande zwischen 1000 bp und 1500 bp sichtbar, seine berechnete Größe liegt bei 1161 bp. Somit wurde die Größe dieses Fragments eindeutig zugeordnet.

Zur weiteren Überprüfung der acht Expressionsvektoren wurden diese in der PCR untersucht. Für jeden P2Y-Rezeptorsubtyp waren Primer konzipiert worden (siehe Tabelle 7). Die PCR wurde, wie in Kapitel 3.3.4.5 erörtert, durchgeführt.

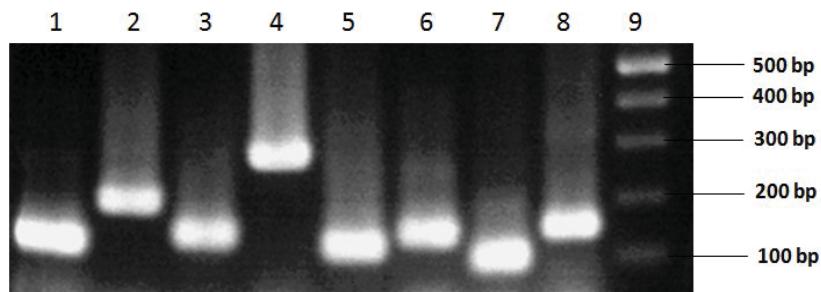


Abbildung 37: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der PCR vermehrten Fragmente der acht klonierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-GOI. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1%-igen Agarosegel. Die Detektion erfolgte mit GelRed®. Bahn 1: pcDNA/FRT-P2Y₁; Bahn 2: pcDNA/FRT-P2Y₂; Bahn 3: pcDNA/FRT-P2Y₄; Bahn 4: pcDNA/FRT-P2Y₆; Bahn 5: pcDNA/FRT-P2Y₁₁; Bahn 6: pcDNA/FRT-P2Y₁₂; Bahn 7: pcDNA/FRT-P2Y₁₃; Bahn 8: pcDNA/FRT-P2Y₁₄; Bahn 9: DNA-Vergleichsleiter.

Tabelle 32: Gelelektrophoretische Auftrennung der in der PCR vermehrten Fragmente der acht klonierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-GOI. Vergleich der vorausgesagten PCR-Produkt-Größe mit den tatsächlich erhaltenen PCR-Produkt-Größen.

Plasmid	Bahn	Vorausgesagte PCR-Produkt-Größe	Erhaltene PCR-Produkt-Größe
pcDNA/FRT-P2Y ₁	1	115 bp	> 100 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₂	2	188 bp	< 200 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₄	3	136 bp	> 100 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₆	4	256 bp	zwischen 200 bp und 300 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₁₁	5	121 bp	> 100 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₁₂	6	139 bp	> 100 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₁₃	7	100 bp	~ 100 bp
pcDNA/FRT-P2Y ₁₄	8	146 bp	zwischen 100 bp und 200 bp

Als Template fungierte dabei jeweils die Plasmidlösung des zu untersuchenden Expressionsvektors in einer Verdünnung von 1:1.000.000. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anhand ihrer Größen identifiziert (siehe Abbildung 37 und Tabelle 32). Wie in Abbildung 37 dargestellt, wurde in jeder aufgetragenen PCR-Probe das Zielgen über die entsprechenden Primer nachgewiesen. Die vorausgesagten Größen der PCR-Produkte liegen zwischen 100 bp und 260 bp (siehe Tabelle 7 und Tabelle 32). Auf dem Gel in Abbildung 37 sind Banden zwischen 100 bp und 300 bp zu erkennen. Tabelle 32 stellt die vorausgesagten PCR-Produkt-Größen den tatsächlich nach der elektrophoretischen Auftrennung erhaltenen PCR-Produkt-Größen einander gegenüber. Es wurde somit nachgewiesen, dass jeder Expressionsvektor das gewünschte GOI enthielt.

Als letzter Nachweis, dass die richtigen Gensequenzen für die einzelnen P2Y-Rezeptoren in den Plasmiden enthalten waren und dass durch die Klonierungsarbeiten keine Punktmutationen in der cDNA-Sequenz hervorgerufen wurden, wurden Proben zur Sequenzierung an das BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gegeben. Um das gesamte Insert sequenzieren zu können, wurde das Plasmid einmal von dem T7-Primer (siehe Vektorkarte Anhang A) aus in Vorwärtsrichtung und einmal von dem BGH_{rev} -Primer (siehe Vektorkarte Anhang A) aus sequenziert. Durch einen Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit der cDNA-Referenzsequenz des jeweiligen Rezeptors, welche aus der NCBI-Datenbank entnommen wurde (Sequenzen siehe Tabelle 9 und Anhang B), wurde die Korrektheit der Gensequenz bestätigt. Die Ergebnisse dieses Abgleichs sind in Anhang C abgebildet. Für den Sequenzvergleich wurde die Software Clustal Omega verwendet. Das Programm Reverse Complement wurde verwendet, um die Sequenz, welche vom BGH_{rev} -Ende aus erhalten wurde, in die reverse, komplementäre Form umzuwandeln, welche für den Abgleich benötigt wurde. Die Buchstaben A, C, G und T stehen für die einzelnen DNA-Basen. Sind die Basen großgeschrieben, so wurde die Base eindeutig bestimmt. Ein Kleinbuchstabe sagt aus, dass es sich wahrscheinlich um die Base handelt, die durch diesen Buchstaben abgekürzt wird. Ein „N“ gibt wiederum an, dass die Base nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Wie die einzelnen Abgleiche veranschaulichen (siehe Anhang C), wurden durch die Klonierungsarbeiten keine Punktmutationen in den Gensequenzen hervorgerufen, welche die einzelnen Rezeptorproteine kodieren. Die Sequenzen, welche bei der Sequenzierung erhalten wurden, stimmten mit der jeweiligen Referenzsequenz exakt überein, was durch das Sternzeichen „*“ ausgedrückt wurde. Die Expressionsvektoren konnten somit für die Transfektion eingesetzt werden.

4.1.2 Leervektor

Aus der Literatur ist bekannt, dass die als Host-Zelllinie verwendete humane Astrozytom-Zelllinie 1321N1 keine funktionellen P2-Rezeptoren besitzt (130), bzw. es wurde bislang nur das Vorhandensein des P2Y₁-Rezeptors beschrieben (67). Diese Zelllinie wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen und in der Arbeitsgruppe Kassack erfolgreich als Host-Zelllinie für stabile Transfektionen und für die Expression von P2Y-Rezeptoren verwendet (85,87,130). Dass der Wildtyp dieser Zelllinie auf eine Behandlung mit verschiedenen Nukleotiden nur sehr gering mit einer intrazellulären Calcium-Freisetzung reagiert, wurde bereits im Rahmen der Dissertation von S. Meis (98) gezeigt. In dieser Arbeit wurde für die stabile Transfektion das FlpIn-SystemTM von Invitrogen genutzt. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob sich durch den Transfektionsvorgang an sich oder durch das verwendete System die Calcium-Signaltransduktionswege in der Zelllinie verändert haben. Dazu wurde eine Leervektor-Zelllinie generiert, welche genau wie die Rezeptor-exprimierenden Zelllinien sämtliche Transfektions- und Selektionsvorgänge durchlaufen hat, aber nur mit dem ursprünglichen, also kein GOI-enthaltenden Expressionsvektor pcDNA5/FRT transfiziert wurde. Diese, den Leervektor enthaltene Zelllinie, 1321N1-FlpIn-C2-LV lag im Arbeitskreis von Prof. Kassack bereits vor. Sie wurde schon während der Arbeit von Ch. Urban etabliert (99). Histamin wurde als Kontrollsubstanz eingesetzt, da die 1321N1-Zellen nativ über den ebenfalls G_q-gekoppelten Histamin (H₁)-Rezeptor verfügen (131), wodurch ebenfalls ein Calcium-Signal in der Zelle hervorgerufen wird. Aufgrund der in der Literatur für die einzelnen P2Y-Rezeptoren bekannten EC₅₀-Werte, welche alle unter 10 µM liegen (4,5), wurden die Nukleotide in einer Konzentration von 1 µM und 10 µM, Histamin nur in 1 µM Konzentration an der Leervektor-Zelllinie getestet (siehe Abbildung 38). Es zeigte sich, dass die getesteten Triphosphate ATP und UTP sowie die Diphosphate ADP und UDP keine Calcium-Freisetzung hervorriefen, die signifikant verschieden waren von der Pufferkontrolle. Die Injektion von Puffer alleine ergab einen Fluoreszenzanstieg von 4% bezogen auf die Histamin-Positivkontrolle. Die Calcium-Signale der einzelnen Nukleotide lagen zwischen 4,5% und 6,0% des durch Histamin-induzierten Signals. Lediglich 10 µM ADP zeigte, wie erwartet, eine von der Pufferkontrolle signifikant verschiedene Calcium-Antwort von etwa 10% der Histamin-Antwort (siehe Abbildung 38), welche auf die nativ in der Zelllinie 1321N1 vorhandenen P2Y₁-Rezeptoren zurückzuführen waren. Diese Resultate zeigten somit eindeutig, dass die Leervektor-Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-LV im Vergleich zum Histamin-induzierten Calcium-Signal nur sehr gering bis gar nicht auf eine Behandlung mit den verschiedenen Nukleotiden reagierte. Die durch die Testsubstanzen hervorgerufenen Fluoreszenzanstiege waren nicht signifikant verschieden von der durch die Injektion von Puffer hervorgerufenen Antwort. Die durch 10 µM ADP-induzierte Calcium-Antwort war vernachlässigbar, da die nach der Transfektion mit den

P2Y-Rezeptoren zu erwartenden EC₅₀-Werte deutlich unter der eingesetzten Konzentration lagen (4,5).

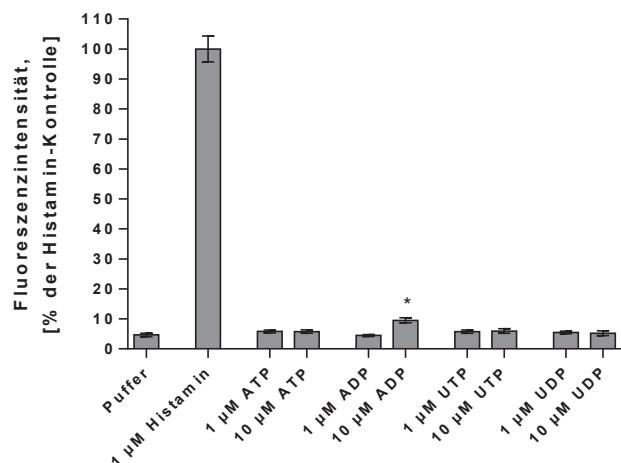


Abbildung 38: Calcium-Signale an der Leervektorzelllinie. Getestet wurden 1 μM Histamin (Positivkontrolle) und die verschiedenen Nukleotide ATP, ADP, UTP und UDP in einer Konzentration von 1 μM bzw. 10 μM an der Leervektor-Zelllinie 1321N1-Flpln C2-LV im Calcium-Assay. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil ausgehend von der durch 1 μM Histamin in den Zellen hervorgerufenen Fluoreszenz dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. * p < 0,05 im Vergleich zu Puffer.

Das Flpln-SystemTM sowie die Host-Zelllinie 1321N1 konnten somit für die stabile Transfektion und die damit verbundene Expression der acht P2Y-Rezeptorsubtypen genutzt werden.

Weiter wurde die Leervektor-Zelllinie auch auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung des Enzyms β-Galactosidase hin untersucht. Wie bereits in den Kapiteln 3.3.2.1, 3.3.2.7 und 3.3.2.8 beschrieben wurde, war es möglich als zusätzliche Kontrolle zur Überprüfung einer erfolgreichen Transfektion auf β-Galactosidase-Aktivität (Blau-Weiß-Färbung) zu testen. Das Flpln-SystemTM von Invitrogen war so konzipiert, dass durch den Einbau des ersten Plasmids pFRT/lacZeo in die Host-Zelllinie, diese eine Blaufärbung zeigte, da sie zur Ausbildung von β-Galactosidase befähigt war. Nach erfolgreicher Klonierung des Expressionsvektors in die Host-Zelllinie verlor diese ihre β-Galactosidase-Aktivität, die Zellen blieben folglich weiß in der Blau-Weiß-Färbung. Abbildung 39 zeigt das Resultat der Blau-Weiß-Färbung an der Host-Zelllinie 1321N1-Flpln-C2 und an der Leervektor-Zelllinie 1321N1-Flpln-C2-LV. Wie zu erwarten war, färbten sich die Zellen der Host-Zelllinie (= Positivkontrolle) blau, sie waren somit zur Ausbildung des Enzyms β-Galactosidase fähig, wohingegen die Zellen der Leervektor-Zelllinie weiß blieben, sie dementsprechend ihre β-Galactosidase-Aktivität verloren hatten. In den nachfolgenden Versuchen zur Blau-Weiß-Färbung an den P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien wurde die Host-Zelllinie als Positiv- und die Leervektor-Zelllinie als Negativkontrolle eingesetzt.

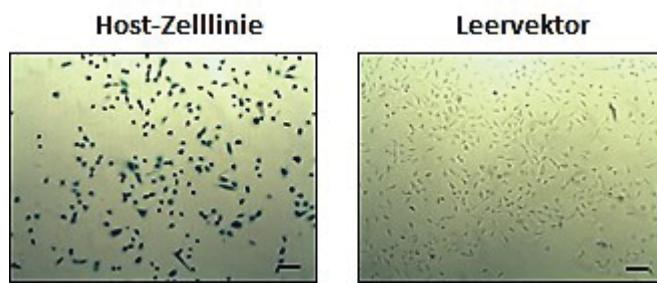


Abbildung 39: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-Flpln-C2-Host-Zelllinie und der 1321N1-Flpln-C2-Leervektor-Zelllinie. Die Host-Zelllinie diente als Positivkontrolle, da diese über die Fähigkeit zur Ausbildung des Enzym β -Galactosidase verfügte und somit eine eindeutige Blaufärbung zeigte. Die Leervektor-Zelllinie zeigte, wie erwartet, eine Weißfärbung. Nach dem erfolgreichen Einbau des Leervektors in das Flpln™-System wurde keine β -Galactosidase-Aktivität mehr beobachtet. Diese Zelllinie wurde als Negativkontrolle genutzt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

4.1.3 P2Y-Rezeptor-exprimierende Zelllinien

Die verschiedenen P2Y-Rezeptoren wurden stabil in die 1321N1-Flpln-Host-Zelllinie, wie in Kapitel 3.3.2.6 beschrieben, transfiziert und Einzelzellklone (siehe Kapitel 3.3.2.7) selektiert. Die Klone waren gegen Hygromycin B resistent, Zeocin-sensitiv und wiesen keine β -Galactosidase-Aktivität mehr auf. Funktionelle Untersuchungen an so vorcharakterisierten Zellklonen mit Hilfe des Calcium-Assays bzw. cAMP-Assays zeigten, ob der exprimierte Rezeptor funktionell aktiv war und ob die dabei erhaltenen EC₅₀-Werte des Standardagonisten den jeweiligen Literaturwerten entsprachen. Die resultierenden Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

4.1.3.1 P2Y₁-Rezeptor

Die zuvor über Hygromycin B-haltiges Nährmedium selektierten Einzelzellklone B6, B9, F7 und H1 der Zelllinie 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁ wurden zunächst einer Blau-Weiß-Färbung unterzogen,

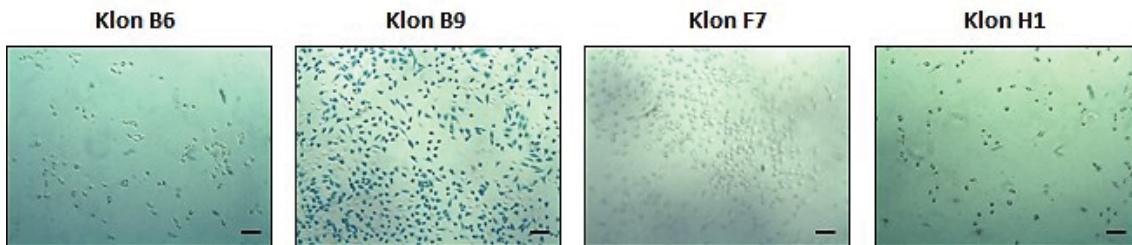


Abbildung 40: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁-Einzelzellklone. Der Klon B9 erschien nach dem Versuch blau und verfügte folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion bei diesem Zellklon hatte nicht funktioniert. Der Klon H1 erschien als blau-weiß gefärbter Mischklon. Die Transfektion war ebenfalls nicht erfolgreich. Die Klone B6 und F7 erschienen weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität, was dafür sprach, dass das GOI erfolgreich in das Flpln-System hinein kloniert wurde. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

um ihre Fähigkeit zur Ausbildung der β -Galactosidase zu überprüfen. Die mikroskopischen Aufnahmen nach der Färbung sind in Abbildung 40 gezeigt. Nach Auswertung der Bilder wurden die Klone B9 und H1 aussortiert und nicht mehr weiter kultiviert, da sie eine Blau- bzw. eine Mischfärbung aufwiesen. Die Klone B6 und F7 hingegen zeigten keine Blaufärbung. Die β -Galactosidase-Aktivität wurde durch den erfolgreichen Einbau des P2Y₁-Gens in diesen beiden Klonen inhibiert, so dass beide Zellklone im Calcium-Assay weiter funktionell untersucht wurden.

Im Calcium-Assay wurden die Nukleotide ATP und ADP als erstes in einem Grobscreening in einer Konzentration von 1 μ M und 10 μ M untersucht. 1 μ M Histamin wurde als Positivkontrolle eingesetzt, um eine Calcium-Freisetzung in der Zelle zu induzieren. Abbildung 41 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

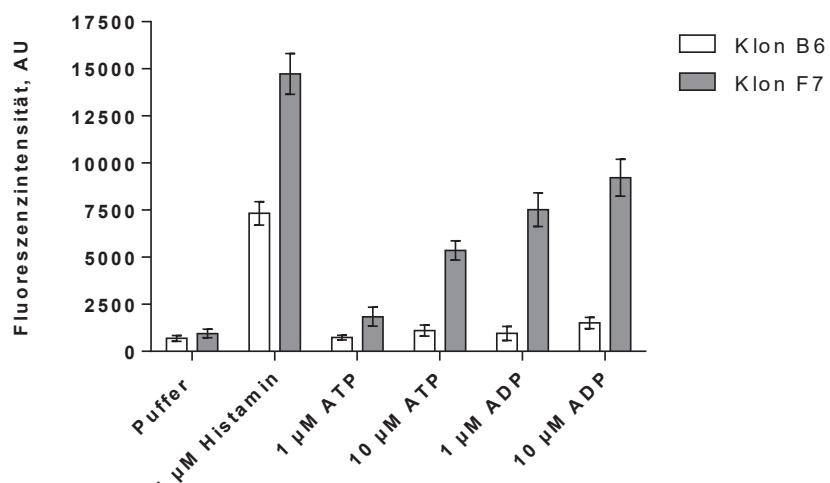


Abbildung 41: Untersuchung der Testsubstanzen ATP und ADP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁-Einzelzellklonen B6 und F7 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μ M Histamin als Positivkontrolle und ATP bzw. ADP in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte \pm SD).

Es ist deutlich zu erkennen, dass nur der Klon F7 auf die Nukleotidbehandlung (ATP bzw. ADP) mit einer intrazellulären Calcium-Freisetzung reagiert, die sich von der Antwort nach der Injektion von Puffer alleine deutlich unterscheidet. Der Klon B6 zeigte keine Calcium-Antwort auf eine Stimulation mit ATP bzw. ADP. Für die weitere funktionelle Charakterisierung der P2Y₁-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie wurde deshalb nur der Klon F7 verwendet, siehe Abbildung 42.

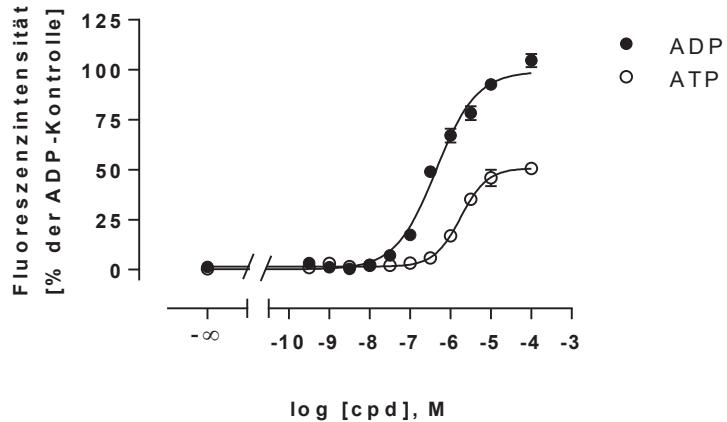


Abbildung 42: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP und ATP am P2Y₁-Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ADP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Die EC₅₀ von ADP lag bei 400 nM und von ATP bei 1.800 nM.

Am P2Y₁-Rezeptor wurde für den physiologischen Standardagonisten ADP eine EC₅₀ von 400 nM bestimmt (pEC₅₀-Wert: 6,40 \pm 0,03; n = 4), siehe Abbildung 42. Darüber hinaus wurden ADP und ATP ebenfalls im direkten Vergleich an der P2Y₁-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie getestet. Aus der Literatur ist bekannt, dass ATP als Partialagonist an diesem Rezeptorsubtyp fungiert (5,132,133). Abbildung 42 stellt die resultierenden und gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven aus vier unabhängigen Experimenten dar. Für ATP wurde so ein pEC₅₀-Wert von 5,75 \pm 0,05 mit einer EC₅₀ von 1.800 nM bestimmt. Außerdem war eindeutig zu erkennen, dass ATP höchstens 50% der maximalen ADP-induzierten Calcium-Antwort in der Zelle hervorruft. In der Literatur ist für ADP eine EC₅₀ von 257 \pm 14 nM und für ATP eine EC₅₀ von 1.520 \pm 210 nM publiziert (103), welche mittels IP₃-Messung bestimmt wurden. Die an der neu klonierten P2Y₁-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie bestimmten EC₅₀-Werte für ADP und ATP entsprachen somit den Literaturwerten. MRS2211 ist ein in der Literatur bekannter P2Y₁-Rezeptor-Antagonist (5,134,135). Zur weiteren Überprüfung des Testsystems wurde eine Konzentrations-Inhibition-Kurve von MRS2211 an dieser Zelllinie erstellt. Dazu wurde der Antagonist, wie in Kapitel 3.3.6.1 beschrieben, zugesetzt und die Fluoreszenz vermessen. In Abbildung 43 ist die resultierende Konzentrations-Inhibition-Kurve dargestellt. Es wurde ein pIC₅₀-Wert von 4,78 \pm 0,04, mit einer IC₅₀ von 16 μ M ermittelt. Der Antagonist blockierte das durch ADP-induzierte Calcium-Signal am P2Y₁-Rezeptor bis auf das Pufferniveau. In der Literatur ist für MRS2211 eine IC₅₀ von > 10 μ M mit einem pK_B von < 5 beschrieben (5,135) beschrieben. Die Werte stimmen somit überein. Diese Zelllinie konnte damit für weitere Versuche verwendet werden.

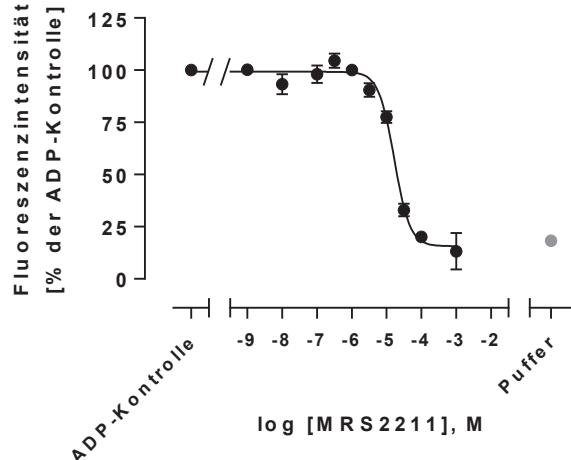


Abbildung 43: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von MRS2211 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁. Die durch 800 nM ADP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten MRS2211 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch 800 nM ADP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die IC₅₀ von MRS2211 lag bei 16 μ M.

4.1.3.2 P2Y₂-Rezeptor

Zunächst wurden die selektierten P2Y₂-Rezeptor-exprimierenden Zellklone in der Blau-Weiß-Färbung untersucht, um die Klone auszusortieren, welche noch eine Blau-Färbung zeigten (siehe Abbildung 44).

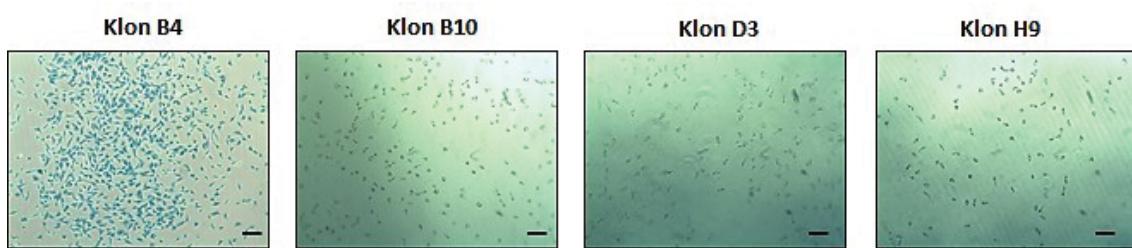


Abbildung 44: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂-Einzelzellklone. Der Klon B4 erschien nach dem Versuch blau und verfügte folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion bei diesem Zellklon hatte demzufolge nicht funktioniert. Die Klone B10, D3 und H9 erschienen weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpInTM-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

Der Klon B4 wurde aufgrund seiner Fähigkeit noch immer β -Galactosidase auszubilden, nicht weiter verwendet.

In Abbildung 45 ist das Ergebnis eines ersten Calcium-Assays an den drei Zellklonen präsentiert, in dem die beiden physiologischen Agonisten ATP und UTP (5) getestet wurden. Der Klon

H9 reagierte nicht mit einer Calcium-Freisetzung auf eine Stimulation mit ATP oder UTP, weshalb dieser Klon nicht weiter kultiviert wurde. Eine entsprechende Calcium-Antwort auf eine Behandlung mit den Nukleotiden zeigten die Klone B10 und D3.

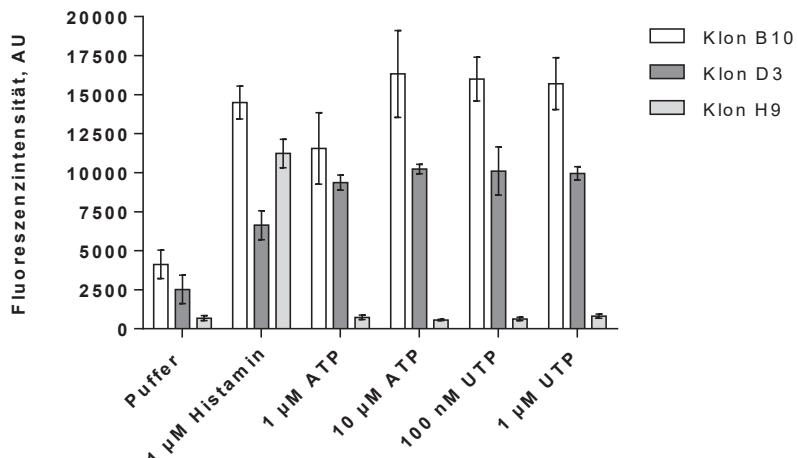


Abbildung 45: Untersuchung der Testsubstanzen ATP und UTP an den 1321N1-Flpln-C2-P2Y₂-Einzelzellklonen B10, D3 und H9 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μM Histamin und ATP bzw. UTP in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte ± SD).

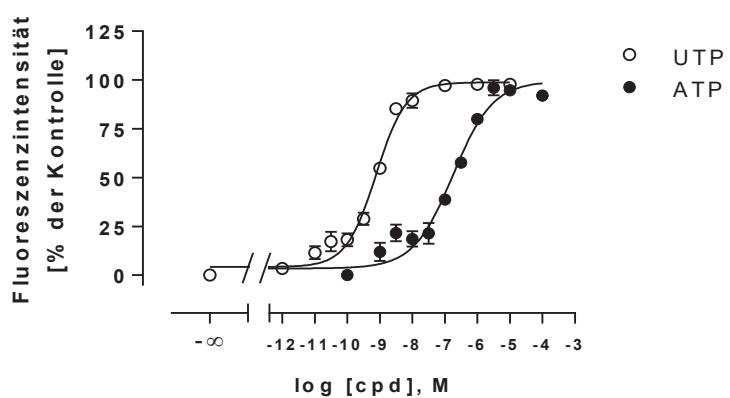


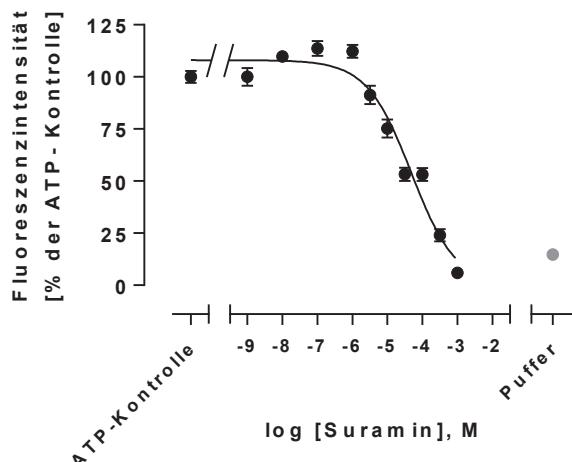
Abbildung 46: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP am P2Y₂-Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-Flpln-C2-P2Y₂. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP bzw. UTP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Die EC₅₀ von ATP lag bei 140 nM und die EC₅₀ von UTP bei 1 nM.

Aufgrund der stabileren Fluoreszenzwerte und der geringeren Abweichungen wurde der Klon D3 für die weitere funktionelle Charakterisierung gewählt. Für den P2Y₂-Rezeptor wurde für ATP ein pEC₅₀-Wert von $6,75 \pm 0,08$ ($n = 4$) mit einer EC₅₀ von 140 nM und für UTP ein pEC₅₀-Wert von $9,12 \pm 0,05$ ($n = 4$) mit einer EC₅₀ von 1 nM bestimmt, siehe Abbildung 46. UTP war

demnach deutlich potenter als ATP an der neu etablierten P2Y₂-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie. In der Literatur sind ATP und UTP allerdings als ungefähr äquipotent am P2Y₂-Rezeptor beschrieben (4,5,36) mit EC₅₀-Werten von 85 nM für ATP und 49 nM für UTP (36).

Zur weiteren Überprüfung des Zellsystems wurde deshalb der aus der Literatur bekannte P2Y₂-Rezeptor-Antagonist Suramin (5) ebenfalls an der Zelllinie getestet.

A)



B)

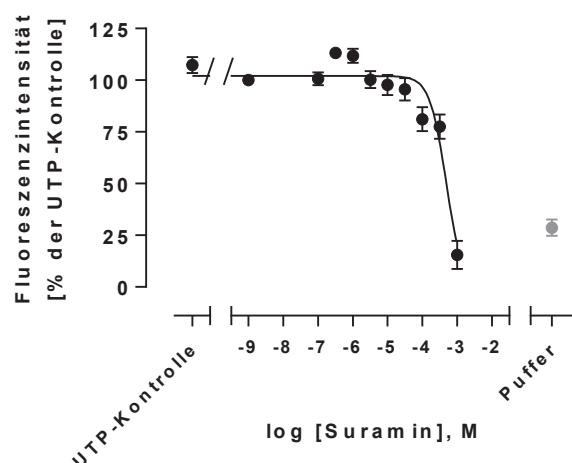


Abbildung 47: Konzentrations-Inhibition-Kurve von Suramin an der Zelllinie 1321N1-FlIn-C2-P2Y₂. A) Die durch 280 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten Suramin konzentrationsabhängig inhibiert. B) Die durch 2 nM UTP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten Suramin inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation bzw. UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten am Klon D3. Die IC₅₀ von Suramin in Gegenwart von ATP lag bei 48 μM und in Gegenwart von UTP bei 480 μM.

Die Konzentrations-Inhibitions-Kurven sowohl für die mit ATP als auch die mit UTP-induzierten Calcium-Antworten wurden hier erstellt (siehe Abbildung 47). Die ATP-induzierte Calcium-Fluoreszenz wurde deutlich konzentrationsabhängig und bis auf Pufferniveau durch Suramin gesenkt. Es ließ sich ein pIC_{50} -Wert von $4,32 \pm 0,06$ mit einer IC_{50} von $48 \mu\text{M}$, $n = 3$, bestimmen (siehe Abbildung 47 A). Das UTP-induzierte Signal wurde nur in der maximal eingesetzten Konzentration von 1 mM Suramin vollständig inhibiert. Die nächst niedrigeren Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ und $316 \mu\text{M}$ Suramin reduzierten das UTP-Signal um ungefähr 25% (Abbildung 47 B). Es ließ sich ein pIC_{50} -Wert von $3,32 \pm 0,04$ mit einer IC_{50} von $480 \mu\text{M}$, $n = 3$, bestimmen. In der Literatur ist für Suramin in Gegenwart von UTP als Standardagonist ein pA_2 -Wert von $4,26 \pm 1,09$ beschrieben (136), was einer IC_{50} von etwa $50 \mu\text{M}$ entspräche bzw. Kaulich *et al.* geben hier eine IC_{50} von $31 \pm 4 \mu\text{M}$ (40) an. Für Suramin wurde an der hier neu etablierten Zelllinie eine IC_{50} von $48 \mu\text{M}$ mit einen K_i -Wert von $16 \mu\text{M}$ ($pK_i = 4,80$) in Gegenwart von ATP und eine IC_{50} von $480 \mu\text{M}$ ($pK_i = 3,32$) mit einen K_i -Wert von $160 \mu\text{M}$ in Gegenwart von UTP bestimmt. Weitere Angaben zur Verwendung der Zelllinie werden in Kapitel 4.2.1 gemacht.

4.1.3.3 P2Y₄-Rezeptor

Die mikroskopischen Aufnahmen nach der Blau-Weiß-Färbung der P2Y₄-Einzelzellklone sind in Abbildung 48 gezeigt. Hier wiesen nur die Klone D3 und D6 rein weiße Zellen auf, welche funktionell im Calcium-Assay weiter untersucht wurden. Die Zellklone E12 und F11 wurden verworfen, da sie noch zur Ausbildung der β -Galactosidase befähigt waren. Dies war anhand der Blaufärbung der Zellen zu erkennen.

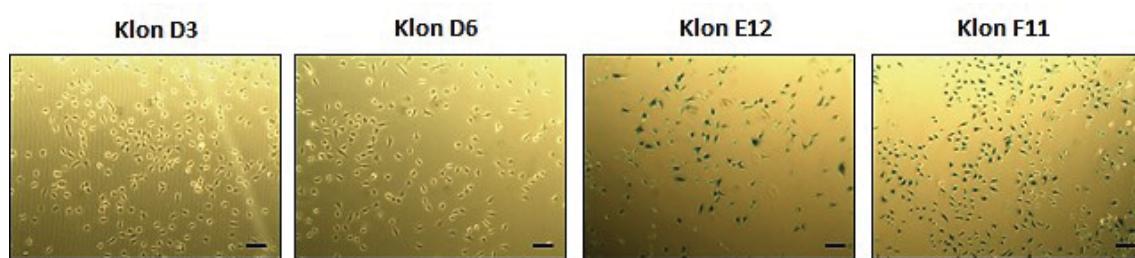


Abbildung 48: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₄-Einzelzellklone. Die Klone E12 und F11 erschienen nach dem Versuch blau und verfügten folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion bei diesen beiden Zellklonen hatte demzufolge nicht funktioniert. Die Klone D3 und D6 erschienen weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpIn™-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht $10 \mu\text{m}$.

Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse des Grobscreenings im Calcium-Assay. Beide Klone reagierten mit deutlichen Fluoreszenzsignalen auf eine Stimulation mit ATP bzw. UTP.

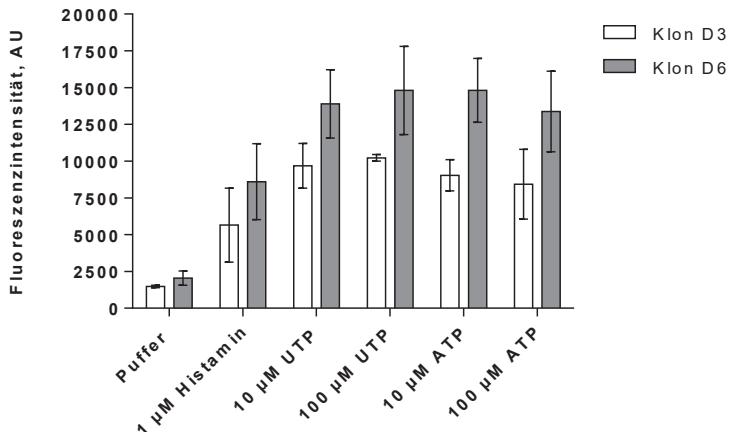


Abbildung 49: Untersuchung der Testsubstanzen UTP und ATP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₄-Einzelzellklonen D3 und D6 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μM Histamin als Positivkontrolle und ATP bzw. UTP in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte ± SD).

Für den P2Y₄-Rezeptor wurde am Klon D3 für ATP ein pEC₅₀-Wert von $6,74 \pm 0,06$ ($n = 3$; EC₅₀ = 181 nM) und für UTP ein pEC₅₀-Wert von $8,70 \pm 0,07$ ($n = 3$; EC₅₀ = 2 nM) bestimmt (Abbildung 50 A). Für den Klon D6 ergaben sich folgende Werte: ATP: pEC₅₀ = $6,72 \pm 0,06$ ($n = 3$, EC₅₀ = 190 nM) und UTP: pEC₅₀ = $8,98 \pm 0,05$ ($n = 4$, EC₅₀ = 1 nM) (Abbildung 50 B). Wie erwartet, erwies sich UTP an beiden Zellklonen als potenter gegenüber ATP, was auch durch von Kügelgen (5) und Nicholas *et al.* (137) in der Literatur beschrieben wurde. Brunschweiger *et al.* geben für UTP einen EC₅₀-Wert von 50 - 800 nM an, welcher über IP₃-Messung bestimmt wurde (104). Die hier bestimmten EC₅₀-Werte für UTP von 2 nM (Klon D3) bzw. 1 nM (Klon D6) lagen dahingegen im unteren nanomolaren Bereich.

Weiter wurde überprüft, ob die beiden literaturbekannten Antagonisten für den P2Y₄-Rezeptor Suramin und Reactive Blue 2 (4,5) in der Lage waren, dass UTP-induzierte Calcium-Signal in der Zelle zu inhibieren. Das Resultat dieses Versuchs ist in Abbildung 51 dargestellt. An beiden Zellklonen wurde nur für Suramin in der Konzentration von 1 mM eine deutliche Inhibition des UTP-induzierten Fluoreszenzsignals um etwa 75%, beobachtet. 100 μM Suramin senkte die Fluoreszenz nur auf 75% des UTP-Signals. Reactive Blue 2 zeigte deutlichere antagonistische Effekte und erwies sich gegenüber dem Klon D6 als deutlich potenter im Vergleich zum Klon D3. Am Klon D6 wurden die Signale durch 100 μM Reactive Blue 2 auf etwa 25% der UTP-Antwort reduziert und durch 316 μM Reactive Blue 2 sogar vollständig geblockt. Etwa noch 60% der Fluoreszenz der UTP-Kontrolle wurden durch 100 μM Reactive Blue 2 und etwa 25% der Kontrollantwort durch 316 μM Reactive Blue 2 am Klon D3 erreicht. Konzentrations-

Inhibitions-Kurven für Suramin oder Reactive Blue 2 wurden an dieser Stelle nicht erstellt. Beide Zellklone wurden aufgrund der Ergebnisse verwendet.

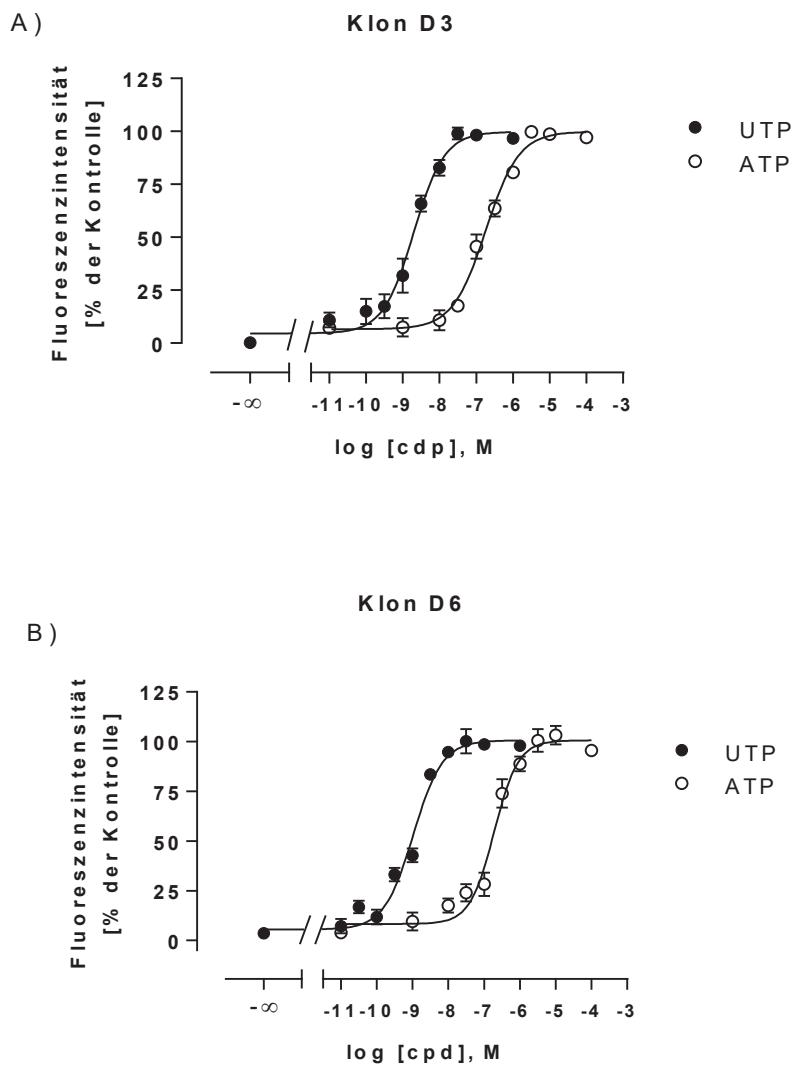


Abbildung 50: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP an den P2Y₄-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen.
A) zeigt Klon D3 und B) den Klon D6. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP bzw. UTP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Für den Klon D3 wurden folgende EC₅₀-Werte bestimmt: UTP = 2 nM, ATP = 181 nM. Klon D6 hatte folgende EC₅₀-Werte: UTP = 1 nM, ATP 190 nM.

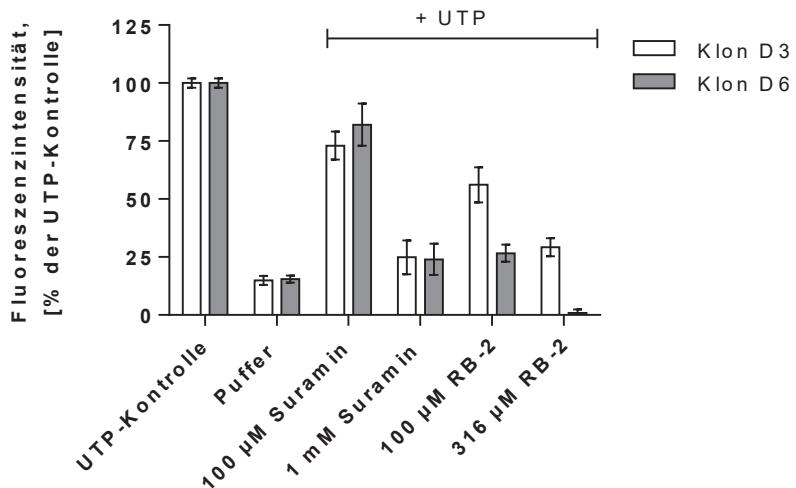


Abbildung 51: Inhibition von Suramin und Reactive Blue 2 an den P2Y₄-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen. Die antagonistische Aktivität von Suramin in Gegenwart von 4 nM UTP (Klon D3) bzw. 2 nM UTP (Klon D6), wurde in den Konzentrationen 100 µM und 1 mM für Suramin bzw. 100 µM und 316 µM Reactive Blue 2 an den Zelllinien untersucht. Puffer und UTP in der jeweiligen Konzentration alleine (4 nM bzw. 2 nM) injiziert, dienten dabei als Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3.4 P2Y₆-Rezeptor

In Abbildung 52 ist das Resultat der Blau-Weiß-Färbung an den P2Y₆-Rezeptorzellklonen E3, H4 und H6 gezeigt. Da sich keine der Zelllinien blau verfärbte, sondern alle drei weiß erschienen, wurden alle im Calcium-Assay getestet.

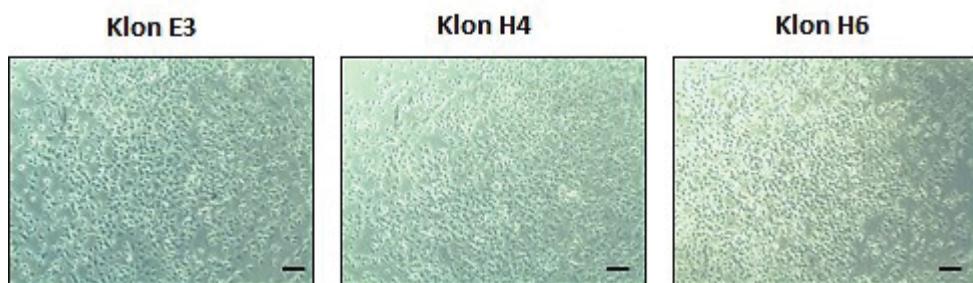


Abbildung 52: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-Flpln-C2-P2Y₆-Einzelzellklone. Die Klone E3, H4 und H6 erschienen nach dem Versuch weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über die Fähigkeit β-Galactosidase auszubilden. Das GOI wurde demzufolge erfolgreich in das Flpln™-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 µm.

In einem ersten Versuch zeigten die drei Zellklone deutliche Fluoreszenzsignale als Antwort auf eine Behandlung sowohl mit 1 µM Histamin als auch mit den beiden Uridinnukleotiden UDP und UTP, in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM, im Calcium-Assay (Abbildung 53). Die wei-

ter erstellten Konzentrations-Effekt-Kurven für UDP und UTP sind in den Abbildung 54 A - C gezeigt.

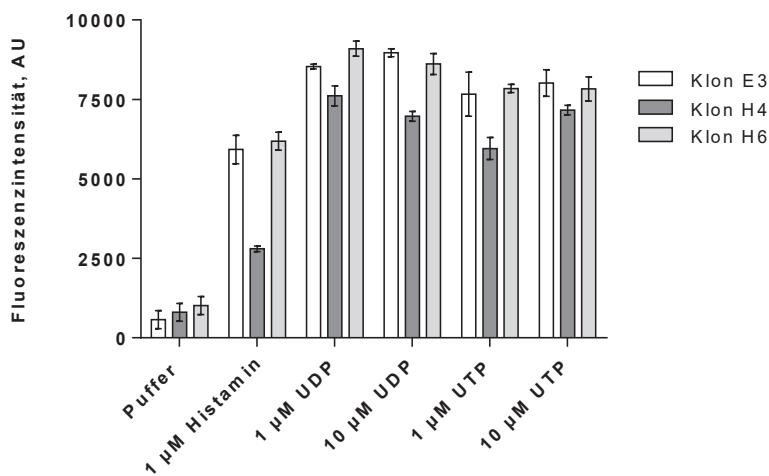


Abbildung 53: Untersuchung der Testsubstanzen UDP und UTP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₆-Einzelzellklonen H3, H4 und H6 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μ M Histamin als Positivkontrolle und UDP bzw. UTP in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte \pm SD).

Für den P2Y₆-Rezeptor wurden an den Zellklonen E3, H4 und H6 folgende Werte bestimmt (Abbildung 54): Der Klon E3 wies für UTP einen pEC₅₀-Wert von $6,82 \pm 0,05$ ($n = 3$, EC₅₀ = 151 nM) und für UDP einen pEC₅₀-Wert von $7,95 \pm 0,05$ ($n = 3$, EC₅₀ = 11,3 nM) auf (Abbildung 54 A). Für den Klon H4 wurden folgende Werte berechnet: für UTP pEC₅₀-Wert von $6,86 \pm 0,04$ ($n = 3$, EC₅₀ = 140 nM) und für UDP einen pEC₅₀-Wert von $7,30 \pm 0,07$ ($n = 3$, EC₅₀ = 51,2 nM) (Abbildung 54 B). Der Klon H6 zeigte diese Werte: pEC₅₀-Wert von $6,98 \pm 0,04$ ($n = 3$, EC₅₀ = 105 nM) für UTP und für UDP einen pEC₅₀-Wert von $8,06 \pm 0,05$ ($n = 3$, EC₅₀ = 8,8 nM) (Abbildung 54 C). Wie erwartet war das Diphosphat UDP an allen drei Zellklonen potenter als UTP, so wie aus der Literatur bekannt. UDP ist hier als 100-fach potenter gegenüber UTP beschrieben (5,137). Dieser Unterschied in der Potenz zwischen UDP und UTP wurde für die neu etablierten Zellklone E3, H4 und H6 nicht so deutlich gesehen. *Besada et al.* geben für das potentere UDP eine EC₅₀ von 13 ± 4 nM an (105). Die hier an den drei Zellklonen bestimmten EC₅₀-Werte für UDP lagen ebenfalls alle im unteren nanomolaren Bereich. Alle drei Zellklone wurden somit weiter verwendet. Antagonisten wurden an dieser Stelle nicht an den P2Y₆-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen untersucht.

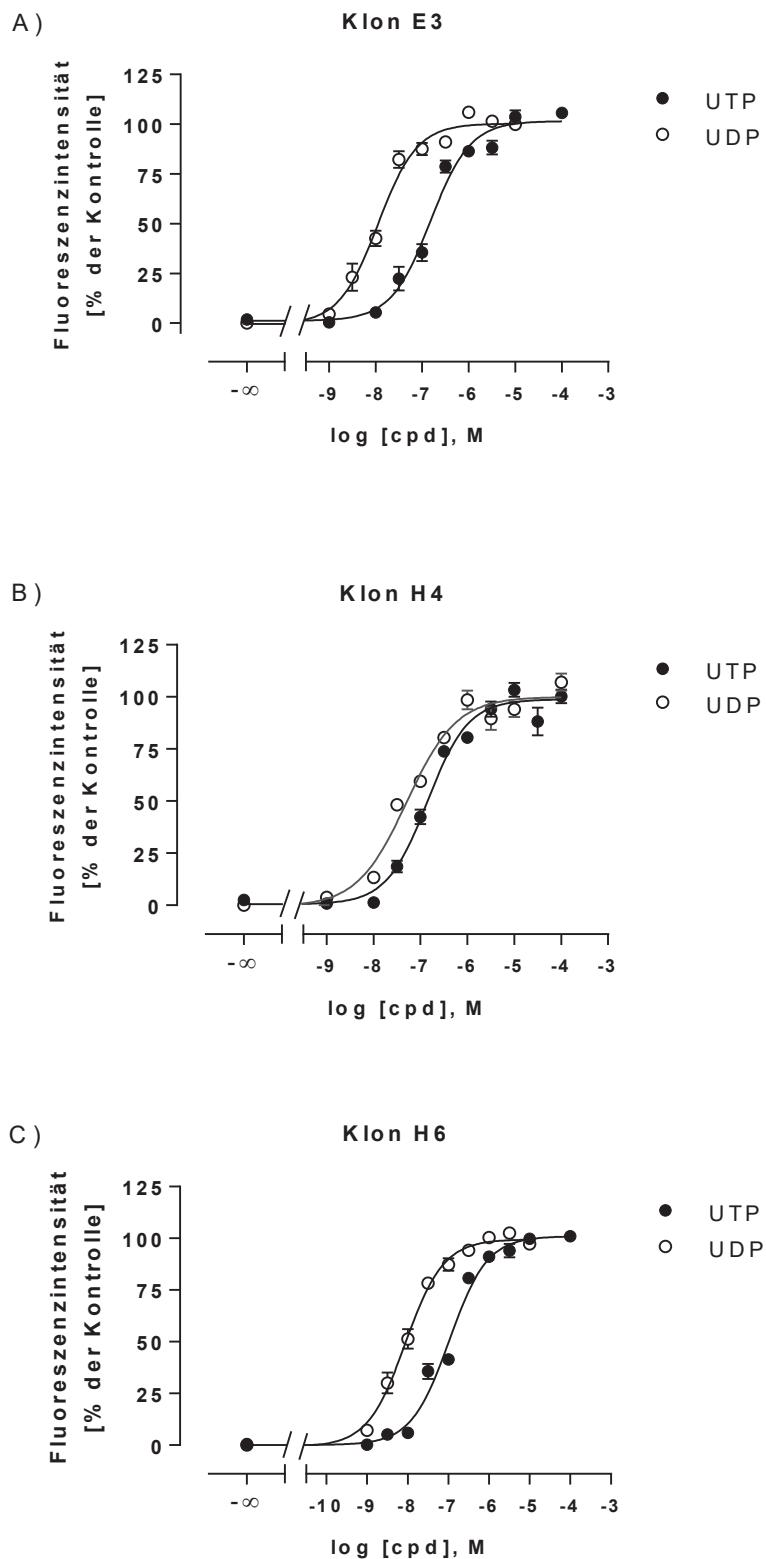


Abbildung 54: Konzentrations-Effekt-Kurven von UTP und UDP an den P2Y₆-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen.
 A) zeigt Klon E3, B) den Klon H4 und C) den Klon H6. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit UTP bzw. UDP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

4.1.3.5 P2Y₁₁-Rezeptor

Die mikroskopischen Aufnahmen nach der Blau-Weiß-Färbung der P2Y₁₁-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie sind in Abbildung 55 gezeigt. Klon F11 entwickelte eine Blaufärbung und wurde deshalb nicht weiter verwendet. Die anderen beiden Zellklone, F6 und F8, blieben weiß und wurden im Calcium-Assay weiter untersucht.

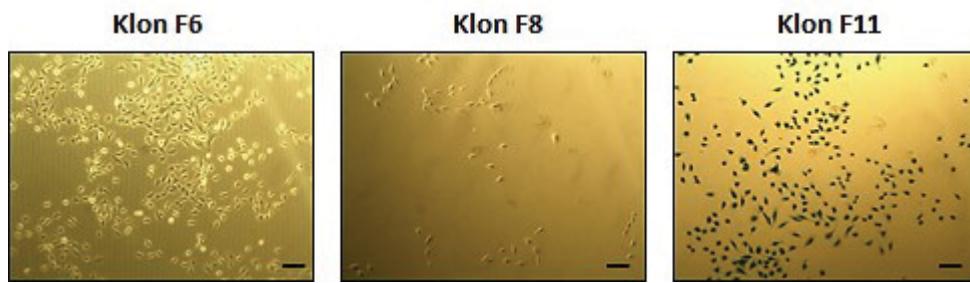


Abbildung 55: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₁-Einzelzellklone. Der Klon F11 erschien nach dem Versuch blau und verfügte folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion hatte bei diesem Zellklon nicht funktioniert. Die Klone F6 und F8 erschienen weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpIn™-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

Die beiden Zellklone F6 und F8 reagierten im Calcium-Assay auf eine ATP-Stimulation mit einer entsprechenden Fluoreszenzantwort, siehe Abbildung 56.

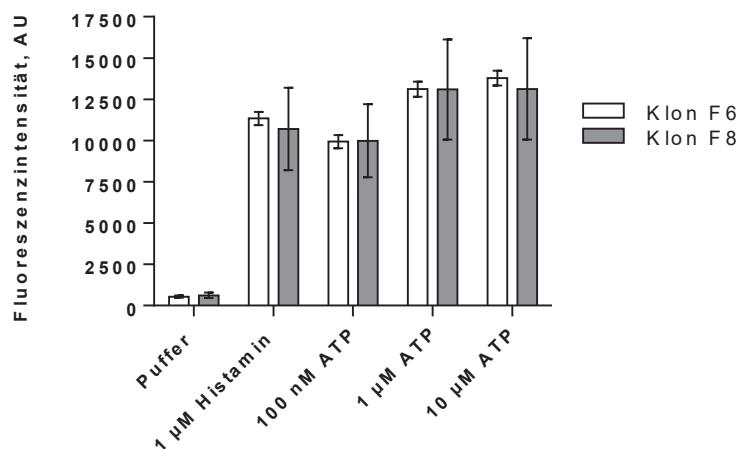


Abbildung 56: Untersuchung der Testsubstanz ATP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₁-Einzelzellklonen F6 und F8 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μ M Histamin als Positivkontrolle ATP in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte \pm SD).

Die jeweils erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für ATP an den P2Y₁₁-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien 13121N1-FlpIn-C2-P2Y₁₁ F6 bzw. F8 sind in Abbildung 57 gezeigt.

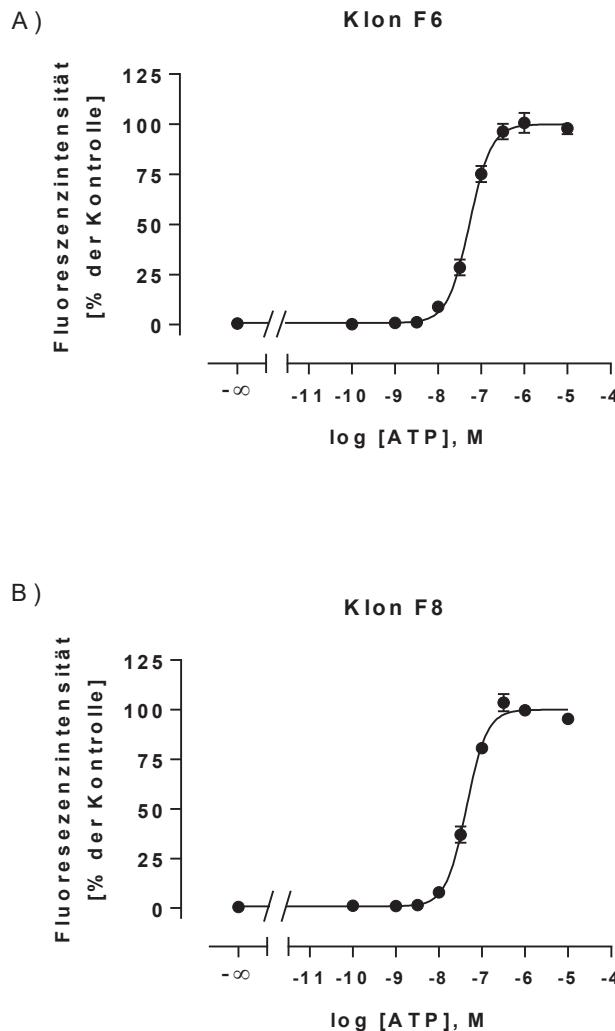


Abbildung 57: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an den P2Y₁₁-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen. A) zeigt den Klon F6 und B) den Klon F8. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Der Klon F6 weist für ATP eine EC₅₀ von 53,3 nM und für den Klon F8 von 43,2 nM auf.

Für ATP wurde am Klon F6 ein pEC₅₀-Wert von $7,27 \pm 0,03$ ($n = 3$, EC₅₀ = 53,3 nM) (Abbildung 57 A) und am Klon F8 ein pEC₅₀-Wert von $7,36 \pm 0,02$ ($n = 3$, EC₅₀ = 43,2 nM) bestimmt (Abbildung 57 B). In der Literatur beschreiben Ullmann *et al.* einen pEC₅₀-Wert für ATP am P2Y₁₁-Rezeptor von $6,76 \pm 0,07$ (85), was einer EC₅₀ von etwa 170 nM entspricht. Die hier bestimmten EC₅₀ für ATP liegen bei 53,3 nM (Klon F6) bzw. 43,2 nM (Klon F8) und liegen somit ebenfalls im unteren nanomolaren Bereich.

NF157 ist ein beschriebener Antagonist am P2Y₁₁-Rezeptor (85,98). Zur weiteren Überprüfung der beiden Testsysteme wurden Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF157 an den Zelllinien erstellt (siehe Abbildung 58). Bei beiden Zelllinien inhibierte NF157 das ATP-induzierte Calcium-Signal in den Zellen konzentrationsabhängig. Am Klon F6 wurde für NF157 ein pIC₅₀-

Wert von $6,83 \pm 0,05$ ($n = 3$, $IC_{50} = 148$ nM) mit einem daraus berechneten pK_i -Wert (siehe Formel 10) von 7,30 bestimmt. Für den Klon F8 wurde als pIC_{50} ein Wert von $6,90 \pm 0,06$ ($n = 3$, $IC_{50} = 127$ nM) mit einem pK_i -Wert von 7,64 ermittelt. Die Literatur gibt für NF157 einen pK_i -Wert von 7,35 an (85). Somit entsprechen auch die an diesen Zellklonen bestimmten pK_i -Werte den Literaturwerten, so dass beide Zellklone weiter verwendet wurden.

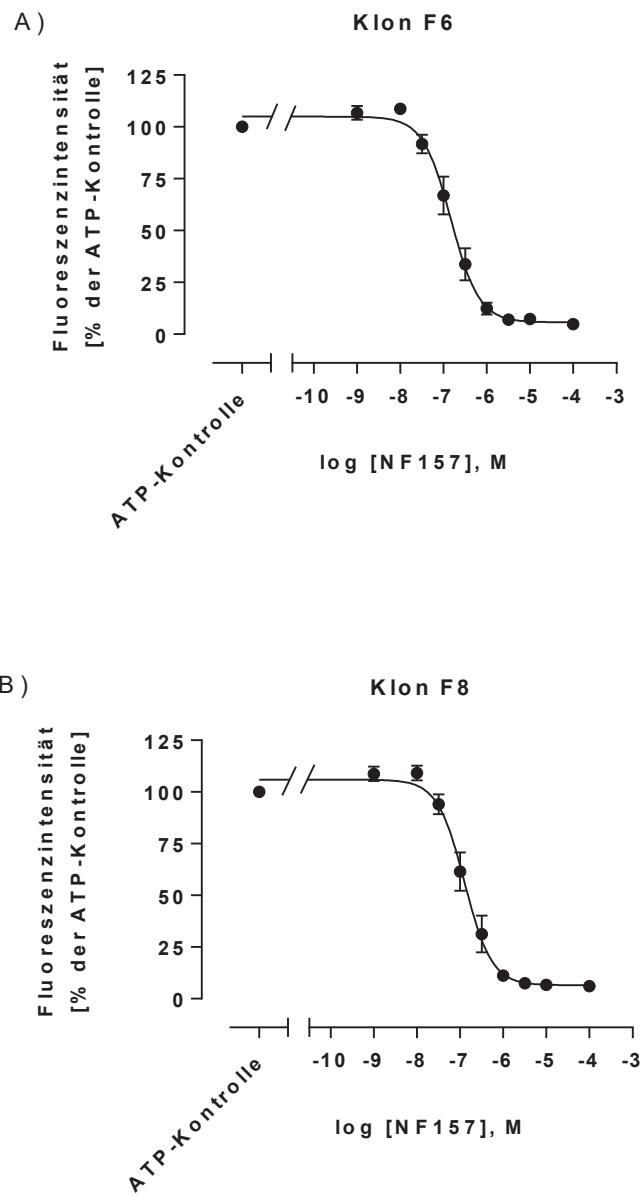


Abbildung 58: Konzentrations-Inhibition-Kurve von NF157 an den P2Y₁₁-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen.
 A) Klon F6: Die durch 100 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF157 konzentrationsabhängig inhibiert. B) Klon F8: Die durch 90 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF157 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Klon F6 weist für NF157 eine IC_{50} von 148 nM und für den Klon F8 von 127 nM auf.

4.1.3.6 P2Y₁₂-Rezeptor

Nach der Blau-Weiß-Färbung für die drei selektierten P2Y₁₂-Rezeptor-exprimierten Zellklone wurden nur die Klone B2 und C5, welche rein weiße Zellen enthielten, weiter untersucht. Der Klon B1 wurde verworfen, da dieser eine Blaufärbung aufwies, siehe Abbildung 59.

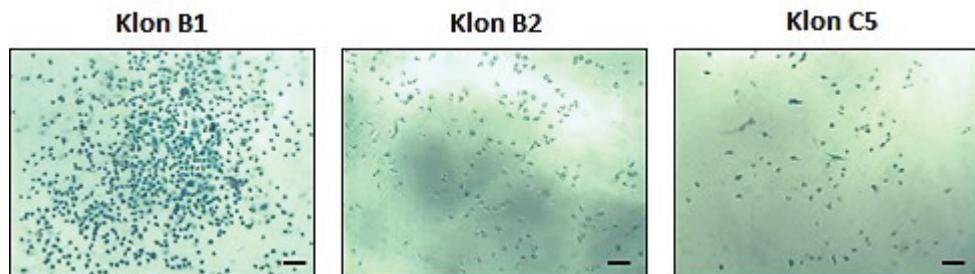


Abbildung 59: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₂-Einzelzellklone. Der Klon B1 erschien nach dem Versuch blau und verfügte folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion bei diesem Zellklon hatte demzufolge nicht funktioniert. Die Klone B2 und C5 erschien weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpIn™-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

Für die weitere Untersuchung dieser beiden Zelllinien wurde hier nicht, wie aufgrund der G_i-Kopplung des P2Y₁₂-Rezeptors zu erwarten wäre, der cAMP-Reporterogen-Assay verwendet. Im cAMP-Assay konnten für beide Klone keine eindeutig auswertbaren Lumineszenz-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden im Calcium-Assay ADP-induzierte Zellantworten bestimmt, siehe Abbildung 60. Dies hängt mit der ebenfalls in der Literatur beschriebenen promiskuitiven G-Protein-Kopplung zusammen (138–142).

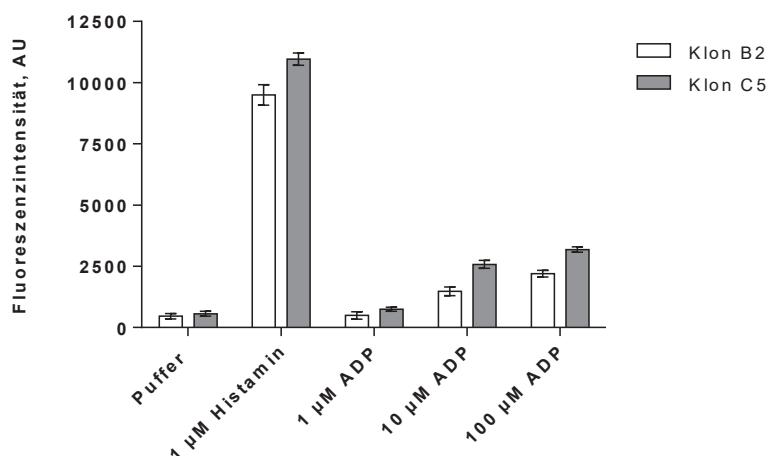


Abbildung 60: Untersuchung der Testsubstanz ADP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₂-Einzelzellklonen B2 und C5 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μ M Histamin als Positivkontrolle und ADP in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte \pm SD).

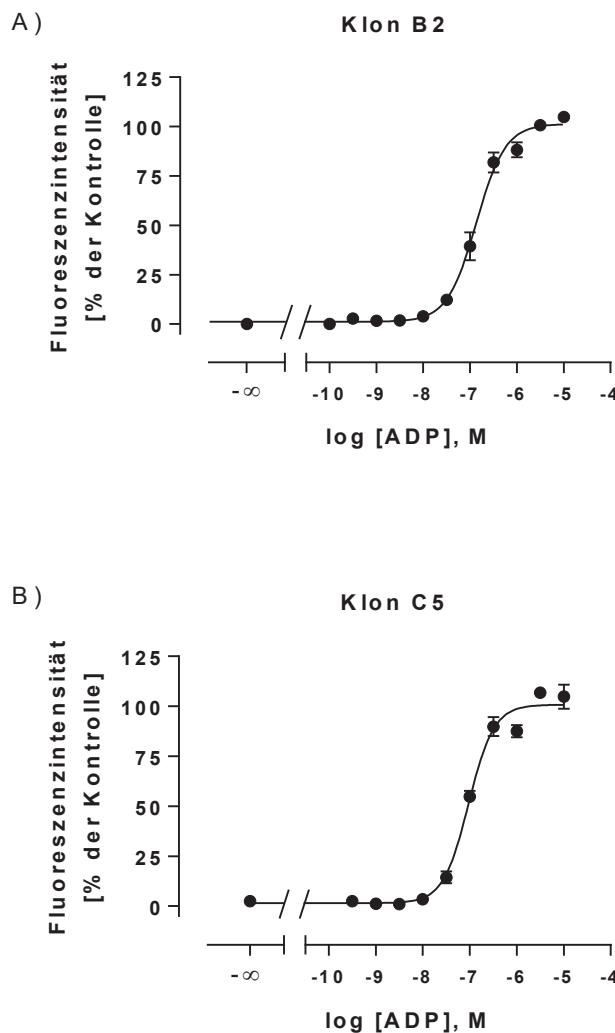


Abbildung 61: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen im Calcium-Assay. A) zeigt Klon B2 und B) Klon C5. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ADP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Klon B2 weist für ADP eine EC₅₀ von 136 nM und für den Klon C5 von 94 nM auf.

An beiden Zelllinien wurden Konzentrations-Effekt-Kurven für ADP mittels Calcium-Assay erstellt. Für Klon B2 wurde für ADP ein pEC₅₀-Wert von $6,87 \pm 0,04$ ($n = 3$, EC₅₀ = 136 nM), siehe Abbildung 61 A und für Klon C5 wurde ein pEC₅₀-Wert von $7,03 \pm 0,03$ ($n = 3$, EC₅₀ = 94 nM) bestimmt (Abbildung 61 B). In der Literatur sind für ADP EC₅₀-Werte von 320 ± 80 nM (106) bzw. von 60 nM (108) beschrieben, allerdings bestimmt mittels cAMP-Messung. Die hier im Calcium-Assay ermittelten Daten liegen innerhalb der gleichen Größenordnung wie die aus der Literatur bekannten cAMP-Daten. Für diese Zelllinien wurde in weiteren Experimenten der Calcium-Assay herangezogen. Versuche mit Antagonisten wurden an dieser Stelle nicht unternommen.

4.1.3.7 P2Y₁₃-Rezeptor

In Abbildung 62 sind die mikroskopischen Aufnahmen der P2Y₁₃-Rezeptor-exprimierenden Zellklone gezeigt. Nur Klon C5 blieb weiß nach der Färbung und wurde weiter untersucht. Die beiden anderen Klone C6 und G4 zeigten eine Mischfärbung aus blauen und weißen Zellen, was sie von der weiteren Charakterisierung ausschloss.

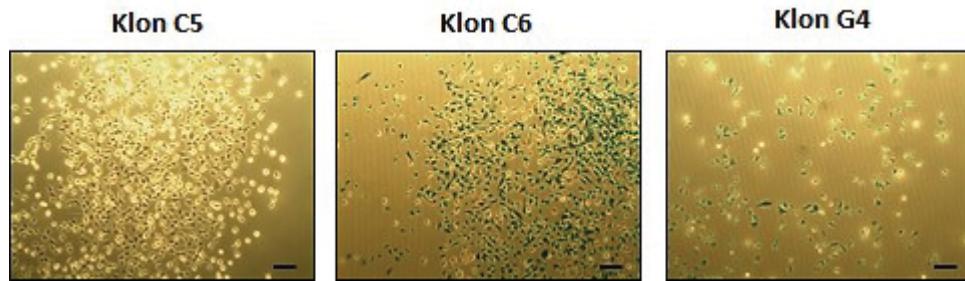


Abbildung 62: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₃-Einzelzellklone. Die Klone C6 und G4 erschien nach dem Versuch zum Teil noch blau. Demzufolge handelte es sich um einen Mischklon. Der Klon C5 erschien weiß. Dieser Zellklon verfügte folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpIn™-System hinein kloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

Für die weitere Untersuchung dieser Zelllinie wurde auch hier nicht, wie aufgrund der G_i-Kopplung des P2Y₁₃-Rezeptors zu erwarten wäre, der cAMP-Reporterogen-Assay verwendet. Im cAMP-Assay konnten für den Klon keine eindeutig auswertbaren Lumineszenz-Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden auch an dieser Stelle im Calcium-Assay ADP-induzierte Zellantworten bestimmt, siehe Abbildung 63.

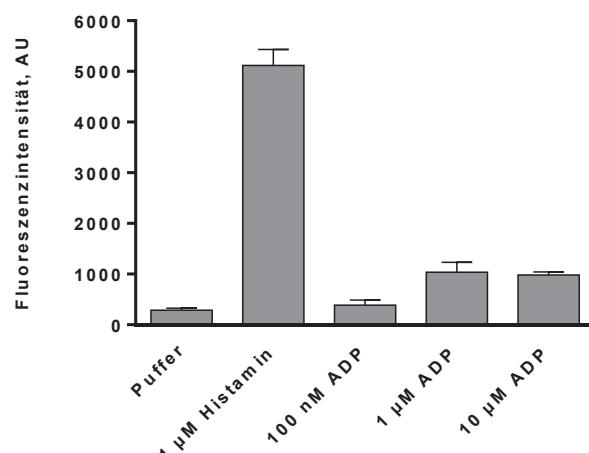


Abbildung 63: Untersuchung der Testsubstanz ADP an dem 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₃-Einzelzellklon C5 im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μ M Histamin als Positivkontrolle und ADP in den Konzentrationen 100 nM, 1 μ M und 10 μ M. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte \pm SD).

In Abbildung 64 ist die erhaltene Konzentrations-Effekt-Kurve für den Zellklon C5 dargestellt. Für ADP wurde ein pEC_{50} -Wert von $6,30 \pm 0,1$ ($n = 4$, $EC_{50} = 502 \text{ nM}$) ermittelt. Marteau *et al.* haben für ADP am P2Y₁₃-Rezeptor eine EC_{50} von $308 \pm 1 \text{ nM}$ beschrieben (107), welche mittels IP₃-Messung bestimmt wurde und somit vergleichbar mit der hier ermittelten EC_{50} von 502 nM ist. Für diese Zelllinie wurde auch hier in weiteren Experimenten der Calcium-Assay herangezogen.

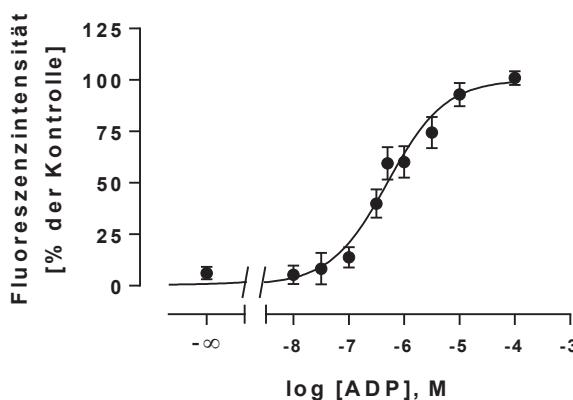


Abbildung 64: Konzentrations-Effekt-Kurven von ADP an der P2Y₁₃-Rezeptor-exprimierenden Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₃ im Calcium-Assay. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ADP maximal erreichbaren Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten. Der EC_{50} -Wert für ADP lag hier bei 502 nM .

4.1.3.8 P2Y₁₄-Rezeptor

Von den vier selektierten Zellklonen, in denen die Expression des P2Y₁₄-Rezeptors erwartet wurde, färbten sich die Klone B8 und D5 blau. Nur die Klone F4 und F8 erschienen weiß nach der Blau-Weiß-Färbung, siehe Abbildung 65.

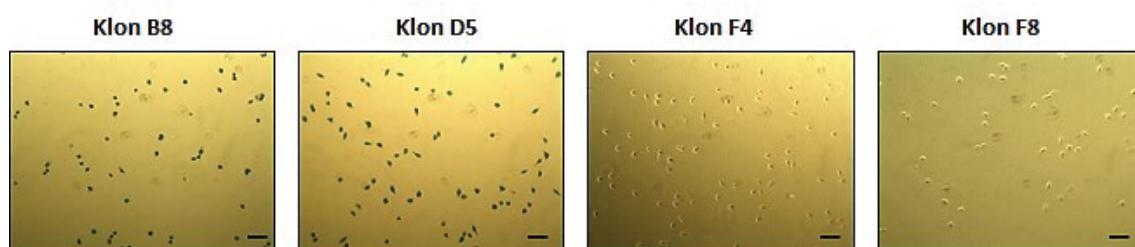


Abbildung 65: Blau-Weiß-Färbung der 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₄-Einzelzellklone. Die Klone B8 und D5 erschienen nach dem Versuch blau und verfügten folglich noch über die Fähigkeit β -Galactosidase auszubilden. Die Transfektion hatte bei diesen beiden Zellklonen nicht funktioniert. Die Klone F4 und F8 erschienen weiß. Diese Zellklone verfügten folglich nicht mehr über β -Galactosidase-Aktivität. Das GOI wurde erfolgreich in das FlpIn™-System hineinkloniert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der schwarze Balken entspricht $10 \mu\text{m}$.

Deshalb wurden eben diese beiden Zelllinien im cAMP-Reportergen-Assay, siehe Abbildung 66, und im Calcium-Assay, siehe Abbildung 67, untersucht.

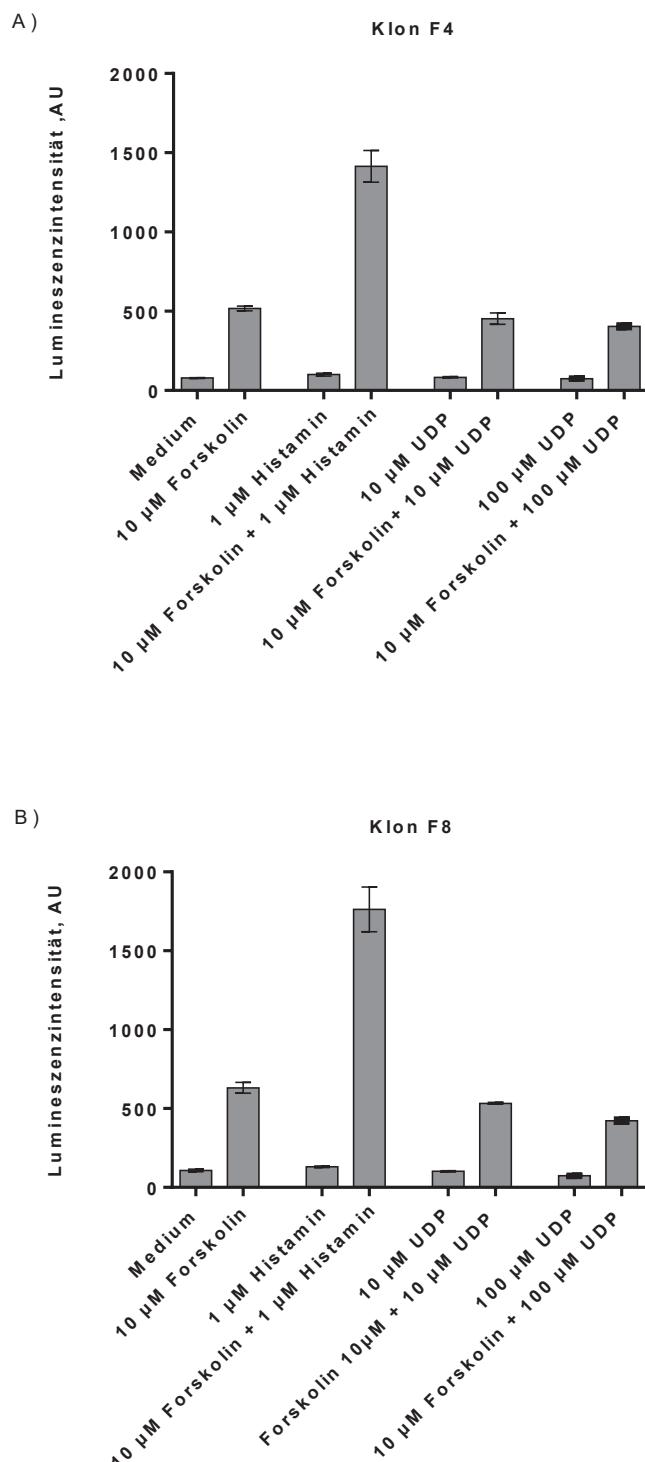


Abbildung 66: Untersuchung der Testsubstanz UDP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₄-Einzelzellklonen F4 (A) und F8 (B) im cAMP-Assay. Getestet wurden 10 μM Forskolin als Positivkontrolle, 1 μM Histamin und UDP in den Konzentrationen 10 μM und 100 μM, entweder alleine oder in Kombination mit 10 μM Forskolin. Dargestellt sind die absoluten Lumineszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte ± SD).

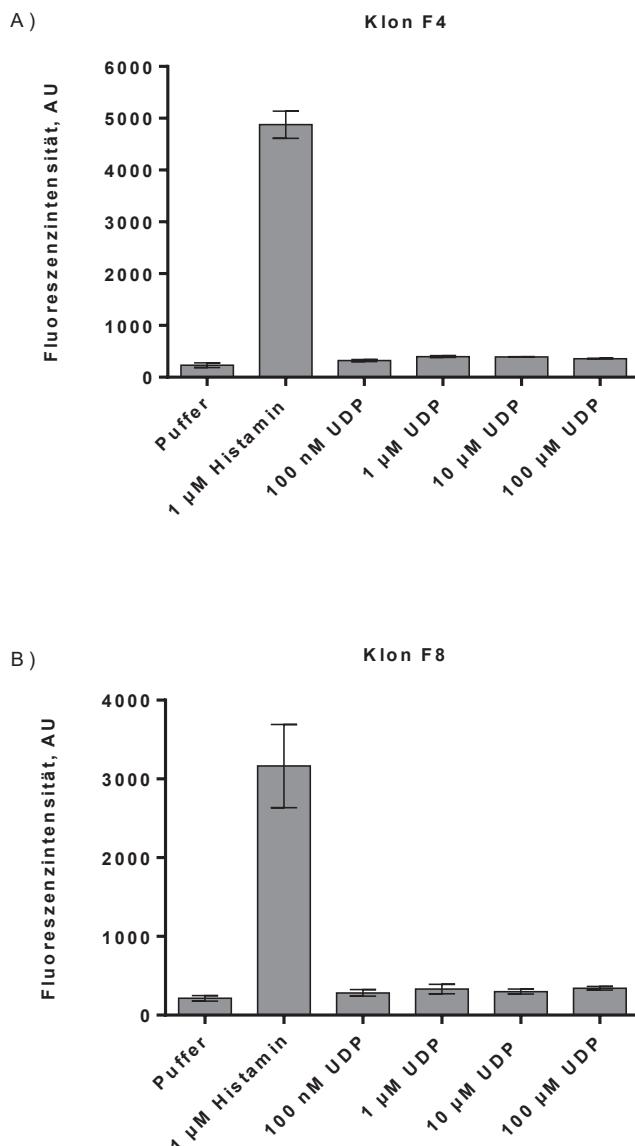


Abbildung 67: Untersuchung der Testsubstanz UDP an den 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₄-Einzelzellklonen F4 (A) und F8 (B) im Calcium-Assay. Getestet wurden 1 μM Histamin als Positivkontrolle und UDP in den Konzentrationen 100 nM, 1 μM, 10 μM und 100 μM. Dargestellt sind die absoluten Lumineszenzsignale eines ausgewählten Experiments (Mittelwerte ± SD).

Weder im cAMP-Assay (siehe Abbildung 66) noch im Calcium-Assay (siehe Abbildung 67) wurden für die Klone F4 und F8 eindeutig auswertbare Lumineszenz- bzw. Fluoreszenz-Signale nach Stimulation mit UDP als nativen Agonisten detektiert. UDP vermochte weder das durch 10 μM Forskolin hervorgerufene Lumineszenzsignal im cAMP-Assay konzentrationsabhängig zu inhibieren noch einen von Puffer signifikant verschiedenen Anstieg der Fluoreszenzintensität im Calcium-Assay zu induzieren. Offensichtlich war das P2Y₁₄-Rezeptorprotein in beiden Zelllinien nicht funktionell aktiv, weshalb beide Zellklone nicht weiter verwendet werden konnten.

4.2 Pharmakologische Evaluierung möglicher P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten

4.2.1 Charakterisierung des verwendeten Zellsystems

Aufgrund der Tatsache, dass das in dieser Arbeit neu etablierte Zellsystem 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ für den P2Y₂-Rezeptor deutlich voneinander abweichende EC₅₀-Werte für die beiden physiologischen, eigentlich als äquipotent beschriebenen Agonisten ATP und UTP (4,5) aufwies (ATP: 140 nM (pEC₅₀ = 6,75 ± 0,08), UTP: 1 nM (pEC₅₀ = 9,12 ± 0,05)) und UTP somit etwa 100-fach potenter war als ATP, siehe Kapitel 4.1.3.2, wurde das von S. Meis bereits etablierte Zellsystem 1321N1-P2Y₂ (98) ebenfalls herangezogen. Abbildung 68 zeigt die für ATP und UTP erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven im Calcium-Assay an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂. Die beiden Nukleotide erwiesen sich als äquipotent, die Kurven sind nicht signifikant verschieden voneinander.

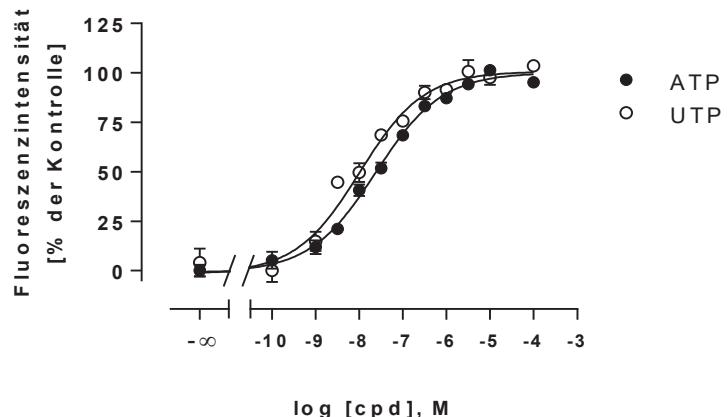


Abbildung 68: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP und UTP am P2Y₂-Rezeptor, rekombinant exprimiert in der Zelllinie 1321N1-P2Y₂. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP bzw. UTP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von vier unabhängigen Experimenten. Die EC₅₀ von ATP lag bei 25 nM und die EC₅₀ von UTP bei 10 nM.

Für ATP wurde ein pEC₅₀-Wert von 7,64 ± 0,05 (n = 3, EC₅₀ = 25 nM) und für UTP ein pEC₅₀-Wert von 7,99 ± 0,07 (n = 3, EC₅₀ = 10 nM) bestimmt.

Suramin als unselektiver P2Y₂-Rezeptor-Antagonist wurde in dem kombinatorischen Screening als Kontrolle eingesetzt. Dafür wurde als nächstes die notwendige Konzentration an Suramin für die beiden Zelllinien bestimmt.

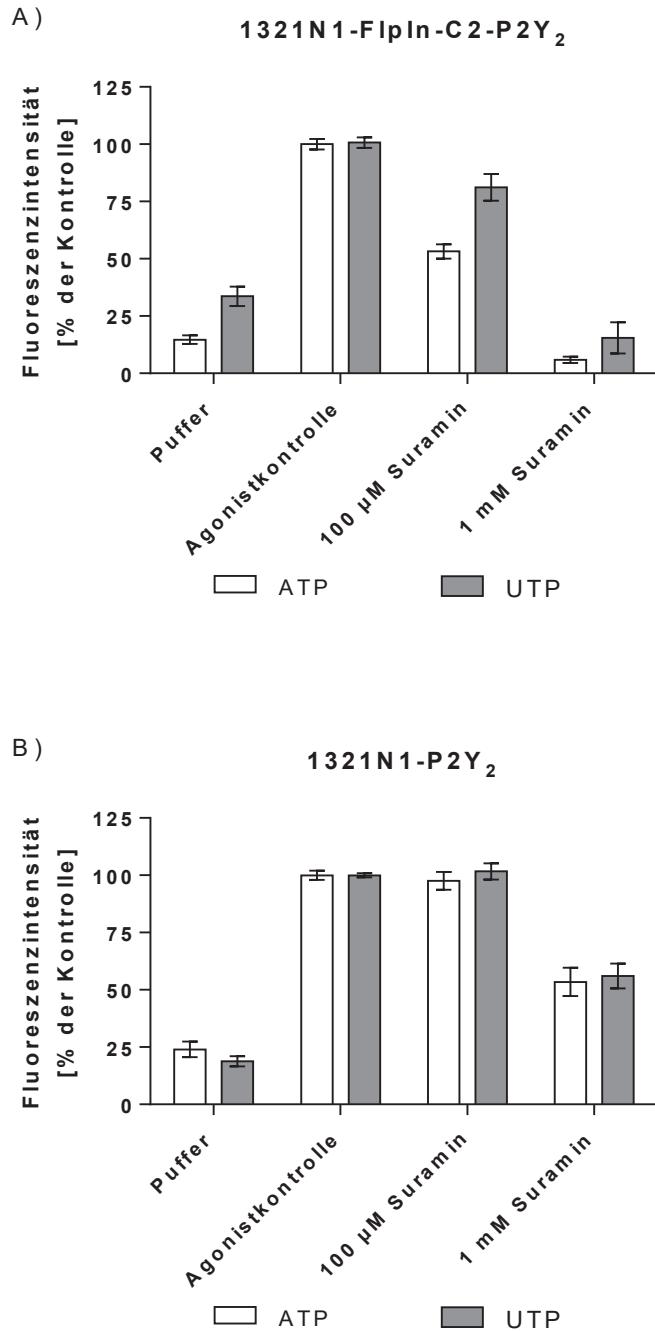


Abbildung 69: Inhibition des ATP- bzw. UTP-Signals durch Suramin an den Zelllinien 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ (A) und 1321N1-P2Y₂ (B). Die antagonistische Aktivität von Suramin, in Gegenwart von 280 nM ATP (weißer Balken) bzw. 2 nM UTP (grauer Balken) in (A) und 50 nM ATP (weißer Balken) bzw. 20 nM UTP (grauer Balken) in (B), wurde in den Konzentrationen 100 μM und 1 mM an den Zelllinien untersucht. Puffer und die beiden Nukleotide alleine injiziert dienten dabei jeweils als Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 69 wird gezeigt, welche Konzentrationen an Suramin einen Effekt haben. An der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ blockierte 100 μM Suramin das durch 280 nM induzierte ATP-Signal auf etwa 50% des ATP-Kontrolls und 1 mM Suramin das ATP-Signal vollständig (siehe Abbildung 69 A). Die durch 2 nM UTP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch

100 μ M Suramin auf etwa 75% des UTP-Kontrollssignals inhibiert. 1 mM Suramin blockierte das UTP-Signal vollständig (siehe Abbildung 69 A). An der Zelllinie 1321N-P2Y₂ waren 100 μ M Suramin weder in der Lage das durch 50 nM ATP-induzierte noch das durch 20 nM UTP-induzierte Calcium-Signal zu inhibieren (Abbildung 69 B). Lediglich Suramin in einer Konzentration von 1 mM zeigte antagonistische Effekte an dieser Zelllinie. Die Calcium-Antwort in der Zelle wurde durch 1 mM Suramin auf etwa 50% der durch den Agonisten ATP oder UTP alleine hervorgerufene maximale Zellantwort reduziert.

Für das anschließende kombinatorische Screening wurden beide Testsysteme verwendet und ATP als Standardagonist in der jeweiligen doppelten EC₅₀ eingesetzt. 1 mM Suramin fungierte als Kontrolle.

4.2.2 Ergebnis des kombinatorischen Grobscreenings

Nachstehend werden die Ergebnisse des kombinatorischen Grobscreenings erläutert. Das kombinatorische Screening und der Calcium-Assay wurden, wie in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.6.1 beschrieben, durchgeführt. Als Zellsystem wurde hier die Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ verwendet. Anhand eines ausgewählten Beispiels wird die genaue Auswertung der Daten und das weitere Vorgehen erklärt.

Die Zusammensetzung der acht Kombinationslösungen möglicher P2Y₂-Liganden sah dabei wie folgt aus:

Kombi A: NF266, NF267, NF268, NF269	Kombi B: NF270, NF271, NF272, NF273
Kombi C: NF274, NF275, NF276, NF277	Kombi D: NF278, NF280, NF281, NF282
Kombi E: NF266, NF270, NF274, NF278	Kombi F: NF267, NF271, NF275, NF280
Kombi G: NF268, NF272, NF276, NF281	Kombi H: NF269, NF273, NF277, NF282

In Abbildung 70 ist das Ergebnis des dazugehörigen Calcium-Assays gezeigt. Von Interesse waren die Kombinationslösungen, welche in der Lage waren, das ATP-induzierte Kontroll-Signal um mindestens 50% zu reduzieren (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 70). Zeigten zwei verschiedene Kombinationslösungen eine Reduzierung des Fluoreszenzsignals an der Zelllinie, welche ein und dieselbe NF-Substanz enthielten, so wurde diese spezielle NF-Substanz noch einmal einzeln im Calcium-Assay untersucht, siehe nachfolgendes Kapitel 4.2.3. Wurde das Fluoreszenzsignal in diesem Experiment durch die einzelne NF-Substanz ebenfalls reduziert, so war dies die Bestätigung dafür, dass diese spezielle NF-Substanz antagonistische Effekte gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor aufwies.

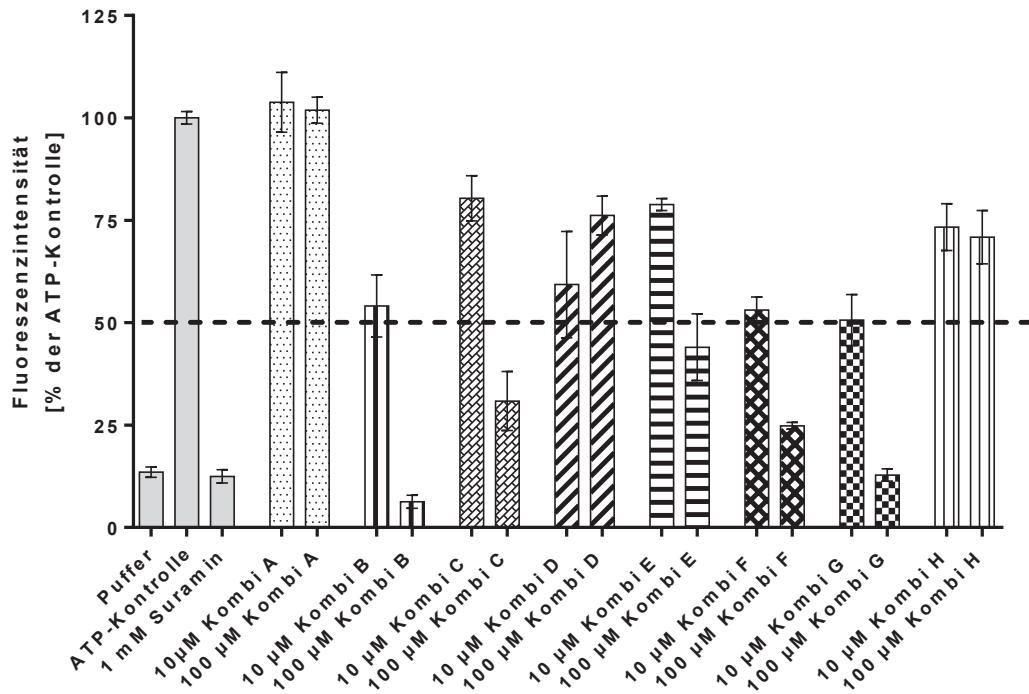


Abbildung 70: Ergebnis des kombinatorischen Grobscreenings für die Substanzen NF266 - NF282 ermittelt im Calcium-Assay. Verwendet wurde die Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit 280 nM ATP maximal erreichten Antwort. Gezeigt ist das Ergebnis eines exemplarischen, repräsentativen Calcium-Assays (Mittelwerte ± SEM).

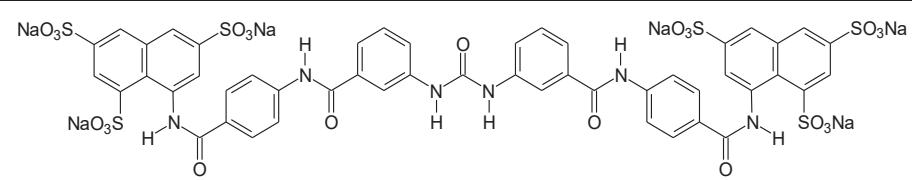
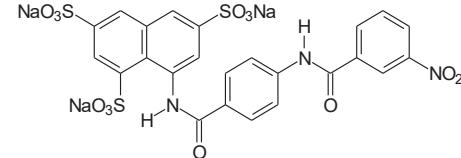
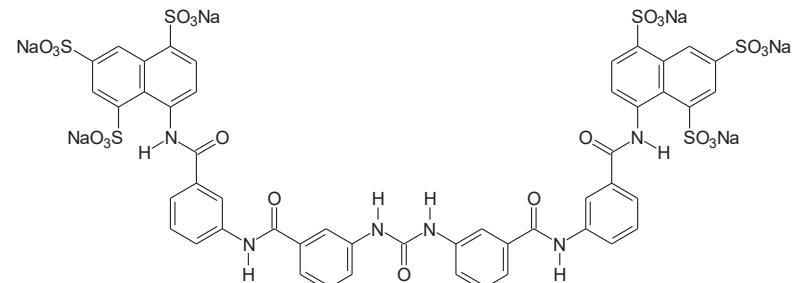
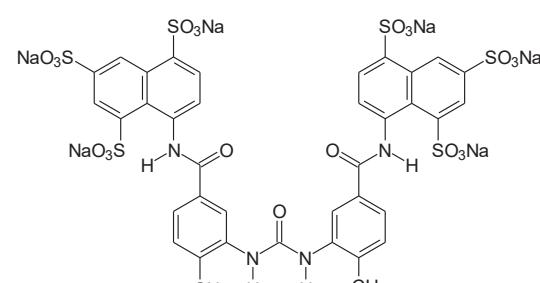
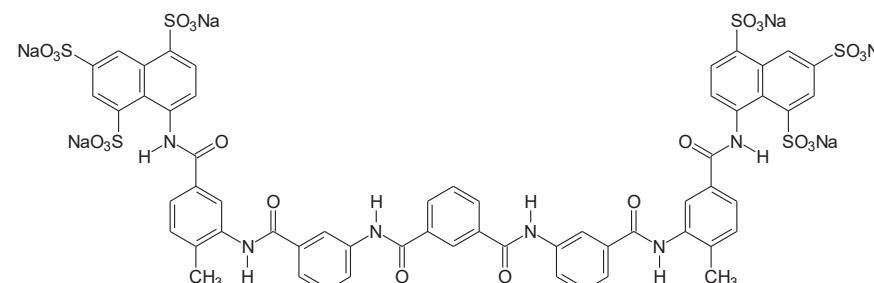
Durch die Kombinationslösung A wurde das ATP-induzierte Calcium-Signal in beiden eingesetzten Konzentrationen nicht blockiert. Die Substanzen NF266, NF267, NF268 und NF269 wiesen demnach keine antagonistischen Eigenschaften am P2Y₂-Rezeptor auf. Ähnliches galt für die Substanzen in den Kombinationslösungen D, E und H. Hier riefen die eingesetzten Konzentrationen Fluoreszenzsignale von $\geq 50\%$ des ATP-Kontrollssignals hervor, was darauf schließen ließ, dass auch die Substanzen NF270, NF273, NF274, NF277, NF278, NF280, NF281 und NF282 nicht als potente P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten reagierten. Diese zwölf genannten NF-Substanzen wurden aufgrund ihrer mangelnden antagonistischen Eigenschaften am P2Y₂-Rezeptor nicht weiter untersucht.

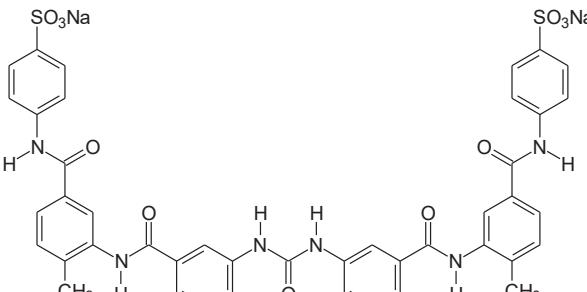
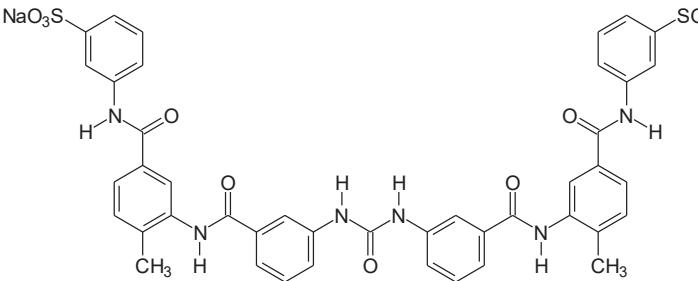
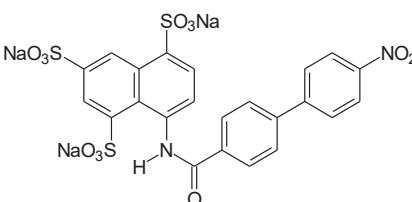
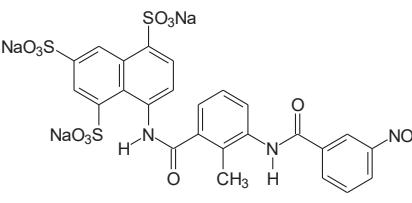
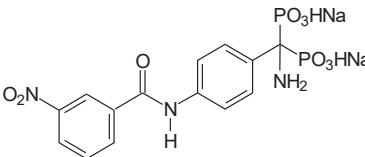
10 μM der Kombinationslösung B inhibierte das Kontroll-Signal um etwa 50%, 100 μM dieser Lösung inhibierte das Signal vollständig und rief eine vergleichbare Zellantwort hervor wie 1 mM Suramin (siehe Abbildung 70). Eine oder mehrere der vier enthaltenen Substanzen zeigten somit antagonistische Eigenschaften an diesem Rezeptorsubtyp. 10 μM bzw. 100 μM der Kombinationslösung C riefen eine Fluoreszenzintensität von etwa 75% bzw. 30% im Vergleich zur ATP-Kontrolle hervor. Folglich waren auch unter den hier enthaltenen Substanzen eine oder mehrere dabei, die als Antagonist an dem P2Y₂-Rezeptor wirkten. Die beiden Kombinati-

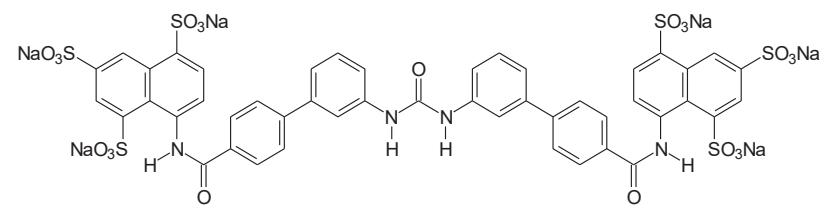
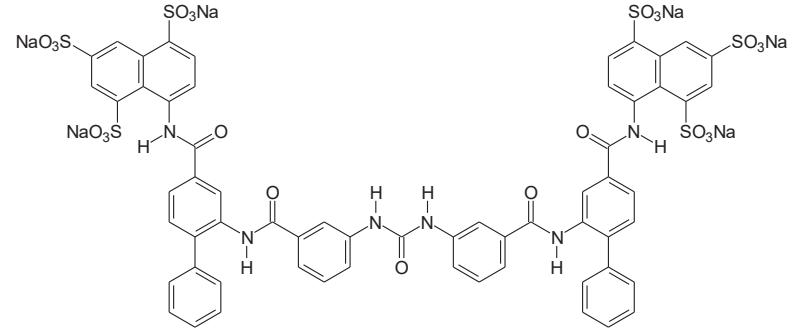
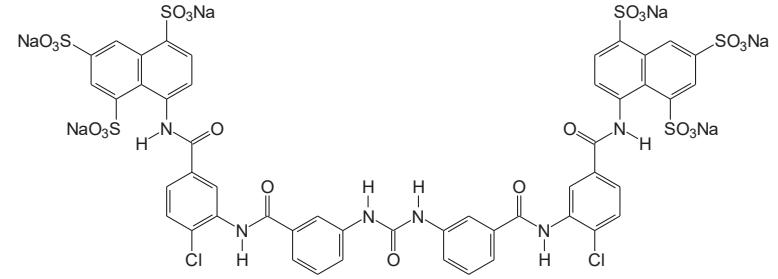
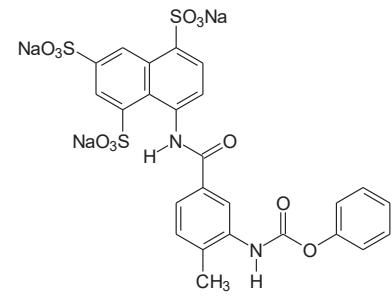
onslösungen F und G beeinflussten die Fluoreszenzintensitäten in gleicher Weise. Durch 10 µM der jeweiligen Lösung wurde das Signal auf etwa 50% des Kontroll-Signals reduziert. 100 µM der Kombinationslösung F inhibierte das ATP-Signal um 75%, 100 µM der Kombinationslösung G rief eine Zellantwort hervor, welche vergleichsweise ebenfalls durch 1 mM Suramin erzielt wurde. In beiden Fällen wurde die ATP-induzierte Fluoreszenz auf Pufferniveau reduziert. Nach dem Betrachten der Zusammensetzungen der Kombinationslösungen B, C, F und G fiel auf, dass die Substanzen NF271, NF272 und NF276 doppelt vorkamen und die beobachteten Effekte wahrscheinlich durch eine oder mehrere dieser Substanzen ausgelöst wurden. Die drei genannten Verbindungen wurden in einem weiteren Calcium-Assay einzeln auf ihre antagonistische Potenz hin am P2Y₂-Rezeptor untersucht, siehe nachfolgendes Kapitel 4.2.3. Gemäß dem oben gezeigten Beispiel wurden die Substanzen NF001 bis NF415 ebenfalls in einem kombinatorischen Screening untersucht. Die Resultate der einzelnen Calcium-Assays der so untersuchten NF-Substanzen sind in Anhang D abgebildet. Die folgenden 32 Substanzen wurden aufgrund der beobachteten Aktivität in den Kombinationslösungen noch einmal einzeln untersucht: NF018, NF032, NF033, NF037/2, NF058/3, NF059, NF062/2, NF078, NF099, NF104, NF164, NF192, NF198, NF258, NF271, NF272, NF276, NF292, NF293, NF341, NF342, NF357, NF358, NF382, NF392, NF393, NF404, NF407, NF408, NF411, NF412 und NF415 (siehe Tabelle 33).

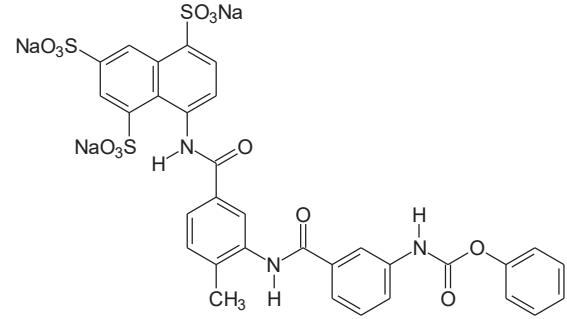
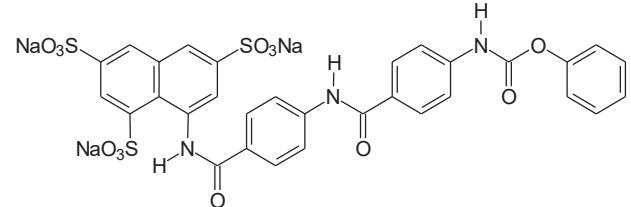
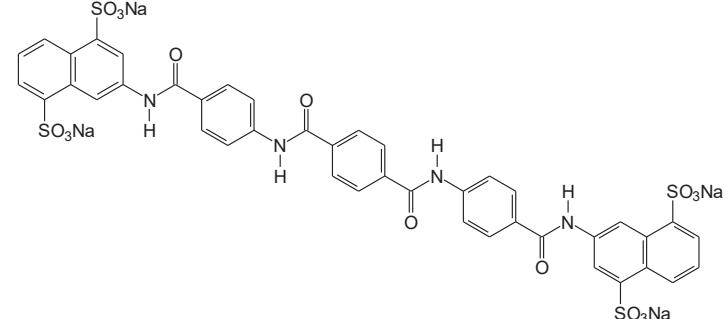
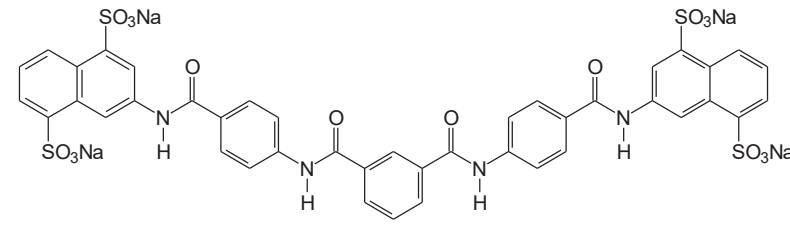
Tabelle 33: Strukturformeln der näher charakterisierten NF-Substanzen.

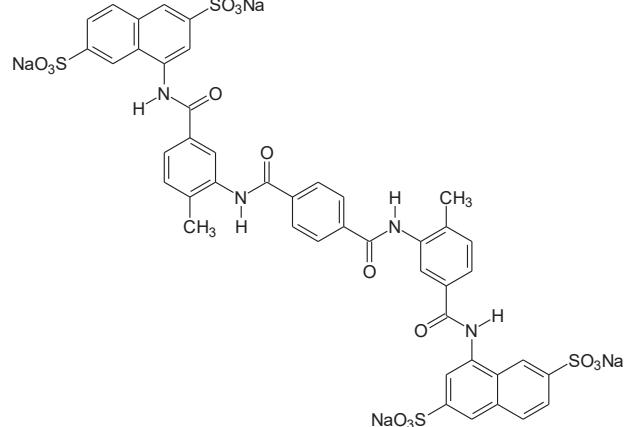
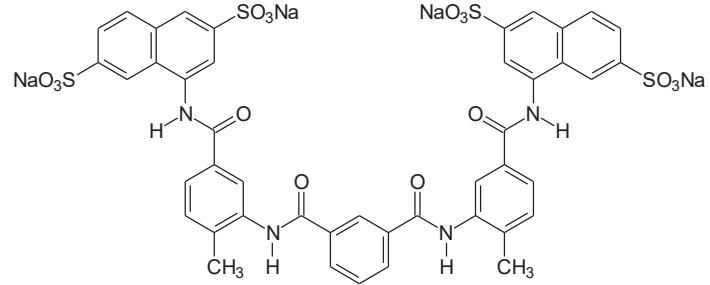
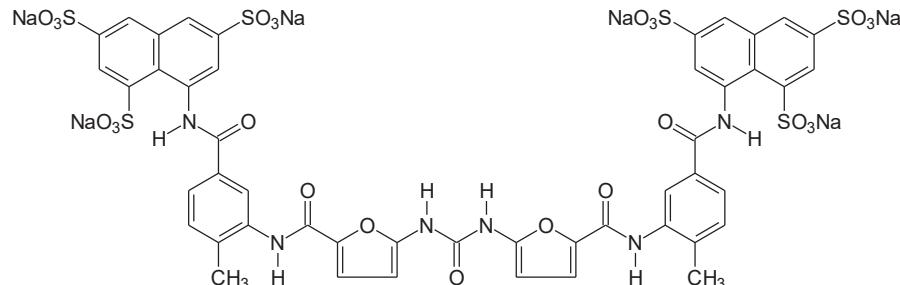
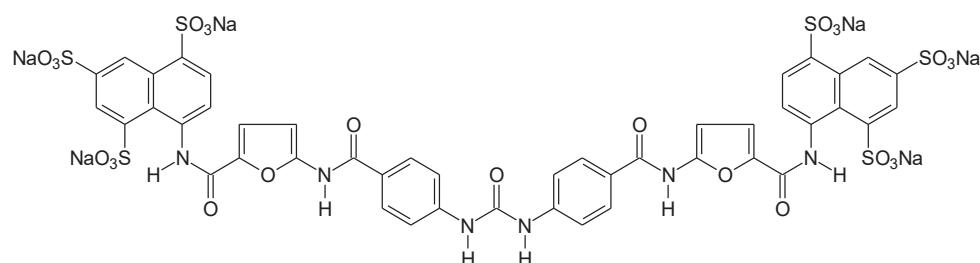
Suramin <p> $C_{51}H_{34}N_6O_{23}S_6Na_6$ $MG = 1429,15 \text{ g/mol}$ 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt </p>	NF018 <p> $C_{24}H_{14}N_3O_{13}S_3Na_3$ $MG = 717,53 \text{ g/mol}$ 8-(3-(3-Nitrobenzamido)benzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt </p>
---	---

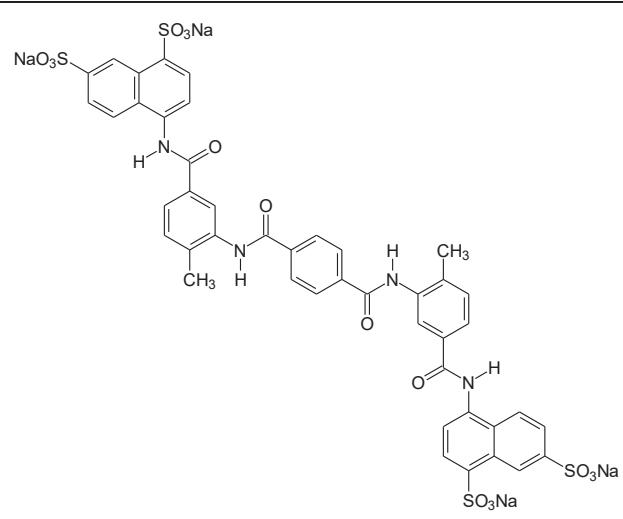
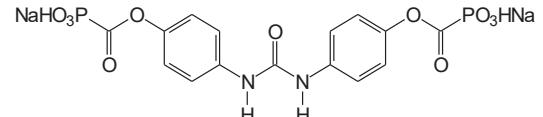
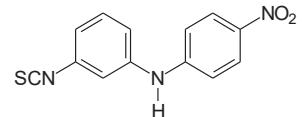
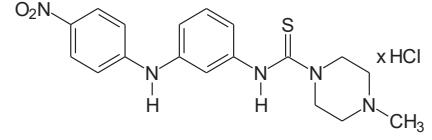
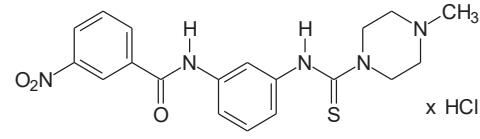
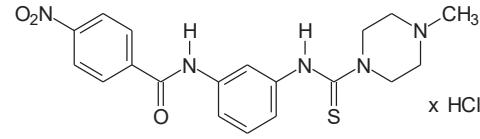
NF032	 <p>$C_{49}H_{30}N_6O_{23}S_6Na_6$ MG = 1401,10 g/mol 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino))bis(naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>
NF033	 <p>$C_{24}H_{14}N_3O_{13}S_3Na_3$ MG = 717,53g/mol 8-(4-(3-Nitrobenzamido)benzamido)-naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt</p>
NF037/2	 <p>$C_{49}H_{30}N_6O_{23}S_6Na_6$ MG = 1401,1 g/mol 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-phenylenecarbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>
NF058/3	 <p>$C_{37}H_{24}N_4O_{21}S_6Na_6$ MG = 1190,91 g/mol 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methylphenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>
NF059	 <p>$C_{58}H_{40}N_6O_{24}S_6Na_6$ MG = 1533,26 g/mol 8,8'-(Isophthaloylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methylphenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>

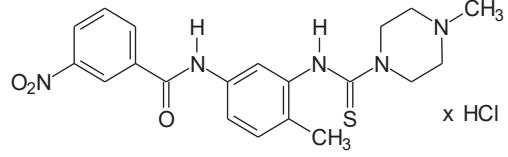
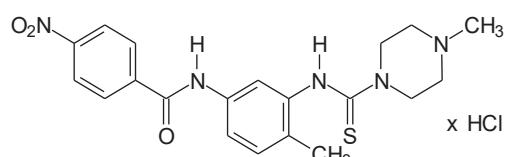
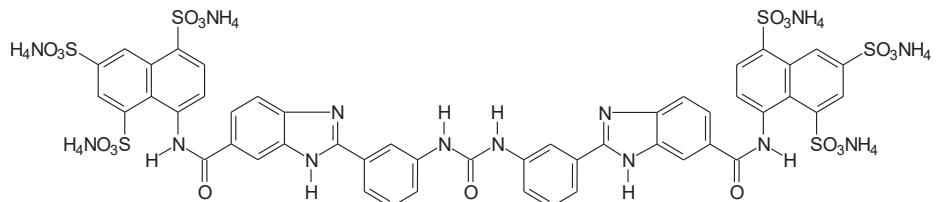
NF062/2	 <p>$C_{43}H_{34}N_6O_{11}S_2Na_2$ (MG = 920,87g/mol) 4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene)carbonylimino)-bis(benzenesulfonic acid) disodium salt</p>
NF078	 <p>$C_{43}H_{34}N_6O_{11}Na_2S_2$ (MG = 920,87g/mol) 3,3'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene)carbonylimino)-bis(benzenesulfonic acid) disodium salt</p>
NF099	 <p>$C_{23}H_{13}N_2O_{12}S_3Na_3$ (MG = 674,51 g/mol) 8-(4-(4-Nitrophenyl)benzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt</p>
NF104	 <p>$C_{25}H_{16}N_3O_{13}S_3Na_3$ (MG = 731,56g/mol) 8-(2-Methyl-3-(3-nitrobenzamido)-benzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt</p>
NF164	 <p>$C_{14}H_{13}N_3O_9P_2Na_2$ (MG = 475,19g/mol) ((3-Nitrobenzamido)phenyl)-aminomethane-1,1-diphosphonic acid disodium salt</p>

NF192	 <p> $C_{47}H_{28}N_4O_{21}S_6Na_6$ $MG = 1315,05 \text{ g/mol}$ 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,4'-biphenylenecarbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt </p>
NF198	 <p> $C_{61}H_{38}N_6O_{23}S_6Na_6$ $MG = 15533,29 \text{ g/mol}$ 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-phenyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt </p>
NF258	 <p> $C_{49}H_{28}Cl_2N_6O_{23}S_6Na_6$ $MG = 1469,99 \text{ g/mol}$ 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-chlorophenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt </p>
NF271	 <p> $C_{25}H_{17}N_2O_{12}S_3Na_3$ $MG = 702,56 \text{ g/mol}$ 8-(4-Methyl-3-phenoxy carbonylimino-benzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt </p>

NF272	 <p> $C_{32}H_{22}N_3O_{15}S_3Na_3$ $MG = 821,68 \text{ g/mol}$ 8-(4-Methyl-3-(3-phenoxy carbonylimino-benzamido)benzamido)-naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid trisodium salt </p>
NF276	 <p> $C_{31}H_{20}N_3O_{13}S_3Na_3$ $MG = 807,66 \text{ g/mol}$ 8-(4-Phenoxy carbonylimino-benzamido)-naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt </p>
NF292	 <p> $C_{42}H_{26}N_4O_{16}S_4Na_4$ $MG = 1062,88 \text{ g/mol}$ 3,3'-(Terephthaloyl bis(imino-4,1-phenylene carbonylimino)) bis(naphthalene-1,5-disulfonic acid) tetrasodium salt </p>
NF293	 <p> $C_{42}H_{26}N_4O_{16}S_4Na_4$ $MG = 1062,88 \text{ g/mol}$ 3,3'-(Isophthaloyl bis(imino-4,1-phenylene carbonylimino)) bis(naphthalene-1,5-disulfonic acid) tetrasodium salt </p>

NF341	 <p>$C_{44}H_{30}N_4O_{16}S_4 Na_4$ MG = 1090,93 g/mol 4,4'-(Terephthaloyl bis(imino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-2,6-disulfonic acid) tetrasodium salt</p>
NF342	 <p>$C_{44}H_{30}N_4O_{16}S_4 Na_4$ MG = 1090,93 g/mol 4,4'-(Isophthaloyl bis(imino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-2,6-disulfonic acid) tetrasodium salt</p>
NF357	 <p>$C_{47}H_{30}N_6O_{25}S_6 Na_6$ MG = 1409,07 g/mol 8,8'-(Carbonyl bis(imino-5,2-furanylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>
NF358	 <p>$C_{45}H_{26}N_6O_{25}S_6 Na_6$ MG = 1381,02 g/mol 8,8'-(Carbonyl bis(imino-4,1-phenylene-carbonylimino-5,2-furanylene-carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexasodium salt</p>

NF382	 <p> $C_{44}H_{30}N_4O_{16}S_4Na_4$ MG = 1090,93 g/mol 4,4'-(Terephthaloylbis(imino-3,1-(4-methyl-phenylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,7-disulfonic acid) tetrasodium salt </p>
NF392	 <p> $C_{15}H_{12}N_2O_{11}P_2Na_2$ MG = 504,19 g/mol P,P'-(Carbonylbis(imino-4,1-phenylene-oxycarbonyl))-bis(phosphonic acid) disodium salt </p>
NF393	 <p> $C_{13}H_9N_3O_2S$ MG = 271,29 g/mol 4-(4-Nitroanilino)phenylisothiocyanate </p>
NF404	 <p> $C_{18}H_{22}ClN_5O_2S$ MG = 407,9 g/mol N-((4-Methyl-1-piperazinyl)-thiocarbonyl)-N'-(4-nitrophenyl)-1,3-phenylenediamine mono-hydrochloride </p>
NF407	 <p> $C_{19}H_{22}ClN_5O_3S$ MG = 435,97 g/mol N-((4-Methyl-1-piperazinyl)-thiocarbonyl)-N'-(3-nitrobenzamido)-1,3-phenylenediamine mono-hydrochloride </p>
NF408	 <p> $C_{19}H_{22}ClN_5O_3S$ MG = 435,97 g/mol N-((4-Methyl-1-piperazinyl)-thiocarbonyl)-N'-(4-nitrobenzamido)-1,3-phenylenediamine mono-hydrochloride </p>

NF411	 <p>$C_{20}H_{24}ClN_5O_3S$ MG = 444,9 g/mol N-((4-Methyl-1-piperazinyl)-thiocarbonyl)-N'-(3-nitrobenzamido)-4-methyl-1,3-phenylenediamine monohydrochloride</p>
NF412	 <p>$C_{20}H_{24}ClN_5O_3S$ MG = 444,9 g/mol 4-Methyl-N-((4-methyl-1-piperazinyl)-thiocarbonyl)-N'-(4-nitrobenzamido)-1,3-phenylenediamine monohydrochloride</p>
NF415	 <p>$C_{49}H_{52}N_{14}O_{21}S_6$ MG = 1365,39 g/mol 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene-(2,5-benzimidazolylene)carbonylimino))bis(naphthalene-1,3,5-trisulfonic acid) hexaammonium salt</p>

Der schematische Aufbau der NF-Substanzen einschließlich möglicher Variationen ist in der nachstehenden Abbildung 71 gezeigt.

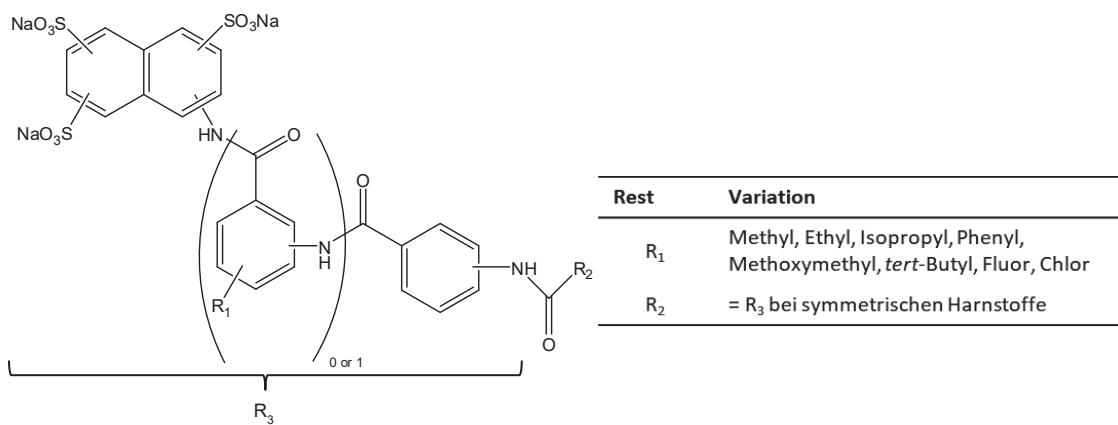


Abbildung 71: Chemisches Grundgerüst der NF-Substanzen mit den möglichen Variationen.

Unter diesen 32 Verbindungen befanden sich elf verschiedene Nitrovorstufen: NF018, NF033, NF099, NF104, NF164, NF393, NF404, NF407, NF408, NF411 und NF412.

Weiter waren elf Endstufen vom Typ „großer Harnstoff“ (NF032, NF037, NF059, NF062, NF078, NF192, NF198, NF258, NF357, NF358 und NF415) darunter zu finden. Diese wiesen unter ande-

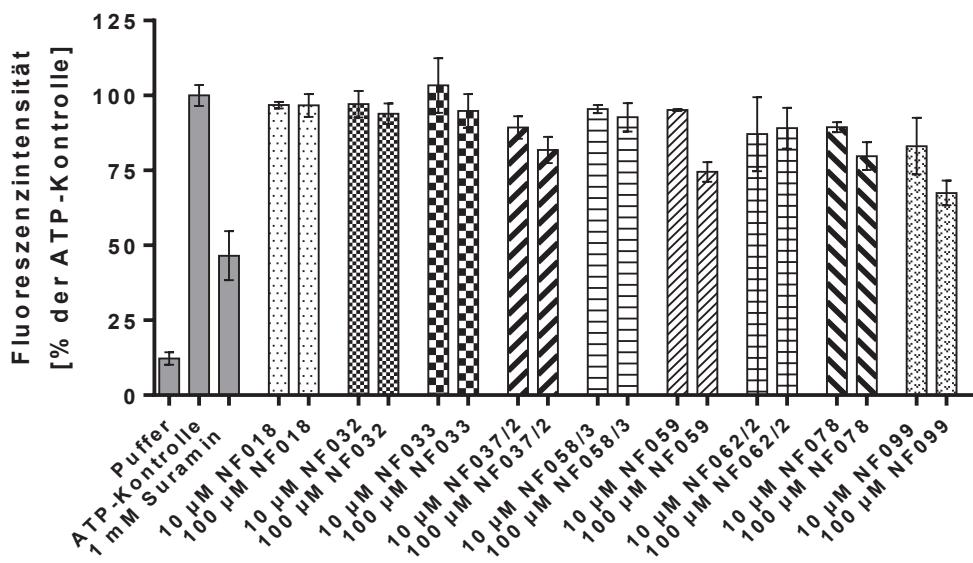
rem Variationen in der Anordnung und der Position der Sulfonsäuren am Naphthylring (NF032, NF293 und NF357) bzw. Variationen des Naphthylsulfonsäure-Substituenten auf (NF062 und NF078). Variationen des Methylsubstituenten an der zweiten Benzamidgruppe (NF037, NF198 und NF258) oder auch Variationen der einzelnen Strukturelemente (NF192, NF357, NF358 und NF415) sowie Variationen des Verknüpfungsmusters, meta- statt para-Verknüpfung der Grundstruktur (NF032) bzw. der Ersatz der zentralen Harnstoffbrücke durch eine Isophthalsäurebisamidbrücke (NF059) waren darunter zu finden. Des Weiteren waren ebenfalls sieben Endstufen vom Typ „kleiner Harnstoff“ (NF058, NF292, NF293, NF341, NF342, NF382 und NF392) zu finden. Auch hier ließen sich verschiedenste Variationen beobachten, wie beispielsweise in der Anordnung und der Position der Sulfonsäuren am Naphthylring (NF292, NF293, NF341, NF342 und NF382) bzw. Variationen des Naphthylsulfonsäure-Substituenten (NF392). Außerdem wurde auch hier teilweise wieder die zentrale Harnstoffbrücke durch eine Isophthalsäurebisamid- (NF293 und NF342) oder eine Terephthalsäurebisamidbrücke (NF292, NF341 und NF382) ersetzt. Drei Verbindungen wiesen anstatt des symmetrischen Aufbaus des Grundgerüsts eine Carbamatstruktur auf: NF271, NF272 und NF276. NF276 zeigte darüber hinaus ebenso eine veränderte Anordnung der Sulfonsäuren am Naphthylring.

4.2.3 Ergebnis des Einzelsubstanz-Screenings

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Substanzen, welche im kombinatorischen Screening als potentielle Antagonisten identifiziert wurden, aufgeführt. Die bereits oben aufgeführten NF-Verbindungen wurden dazu jeweils einzeln in den Konzentrationen 10 μM bzw. 100 μM auf ihre antagonistische Aktivität im Zellsystem 1321N1-P2Y₂ untersucht. Das Testsystem wurde an dieser Stelle gewechselt, weil die in dieser Arbeit etablierte P2Y₂-Rezeptor-exprimierende Zelllinie (1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂) eine deutlich höhere Potenz für UTP als für ATP aufwies, siehe Kapitel 4.1.3.2. Da die beiden Agonisten in der Literatur als vergleichsweise äquipotent beschrieben werden (4,5,36,143), wurde entschieden, ab der Einzelcharakterisierung der möglichen P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten auf die bereits von S. Meis etablierte Zelllinie zurückzugreifen (98), da hier ATP und UTP ein vergleichsweise äquipotentes Verhalten gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor aufwiesen. Auch hier wurde wieder ATP in der doppelten EC₅₀ als Standardagonist verwendet.

Wie anhand Abbildung 72 A zu erkennen ist, wurde das ATP-induzierte Calcium-Signal durch die Substanzen NF018, NF032, NF033, NF037/2, NF058/3 NF062 und NF078 nicht inhibiert.

A)



B)

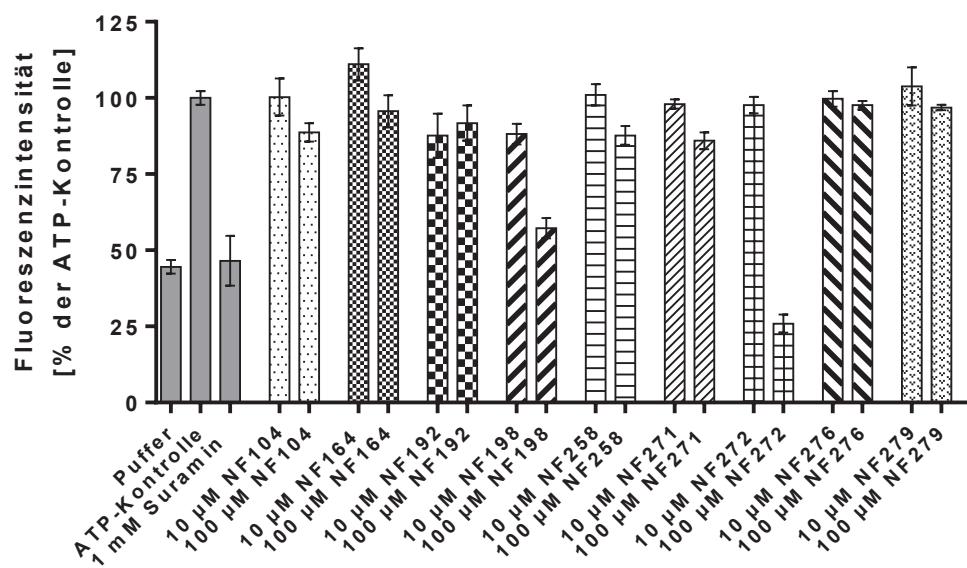
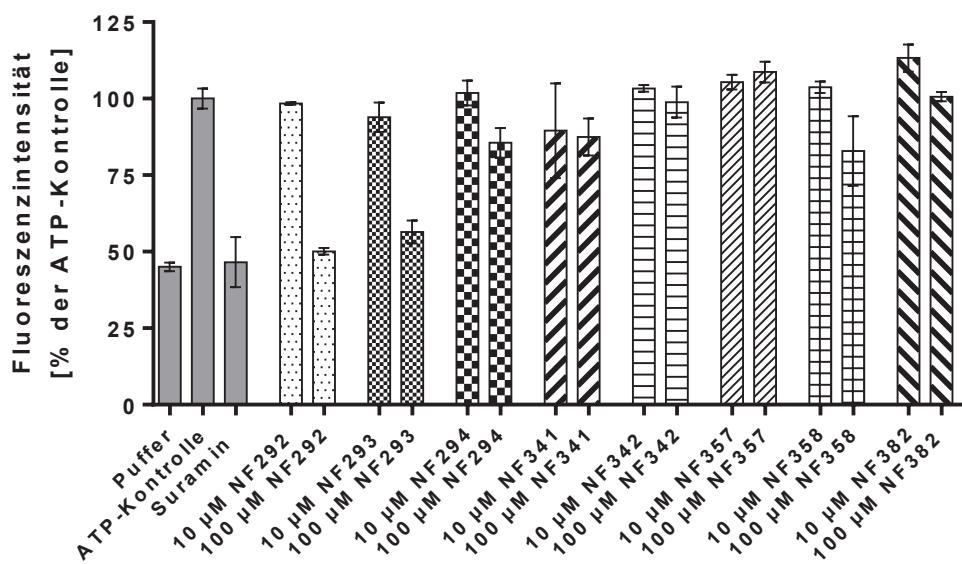


Abbildung 72: Ergebnisse der Einzelscreenings der NF-Substanzen im Calcium-Assay im Antagonist-Modus. Verwendet wurde die Zelllinie 1321N1-P2Y₂. A) zeigt die Verbindungen NF018, NF032, NF033, NF037/2, NF058/3, NF059, NF062/2, NF078, NF099 und B) NF104, NF164, NF192, NF198, NF258, NF271, NF272, NF276, NF279. 50 nM ATP wurde dabei als Standardagonist verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

C)



D)

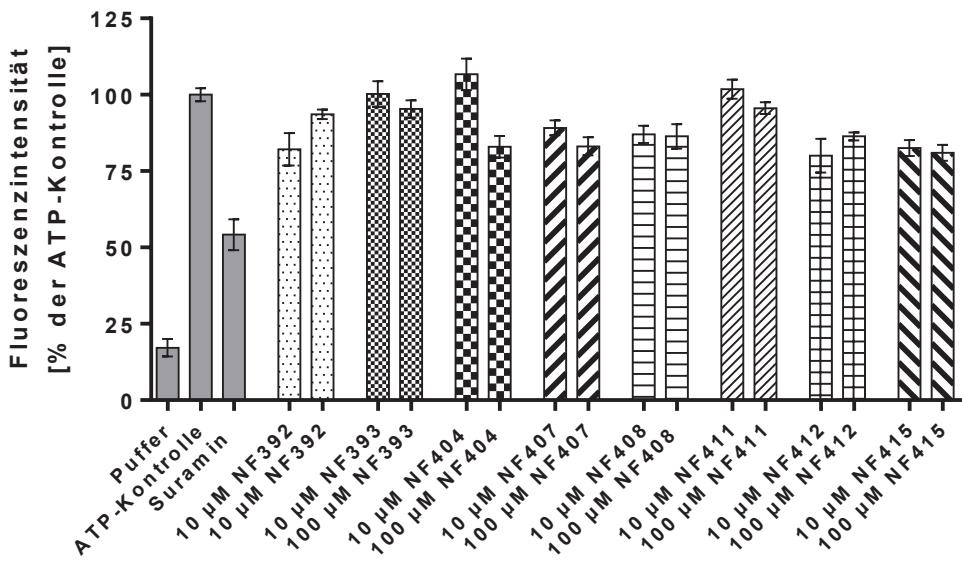


Abbildung 72: Ergebnisse der Einzelscreenings der NF-Substanzen im Calcium-Assay im Antagonist-Modus. Verwendet wurde die Zelllinie 1321N1-P2Y₂. C) zeigt die Verbindungen NF292, NF293, NF294, NF341, NF0342, NF357, NF358, NF382 und D) NF392, NF393, NF404, NF407, NF408, NF411, NF412, NF415. 50 nM ATP wurde dabei als Standardagonist verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

Alleine NF059 und NF099 zeigten in der eingesetzten Konzentration von 100 μM eine Inhibition des ATP-Signals um etwa 25%. Daher wurden nur NF059 und NF099 weiter untersucht.

Abbildung 72 B zeigt, dass die Verbindungen NF104, NF164, NF192, NF258, NF271, NF276 und NF279 wenig bis keine antagonistische Potenz aufwiesen. Demgegenüber war für NF198 und

NF272 eine Inhibition des ATP-induzierten Fluoreszenzsignals um etwa 50% zu beobachten. Ebenso zeigten die Verbindungen NF292 und NF293, dass sie das ATP-Kontroll-Signal in der Konzentration von 100 μ M deutlich blockierten, siehe Abbildung 72 C. NF294, NF341, NF342, NF357, NF358 und N382 wurden aufgrund mangelnder antagonistischer Potenz nicht weiter untersucht. Die acht Substanzen, welche in Abbildung D untersucht wurden, zeigten maximal eine Inhibition des ATP-induzierten Fluoreszenzsignals von < 25% und wurde daher nicht weiter untersucht.

Nach Auswertung der im Antagonist-Modus erhobenen Daten wurden die drei potentesten P2Y₂-Antagonisten NF198, NF272 und NF292 näher charakterisiert und Konzentrations-Inhibitions-Kurven erstellt (siehe Abbildung 73). Die IC₅₀- und die jeweiligen pIC₅₀-Werte wurden bestimmt und daraus K_i bzw. pK_i-Werte berechnet.

Wie anhand Abbildung 73 zu erkennen ist, wurde das ATP-induzierte Calcium-Signal in den P2Y₂-Rezeptor-exprimierenden Zellen durch den jeweils eingesetzten Antagonisten (NF198, NF272, NF292 bzw. Suramin) konzentrationsabhängig inhibiert. Für NF198 wurde ein pIC₅₀-Wert von $4,20 \pm 0,05$ mit einem daraus berechneten pK_i-Wert (siehe Formel 10) von 4,67 (K_i = 21 μ M) bestimmt.

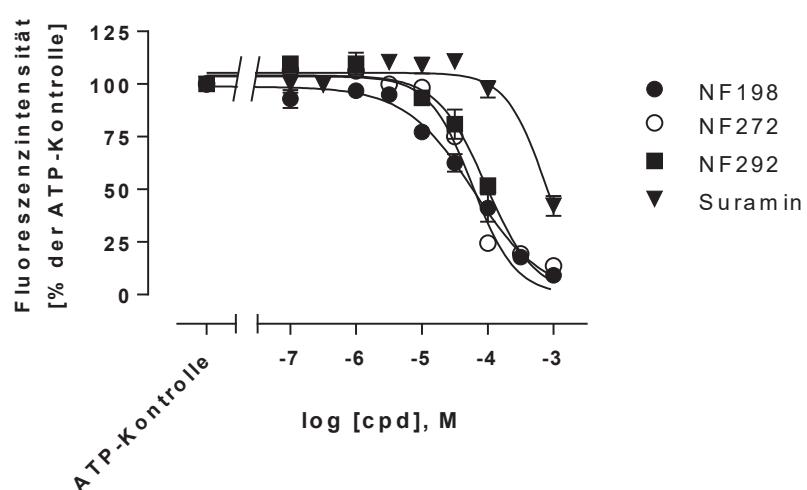


Abbildung 73: Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF198, NF272, NF292 und Suramin an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂. Die durch 50 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch NF198, NF272, NF292 und Suramin konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tabelle 34: Inhibitorische Potenz der Suramin-Derivate bestimmt im Calcium-Assay für den P2Y₂-Rezeptor, welcher rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen vorlag (1321N1-P2Y₂). Gezeigt sind die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten und die daraus berechneten K_i und pK_i-Werte.

	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ \pm SEM	K _i [μM]	pK _i
NF198	63	4,20 \pm 0,05	21	4,67
NF272	58	4,23 \pm 0,04	19	4,72
NF292	96	4,03 \pm 0,05	32	4,49
Suramin	796	3,10 \pm 0,08	265	3,57

NF272 wies einen pIC₅₀-Wert von $4,23 \pm 0,04$ mit einem daraus berechneten pK_i-Wert von 4,72 (K_i = 19 μM) auf. Für NF292 konnte ein pIC₅₀-Wert von $4,03 \pm 0,05$ mit einem pK_i-Wert von 4,49 (K_i = 32 μM) ermittelt werden, siehe Tabelle 34. Demgegenüber wurde für Suramin nur ein pIC₅₀-Wert von $3,10 \pm 0,08$ mit einem resultierenden pK_i-Wert von 3,57 (K_i = 265 μM) bestimmt. Die drei getesteten Antagonisten waren somit alle deutlich potenter als Suramin an diesem P2Y-Rezeptorsubtyp. NF198 erwies sich am P2Y₂-Rezeptor als 12-fach, NF272 als 14-fach und NF292 als 8-fach potenter als Suramin. siehe Tabelle 34.

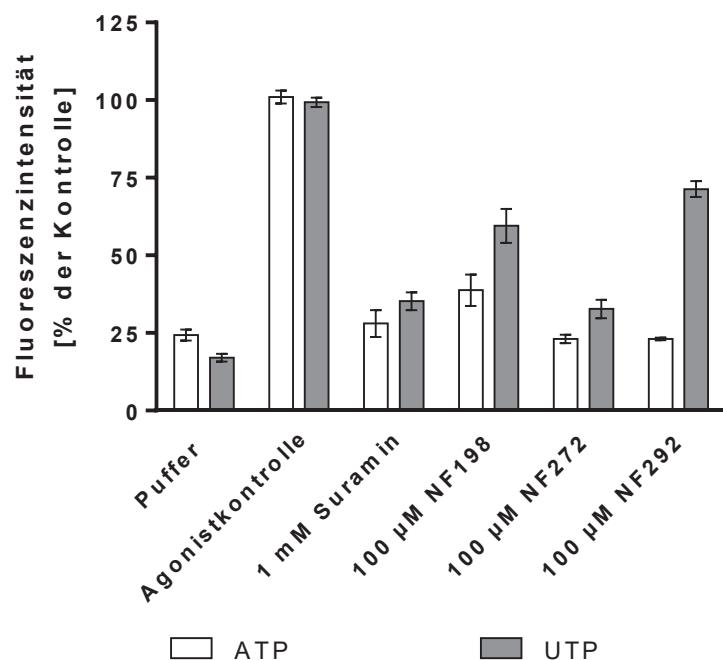


Abbildung 74: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198, NF272 und NF292 im Calcium-Assay an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂. Als Standardagonist wurde entweder 50 nM ATP (weißer Balken) oder 20 nM UTP (grauer Balken) verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP- bzw. UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob NF198, NF272 und NF292 neben dem ATP- auch das UTP-induzierte Calcium-Signal inhibierten. Abbildung 74 zeigt, dass Suramin und NF272 das ATP-induzierte Kontroll-Signal im gleichen Rahmen wie das UTP-induzierte Fluoreszenz-Signal in den Zellen blockieren. Suramin und auch NF272 zeigten hier eine Inhibition um etwa 70% - 75%. Nur für NF198 und NF292 ließen sich Unterschiede feststellen. 100 µM NF198 wies eine Reduktion des ATP-Signals um 60% auf, wohingegen das UTP-Signal um weniger als 50% reduziert wurde. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch NF292. Das ATP-induzierte Kontroll-Signal wurde auf Pufferniveau blockiert, das UTP-Signal allerdings nur um 25% reduziert. Für diese Substanz wurde somit die größte Diskrepanz hinsichtlich ihrer antagonistischen Potenz je nach gewähltem Agonisten beobachtet.

Aufgrund dieser Daten wurde entschieden nur die beiden Antagonisten NF198, als phenylsubstituiertes Suramin-Derivat, und NF272, als unsymmetrisches Suramin-Derivat, im nativen Zellsystem weiter zu testen. Zum einen erwies sich NF292 im rekombinanten Zellsystem als etwa zweifach weniger potent als NF198 bzw. NF272 und zum anderen war NF292 nicht in der Lage das UTP-induzierte Calcium-Signal im gleichen Ausmaß wie das ATP-induzierte Calcium-Signal zu inhibieren.

4.2.4 Testung von NF198 und NF272 in den nativen Zellsystemen HEY und OVCAR-3

Um zu überprüfen, ob die beiden zuvor identifizierten Antagonisten NF198 und NF272 den P2Y₂-Rezeptor auch in Zellsystemen mit nativ exprimierten P2Y₂-Rezeptoren blockierten, wurden die Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 herangezogen (66,67,144–146). Im Rahmen dieser Arbeit wurden aber auch eigene Daten zur Expression des P2Y₂-Rezeptors in diesen Zelllinien erstellt. Die Expression des P2Y₂-Rezeptors wurde auf mRNA-Ebene in der jeweiligen Zelllinie, siehe Kapitel 4.3.1, entsprechend nachgewiesen und die funktionelle Integrität des P2Y₂-Rezeptors wurde mittels Calcium-Assay, siehe Kapitel 4.3.2, bestätigt.

In einem ersten Vorversuch, siehe Abbildung 75, wurde die inhibitorische Potenz von Suramin, NF198 und NF272 gegenüber den Agonisten ATP und UTP an HEY-Zellen bestimmt. 100 µM Suramin blockierte sowohl das ATP- als auch das UTP-induzierte Calcium-Signal in den Zellen auf etwa 40% des Kontroll-Signals. Die beiden NF-Substanzen NF198 und NF272 inhibierten in der eingesetzten Konzentration von 100 µM das Fluoreszenz-Signal auf etwa 25% des ATP- bzw. des UTP-induzierten Kontroll-Signals und erreichten damit das Pufferniveau. Die Konzentrations-Inhibition-Kurven von Suramin, NF198 und NF272 sind in Abbildung 76 gezeigt.

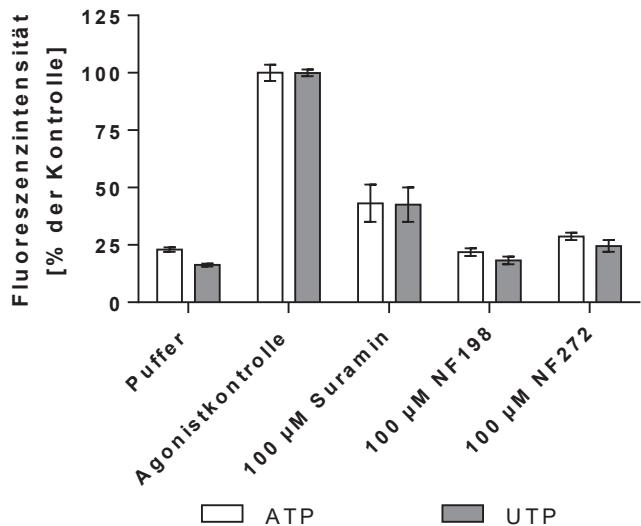


Abbildung 75: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198 und NF272 im Calcium-Assay an der Zelllinie HEY. Als Standardagonist wurde entweder 200 nM ATP (weißer Balken) oder 150 nM UTP (grauer Balken) verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP- bzw. UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

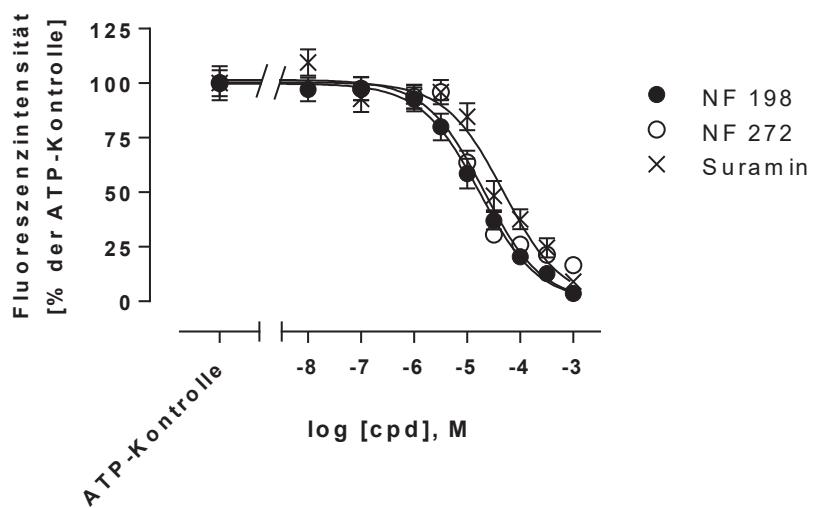


Abbildung 76: Konzentrations-Inhibition-Kurven von NF198, NF272 und Suramin an der Zelllinie HEY. Die durch 200 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch die Antagonisten NF198, NF272 und Suramin konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Die drei Antagonisten inhibierten die durch 200 nM ATP hervorgerufenen Calcium-Antworten in der Zelle konzentrationsabhängig. Dabei erwiesen sich NF198 und NF272 als etwa äquipotent. Für NF198 wurde ein pIC_{50} -Wert von $4,77 \pm 0,07$ und für NF272 ein pIC_{50} -Wert von $4,69 \pm$

0,07 (bestimmt, siehe Tabelle 35. Die apparenten pK_i -Werte wurden dabei wie folgt errechnet: NF198: $pK_i = 5,25$ und NF272: $pK_i = 5,18$.

Tabelle 35: Inhibitorische Potenz der Suramin-Derivate bestimmt im Calcium-Assay für den P2Y₂-Rezeptor, welcher nativ in HEY-Zellen exprimiert war. Gezeigt sind die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten und die daraus berechneten K_i und pK_i -Werte.

	IC_{50} [μM]	$pIC_{50} \pm$ SEM	K_i [μM]	pK_i
NF198	17	$4,77 \pm 0,07$	5,60	5,25
NF272	20	$4,69 \pm 0,07$	6,70	5,18
Suramin	48	$4,32 \pm 0,08$	15,8	4,80

Suramin wies hier einen pIC_{50} -Wert von $4,32 \pm 0,08$ mit einem daraus berechneten pK_i -Wert von 4,80 auf. Suramin zeigte in diesem nativen Zellsystem eine deutlich größere inhibitorische Potenz am P2Y₂-Rezeptor mit einer IC_{50} von 48 μM als im rekombinanten Zellsystem 1321N1-P2Y₂. Hier lag die IC_{50} bei 796 μM (siehe Tabelle 34). Somit war Suramin im HEY-Testsystem etwa 15-fach potenter als im rekombinanten Testsystem. Die IC_{50} -Werte von NF198 und NF272 lagen in beiden Zellsystem in einem vergleichbaren Rahmen. Im rekombinanten Zellsystem wurde für NF198 eine IC_{50} von 63 μM (siehe Tabelle 34) und im nativen Zellsystem von 17 μM (Tabelle 35) bestimmt. Für NF272 stellten sich die IC_{50} -Werte wie folgt dar, HEY: $IC_{50} = 20 \mu M$ und 1321N1-P2Y₂: $IC_{50} = 58 \mu M$ (siehe Tabelle 34 und Tabelle 35). Die beiden Antagonisten NF198 und NF272 inhibierten somit auch im Zellsystem HEY den nativ exprimierten P2Y₂-Rezeptor.

Die oben beschriebenen Versuche wurden für NF198, NF272 und Suramin parallel auch an der Zelllinie OVACR-3 durchgeführt. Hier wurde zunächst die inhibitorische Potenz von Suramin und den beiden NF-Verbindungen in Abhängigkeit vom eingesetzten Standardagonisten ATP oder UTP bestimmt, siehe Abbildung 77. 100 μM Suramin blockierte sowohl das ATP- als auch das UTP-induzierte Calcium-Signal in den OVCAR-3-Zellen auf etwa 65% des ATP- bzw. auf etwa 60% des UTP-Kontroll-Signals. 100 μM NF198 inhibierte das Fluoreszenz-Signal auf etwa 30% des ATP- bzw. auf 20% des UTP-induzierten Kontroll-Signals und 100 μM NF272 inhibierte das Calcium-Signal des jeweiligen Standardagonisten in beiden Fällen auf < 25% des jeweiligen Kontroll-Signals. Das Fluoreszenzniveau, welches durch die Injektion von Puffer alleine hervorgerufen wurde, wurde nur durch 100 μM NF272 in Gegenwart von ATP erreicht. Die anderen drei getesteten Kombinationen unterschieden sich deutlich vom Referenz-Puffer-Signal. Die Konzentrations-Inhibitions-Kurven von Suramin und NF272 an der Zelllinie OVCAR-3, in Gegenwart von ATP als Standardagonist, sind in Abbildung 78 gezeigt. Entsprechende Daten für NF198 wurden an dieser Stelle nicht erhoben. Suramin und auch NF272 inhibierten das ATP-induzierte Calcium-Signal in den Zellen konzentrationsabhängig.

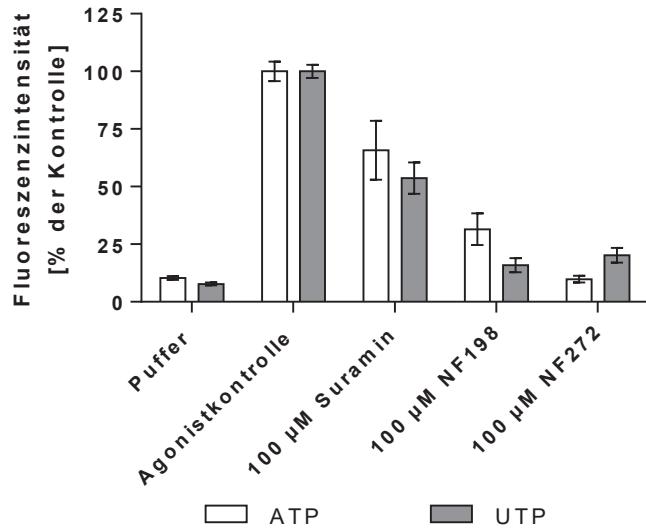


Abbildung 77: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Suramin, NF198 und NF272 im Calcium-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. Als Standardagonist wurde entweder 200 nM ATP (weißer Balken) oder 80 nM UTP (grauer Balken) verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP- bzw. UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

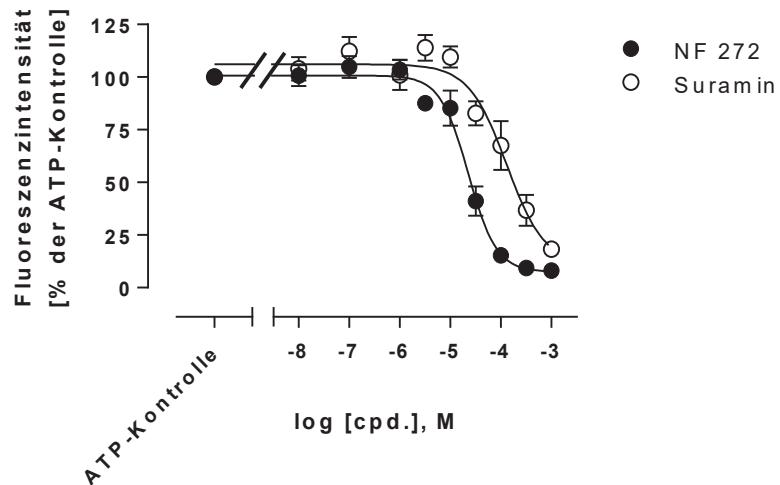


Abbildung 78: Konzentrations-Inhibition-Kurven von NF272 und Suramin an der Zelllinie OVCAR-3. Die durch 200 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch die Antagonisten NF272 und Suramin konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tabelle 36: Inhibitorische Potenz von Suramin und NF272 bestimmt im Calcium-Assay für den P2Y₂-Rezeptor, welcher nativ in OVCAR-3-Zellen exprimiert war. Gezeigt sind die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten und die daraus berechneten K_i und pK_i-Werte.

	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	K _i [μM]	pK _i
NF272	21	4,67 ± 0,07	6,30	5,20
Suramin	153	3,82 ± 0,10	46	4,33

Auch hier erwies sich NF272 potenter als Suramin. Für NF272 wurde ein pIC₅₀-Wert von 4,67 ± 0,05, siehe Tabelle 36, bestimmt. Der daraus berechnete pK_i-Wert lag bei 5,20 und lag somit im selben Größenbereich wie die zuvor gezeigten pK_i-Werte von NF272 im HEY-Zellsystem (pK_i = 5,18) bzw. im Überexpressionssystem 1321N1-P2Y₂ (pK_i = 4,72). Für Suramin wurde im OVCAR-3-Zellsystem ein pIC₅₀-Wert von 3,82 ± 0,10 ermittelt. Auch in diesem nativen Testsystem zeigte Suramin damit eine deutlich höhere inhibitorische Potenz als im rekombinanten System, siehe Tabelle 34. Suramin war an der OVCAR-3-Zelllinie etwa um den Faktor fünf potenter. Abschließend lässt sich festhalten, dass NF272 in allen drei Testsystemen (HEY, OVCAR-3, 1321N1-P2Y₂) den P2Y₂-Rezeptor, nativ oder rekombinant exprimiert, konzentrationsabhängig blockierte und die erhaltenen IC₅₀-, pIC₅₀- bzw. pK_i-Werte sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Desweitern erwies sich NF272 dabei als deutlich potenter im Vergleich zu Suramin.

4.2.5 Zytotoxizität von NF198 und NF272

Die Zytotoxizität der beiden potenteren Antagonisten NF198 und NF272 wurde an der Astrozytom-Zelllinie 1321N1, der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 und der nativen Zelllinie HEK293 untersucht. Der MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) wurde verwendet, um zu bestimmen, welchen Effekt die beiden Substanzen auf die Zellviabilität ausübten. Abbildung 79 zeigt das Resultat eines ersten Vorversuches zu Bestimmung der Zytotoxizität der beiden Substanzen. Hierzu wurden die Zellen für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an NF198 bzw. NF272 behandelt. 0,9%ige Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und 100 μM Cisplatin dienten dabei als Positiv- bzw. Negativkontrolle. NF198 erwies sich dabei an allen drei Zelllinien als deutlich zytotoxischer als NF272, siehe Abbildung 79. 10 μM NF198 beeinflusste nur das Wachstum der 1321N1-Zellen und reduzierte dieses um 25%. Die Zellviabilität der 1321N1- und der HEK293-Zellen lag nach der Behandlung mit 100 μM NF198 bei etwa 50%, wohingegen kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten der OVCAR-3-Zellen zu beobachten war. Sowohl durch 250 μM als auch durch 500 μM NF198 wurde das Zellwachstum aller drei Zelllinien deutlich beeinflusst.

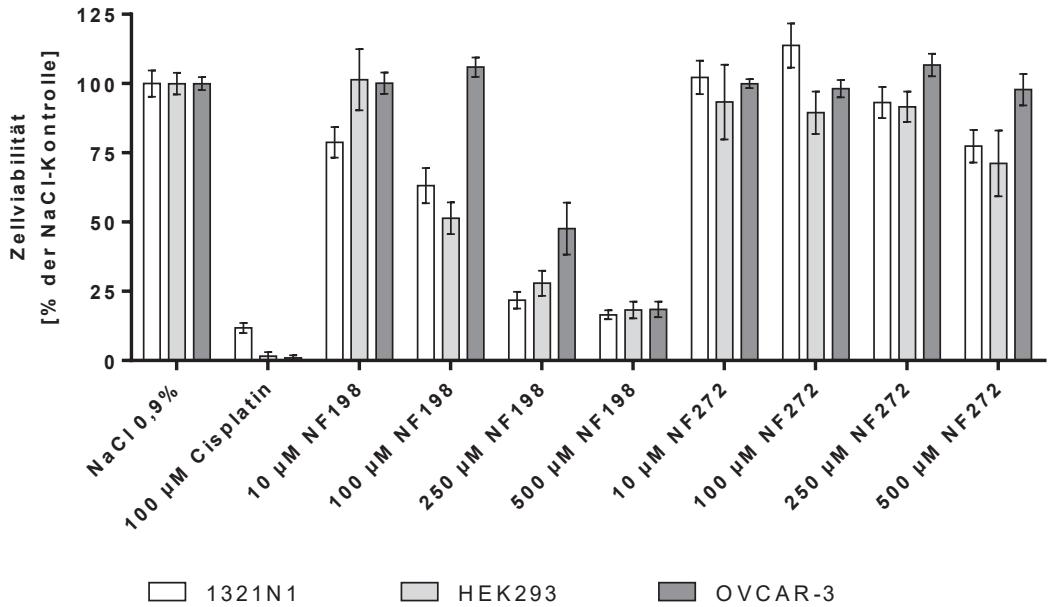


Abbildung 79: Zytotoxizität von NF198 und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien 1321N1, HEK293 und OVCAR-3. 0,9% NaCl wurde als Negativkontrolle und 100 μM Cisplatin als Positivkontrolle verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

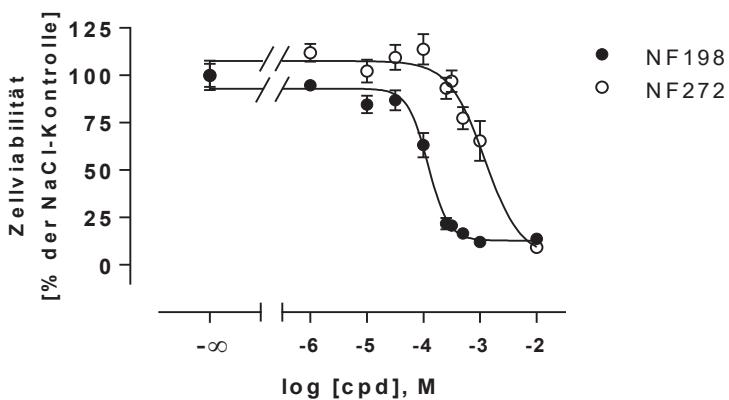
Durch 250 μM NF198 überlebten nur etwa 50% der OVCAR-3-Zellen und etwa 25% - 30% der 1321N1- und HEK293-Zellen. Eine 72-stündige Behandlung mit 500 μM NF198 überlebten nur knapp 20% der Zellen der jeweiligen Zelllinie. Für NF272 stellte sich ein komplett anderes Bild dar. Die Zellviabilität aller drei Zelllinien wurde weder durch 10 μM, 100 μM oder 250 μM beeinflusst. Lediglich 500 μM NF272 reduzierte das Zellwachstum der 1321N1- und HEK293-Zellen um etwa 25%, wohingegen kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten der OVCAR-3-Zellen bei dieser Konzentration zu beobachten war.

Anschließend wurden Konzentrations-Effekt-Kurven sowohl für NF198 als auch für NF272 an den jeweiligen Zelllinien erstellt, welche in der Abbildung 80 gezeigt sind. Die dazugehörigen IC₅₀- und pIC₅₀-Werte sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Für NF198 ließen sich IC₅₀-Werte im mittleren mikromolaren Bereich von 120 μM (1321N1), 106 μM (HEK293) und 246 μM (OVCAR-3) bestimmen. NF272 wies demgegenüber in diesen Experimenten etwa 10-fach höhere IC₅₀-Werte als NF198 auf. Hier wurden folgenden IC₅₀-Werte bestimmt: 1.210 μM für 1321N1-Zellen, 1.022 μM für HEK293-Zellen und 1.678 μM für OVCAR-3-Zellen, siehe Tabelle 37.

Aufgrund der zytotoxischen Nebeneffekte von NF198, welche den Einsatz dieser Substanz in *in-vivo* Experimenten erschweren würde, wurde diese Substanz nicht weiter funktionell charakterisiert, sondern nur NF272.

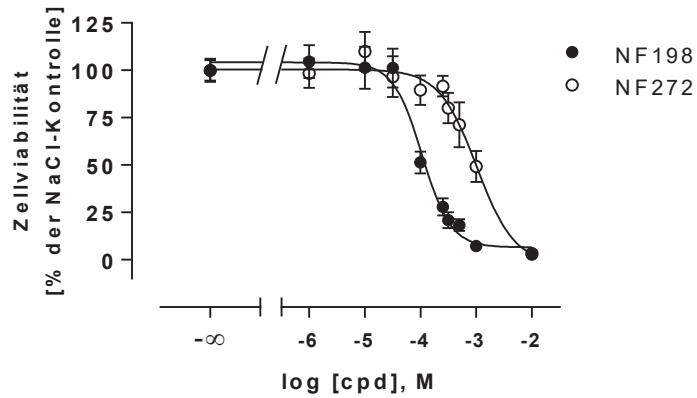
A)

1321N1



B)

HEK293



C)

OVCAR-3

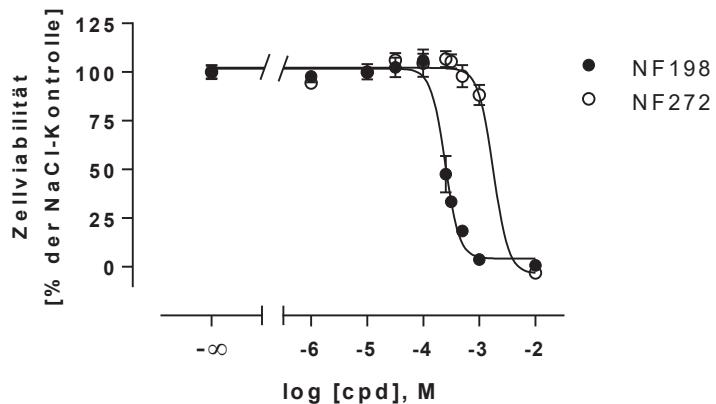


Abbildung 80: Konzentrations-Effekt-Kurven von NF198 und NF272 an den Zelllinien 1321N1 (A), HEK293 (B) und OVCAR-3 (C) bestimmt mittels MTT-Assay. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 37: Zytotoxizität der beiden P2Y₂-Antagonisten NF198 und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien 1321N1, HEK293 und OVCAR-3. Gezeigt sind die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

NF198		NF272	
IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀ [μM]	pIC ₅₀ ± SEM
1321N1	120	3,92 ± 0,04	1.210
HEK293	106	3,97 ± 0,07	1.022
OVCAR-3	246	3,61 ± 0,02	1.786

4.2.6 Funktionelle Charakterisierung von NF272

4.2.6.1 Schild-Analyse von NF272

Die in Abbildung 73, Abbildung 76 und Abbildung 78 gezeigten Konzentrations-Inhibition-Kurven von NF272 wiesen einen Hillslope auf, der nicht signifikant verschieden war von 1, was auf ein kompetitives Verhalten von NF272 gegenüber ATP am P2Y₂-Rezeptor hindeutete. Um den kompetitiven Antagonismus nachzuweisen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP in Gegenwart steigender Konzentrationen an NF272 an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂ erstellt, siehe Abbildung 81.

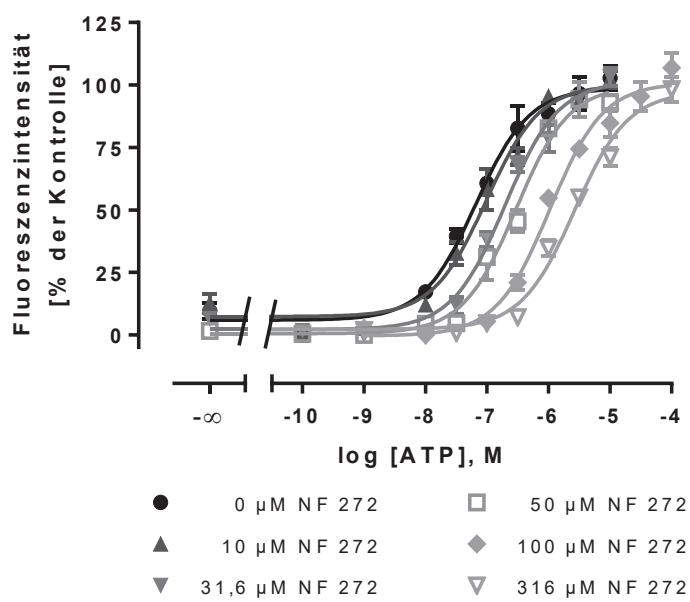


Abbildung 81: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂ in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an NF272 bestimmt im Calcium-Assay. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM eines repräsentativen Experiments aus einer Reihe von drei Experimenten.

Tabelle 38: Einfluss von NF272 auf die EC₅₀ bzw. den pEC₅₀ von ATP an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂ im Calcium-Assay. Gezeigt sind die mittleren EC₅₀- bzw. pEC₅₀-Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

	EC ₅₀ [nM]	pEC ₅₀ \pm SEM
0 μM NF272	65	7,18 \pm 0,08
10 μM NF272	97	7,01 \pm 0,08
31,6 μM NF272	197	6,71 \pm 0,06
50 μM NF272	297	6,53 \pm 0,08
100 μM NF272	1.047	5,98 \pm 0,07
316 μM NF272	2.653	5,58 \pm 0,07

Die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP in Anwesenheit steigender Konzentrationen an NF272 ist in Abbildung 81 eindeutig zu erkennen. Die Entwicklung der dazugehörigen EC₅₀- und pEC₅₀-Werte ist in Tabelle 38 dargestellt. In der Analyse nach *Schild* (Kapitel 3.3.6.1), wurde eine Gerade erhalten, deren Steigung nicht signifikant verschieden von 1 ist ((Abbildung 82) Steigung $1,264 \pm 0,197$; 95%iges Konfidenzintervall: 0,8522 - 1,676). Dies weist ebenfalls auf einen kompetitiven Charakter der Inhibition durch NF272 hin.

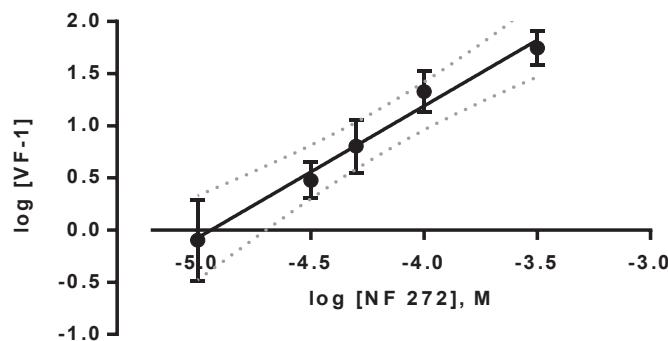


Abbildung 82: Schild-Plot von NF272. Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF272 an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂. Dazu wurde die durch NF272 vermittelte Inhibition der durch ATP-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration ermittelt. Der pA₂-Wert wurde mit $5,03 \pm 0,22$ (Mittelwert \pm SEM) bestimmt. Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

Der pA₂-Wert wurde bestimmt mit $5,03 \pm 0,22$ (Mittelwert \pm SEM) und lag somit im gleichen Bereich wie der apparetive pK_i-Wert von NF272, bestimmt an der Zelllinie 1321N1-P2Y₂ mit pK_i = 4,72, siehe Kapitel 4.2.3 bzw. bestimmt in HEY-Zellen mit pK_i = 5,18 oder an OVCAR-3-Zellen mit pK_i = 5,20, siehe Kapitel 4.2.4.

4.2.6.2 Auswertung nach *Lew and Angus*

Weiter wurde zum Nachweis des kompetitiven Charakters von NF272 noch die nicht-lineare Analyse nach *Lew and Angus* (Kapitel 3.3.6.1) durchgeführt, siehe Abbildung 83, und der dazugehörige *Clark-Plot* erstellt (Abbildung 84).

Durch diese nicht-lineare Regressionsmethode wurde das kompetitive Verhalten von NF272 gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor bestätigt und ein pK_d-Wert von $4,96 \pm 0,11$ (Mittelwert \pm SEM) bestimmt. Dieser Wert ist nicht signifikant verschieden von dem pA₂-Wert von $5,03 \pm 0,22$ (Mittelwert \pm SEM), welcher im *Schild-Plot* bestimmt wurde.

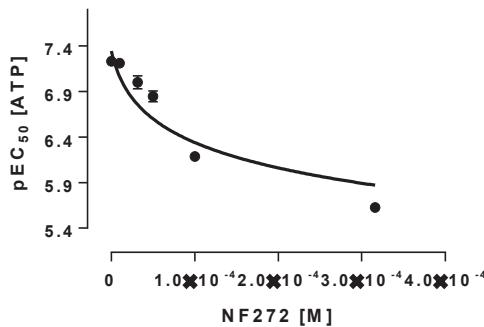


Abbildung 83: Nicht-lineare Regression der ATP-pEC₅₀-Werte gegen steigende Konzentrationen an NF272.

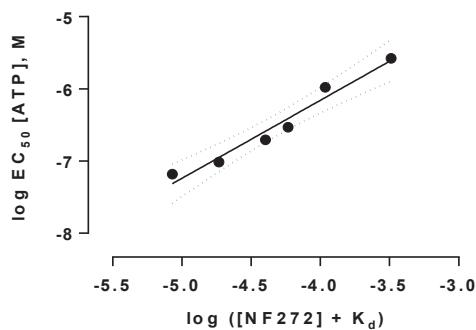


Abbildung 84: *Clark-Plot*, der den Einfluss von NF272 auf den log (EC₅₀) von ATP widerspiegelt.
Steigung = $1,081 \pm 0,1067$.

4.2.7 Selektivität von NF272

4.2.7.1 Selektivität gegenüber P2X-Rezeptoren

Die Selektivität von NF272 wurde an verschiedenen P2X-Rezeptoren aus dem Menschen (h) bzw. aus der Ratte (r), welche rekombinant in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimiert waren, untersucht. Diese Versuche wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Hausmann und Prof. Schmalzing

am Universitätsklinikum der RWTH Aachen durchgeführt. Dort wurden Daten für die Selektivität von NF272 gegenüber rP2X₁, hP2X₂ und S15V-rP2X₃ erhoben. Dazu wurden die durch Stimulation mit einem Agonisten verursachten Ströme mit Hilfe einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch bestimmt. Die verwendete Messmethode ist in der Literatur mehrfach beschrieben (85,86), siehe Kapitel 3.3.6.2. In Tabelle 39 sind die resultierenden IC₅₀-Werte für NF272 an den verschiedenen P2X-Rezeptorsubtypen zusammengefasst. NF272 wies auch inhibitorische Effekte an den untersuchten P2X-Rezeptorsubtypen auf. Die IC₅₀-Werte lagen hier bei 2,0 µM (rP2X₁), 6,9 µM (rP2X₃) und 94,8 µM (hP2X₂).

Tabelle 39: IC₅₀ von NF272 an den P2X-Rezeptorsubtypen, rekombinant exprimiert in *Xenopus-laevis*-Oozyten. Die Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Hausmann und Prof. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen erhoben und dem Arbeitskreis Kassack zur Verfügung gestellt.

Rezeptor	IC ₅₀ [µM]	pIC ₅₀ ± SEM	n
rP2X ₁	2,0	5,69 ± 0,05	6
hP2X ₂	94,8	4,02 ± 0,03	6
S15V-rP2X ₃	6,9	5,16 ± 0,05	7

4.2.7.2 Selektivität gegenüber P2Y-Rezeptoren

Die Selektivität von NF272 gegenüber weiteren P2Y-Rezeptoren wurde an den in dieser Arbeit, etablierten P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien mittels Calcium-Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 unter Angabe der IC₅₀- und der K_i-Werte bzw. der prozentualen Inhibition durch 100 µM NF272 zusammengefasst und die dazugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurven sind in den nachstehenden Abbildungen (Abbildung 85 - Abbildung 89) gezeigt.

Tabelle 40: Inhibitorische Potenz von NF272 ermittelt im Calcium-Assay für den P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆-, P2Y₁₁- und P2Y₁₂-Rezeptor, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Gezeigt sind die mittleren IC₅₀-Werte von drei unabhängigen Experimenten und die daraus berechneten K_i-Werte und prozentuale Inhibition durch 100 µM NF272.

Rezeptor	IC ₅₀ [µM]	K _i [µM]	% Inhibition durch 100 µM NF272
P2Y ₁	55	18	81,2 ± 3,4
P2Y ₂	58	19	88,2 ± 1,6
P2Y ₄	210	70	34,2 ± 3,4
P2Y ₆	330	110	32,1 ± 2,6
P2Y ₁₁	2,6	0,9	98,7 ± 2,1
P2Y ₁₂	7,9	2,6	97,3 ± 3,8

Die höchste Potenz zeigte NF272 gegenüber dem P2Y₁₁- und dem P2Y₁₂-Rezeptor. Danach folgten der P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄- und der P2Y₆-Rezeptor. Die IC₅₀-Werte lagen bei 2,6 µM für den P2Y₁₁- bzw. 7,9 µM für den P2Y₁₂-Rezeptor. NF272 ist somit etwa 21-fach potenter am P2Y₁₁- bzw. etwa 8-fach potenter am P2Y₁₂-Rezeptorsubtyp als am P2Y₂-Rezeptor. Gegenüber dem P2Y₁-Rezeptor (IC₅₀ = 55 µM) erwies sich NF272 als äquipotent im Vergleich zum P2Y₂-Rezeptor (IC₅₀ = 58 µM). Lediglich innerhalb den Uracilnukleotid-sensitiven Rezeptorsubtypen (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) zeigte NF272 gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor eine moderate Selektivität. Hier war der Antagonist 3,6-fach potenter als am P2Y₄-Rezeptor bzw. 5,7-fach potenter als am P2Y₆-Rezeptor. Das Verhalten von NF272 gegenüber dem P2Y₁₃- und dem P2Y₁₄-Rezeptor wurde an dieser Stelle nicht untersucht.

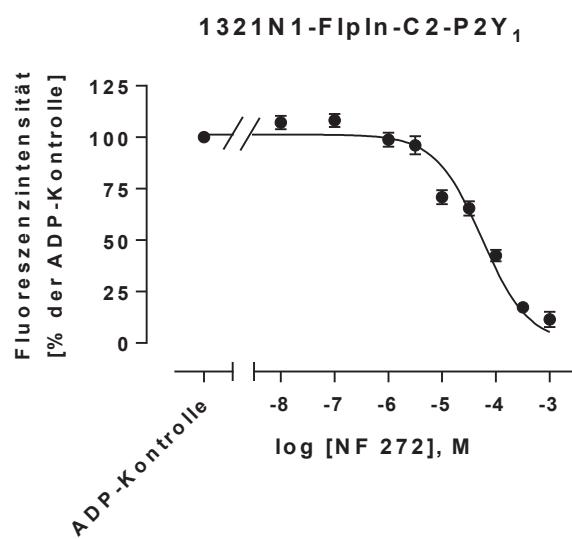


Abbildung 85: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁. Die durch 800 nM ADP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF272 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ADP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

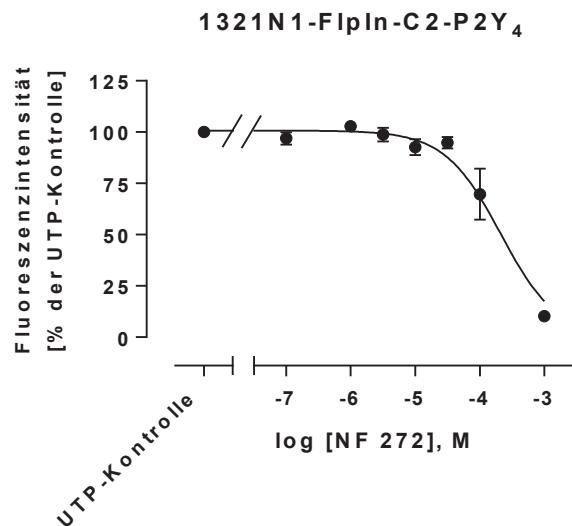


Abbildung 86: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₄. Die durch 4 nM UTP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF272 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

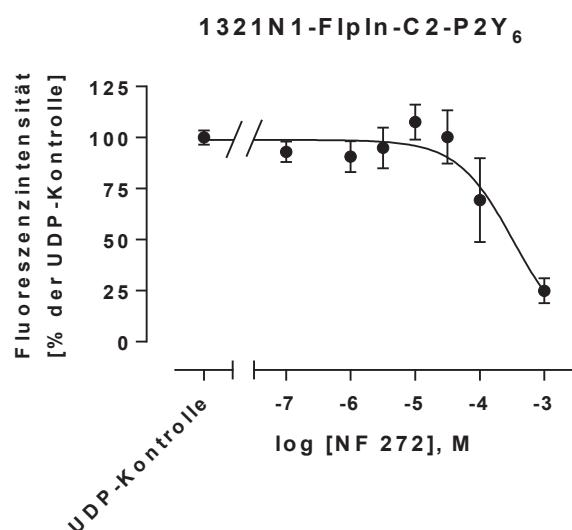


Abbildung 87: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₆. Die durch 18 nM UDP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF272 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch UDP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

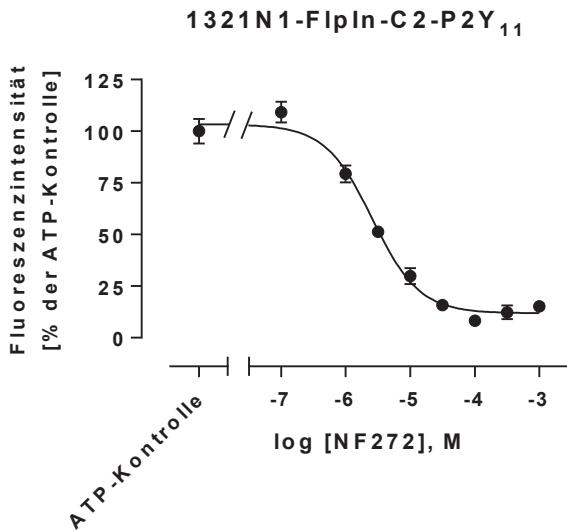


Abbildung 88: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FipIn-C2-P2Y₁₁. Die durch 100 nM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF272 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

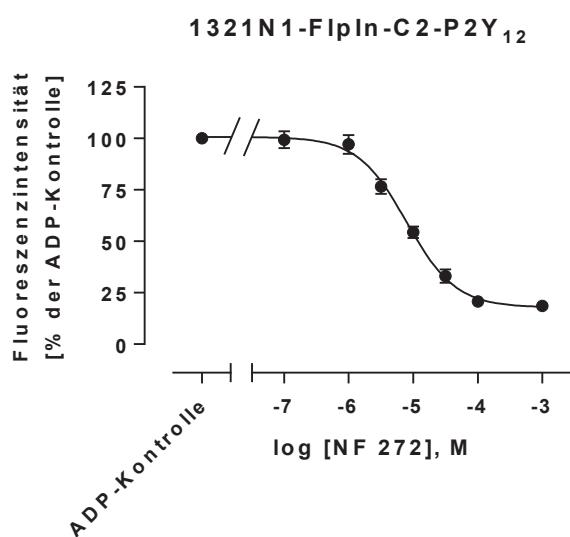


Abbildung 89: Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF272 an der Zelllinie 1321N1-FipIn-C2-P2Y₁₂. Die durch 300 nM ADP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten NF272 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ADP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

4.3 Sensitivierung von Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Cisplatin durch Nukleotide

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des nativ in Ovarialkarzinom-Zelllinien exprimierten P2Y₂-Rezeptors näher untersucht. Dazu wurden von denen im Arbeitskreis Kassack vorhandenen Ovarialkarzinom-Zelllinien im Arbeitskreis von Frau Prof. Royer-Pokora aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, DNA-Microarray-Analysen angefertigt, siehe Kapitel 3.3.4.1. Die Expression purinerger Rezeptoren sowie der verschiedenen Nukleotidasen wurde in folgenden Zelllinien untersucht: A2780, CAOV-3, HEY, OAW.42, OVCAR-3, PA.1 und TOV112.D. Im Anhang E sind die Expressionsdaten der Zelllinien gezeigt. Expressionsdaten für den P2X₆-Rezeptor wurden in diesem Versuch nicht mit erfasst. Eine Übersicht zu den hier untersuchten Genen ist in der nachfolgenden Tabelle 41 beschrieben. Anhand der Expressionsdaten (Abbildung 90) und in Abstimmung mit den in der Literatur bekannten Daten (66,67,144–146) wurden die beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 für die nachfolgenden Experimente gewählt, da sie den P2Y₂-Rezeptor auf mRNA-Ebene am stärksten exprimieren.

Tabelle 41: Untersuchte Gene im DNA-Microarray.

Bezeichnung	Gensymbol	Beschreibung	Accession-Number
P1A ₁	ADORA1	Homo sapiens Adenosin-A1-Rezeptor Transkript Variante 1, mRNA	NM_000674
P1A _{2A}	ADORA2A	Homo sapiens Adenosin-A2a-Rezeptor, mRNA	NM_000675
P1A _{2B}	ADORA2B	Homo sapiens Adenosin-A2b-Rezeptor, mRNA	NM_000676
P1A ₃	ADORA3	Homo sapiens Adenosine-A3-Rezeptor, mRNA	NM_020683
P2X ₁	P2RX1	Homo sapiens Purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 1, mRNA	NM_002558
P2X ₂	P2RX2	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 2, Transkript Variante 4, mRNA	NM_170683
P2X ₃	P2RX3	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 3, mRNA	NM_002559
P2X ₄	P2RX4	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 4, mRNA	NM_002560
P2X _{5 (1)}	P2RX5	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 5, Transkript Variante 1, mRNA	NM_002561
P2X _{5 (3)}	P2RX5	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 5, Transkript Variante 3, mRNA	NM_175081
P2X ₇	P2RX7	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2X, Ligand-gesteuerter Ionenkanal, 7, mRNA	NM_002562
P2Y ₁	P2RY1	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 1, mRNA	NM_002563
P2Y ₂	P2RY2	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 2, Transkript Variante 1, mRNA	NM_176072
P2Y ₄	P2RY4	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 4, mRNA	NM_002565

Bezeichnung	Gensymbol	Beschreibung	Accession-Number
P2Y ₆	P2RY6	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 6, Transkript Variante 2, mRNA	NM_176798
P2Y ₁₁	P2RY11	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 11, mRNA	NM_002566
P2Y ₁₂	P2RY12	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 12, Transkript Variante 1, mRNA	NM_022788
P2Y ₁₃	P2RY13	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 13, Transkript Variante 1, mRNA	NM_023914
P2Y ₁₄	P2RY14	Homo sapiens purinerger Rezeptor P2Y, G-Protein gekoppelt, 14, Transkript Variante 2, mRNA	NM_014879
NT5E	NT5E	Homo sapiens 5'-Nukleotidase, ecto (CD73) (NT5E), mRNA	NM_002526
ENTPD1	ENTPD1	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 1, mRNA	NM_006208
ENTPD2	ENTPD2	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphate-diphosphohydrolase 2, Transkript Variante 2, mRNA	NM_001246
ENTPD3	ENTPD3	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 3, mRNA	NM_001248
ENTPD4	ENTPD4	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 4, mRNA	NM_004901
ENTPD5	ENTPD5	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 5, mRNA	NM_001249
ENTPD6	ENTPD6	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 6, mRNA	NM_001247
ENTPD7	ENTPD7	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 7, mRNA	NM_020354
ENTPD8	ENTPD8	Homo sapiens Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase 8, Transkript Variante 1, mRNA	NM_001033113

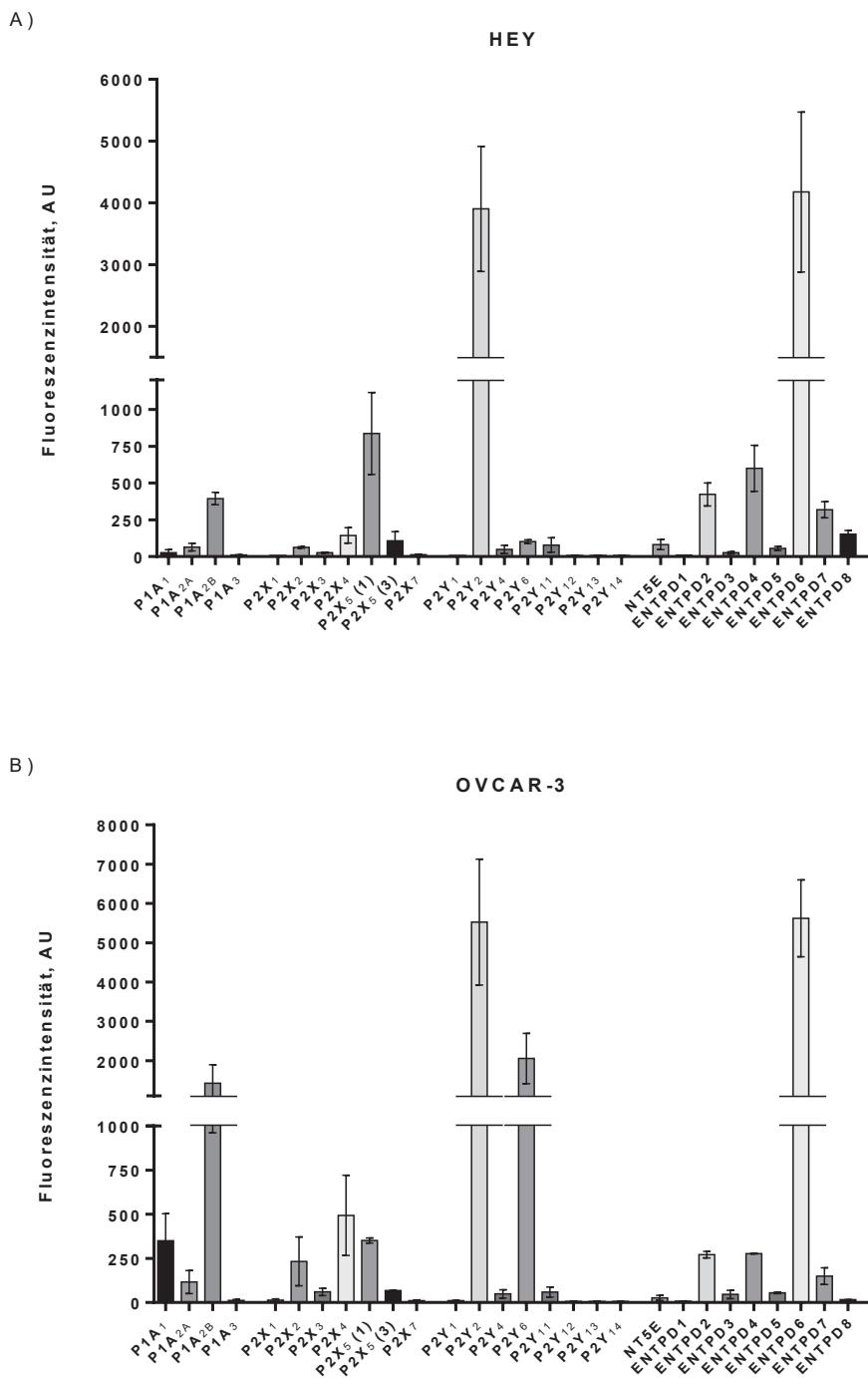


Abbildung 90: Ergebnis der DNA-Microarray-Analyse der Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B) hinsichtlich der Expression purinerger Rezeptoren und Nukleotidasen. Die Experimente wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Royer-Pokora aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt.

4.3.1 Expressionsprofil purinriger Rezeptoren

Weiter wurde das Expressionsprofil der purinergen Rezeptoren auf mRNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Zelllinien HEY und OVCAR-3 bestimmt. Anschließend wurde mittels Western Blot bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie die Expression auf Proteinebene untersucht.

4.3.1.1 mRNA-Ebene

Abbildung 91 zeigt die Aufnahme einer erfolgten gelelektrophoretischen Auftrennung von PCR-Proben, in der die Expression des P2Y₂-Rezeptors auf mRNA-Ebene in den beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 untersucht wurde. Da die Expression des Proteins β -Actin durch die Experimente in dieser Arbeit nicht beeinflusst wurde, wurde β -Actin als sogenanntes Housekeeping Gen betrachtet und als Positivkontrolle mit analysiert.

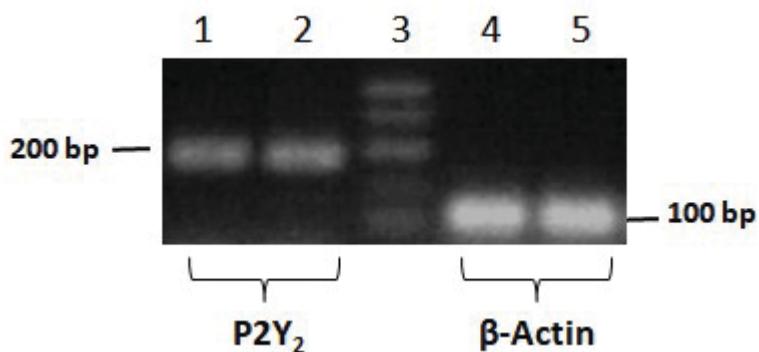


Abbildung 91: Agarose-Gelelektrophorese der in der PCR vermehrten Zielstrukturen (P2Y₂ und β -Actin) für die beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3. Linie 1: HEY; Linie 2: OVCAR-3; Linie 3: DNA-Vergleichsleiter; Linie 4: HEY; Linie 5: OVCAR-3. Die vorausgesagten PCR-Produktlängen betragen: P2Y₂: 188 bp und β -Actin: 103 bp. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von GelRed®. Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme aus einer Serie mit drei Experimenten.

Erwartungsgemäß wurden in beiden Zelllinien PCR-Produkte für das P2Y₂-Rezeptor gen nachgewiesen. Die berechnete PCR-Produktlänge beträgt für den verwendeten Primer 188 bp (siehe Tabelle 7). Die zwei Banden der PCR-Produkte erschienen auf gleicher Höhe kurz unterhalb der 200 bp-Marke der Vergleichs-DNA-Leiter (siehe Linie 1 und 2 in Abbildung 91), so dass hier P2Y₂-mRNA eindeutig nachgewiesen wurde. Die Intensität der beiden Banden unterschied sich nicht voneinander. Die beiden Banden für β -Actin (siehe Abbildung 91, Linie 4 und 5) waren auf Höhe der 100 bp-Marke zu erkennen, was mit der berechneten PCR-Produktgröße von 103 bp (siehe Tabelle 7) übereinstimmte. Außerdem bestätigte die gleichmäßige Intensität der β -Actin-Banden, dass für alle Proben die gleiche Menge an cDNA aufgetragen wurde. Neben

dem P2Y₂-Rezeptor wurden ebenfalls Expressionsnachweise für alle anderen P2-Rezeptoren durchgeführt. Denn sowohl die P2X- als auch die P2Y-Rezeptoren können im Tumorgeschehen eine Rolle spielen (siehe Kapitel 1.1.3). Die resultierenden Bilder nach der elektrophoretischen Auftrennung sind in den nachstehenden Abbildung 92 und Abbildung 93 gezeigt. In den HEY-Zellen wurden PCR-Fragmente für den P2X₄- und den P2X₅-Rezeptor (siehe Abbildung 92 A, Linie 5 und 6) und ein Fragment für den P2Y₂-Rezeptor nachgewiesen (siehe Abbildung 92 B, Linie 3). Die dazugehörigen Banden erschienen je auf der Höhe ihrer vorausgesagten Größen (siehe Tabelle 7). Die β -Actin-Kontrollen sind jeweils in Linie 1 der Abbildung 92 gezeigt. Die teilweise unterhalb der 100 bp-Marke zu erkennenden Banden sind auf Primer-Dimere zurückzuführen, die sich während der PCR-Reaktion aufgrund eines fehlenden Templates gebildet haben und somit ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert wurden.

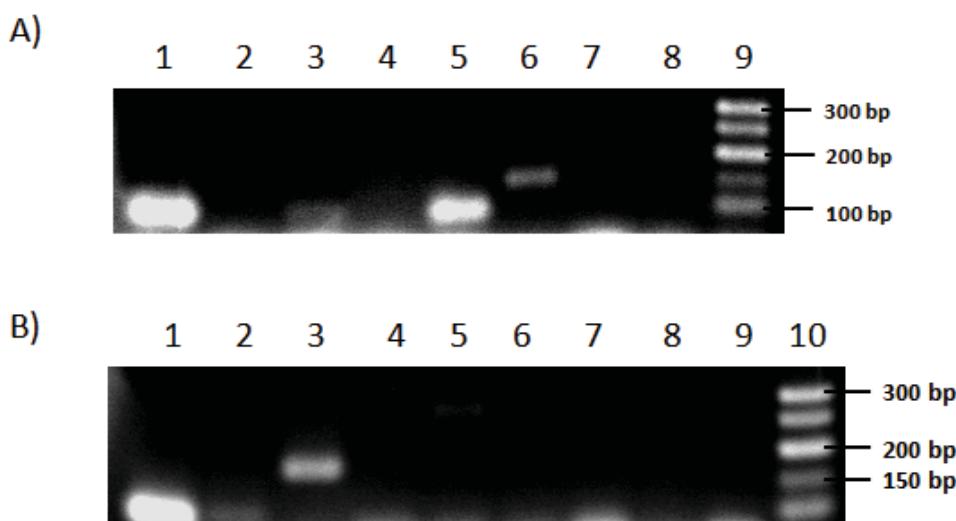


Abbildung 92: Agarose-Gelelektrophorese der in der PCR vermehrten einzelnen P2X- und P2Y-Rezeptor-Fragmente. Hier wurden die HEY-Zellen untersucht. A) Linie 1: β -Actin; Linie 2: P2X₁; Linie 3: P2X₂; Linie 4: P2X₃; Linie 5: P2X₄; Linie 6: P2X₅; Linie 7: P2X₆; Linie 8: P2X₇; Linie 9: DNA-Vergleichsleiter. B) Linie 1: β -Actin; Linie 2: P2Y₁; Linie 3: P2Y₂; Linie 4: P2Y₄; Linie 5: P2Y₆; Linie 6: P2Y₁₁; Linie 7: P2Y₁₂; Linie 8: P2Y₁₃; Linie 9: P2Y₁₄; Linie 10: DNA-Vergleichsleiter. Die vorausgesagten PCR-Produktlängen sind in Tabelle 7 angegeben. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von GelRed®. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus einer Serie mit drei Experimenten.

Für die Zelllinie OVCAR-3 wurden PCR-Fragmente für die Gene des P2X₂-, P2X₄- und des P2X₅-Rezeptors (siehe Abbildung 93 A, Linie 3, 5 und 6) sowie für den P2Y₂- und den P2Y₆-Rezeptor (siehe Abbildung 93 B, Linie 3 und 5) detektiert. Die Banden erschienen auf der Höhe der vorausgesagten PCR-Produktgröße (siehe Tabelle 7). Einzig die Intensität der Bande für das P2X₅-Rezeptoren war deutlich weniger prominent verglichen mit den anderen Banden. Die Banden der β -Actin-Kontrollen waren hier jeweils wieder in Linie 1 aufgetragen. Auch in diesem Ver-

such erschienen Banden unterhalb der 100 bp-Marke, welche auf Primer-Dimere zurückzuführen waren.

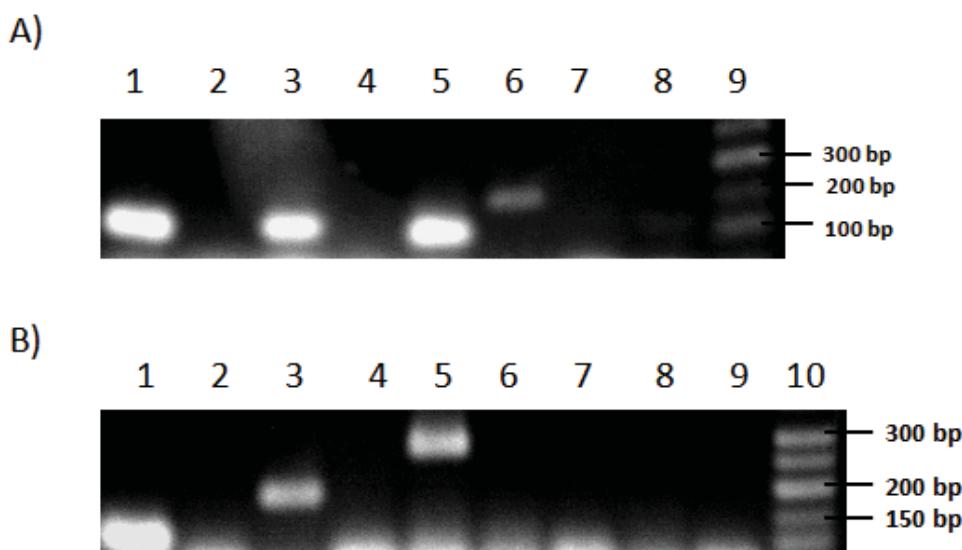


Abbildung 93: Agarose-Gelelektrophorese der durch PCR vermehrten einzelnen P2X- und P2Y-Rezeptor Fragmente. Hier wurden die OVCAR-3-Zellen untersucht. A) Linie 1: β -Actin; Linie 2: P2X₁; Linie 3: P2X₂; Linie 4: P2X₃; Linie 5: P2X₄; Linie 6: P2X₅; Linie 7: P2X₆; Linie 8: P2X₇; Linie 9: DNA-Vergleichsleiter. B) Linie 1: β -Actin; Linie 2: P2Y₁; Linie 3: P2Y₂; Linie 4: P2Y₄; Linie 5: P2Y₆; Linie 6: P2Y₁₁; Linie 7: P2Y₁₂; Linie 8: P2Y₁₃; Linie 9: P2Y₁₄; Linie 10: DNA-Vergleichsleiter. Die vorausgesagten PCR-Produktlängen sind in Tabelle 7 angegeben. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von GelRed®. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus einer Serie mit drei Experimenten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in beiden Zelllinien PCR-Produkte für das P2Y₂-Rezeptorgen nachgewiesen wurden. Folglich war damit auch mRNA für das genannte Gen in den jeweiligen Zellen vorhanden.

4.3.1.2 Proteinebene

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob auch das Protein für den P2Y₂-Rezeptor in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien exprimiert wurde. Der Western Blot, siehe Kapitel 3.3.5, wurde zunächst zum Nachweis der P2Y₂-Rezeptorproteine herangezogen. Neben dem P2Y₂-Rezeptor können diverse Effekte auch über den P2Y₁- oder den P2X₇-Rezeptor vermittelt sein (siehe Abbildung 7) und ATP ist für diese beiden Rezeptorsubtypen ebenfalls ein nativer Ligand. Aus diesem Grund wurde ebenfalls untersucht, ob Proteine für den P2Y₁- und den P2X₇-Rezeptor in den Zelllinien vorhanden sind, obwohl weder PCR- noch Microarray-Daten mRNA für P2Y₁ oder P2X₇ zeigten. In der nachstehenden Abbildung sind die Western Blot-Aufnahmen repräsentativer Experimente gezeigt.

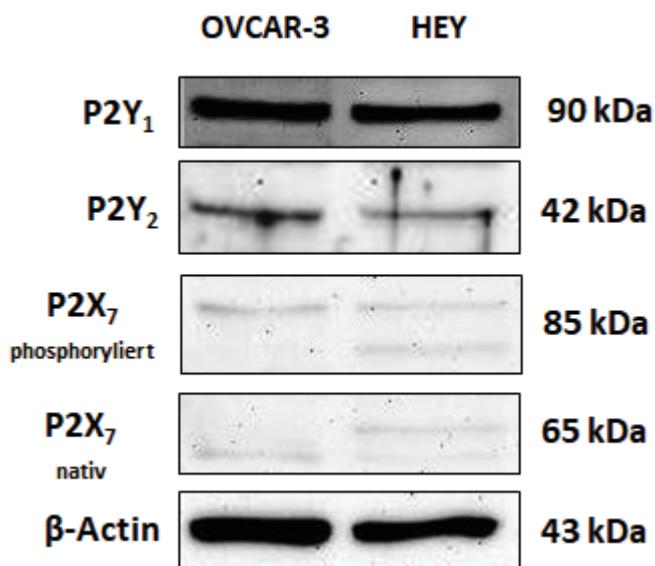


Abbildung 94. Western Blot Analyse zum Nachweis der P2Y₁-, P2Y₂- und P2X₇- Rezeptorproteine. β -Actin fungierte als Beladungskontrolle. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus einer Serie mit drei Experimenten.

Untersucht wurden Proteinproben, entnommen aus OVCAR-3-Zellen und aus HEY-Zellen, siehe Abbildung 94. Das P2Y₁-Protein verfügt über eine Größe von 45 kDa auf. Tatsächlich war in beiden Proben eine prominente Bande auf Höhe der 90 kDa-Marke zu sehen. Diese Bande wies darauf hin, dass das P2Y₁-Protein als Dimer vorlag und auch so detektiert wurde, was bereits in der Literatur beschrieben ist (147). Schicker *et al.* berichten hier von einer ungefähren Proteingröße von 90 kDa. Aufgrund der Resultate der PCR-Experimente, siehe Kapitel 4.3.1.1, wo mRNA für das P2Y₂-Rezeptorgen in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 bereits nachgewiesen werden konnte, wurde der Nachweis des Proteins auch in diesem Western Blot-Experiment erwartet. Die Größe des P2Y₂-Rezeptorproteins liegt bei 42 kDa. Schwache Protein-Banden wurden entsprechend der Größe in den Proben der OVCAR-3- und HEY-Zellen detektiert. Das P2Y₂-Rezeptorprotein war demnach in den Proben exprimiert.

Das Protein für den P2X₇-Rezeptor weist eine Größe von 65 kDa im nativen Zustand und im phosphorylierten Zustand von 85 kDa auf. Sowohl in den OVCAR-3- als auch in den HEY-Zellen waren sehr schwach ausgeprägte Banden bei 65 kDa und bei 85 kDa zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der P2X₇-Rezeptor exprimiert sein könnte. Das Housekeeping Gen β -Actin wurde als Beladungskontrolle verwendet, siehe Abbildung 94. Die Größe des Proteins β -Actin liegt bei 43 kDa. Tatsächlich erschienen in allen Proben die Banden knapp über der 40-kDa-Bande der Proteinleiter. Es wurden demnach entsprechend gleiche Proteinkonzentrationen aufgetragen, was anhand der gleichmäßigen Intensität der β -Actin-Banden zu erkennen war. Festzuhalten bleibt, dass nach diesem Experiment zunächst von der Expression des P2Y₁- und des P2Y₂-Rezeptors ausgegangen wurde und es erste Hinweise auf eine gleichzeitige, mögliche Co-

Expression des P2X₇-Rezeptors gab.

Um weitere Aussagen hinsichtlich der P2Y₂-Rezeptor-Expression auf Proteinebene treffen zu können, wurde zusätzlich das Verfahren der Immunfluoreszenzmikroskopie herangezogen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 3.3.5.5 beschrieben durchgeführt. In den nachstehenden Abbildung 95 und Abbildung 96 sind repräsentative Bilder der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt. Die Versuche wurden im Institut für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Arbeitskreis von Prof. Dr. Fritz unter der Anleitung von Frau Hennicke durchgeführt. Abbildung 95 zeigt das Ergebnis dieser Expressionsstudien an den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und erschienen blau. Die jeweiligen Zielproteine wurden über Alexa Fluor 488 gekoppelte Sekundärantikörper gefärbt und erschienen, wenn vorhanden, grün. In der Zelllinie HEY wurden neben dem P2Y₂-Rezeptorprotein, wie schon im Western Blot, auch P2Y₁-Rezeptoren nachgewiesen. Der P2X₇-Rezeptor war in dieser Zelllinie nicht exprimiert (siehe Abbildung 95). Die Expression des P2Y₂- sowie des P2Y₁-Rezeptors wurde ebenfalls für die OVCAR-3-Zellen bestätigt. Auch in dieser Ovarialkarzinom-Zelllinie war der P2X₇-Rezeptor nicht exprimiert, wie in Abbildung 95 zu erkennen ist. Abbildung 96 zeigt die Resultate der Kontrollversuche, die durchgeführt wurden, um zu sehen, wie valide die zuvor erläuterten Expressionsdaten sind. Die Leervektor-Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-LV wurde als Negativkontrolle herangezogen, um zu überprüfen wie spezifisch die Antikörper an sein Zielprotein bzw. wie unspezifisch diese binden. Demgegenüber wurden die beiden Zelllinien 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁ und 1321N1-P2Y₂ für das jeweilige Zielprotein als Positivkontrollen herangezogen. Eine Zelllinie, die den P2X₇-Rezeptor exprimierte, lag im Arbeitskreis nicht vor, so dass an dieser Stelle eine entsprechende Positivkontrolle fehlt. In Abbildung 96 ist zu erkennen, dass an der Leervektor-Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-LV weder P2Y₂- noch P2X₇-Rezeptorproteine nachzuweisen waren. Demgegenüber waren erwartungsgemäß vereinzelt P2Y₁-Rezeptoren in dieser Zelllinie exprimiert. Laut *Burnstock und Di Virgilio* (67) exprimiert die 1321N1-Zelllinie nativ vereinzelt P2Y₁-Rezeptoren (siehe Kapitel 4.1.2). Auf der anderen Seite waren im Überexpressionssystem 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁ deutlich mehr P2Y₁-Rezeptorproteine vorhanden, was anhand der stärkeren grünen Fluoreszenz zu erkennen ist. Gleiches gilt für das P2Y₂-Überexpressionss-Zellsystem 1321N1-P2Y₂. Auch hier waren erwartungsgemäß die Rezeptorproteine deutlich grün angefärbt. Abschließend lässt sich festhalten, dass in den beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 der P2Y₂-Rezeptor auch auf Proteinebene mittels Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurde und es erste Hinweise auf eine gleichzeitige Expression des P2Y₁-Rezeptors in den beiden Zelllinien gab. Die Expressionsdaten für den P2X₇-Rezeptor waren widersprüchlich, so dass durch funktionelle

Calcium-Studien überprüft werden sollte, welche Rezeptorsubtypen in den Zellen funktionell aktiv waren

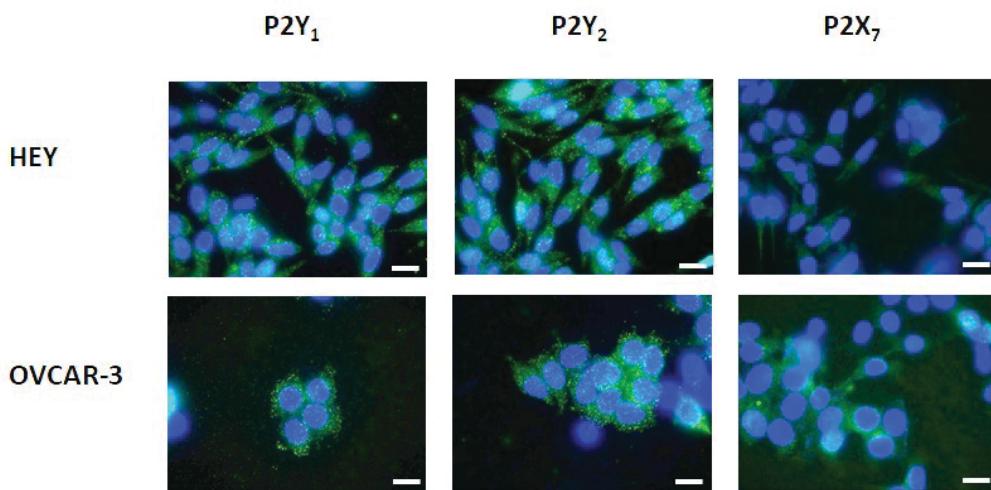


Abbildung 95: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien HEY und OVCAR-3 zum Nachweis der verschiedenen Rezeptorproteine (P2Y₁, P2Y₂ und P2X₇). Die Rezeptorproteine wurden angefärbt mit Alexa Fluor 488 (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau). Der weiße Balken entspricht einer Größe von 20 µm. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, 50-fache Vergrößerung.

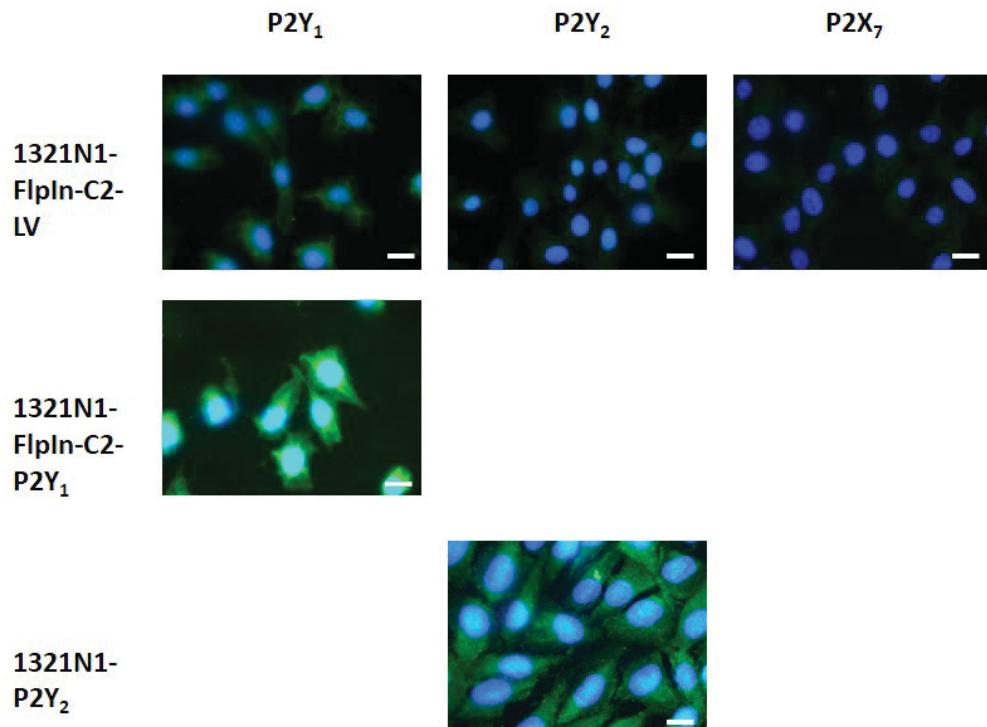


Abbildung 96: Repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kontroll-Zelllinien 1321N1-Flpln-C2-LV, 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁ und 1321N1-P2Y₂ zum Nachweis der verschiedenen Rezeptorproteine (P2Y₁, P2Y₂ und P2X₇). Die Rezeptorproteine wurden angefärbt mit Alexa Fluor 488 (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau). Der weiße Balken entspricht einer Größe von 20 µm. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen, 50-fache Vergrößerung.

4.3.2 Pharmakologische Charakterisierung der exprimierten P2Y-Rezeptoren mittels Calcium-Assay

Nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass der P2Y₂-Rezeptor in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert war, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob das Protein auch funktionell aktiv war. Dazu wurde wiederum der Calcium-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.1) als funktioneller Assay herangezogen. Auf diesem Weg wurde ebenfalls überprüft, ob ggf. andere vorhandene P2-Rezeptoren auch funktionell aktiv waren, wie beispielsweise der P2Y₁-Rezeptor. Dessen Expression wurde sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen (siehe Kapitel 4.3.1.2). Durch Testen der verschiedenen physiologischen Agonisten der P2Y-Rezeptoren wie ATP, UTP, ADP oder auch UDP und gleichzeitiges Bestimmen der jeweiligen EC₅₀-Werte wurde die funktionelle Aktivität exprimierter P2Y-Rezeptoren überprüft. Abbildung 97 zeigt die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven der zuvor genannten Nukleotide, welche anhand der HEY-Zelllinie bestimmt wurden. In Tabelle 42 sind die dabei ermittelten EC₅₀- und pEC₅₀-Werte zusammengefasst.

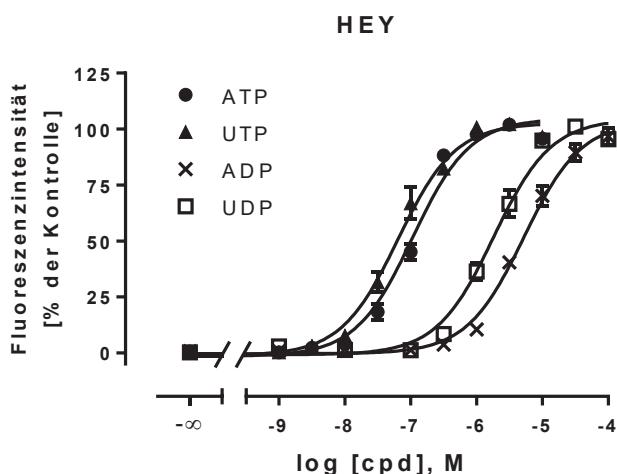


Abbildung 97: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, ADP und UDP bestimmt an der Zelllinie HEY. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP bzw. UTP bzw. ADP bzw. UDP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Die beiden Triphosphate ATP und UTP waren nicht nur deutlich potenter als die korrespondierenden Diphosphate ADP und UDP, sondern sie erwiesen sich auch als vergleichsweise äquipotent an der Zelllinie HEY. Die dazugehörigen Konzentrations-Effekt-Kurven waren nicht signifikant verschieden voneinander (siehe Abbildung 97).

Tabelle 42: Übersicht zu den im Calcium-Assay ermittelten EC₅₀- und pEC₅₀-Werte für die Agonisten ATP, UTP, ADP und UDP an der Zelllinie HEY. Gezeigt sind die mittleren EC₅₀- bzw. pEC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Agonist	EC ₅₀ [nM]	pEC ₅₀ ± SEM
ATP	107	6,97 ± 0,04
UTP	64	7,19 ± 0,05
ADP	5.200	5,28 ± 0,04
UDP	1.800	5,74 ± 0,04

Für ATP wurde in diesem Experiment ein pEC₅₀-Wert von 6,97 ± 0,04 und für UTP ein pEC₅₀-Wert von 7,19 ± 0,05 ermittelt. Demgegenüber lagen die pEC₅₀-Werte für ADP mit 5,28 ± 0,04 und für UDP mit 5,74 ± 0,04 deutlich niedriger und die dazugehörigen EC₅₀-Werte im Umkehrschluss deutlich höher im Vergleich zu denen von ATP und UTP.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die Calcium-Experimente an der OVACR-3-Zelllinie. In der nachstehenden Abbildung 98 sind die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für die vier Nukleotide dargestellt und Tabelle 43 gibt eine Übersicht zu den bestimmten EC₅₀- und pEC₅₀-Werten. An dieser Zelllinie erwiesen sich ATP, UTP und auch UDP gegenüber ADP als deutlich potenter. Für ADP wurde ein pEC₅₀-Wert von 5,47 ± 0,04 bestimmt. Die pEC₅₀-Werte der anderen drei Agonisten lagen entsprechend höher. Folgende Werte wurden hier ermittelt: für ATP: pEC₅₀ = 7,06 ± 0,06; für UTP: pEC₅₀ = 7,51 ± 0,06 und für UDP: pEC₅₀ = 7,02 ± 0,04. Die OVCAR-3-Zellen reagierten somit am empfindlichsten auf eine Stimulation mit UTP, gefolgt von ATP und UDP, welche sich in diesem Experiment als vergleichsweise äquipotent erwiesen, da sich die jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurven nicht signifikant voneinander unterschieden. Aufällig ist, dass die OVCAR-3-Zellen sehr viel sensitiver für UDP waren als die HEY-Zellen, was darauf hindeutete, dass ein für UDP sensitiver P2Y-Rezeptorsubtyp ebenfalls in den OVCAR-3-Zellen exprimiert und funktionell aktiv ist.

Tabelle 43: Übersicht zu den im Calcium-Assay ermittelten EC₅₀- und pEC₅₀-Werte für die Agonisten ATP, UTP, ADP und UDP an der Zelllinie OVCAR-3. Gezeigt sind die mittleren EC₅₀- bzw. pEC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Agonist	EC ₅₀ [nM]	pEC ₅₀ ± SEM
ATP	87	7,06 ± 0,06
UTP	31	7,51 ± 0,06
ADP	3.350	5,47 ± 0,04
UDP	95	7,02 ± 0,04

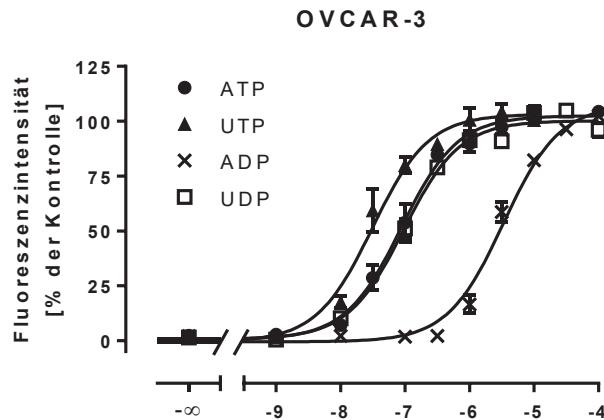


Abbildung 98: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, ADP und UDP bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der mit ATP bzw. UTP bzw. ADP bzw. UDP maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tabelle 44 vergleicht die an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 bestimmten EC₅₀-Werte für ATP, UTP, ADP und UDP mit denen ebenfalls in dieser Arbeit bestimmten EC₅₀-Werte für die jeweiligen P2Y-Rezeptorsubtypen. Als Vergleich wurden die etablierten Überexpressionszelllinien 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁, 1321N1-P2Y₂, 1321N1-Flpln-C2-P2Y₄, 1321N1-Flpln-C2-P2Y₆, 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁₁, 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁₂ und 1321N1-Flpln-C2-P2Y₁₃ herangezogen, um eine Aussage zu funktionell aktiven P2Y-Rezeptorsubtypen in den Ovarialkarzinom-Zelllinien zu treffen.

Anhand der ermittelten EC₅₀-Werte für die Nukleotide an den Zelllinien HEY und OVCAR-3, lässt sich ableiten, dass in beiden Zelllinien ein P2Y-Rezeptorsubtyp exprimiert und funktionell aktiv ist, welcher sowohl für ATP als auch für UTP sensitiv ist. Zudem ist in der Zelllinie OVCAR-3 ebenfalls ein UDP-sensitiver P2Y-Rezeptorsubtyp exprimiert und funktionell aktiv.

Tabelle 44: Vergleich der mittels Calcium-Assay bestimmten EC₅₀-Werte für die Nukleotide ATP, UTP, ADP und UDP an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 mit den EC₅₀-Werten der jeweiligen rekombinanten P2Y-Rezeptorsubtyp-exprimierenden 1321N1-Zelllinie. Gezeigt sind die mittleren EC₅₀- bzw. pEC₅₀-Werte (Mittelwerte \pm SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Mit „/“ = nicht bestimmt.

	EC ₅₀ [nM]									
	HEY	OVCAR-3	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃	
ATP	107	87	1.600	25	181	/	53	/	/	
UTP	64	31	/	10	2	150	/	/	/	
ADP	5.200	3.350	400	/	/	/	/	98	577	
UDP	1.800	95	/	/	/	11	/	/	/	

Tabelle 44 zeigt, dass es nur zwei Rezeptorsubtypen gab, welche empfindlich auf eine Stimulation mit ATP und auch mit UTP reagiert hatten: P2Y₂ und P2Y₄. In der Literatur sind sowohl ATP als auch UTP als physiologische Agonisten für diese beiden Rezeptoren bekannt (5,6). Dabei sind ATP und UTP als vergleichsweise äquipotent am P2Y₂-Rezeptor und UTP potenter als ATP am P2Y₄-Rezeptor beschrieben. Dieses Verhalten wurde für die beiden Triphosphate bestätigt, indem die jeweiligen EC₅₀-Werte an den Überexpressionszelllinien 1321N1-P2Y₂ und 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₄ ermittelt wurde. Am P2Y₂-Rezeptor wurden folgende EC₅₀ bestimmt: ATP: EC₅₀ = 25 nM und UTP: EC₅₀ = 10 nM. Für den P2Y₄-Rezeptor waren die Werte wie folgt: ATP: EC₅₀ = 181 nM und UTP: EC₅₀ = 2 nM. Der P2Y₄-Rezeptor war somit für UTP etwa 90-fach sensitiver als für ATP. Sowohl an der Zelllinie HEY als auch an der Zelllinie OVCAR-3 erwiesen sich die beiden Nukleotide ATP und UTP als vergleichsweise äquipotent (HEY: EC₅₀ = 107 nM (ATP) und EC₅₀ = 64 nM (UTP); OVCAR-3: EC₅₀ = 87 nM (ATP) und EC₅₀ = 31 nM (UTP)). Der P2Y₂-Rezeptor ist somit in den Zelllinien HEY und OVCAR-3 funktionell aktiv. ADP, als nativer physiologischer Agonist am P2Y₁-Rezeptor (5,6), wies an der Überexpressionszelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁ eine EC₅₀ von 400 nM auf, siehe Tabelle 44. Demgegenüber lag die EC₅₀ für ADP an der Zelllinie HEY mit 5.200 nM um etwa 13-fach höher. An der Zelllinie OVCAR-3 wurde für ADP eine EC₅₀ von 3.350 nM bestimmt, welche fast neunmal höher war als die EC₅₀, welche im rekombinanten Zellsystem bestimmt wurde. Aufgrund der Ergebnisse in Tabelle 44 wird geschlussfolgert, dass der P2Y₁-Rezeptor in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 nicht funktionell aktiv ist, obwohl dieser exprimiert zu sein scheint, siehe Kapitel 4.3.1.

Eine Expression bzw. funktionelle Aktivität anderer ADP-sensitiver P2Y-Rezeptoren, wie beispielsweise des P2Y₁₂- oder des P2Y₁₃-Rezeptors, wurde aufgrund der mangelnden Sensitivität der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen gegenüber ADP ebenfalls ausgeschlossen. Die EC₅₀-Werte der Überexpressionszelllinien lagen bei 98 nM (1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₂) bzw. bei 577 nM (1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₃).

Ob der ATP-sensitive P2Y₁₁-Rezeptor in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien vorlag und funktionell aktiv ist, konnte an dieser Stelle durch Betrachten der EC₅₀ für ATP (EC₅₀ = 53 nM (1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₁), EC₅₀ = 107 nM (HEY), EC₅₀ = 87 nM (OVCAR-3)) nicht eindeutig geklärt werden und wurde in einem nachfolgenden Antagonismus-Experiment, bei dem NF340 als potenter und selektiver P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonist (85,98) eingesetzt wurde, weiter untersucht.

Der UDP-sensitive P2Y₆-Rezeptor war nur in den OVCAR-3-Zellen vorhanden und funktionell aktiv. Hier ließ sich für UDP eine EC₅₀ von 95 nM bestimmen. Für die HEY-Zellen lag die EC₅₀ von UDP mit 1.800 nM deutlich höher, siehe Tabelle 44. Am P2Y₆-Überexpressionsklon wurde eine EC₅₀ von 11 nM für UDP bestimmt und lag damit in der gleichen Größenordnung wie die

EC_{50} für UDP bestimmt an den OVCAR-3-Zellen.

Durch den Einsatz verschiedener P2Y-Rezeptor-Antagonisten wurde in den nachfolgenden Experimenten überprüft, ob sich die Agonist-induzierten Calcium-Signale blockieren ließen. Neben Suramin, als unspezifischer P2-Rezeptor-Antagonist (5,36,40), wurden auch NF340 als selektiver P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonist (87,98) sowie der zuvor in Rahmen dieser Arbeit identifizierte P2Y₂-Rezeptor-Antagonist NF272 als auch der deutlich selektivere P2Y₂-Rezeptor-Antagonist AR-C118925 (45) und der P2X₇-Rezeptor-Antagonist A740003 (148) für die Versuche verwendet. Wie erwartet, blockierte der P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonist NF340 (100 μ M) in beiden Zelllinien weder das ATP- noch das UTP-induzierte Calcium-Signal, siehe Abbildung 99. Die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten unterschieden sich nicht signifikant von dem Fluoreszenzsignal der dazugehörigen Kontrolle. UTP ist kein physiologischer Agonist am P2Y₁₁-Rezeptor. Deshalb wurde an dieser Stelle auch keine Inhibierung des UTP-induzierten Calcium-Signals durch NF340 erwartet. Der Versuch wurde als Kontrollexperiment durchgeführt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der P2Y₁₁-Rezeptor weder in der HEY- noch in der OVCAR-3-Zelllinie funktionell aktiv vorhanden ist, was in Einklang mit den Expressionsdaten steht. Ebenso wurde erwartungsgemäß in beiden Zelllinien das ATP-induzierte Calcium-Signal nicht durch 100 μ M A740003 inhibiert. Eine funktionale Aktivität des P2X₇-Rezeptors konnte an dieser Stelle somit ebenfalls ausgeschlossen werden. 100 μ M Suramin und auch 100 μ M NF272 blockierten erwartungsgemäß in beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien sowohl das ATP- als auch das UTP-induzierte Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 99). In den HEY-Zellen inhibierte 100 μ M Suramin das Calcium-Signal auf etwa 40% des jeweiligen Kontrollssignals und 100 μ M NF272 reduzierten die Signale auf etwa 30% des entsprechenden Kontrollssignals. Für die OVCAR-3-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Durch eine Präinkubation mit 100 μ M Suramin wurde das Calcium-Signal auf 60% des ATP-induzierten Kontrollssignals bzw. auf 55% des UTP-induzierten Kontrollssignals reduziert. Durch eine Behandlung mit 100 μ M NF272 wurde hier das ATP-induzierte Calcium-Signal auf etwa 10% des Kontrollssignals reduziert und unterschied sich damit nicht mehr signifikant von dem Signal, welches durch die Injektion von Puffer alleine hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 99). 100 μ M NF272 blockierte somit vollständig den P2Y₂-Rezeptor in den OVCAR-3-Zellen. Auf der anderen Seite wurde das UTP-induzierte Calcium-Signal in den Zellen auf 20% des UTP-Kontrollssignals inhibiert und unterschied sich somit deutlich von dem Signal, welches durch die Injektion von Puffer alleine hervorgerufen wurde. Der P2Y₂-Rezeptor wurde an dieser Stelle noch nicht vollständig blockiert. 100 μ M AR-C118925 inhibierte das ATP-induzierte Calcium-Signal in den HEY- und in den OVCAR-3-Zellen erwartungsgemäß vollständig, siehe Abbildung 99. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Suramin und NF272 für die beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 wurden bereits in Kapitel 4.2.4 gezeigt.

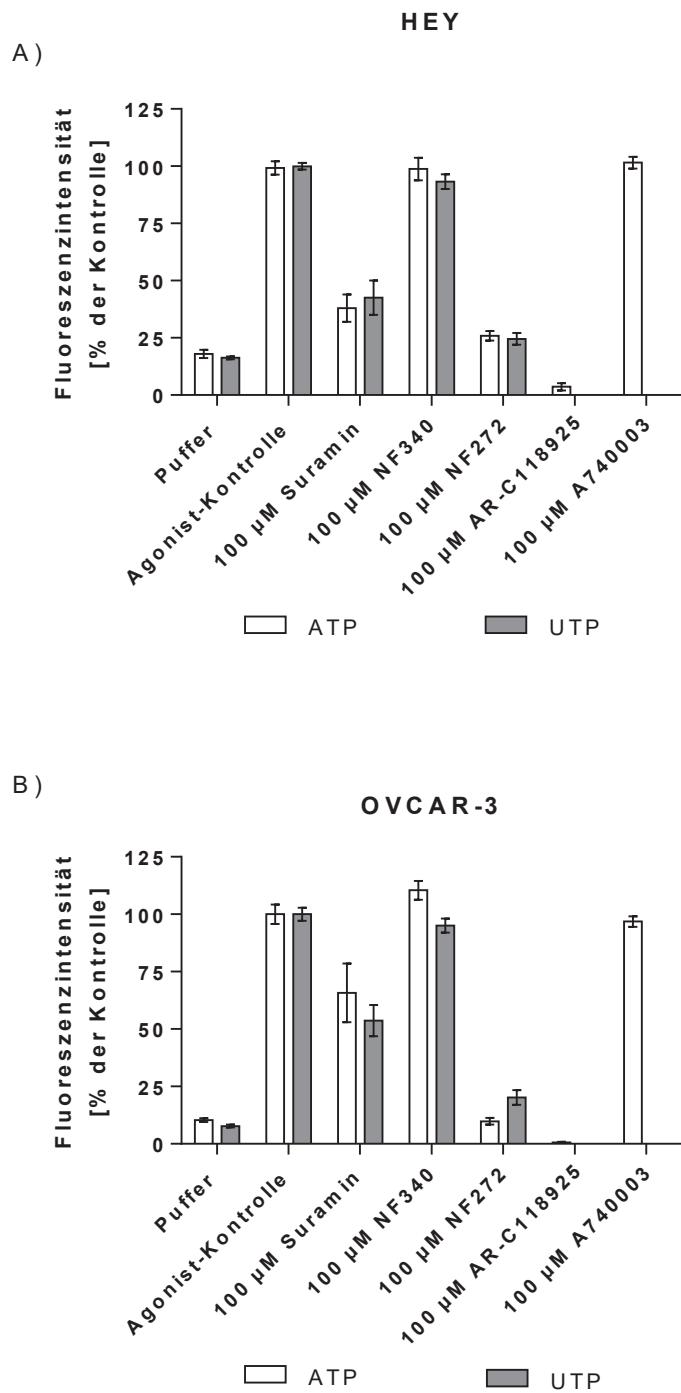


Abbildung 99: Inhibitorische Effekte von Suramin, NF340, NF272, AR-C118925 und A740003 im Calcium-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). A) Als Standardagonist wurde entweder 200 nM ATP (weißer Balken) oder 150 nM UTP (grauer Balken) verwendet. B) Als Standardagonist wurde entweder 200 nM ATP (weißer Balken) oder 80 nM UTP (grauer Balken) verwendet. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP- bzw. UTP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die Versuche mit den Verbindungen AR-C118925 und A740003 wurden von P. Surrechatchaiyan und auch nur in Gegenwart von ATP durchgeführt.

Es wurde nachgewiesen, dass NF272 sowohl im nativen als auch im rekombinanten Zellsystem den P2Y₂-Rezeptor blockiert und sich die IC₅₀- sowie pIC₅₀-Werte bzw. pK_i-Werte nicht signifikant voneinander unterscheiden. An den HEY-Zellen wies NF272 eine IC₅₀ von 20 µM (n = 3; pIC₅₀ = 4,69 ± 0,07) und an den OVCAR-3-Zellen von IC₅₀ = 23 µM (n = 3; pIC₅₀ = 4,65 ± 0,05) auf, siehe Tabelle 35 und Tabelle 36.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von AR-C118925 in Gegenwart von 100 µM ATP an den beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 sind in Abbildung 100 gezeigt. Die durch 100 µM ATP induzierte Calcium-Antwort in den Zellen wurde durch den Antagonisten AR-C118925 erwartungsgemäß konzentrationsabhängig inhibiert. Für die HEY-Zellen wurde eine IC₅₀ von 9,9 µM (n = 3, pIC₅₀ = 5,00 ± 0,02) und für die OVCAR-3-Zellen eine IC₅₀ = 5,8 µM (n = 3, pIC₅₀ = 5,81 ± 0,04) bestimmt. Die daraus berechneten K_i-Werte liegen bei 10 nM für die HEY- und 5 nM für die OVCAR-3-Zellen, welche somit in einer ähnlichen Größenordnung wie die durch *Rafehi et al.* publizierten Daten von 37,2 nM (pA₂ = pK_B = 10^{-7,43} nM, entsprechend 37,2 nM) lagen (45).

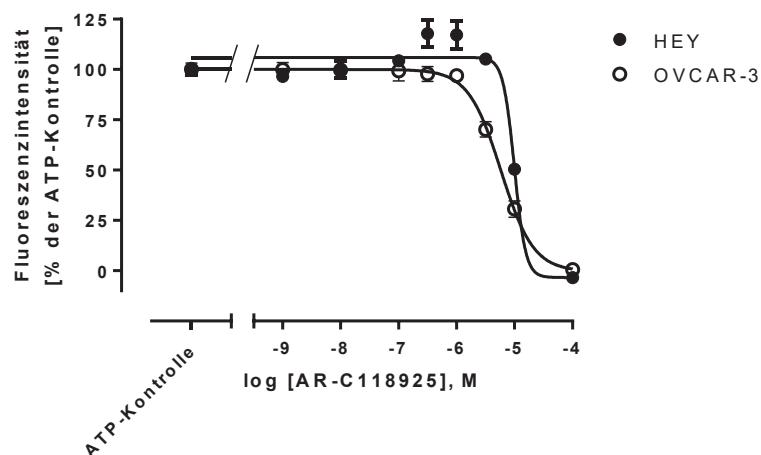


Abbildung 100: Konzentrations-Inhibition-Kurven von AR-C118925 an den Zelllinien HEY und OVCAR-3. Die durch 100 µM ATP hervorgerufene Calcium-Antwort wurde durch den Antagonisten AR-C118925 konzentrationsabhängig inhibiert. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch ATP-Stimulation maximal erreichten Antwort. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Die funktionelle Integrität des P2Y₂-Rezeptors in den Zelllinien HEY und OVCAR-3 wurde somit, wie zuvor beschrieben, eindeutig nachgewiesen.

4.3.3 Bestimmung der Zytotoxizität verschiedener Testsubstanzen

4.3.3.1 Vorversuche

Nukleotide können über verschiedenste Wege degradiert (13) und verstoffwechselt werden. Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass UTP einerseits als instabil (40) beschrieben wird und andererseits sehr schnell unter physiologischen Bedingungen abgebaut wird (149). Aus diesem Grund wurden HEY- und OVCAR-3-Zellen zunächst über 72 Stunden mit ATP bzw. UTP behandelt. Dabei wurde das ATP- bzw. UTP-haltige Zellkulturmedium entweder für die gesamte Inkubationszeit auf den Zellen belassen oder alle 24 Stunden gewechselt. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Zellen im MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) vermessen. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven sind in den nachstehenden Abbildung 101 und Abbildung 102 gezeigt. Die unterschiedlichen Bedingungen (ohne Mediumwechsel bzw. mit Mediumwechsel alle 24 Stunden) üben keinen signifikanten Effekt auf die IC_{50} - bzw. die pIC_{50} -Werte aus. Für die Zelllinie HEY wurden dabei folgende Werte bestimmt: IC_{50} (ATP 72 h) = 156 μ M, IC_{50} (ATP alle 24 h neu) = 145 μ M; IC_{50} (UTP 72 h) = 1.339 μ M, IC_{50} (UTP alle 24 h neu) = 1.344 μ M; und für die Zelllinie OVCAR-3: IC_{50} (ATP 72 h) = 243 μ M, IC_{50} (ATP alle 24 h neu) = 304 μ M; IC_{50} (UTP 72 h) = 3.686 μ M, IC_{50} (UTP alle 24 h neu) = 2.773 μ M

Tabelle 45: IC_{50} - und pIC_{50} -Werte von ATP und UTP bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3. ATP bzw. UTP wurde entweder für 72 Stunden auf den Zellen belassen (= ohne Mediumwechsel) oder das ATP/UTP-haltige Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

	ATP		UTP	
	IC_{50} [μ M]	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50} [μ M]	$pIC_{50} \pm$ SEM
HEY				
Ohne Mediumwechsel	156	3,81 \pm 0,02	1.339	2,87 \pm 0,10
Mediumwechsel alle 24 h	146	3,84 \pm 0,02	1.344	2,87 \pm 0,06
OVCAR-3				
Ohne Mediumwechsel	242	3,62 \pm 0,04	3.686	2,46 \pm 0,09
Mediumwechsel alle 24 h	304	3,52 \pm 0,04	2.773	2,56 \pm 0,09

Es wurde ebenso gezeigt, dass sich die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte nicht überlappen, siehe Tabelle 45. Dies zeigt, dass eine Substanzzugabe für 72 Stunden den gleichen Effekt auf die Zellviabilität der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen hat, wie eine dreimalige Substanzzugabe nach 0, 24 oder 48 Stunden. Die korrespondierenden pIC_{50} -Werte von $3,81 \pm 0,02$ (ATP 72 h) bzw. $3,84 \pm 0,02$ (ATP alle 24 h neu) bzw. von $2,87 \pm 0,1$ (UTP 72 h) bzw. $2,87 \pm 0,06$ (UTP alle 24 h neu) für die HEY-Zellen unterschieden sich nicht signifikant voneinander, siehe Abbildung 101. Selbiges galt für die OVCAR-3-Zellen, siehe Abbildung 102. Hier unterschieden sich die korrespondierenden

pIC_{50} -Werte auch nicht signifikant voneinander: $3,62 \pm 0,04$ (ATP 72 h) bzw. $3,52 \pm 0,04$ (ATP alle 24 h neu) für ATP und $2,46 \pm 0,09$ (UTP 72 h) bzw. $2,56 \pm 0,09$ (UTP alle 24 h neu) für UTP.

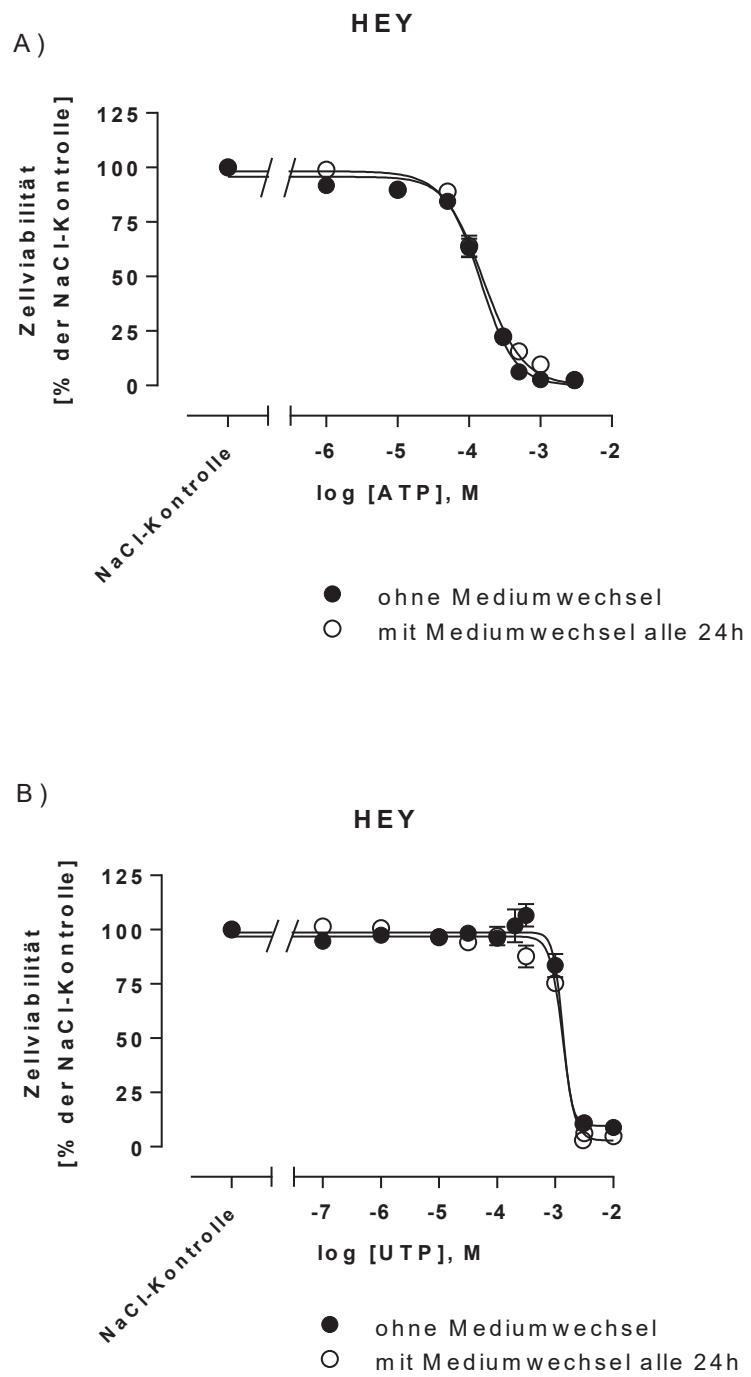


Abbildung 101: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP (A) und UTP (B) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit ATP oder UTP behandelt, dabei wurde das Zellkulturmedium entweder nicht (●) oder alle 24 Stunden (○) gewechselt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

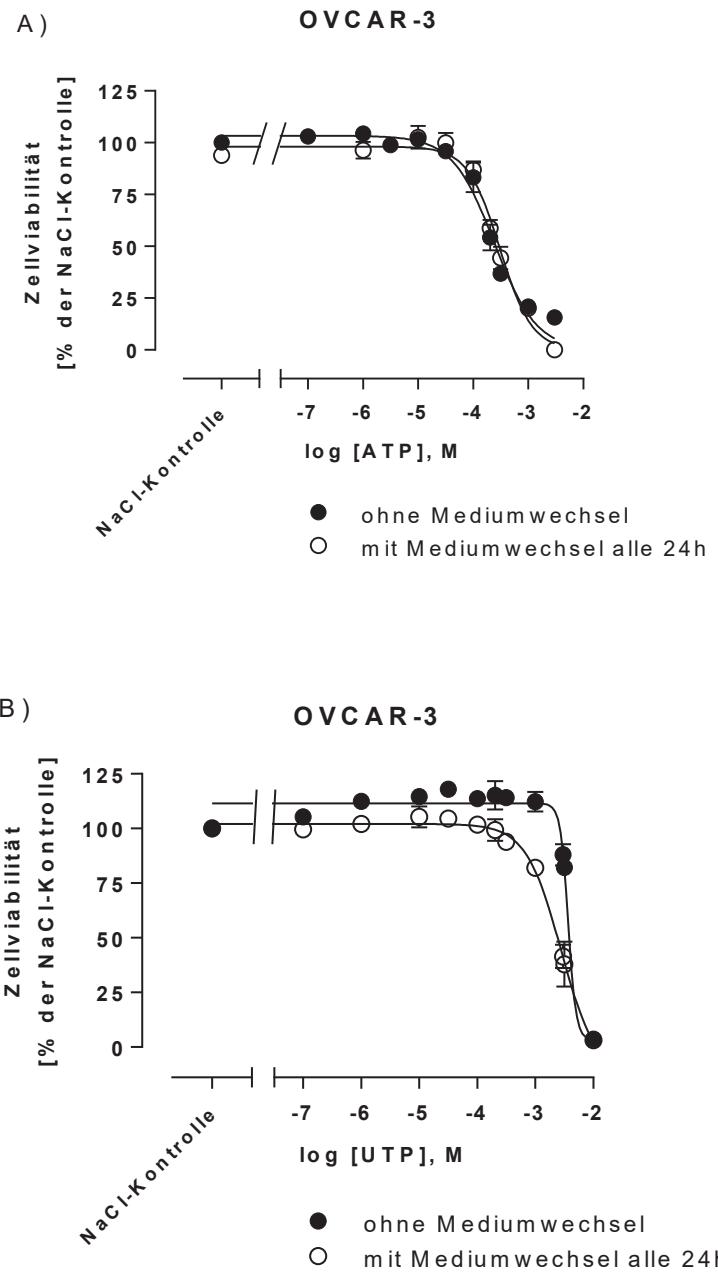


Abbildung 102: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP (A) und UTP (B) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit ATP oder UTP behandelt, dabei wurde das Zellkulturmedium entweder nicht (●) oder alle 24 Stunden (○) gewechselt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Der 24-stündige Austausch des ATP- oder UTP-haltigen Nährmediums wurde in Hinblick auf die weiter geplanten Versuche aufgrund der nicht voneinander abweichenden IC_{50} -und pIC_{50} -Werte als nicht notwendig erachtet.

4.3.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität von ATP, UTP, Suramin und NF272

Im nächsten Schritt wurde die Zytotoxizität von ATP, UTP, Suramin und NF272 bestimmt. Abbildung 103 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven der vier genannten Substanzen für die beiden Zelllinien. Tabelle 46 gibt eine Übersicht zu den jeweiligen IC_{50} - und pIC_{50} -Werten. ATP erwies sich an der Zelllinie HEY etwa um das Zehnfache toxischer als UTP ($IC_{50} = 145 \mu M$ (ATP) bzw. $IC_{50} = 1.710 \mu M$ (UTP)).

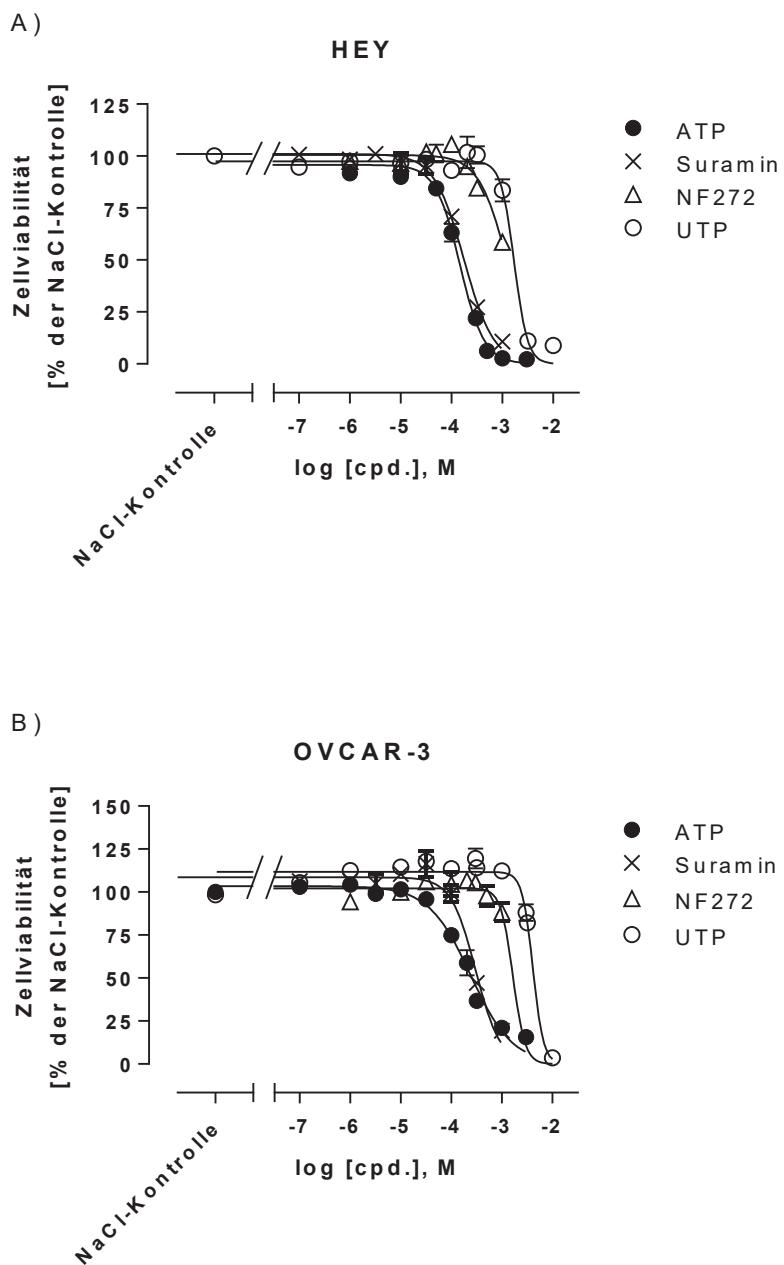


Abbildung 103: Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP, UTP, Suramin und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den genannten Substanzen behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Suramin zeigte im Vergleich zu dem Suramin-Derivat NF272 ebenfalls eine um den Faktor 10 höhere Zytotoxizität. Hier wurden IC_{50} -Werte von 174 μM für Suramin und 1.220 μM für NF272 bestimmt. Die Zytotoxizität der oben genannten Substanzen wurde ebenfalls an der Zelllinie OVCAR-3 untersucht. Auch hier war ATP toxischer als UTP. Die IC_{50} von ATP lag bei 240 μM wohingegen UTP eine IC_{50} von 4.010 μM aufwies. Auch Suramin zeigte sich an dieser Zelllinie mit einer IC_{50} von 304 μM toxischer als das von ihm abgeleitete Derivat NF272. Hier lag die IC_{50} bei 1.786 μM , siehe Abbildung 103 B und Tabelle 46.

Tabelle 46: Zytotoxizität von ATP, UTP, Suramin und NF272 bestimmt mittels MTT-Assay nach 72-stündiger Inkubationszeit an den Zelllinien HEY und OVCAR-3. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

	HEY		OVCAR-3	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm SEM$	IC_{50}	$pIC_{50} \pm SEM$
ATP	145 μM	3,84 \pm 0,02	240 μM	3,62 \pm 0,04
UTP	1.710 μM	2,77 \pm 0,03	4.010 μM	2,39 \pm 0,05
Suramin	174 μM	3,76 \pm 0,03	304 μM	3,52 \pm 0,04
NF272	1.220 μM	2,91 \pm 0,04	1.786 μM	2,75 \pm 0,30

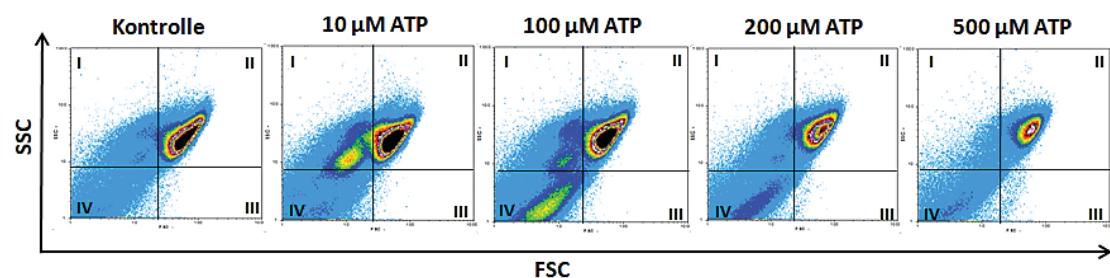
4.3.4 Effekte extrazellulärer Nukleotide

4.3.4.1 Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte von ATP

Zunächst wurden die konzentrationsabhängigen Effekte von ATP an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Zelllinien wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP bzw. Medium als Kontrolle behandelt, siehe Abbildung 104. Teilungsfähige und intakte Zellen sind im Quadrant II visualisiert. Durch die 48-stündige Behandlung mit 10 μM ATP veränderten die HEY-Zellen ihre Größe und marginal die Granularität. Ebenso wurde eine zweite Zellpopulation in Quadrant I detektiert. Nach der Behandlung mit 100 μM ATP zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Anzahl lebender Zellen war im Vergleich zur Kontrolle wesentlich geringer. Die höhere ATP-Konzentration hatte einen stärkeren Einfluss sowohl auf die Größe als auch auf die Granularität der Zellen. Die zweite Population, welche unter der Behandlung mit 10 μM ATP entstand, nahm ab. Dafür wurde eine dritte Zellpopulation im Quadrant IV detektiert, die aus deutlich kleineren und weniger granulären Zellen bestand. Nach der Behandlung mit 200 μM bzw. 500 μM ATP wurde in Quadrant II nur eine Zellpopulation detektiert, jedoch mit einer wesentlich geringeren Anzahl an viablen Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die OVCAR-3-Zellen wurden ebenfalls so behandelt und analy-

siert, siehe Abbildung 104 B. Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten eine einheitliche und scharf abgegrenzte Population lebender und viabler Zellen im Quadrant II. Nach der 48-stündigen Behandlung mit 10 μ M ATP erschien im Dotplot eine kleinere, zweite Zellpopulation (Quadrant I und II). Die Zellen wiesen zwar die gleiche Granularität auf, waren aber kleiner als die der Hauptpopulation. Nach der Behandlung mit 100 μ M ATP wurde eine ähnliche Verteilung der Zellen detektiert. Die Anzahl der Zellen in der ersten Population (Quadrant II) war in diesem Fall geringer und in der zweiten Population höher. Nach der Behandlung mit 200 μ M bzw. 500 μ M ATP nahm die Anzahl der lebenden Zellen innerhalb der Zellpopulation im Quadrant II deutlich ab. Dahingegen nahm die Anzahl der Zellen der zweiten Population (Quadrant I und II) zu.

A) HEY



B) OVCAR-3

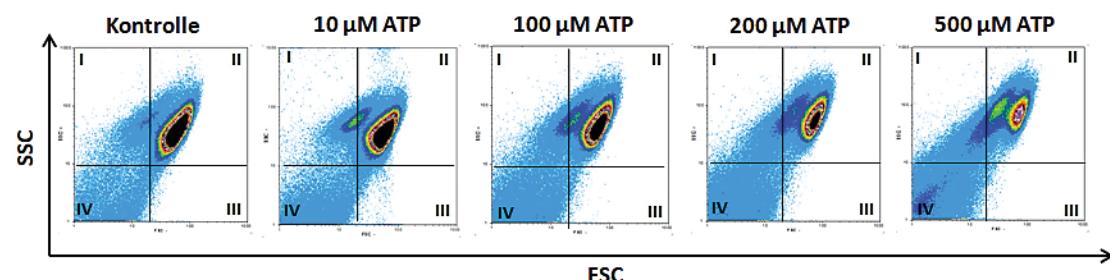


Abbildung 104: Sidescatter vs. Forwardscatter Dotplot. HEY-Zellen (A) bzw. OVCAR-3-Zellen (B) wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M) oder Medium als Kontrolle behandelt. Die verschiedenen Zellpopulationen wurden im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) analysiert. Die Anzahl der Zellen in Quadrant II wurde für die Auswertung des Experiments herangezogen, dabei wurde die Anzahl der Zellen in Quadrant II der Kontrolle als 100% gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Repräsentative Bilder aus einer Reihe an drei bzw. zwei unabhängigen Experimenten sind hier gezeigt.

Die Anzahl der lebenden und teilungsfähigen Zellen wurde bezogen auf die Kontrolle normiert und in einem Balkendiagramm dargestellt, siehe Abbildung 105. Die Anzahl lebender und teilungsfähiger Zellen in Quadrant II der unbehandelten Kontrollzellen wurde für diese Auswer-

tung immer gleich 100% gesetzt. 10 μ M ATP verursachte einen schwachen, allerdings nicht signifikanten proliferationsfördernden Effekt um ca. 12% im Vergleich zur Kontrolle an den HEY-Zellen. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten der HEY-Zellen zwischen der Kontrolle und den 100 μ M ATP behandelten Zellen beobachtet. Demgegenüber wurde das Proliferationsverhalten der HEY-Zellen durch 200 μ M ATP und auch 500 μ M ATP signifikant beeinflusst. Unter 200 μ M ATP wurde das Zellwachstum um 35% und durch 500 μ M ATP sogar um fast 65% reduziert. Ein ähnliches Resultat zeigte sich auch für die OVCAR-3 Zellen. Auch hier reduzierten 200 μ M ATP bzw. 500 μ M ATP das Zellwachstum um 55% bzw. 70% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Ebenso reduzierte an dieser Zelllinie 100 μ M ATP das Zellwachstum bereits um etwa 40%, siehe Abbildung 105 B. Nach der Behandlung mit 10 μ M ATP wurde ebenfalls eine geringere Anzahl lebender und teilungsfähiger Zellen detektiert, jedoch unterschied sich diese nicht signifikant von der Kontrolle. Nach einer Behandlung mit ATP über 48 Stunden wurde einerseits das Zellwachstum der HEY- und OVCAR-3-Zellen durch höhere Konzentrationen an ATP (200 μ M oder 500 μ M) signifikant reduziert. Andererseits veränderten sich die Zellen hinsichtlich ihrer Form und Granularität unter einer Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen an ATP (10 μ M oder 100 μ M).

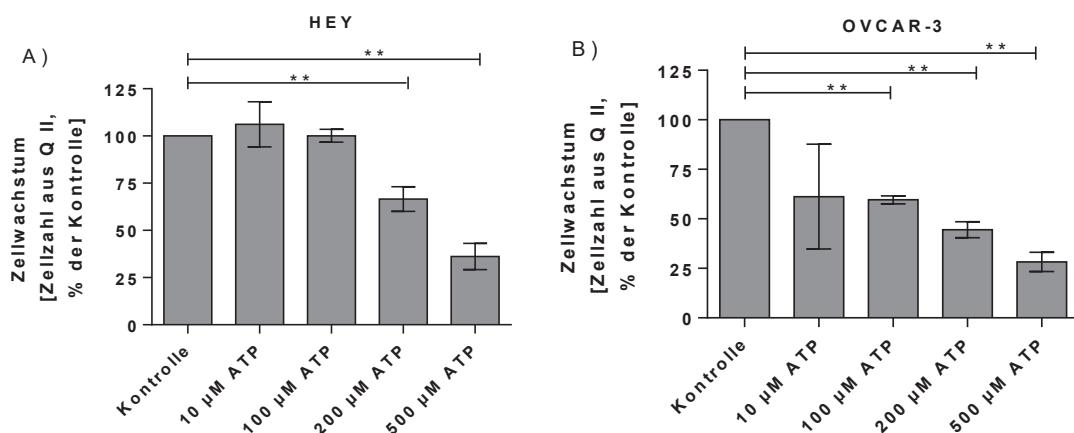


Abbildung 105: Auswirkung einer 48-stündigen Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen ATP auf das Wachstum, hier die Zellzahl aus Quadrant II (Q II), der HEY-Zellen (A) und OVCAR-3-Zellen (B). Gezeigt sind normierte Mittelwerte \pm SEM von drei bzw. zwei unabhängigen Experimenten bezogen auf die Kontrolle. ** p < 0,01

In einem weiteren Versuch wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) bestimmt, nachdem diese Zellen für 0, 24, 48 und 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von ATP (0, 10, 50, 100, 200 μ M) behandelt wurden. An dieser Stelle wurde somit ebenfalls untersucht, welchen Einfluss ATP auf das Proliferationsverhalten der jeweiligen Zelllinie ausübte. In Abbildung 106 sind die gemittelten absoluten Absorptionswerte gezeigt. ATP

inhibierte das Wachstum der HEY-Zellen und auch das der OVCAR-3-Zellen sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Der stärkste Effekt zeigte sich hierbei 48 bzw. 72 Stunden nach Beginn der ATP-Behandlung. 10 und 50 μ M ATP beeinflussten das Proliferationsverhalten bei der Zelllinien nicht. Die beiden Kurven waren deckungsgleich mit der Wachstumskurve der Mediumkontrolle (= 0 μ M ATP). Erst höhere Konzentrationen an ATP (100 μ M bzw. 200 μ M) inhibierten das Zellwachstum deutlich nach 48 bzw. 72 Stunden. Die Verläufe dieser Proliferationskurven unterschieden sich deutlich von der Verlaufskurve der jeweiligen Mediumkontrolle.

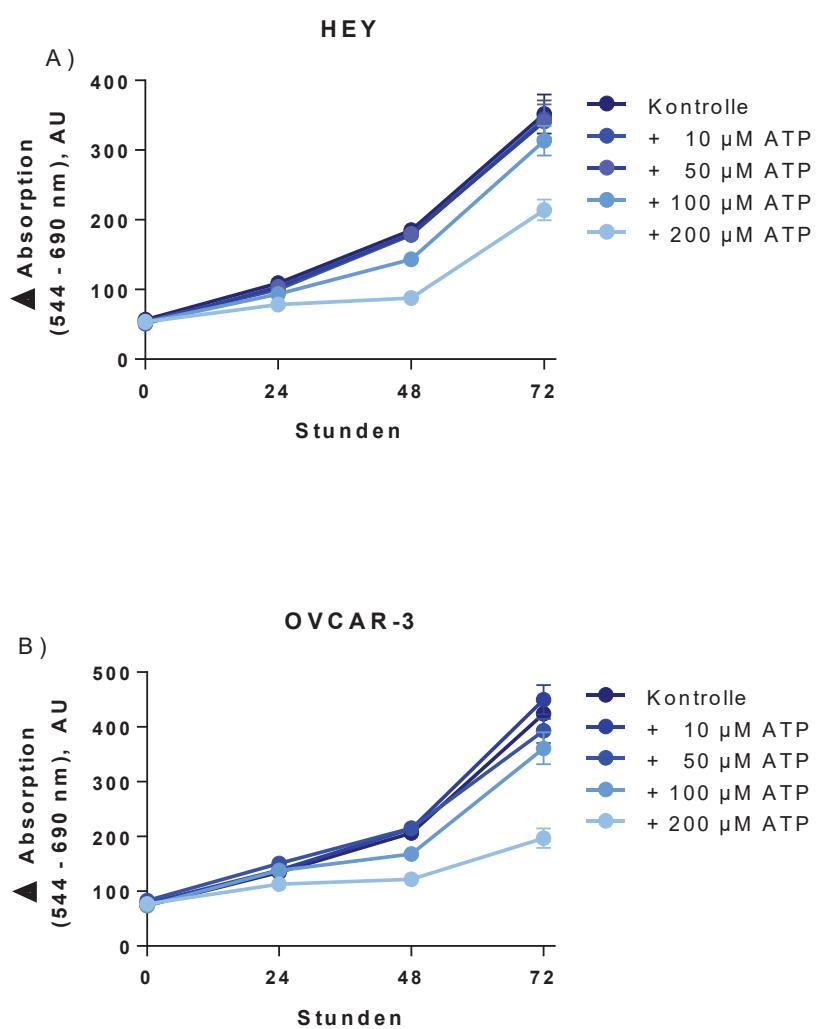


Abbildung 106: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von ATP auf die Viabilität der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen. HEY-Zellen (A) und OVCAR-3-Zellen (B) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von ATP behandelt. Gezeigt sind die gemittelten Absorptionswerte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten mit je 6 Replikaten.

4.3.4.2 Zeit- und Konzentrationsabhängige Effekte von UTP und ADP

Analog zu der in Kapitel 4.3.4.1 beschriebenen ATP-Behandlung wurde ebenfalls der Einfluss von UTP und von ADP auf das Wachstumsverhalten der beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien untersucht, siehe Abbildung 107 und Abbildung 108.

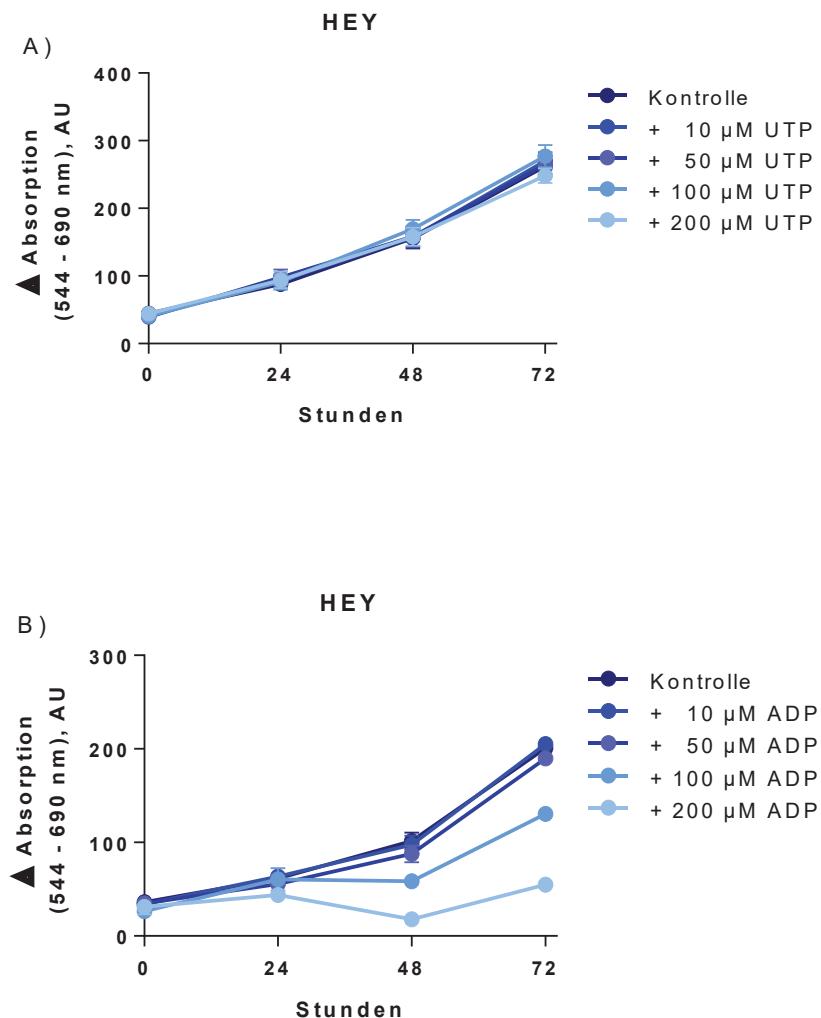


Abbildung 107: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von UTP und ADP auf die Viabilität der HEY-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit UTP (A) oder mit ADP (B) in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Gezeigt sind die gemittelten Absorptionswerte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten mit je sechs Replikaten.

Dabei wurden die zuvor gewählten Konzentrationen ebenfalls verwendet und die Zellviabilität jeweils nach 0, 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Wie in Abbildung 107 A zu erkennen ist, beeinflusst UTP in dem gewählten Konzentrationsbereich (10, 50, 100 bzw. 200 μ M) das Proliferationsverhalten der HEY-Zellen nicht. Weder zeit- noch konzentrationsabhängige Effekte sind hier für UTP zu beobachten. Die fünf Wachstumskurven liegen deckungsgleich übereinander.

Demgegenüber inhibiert ADP das Proliferationsverhalten der HEY-Zellen deutlich. Auch hier wurden zeit- und konzentrationsabhängige Effekte für ADP ausgemacht, siehe Abbildung 107 B. Die stärksten Effekte waren ebenfalls nach 48 bzw. 72 Stunden mit 100 μ M bzw. 200 μ M ADP zu sehen. 10 μ M und 50 μ M ADP beeinflussten das Wachstum der HEY-Zellen nicht. Die Wachstumskurven unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollkurve. Für die OVCAR-3-Zellen wurden ähnliche Effekte wie für die HEY-Zellen bestimmt. Auch hier beeinflusste UTP im gewählten Konzentrationsbereich das Wachstumsverhalten der OVCAR-3-Zellen nicht. Es wurden weder zeit- noch konzentrationsabhängige Effekte beobachtet. Die Proliferationskurven lagen auch hier übereinander, siehe Abbildung 108 A.

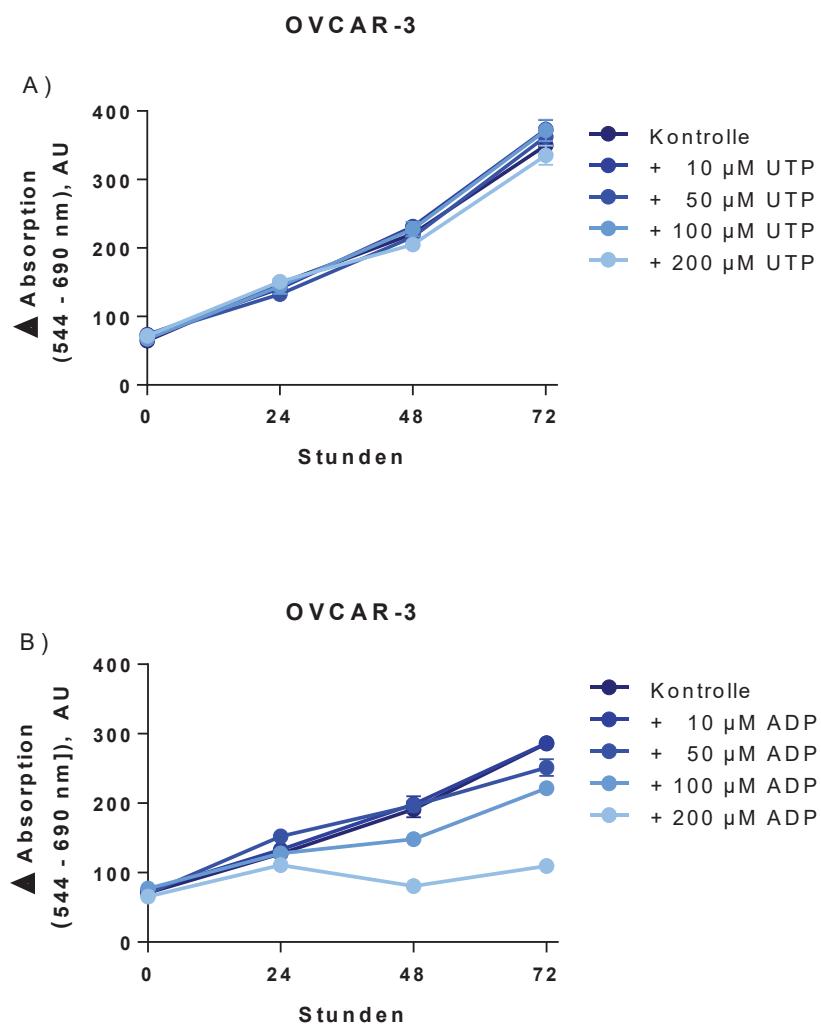


Abbildung 108: Konzentrations- und zeitabhängige Effekte von UTP und ADP auf die Viabilität der OVCAR-3-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit UTP (A) oder mit ADP (B) in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Gezeigt sind die gemittelten Absorptionswerte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten mit je sechs Replikaten.

In Abbildung 108 B sind die Wachstumskurven der OVCAR-3-Zellen unter einer Behandlung mit ADP gezeigt. 10 μ M und auch 50 μ M ADP beeinflussten das Zellwachstum nicht. 100 μ M und 200 μ M ADP inhibierten das Zellwachstum zeitabhängig (nach 48 bzw. 72 Stunden). Aufgrund der negativen Ergebnisse mit UTP wurden keine Experimente mit UDP an den beiden Zelllinien durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass analog zu ATP auch ADP das Proliferationsverhalten der HEY-Zellen und der OVCAR-3-Zellen sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig inhibierte. Die deutlichsten Effekte wurden nach 48 bzw. nach 72 Stunden und bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μ M bzw. 200 μ M ADP bestimmt. Niedrige Konzentrationen (10 μ M und 50 μ M ADP) beeinflussten das Zellwachstum nicht. UTP zeigte an beiden Zelllinien weder konzentrations- noch zeitabhängige Effekte auf das Wachstumsverhalten der Zellen in dem gewählten Konzentrationsbereich.

4.3.4.3 Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin, Paclitaxel bzw. Topotecan

Da das Ovarialkarzinom unter anderem mit einer Chemotherapie bestehend aus einer Platin-Verbindungen, Topotecan oder auch Paclitaxel therapiert wird, wurde zunächst für die Zelllinien HEY und OVCAR-3 die Zytotoxizität dieser drei Chemotherapeutika (in dieser Arbeit wird als Platin-Verbindung Cisplatin eingesetzt) mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) bestimmt. Aus den erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven wurden die resultierenden IC_{50} -Werte abgeleitet. Die nachstehenden Abbildung 109 und Abbildung 110 zeigen die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven für die jeweilige Zelllinie.

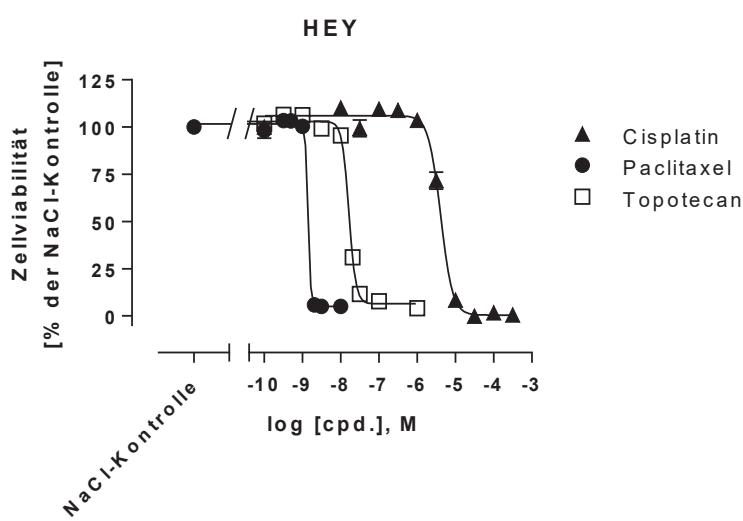


Abbildung 109: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den genannten Zytostatika behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

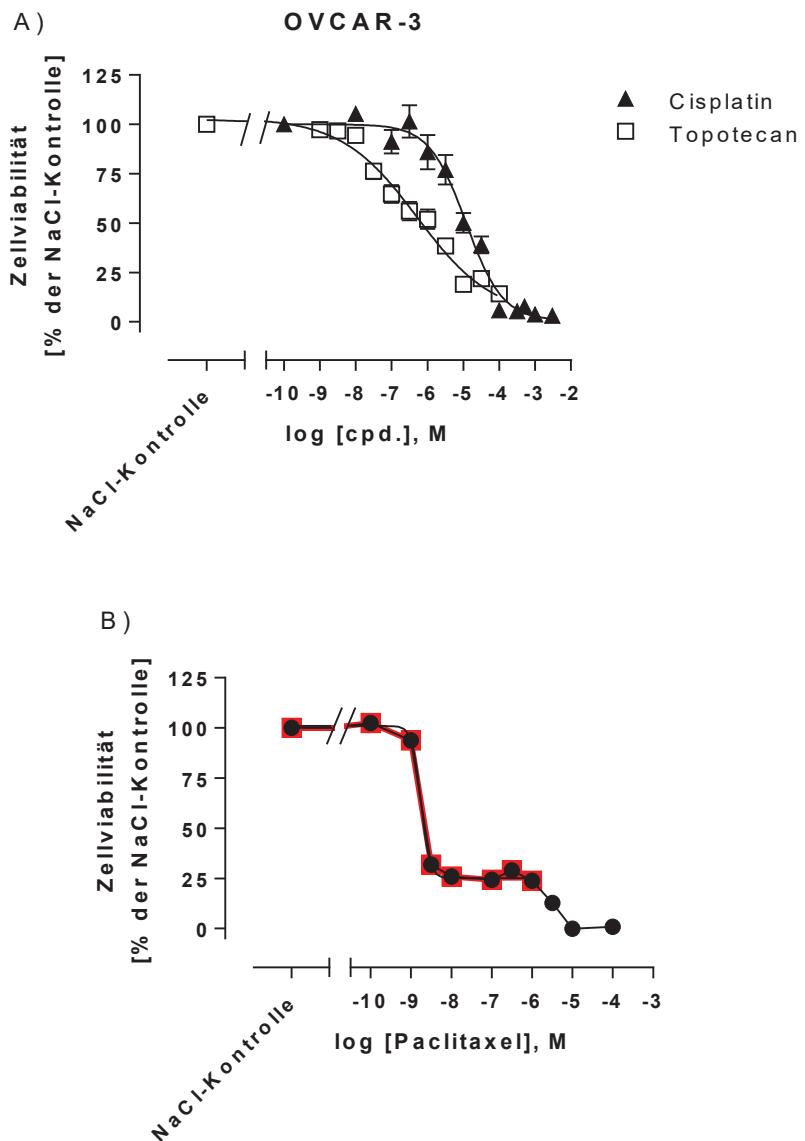


Abbildung 110: Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den genannten Zytostatika behandelt. A) zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin und Topotecan und B) die von Paclitaxel. In Rot sind die Punkte dargestellt, welche für die Bestimmung der IC_{50} herangezogen wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 47 fasst die daraus abgeleiteten IC_{50} - und pIC_{50} -Werte zusammen. An der Zelllinie HEY wurde für Cisplatin ein pIC_{50} -Wert von $5,39 \pm 0,02$ ermittelt. Für Topotecan lag die pIC_{50} bei $7,78 \pm 0,01$ und für Paclitaxel bei $pIC_{50} = 8,85 \pm 0,07$, siehe Abbildung 109 und Tabelle 47. Wie erwartet, reagierten die HEY-Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zytostatika weniger sensitiv auf eine Behandlung mit Cisplatin. In der Literatur wurde bereits eine gewisse Resistenz gegenüber Cisplatin beschrieben (92).

Tabelle 47: Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

	HEY		OVCAR-3	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
Cisplatin	4,1 µM	5,39 ± 0,02	12 µM	4,93 ± 0,08
Topotecan	16,5 nM	7,78 ± 0,01	516 nM	6,29 ± 0,22
Paclitaxel	1,41 nM	8,85 ± 0,07	1,7 nM	8,75 ± 0,03

Die jeweiligen IC₅₀-Werte für Paclitaxel und Topotecan lagen dabei im unteren nanomolaren Bereich. Demgegenüber wies Cisplatin eine deutlich höhere IC₅₀- (IC₅₀ = 4,1 µM) im unteren mikromolaren Bereich auf. Für die Zelllinie OVCAR-3 wurde für Cisplatin ein pIC₅₀-Wert von 4,93 ± 0,08 und für Topotecan ein pIC₅₀-Wert von 6,29 ± 0,22 bestimmt, siehe Abbildung 110 A und Tabelle 47. Die OVCAR-3-Zellen sind laut Literatur als resistent gegenüber klinisch relevanten Konzentrationen an Cisplatin beschrieben (95), was sich anhand der hier ermittelten IC₅₀- von 12 µM bestätigen ließ.

Die Konzentrations-Effekt-Kurve für Paclitaxel ist in Abbildung 110 B separat dargestellt, da sie nicht den klassischen sigmoidalen Verlauf aufwies, sondern über zwei Wendepunkte verfügte. Im Bereich zwischen 10 nM und 1 µM weist die Kurve ein zweites Plateau auf. In diesem Konzentrationsbereich zeigten die OVCAR-3-Zellen eine gewisse Toleranz bzw. Resistenz gegenüber dem Zytostatikum. Bei höheren Paclitaxel-Konzentrationen nahm die Zellviabilität wieder ab. Da die überwiegende Mehrzahl an Zellen (etwa 75%) im Bereich des ersten Wendepunktes erfasst wird, wurde entschieden zum Erstellen der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve, welche zum Ermitteln der IC₅₀-Konzentration herangezogen werden sollte, nur den ersten Teil der Kurve (in rot dargestellt) heranzuziehen. Die so bestimmte IC₅₀ von 1,7 nM wurde als Referenz für die nachfolgenden Experimente verwendet.

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss eine 48-stündige Präinkubation von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan bzw. Paclitaxel ausübte. Das Zeitintervall für die Präinkubation wurde aufgrund der Ergebnisse in Kapitel 4.3.4.1 gewählt, da erste Effekte auch hier nach 48 Stunden zu beobachten waren. Es wurden zwei fixe Konzentrationen an ATP gewählt, 100 µM bzw. 200 µM. An den HEY-Zellen lagen diese beiden Konzentrationen um die IC₅₀ herum (IC₅₀ (ATP) = 145 µM). Für die OVCAR-3-Zellen lagen beide Konzentrationen unterhalb der IC₅₀ von 240 µM. Aufgrund der stärker ausgeprägten proliferationshemmenden Effekte von ATP an der OVCAR-3-Zelllinie, siehe Kapitel 4.3.4.1, wurde hier die Konzentration an ATP für dieses Experiment bei 100 µM und 200 µM belassen und nicht

erhöht. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde mittels MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.6.4) bestimmt. Die Abbildung 111 und Abbildung 112 zeigen die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven für die beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien. In den Tabelle 48 und Tabelle 49 sind die jeweils daraus abgeleiteten IC_{50} - und die pIC_{50} -Werte gezeigt.

Nach Behandlung der HEY-Zellen mit 200 μM ATP wurde das Top-Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zu der Kontrolle deutlich niedriger detektiert. Das Wachstum dieser Zellen wurde verglichen mit dem Wachstum der unbehandelten Zellen (= Kontrolle) um etwa 40% reduziert. Dagegen wurde die Proliferation der Zellen nach der Behandlung mit 100 μM ATP nicht beeinflusst, siehe Abbildung 111. Weiter war eine deutliche Linksverschiebung der Cisplatin-Konzentrations-Effekt-Kurven unter der ATP-Behandlung zu erkennen. Anhand der unbehandelten Kontrollzellen wurde für Cisplatin ein pIC_{50} -Wert von $5,30 \pm 0,02$ mit einer IC_{50} von 5,0 μM bestimmt. Durch 100 μM ATP wurde der pIC_{50} -Wert auf $5,59 \pm 0,02$ erhöht und die IC_{50} entsprechend auf 2,5 μM erniedrigt. Für 200 μM ATP wurde ein pIC_{50} -Wert von $5,95 \pm 0,05$ mit einer IC_{50} von 1,1 μM bestimmt. Durch die 48-stündige Präinkubation mit 100 μM ATP und anschließender Coinkubation mit Cisplatin wurde die IC_{50} für Cisplatin von 5,0 μM um den Faktor 2 signifikant auf 2,5 μM reduziert. 200 μM ATP reduzierte die Cisplatin IC_{50} sogar um den Faktor 4,5 von 5,0 μM auf 1,1 μM , siehe Tabelle 48. Für Topotecan wurde anhand der Kontrollzellen ein pIC_{50} -Wert von $7,59 \pm 0,01$ ($IC_{50} = 26 \text{ nM}$), für die mit 100 μM ATP-behandelten Zellen ein pIC_{50} -Wert von $7,62 \pm 0,01$ ($IC_{50} = 24 \text{ nM}$) und für die mit 200 μM ATP behandelten Zellen ein pIC_{50} -Wert von $7,73 \pm 0,02$ ($IC_{50} = 19 \text{ nM}$) bestimmt. Hier wurde durch die ATP-Behandlung die IC_{50} von Topotecan nicht signifikant beeinflusst. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Verwendung von Paclitaxel als Zytostatikum. Für Paclitaxel wurde anhand der Kontrollzellen ein pIC_{50} -Wert von $8,75 \pm 0,02$ ($IC_{50} = 1,8 \text{ nM}$), für mit 100 μM ATP behandelte Zellen ein pIC_{50} von $8,88 \pm 0,02$ ($IC_{50} = 1,3 \text{ nM}$), und für mit 200 μM ATP behandelte Zellen ein pIC_{50} von $8,97 \pm 0,02$ ($IC_{50} = 1,1 \text{ nM}$), bestimmt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den pIC_{50} -Werten ermittelt.

Tabelle 48: Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan bzw. Paclitaxel bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit *** $p < 0,001$ (bezogen auf die jeweilige Kontrolle).

	Kontrolle		100 μM ATP		200 μM ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$pIC_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$pIC_{50} \pm \text{SEM}$
Cisplatin	5,0 μM	$5,30 \pm 0,02$	2,5 μM^{***}	$5,59 \pm 0,02$	1,1 μM^{***}	$5,95 \pm 0,05$
Topotecan	26 nM	$7,59 \pm 0,01$	24 nM	$7,62 \pm 0,01$	19 nM	$7,73 \pm 0,02$
Paclitaxel	1,8 nM	$8,75 \pm 0,02$	1,3 nM	$8,88 \pm 0,02$	1,1 nM	$8,97 \pm 0,02$

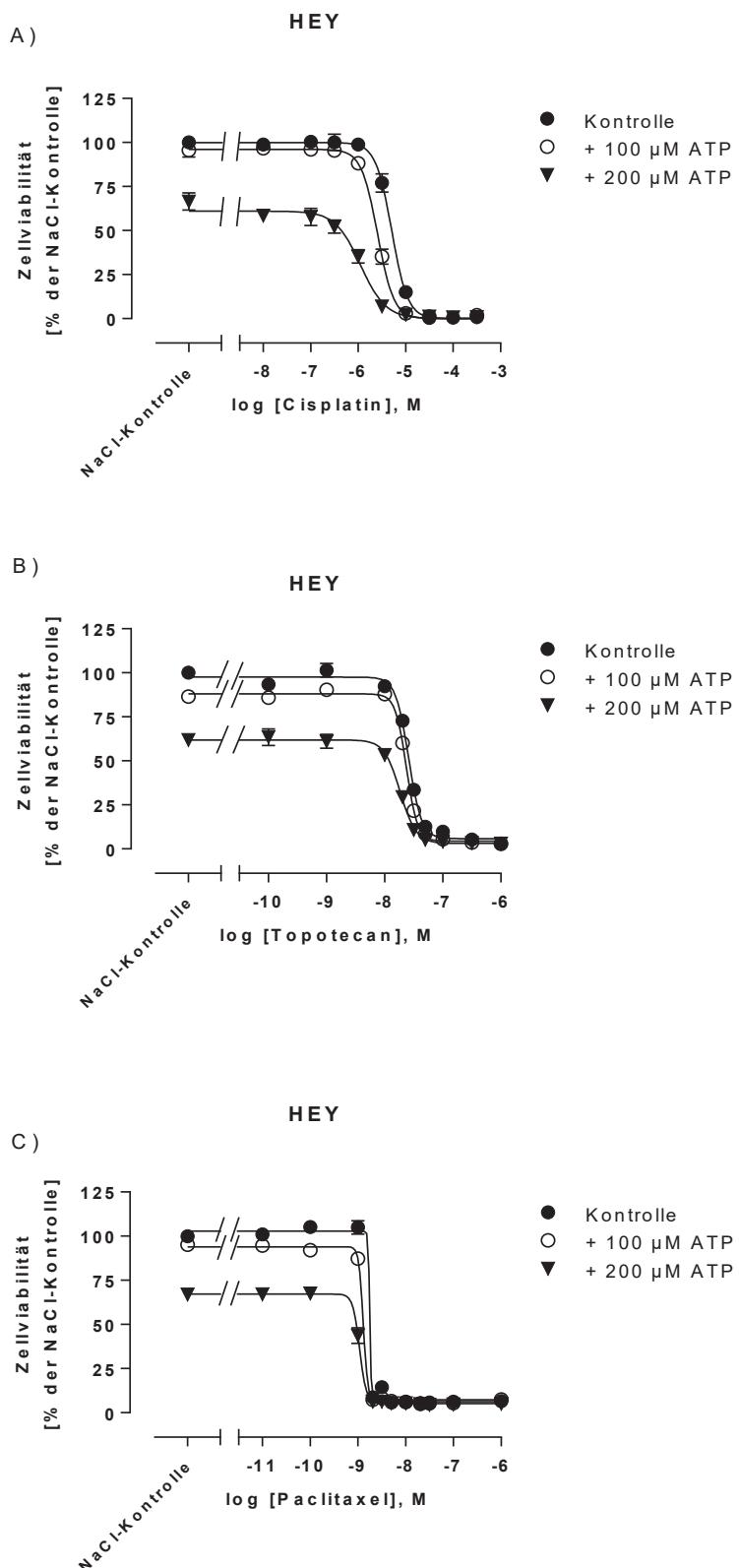


Abbildung 111: Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin (A), Topotecan (B) oder Paclitaxel (C) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. ATP (100 µM bzw. 200 µM) wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit dem jeweiligen Zytostatikum coinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

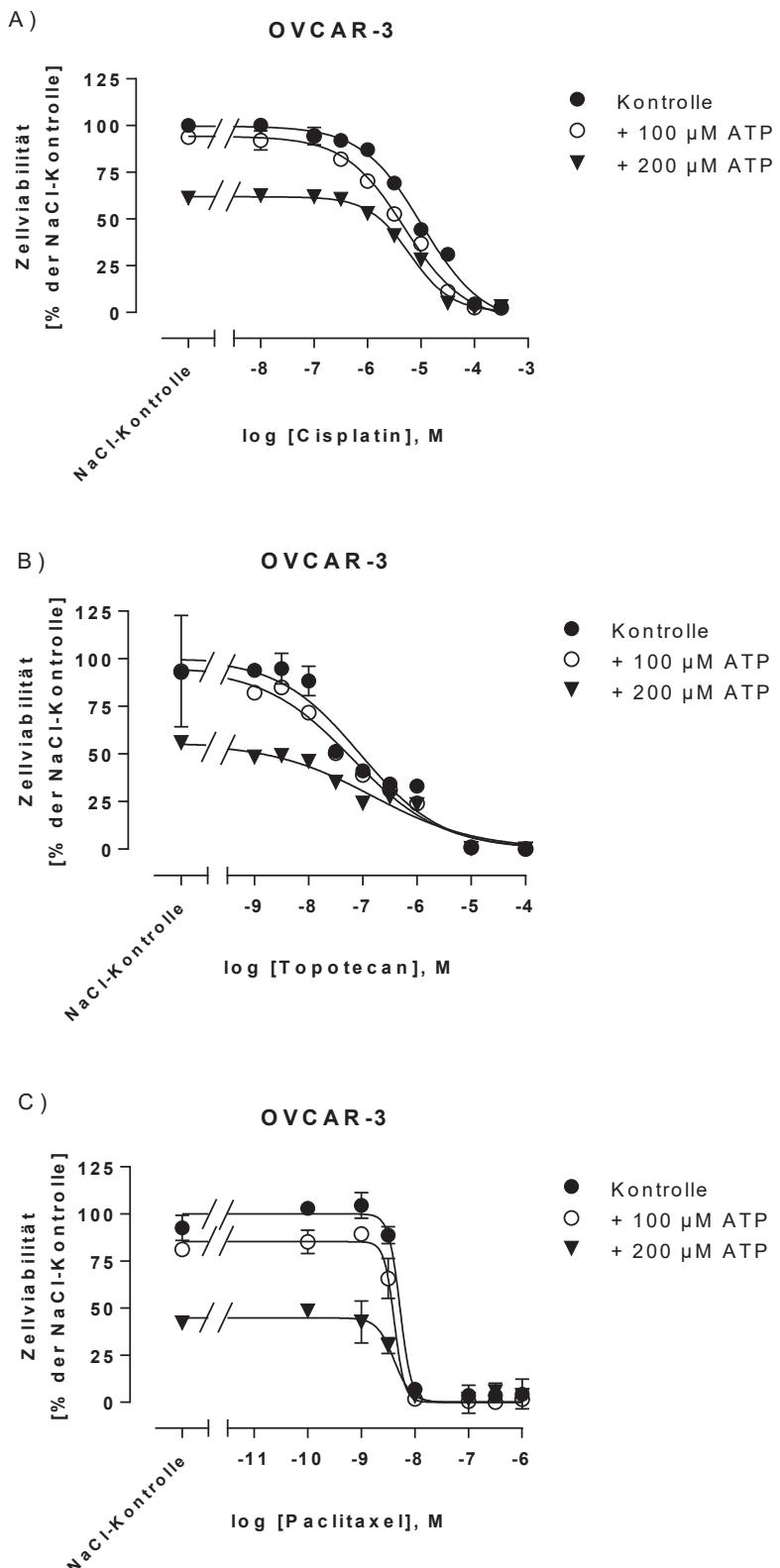


Abbildung 112: Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin (A), Topotecan (B) oder Paclitaxel (C) bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. ATP (100 µM bzw. 200 µM) wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit dem jeweiligen Zytostatikum coincubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 49: Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin, Topotecan bzw. Paclitaxel bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$ (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 μ M ATP		200 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
Cisplatin	10,5 μ M	4,98 \pm 0,06	5,0 μ M*	5,30 \pm 0,07	6,2 μ M*	5,21 \pm 0,05
Topotecan	89 nM	7,05 \pm 0,16	64 nM	7,19 \pm 0,21	152 nM	6,82 \pm 0,18
Paclitaxel	5,3 nM	8,28 \pm 0,05	4,1 nM	8,39 \pm 0,06	4,1 nM	8,34 \pm 0,08

In Abbildung 112 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin, Topotecan und Paclitaxel gezeigt, welche an der Zelllinie OVCAR-3 unter ATP-Behandlung bestimmt wurden. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin wurden durch die Behandlung mit ATP ebenfalls nach links verschoben. Der pIC_{50} -Wert der Kontrollzellen lag bei $4,98 \pm 0,06$ ($IC_{50} = 10,5 \mu$ M). Durch die Behandlung mit 100 μ M ATP wurde ein pIC_{50} -Wert von $5,30 \pm 0,07$ ($IC_{50} = 5,0 \mu$ M) und durch 200 μ M ATP von $5,21 \pm 0,05$ ($IC_{50} = 6,2 \mu$ M) erreicht. Folglich wurde durch 100 μ M ATP auch an dieser Zelllinie die Sensitivität von Cisplatin signifikant um den Faktor 2 erhöht. Demgegenüber wurde die Cisplatin-Zytotoxizität durch 200 μ M ATP nur marginal erhöht und nicht in dem Ausmaß, welches für die HEY-Zellen beobachtet wurde. Die IC_{50} wurde zwar signifikant von 10,5 μ M auf 6,2 μ M reduziert, der Shift-Faktor lag hier aber nur bei 1,6. Für Topotecan wurden die nachfolgenden Werte bestimmt. Die Kontrollzellen wiesen einen pIC_{50} -Wert von $7,05 \pm 0,16$ ($IC_{50} = 89$ nM), die mit 100 μ M ATP behandelten Zellen einen von $7,19 \pm 0,21$ ($IC_{50} = 64$ nM) und die mit 200 μ M behandelten Zellen wiesen einen pIC_{50} -Wert von $6,82 \pm 0,18$ ($IC_{50} = 152$ nM) auf. Die IC_{50} von Topotecan wurde hier durch die ATP-Behandlung nicht signifikant beeinflusst. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven unter der ATP-Behandlung für Paclitaxel sind in Abbildung 112 C gezeigt. Durch die Behandlung mit 100 μ M ATP wurde die pIC_{50} von $8,28 \pm 0,05$ ($IC_{50} = 5,3$ nM) auf $pIC_{50} = 8,39 \pm 0,06$ ($IC_{50} = 4,1$ nM) und durch 200 μ M ATP auf $pIC_{50} = 8,34 \pm 0,08$ ($IC_{50} = 4,1$ nM) reduziert. Es wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Zytotoxizität von Cisplatin an beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien durch eine 48-stündige Präinkubation von ATP (100 μ M bzw. 200 μ M) mit anschließender Coinkubation für 72 Stunden signifikant erhöht und im Umkehrschluss die IC_{50} von Cisplatin im Vergleich zu den allein mit Cisplatin behandelten Kontrollzellen signifikant reduziert wurde. Dieser Effekt wurde bei der Verwendung von Topotecan oder Paclitaxel als Zytostatikum nicht beobachtet.

4.3.4.4 Einfluss von ADP, UTP und UDP auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Aufgrund der zuvor für ATP erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Erhöhung der Cisplatin-Sensitivität an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde ebenfalls der Einfluss von ADP, UTP und UDP auf die Cisplatin-Sensitivität an den beiden Zelllinien untersucht. Die in Kapitel 4.3.4.3 beschriebenen Experimente wurden analog mit ADP, UTP bzw. UDP durchgeführt. Die für die Zelllinien HEY und OVCAR-3 erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin sind in den Abbildung 113 und Abbildung 114 gezeigt. Die Tabelle 50 und Tabelle 51 fassen die bestimmten IC_{50} - und pIC_{50} -Werte zusammen. Beide Zelllinien haben gemein, dass eine 48-stündige Präinkubation mit UTP bzw. UDP (100 μ M bzw. 200 μ M) mit anschließender Coinkubation mit Cisplatin für 72 Stunden die Zytotoxizität von Cisplatin nicht beeinflusste. An der Zelllinie HEY wurden folgende Werte bestimmt: die Kontrollzellen wiesen einen pIC_{50} -Wert von $5,33 \pm 0,03$ ($IC_{50} = 4,7 \mu$ M), unter der Behandlung mit 100 μ M UTP einen pIC_{50} von $5,30 \pm 0,04$ ($IC_{50} = 5,0 \mu$ M) und unter 200 μ M UTP einen pIC_{50} -Wert von $5,30 \pm 0,03$ ($IC_{50} = 5,0 \mu$ M) auf. Im zweiten Experiment wurde für die Kontrollzellen ein pIC_{50} -Wert von $5,23 \pm 0,03$ ($IC_{50} = 5,8 \mu$ M) für Cisplatin bestimmt. Nach der Behandlung mit 100 μ M UDP lag der Wert bei $pIC_{50} = 5,21 \pm 0,04$ ($IC_{50} = 6,1 \mu$ M) und mit 200 μ M UDP bei $pIC_{50} = 5,23 \pm 0,05$ ($IC_{50} = 5,8 \mu$ M). UTP und UDP hatten somit keinen Einfluss somit auf die Zytotoxizität von Cisplatin an der HEY-Zelllinie. Dieses Verhalten ließ sich auch für die OVCAR-3-Zellen beobachten. Nach der Behandlung mit UTP wurden folgende Werte bestimmt: Die Kontrollzellen wiesen einen pIC_{50} -Wert von $4,85 \pm 0,09$ ($IC_{50} = 14,0 \mu$ M) für Cisplatin auf. Für die mit 100 μ M UTP behandelten Zellen lag der pIC_{50} -Wert bei $5,08 \pm 0,09$ ($IC_{50} = 8,2 \mu$ M) und mit 200 μ M UTP bei $pIC_{50} = 5,16 \pm 0,08$ ($IC_{50} = 7,0 \mu$ M). Aufgrund des Überlappens der 95%-Konfidenzintervalle für die jeweiligen IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte sind diese Werte nicht signifikant unterschieden voneinander. Bei der Experimentenreihe mit UDP wurde für die Kontrollzellen ein pIC_{50} -Wert von $4,58 \pm 0,04$ ($IC_{50} = 26,2 \mu$ M) für Cisplatin bestimmt. Nach der Behandlung mit 100 μ M UDP wurde ein pIC_{50} -Wert von $6,64 \pm 0,05$ ($IC_{50} = 22,7 \mu$ M) für Cisplatin und mit 200 μ M UDP ein pIC_{50} -Wert von $4,67 \pm 0,05$ ($IC_{50} = 21,5 \mu$ M) für Cisplatin bestimmt. Die pIC_{50} -Werte waren nicht signifikant verschieden voneinander, da sich die 95%-Konfidenzintervalle der IC_{50} -Werte auch hier überlappten. Die Zytotoxizität von Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen wurde somit in den gewählten Konzentrationsbereichen weder durch UTP noch durch UDP beeinflusst. Im Gegensatz zu UTP und UDP wurde nach der Behandlung mit ADP eine Linksverschiebung der jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin an beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien beobachtet, siehe Abbildung 113 B und Abbildung 114 B. Für die HEY-Zellen wurde die IC_{50} für Cisplatin von 4,8 μ M ($pIC_{50} = 5,23 \pm 0,04$) der unbehandelten Zellen durch 100 μ M ADP signifikant auf 2,9 μ M ($pIC_{50} = 5,54 \pm 0,03$) und durch 200 μ M ADP signifikant auf 1,6 μ M ($pIC_{50} = 5,79 \pm 0,04$) reduziert.

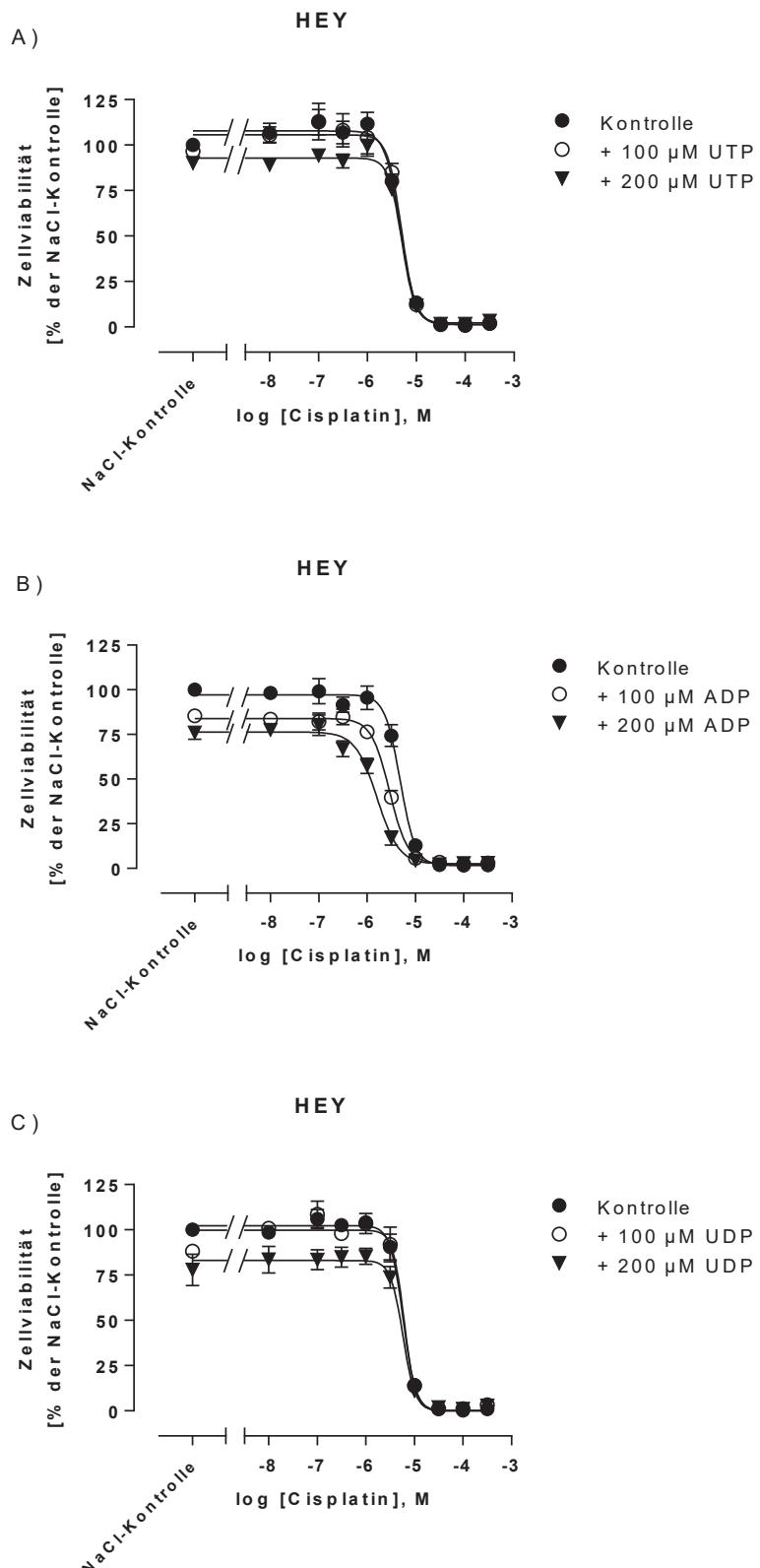


Abbildung 113: Einfluss von UTP (A), ADP (B) bzw. UDP (C) auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. Das jeweilige Nukleotid (100 μM bzw. 200 μM) wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

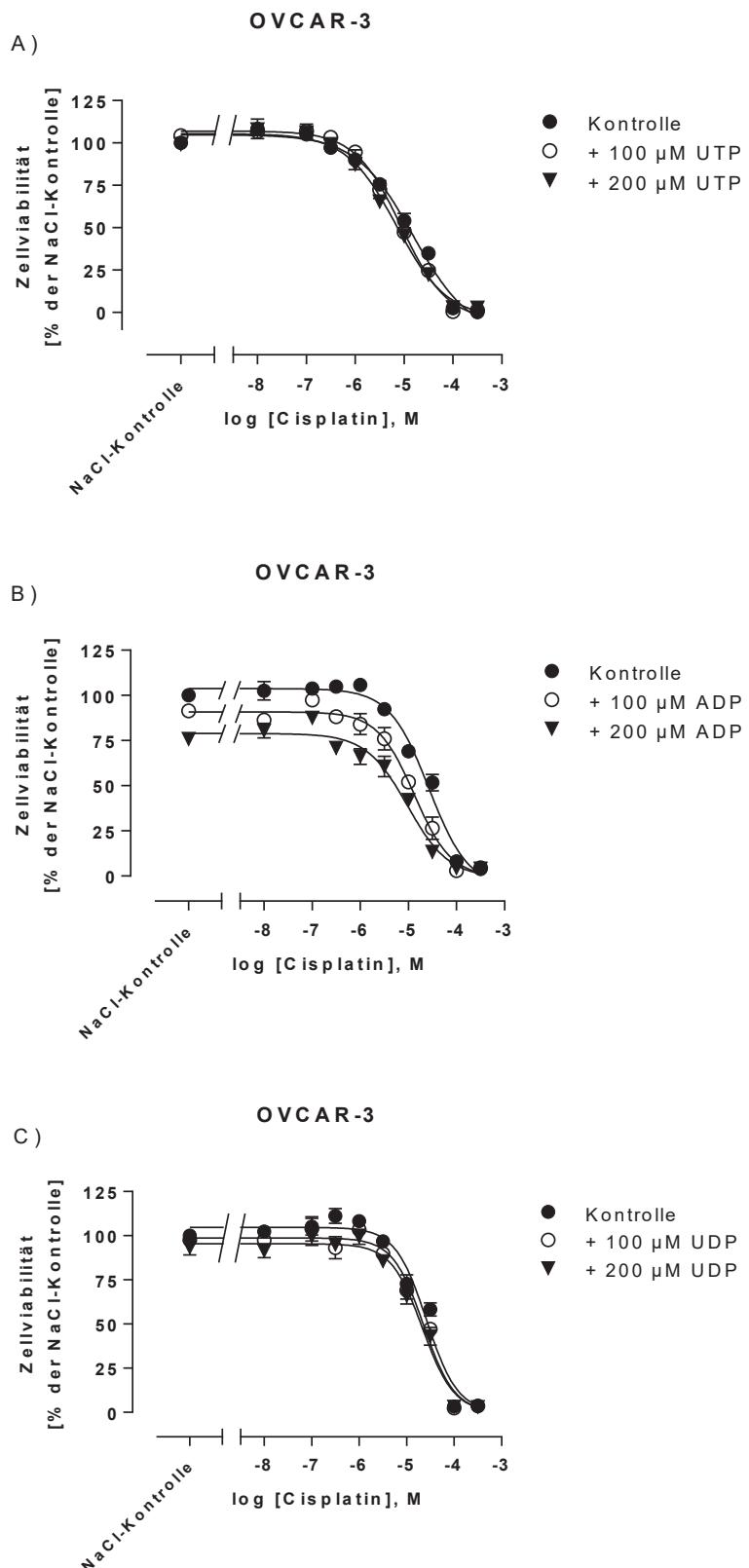


Abbildung 114: Einfluss von UTP (A), ADP (B) bzw. UDP (C) auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. Das jeweilige Nukleotid (100 µM bzw. 200 µM) wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinubiziert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 50: Effekt von UTP, ADP und UDP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit ** $p < 0,01$ (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 μ M cpd.		200 μ M cpd.	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
UTP	4,7 μ M	5,33 \pm 0,03	5,0 μ M	5,30 \pm 0,04	5,0 μ M	5,30 \pm 0,03
ADP	4,8 μ M	5,32 \pm 0,04	2,9 μ M**	5,54 \pm 0,03	1,6 μ M**	5,79 \pm 0,04
UDP	5,8 μ M	5,23 \pm 0,03	6,1 μ M	5,21 \pm 0,04	5,8 μ M	5,23 \pm 0,05

Tabelle 51: Effekt von UTP, ADP und UDP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$ (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 μ M cpd.		200 μ M cpd.	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
UTP	14,0 μ M	4,85 \pm 0,09	8,2 μ M	5,08 \pm 0,09	7,0 μ M	5,16 \pm 0,06
ADP	26,7 μ M	4,57 \pm 0,07	13,3 μ M*	4,87 \pm 0,07	9,5 μ M*	5,02 \pm 0,08
UDP	26,2 μ M	4,58 \pm 0,04	22,7 μ M	4,64 \pm 0,05	21,5 μ M	4,67 \pm 0,05

Dieser Sachverhalt wurde auch anhand der IC_{50} von Cisplatin für die OVCAR-3-Zellen beobachtet. Nach der Behandlung 100 μ M ADP wurde die Cisplatin- IC_{50} von 27,6 μ M ($pIC_{50} = 4,57 \pm 0,07$) der unbehandelten Zellen signifikant auf 13,3 μ M ($pIC_{50} = 4,87 \pm 0,07$) und mit 200 μ M ADP auf 9,5 μ M ($pIC_{50} = 5,02 \pm 0,08$) reduziert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Zytotoxizität von Cisplatin an beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien durch eine 48-stündige Präinkubation von ADP (100 μ M bzw. 200 μ M) mit anschließender Coinkubation für 72 Stunden ebenfalls signifikant erhöht wurde.

4.3.4.5 Zeitabhängiger Einfluss von ATP bzw. ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Weiter wurde untersucht, ob ein zeitabhängiger Aspekt bezüglich des Einflusses von ATP bzw. ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin existierte. Die zuvor gewählte Präinkubationszeit von 48 Stunden stellte einen recht langen Zeitraum dar. Entsprechend wurde nun untersucht, ob eine kurzzeitige Präinkubation von 6 Stunden auch ausreichte, um die Zytotoxizität von Cisplatin zu beeinflussen. Des Weiteren wurde evaluiert, ob in diesen Fällen (48- oder 6-stündige Präinkubation) eine anschließende Coinkubation mit Cisplatin zwingend erforderlich war, oder ob die ATP- bzw. ADP-Präinkubation alleine auch einen sensitivierenden Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin ausübte. Abschließend wurde noch analysiert, ob bereits lediglich eine 72-stündige Coinkubation von ATP bzw. ADP ausreichte, um die Konzentrations-Effekt-Kurven von Cisplatin nach links zu verschieben. So wurde überprüft, ob die Präinkubation zwingend notwendig war oder ob darauf verzichtet werden konnte.

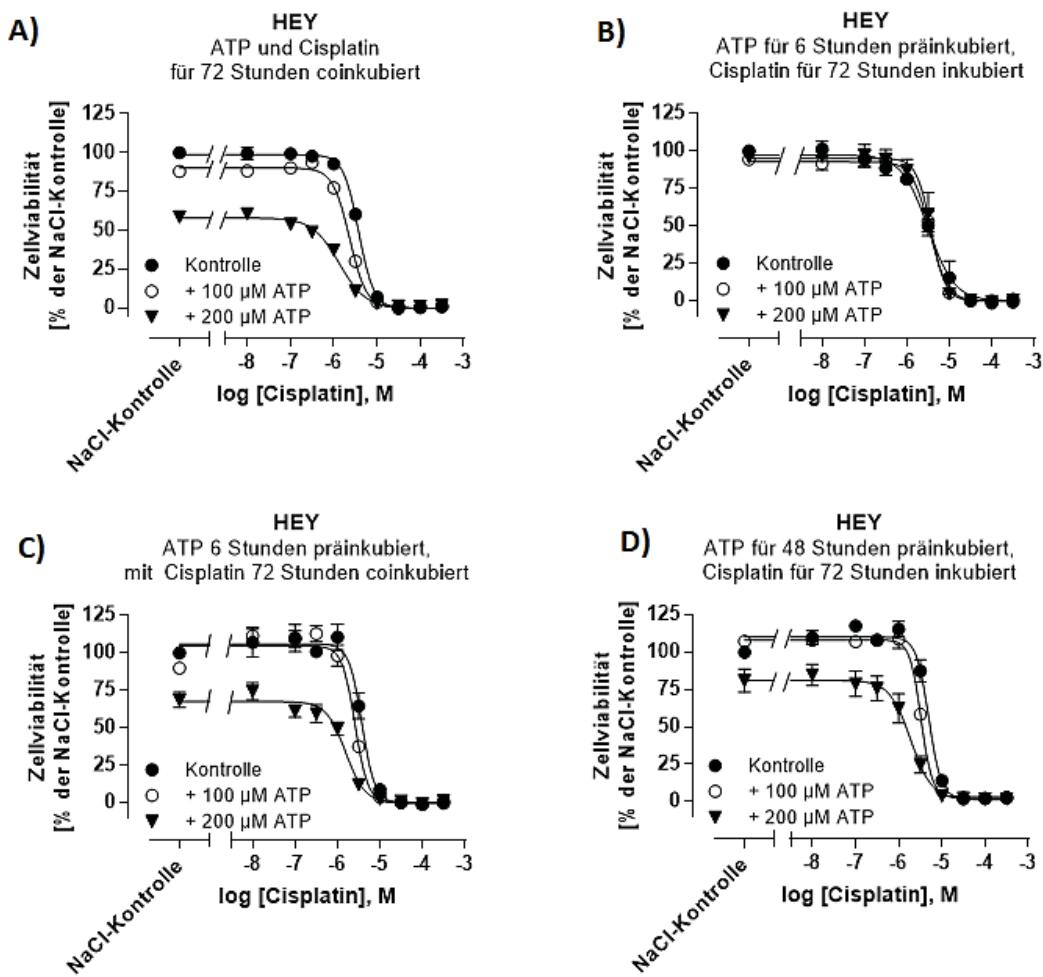


Abbildung 115: Zeitabhängiger Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. ATP (100 μ M bzw. 200 μ M) wurde entweder für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (A), nur für 6 Stunden präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (B), für 6 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (C) bzw. für 48 präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (D). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 52: Zeitabhängiger Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittleren IC_{50} und pIC_{50} -Werte von drei unabhängigen Experimenten.

Mit *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 μ M ATP		200 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm SEM$	IC_{50}	$pIC_{50} \pm SEM$	IC_{50}	$pIC_{50} \pm SEM$
48h Prä- und Coinkubation	5,0 μ M	5,30 \pm 0,02	2,5 μ M***	5,59 \pm 0,02	1,1 μ M***	5,95 \pm 0,05
48h Präinkubation	4,9 μ M	5,31 \pm 0,03	3,3 μ M*	5,49 \pm 0,02	1,9 μ M**	5,72 \pm 0,07
6h Prä- und Coinkubation	3,8 μ M	5,43 \pm 0,04	2,5 μ M*	5,60 \pm 0,03	1,6 μ M**	5,81 \pm 0,05
6h Präinkubation	3,1 μ M	5,50 \pm 0,05	3,4 μ M	5,46 \pm 0,03	3,7 μ M	5,43 \pm 0,04
Coinkubation	3,8 μ M	5,43 \pm 0,02	2,3 μ M***	5,64 \pm 0,02	1,3 μ M***	5,88 \pm 0,05

Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin sind in Abbildung 115 bis Abbildung 118 gezeigt. Die gemittelten IC_{50} - und pIC_{50} -Werte für jede Zelllinie sind in den Tabelle 52 bis Tabelle 55 gezeigt. Es wurden für jede Bedingung mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die 48-stündige Präinkubation von ATP mit anschließender Coinkubation mit Cisplatin erhöhte signifikant die Cisplatin-Sensitivität der HEY-Zellen, wie bereits in Kapitel 4.3.4.3 gezeigt. Die alleinige 48-stündige Präinkubation mit ATP ohne anschließende Coinkubation mit Cisplatin erhöhte ebenfalls die Zytotoxizität von Cisplatin. Für die unbehandelten HEY-Zellen wurde eine IC_{50} von 4,9 μM bestimmt. Durch 100 μM ATP für 48 Stunden präinkubiert wurde die IC_{50} auf 3,3 μM reduziert. Durch 200 μM ATP sogar signifikant auf nur 1,9 μM erniedrigt, siehe Tabelle 52. Die Shift-Faktoren lagen hier bei 1,5 (für die Behandlung mit 100 μM ATP) bzw. bei 2,5 (für die Behandlung mit 200 μM ATP) und erreichten somit nicht die Shift-Faktoren von 2 bzw. 4,5, welche im vorherigen Experiment mit der 48-stündigen Prä- und anschließender Coinkubation erzielt wurden. Durch eine kurzzeitige 6-stündige ATP-Präinkubation mit anschließender Coinkubation wurde die Zytotoxizität von Cisplatin ebenfalls signifikant erhöht. Hier wurde für die unbehandelten Zellen eine IC_{50} von 3,8 μM bestimmt. Durch die Behandlung mit 100 μM ATP wurde die IC_{50} von Cisplatin auf 2,5 μM und durch 200 μM ATP auf $IC_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ signifikant reduziert. Es wurden somit unter diesen Bedingungen Shift-Faktoren von 1,5 (100 μM ATP) bzw. 2,4 (200 μM ATP) erzielt. Das alleinige Inkubieren von ATP für 6 Stunden beeinflusste die IC_{50} von Cisplatin nicht. Für die Kontrollzellen wurde eine IC_{50} von 3,1 μM , für die mit 100 μM ATP behandelten Zellen eine IC_{50} von 3,4 μM und für die mit 200 μM behandelten Zellen bei $IC_{50} = 3,7 \mu\text{M}$ bestimmt. Anders stellte sich das Ergebnis dar, wenn auf eine ATP-Präinkubation verzichtet wurde und die HEY-Zellen gleichzeitig mit ATP und Cisplatin für 72 Stunden behandelt wurden. Auch unter diesen Bedingungen wurde die Zytotoxizität von Cisplatin signifikant erhöht. Für die Kontrollzellen wurde eine IC_{50} von 3,8 μM , für die mit 100 μM ATP behandelten Zellen eine IC_{50} von 2,3 μM und für die mit 200 μM ATP behandelten Zellen eine IC_{50} von 1,3 μM bestimmt, siehe Tabelle 52. Die Shift-Faktoren lagen hier bei 1,6 (100 μM ATP) und 2,9 (200 μM ATP).

Für die OVCAR-3 Zellen wurde der gerade beschriebene Effekt von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin nicht in dem Ausmaß beobachtet, wie zuvor für die HEY-Zellen beschrieben. Die IC_{50} von Cisplatin wurde durch die alleinige ATP-Präinkubation von 48 Stunden ebenfalls signifikant von 10,1 μM der Kontrollzellen auf 5,9 μM (durch 100 μM ATP) bzw. auf 6,2 μM (durch 200 μM ATP) reduziert. Die so erzielten Shift-Faktoren lagen hier bei 1,7 (100 μM ATP) bzw. bei 1,6 (200 μM ATP) und erreichten damit nicht dieselben Shift-Faktoren für die IC_{50} , welche durch eine 48-stündige Präinkubation mit anschließender Coinkubation von ATP hervorgerufen wurden. Unter diesen Bedingungen lagen die Shift-Faktoren bei 2,1 (100 μM ATP) bzw. 1,8

(200 μ M ATP), siehe Tabelle 53. In den nachfolgenden Versuchen zeigte sich, dass die Zytotoxizität von Cisplatin weder durch die alleinige Coinkubation mit ATP für 72 Stunden noch durch die 6-stündige ATP-Präinkubation mit bzw. ohne anschließender Coinkubation signifikant beeinflusst wurde, siehe Tabelle 53. Wurden ATP und Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen für 72 Stunden coinkubiert, so wurden folgende IC₅₀-Werte erzielt. Die Kontrollzellen wiesen eine IC₅₀ für Cisplatin von IC₅₀ = 11,6 μ M auf. Durch 100 μ M ATP wurde eine IC₅₀ = 7,5 μ M und durch 200 μ M ATP eine IC₅₀ = 10,5 μ M erreicht. Wenn ATP für 6 Stunden nur präinkubiert wurde, so lag die Cispaltin-IC₅₀ der unbehandelten Zellen bei 12,1 μ M, der mit 100 μ M ATP behandelten Zellen bei 13,6 μ M und die IC₅₀ der mit 200 μ M ATP behandelten Zellen 10,5 μ M.

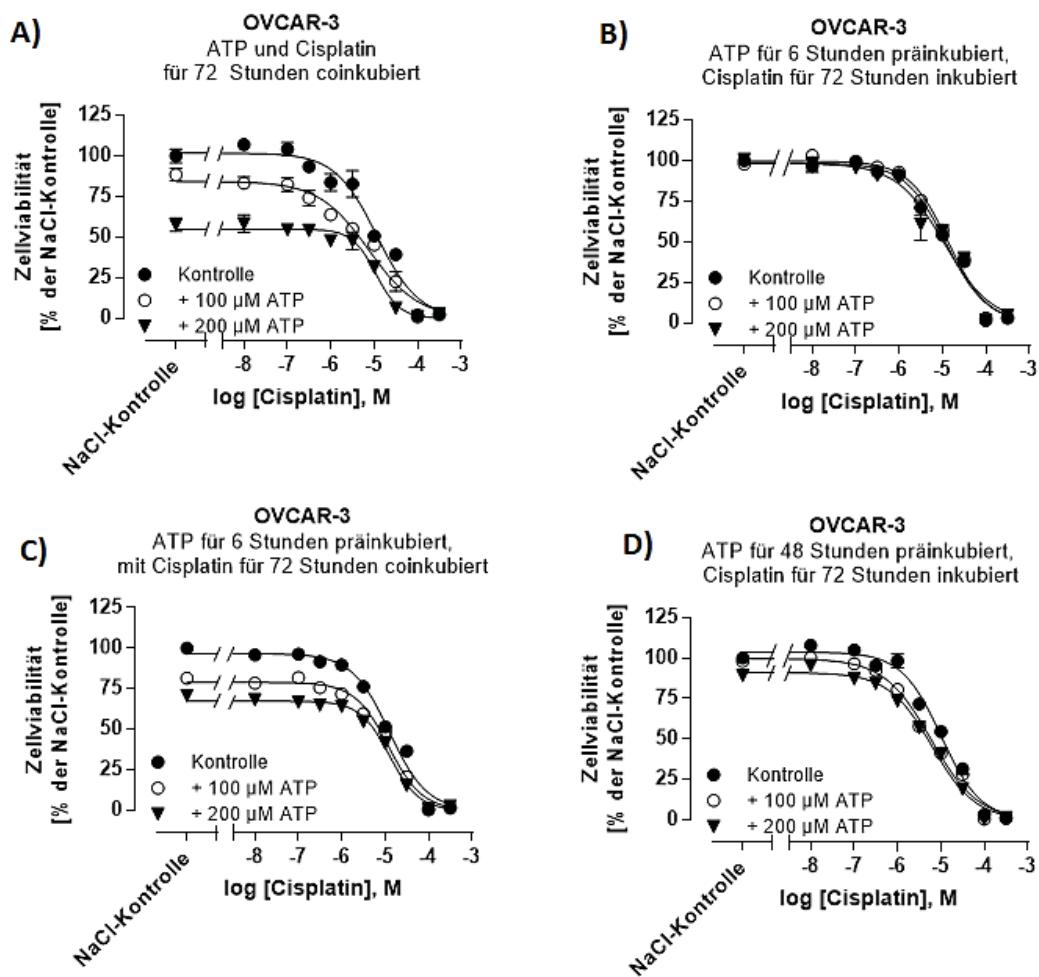


Abbildung 116: Zeitabhängiger Einfluss von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. ATP (100 μ M bzw. 200 μ M) wurde entweder für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (A), nur für 6 Stunden präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (B), für 6 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (C) bzw. für 48 präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (D). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 53: Zeitabhängiger Effekt von ATP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$ (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 μ M ATP		200 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
48h Prä- und Coinkubation	10,5 μ M	4,98 \pm 0,06	5,0 μ M*	5,30 \pm 0,07	6,2 μ M*	5,21 \pm 0,05
48h Präinkubation	10,1 μ M	4,99 \pm 0,04	5,9 μ M*	5,23 \pm 0,04	6,2 μ M*	5,21 \pm 0,04
6h Prä- und Coinkubation	12,6 μ M	4,90 \pm 0,03	11,9 μ M	4,92 \pm 0,03	12,6 μ M	4,90 \pm 0,02
6h Präinkubation	12,1 μ M	4,92 \pm 0,05	13,6 μ M	4,87 \pm 0,04	10,5 μ M	4,96 \pm 0,07
Coinkubation	11,6 μ M	4,94 \pm 0,07	7,5 μ M	5,13 \pm 0,08	10,5 μ M	4,96 \pm 0,06

Auch durch eine 6-stündige ATP-Präinkubation mit anschließender Coinkubation ließ sich die Cisplatin-Zytotoxizität an dieser Stelle nicht signifikant beeinflussen. Die IC_{50} der OVCAR-3-Kontrollzellen lag bei 12,6 μ M, der mit 100 μ M ATP behandelten Zellen bei 11,9 μ M und der mit 200 μ M ATP behandelten Zellen bei 12,6 μ M, siehe Tabelle 53.

An dieser Stelle bleibt festzuhalten, dass für die HEY-Zellen neben dem konzentrationsabhängigen Effekt von ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin auch ein zeitabhängiger Effekt nachgewiesen wurde. Den größten Einfluss auf die Cisplatin-Zytotoxizität übte dabei die 48-stündige Präinkubation von ATP mit anschließender Coinkubation aus. Die alleinige ATP-Präinkubation von 48 Stunden reichte ebenfalls aus, um die Cisplatin-Zytotoxizität signifikant zu erhöhen, siehe Tabelle 52 und Tabelle 53. Ebenso wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Coinkubation von ATP und Cisplatin ohne Präinkubation an der HEY-Zelllinie ebenfalls die Zytotoxizität von Cisplatin erhöhte, allerdings waren die Shift-Faktoren hier deutlich geringer ausgeprägt als für die zuvor genannten Bedingungen beschrieben. Weiter wurde veranschaulicht, dass eine kurzzeitige Präinkubation von ATP für 6 Stunden nur einen Einfluss auf die Zytotoxizität von Cisplatin ausübte, wenn im Anschluss an die Präinkubation das Nukleotid auch coinkubiert wurde. Die alleinige 6-stündige Präinkubation beeinflusste die IC_{50} von Cisplatin nicht. Für die OVCAR-3-Zellen wurde für ATP ebenfalls ein zeitabhängiger Einfluss nachgewiesen. Dieser war allerdings auf die 48-stündige Präinkubation mit und ohne anschließende Coinkubation begrenzt. Für die anderen drei Bedingungen wurden keine signifikanten Effekte von ATP auf die Cisplatin-Zytotoxizität an diesen Zellen beobachtet.

In den nachfolgenden Versuchen wurde nun untersucht, ob ebenfalls ein zeitabhängiger Einfluss von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin an den beiden Zelllinien HEY und OVCAR-3 zu beobachten war. Die oben beschriebenen Experimente wurden in Gegenwart von ADP unter den genannten Bedingungen wiederholt, siehe Abbildung 117 und Abbildung 118 sowie Tabel-

le 54 und Tabelle 55. An der Zelllinie HEY wurde die Zytotoxizität von Cisplatin durch ADP ebenfalls zeitabhängig beeinflusst. Ebenso wie die 48-stündige Präinkubation von ADP mit nachfolgenden Coinkubation wurde durch die alleinige Präinkubation von 200 μ M ADP für 48 Stunden die IC₅₀ von Cisplatin signifikant reduziert. Für die unbehandelten Kontrollzellen wurde eine IC₅₀ für Cisplatin von 4,6 μ M und für die mit 200 μ M ADP für 48 Stunden präinkubierten Zellen von 3,8 μ M bestimmt. Die Erhöhung der Cisplatin-Zytotoxizität stellte sich zwar als signifikant heraus, der Shift-Faktor lag hier bei 1,2, doch wurde nicht das Ausmaß erreicht, welches durch eine 48-stündige ADP-Präinkubation mit anschließender Coinkubation erreicht wurde.

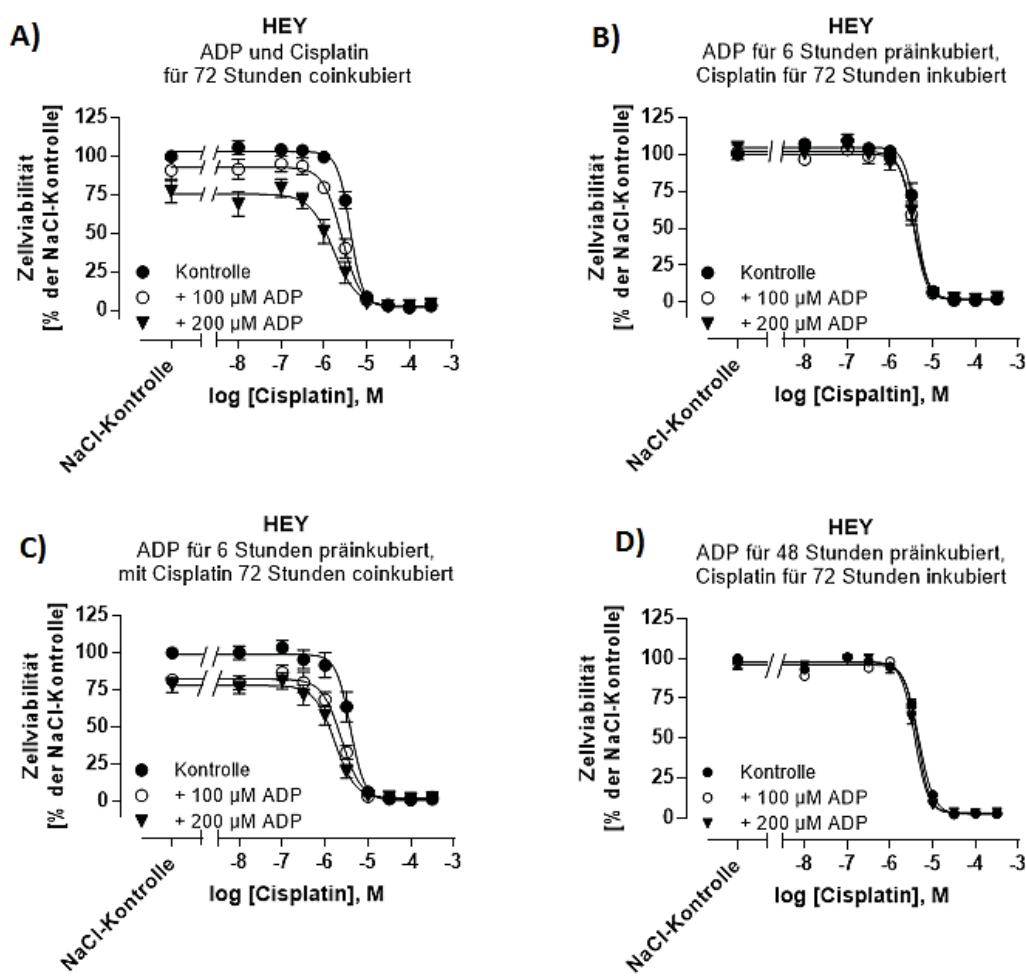


Abbildung 117: Zeitabhängiger Einfluss von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. ADP (100 μ M bzw. 200 μ M) wurde entweder für 72 Stunden mit Cisplatin coinubiert (A), nur für 6 Stunden präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (B), für 6 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinubiert (C) bzw. für 48 präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (D). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 54: Zeitabhängiger Effekt von ADP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit ** p < 0,01, * p < 0,05 (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		100 µM ADP		200 µM ADP	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
48h Prä- und Coinkubation	4,8 µM	5,32 ± 0,04	2,9 µM**	5,54 ± 0,03	1,6 µM**	5,79 ± 0,04
48h Präinkubation	4,6 µM	5,33 ± 0,02	4,4 µM	5,36 ± 0,02	3,8 µM*	5,42 ± 0,02
6h Prä- und Coinkubation	3,9 µM	5,41 ± 0,04	2,4 µM*	5,62 ± 0,04	1,7 µM**	5,77 ± 0,05
6h Präinkubation	4,1 µM	5,39 ± 0,03	3,5 µM	5,45 ± 0,03	3,6 µM	5,44 ± 0,02
Coinkubation	4,1 µM	5,39 ± 0,02	2,6 µM**	5,58 ± 0,04	1,7 µM**	5,78 ± 0,08

Unter diesen Bedingungen lag der Shift-Faktor bei 3, die IC₅₀ der Kontrollzellen wurde signifikant von 4,8 µM durch 200 µM ADP auf 1,6 µM reduziert, siehe Tabelle 54. Selbst durch 100 µM ADP wurde unter diesen Bedingungen die IC₅₀ von Cisplatin noch um den Faktor 1,7 auf 2,9 µM signifikant reduziert. Für die alleinige Präinkubation von ADP für 48 Stunden ließ sich ein solcher Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin nicht beobachten. Die IC₅₀ lag hier bei 4,4 µM und unterschied sich somit nicht signifikant von der IC₅₀ von 4,6 µM der Kontrollzellen. Durch die alleinige ADP-Präinkubation von 6 Stunden wurde auch in diesem Experiment die Zytotoxizität von Cisplatin nicht beeinflusst. Die Kontrollzellen wiesen eine IC₅₀ von 4,1 µM, die mit 100 µM ADP behandelten Zellen von 3,5 µM und die mit 200 µM ADP behandelten Zellen von 3,6 µM auf. Die IC₅₀ von Cisplatin wurde zwar reduziert, doch erwiesen sich die Shifts als nicht signifikant. Anders gestaltete sich die Datenlage, wenn ADP für 6 Stunden prä- und dann coinkubiert wurde. Unter diesen Bedingungen zeigten die unbehandelten HEY-Zellen eine IC₅₀ für Cisplatin von 3,9 µM, die mit 100 µM ADP behandelten Zellen von 2,4 µM und die mit 200 µM ADP behandelten Zellen eine IC₅₀ von 1,7 µM. Durch 100 µM ADP wurde die Zytotoxizität von Cisplatin somit signifikant um den Faktor 1,6 bzw. durch 200 µM ADP signifikant um den Faktor 2,3 erhöht, siehe Tabelle 54. Auch die alleinige gleichzeitige Behandlung der HEY-Zellen mit ADP und Cisplatin für 72 Stunden ohne ADP-Präinkubation beeinflusste die IC₅₀ von Cisplatin signifikant. Für die unbehandelten Zellen wurde eine IC₅₀ von 4,1 µM, für die mit 100 µM ADP behandelten Zellen eine IC₅₀ von 2,6 µM und für die mit 200 µM ADP behandelten Zellen eine IC₅₀ von 1,7 µM bestimmt. Die Shift-Faktoren lagen in diesem Fall bei 1,6 (für 100 µM ADP) bzw. 2,4 (für 200 µM ADP).

In Tabelle 55 sind die zeitabhängigen Effekte von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin, welche an den OVCAR-3-Zellen bestimmt wurden, dargestellt. Diese Versuche wiesen allesamt deutlich höhere Werte für die IC₅₀ von Cisplatin im Vergleich zu den Werten aus Tabelle 53 auf.

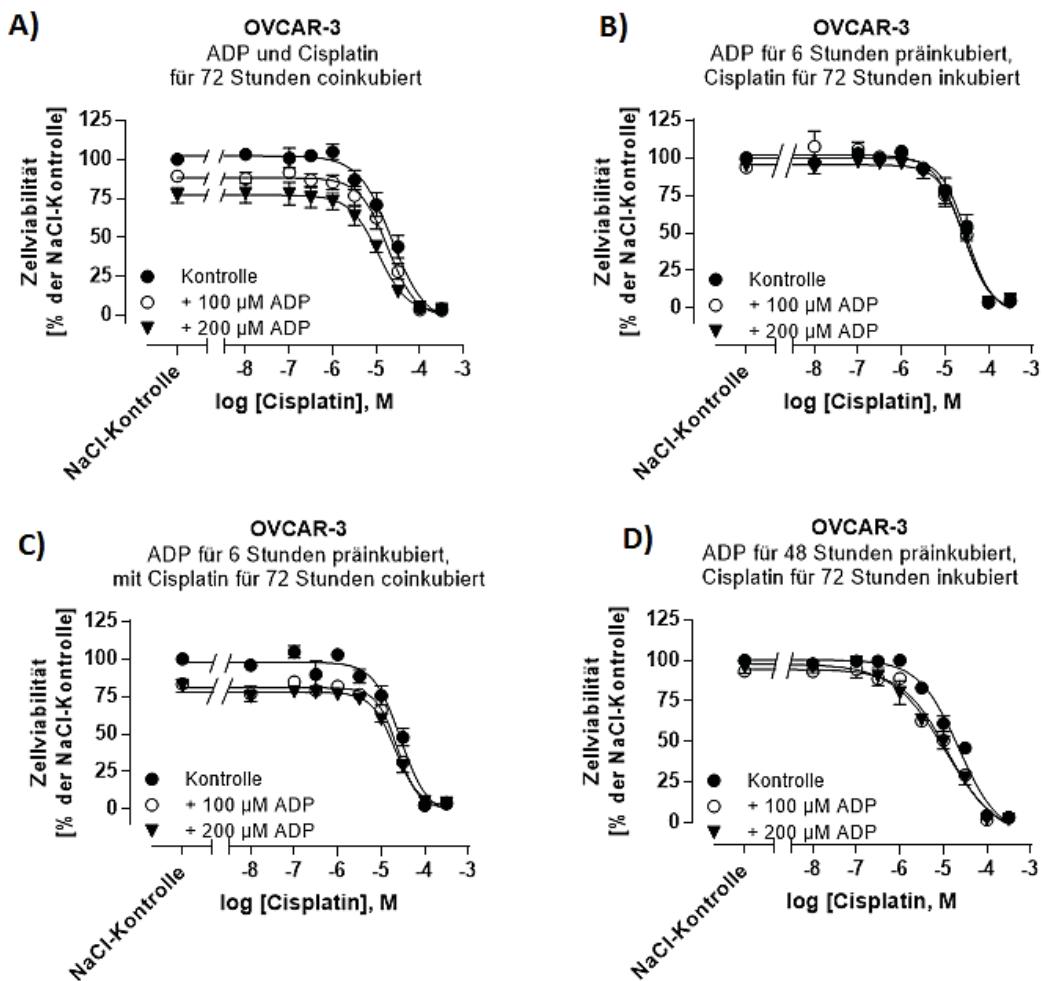


Abbildung 118: Zeitabhängiger Einfluss von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie OVCAR-3. ADP (100 µM bzw. 200 µM) wurde entweder für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (A), nur für 6 Stunden präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (B), für 6 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert (C) bzw. für 48 präinkubiert und Cisplatin für 72 Stunden alleine inkubiert (D). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 55: Zeitabhängiger Effekt von ADP auf Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. Gezeigt sind hier die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * p < 0,05 (bezogen auf die Kontrolle).

	Kontrolle		+ 100 µM ADP		+ 200 µM ADP	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
48h Prä- und Coinkubation	26,7 µM	4,57 ± 0,07	13,3 µM*	4,87 ± 0,07	9,5 µM*	5,02 ± 0,08
48h Präinkubation	22,5 µM	4,65 ± 0,07	12,3 µM	4,91 ± 0,09	11,6 µM	4,94 ± 0,12
6h Prä- und Coinkubation	27,7 µM	4,56 ± 0,08	23,5 µM	4,63 ± 0,05	21,7 µM	4,68 ± 0,05
6h Präinkubation	31,3 µM	4,51 ± 0,06	26,0 µM	4,58 ± 0,08	28,5 µM	4,55 ± 0,05
Coinkubation	22,7 µM	4,64 ± 0,09	18,2 µM	4,74 ± 0,07	11,5 µM	4,95 ± 0,09

Diese Tatsache ist damit zu begründen, dass die Versuche deutlich zeitversetzt zueinander durchgeführt wurden und die OVCAR-3-Zellen möglicherweise in der höheren Passage ihre Sensitivität gegenüber Cisplatin veränderten. Eine 48-stündige ADP-Präinkubation mit nachfolgender Coinkubation reduzierte die IC_{50} von Cisplatin signifikant von 26,7 μM der unbehandelten Zellen auf 13,3 μM für die mit 100 μM ADP behandelten Zellen. Und durch 200 μM ADP wurde diese sogar auf 9,5 μM reduziert. Die Shift-Faktoren lagen hier für 100 μM ADP bei 2,0 bzw. für 200 μM ADP bei 2,8. Demgegenüber ließ sich für die alleinige 48-stündige Präinkubation von ADP kein Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin beobachten. Die Kontrollzellen zeigten eine IC_{50} für Cisplatin von 22,5 μM , die mit 100 μM ADP behandelten Zellen von 12,3 μM und die mit 200 μM ADP behandelten Zellen von 11,6 μM . Die IC_{50} für Cisplatin wurde zwar durch die ADP-Behandlung reduziert, allerdings erwiesen sich diese Werte als nicht signifikant verschieden voneinander. Auch für die anderen drei Versuchsbedingungen (Coinkubation, 6 Stunden Präinkubation bzw. 6 Stunden Prä- und Coinkubation) wurden keine signifikanten Effekte von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen ausgemacht. Durch die gleichzeitige Coinkubation von ADP mit Cisplatin wurde zwar die IC_{50} von 22,7 μM der unbehandelten Zellen durch 100 μM ADP auf 18,2 μM bzw. durch 200 μM ADP auf 11,5 reduziert, jedoch waren diese Shifts nicht signifikant. Gleiches galt für die 6-stündige ADP-Präinkubation mit oder ohne anschließende Coinkubation. Auch hier wurden keine signifikanten Effekte beobachtet. Durch die 6-stündige Präinkubation wurde für die Kontrollzellen eine IC_{50} für Cisplatin von 31,3 μM , für die mit 100 μM ADP behandelten Zellen eine IC_{50} von 26,0 μM und für die mit 200 μM ADP behandelten Zellen eine IC_{50} von 28,5 μM bestimmt. Wurde ADP für 6 Stunden präinkubiert und danach ebenfalls coinkeubiert, so wurden folgende Werte bestimmt. Die IC_{50} für Cisplatin der Kontrollzellen lag bei 27,7 μM , die der mit 100 μM ADP behandelten Zellen bei 23,5 μM und die der mit 200 μM ADP behandelten Zellen bei 21,7 μM .

An dieser Stelle bleibt festzuhalten, dass für die HEY-Zellen neben dem konzentrations-abhängigen Effekt von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin auch ein zeitabhängiger Effekt nachgewiesen wurde. Den größten Einfluss auf die Cisplatin-Zytotoxizität übte dabei die 48-stündige Präinkubation von ADP mit anschließender Coinkubation aus. Ebenso reichte die alleinige ADP-Präinkubation von 48 Stunden auch aus, um die Cisplatin-Zytotoxizität signifikant zu erhöhen, siehe Tabelle 54. Ebenso wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Coinkubation ADP und Cisplatin ohne Präinkubation an der HEY-Zelllinie ebenfalls die Zytotoxizität von Cisplatin erhöhte, allerdings waren die Shift-Faktoren hier deutlich geringer ausgeprägt als für die zuvor genannten Bedingungen beschrieben. Weiter wurde veranschaulicht, dass eine kurzzeitige Präinkubation von ADP von 6 Stunden nur einen Einfluss auf die Zytotoxizität von Cisplatin ausübte, wenn im Anschluss an die Präinkubation ADP auch coinkeubiert wurde. Die alleinige 6-

ständige Präinkubation beeinflusste die IC_{50} von Cisplatin nicht. Für die OVCAR-3-Zellen wurde für ADP ebenfalls ein zeitabhängiger Aspekt nachgewiesen. Hier wurde allerdings nur durch die 48-stündige Prä- und Coinkubation von ADP die IC_{50} von Cisplatin signifikant beeinflusst.

4.3.4.6 Inhibierung der ATP- bzw. ADP-induzierten erhöhten Cisplatin-Zytotoxizität durch P2Y-Rezeptor-Antagonisten

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die zuvor beschriebenen Effekte von ATP bzw. ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin durch den Einsatz von verschiedenen P2Y-Rezeptor-Antagonisten unterdrücken bzw. revertieren ließen. Auf diesem Wege wurde evaluiert, ob die Zellen gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin P2Y-vermittelt sensitiviert wurden. Verwendet wurden Suramin, als unspezifischer P2-Rezeptor-Antagonist (5,6), die in dieser Arbeit identifizierten P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF198 und NF272 sowie AR-C118925 als selektiver und potenter P2Y₂-Rezeptor-Antagonist (45) und der P2Y₁-Rezeptor-Antagonist MRS2211 (5,134,135).

Zu Beginn dieser Inhibitionsstudie wurde zunächst Suramin verwendet. Dabei wurde Suramin in den Konzentrationen 10, 50 oder 100 μ M eine Stunde vor Beginn der ATP-Behandlung (100 μ M, 48 Stunden prä- und coincubiert) zu den HEY-Zellen gegeben. Suramin verblieb während der gesamten Behandlungszeit auf den Zellen und wurde nach Ablauf der 48 Stunden wiederum für eine Stunde vor ATP- und Cisplatin-Zugabe präinkubiert. Die ATP-Konzentration von 100 μ M wurde zunächst gewählt, da bei dieser Konzentration, wie bereits geschildert, weder das Wachstumsverhalten der Zellen noch das Top-Plateau der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven nachhaltig beeinflusst wurden. Abbildung 119 zeigt die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven einzelner ausgewählter Experimente und Tabelle 56 fasst die ermittelten IC_{50} - und pIC_{50} -Werte zusammen. Wie erwartet wurden die Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin durch 100 μ M ATP nach links verschoben. Die Zytotoxizität von Cisplatin wurde folglich erhöht, was auch anhand der ermittelten IC_{50} - zu erkennen ist, siehe Tabelle 56.

Tabelle 56: Konzentrationsabhängige Effekte von Suramin auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittlere IC_{50} und die pIC_{50} -Werte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

	Kontrolle		+ 100 μ M ATP		+ Suramin + 100 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
10 μ M Suramin	8,7 μ M	5,06 \pm 1,5	3,6 μ M	5,40 \pm 0,09	4,8 μ M	5,32 \pm 0,05
50 μ M Suramin	8,9 μ M	5,07 \pm 1,9	5,7 μ M	5,24 \pm 0,09	5,2 μ M	5,28 \pm 0,05
100 μ M Suramin	4,4 μ M	5,35 \pm 0,08	2,2 μ M	5,66 \pm 0,1	1,7 μ M	5,76 \pm 0,08

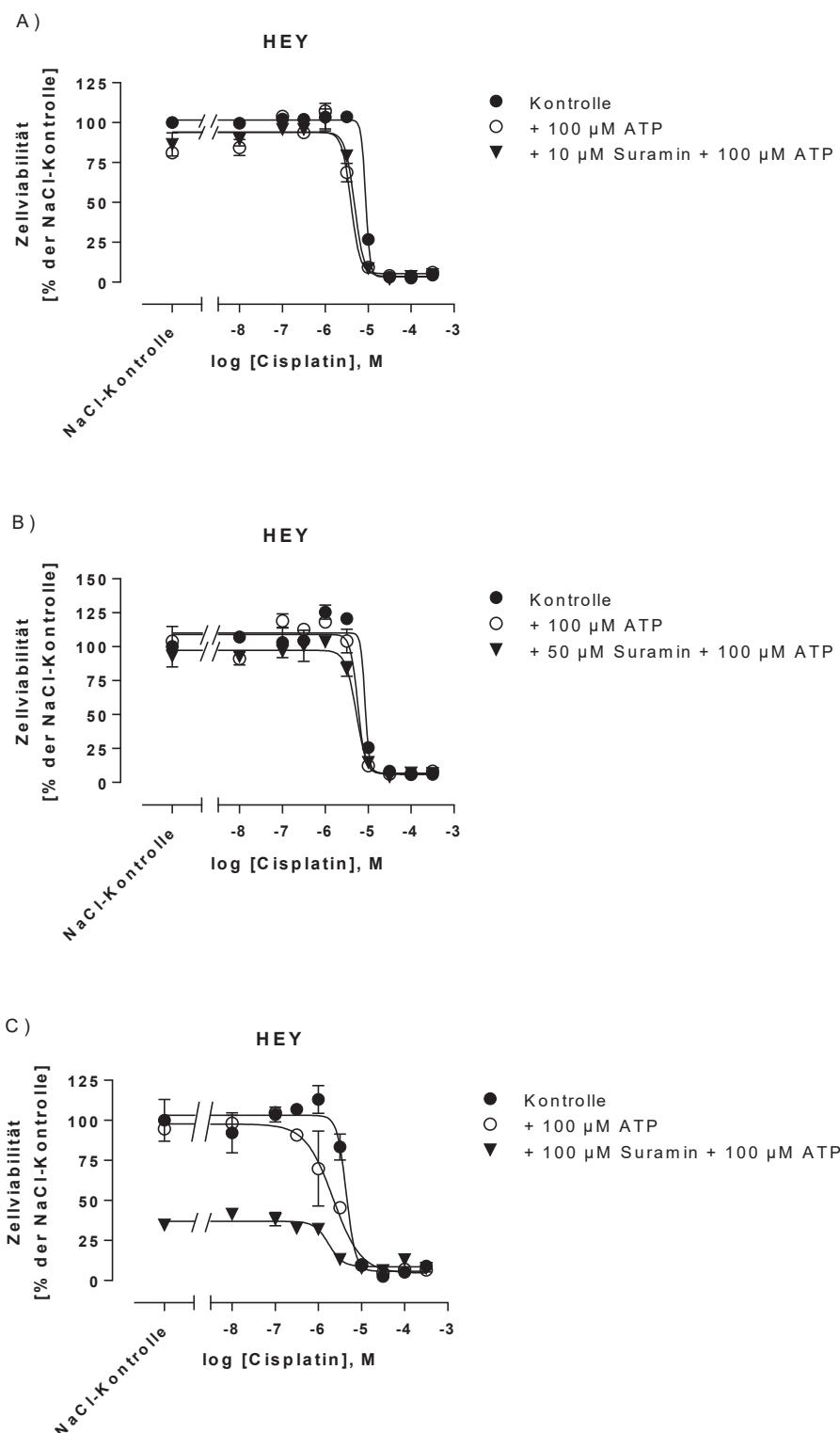


Abbildung 119: Effekt von Suramin auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. Suramin in den Konzentrationen von 10 µM (A), 50 µM (B) oder 100 µM (C) wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Vor Beginn der 72-stündigen Inkubation mit Cisplatin wurden Suramin und ATP erneut zugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM repräsentativer Experimente.

Wurde Suramin entsprechend präinkubiert vor Beginn der ATP-Behandlung, so wurde für die beiden Suramin-Konzentrationen von 10 μM und 50 μM weder ein Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin noch auf das Top-Plateau der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven beobachtet. Diese Kurven waren größtenteils deckungsgleich mit den Kurven, wo die HEY-Zellen mit 100 μM ATP 48 Stunden präinkubiert und dann für 72 Stunden mit Cisplatin coinokubiert wurden. Hier wurden IC_{50} -Werte für Cisplatin von 4,8 μM bzw. von 5,2 μM bestimmt, welche sich nicht signifikant von den IC_{50} -Werten der jeweiligen dazugehörigen ATP-behandelten Zellen unterschied. Anders sah es aus, wenn Suramin in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt wurde. Hier ließen sich deutliche Effekte auf die Cisplatin-Zytotoxizität und auf das Top-Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve beobachten. Allein durch 100 μM Suramin wurde das Wachstum der HEY-Zellen auf etwa 30% des Wachstums der Kontrollzellen reduziert, siehe Abbildung 119 C. Die IC_{50} von Cisplatin der mit 100 μM Suramin + 100 μM ATP behandelten Zellen lag bei 1,7 μM . Cisplatin alleine wies an den unbehandelten Zellen eine IC_{50} von 4,4 μM auf und durch 100 μM ATP wurde diese auf 2,2 μM reduziert.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden Suramin nicht weiter für die Inhibitionsversuche zu verwenden. In den niedrigen Konzentrationen von 10 μM und 50 μM übte Suramin keinen revertierenden Einfluss auf die ATP-induzierte erhöhte Cisplatin-Zytotoxizität aus und höhere Suramin-Konzentrationen erwiesen sich als zu toxisch für die Zellen.

Durch die Zugabe von 100 μM NF198 vor der ATP-Präinkubation wurde eine IC_{50} für Cisplatin von 632 nM ermittelt. Die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den HEY-Zellen wurde demnach durch den Einsatz von NF198 nicht aufgehoben. Vielmehr wurden die HEY-Zellen durch die Kombination von 100 μM NF198 + 100 μM ATP weiter gegenüber Cisplatin sensitiviert, siehe Abbildung 120 A und Tabelle 57. Durch die Behandlung mit 200 μM ATP wurde in diesem repräsentativen Experiment wie erwartet die IC_{50} von Cisplatin von 5,9 μM ($\text{pIC}_{50} = 5,23 \pm 0,04$) der unbehandelten Kontrollzellen auf 1,1 μM reduziert. Durch den Einsatz von 200 μM NF198 + 200 μM ATP wurde das Zellwachstum der HEY-Zellen an dieser Stelle vollkommen inhibiert. Es ließ sich keine Konzentrations-Effekt-Kurve unter diesen Bedingungen erstellen, siehe Abbildung 120 B und Tabelle 58. Die Substanz NF198 erwies sich demnach als ebenfalls zu toxisch für die Zellen und wurde nicht weiterverwendet. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden auch keine Daten für die OVCAR-3-Zellen erhoben.

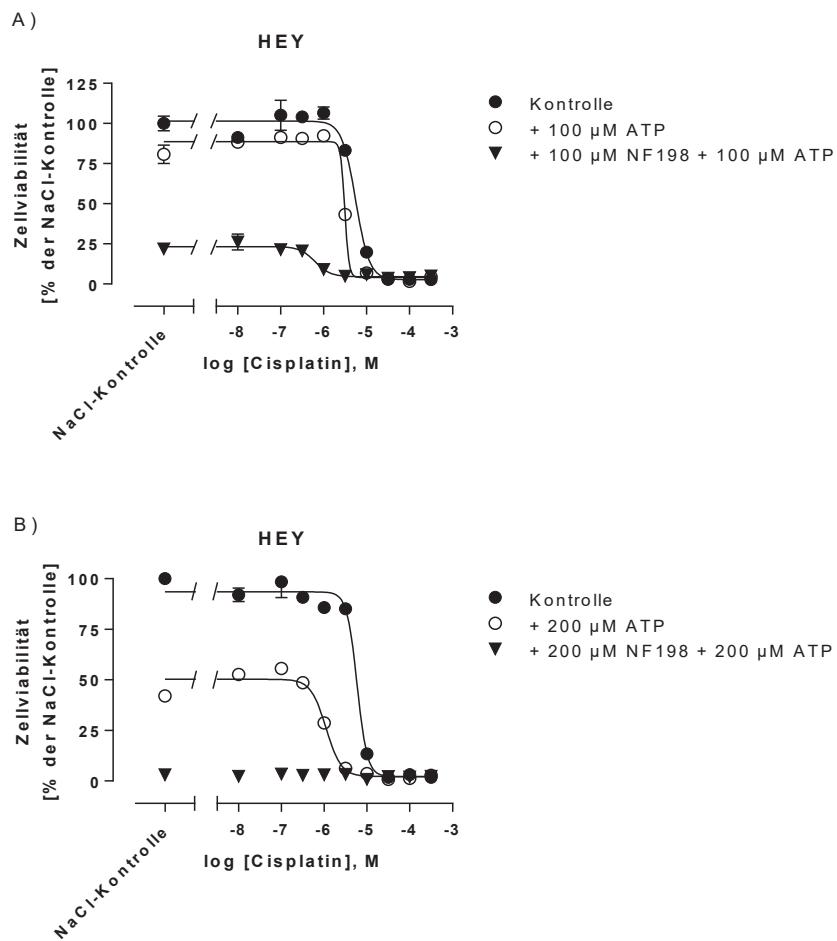


Abbildung 120: Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an der Zelllinie HEY. NF198 in den Konzentrationen von 100 μM (A) oder 200 μM (B) wurde 1 Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation (100 μM oder 200 μM) zu den Zellen gegeben. Vor Beginn der 72-stündigen Inkubation mit Cisplatin wurden NF198 und ATP erneut zugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM repräsentativer Experimente.

Tabelle 57: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittlere IC₅₀ und die pIC₅₀-Werte ± SEM eines repräsentativen Experiments.

	Kontrolle		+ 100 μM ATP		+ 100 μM NF198 + 100 μM ATP	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
Cisplatin	5,6 μM	5,25 ± 0,04	3,1 μM	5,51 ± 0,7	623 nM	6,20 ± 0,09

Tabelle 58: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF198 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittlere IC₅₀ und die pIC₅₀-Werte ± SEM eines repräsentativen Experiments. „/“ bedeutet Werte nicht bestimmbar.

	Kontrolle		+ 200 μM ATP		+ 200 μM NF198 + 200 μM ATP	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
Cisplatin	5,9 μM	5,23 ± 0,04	1,1 μM	5,96 ± 0,04	/	/

In einem anschließenden Experiment wurde weiter untersucht, ob das weniger toxische NF272, siehe Kapitel 4.2.5, selbst einen Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 ausübte, siehe Abbildung 121. Die Zellen wurden dabei, in Anlehnung an das Versuchsprotokoll für die ATP-Präinkubationsstudien, für 48 Stunden mit NF272 präinkubiert und danach für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert. Die so bestimmten IC_{50} - und IC_{90} -Werte für Cisplatin sind in Tabelle 59 zusammengefasst.

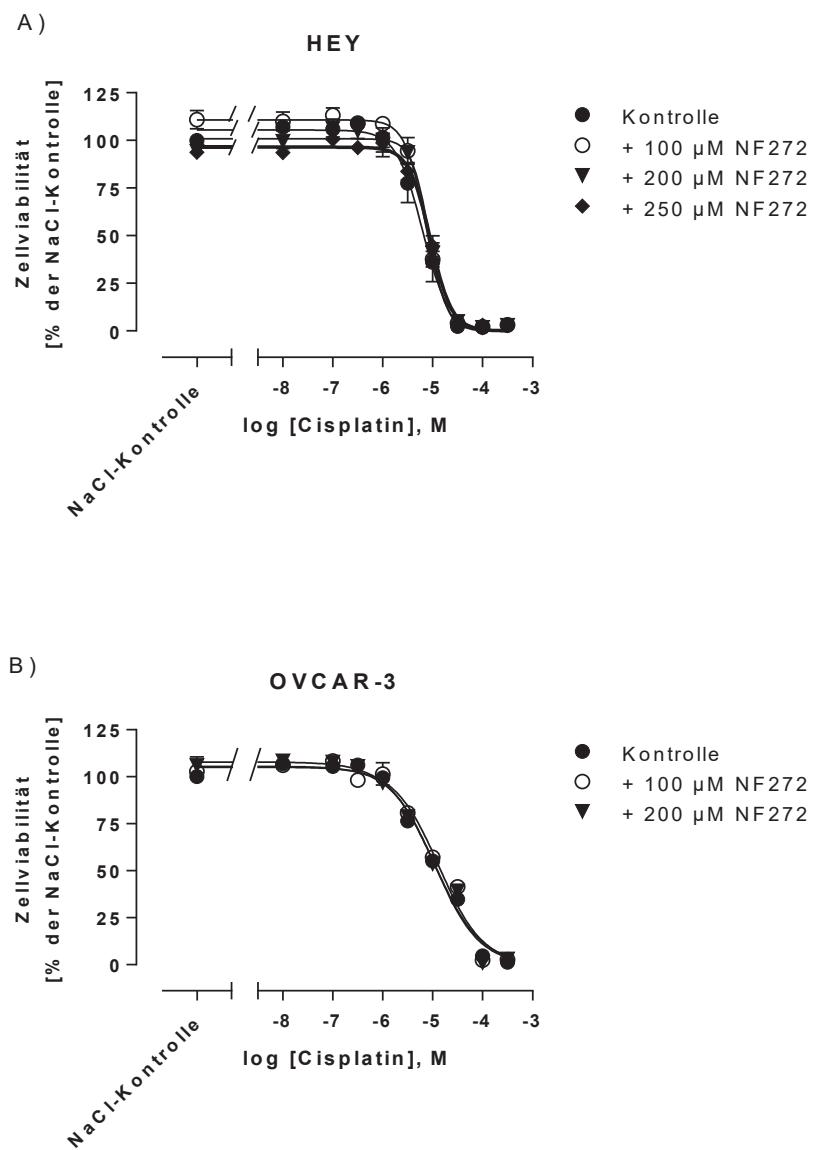


Abbildung 121: Effekt von NF272 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). NF272 wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 59: Effekt von NF272 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3. Gezeigt sind hier die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit „/“ = nicht bestimmt.

	HEY		OVCAR-3	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
Kontrolle	6,3 µM	5,20 ± 0,04	11,5 µM	4,95 ± 0,03
+ 100 µM NF272	7,3 µM	5,14 ± 0,03	13,2 µM	4,88 ± 0,08
+ 200 µM NF272	8,6 µM	5,06 ± 0,03	10,7 µM	4,97 ± 0,04
+ 250 µM NF272	8,9 µM	5,05 ± 0,03	/	/

Zu erkennen ist, dass NF272 an beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von Cisplatin ausübte. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven waren weder nach links oder nach rechts verschoben noch wurde das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflusst. Die Top-Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven waren nicht reduziert. An der Zelllinie HEY ließ sich für die Kontrollzellen eine IC₅₀ von 6,3 µM, für die mit 100 µM NF272 behandelten Zellen von 7,3 µM, für die mit 200 µM NF272 behandelten Zellen von 8,6 µM und für die mit 250 µM NF272 behandelten Zellen eine IC₅₀ von 8,9 µM bestimmen. Diese Werte erwiesen sich als nicht signifikant verschieden voneinander. Bei den OVCAR-3-Zellen wurde für die unbehandelten Zellen eine IC₅₀ von Cisplatin von 11,5 µM bestimmt. Für die mit 100 µM NF272 behandelten Zellen lag die IC₅₀ bei 13,2 µM und für die mit 200 µM NF272 bei 10,7 µM. Auch dieser Werte erwiesen sich als nicht signifikant verschieden voneinander. An dieser Stelle wurden keine Daten mit 250 µM NF272 an den OVCAR-3 Zellen generiert.

Im weiteren Verlauf dieser Versuchsreihe wurde nun untersucht, ob sich die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 durch den Einsatz von NF272 wieder rückgängig machen ließ. Dazu wurden verschiedenste Konzentrationen an NF272 ausgetestet. In der nachstehenden Abbildung 122 ist gezeigt, dass durch den Einsatz von 250 µM NF272 die durch 200 µM ATP nach links geshiftete Konzentrations-Effekt-Kurve von Cisplatin zur rechten Seite zurück verschoben wurde. Tabelle 60 fasst die anhand der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten IC₅₀-und pIC₅₀-Werte für Cisplatin zusammen. Durch den Einsatz von 200 µM ATP (48 Stunden präinkubiert und anschließend für 72 Stunden mit Cisplatin coinubiert) wurde die IC₅₀ von Cisplatin der unbehandelten Kontrollzellen von 5,3 µM signifikant um den Faktor 3,3 auf 1,6 µM reduziert. Wurde nun der P2Y₂-Antagonist NF272 eine Stunde vor Beginn der ATP-Behandlung jeweils zu den HEY-Zellen gegeben, so wurde eine IC₅₀ für Cisplatin von 4,4 µM bestimmt. Wie erwartet unterschieden sich die IC₅₀ für Cisplatin der Kontrollzellen und der mit 250 µM NF272 + 200 µM ATP behandelten Zellen nicht signifikant voneinander. Auf der anderen Seite war ein signifikanter Unterschied in den IC₅₀-Werten für Cisplatin sowohl für die Kontrollzellen und für

die mit 200 μM ATP behandelten Zellen als auch für die mit 200 μM ATP und die mit 250 μM NF272 + 200 μM ATP behandelten Zellen nachzuweisen. Folglich war es möglich, die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin durch den Einsatz von NF272 zu inhibieren.

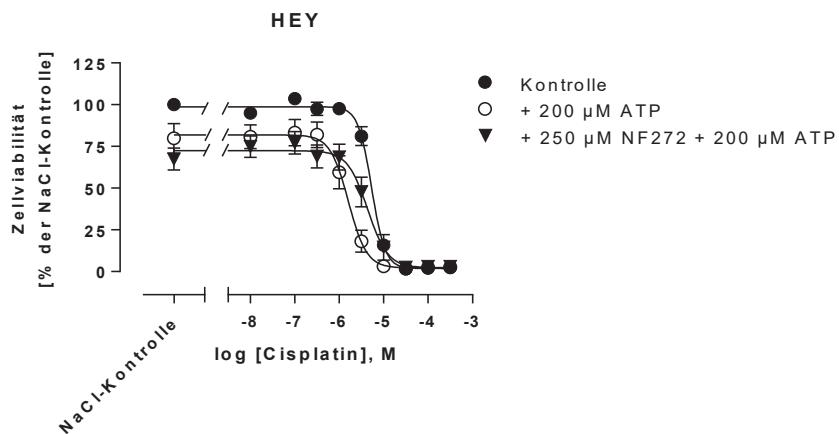


Abbildung 122: Effekt von 250 μM NF272 auf die durch 200 μM ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. NF272 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde vor der Cisplatin-Zugabe erneuert und NF272 und ATP neu hinzugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 60: Effekt von 250 μM NF272 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. NF272 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit 200 μM ATP behandelten Zellen.

	+ 250 μM NF272					
	Kontrolle		+ 200 μM ATP		+ 200 μM ATP	
	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$
Cisplatin	5,3 μM	5,27 \pm 0,03	1,6 μM **	5,80 \pm 0,07	4,4 $\mu\text{M}^{\text{ns}, \#}$	5,36 \pm 0,08

Ein ähnliches Resultat ließ sich für die HEY-Zellen beobachten, wenn 250 μM NF272 eine Stunde vor Beginn der 72-stündigen ATP- und Cisplatin-Coinkubation zu den Zellen gegeben wurde. Die so erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin sind in Abbildung 123 gezeigt. Die unbehandelten Zellen wiesen eine IC_{50} für Cisplatin von 4,8 μM auf. Durch die Behandlung mit 200 μM ATP wurde diese erwartungsgemäß auf 0,95 μM reduziert. Diese beiden Werte unterschieden sich signifikant voneinander, da die 95%-Konfidenzintervalle sich nicht überlappten. Durch die Kombination von 250 μM NF272 + 200 μM ATP wurde die IC_{50} von Cisplatin wieder signifikant auf 2,4 μM erhöht. Im Gegensatz dazu waren die IC_{50} für Cisplatin von 4,8 μM der Kontrollzellen und von 2,4 μM der mit 250 μM NF272 + 200 μM ATP behandelten Zellen nicht signifikant verschieden voneinander. Folglich war es möglich unter diesen Versuchsbedingun-

gen ebenfalls durch den Einsatz von NF272 die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den HEY-Zellen zwar nicht vollständig, aber zumindest partiell zu unterdrücken.

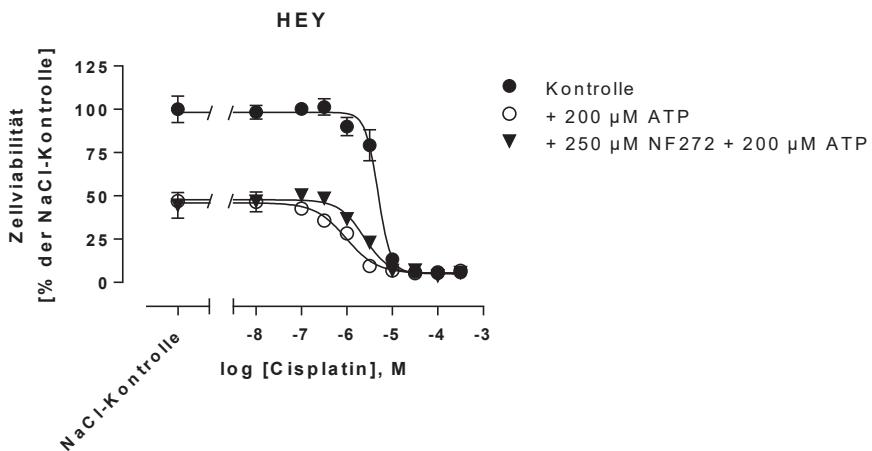


Abbildung 123: Effekt von 250 μM NF272 auf die durch 200 μM ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. NF272 wurde eine Stunde vor Beginn der 72-stündigen ATP- und Cisplatin-Coinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM eines repräsentativen Experiments.

Tabelle 61: Effekt von 250 μM NF272 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. NF272 wurde eine Stunde vor Beginn der 72-stündigen ATP-/Cisplatin-Coinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind die mittlere IC_{50} und die pIC_{50} -Werte \pm SEM von einem repräsentativen Experiment. Mit *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit 200 μM ATP behandelten Zellen.

	Kontrolle		200 μM ATP		250 μM NF272	
	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$
	Cisplatin	4,8 μM	5,32 \pm 0,04	0,95 μM^{***}	6,02 \pm 0,07	2,4 $\mu\text{M}^{ns,\#}$

Entsprechende Daten für die OVCAR-3-Zelllinien mit NF272 wurden an dieser Stelle nicht erhoben. Dafür wurden die gerade beschriebenen Experimente an beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien noch mit dem deutlich selektiveren P2Y₂-Antagonisten AR-C118925 durchgeführt. Dazu wurde in einem ersten Experiment untersucht, ob AR-C118925 selbst einen Effekt auf die Zytotoxizität von Cisplatin an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 ausübt, siehe Abbildung 124. Die so bestimmten pIC_{50} - und IC_{50} -Werte für Cisplatin sind in Tabelle 62 zusammengefasst. Auch hier wurde die Zytotoxizität von Cisplatin an beiden Zelllinien nicht signifikant durch AR-C118925 verändert. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven waren weder nach links noch nach rechts verschoben. Lediglich das Wachstumsverhalten der Zellen wurde leicht beeinflusst, zu erkennen an den reduzierten Top-Plateaus. Möglicherweise ist dies auf zytotoxische Nebeneffekte zurückzuführen.

fekte von AR-C118925 zurückzuführen, allerdings wurden bislang keine Zytotoxizitätsdaten für AR-C118925 veröffentlicht.

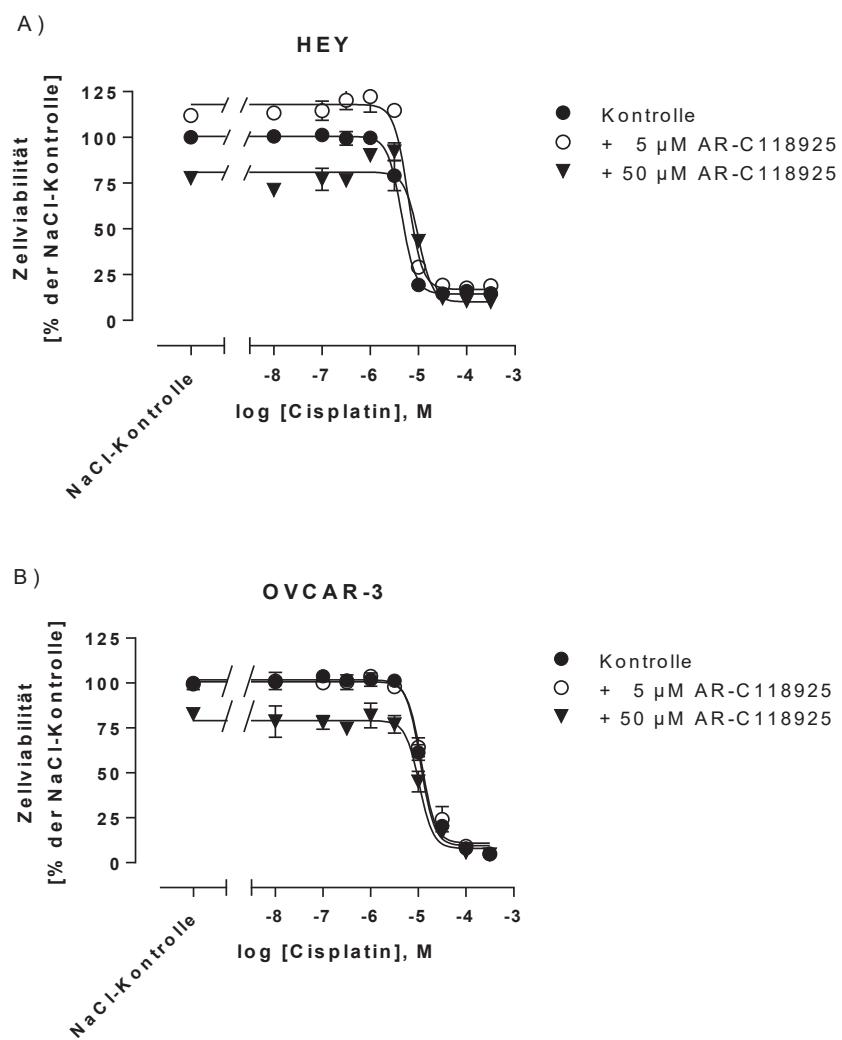


Abbildung 124: Effekt von AR-C118925 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). AR-C118925 wurde für 48 Stunden präinkubiert und für 72 Stunden mit Cisplatin coinubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Tabelle 62: Effekt von AR-C118925 auf die Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt mittels MTT-Assay an den Zelllinien HEY und OVCAR-3. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. IC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

	HEY		OVCAR-3	
	IC_{50}	$IC_{50} \pm SEM$	IC_{50}	$IC_{50} \pm SEM$
Kontrolle	4,5 µM	5,35 \pm 0,03	11,1 µM	4,96 \pm 0,02
+ 5 µM AR-C118925	6,1 µM	5,21 \pm 0,04	11,7 µM	4,93 \pm 0,03
+ 50 µM AR-C118925	9,9 µM	5,00 \pm 0,05	10,5 µM	4,98 \pm 0,04

An der Zelllinie HEY ließ sich für die Kontrollzellen für Cisplatin eine IC_{50} von 4,5 μ M, für die mit 5 μ M AR-C118925 behandelten Zellen von 6,1 μ M und für die mit 50 μ M AR-C118925 behandelten Zellen eine IC_{50} von 9,9 μ M bestimmen. Diese Werte erwiesen sich als nicht signifikant verschieden voneinander. Bei den OVCAR-3-Zellen wurde für die unbehandelten Zellen eine IC_{50} von Cisplatin von 11,1 μ M bestimmt. Für die mit 5 μ M AR-C118925 behandelten Zellen lag die IC_{50} bei 11,7 μ M und für die mit 50 μ M AR-C118925 bei 10,5 μ M. Auch dieser Werte erwiesen sich als nicht signifikant verschieden voneinander.

Weiter wurde nun evaluiert, ob sich die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 auch durch den Einsatz von AR-C118925 revertieren ließ. In Abbildung 125 ist gezeigt, dass durch den Einsatz von 5 μ M AR-C118925 die durch 100 μ M ATP nach links geshiftete Konzentrations-Effekt-Kurve von Cisplatin zur rechten Seite zurück verschoben wurde.

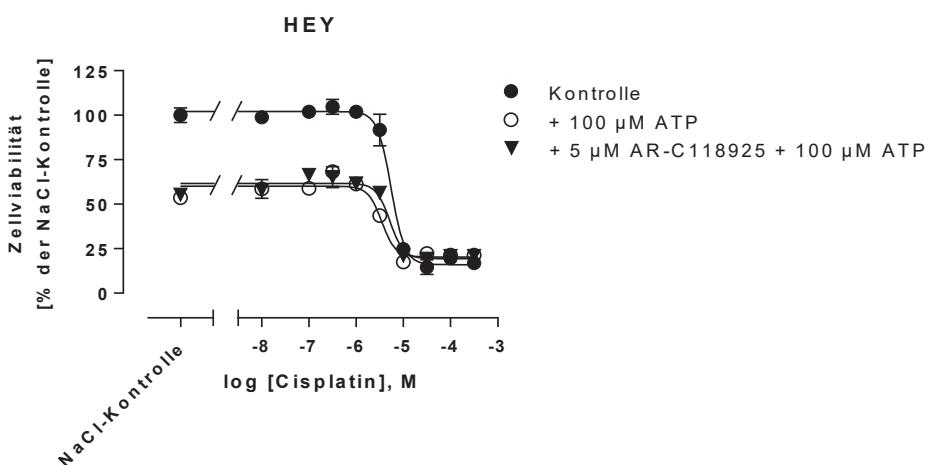


Abbildung 125: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die durch 100 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde vor der Cisplatin-Zugabe erneuert und AR-C118925 und ATP neu hinzugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Tabelle 63: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit 100 μ M ATP behandelten Zellen.

	+ 5 μ M AR-C118925					
	Kontrolle		+ 100 μ M ATP		+ 100 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
Cisplatin	5,5 μ M	5,26 \pm 0,04	3,5 μ M*	5,46 \pm 0,06	5,2 μ M ^{ns, #}	5,29 \pm 0,07

Tabelle 63 fasst die anhand der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten IC_{50} - und pIC_{50} -Werte für Cisplatin zusammen. Durch den Einsatz von 100 μ M ATP (48 Stunden präinkubiert und anschließend für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert) wurde die IC_{50} von Cisplatin der unbehandelten Kontrollzellen von 5,5 μ M signifikant um den Faktor 1,5 auf 3,5 μ M reduziert. Wurde nun der P2Y₂-Antagonist AR-C118925 eine Stunde vor Beginn der ATP-Behandlung jeweils zu den HEY-Zellen gegeben, so wurde eine IC_{50} für Cisplatin von 5,2 μ M bestimmt. Wie erwartet unterschieden sich die IC_{50} -Werte für Cisplatin der Kontrollzellen und der mit 5 μ M AR-C118925 + 100 μ M ATP behandelten Zellen nicht signifikant voneinander. Auf der anderen Seite war ein signikanter Unterschied in der IC_{50} für Cisplatin sowohl für die Kontrollzellen und für die mit 100 μ M ATP behandelten Zellen als auch für die mit 100 μ M ATP und die mit 5 μ M AR-C118925 + 100 μ M ATP behandelten Zellen nachzuweisen. Folglich war es möglich, die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin auch durch den Einsatz von AR-C118925 zu inhibieren.

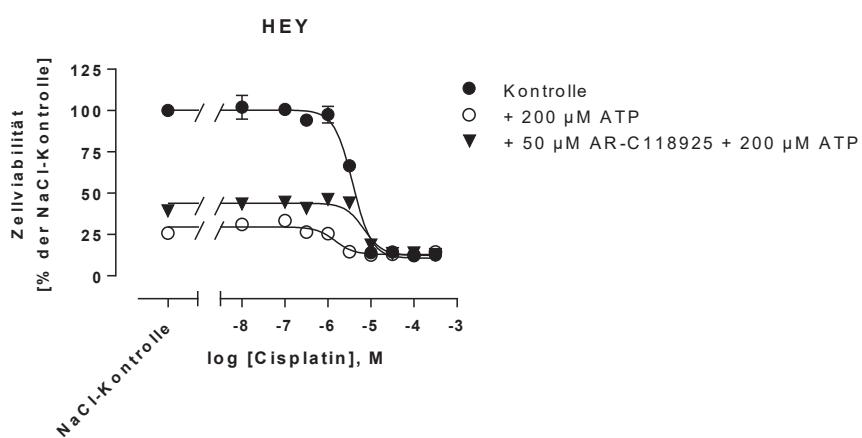


Abbildung 126: Effekt von 50 μ M AR-C118925 auf die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde vor der Cisplatin-Zugabe erneuert und AR-C118925 und ATP neu hinzugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Tabelle 64: Effekt von 50 μ M AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit 200 μ M ATP behandelten Zellen.

	Kontrolle		+ 200 μ M ATP		+ 50 μ M AR-C118925	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
Cisplatin	5,8 μ M	5,42 \pm 0,04	1,5 μ M*	5,84 \pm 0,11	6,9 μ M ^{ns, #}	5,16 \pm 0,07

Ein ähnliches Resultat ließ sich für die HEY-Zellen beobachten, wenn 50 μ M AR-C118925 eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen Präinkubation von 200 μ M ATP zu den Zellen gegeben wurde. Die so erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin sind in Abbildung 126 gezeigt. Die unbehandelten Zellen wiesen eine IC_{50} für Cisplatin von 5,8 μ M auf. Durch die Behandlung mit 200 μ M ATP wurde diese erwartungsgemäß signifikant auf 1,5 μ M reduziert. Durch die Kombination von 50 μ M AR-C118925 + 200 μ M ATP wurde die IC_{50} von Cisplatin wieder signifikant auf 6,9 μ M erhöht. Im Gegensatz dazu waren die IC_{50} für Cisplatin von 5,8 μ M der Kontrollzellen und von 6,9 μ M der mit 50 μ M AR-C118925 + 200 μ M ATP behandelten Zellen nicht signifikant verschieden voneinander. Folglich war es möglich auch unter diesen Versuchsbedingungen durch den Einsatz von AR-C118925 die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den HEY-Zellen zu unterdrücken.

Gleichermaßen wurde an dieser Stelle auch für die OVCAR-3-Zellen beobachtet. Die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven sind in den Abbildung 127 und Abbildung 128 dargestellt.

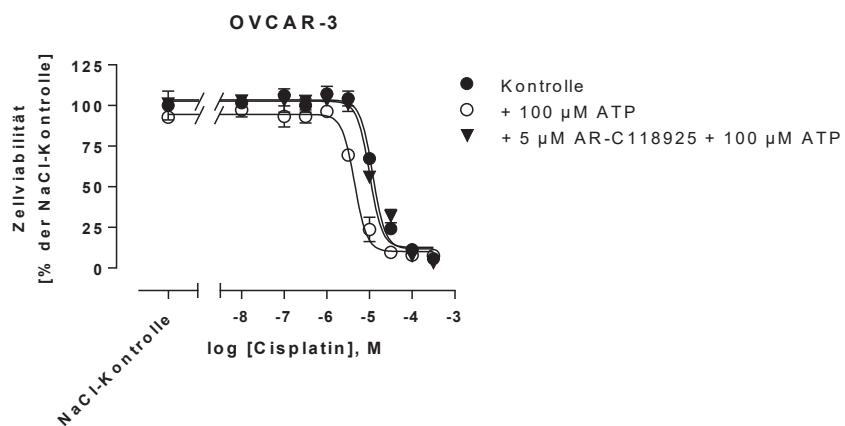


Abbildung 127: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die durch 100 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde vor der Cisplatin-Zugabe erneuert und AR-C118925 und ATP neu hinzugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Tabelle 65: Effekt von 5 μ M AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind hier die mittleren IC_{50} - bzw. pIC_{50} -Werte (Mittelwerte \pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # $p < 0,05$ im Vergleich zu den mit 100 μ M ATP behandelten Zellen.

	+ 5 μ M AR-C118925					
	Kontrolle		+ 100 μ M ATP		+ 100 μ M ATP	
	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM	IC_{50}	$pIC_{50} \pm$ SEM
Cisplatin	11,9 μ M	4,93 \pm 0,03	4,5 μ M*	5,35 \pm 0,04	10,0 μ M ^{ns, #}	5,00 \pm 0,04

Die durch 100 μ M ATP an den OVCAR-3-Zellen nach links verschobene Konzentrations-Effekt-Kurve von Cisplatin wurde in Gegenwart von 5 μ M AR-C118925 zur rechten Seite zurück verschoben. Tabelle 65 fasst die anhand der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten IC₅₀- und pIC₅₀-Werte für Cisplatin zusammen. Durch den Einsatz von 100 μ M ATP (48 Stunden präinkubiert und anschließend für 72 Stunden mit Cisplatin coinkubiert) wurde die IC₅₀ von Cisplatin der unbehandelten Kontrollzellen von 11,9 μ M signifikant um den Faktor 2,5 auf 4,5 μ M reduziert. Wurde nun AR-C118925 eine Stunde vor Beginn der ATP-Behandlung jeweils zu den OVCAR-3-Zellen gegeben, so wurde eine IC₅₀ für Cisplatin von 10,0 μ M bestimmt. Wie erwartet unterschieden sich die IC₅₀ für Cisplatin der Kontrollzellen und der mit 5 μ M AR-C118925 + 100 μ M ATP behandelten Zellen nicht signifikant voneinander. Auf der anderen Seite war ein signifikanter Unterschied in den IC₅₀-Werten für Cisplatin sowohl für die Kontrollzellen und für die mit 100 μ M ATP behandelten Zellen als auch für die mit 100 μ M ATP und die mit 5 μ M AR-C118925 + 100 μ M ATP behandelten Zellen nachzuweisen. Folglich war es auch an der Zelllinie OVCAR-3 möglich die durch ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin durch den Einsatz von AR-C118925 zu inhibieren.

Ein ähnliches Resultat ließ sich ebenfalls für diese Zelllinie beobachten, wenn 50 μ M AR-C118925 eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen Präinkubation von 200 μ M ATP zu den Zellen gegeben wurde. Die so erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin sind in Abbildung 128 gezeigt.

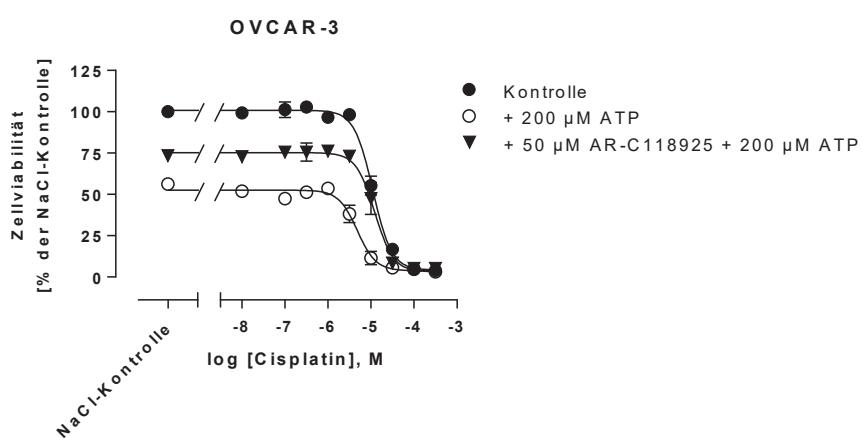


Abbildung 128: Effekt von 50 μ M AR-C118925 auf die durch 200 μ M ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3 bestimmt mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde vor der Cisplatin-Zugabe erneuert und AR-C118925 und ATP neu hinzugegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Diese Experimente wurden durchgeführt von P. Surrechatchaiyan.

Tabelle 66: Effekt von 50 µM AR-C118925 auf die ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie OVCAR-3 mittels MTT-Assay. AR-C118925 wurde eine Stunde vor Beginn der 48-stündigen ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind hier die mittleren IC₅₀- bzw. pIC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Mit * p < 0,05, ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle und mit # p < 0,05 im Vergleich zu den mit 200 µM ATP behandelten Zellen.

	Kontrolle		+ 200 µM ATP		+ 50 µM AR-C118925 + 200 µM ATP	
	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀	pIC ₅₀ ± SEM
	Cisplatin	11,0 µM	4,96 ± 0,03	4,8 µM*	5,32 ± 0,05	12,2 µM ^{ns, #}

Die unbehandelten Zellen wiesen eine IC₅₀ für Cisplatin von 11,0 µM auf. Durch die Behandlung mit 200 µM ATP wurde diese erwartungsgemäß auf 4,8 µM reduziert. Diese beiden Werte unterschieden sich signifikant voneinander. Durch die Kombination von 50 µM AR-C118925 + 200 µM ATP wurde die IC₅₀ von Cisplatin wieder signifikant auf 12,2 µM erhöht. Im Gegensatz dazu waren die IC₅₀ für Cisplatin von 11,0 µM der Kontrollzellen und von 12,2 µM der mit 50 µM AR-C118925 + 200 µM ATP behandelten Zellen nicht signifikant verschieden voneinander. Folglich war es möglich, auch unter diesen Versuchsbedingungen durch den Einsatz von AR-C118925 die durch 200 µM ATP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen zu unterdrücken. Festzuhalten bleibt an dieser Stelle, dass in Gegenwart der beiden P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF272 und AR-C118925 sich jeweils die sensitivierende Wirkung von ATP auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität an beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien aufheben ließ.

Ob sich die durch ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY auch durch den Einsatz von NF272 bzw. MRS2211, als P2Y₁-Rezeptor-Antagonist inhibieren ließ, wurde nachfolgend untersucht. Repräsentative Konzentrations-Effekt-Kurven für Cisplatin für die mit NF272 + ADP behandelten Zellen sind in Abbildung 129 gezeigt. Die unbehandelten HEY-Zellen wiesen eine IC₅₀ für Cisplatin von 7,3 µM auf. Durch die Coinkubation mit 200 µM ADP wurde die IC₅₀ erwartungsgemäß signifikant auf 2,1 µM reduziert, siehe Tabelle 67. Durch die zusätzliche Gabe des P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF272 wurde die IC₅₀ wieder auf 4,1 µM erhöht. Allerdings erwies sich die IC₅₀ der mit 200 µM ADP behandelten Zellen und die IC₅₀ der mit 200 µM NF272 + 200 µM ADP behandelten Zellen als nicht signifikant verschieden voneinander. NF272 war demnach nicht in der Lage den durch ADP-induzierten Effekt auf die erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den HEY-Zellen vollständig zu unterdrücken, sondern nur partiell aufzuheben, da sich die IC₅₀ für Cisplatin der Kontrollzellen nicht signifikant von der IC₅₀ der mit 200 µM NF272 + 200 µM ADP behandelten Zellen unterschied.

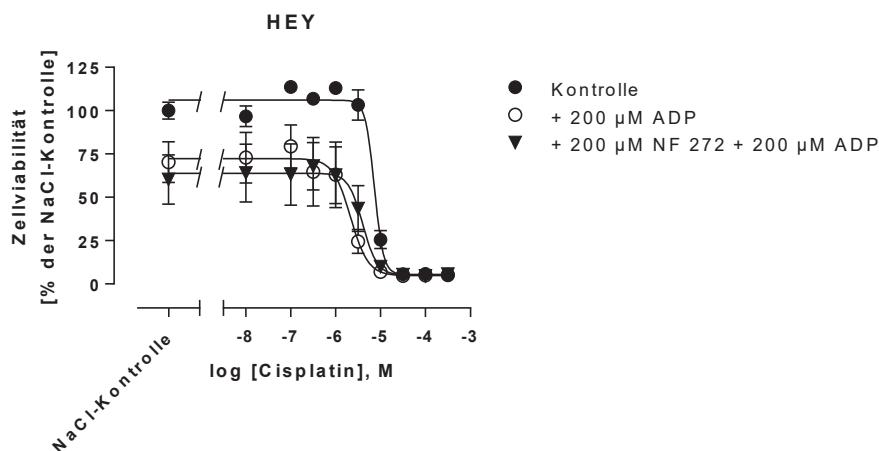


Abbildung 129: Effekt von 200 μM NF272 auf die durch 200 μM ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. NF272 wurde eine Stunde vor Beginn der 72-stündigen ADP- und Cisplatin-Coinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 67: Konzentrationsabhängiger Effekt von NF272 auf die ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittlere IC_{50} - und die pIC_{50} -Werte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$.

	Kontrolle		+ 200 μM ADP		+ 200 μM NF272 + 200 μM ADP	
	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$
	Cisplatin	7,3 μM	5,14 \pm 0,06	2,1 μM *	5,67 \pm 0,1	4,1 μM

Der P2Y₁-Rezeptor-Antagonist MRS2211 war ebenfalls nicht in der Lage den sensitivierenden Effekt von ADP auf die Zytotoxizität von Cisplatin zu inhibieren. Abbildung 130 zeigt beispielhaft die Resultate eines repräsentativen Experiments. Für die unbehandelten HEY-Zellen wurde eine IC_{50} von 4,0 μM für Cisplatin bestimmt. Durch die Behandlung mit 100 μM ADP wurde die Konzentrations-Effekt-Kurve erwartungsgemäß nach links verschoben, die IC_{50} wurde auf 1,8 μM reduziert. Durch die Zugabe von 100 μM MRS2211 eine Stunde vor Beginn der ADP- und Cisplatin-Behandlung wurde eine IC_{50} von 1,9 μM für Cisplatin bestimmt. Die Kurve für die mit 100 μM ADP und die Kurve für die mit 100 μM MRS2211 + 100 μM ADP behandelten Zellen erschienen deckungsgleich. MRS2211 erwies sich an der HEY-Zelllinie als nicht toxisch, denn es wurde kein Effekt auf das Top-Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve bzw. auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen beobachtet. Eine Beteiligung des P2Y₁-Rezeptors, welcher möglicherweise die durch ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an den HEY-Zellen vermittelt haben könnte, wurde an dieser Stelle ausgeschlossen. Daten für die OVCAR-3-Zellen wurden aufgrund des negativen Ergebnisses an den HEY-Zellen nicht mehr bestimmt.

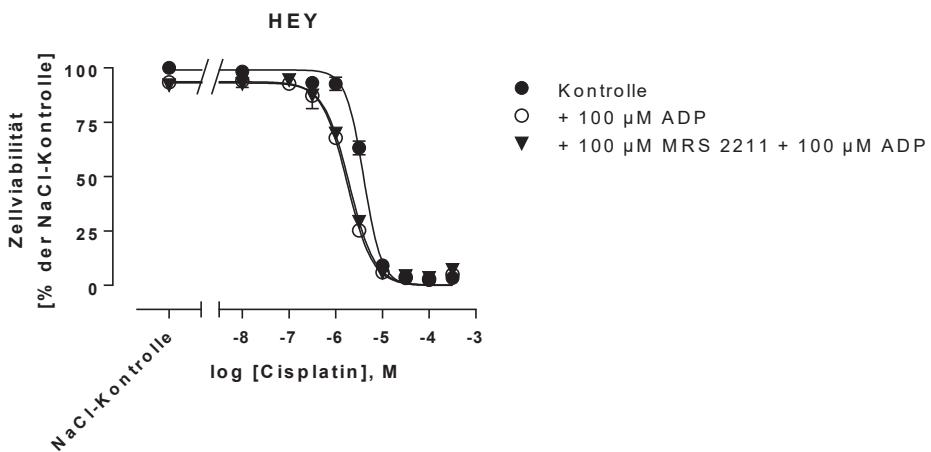


Abbildung 130: Effekt von 100 μM MRS2211 auf die durch 100 μM ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin an der Zelllinie HEY bestimmt mittels MTT-Assay. MRS2211 wurde eine Stunde vor Beginn der 72-stündigen ATP- und Cisplatin-Coinkubation zu den Zellen gegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 68: Konzentrationsabhängiger Effekt von MRS2211 auf die ADP-induzierte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin bestimmt an der Zelllinie HEY mittels MTT-Assay. Gezeigt sind die mittlere IC_{50} - und die pIC_{50} -Werte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten. Mit * $p < 0,05$.

	Kontrolle			+ 100 μM ADP			+ 100 μM MRS2211	
	IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$		IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$		IC_{50}	$\text{pIC}_{50} \pm \text{SEM}$
		Cisplatin	4,0 μM		1,8 μM *	5,75 \pm 0,02		1,9 μM

4.3.4.7 Synergismus von ATP und Cisplatin

Die Ergebnisse der zuvor präsentierten Versuche hinsichtlich der beobachteten Cisplatin-Sensitivierung mittels ATP ließen vermuten, dass ATP und Cisplatin in der Kombination einen synergistischen Effekt an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien aufwiesen. Aus diesem Grund wurden verschiedene MTT-Assays an den beiden Zelllinien durchgeführt, in denen die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (10, 25, 50, 75, 100 und 125 μM) und Cisplatin (2, 3,16 und 5 μM für HEY bzw. 2, 4 und 5 μM für OVCAR-3) behandelt wurden. Anhand der erzielten Resultate wurden nach der Chou-Talalay-Methode (150,151) unter zu Hilfenahme der Software CalcuSyn® die sogenannten Kombinationsindizes (CI) für die einzelnen Kombinationen von ATP und Cisplatin an der jeweiligen Zelllinie berechnet, siehe Tabelle 69 und Tabelle 70. Ein Kombinationsindex (CI) von 1 bedeutet, dass die beiden Substanzen zusammen einen additiven Effekt aufwiesen. Ein CI von > 1 wies auf ein antagonistisches und ein CI < 1 auf ein synergistisches Verhalten der beiden untersuchten Substanzen hin. Cisplatin wurde für dieses Experiment in Konzentrationen $\leq \text{IC}_{50}$ der jeweiligen Zelllinien eingesetzt, um ein komplettes

Absterben der Zellen zu vermeiden und stattdessen auf synergistische Effekte zwischen ATP und Cisplatin untersuchen zu können.

Tabelle 69: Kombinationsindizes (CI) berechnet mit Hilfe der Software CalcuSyn® nach der Chou-Talalay-Methode für die verschiedenen Kombinationen an ATP und Cisplatin an der Zelllinie HEY. CI >1 (= Antagonismus), CI = 1 (= additiver Effekt), CI < 1 (= Synergismus). Synergistische Kombinationen sind in fett und kursiv dargestellt.

ATP [μM]	Cisplatin [μM]		
	2	3,16	5
10	1,039	0,853	0,729
25	0,720	0,654	0,634
50	0,877	0,629	0,569
75	1,077	0,691	0,687
100	0,953	0,706	0,664
125	0,909	0,590	0,603

Tabelle 70: Kombinationsindizes (CI) berechnet mit Hilfe der Software CalcuSyn® nach der Chou-Talalay-Methode für die verschiedenen Kombinationen an ATP und Cisplatin an der Zelllinie OVCAR-3. CI >1 (= Antagonismus), CI = 1 (= additiver Effekt), CI < 1 (= Synergismus). Synergistische Kombinationen sind in fett und kursiv dargestellt.

ATP [μM]	Cisplatin [μM]		
	2	4	5
10	0,843	0,869	0,359
25	0,631	0,720	0,824
50	0,609	0,586	0,602
75	0,679	0,662	0,665
100	0,634	0,644	0,752

Tabelle 69 zeigt die berechneten Kombinationsindizes für die Zelllinie HEY. Wurde Cisplatin in der IC₅₀ von 5 μM eingesetzt, so erwiesen sich alle Kombinationen mit ATP (10, 25, 50, 75, 100 oder auch 125 μM) als synergistisch. Gleichermaßen galt für die Kombination von ATP und Cisplatin in der Konzentration von 3,16 μM. Auch diese sechs Kombinationen zeigten ein synergistisches Verhalten. Wurde Cisplatin in einer Konzentration von 2 μM eingesetzt, so wiesen nur die Kombinationen mit 25, 50, 100 und 125 μM ATP Kombinationsindizes von CI < 1 auf. Festzuhalten bleibt, dass an der Zelllinie HEY für die Kombination von ATP und Cisplatin, eingesetzt in Konzentrationen von 2, 3,16 bzw. 5 μM, ein synergistisches Verhalten nachgewiesen wurde. Tabelle 70 zeigt analog die für die OVCAR-3-Zellen berechneten Kombinationsindizes. Wurde Cisplatin in Konzentrationen von 5, 4 oder 2 μM eingesetzt, so wurden für alle Kombinationen mit ATP Kombinationsindizes von CI < 1 bestimmt. Für alle diese Kombinationen wurde ein synergistischer Effekt nachgewiesen. Auch für die OVCAR-3-Zellen wurde demnach ein synergistisches Verhalten für die Kombination von ATP und Cisplatin nachgewiesen.

4.3.4.8 Effekt von ATP auf das Apoptoseverhalten bzw. den Zellzyklus

Um weitere Aussagen zum Synergismus zwischen ATP und Cisplatin an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien treffen zu können, wurde in einem ersten Schritt das Apoptoseverhalten der Zellen unter Behandlung mit ATP bzw. Cisplatin, alleine oder in Kombination, untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt, siehe Abbildung 131.

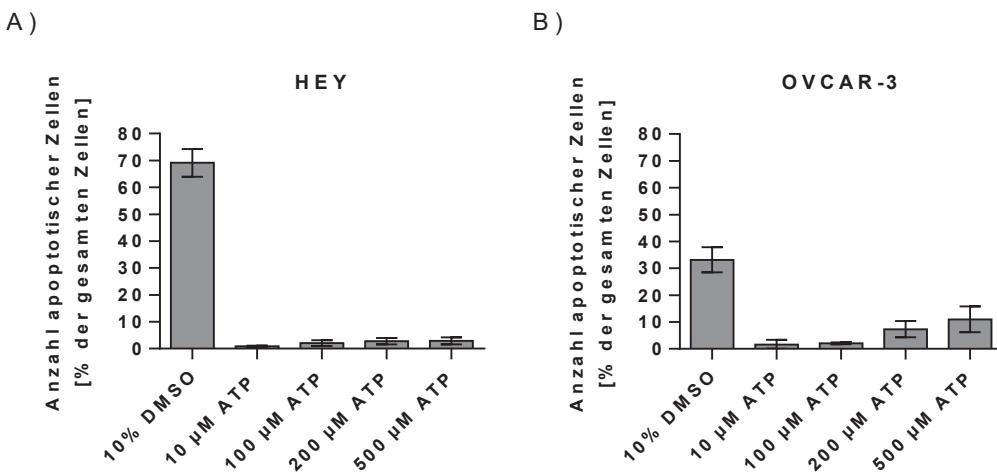


Abbildung 131: Effekt von ATP auf die Apoptose-Induktion in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (10, 100, 200 oder 500 μ M) oder 10% DMSO (als Positivkontrolle) behandelt. Gezeigt sind kontrollbereinigte Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

10% DMSO wurde an dieser Stelle als Positivkontrolle eingesetzt, da diese Konzentration bereits ausreicht, um einen apoptotischen Zelluntergang in Zellen zu induzieren (152–154). Wie erwartet lag nach der Behandlung mit 10% DMSO die Anzahl apoptotischer Zellen bei etwa 70% für die Zelllinie HEY und bei etwa 30% für die Zelllinie OVCAR-3. Gezeigt sind hier jeweils die kontrollbereinigten Mittelwerte. Kontrollbereinigt bedeutet an dieser Stelle, dass die prozentuale Anzahl apoptotischer Zellen der jeweils unbehandelten Kontrolle von der prozentualen Anzahl apoptotischer Zellen der jeweils behandelten Probe subtrahiert wurde. Durch die 24-stündige Behandlung mit ATP (10, 100, 200, 500 μ M) wurde in den HEY-Zellen marginal Apoptose induziert. Die Anzahl apoptotischer Zellen lag hier für jede der angegebenen Konzentrationen bei < 5%, siehe Abbildung 131 A. Die OVCAR-3-Zellen reagierten an dieser Stelle deutlich empfindlicher auf die ATP-Behandlung. Wurden unter 10 μ M bzw. 100 μ M ATP nur etwa 2% apoptotischer Zellen detektiert, so lag die Anzahl apoptotischer Zellen unter der Behandlung mit 200 μ M ATP bereits bei 7% und mit 500 μ M ATP sogar schon bei 11%. Durch

höhere Konzentrationen an ATP (200 μ M bzw. 500 μ M) ließ sich demnach in den OVCAR-3-Zellen bereits Apoptose induzieren, wohingegen dieses Verhalten für die Zelllinie HEY nicht beobachtet wurde.

Weiter wurde noch untersucht, welchen Einfluss die Kombination von 200 μ M ATP und Cisplatin in den jeweils angegebenen Konzentrationen auf das Apoptoseverhalten ausübte, siehe Abbildung 132. Um nach einer Behandlung von nur 24 Stunden Apoptose zu induzieren, wurde an der Zelllinie HEY Cisplatin in zwei- bzw. dreifacher IC₅₀ (d.h. von 10 μ M bzw. 15 μ M) eingesetzt. Durch die Behandlung mit 10 μ M Cisplatin wurden an der Zelllinie HEY etwa 20% apoptotischer Zellen detektiert.

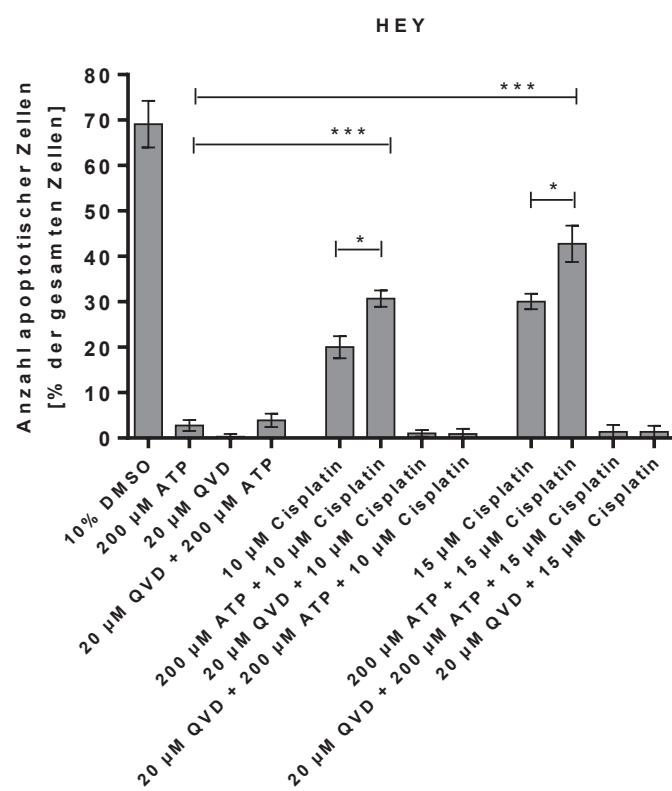


Abbildung 132: Induktion von Apoptose in der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Substanzen, alleine oder in Kombination, oder mit 10% DMSO (als Positivkontrolle) behandelt. 20 μ M QVD wurde für eine Stunde vorbehandelt. Gezeigt sind kontrollbereinigte Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$.

Durch die Kombination von 10 μ M Cisplatin + 200 μ M ATP wurde die Anzahl apoptotischer Zellkerne sogar auf 30% gesteigert und unterschied sich somit signifikant von den Werten, welche für die Einzelsubstanzen (200 μ M ATP: 2% apoptotische Zellen; 10 μ M Cisplatin: 20% apoptotische Zellen) detektiert wurden. Gleiches galt für den Einsatz von 15 μ M Cisplatin. Hier wurden ca. 30% apoptotische Zellen bestimmt. Durch die Kombination von 15 μ M Cisplatin +

200 μM ATP lag die Anzahl apoptotischer Zellkerne bei etwa 40%. Auch dieser Wert unterschied sich wiederum signifikant von den Werten, welche für die Einzelverbindungen (200 μM ATP: 2% apoptotische Zellen; 15 μM Cisplatin: 30% apoptotische Zellen) detektiert wurden. Auch hier zeigt sich wieder, dass ATP und Cisplatin in der Kombination ein synergistisches und nicht nur additives Verhalten hinsichtlich der Induktion von Apoptose an der Zelllinie HEY ausübten, siehe dazu Abbildung 133.

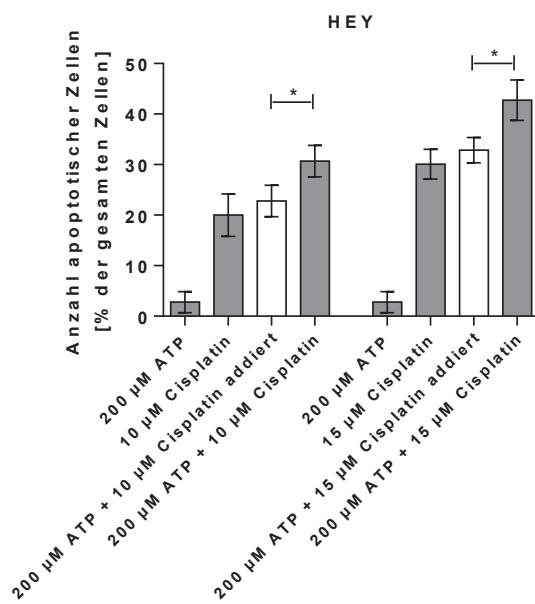


Abbildung 133: Induktion von Apoptose in der Zelllinie HEY. In grau ist der experimentell ermittelte prozentuale Anteil apoptotischer Zellen und in weiß der rein additive prozentuale Anteil apoptotischer Zellen dargestellt.
* $p < 0,5$.

Des Weiteren wurde untersucht, ob durch den Einsatz des unspezifischen Caspase-Inhibitors QVD-OPh (QVD) (155,156) die Induktion von Apoptose verhindert wurde. Dazu wurden die Zellen jeweils eine Stunde mit 20 μM QVD vorbehandelt und dann für 24 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen alleine oder in Kombination behandelt. Sowohl für 20 μM QVD alleine als auch für die Kombination von 20 μM QVD + 200 μM ATP lag die Anzahl apoptotischer Zellen bei < 5%, siehe Abbildung 132. Durch die Vorbehandlung mit 20 μM QVD wurde die zuvor durch 10 μM bzw. 15 μM Cisplatin gesteigerte Caspase-Aktivität und damit verbundene Apoptoseinduktion komplett unterdrückt. Die Anzahl apoptotischer Zellen lag bei < 2%. Gleiches galt für die Kombination von 200 μM ATP + 10 μM Cisplatin bzw. 200 μM ATP + 15 μM Cisplatin. Auch hier wurden durch den Einsatz von 20 μM QVD weniger als 2% apoptotische Zellen detektiert. QVD vermochte an dieser Stelle somit sowohl den durch Cisplatin alleine als auch den durch die Kombination von ATP und Cisplatin ausgelösten intrinsischen Weg der

Apoptoseeinleitung vollständig zu inhibieren. Vergleichbare Daten für die Zelllinie OVCAR-3 wurden an dieser Stelle nicht erhoben.

Ferner wurde noch fluoreszenzmikroskopisch im Caspase 3/7-Aktivierungs-Assay untersucht, ob es durch die Behandlung mit ATP bzw. durch die kombinierte Behandlung mit ATP und Cisplatin in den Zelllinien HEY und OVCAR-3 zu einer Aktivierung der Caspase 3 bzw. 7 kam, siehe Abbildung 135. Dazu wurden die unbehandelte Kontrolle und HEY-Zellen, welche mit 200 μ M ATP bzw. 10 μ M Cisplatin alleine oder in der Kombination mit 200 μ M ATP + 10 μ M Cisplatin bzw. OVCAR-3-Zellen, welche mit 50 μ M ATP bzw. 20 μ M Cisplatin alleine oder in der Kombination mit 50 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin behandelt wurden, wie in Kapitel 3.3.6.9 beschrieben, analysiert.

Anhand der in Abbildung 135 detektierten grünen Fluoreszenz wurde eine Aktivierung der Caspase 3/7 für die mit ATP und Cisplatin in der Kombination behandelten HEY- und auch für die OVCAR-3-Zellen eindeutig nachgewiesen, siehe ebenso Abbildung 134.

Um weiter beurteilen zu können, ob die beobachteten signifikanten Effekte der Caspase 3/7-Aktivierung synergistisch sind, wurde die Summe aus den Effekten der Einzelbedingung (200 μ M ATP und 10 μ M Cisplatin für HEY bzw. 50 μ M ATP und 20 μ M Cisplatin für OVCAR-3) gebildet und mit dem Effekt der kombinierten Behandlung verglichen, siehe Abbildung 134.

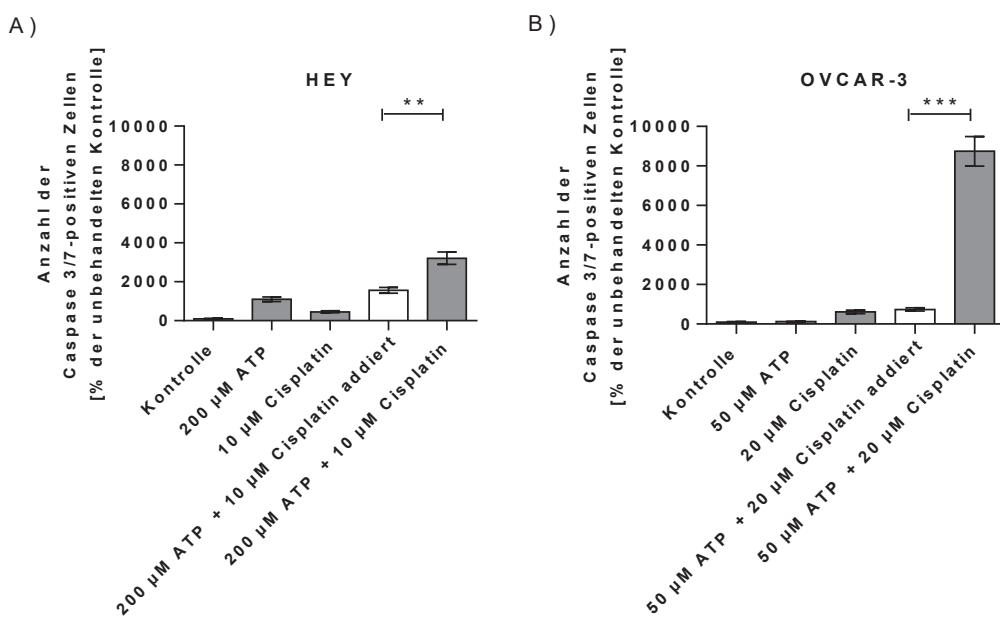


Abbildung 134: Untersuchungen zur Caspase 3/7-Aktivierung in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). In grau ist der experimentell ermittelte prozentuale Anteil Caspase 3/7-positiver Zellen und in weiß der rein additive prozentuale Anteil Caspase 3/7-positiver Zellen dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Replikaten. Diese Experimente wurden durchgeführt von C. Wang. ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

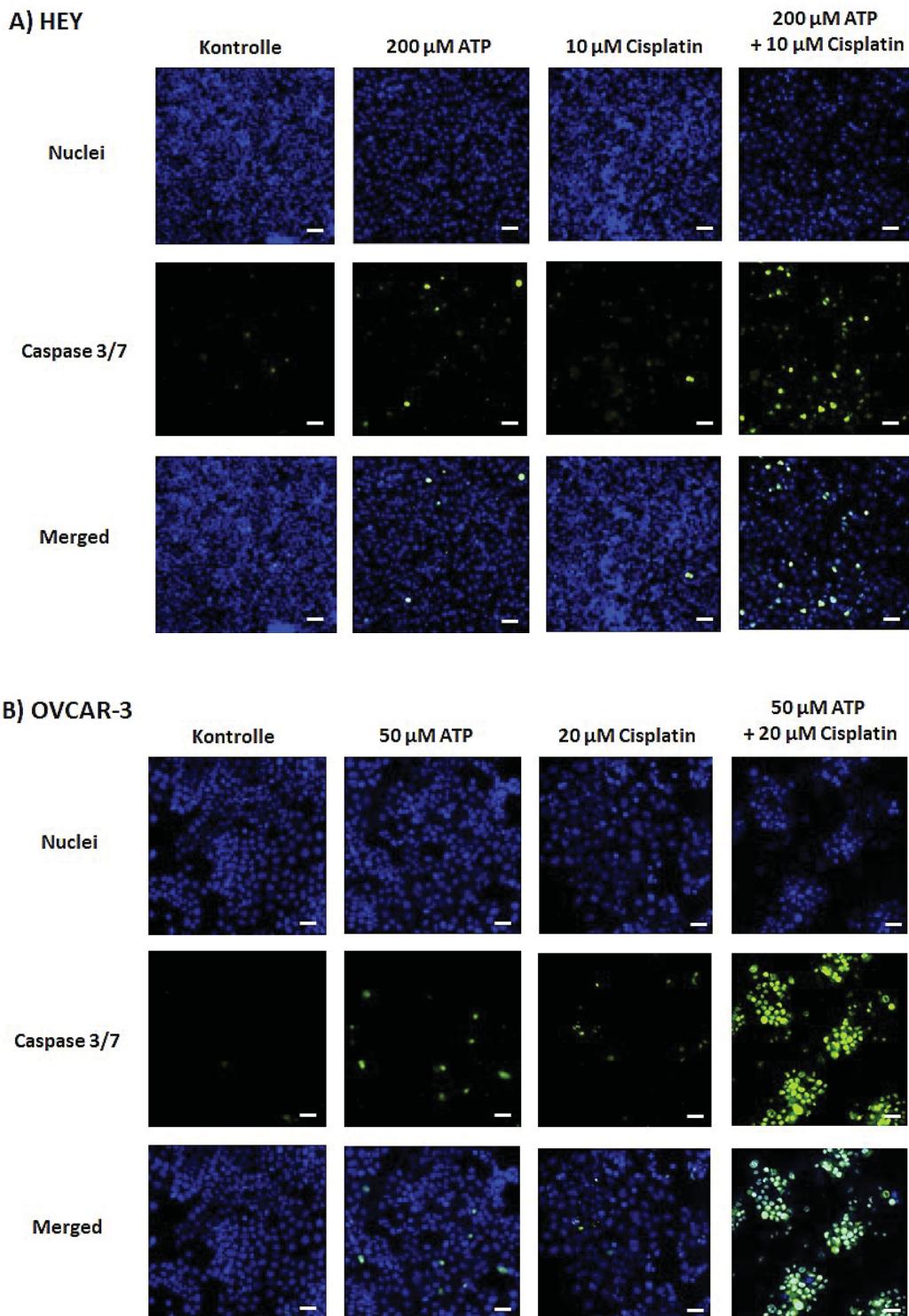


Abbildung 135: Untersuchungen zur Caspase 3/7-Aktivierung in den Zelllinien HEY (A) und OVCAR-3 (B). A) Die HEY-Zellen wurden entweder nur mit Medium (= Kontrolle) oder mit 200 μ M ATP, 10 μ M Cisplatin alleine bzw. mit der Kombination aus 200 μ M ATP + 10 μ M Cisplatin behandelt. B) Die OVCAR-3-Zellen wurden entweder nur mit Medium (= Kontrolle) oder mit 50 μ M ATP, 20 μ M Cisplatin alleine bzw. mit der Kombination aus 50 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin behandelt. Die Zellkerne sind gefärbt mit Hoechst 33342 (blau) und die Zellen mit aktiverter Caspase 3/7 zeigen eine grüne Fluoreszenz. Der weiße Balken entspricht 10 μ m. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Experiments sind hier gezeigt. Diese Experimente wurden durchgeführt von C. Wang.

Auch hier unterschied sich die Summe der addierten Einzeleffekte signifikant vom dem Effekt auf die Aktivierung der Caspasen 3/7, wenn die HEY-Zellen in der Kombination mit 200 µM ATP + 10 µM Cisplatin bzw. die OVCAR-3-Zellen mit 50 µM ATP + 20 µM Cisplatin behandelt wurden.

Somit bleibt an dieser Stelle festzuhalten, dass es einerseits durch die gleichzeitige Behandlung mit ATP und Cisplatin im Vergleich zu der jeweils unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Aktivierung der Caspasen 3/7 in den Ovarialkarzinom-Zelllinien kam und anderseits übte ATP in beiden Zelllinien einen signifikanten synergistischen Effekt auf die Cisplatin-induzierte Caspasen 3/7-Aktivierung aus.

Weiter wurde untersucht, welchen Effekt die 24-stündige Behandlung mit ATP bzw. Cisplatin, als Einzelsubstanz oder in der Kombination, auf den Zellzyklus der jeweiligen Zelllinie ausübte, siehe Abbildung 136 bis Abbildung 139.

Die unbehandelten HEY-Zellen (= Kontrolle) zeigten eine typische Zellzyklusverteilung (124). Etwa 57% der Zellen befanden sich in der G₀/G₁-Phase, 12% in der S-Phase und etwa 30% in der G₂/M-Phase. Außerdem wurde etwa 1% der Zellen in der Sub-G₁-Phase detektiert. Durch die Behandlung mit 10 µM bzw. 100 µM ATP wurde die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen nicht signifikant beeinflusst. Unter 10 µM ATP wurden 58% der Zellen in der G₀/G₁-Phase, 12% in der S-Phase, 29% in der G₂/M-Phase und wiederum etwa 1% der Zellen in der Sub-G₁-Phase ermittelt. Für 100 µM ATP sahen die Werte wie folgt aus: 55% in G₀/G₁-Phase, 13% in S-Phase, 30% in G₂/M-Phase und 2% in Sub-G₁-Phase. Unter der Behandlung mit 200 µM ATP wurden Veränderungen in der Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen registriert. So nahm im Vergleich zur Kontrolle die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase signifikant von 57% auf 45% ($p < 0,05$) ab. Die S-Phase war unverändert. In der Kontrolle wurden hier 12% der Zellen detektiert und unter 200 µM ATP waren es 13% der Zellen. Demgegenüber nahmen die Anzahl der Zellen sowohl in der G₂/M-Phase als auch in der Sub-G₁-Phase im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Etwa 37% der Zellen befanden sich nach der Behandlung mit 200 µM ATP in der G₂/M-Phase und 5% in der Sub-G₁-Phase. Die gleiche Tendenz wurde auch für die mit 500 µM ATP behandelten Zellen beobachtet. Hier wurden nur noch 37% der Zellen in der G₀/G₁-Phase, dafür aber 22% der Zellen in der S-Phase, 35% der Zellen in der G₂/M-Phase und 6% in der Sub-G₁-Phase detektiert, siehe Abbildung 136. 5 µM Cisplatin beeinflusste wie erwartet deutlich die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen. Die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase stieg von 1% (Kontrolle) auf etwa 20% an. In der G₀/G₁-Phase befanden sich nur noch 30% der Zellen, 18% in der S-Phase und etwa 32% der Zellen in der G₂/M-Phase. Der durch eine Behandlung mit Cisplatin typischerweise induzierte Zellzyklusarrest in der S-Phase (157) bzw. in der G₂/M-Phase (158) wurde an dieser Stelle für die HEY-Zellen unter den gegebenen Bedingungen nur schwach registriert.

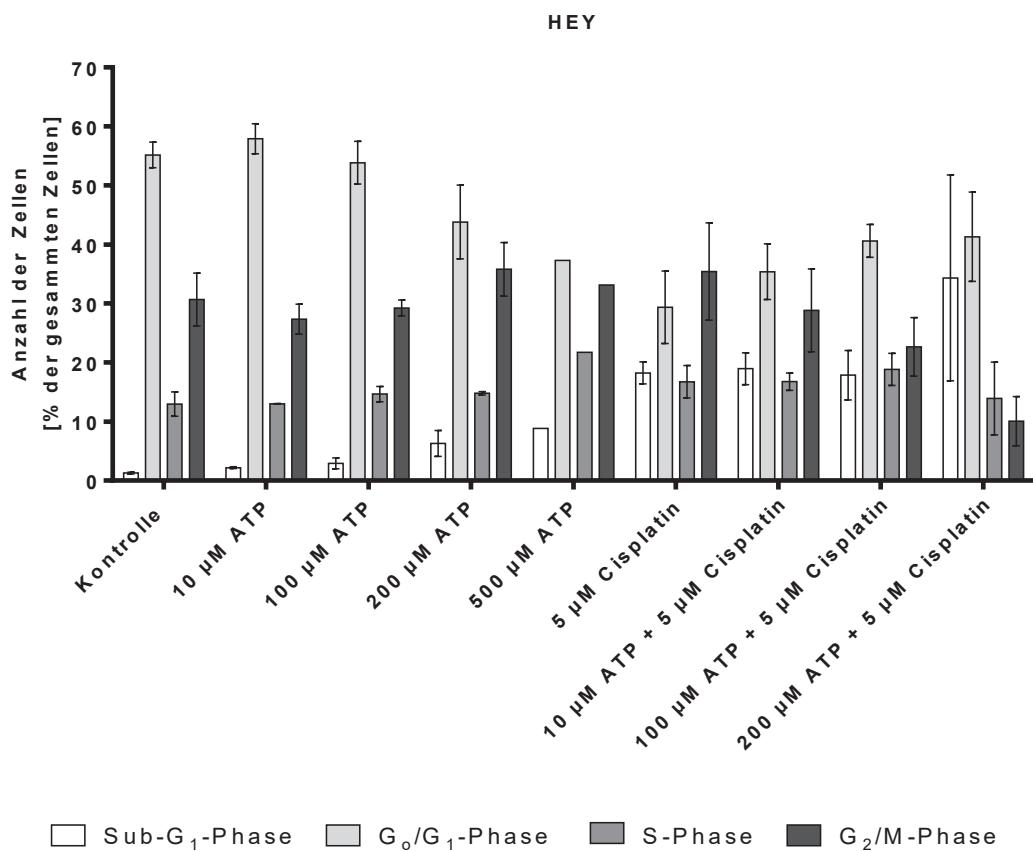
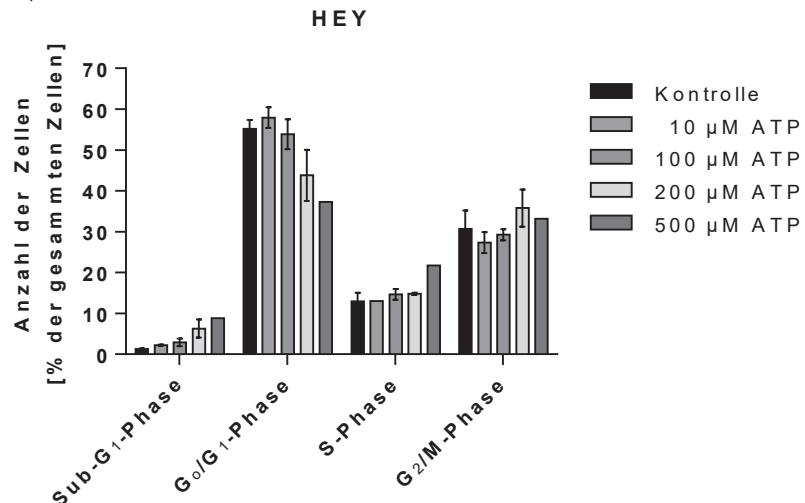


Abbildung 136: Zellzyklusverteilung in der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit Medium (= Kontrolle) oder mit ATP bzw. Cisplatin, alleine oder in Kombination, behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Eine leichte, nicht signifikante Zunahme an Zellen in der S- bzw. G₂/M-Phase wurde hier ausgemacht. Dafür wurde eine große Anzahl an Zellen in der Sub-G₁-Phase detektiert, was für einen apoptotischen Untergang der Zellen sprach. Durch die gleichzeitige Behandlung mit 10 μM ATP + 5 μM Cisplatin bzw. 100 μM ATP + 5 μM Cisplatin wurde die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen im Vergleich zu den alleine mit 5 μM Cisplatin behandelten Zellen nur marginal beeinflusst. Etwa je 20% der Zellen befanden sich unter beiden Bedingungen (10 μM ATP + 5 μM Cisplatin bzw. 100 μM ATP + 5 μM) in der Sub-G₁-Phase bzw. in der S-Phase. Die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase stieg von 30% (5 μM Cisplatin) auf 35% (10 μM ATP + 5 μM Cisplatin) bzw. 40% (100 μM ATP + 5 μM Cisplatin) an. Demgegenüber sank die Anzahl der Zellen in der G₂/M-Phase von 32% (5 μM Cisplatin) auf 30% (10 μM ATP + 5 μM Cisplatin) bzw. 25% (100 μM ATP + 5 μM Cisplatin). Durch die Behandlung mit 200 μM ATP + 5 μM Cisplatin wurde der Zellzyklus am deutlichsten beeinflusst. Die Anzahl apoptotischer Zellen lag hier bei etwa 35%. Unter dieser Bedingung wurde somit der höchste prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. 40% der Zellen wurden in der G₀/G₁-Phase, 15% in der S-Phase und nur noch 10%

der Zellen in der G₂/M-Phase detektiert. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, welchen Effekt eine Behandlung mit ATP bzw. eine Behandlung mit ATP und Cisplatin in der Kombination auf die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen ausübt, wurden die zuvor beschriebenen Daten nochmals anders gegeneinander aufgetragen, siehe dazu Abbildung 137.

A)



B)

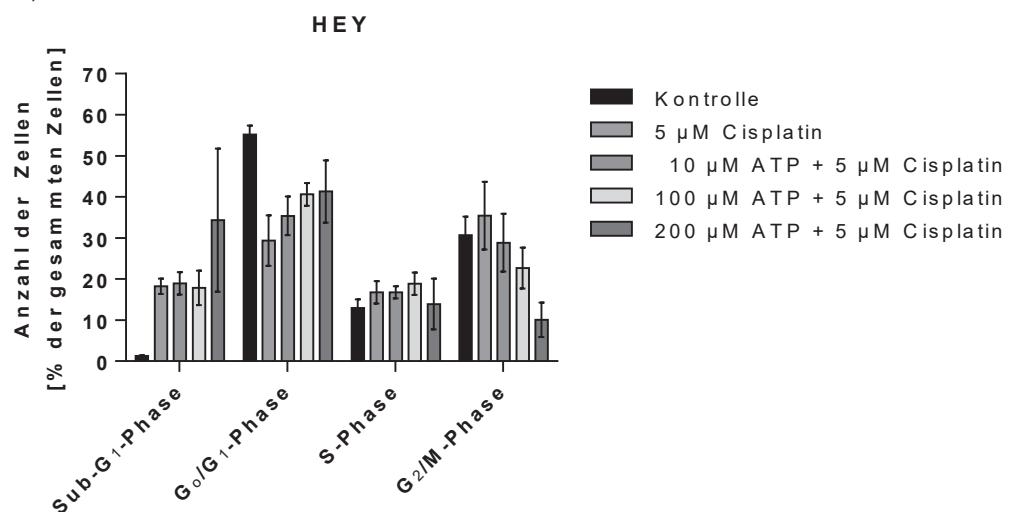


Abbildung 137: Effekt von ATP (A) bzw. von Cisplatin + ATP (B) auf die Zellzyklusverteilung in der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit Medium (= Kontrolle) oder mit ATP bzw. 5 µM Cisplatin, alleine oder in Kombination, behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Abbildung 137 A veranschaulicht die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen unter der 24-stündigen Behandlung mit ATP. Es ist zu erkennen, dass bei steigender Konzentration an ATP die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase zunimmt. Auf der anderen Seite nimmt die Anzahl

der Zellen, welche sich in der G₀/G₁-Phase befinden, deutlich ab. Die G₂/M-Phase erscheint hierbei im Mittel unverändert. Selbiges trifft auch auf die Anzahl der Zellen in der S-Phase zu. Nur die HEY-Zellen, welche mit 500 µM ATP behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu den anderen vier Bedingungen, einen höheren prozentualen Anteil an Zellen in der S-Phase. Diese Beobachtung weist auf einen möglichen S-Phase-Arrest unter hohen Konzentrationen an ATP hin. In Abbildung 137 B ist der Effekt von ATP und Cisplatin in der Kombination auf die Zellzyklusverteilung der HEY-Zellen gezeigt. Erwartungsgemäß nimmt die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase zu. Auffällig ist, dass durch die Behandlung mit 5 µM Cisplatin, 10 µM ATP + 5 µM Cisplatin und 100 µM ATP + 5 µM Cisplatin nahezu identische Werte für die Zellen in der Sub-G₁-Phase von etwa 18% erzielt wurden. Erst durch die Kombination von 200 µM ATP + 5 µM Cisplatin wurde dieser Wert deutlich auf 35% gesteigert. Die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase reduzierte sich unter der Behandlung mit Cisplatin (alleine oder in Kombination mit ATP) im Vergleich zu den Kontrollzellen zwar deutlich, aber es ließ sich eine erneute Zunahme der Zellzahl beobachten, je höher die Konzentration an ATP wurde. Die Anzahl der Zellen, welche sich in der S-Phase befanden, nahm tendenziell unter der Behandlung mit 5 µM Cisplatin, alleine oder in Kombination mit 10 µM oder 100 µM ATP, im Vergleich zur Kontrolle zu. Dies wies auf einen Arrest des Zellzyklus in der S-Phase hin. Für die sich in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen wurde eine deutliche Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen nach kombinierter Behandlung mit Cisplatin und ATP ermittelt. Hier galt, je höher die Konzentration an ATP, desto weniger Zellen wurden in der G₂/M-Phase detektiert. Wobei durch die alleinige Behandlung mit 5 µM Cisplatin die Anzahl an Zellen, welche sich in der G₂/M-Phase befanden, zunächst gesteigert wurde.

Die unbehandelten OVCAR-3-Zellen (= Kontrolle), siehe Abbildung 138, verfügten ebenfalls über eine typische Zellzyklusverteilung (124). Etwa 59% der Zellen befanden sich in der G₀/G₁-Phase, 10% in der S-Phase und etwa 30% in der G₂/M-Phase. Außerdem wurde etwa 1% der Zellen in der Sub-G₁-Phase detektiert. Durch die Behandlung mit 10 µM ATP wurde die Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen nicht beeinflusst. 61% der Zellen wurden in der G₀/G₁-Phase, 8% in der S-Phase, 29% in der G₂/M-Phase und wiederum etwa 2% der Zellen in der Sub-G₁-Phase bestimmt. Unter der Behandlung mit 100 µM ATP veränderten sich diese Werte wie folgt: 65% in G₀/G₁-Phase, 20% in S-Phase, 30% in G₂/M-Phase und 2% in Sub-G₁-Phase. Unter der Behandlung mit 200 µM ATP wurden weitere Veränderungen in der Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen beobachtet. So nahm im Vergleich zur Kontrolle die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase von 59% auf 55% ab. In der S-Phase wurden hier statt 10% der Zellen (Kontrolle) etwa 20% der mit 200 µM ATP behandelten Zellen detektiert. Außerdem nahm die Anzahl der Zellen in der G₂/M-Phase im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Etwa 40% der Zellen be-

fanden sich nach der Behandlung mit 200 μ M ATP in der G₂/M-Phase. Die Sub-G₁-Phase schien unverändert, hier wurden 2% der Zellen detektiert. Eine ähnliche Tendenz wurde auch für die mit 500 μ M ATP behandelten Zellen beobachtet. Hier wurden nur noch 45% der Zellen in der G₀/G₁-Phase, wiederum etwa 20% der Zellen in der S-Phase, 30% der Zellen in der G₂/M-Phase und 8% in der Sub-G₁-Phase detektiert, siehe Abbildung 138.

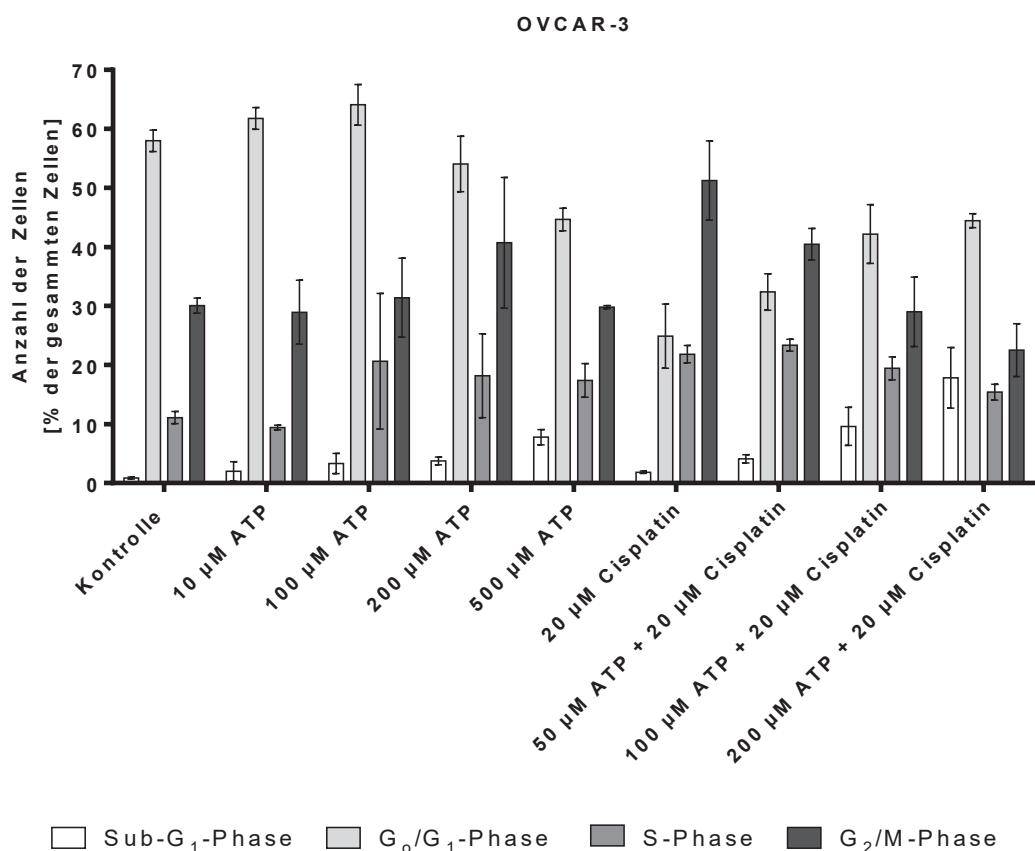


Abbildung 138: Zellzyklusverteilung in der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit Medium (= Kontrolle) oder mit ATP bzw. Cisplatin, alleine oder in Kombination, behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Auch bei den OVCAR-3-Zellen beeinflusste 20 μ M Cisplatin erwartungsgemäß die Zellzyklusverteilung deutlich. Die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase lag, wie bei den Kontrollzellen, bei etwa einem 1%. In der G₀/G₁-Phase befanden sich nur noch 25% der Zellen, 22% in der S-Phase und etwa 52% der Zellen in der G₂/M-Phase. Hier wurde somit deutlich der für eine Behandlung mit Cisplatin beschriebene Arrest der G₂/M-Phase beobachtet (158). Durch die gleichzeitige Behandlung mit 50 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin, 100 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin bzw. 200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin wurde die Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen im Vergleich zu den alleine mit 20 μ M Cisplatin behandelten Zellen deutlich beeinflusst. Die Anzahl apoptotischer Zellen (Sub-G₁-Phase) erhöhte sich von 1% (20 μ M Cisplatin) auf 3% (50 μ M ATP + 20 μ M Cis-

platin), bzw. auf 10% (100 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin) bzw. auf 20% (200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin). Unter der Behandlung mit 50 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin befanden sich bereits 32% der Zellen in der G₀/G₁-Phase anstatt 25% der Zellen, welche nach der Behandlung mit 20 μ M Cisplatin alleine detektiert wurden. Unter der Behandlung mit 100 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin stieg die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase auf 32% an bzw. auf 40% unter der Behandlung mit 200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin. Demgegenüber sanken die Anzahl der Zellen sowohl in der S-Phase als auch in der G₂/M-Phase unter den zuvor genannten Bedingungen. Folgende Werte wurden für die sich in der S-Phase befindlichen Zellen registriert: 22% (20 μ M Cisplatin), 25% (50 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin), 20% (100 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin) bzw. 15% (200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin). Die Anzahl der Zellen in der G₂/M-Phase reduzierte sich von 52% (20 μ M Cisplatin) auf 42% (50 μ M ATP + 5 μ M Cisplatin), 30% (100 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin) bzw. 25% (200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin).

Auch hier wurden die zuvor beschriebenen Daten nochmalig anderweitig gegeneinander aufgetragen, um anschaulichere Aussagen dazu treffen zu können, welchen Effekt eine Behandlung mit ATP bzw. mit Cisplatin und ATP auf die Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen ausübte, siehe Abbildung 139. Abbildung 139 A beschreibt die Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen unter der 24-stündigen Behandlung mit ATP. Es ist zu erkennen, dass auch hier bei steigender Konzentration an ATP die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase zunimmt. Auf der anderen Seite nimmt die Anzahl der Zellen, welche sich in der G₀/G₁-Phase befinden, nach der Behandlung mit 10 μ M bzw. 100 μ M ATP zunächst leicht zu, doch bei höheren Konzentrationen an ATP (200 μ M oder 500 μ M) zeigte sich auch hier eine deutlich abnehmende Tendenz in der Zellzahl. Die G₂/M-Phase blieb im Mittel unverändert. Die Anzahl der Zellen, welche sich in der S-Phase befanden, stieg mit steigender ATP-Konzentration an, so dass auch hier Hinweise auf einen durch ATP-induzierten S-Phase-Arrest zu finden sind. Abbildung 139 B veranschaulicht den Effekt von ATP und Cisplatin in der Kombination auf die Zellzyklusverteilung der OVCAR-3-Zellen. Erwartungsgemäß nimmt auch hier die Anzahl der Zellen in der Sub-G₁-Phase stetig zu. Die Anzahl der Zellen in der G₀/G₁-Phase reduzierte sich unter der Behandlung mit Cisplatin (alleine oder in Kombination mit ATP) im Vergleich zu den Kontrollzellen zwar deutlich, aber es ließ sich auch hier, wie zuvor bei den HEY-Zellen, eine erneute Zunahme der Zellzahl beobachten, je höher die Konzentration an ATP wurde. Die Anzahl der Zellen, welche sich in der S-Phase befanden, nahm unter der Behandlung mit 20 μ M Cisplatin, alleine oder in Kombination mit 50, 100 und 200 μ M ATP, im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu. Allerdings wurde ebenfalls beobachtet, dass mit steigender Konzentration an ATP der prozentuale Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen im Vergleich zu den mit Cisplatin alleine behandelten Zellen wieder abnahm. Auch hier ließen sich somit Hinweise auf einen durch ATP-induzierten

Zellzyklusarrest in der S-Phase finden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde durch 20 μ M Cisplatin initial eine Steigerung der Zellen, welche sich in der G₂/M-Phase befanden, herbeigeführt. Diese Beobachtung ging mit einem durch Cisplatin-induzierten Arrest des Zellzyklus in der G₂/M-Phase einher. Für die sich in der G₂/M-Phase befindlichen Zellen wurde eine deutlich gesteigerte Anzahl an Zellen nach der alleinigen Behandlung mit Cisplatin registriert. Durch die Kombination mit steigenden Konzentrationen an ATP reduzierte sich wiederum die prozentuale Anzahl der Zellen in der G₂/M-Phase.

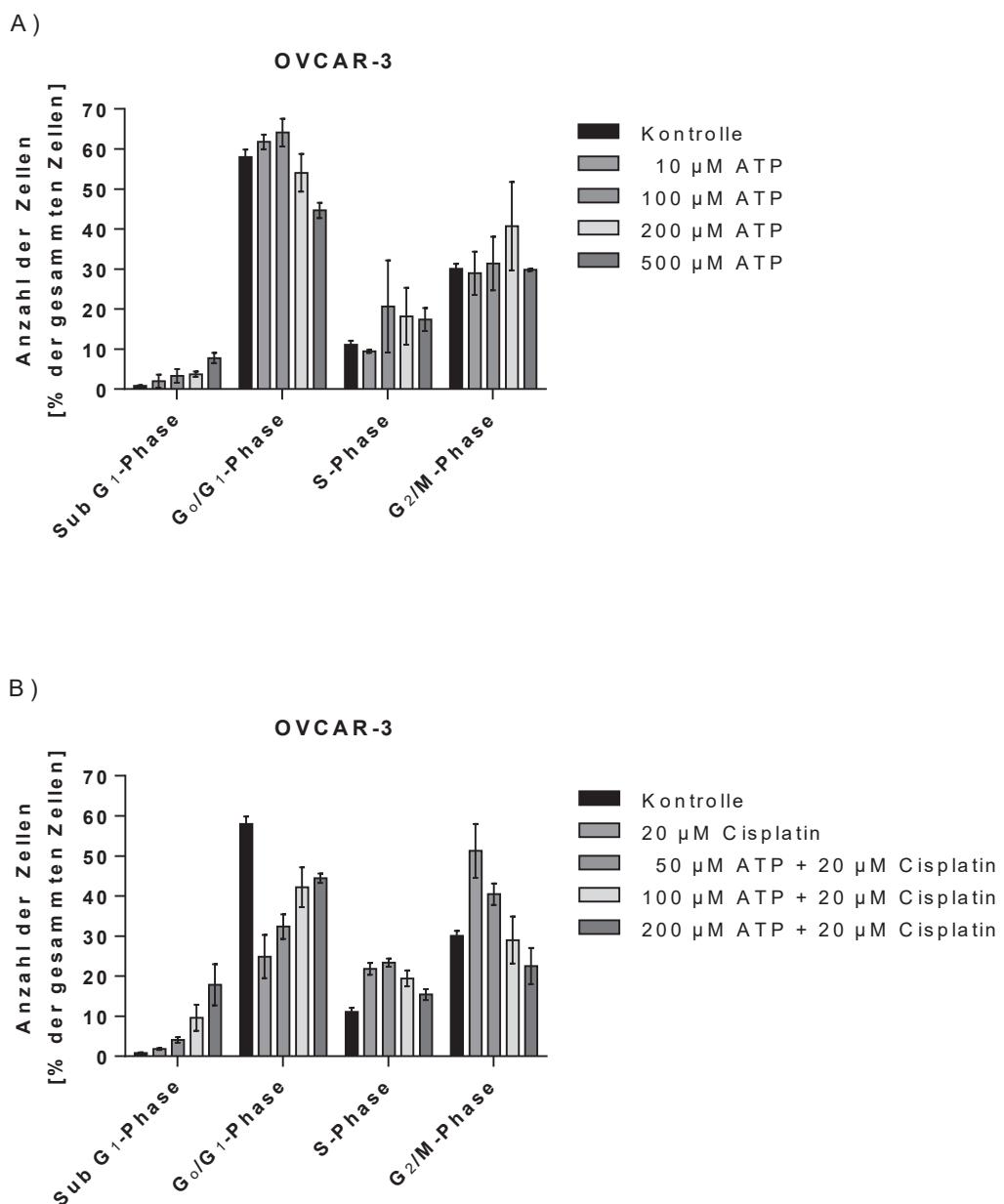


Abbildung 139: Effekt von ATP (A) bzw. von Cisplatin + ATP (B) auf die Zellzyklusverteilung in der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit Medium (= Kontrolle) oder mit ATP bzw. 20 μ M Cisplatin, alleine oder in Kombination, behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

4.3.5 Untersuchungen zum möglichen Mechanismus des sensitivierenden Effektes von ATP auf die Cisplatin-Zytotoxizität

4.3.5.1 Effekt von ATP auf die Cisplatin-induzierte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die gleichzeitige Gabe von ATP die durch Cisplatin-induzierte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen beeinflusst wurde. Zwar werden DNA-Doppelstrangbrüche nicht primär durch Cisplatin induziert, es werden aber unter einer Behandlung mit Cisplatin vorwiegend 1,2- oder 1,3-Intrastrand-Crosslinks und in kleinerem Ausmaß auch Interstrand-Crosslinks beobachtet (159–161). Dabei kann es jedoch durch die Reparatur Cisplatin-vermittelter Intrastrand-Crosslinks oder die Blockade und das Kollabieren von Replikationsgabeln durch Interstrand-Crosslinks zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommen (162). Zum Nachweis solcher DNA-Doppelstrangbrüche wird das Auftreten von Foci im Zellkern, bestehend aus Serin¹³⁹-phosphoryliertem Histon H2AX (γ H2AX), als sogenannter Surrogatparameter für das Bestimmen von DNA-Doppelstrangbrüchen herangezogen (125). Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3.6.8 beschrieben vorbereitet, für 6 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen oder Medium als Negativkontrolle behandelt oder für 30 Minuten mit ionisierender Strahlung mit einer Energiedosis von 2 Gy als Positivkontrolle bestrahlt und analog dem Protokoll weiter verfahren. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind in den Abbildung 140 und Abbildung 141 gezeigt. An den Zelllinien HEY und OVCAR-3 wurde untersucht, wie ausgeprägt die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Behandlung mit 200 μ M ATP, 5 μ M Cisplatin (HEY) bzw. 20 μ M Cisplatin (OVCAR-3) alleine oder in Kombination war. Bei den unbehandelten HEY-Zellen trat ein Focus, sprich ein DNA-Doppelstrangbruch, pro Zellkern auf. Das gleiche Ergebnis wurde ebenfalls für die mit 200 μ M ATP behandelten HEY-Zellen erzielt. Durch die 30-minütige Bestrahlung der HEY-Zellen mit 2 Gy wurde erwartungsgemäß die Anzahl der Doppelstrangbrüche pro Zellkern auf 5 erhöht. Durch die Behandlung mit 5 μ M Cisplatin wurde die Anzahl der Foci pro Zellkern auf etwa 6 und durch die gleichzeitige Behandlung mit 200 μ M ATP + 5 μ M Cisplatin auf 7,5 gesteigert. Allerdings erwiesen sich diese beiden Werte als nicht signifikant verschieden voneinander, siehe Abbildung 140.

Sowohl bei den unbehandelten als auch bei den mit 200 μ M ATP behandelten OVCAR-3-Zellen wurde ein DNA-Doppelstrangbruch pro Zellkern detektiert. Durch die 30-minütige Bestrahlung der OVCAR-3-Zellen mit 2 Gy wurde auch hier erwartungsgemäß die Anzahl der Doppelstrangbrüche pro Zellkern sogar deutlicher im Vergleich zu den HEY-Zellen auf 11 erhöht. Nach der Behandlung mit 20 μ M Cisplatin wurden 3 Foci pro Zellkern und nach der gleichzeitigen Behandlung von 200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin wurden ebenfalls etwa 3 Foci pro Zellkern detektiert, siehe Abbildung 142.

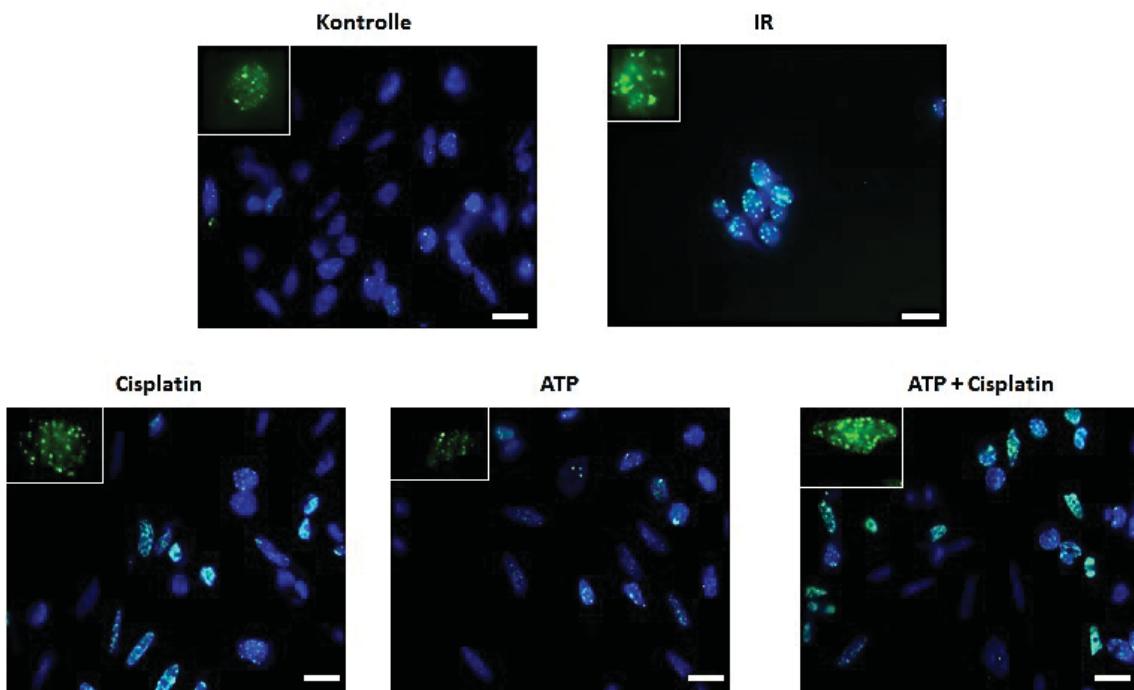


Abbildung 140: Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen in HEY-Zellen mittels Markierung von γ H2AX-Foci.
 HEY-Zellen wurden entweder für 6 Stunden mit Medium (= Kontrolle), 5 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP, 5 μ M Cisplatin + 200 μ M ATP in der Kombination behandelt oder für 30 Minuten mit 2 Gy bestrahlt (= IR). Die Zellkerne sind gefärbt mit DAPI (blau) und die γ H2AX Foci mit Alexa Fluor 488 (grün). Der weiße Balken entspricht 20 μ m. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Experiments sind hier gezeigt.

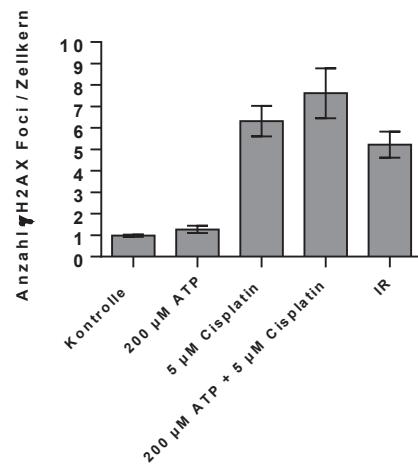


Abbildung 141: Anzahl der γ H2AX Foci pro Zellkern. HEY-Zellen wurden dazu entweder 6 Stunden mit Medium (= Kontrolle), 200 μ M ATP, 5 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP + 5 μ M Cisplatin behandelt oder für 30 Minuten mit 2 Gy (= IR) bestrahlt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

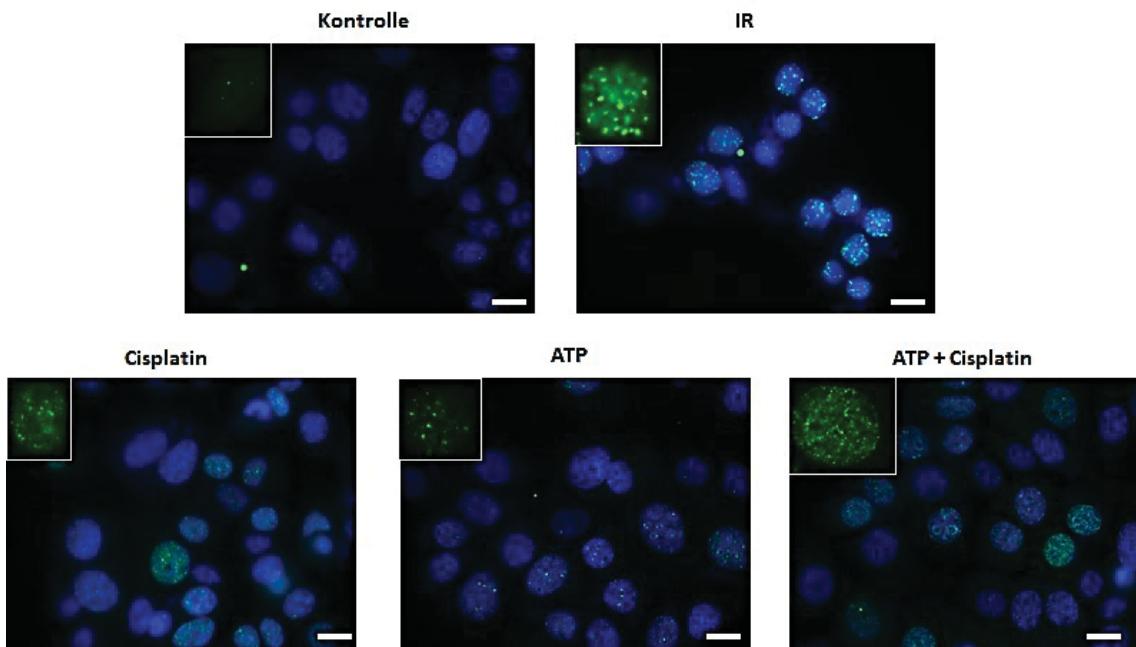


Abbildung 142: Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen in OVCAR-3-Zellen mittels Markierung von γ H2AX-Foci. OVCAR-3-Zellen wurden entweder für 6 Stunden mit Medium (= Kontrolle), 20 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP, 20 μ M Cisplatin + 200 μ M ATP in der Kombination behandelt oder für 30 Minuten mit 2 Gy bestrahlt (IR). Die Zellkerne sind gefärbt mit DAPI (blau) und die γ H2AX Foci mit Alexa Fluor 488 (grün). Der weiße Balken entspricht 20 μ m. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines repräsentativen Experiments sind hier gezeigt.

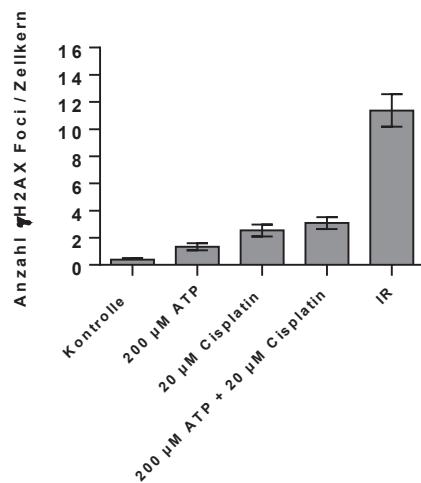


Abbildung 143: Anzahl der γ H2AX Foci pro Zellkern. OVCAR-3-Zellen wurden dazu entweder 6 Stunden mit Medium (= Kontrolle), 200 μ M ATP, 20 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP + 20 μ M Cisplatin behandelt oder für 30 Minuten mit 2 Gy (= IR) bestrahlt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass 200 μ M ATP alleine an beiden Zelllinien kein vermehrtes Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen hervorruft. Cisplatin alleine induzierte in beiden Fällen wie erwartet die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Anzahl der Foci pro Zell-

kern wurde durch die Kombination von Cisplatin mit 200 μ M ATP nicht signifikant gesteigert, was vermuten lässt, dass ATP an dieser Stelle keinen Einfluss auf die Cisplatin-Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen ausübt. Es bleibt festzuhalten, dass die sensitivierende Wirkung von ATP auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität nicht mit einem vermehrten Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen, also einer erhöhten Schädigung der DNA, einhergeht.

4.3.5.2 Effekt von ATP auf die Expression ausgewählter Proteine

Um mögliche mechanistische Vorgänge aufzuklären, wodurch der ATP-induzierte sensitivierende Effekt von Cisplatin an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien vermittelt wird, wurden die nachstehenden Western Blot-Experimente durchgeführt. Betrachtet wurde hier die Expression von verschiedenen Proteinen, welche an der ATP-induzierten erhöhten Cisplatin-Zytotoxizität beteiligt sein könnten, siehe Kapitel 1.1. und 1.2. Das waren der EGF-Rezeptor (inklusive seinem Phosphorylierungsstatus) und die Serin/Threonin-Kinase mTOR (= Mammalian Target of Rapamycin), welche die Zellproliferation kontrollieren. Das Protein β -Actin diente hier als Beladungskontrolle. Repräsentative Aufnahmen der Western Blots sind in den nachstehenden Abbildung 144 - Abbildung 147 gezeigt. Zunächst wurde an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 untersucht, welchen Effekt eine kurzzeitige, 10-minütige Behandlung mit ATP (10, 50 oder 100 μ M) im Vergleich zu der längerfristigen Behandlung von 48 Stunden auf die Expression des EGF-Rezeptors und seinen Phosphorylierungssgrad ausübt.

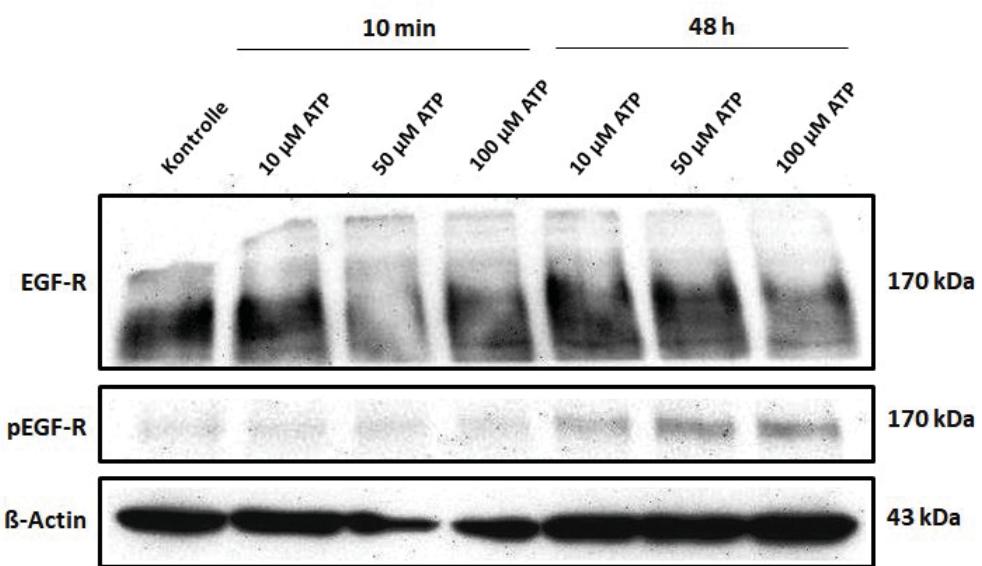


Abbildung 144: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine EGF-R und pEGF-R an der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (10, 50 oder 100 μ M) oder Medium (= Kontrolle) entweder für 10 Minuten oder für 48 Stunden behandelt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. β -Actin fungierte als Beladungskontrolle.

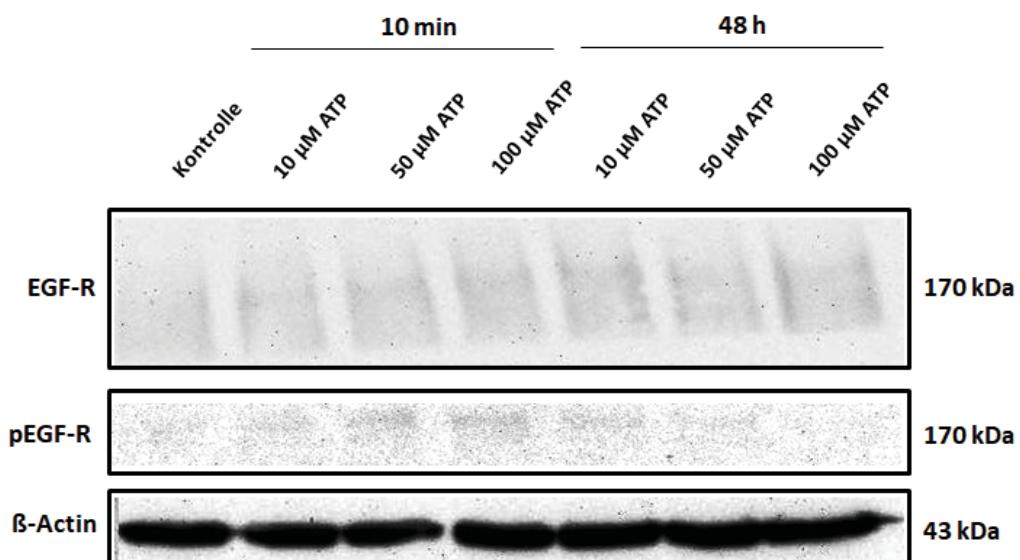


Abbildung 145: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine EGF-R und pEGF-R an der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ATP (10, 50 oder 100 µM) oder Medium (= Kontrolle) entweder für 10 Minuten oder für 48 Stunden behandelt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. β-Actin fungierte als Beladungskontrolle.

Wie in Abbildung 144 zu erkennen ist, wurde in der Zelllinie HEY der EGF-Rezeptor unter allen Bedingungen deutlich nachgewiesen. Nach der Behandlung mit ATP wurde auch der phosphorylierte EGF-Rezeptor (pEGF-R) gesehen. Mit zunehmender Konzentration an ATP und mit Zunahme der Inkubationszeit wurde mehr phosphoryliertes Protein detektiert. Die stärksten Banden für den phosphorylierten EGF-Rezeptor zeigten sich nach einer 48-stündigen Behandlung mit 50 µM bzw. 100 µM ATP (siehe Abbildung 144). Ein ähnliches Verhalten ließ sich für die OVCAR-3-Zellen nicht beobachten, da die Expression der untersuchten Gene an der Grenze der Detektierbarkeit lag, siehe Abbildung 145. Unter den gegebenen Bedingungen ließen sich nach der ATP-Behandlung keine entsprechenden Banden für das phosphorylierte EGF-Rezeptorprotein bestimmen, siehe Abbildung 145.

Weiter wurden noch 24-Stunden-Kombinationsexperimente durchgeführt bei denen die Zellen entweder mit ATP oder Cisplatin alleine oder mit einer der Kombination der beiden Substanzen in den jeweils angegebenen Konzentrationen behandelt wurden. Außerdem wurden Zellen für 3 Stunden mit 1 µM Staurosporin behandelt. Staurosporin, ein Kinaseinhibitor und starker Apoptose-Induktor, wurde hier eingesetzt, um *in-vitro* Apoptose zu induzieren (163,164) und diente somit als Positivkontrolle. Repräsentative Western Blots für die Proteine pEGF-R und mTOR sind in den beiden nachstehenden Abbildung 146 und Abbildung 147 gezeigt.

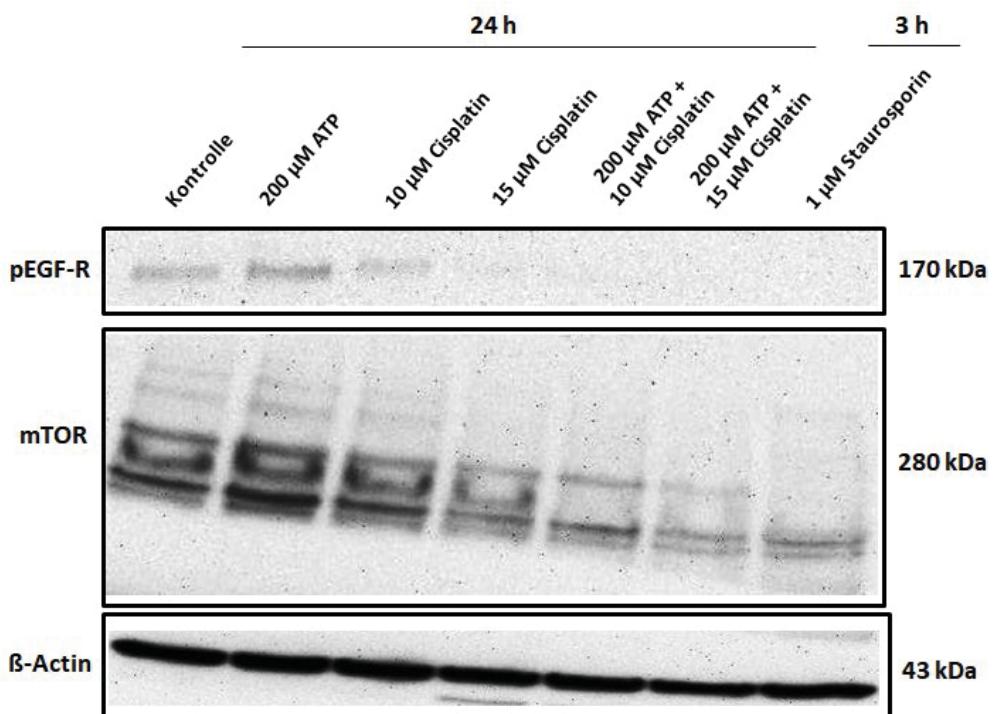


Abbildung 146: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine pEGF-R und mTOR an der Zelllinie HEY. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium alleine (= Kontrolle), 200 µM ATP, 10 µM bzw. 15 µM Cisplatin, 200 µM ATP + 10 µM Cisplatin bzw. 200 µM ATP + 15 µM Cisplatin oder für 3 Stunden mit 1 µM Staurosporin behandelt. Staurosporin diente hier als Apoptose-induzierende Substanz (= Positivkontrolle). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. β-Actin fungierte als Beladungskontrolle.

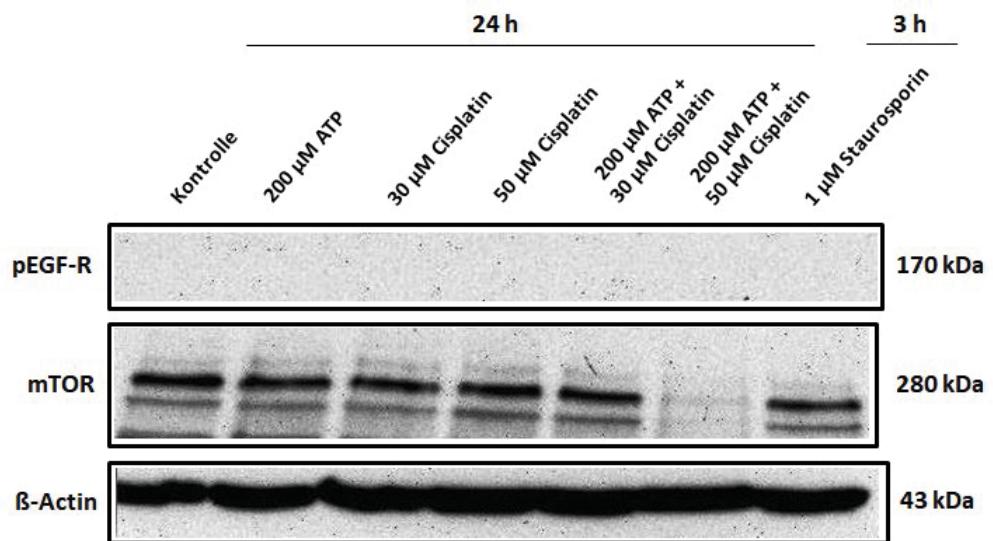


Abbildung 147: Effekt von ATP auf die Expression der Proteine pEGF-R und mTOR an der Zelllinie OVCAR-3. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Medium alleine (= Kontrolle), 200 µM ATP, 30 bzw. 50 µM Cisplatin, 200 µM ATP + 30 µM Cisplatin bzw. 200 µM ATP + 50 µM Cisplatin oder für 3 Stunden mit 1 µM Staurosporin behandelt. Staurosporin diente hier als Apoptose-induzierende Substanz (= Positivkontrolle). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. β-Actin fungierte als Beladungskontrolle.

Für die Zelllinie HEY wurde gezeigt, dass nach der 24-stündigen Behandlung mit 200 μ M ATP die Expression an phosphoryliertem EGF-Rezeptor im Vergleich zu den Kontrollzellen auch in diesem Experiment zunahm, siehe Abbildung 146. Die Beobachtung, dass eine Behandlung mit ATP die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors fördert, wurde auch schon in dem vorherigen Versuche, siehe Abbildung 144, beschrieben und an dieser Stelle bestätigt. Nach der Inkubation mit 10 μ M Cisplatin wurde nur eine schwach ausgeprägte Bande für den phosphorylierten EGF-Rezeptor detektiert. Demgegenüber wurde unter den anderen Versuchsbedingungen (15 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP + 10 μ M Cisplatin, 200 μ M ATP + 15 μ M Cisplatin für 24 Stunden bzw. 1 μ M Staurosporin für 3 Stunden) kein phosphoryliertes Protein mehr nachgewiesen. Die Expression von mTOR wurde an dieser Stelle am deutlichsten beeinflusst. Während nach der ATP-Behandlung stärkere Banden für mTOR im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert wurden (Abbildung 146), so wurde durch die Behandlung mit 10 μ M Cisplatin die Proteinexpression nicht verändert. Demgegenüber reduzierten 15 μ M Cisplatin sowie die Kombination von 200 μ M ATP mit entweder 10 μ M Cisplatin oder 15 μ M Cisplatin die Expression von mTOR deutlich. Hier wurden entsprechend schwächer ausgeprägte Banden detektiert, siehe Abbildung 146. Wie in der Literatur beschrieben (165,166) wurde erwartungsgemäß durch die dreistündige Inkubation mit 1 μ M Staurosporin die mTOR-Expression ebenfalls herabgesenkt. Die gerade beschriebenen Versuche wurden ebenso an der Zelllinie OVCAR-3 durchgeführt, siehe Abbildung 147, allerdings mit angepassten Cisplatin-Konzentrationen (hier 30 μ M bzw. 50 μ M). Der phosphorylierte EGF-Rezeptor wurde hier unter allen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen. Entsprechende Proteinbanden waren nicht zu erkennen. Wie bereits zuvor für die HEY-Zellen beschrieben, wurde auch bei den OVCAR-3-Zellen die Expression von mTOR deutlich beeinflusst. Durch die Behandlung mit 200 μ M ATP zeigte sich wieder eine verstärkte Proteinexpression wohingegen die Expression durch die Inkubation mit 30 μ M oder 50 μ M Cisplatin im Vergleich zur Kontrolle kaum verändert wurde. Die Banden im Western Blot erschienen von der Intensität her gleich. Erst durch die gleichzeitige Behandlung mit 200 μ M ATP + 50 μ M Cisplatin wurde die Expression von mTOR reduziert. Diese Beobachtung ließ sich für die zweite gewählte Konzentration (200 μ M ATP + 30 μ M Cisplatin) nicht machen. Hier wurde die Expression von mTOR nicht beeinflusst, siehe Abbildung 147. Die Behandlung mit 1 μ M Staurosporin für drei Stunden übte an dieser Stelle keinen Effekt auf die mTOR-Expression aus.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass in der HEY-Zelllinie durch die Behandlung mit ATP die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors induziert wurde. Diese Beobachtung ließ sich für die OVCAR-3-Zelllinien im gewählten Konzentrationsbereich für ATP nicht machen.

In den Kombinationsexperimenten, also unter der gleichzeitigen 24-stündigen Behandlung von

ATP und Cisplatin, wurde für beide Zelllinien unter der hohen Cisplatin-Konzentration (HEY: 15 μ M, OVCAR-3: 50 μ M) eine erhebliche Reduktion der Expression von mTOR nachgewiesen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und im Vergleich zu den mit den Einzelsubstanzen behandelten Zellen.

5 Diskussion

5.1 Etablierung der einzelnen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht verschiedene P2Y-Rezeptorsubtyp-exprimierende Zelllinien kloniert und etabliert. Dabei handelt es sich um die Zelllinien 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₄, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₆, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₁, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₂, 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₃ und 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₄.

Tabelle 71: Vergleich zwischen in dem Rahmen dieser Arbeit bestimmten EC₅₀-Werte der verschiedenen Agonisten an den P2Y-Rezeptorsubtypen und den EC₅₀-Werten aus der Literatur.

*Bestimmt im Calcium-Assay. Die Angabe in den Klammern verweist auf den jeweils verwendeten Zellklon. Mit „/“ = nicht bestimmt.

	Agonist	EC ₅₀ in dieser Arbeit*	EC ₅₀ Literaturwert	Literaturstelle
P2Y₁	ATP	1800 nM	1520 ± 210 nM (IP ₃)	<i>Schachter and Harden</i> (1997) (103)
	ADP	400 nM	257 ± 14 nM (IP ₃)	
P2Y₂	ATP	140 nM	85 nM	<i>Jacobson et. al.</i> (2009) (36)
	UTP	1 nM	49 nM	
P2Y₄ (D3)	UTP	2 nM	50 - 800 nM (IP ₃)	<i>Brunschweiger et al.</i> (2006) (104)
P2Y₄ (D6)	UTP	1 nM		
P2Y₆ (E3)	UDP	11,3 nM		
P2Y₆ (H4)	UDP	51,2 nM	13 ± 4 nM	<i>Besada et al.</i> (2006) (105)
P2Y₆ (H6)	UDP	8,8 nM		
P2Y₁₁ (F6)	ATP	53,3 nM	170 nM	<i>Ullmann et al.</i> (2005) (85)
P2Y₁₁ (F8)	ATP	43,2 nM		
P2Y₁₂ (B2)	ADP	136 nM	320 ± 80 nM bzw. 60 nM	<i>Ding et al.</i> (2003) (106) bzw. <i>Zhang et al.</i> (2001) (108)
P2Y₁₂ (C5)	ADP	94 nM		
P2Y₁₃	ADP	502 nM	308 ± 1 nM (IP ₃)	<i>Marteau et al.</i> (2003) (107)
P2Y₁₄	UDP-Glucose	Konnte nicht bestimmt werden	/	/

Tabelle 71 gibt eine Übersicht zu den in dieser Arbeit bestimmten EC₅₀-Werten der Standardagonisten für die jeweiligen P2Y-Rezeptorsubtypen und vergleicht diese mit den Literaturwerten. Die Angabe in den Klammern bezieht sich auf den verwendeten Zellklon. Die beiden Zelllinien

nien, welche den P2Y₁₃- bzw. den P2Y₁₄-Rezeptor rekombinant exprimierten, lieferten während der Charakterisierung keine reproduzierbaren funktionellen Signale im cAMP-Reportergen-Assay, weshalb diese Zelllinien keine weitere Verwendung im Rahmen der Selektivitätsuntersuchungen fanden. Die Funktionalität des P2Y₁₂-Rezeptors in der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₁₂ konnte, wie in Kapitel 4.1.3.6 beschrieben, nicht eindeutig bestätigt werden, da sich im cAMP-Reportergen-Assay kein stabiles Lumineszenzsignal ermitteln ließ. Möglicherweise wurden die enthaltenen G-Proteine durch die Transfektionsarbeiten so verändert, dass die α_i -Untereinheit, welche die Adenylylzyklase inhibiert (167,168), nicht richtig funktionsfähig war. Allerdings wurden an dieser Zelllinie aufgrund der promiskuitiven G-Protein-Kopplung deutliche Signale im Calcium-Assay bestimmt (138–141), was ebenso auf eine mögliche Veränderung der G-Proteine durch die Transfektionsarbeiten zurückzuführen sein könnte. Auf Grund dieses Verhaltens wurde in der Selektivitätsbestimmung der Calcium-Assay für den P2Y₁₂-Rezeptor herangezogen.

Anhand der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ wurde zunächst das kombinatorische Screening der strukturell vom Suramin abgeleiteten Verbindungen der Substanzbibliothek von Prof. Nickel und Prof. Kassack durchgeführt. Aufgrund der deutlich voneinander abweichenden EC₅₀-Werte für ATP (EC₅₀ = 140 nM) bzw. UTP (EC₅₀ = 1 nM), welche für den P2Y₂-Rezeptor an der Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ bestimmt wurden, wurde für die Untersuchung der einzelnen NF-Substanzen die bereits von S. Meis etablierte Zelllinie 1321N1-P2Y₂ weiter verwendet (98). Diese Zelllinie wies, wie in der Literatur beschrieben, ein ungefähr äquipotentes Verhalten von ATP und UTP gegenüber dem besagten Rezeptorsubtyp auf. Hier konnten die EC₅₀-Werte wie folgt ermittelt werden: ATP: EC₅₀ = 25 nM; UTP EC₅₀ = 10 nM (siehe Kapitel 4.2.1).

Für die in dieser Arbeit etablierte P2Y₂-Rezeptor-exprimierende Zelllinie 1321N1-FlpIn-C2-P2Y₂ wurde für UTP eine deutlich höhere Potenz als für ATP beobachtet. UTP war 140-fach potenter als ATP. Wodurch genau dieser Umstand verursacht wurde - ob dies auf eine durch die Transfektionsarbeiten hervorgerufene Genmutation zurückzuführen war - wurde an dieser Stelle nicht weiter untersucht.

Mit Hilfe der rekombinanten Zelllinien wurde die Selektivität der getesteten NF-Substanzen gegenüber dem P2Y₁-, P2Y₄-, P2Y₆-, P2Y₁₁- bzw. P2Y₁₂-Rezeptor untersucht.

5.2 Antagonisten am P2Y₂-Rezeptor

Für die verschiedenen P2-Rezeptoren sind bisher relativ wenige Subtyp-selektive und potente Liganden in der Literatur beschrieben (siehe Tabelle 2 und Tabelle 3). Die Bestimmung der genauen physiologischen Funktionen der verschiedenen P2-Rezeptoren war aus diesem Grund lange Zeit erschwert (26,35,36). Nach und nach werden den einzelnen Rezeptorsubtypen nun einzelne (patho-) physiologische Funktionen zugeordnet (9,10,37). Sowohl mit Reactive Blue 2 als auch mit Suramin wurden zwei Substanzen beschrieben, welche relativ unspezifisch mit den verschiedenen P2-Rezeptoren interagieren (5,6,36,136). Strukturverwandte Substanzen des Suramin konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich sowohl als P2X-Rezeptor-selektive Antagonisten, z.B. NF110, NF449, NF770 (86,169,170) wie auch als P2Y-Rezeptor-selektive Antagonisten, z.B. NF157 und NF340 (85,87), mit teilweise subnanomolarer Potenz in der Literatur beschrieben werden. Für den P2Y₂-Rezeptor wurden neben den unspezifischen Antagonisten Suramin und Reactive Blue 2 (5,6,36,136) kürzlich AR-C118925 (45) und PSB-716 (70) als potente und selektive P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten identifiziert. Wie bereits einleitend erwähnt, werden dem P2Y₂-Rezeptor entweder auf Grund von mRNA-Profilen in verschiedenen Geweben, funktioneller Studien oder klinischer Studien am Menschen wichtige (patho-) physiologische Funktionen zugeschrieben (siehe Kapitel 1.1.2). Der P2Y₂-Rezeptor spielt wahrscheinlich unter anderem bei arteriosklerotischen Erkrankungen, (Lungen-) Entzündungen, Zystischer Fibrose, dem Syndrom des trockenen Auges, Bluthochdruck, Schmerz, bei neurodegenerativen Erkrankungen oder bei Tumorerkrankungen eine Rolle. Er stellt somit ein interessantes therapeutisches Target dar. Genauere Aussagen zur physiologischen Rolle des P2Y₂-Rezeptors sind in Anbetracht des Mangels an selektiven, potenteren und vor allem nicht-toxischen Liganden jedoch erschwert (6,9,35). Suramin selbst verfügt bekanntermaßen über eine große Bandbreite von unerwünschten Nebeneffekten (171). Es zeigte auch in dieser Arbeit toxische Effekte im MTT-Assay, wenn es in Konzentrationen eingesetzt wurde, in denen es den P2Y₂-Rezeptor inhibieren sollte, siehe Kapitel 4.3.4.6 und vergleiche Abbildung 119. Aufgrund seiner Toxizität ist der Einsatz von Suramin in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten entsprechend limitiert. In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach gezeigt, dass vom Suramin abgeleitete Verbindungen eine große Quelle an verschiedenen P2-Rezeptor-Antagonisten darstellen. Aus diesem Grund wurde eine Reihe strukturell vom Suramin abgeleiteter Verbindungen aus der Substanzbibliothek von Prof. Nickel und von Prof. Kassack auf ihre antagonistische Aktivität am P2Y₂-Rezeptor im Calcium-Assay getestet, um so neue, möglichst potente, selektive und nicht toxische Liganden für diesen Rezeptorsubtyp zu identifizieren.

5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung der getesteten Antagonisten

Von den insgesamt 415 getesteten Substanzen im kombinatorischen Screening wurden 32 Verbindungen im Einzelscreening weiter untersucht. Dabei wurden sechs Verbindungen (NF059; NF099; NF198; NF272; NF292 und NF293) als mögliche P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten identifiziert und näher charakterisiert (siehe Kapitel 4.2.3, vergleiche Abbildung 72). Die Strukturformeln dieser potenziellen Antagonisten sind nachfolgend in Abbildung 148 gezeigt.

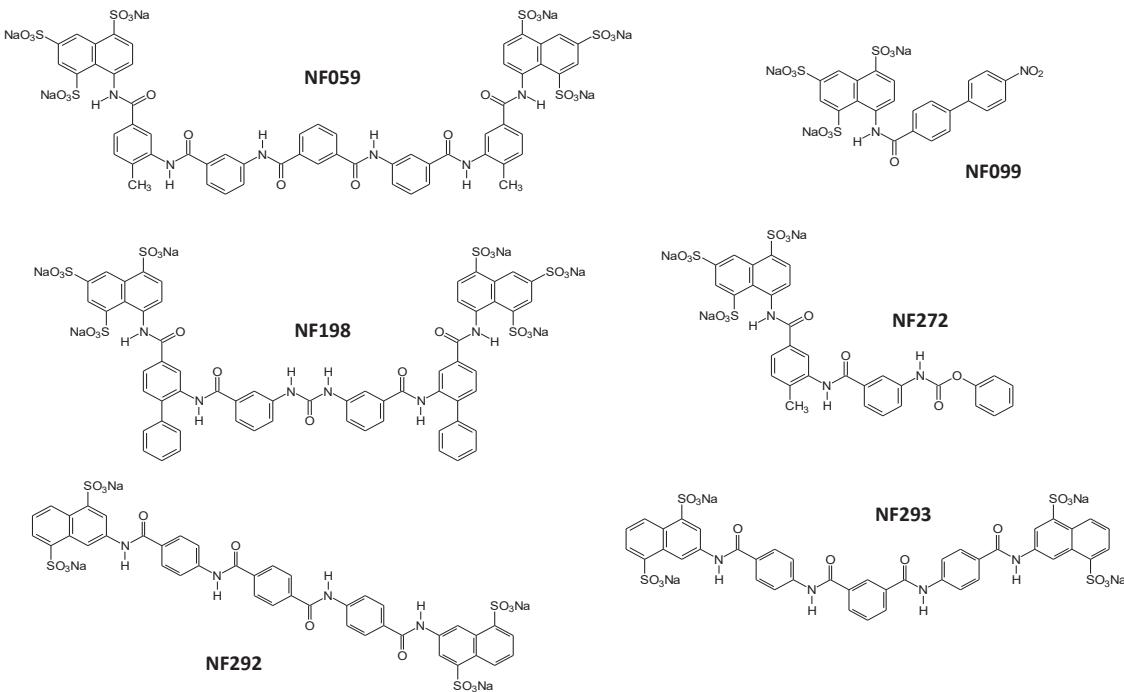


Abbildung 148: Strukturformeln der sechs potenziellen P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF059, NF099, NF198, NF272, NF292 und NF293.

Überraschenderweise konnten mit NF198, NF272 und NF292 nur drei Verbindungen ermittelt werden, welche eine mittlere mikromolare antagonistische Potenz am P2Y₂-Rezeptor aufwiesen, vergleiche Abbildung 73 und Tabelle 34. Allerdings erreichten diese drei Suraminderivate bei weitem nicht die Potenz von der kürzlich publizierten Verbindung AR-C118925 ($IC_{50} = 57,4 \text{ nM}$ (45)). Im direkten Vergleich zu Suramin waren alle drei Verbindungen aber deutlich potenter (Suramin $IC_{50} = 796 \mu\text{M}$), vergleiche Tabelle 34. NF292 als Terephthalsäurebisamid (vergleiche Abbildung 148) wies mit einer IC_{50} von $96 \mu\text{M}$ die höchste IC_{50} von den drei identifizierten Antagonisten auf. NF198 als „großer“ symmetrischer Harnstoff vom Suramin-Typ, siehe Abbildung 149, und NF272, welches zu einer Hälfte aus der Suramingrundstruktur besteht und statt der Harnstoffbrücke über einen Phenylcarbamatrest verfügt, erwiesen sich an dieser Stelle als vergleichsweise äquipotent gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor.

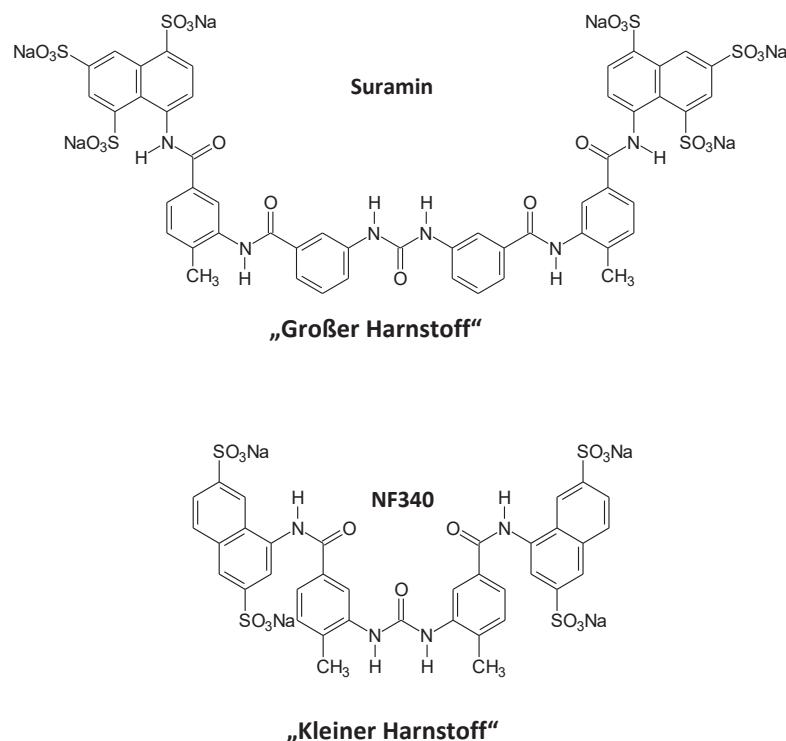


Abbildung 149: Unterschied zwischen dem „großen“ Harnstoff vom Suramin-Typ und dem „kleinen“ Harnstoff vom NF340-Typ.

Die IC_{50} von NF198 lag bei $63 \mu\text{M}$ und die von NF272 bei $58 \mu\text{M}$. Diese Ergebnisse bestätigten die These, dass für die Interaktion mit dem P2Y₂-Rezeptor weder die zentrale Harnstoffbrücke noch der symmetrische Aufbau zwingend von Nöten waren. Für die P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten NF157 oder NF340 wurde beispielsweise gezeigt, dass für die Interaktion mit dem P2Y₁₁-Rezeptor eine symmetrische Struktur, welche zwei anionische Elemente, in einem bestimmten Abstand voneinander, miteinander verbindet, notwendig ist (85,87). Dieser Strukturaufbau war im Falle des P2Y₂-Rezeptors nicht zwingend notwendig. Das halbe Suraminmolekül, enthalten im NF272, welches nur über ein anionisches Cluster verfügt, erwies sich schon als ausreichend für die Interaktion mit dem P2Y₂-Rezeptor und erreichte dabei sogar die gleiche antagonistische Potenz wie der „große“ symmetrische Harnstoff NF198. NF198 unterschied sich vom Suramin lediglich durch den Austausch der aromatischen Methyl- durch Phenylgruppen. Durch die Einführung dieses größeren, lipophileren Restes wurde die Potenz von NF198 deutlich erhöht. NF198 war im rekombinanten Zellsystem etwa 12-fach potenter als Suramin ebenso wie die unsymmetrische Verbindung NF272, welche etwa 14-fach potenter war als Suramin. Im direkten Vergleich der drei Antagonisten untereinander wurde NF292 aufgrund seiner zweifach geringeren IC_{50} von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Hillmann *et al.* (41) postulierten 2009 nach Ivanov *et al.* im Jahr 2007 (172) ein dreidimensionales Modell für den P2Y₂-Rezeptor und identifizierten eine Bindungstasche im oberen Drittel des

Rezeptormoleküls, siehe Abbildung 150. Der Eingang zu dieser Bindungsstelle befindet sich zwischen den transmembranären Domänen TM5 und TM6. Die verschiedenen Liganden wechselwirken dabei sowohl über ionische, lipophile oder π — π -Interaktionen als auch über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den Aminosäureresten. Die Bindungstasche enthält mehrere Serin- und Threoninreste, welche über Wasserstoffbrücken mit dem Riboserest des Nukleotids interagieren und verfügt über drei identifizierte, positiv geladene Aminosäurereste (H262, R265 und R292), welche für die Orientierung und Bindung des Phosphatrestes des jeweiligen Nukleotids notwendig sind.

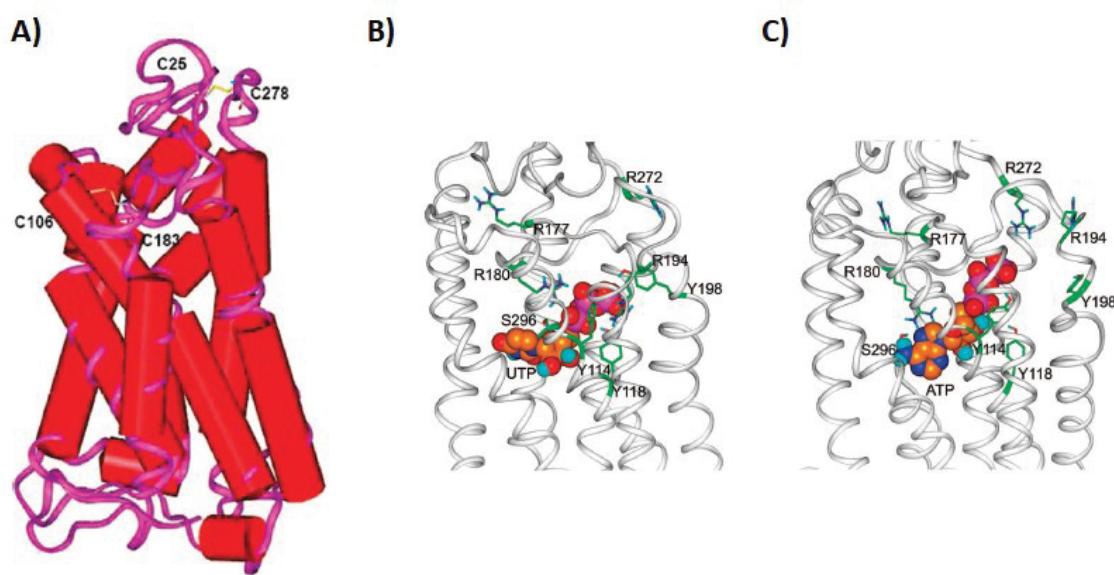


Abbildung 150: Computer-generiertes Modell des P2Y₂-Rezeptors. Abbildungen entnommen aus (41).

A) Dreidimensionales P2Y₂-Rezeptormodell mit den beiden enthaltenen Disulfidbrücken (zwischen C25 — C278 und C106 — C183). Des Weiteren sind die Bindungsstellen für UTP (B) und für ATP (C) im oberen Bereich der transmembranären Helices des Rezeptors gezeigt.

Interessanterweise zeigen ATP und UTP nicht die gleiche Orientierung in der Bindungstasche, sondern weisen einen leicht voneinander versetzten Bindungsmodus auf, siehe Abbildung 150 B und C. Dabei wird das Rezeptorprotein durch die Bindung von UTP stärker rearrangiert als durch die Bindung von ATP. Außerdem wurde gezeigt, dass der Antagonist Reactive Blue 2 (RB-2) mit der gleichen Bindungsstelle wechselwirkt wie die Agonisten. Allerdings scheint es dabei mit anderen Aminosäureresten zu interagieren. RB-2 als verhältnismäßig großes Molekül verfügt zwar über drei negativ geladene Sulfonsäurereste, welche aber nicht wie bei den Phosphatresten der Nukleotide direkt aneinandergrenzen, sondern über das Molekül verteilt sind. Somit ist naheliegend, dass andere bzw. weitere Aminosäurereste, möglicherweise auch außerhalb der Bindungstasche liegend, in die Bindung des Antagonisten mit einbezogen sind.

Daraus schlussfolgerten *Hillman et al.* (41), dass das RB-2 vermutlich nicht in die Bindungstasche hineintauchen kann, um die Agonist-Bindungsstelle zu besetzen, sondern eher den Eingang der Bindungstasche blockiert. Dieses Verhalten ist natürlich auch für Suramin und die in dieser Arbeit identifizierten Antagonisten NF198, NF272 und NF292 denkbar. Im Vergleich zu den Agonisten ATP und UTP sind sie deutlich größer und verfügen ebenfalls über negativ geladene Sulfonsäurereste, ähnlich wie RB-2, so dass hier eher davon auszugehen ist, dass der Eingang zur Bindungstasche durch die Suraminanaloge blockiert und nicht die Bindungsstelle der Agonisten besetzt wird. Wie zuvor erörtert, je nachdem, welcher Agonist bindet, wird das Rezeptorprotein in verschiedenem Umfang restrukturiert. Diese Tatsache erklärt möglicherweise, warum das große, recht starre Molekül NF292 nicht in der Lage ist, die ATP- und UTP-induzierten Calcium-Signale im gleichen Ausmaß zu inhibieren.

5.2.2 NF198 und NF272

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden allesamt im rekombinanten Zellsystem erhoben. Um nun die Funktion der gerade identifizierten P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten NF198 und NF272 im nativen System zu untersuchen, wurden die Substanzen an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 getestet. Da diese beiden Zelllinien nachweislich den P2Y₂-Rezeptor nativ exprimieren (siehe Kapitel 4.3.1 bzw. Kapitel 5.3.1) und über ein im Calcium-Assay funktionell aktives Rezeptorprotein verfügen (siehe Kapitel 4.3.2 bzw. 5.3.2), wurden diese beiden Testsysteme gewählt. Analog zu den rekombinanten Systemen wurden auch an diesen Zellen Konzentrations-Inhibitions-Kurven für NF198 bzw. NF272 in Gegenwart des Standardagonisten ATP erstellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden Antagonisten NF198 und NF272 das durch ATP hervorgerufene Fluoreszenzsignal jeweils konzentrationsabhängig inhibierten, vergleiche Abbildung 76 und Abbildung 78. An der Zelllinie HEY wurden dabei folgende Werte bestimmt: NF198 wies einen pK_i-Wert von 5,25 ($IC_{50} = 17 \mu M$) und NF272 eine pK_i-Wert von 5,18 ($IC_{50} = 20 \mu M$) auf. Für Suramin wurde in diesem Zellsystem ein pK_i-Wert von 4,80 mit einer IC_{50} von 48 μM bestimmt, siehe Kapitel 4.2.4 und Tabelle 35. An der Zelllinie OVCAR-3 wurde nur die inhibitorische Potenz von NF272 im direkten Vergleich zu Suramin bestimmt. Für NF272 wurde ein pK_i-Wert von 5,12 ($IC_{50} = 23 \mu M$) und für Suramin ein pK_i-Wert von 4,37 ($IC_{50} = 130 \mu M$) ermittelt, siehe Kapitel 4.2.4 und Tabelle 36. Die beiden Verbindungen, aber vor allem NF272 blockierten auch im nativen Zellsystem den P2Y₂-Rezeptor und erwiesen sich wieder als potenter gegenüber der Leitsubstanz Suramin. Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichst schwach bis nicht-toxischen P2Y₂-Rezeptor-antagonisten zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde die Zytotoxizität von NF198 und

NF272 sowohl an Krebszell- als auch an Nicht-Krebszelllinien untersucht. Obwohl sich die beiden Antagonisten im rekombinanten und auch im nativen Zellsystem als äquipotent hinsichtlich des P2Y₂-Antagonismus erwiesen, konnte im Rahmen der Toxizitätsstudien gezeigt werden, dass NF272 etwa zehnfach weniger toxisch war als NF198, vergleiche Abbildung 79 und Abbildung 80 sowie Tabelle 37. Während NF198 bereits in einer Konzentration von 100 µM die Viabilität der 1321N1- und der HEK293-Zellen deutlich beeinflusste, wurden solche Effekte für NF272 bis zu einer Konzentration von 250 µM nicht beobachtet, siehe Abbildung 79. Diese im direkten Vergleich zu NF198 und Suramin nicht vorhandenen zytotoxischen Eigenschaften von NF272 ermöglichen den Einsatz von NF272 in entsprechenden zellulären Untersuchungen. Wie in Kapitel 4.3.4.6 erörtert, konnten Suramin und NF198 aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften in den Versuchen, wo es um die Inhibierung der ATP-induzierten erhöhten Zytotoxizität von Cisplatin durch P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten ging, nicht eingesetzt werden, vergleiche Abbildung 119 und Abbildung 120 bzw. Tabelle 56, Tabelle 57 und Tabelle 58. NF272 demgegenüber konnte im Rahmen dieser *in-vitro*-Experimente bis zu einer Konzentration von 250 µM verwendet werden, ohne dass die Zellviabilität oder die Zytotoxizität von Cisplatin durch den P2Y₂-Antagonisten beeinflusst wurde, vergleiche Abbildung 121 und Tabelle 59. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit, wie bereits erörtert, unterscheidet sich NF198 nur durch den Austausch der aromatischen Methyl- durch Phenylgruppen von der Leitsubstanz Suramin. Es ist somit naheliegend, dass sie über ein ähnliches toxisches Profil verfügen. Zumindest sind die beiden „großen“ symmetrischen Harnstoffe deutlich toxischer als das unsymmetrische, kleinere NF272. Für Suramin ist in der Literatur eine Blockade von verschiedenen Wachstumsfaktoren beschrieben (98), wodurch seine proliferationshemmenden und somit toxischen Nebenwirkungen zu erklären sind. Möglich ist, dass NF198 ebenfalls verschiedene Wachstumsfaktoren hemmen könnte, welche NF272 aufgrund der beschriebenen strukturellen Unterschiede im Molekülaufbau möglicherweise nicht inhibiert. Wodurch genau diese deutlich reduzierte Toxizität von NF272 zu erklären ist, müsste in weiteren Experimenten noch näher untersucht werden.

5.2.3 NF272 – ein kompetitiver P2Y₂-Rezeptor-Antagonist

Für den Antagonisten NF272 wurde im Calcium-Assay ein kompetitives Verhalten gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor nachgewiesen. Die Hillslopes der Konzentrations-Inhibition-Kurven von NF272 sowohl im rekombinanten als auch im nativen Zellsystem waren nicht signifikant verschieden von 1 (vergleiche Abbildung 73, Abbildung 76 und Abbildung 78). Weiter wurde in der Analyse nach *Schild* für die resultierende Gerade im sogenannten *Schild-Plot* eine Steigung

bestimmt, welche ebenfalls nicht signifikant verschieden von 1 war. Diese Tatsache bestätigte den kompetitiven Charakter (113,114) von NF272. Durch die Analyse nach *Schild* wurde für NF272 ein pA_2 -Wert von $5,03 \pm 0,22$ (Mittelwert \pm SEM) bestimmt, vergleiche Kapitel 4.2.6.1. Ferner wurden die erhobenen Daten ebenfalls im Rahmen der nicht-linearen Regressionsmethode nach *Lew and Angus* ausgewertet. Auch hier konnte der kompetitive Charakter von NF272 gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor im rekombinanten Zellsystem über den erstellten *Clark-Plot* bestätigt werden. Es wurde ein pK_d -Wert von $4,96 \pm 0,11$ (Mittelwert \pm SEM) bestimmt, vergleiche Kapitel 4.2.6.2. Tabelle 72 stellt die in den verschiedenen Zellsystemen (rekombinant versus nativ) resultierenden charakteristischen Werte (pK_i , pA_2 , pK_d) für NF272 einander gegenüber. Zu erkennen ist, dass der durch die *Schild*-Analyse bestimmte pA_2 -Wert von $5,03 \pm 0,22$ und der nach *Lew and Angus* ermittelte pK_d -Wert von $4,96 \pm 0,11$ in Einklang mit den anhand der Konzentrations-Inhibitions-Kurven ermittelten pK_i -Werten von 4,67 (1321N1-P2Y₂); 5,18 (HEY) bzw. 5,12 (OVCAR-3) stehen.

Tabelle 72: Vergleich der in den verschiedenen Zellsystemen bestimmten charakteristischen Werte für NF272.

NF272	
pK_i - 1321N1-P2Y ₂	4,67
pK_i - HEY	5,18
pK_i - OVCAR-3	5,12
pA_2 – <i>Schild</i> -Analyse	$5,03 \pm 0,22$
pK_d - <i>Lew and Angus</i>	$4,96 \pm 0,11$

Aufgrund der Tatsache, dass Suramin bekanntermaßen unspezifisch an alle P2-Rezeptoren bindet (5,40), wurde im letzten Schritt die Selektivität von NF272 gegenüber anderen P2-Rezeptoren bestimmt, siehe Kapitel 4.2.7. Daten für das Verhalten von NF272 gegenüber verschiedenen P2X-Rezeptoren wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Hausmann und Prof. G. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen bestimmt. Für den rP2X₁-Rezeptor wurde ein IC_{50} -Wert von $2,0 \mu\text{M}$ mit einem entsprechenden pIC_{50} -Wert von $5,69 \pm 0,05$ bestimmt, vergleiche Tabelle 39. NF272 war somit am rP2X₁-Rezeptor deutlich potenter als am P2Y₂-Rezeptor. Gegenüber den anderen beiden untersuchten P2X-Rezeptorsubtypen (hP2X₂ und rP2X₃) erwies sich NF272 als äquipotent, vergleiche Tabelle 39.

Gegenüber anderen P2Y-Rezeptoren wurde für NF272 die höchste Potenz am P2Y₁₁- und am P2Y₁₂-Rezeptor bestimmt, gefolgt von den Rezeptorsubtypen P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆ (siehe Tabelle 40). NF272 zeigte folglich eine 21-fach höhere Potenz am P2Y₁₁- bzw. P2Y₁₂-Rezeptor als am P2Y₂-Rezeptor. Anhand dieser Resultate wird ersichtlich, dass NF272 bevorzugt ATP/ADP-sensitive P2-Rezeptorsubtypen (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2X₁) inhibiert und lediglich für den P2Y₂-Rezeptor gegenüber den Uracilnukleotid-sensitiven Rezeptorsubtypen P2Y₄ 3,6-fach bzw.

gegenüber dem P2Y₆-Rezeptor 5,7-fach selektiver ist. Demgegenüber zeigte NF272 eine etwa 14-fach höhere Affinität zum P2Y₂-Rezeptor als Suramin. NF272 ist Suramin sowohl hinsichtlich der Potenz als auch der Zytotoxizität überlegen, weist aber nur eine moderate Selektivität für den P2Y₂-Rezeptor innerhalb der Uracilnukleotid-sensitiven Rezeptortypen (P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆) auf. NF272 müsste als P2Y₂-Rezeptor-Antagonist hinsichtlich seiner Selektivität gegenüber anderen P2-Rezeptoren noch deutlich weiter entwickelt werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass sich in der von der Leitsubstanz Suramin abgeleiteten Substanzbibliothek Verbindungen wie NF198 oder NF292 finden ließen, welche als Antagonisten am P2Y₂-Rezeptor agierten. Es wurde gezeigt, dass diese Verbindungen im direkten Vergleich zum Suramin eine > 10-fach höhere Potenz aufwiesen. Dabei wurde NF272 unter den 415 untersuchten Substanzen als neuer kompetitiver P2Y₂-Rezeptor-Antagonist identifiziert. NF272 als ein um die Hälfte verkleinertes, unsymmetrisches Suraminderivat, welches nur über ein anionisches Strukturelement verfügt, zeigte dabei eine 14-fach höhere Potenz gegenüber dem P2Y₂-Rezeptor als Suramin selbst. Diese überlegende Potenz konnte sowohl für das rekombinante als auch für die nativen Zellsysteme HEY und OVCAR-3 nachgewiesen werden. Nachteilig erwies sich an dieser Stelle die lediglich moderate Selektivität gegenüber den anderen beiden Uracilnukleotid-sensitiven Rezeptoren P2Y₄ bzw. P2Y₆. Gegenüber weiteren P2-Rezeptorsubtypen zeigte sich NF272 als nicht selektiv. Positiv hervorzuheben ist, dass NF272 bis zu einer eingesetzten Konzentration von 250 µM an den untersuchten Zelllinien keine zytotoxischen Effekte zeigte. NF272 könnte somit als Vorbildstruktur für die Weiterentwicklung von P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten dienen. Aufgrund seiner Polysulfonierung besitzt NF272 eine hohe Hydrophilie, so dass es Membranen nicht passiv überwinden kann. Wie einleitend erwähnt sollten potenzielle Arzneistoffe aber eine möglichst hohe Membranpermeabilität aufweisen, damit sie ausreichend im aktiven Zentrum anfluten können. Durch Überführen der Sulfonsäuren in entsprechend resorbierbare Ester-Prodrugs würde zwar die Lipophilie und damit die perorale Bioverfügbarkeit erhöht werden. Doch aufgrund des potenziellen alkylierenden Charakters (110) und der daraus resultierenden Toxizität solcher Sulfonsäureester wäre ein klinischer Einsatz unmöglich. Carbonsäuren wären demgegenüber deutlich weniger toxisch und ließen sich leicht in peroral bioverfügbare Ester überführen.

5.3 Sensitivierung von Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Cisplatin durch Nukleotide

5.3.1 Funktionelle Integrität exprimierter P2Y₂-Rezeptoren

Bekanntermaßen ist die Konzentration von extrazellulärem ATP in direkter Umgebung eines soliden Tumors im Vergleich zu der Konzentration in gesundem Gewebe deutlich erhöht. Während im gesunden Gewebe normalerweise eine ATP-Konzentration von 10 - 100 nM im extrazellulären Milieu vorherrscht, so kann diese im sogenannten ‚tumor microenvironment‘ im Bereich von 100 - 500 mM liegen (8,12,17). Untersuchungen zur Rolle von extrazellulärem ATP im Krebsgeschehen stehen aktuell im Focus vieler Forschungsgruppen. Ebenso werden aber auch die Funktionen der verschiedenen Plasmamembran-Rezeptoren, welche mit ATP, den einzelnen Abbauprodukten von ATP (wie ADP, AMP, Adenosin) oder auch anderen Nukleotiden interagieren, und die daraus resultierende mögliche Signaltransduktion betrachtet. ATP, als physiologischer Agonist für diverse P2-Rezeptorsubtypen wie der P2Y₂- und P2Y₁₁-Rezeptor oder auch die verschiedenen P2X-Rezeptoren, hier allem voran der P2X₇-Rezeptor, wird inzwischen eine immense Rolle im Rahmen des Zellwachstums, der Zellproliferation und des Zelluntergangs von Krebszellen bzw. im Bereich der Metastasierung zugesprochen (8,12,28,66). Im Mittelpunkt vieler Publikationen steht derzeit der P2Y₂-Rezeptor. Wie einleitend in Tabelle 4 gezeigt, ist dieser P2Y-Rezeptorsubtyp in diversen Krebszelllinien exprimiert und abhängig vom Gewebetyp führt seine Aktivierung entweder zu einer erhöhten oder einer reduzierten Zellproliferation (25,26,66,67). So ist beschrieben, dass das Wachstum von nasopharyngealen Krebszellen (61), von ösophagealen Krebszellen (65) oder auch von kolorektalen Krebszellen durch extrazelluläres ATP inhibiert wird, vermittelt über den P2Y₂-Rezeptor. Für humane Ovarialkarzinom-Zelllinien sind aktuell sowohl proliferationsfördernde Effekte durch ATP für SKOV-3-Zellen (173) als auch proliferationshemmende Effekte durch ATP für EFO-21- und EFO-27-Zellen (145) publiziert. Weiter berichten *Li et al.*, dass die Zellinvasion und die Metastasierung von Prostatakrebszellen durch die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors gefördert wird (43,60). Gleichermaßen wurde auch für verschiedene Brustkrebszelllinien beschrieben. Durch extrazelluläres ATP wird über den P2Y₂-Rezeptor die Zellinvasion moduliert und die Tumorprogression gefördert (174,175).

In Anbetracht der vielfältigen Rolle, welche extrazelluläres ATP und das damit verbundene purinerge Signaltransduktionssystem im Krebsgeschehen zu spielen scheint, wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss Nukleotide, insbesondere ATP, auf das Wachstumsverhalten von Ovarialkarzinom-Zelllinien und auf die Zytotoxizität von Cisplatin gegenüber Ovarial-

karzinom-Zellen ausübt.

Als Zellsysteme wurden in dieser Arbeit die beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 gewählt, da diese Zellen nachweislich den P2Y₂-Rezeptor exprimieren. Das Expressionsprofil purinerger Rezeptoren wurde sowohl mittels DNA-Microarray- als auch über PCR-Analysen untersucht, vergleiche Kapitel 4.3.1.1. Auf Proteinebene wurde die Expression des P2Y₂-Rezeptors für beide Zelllinien mittels Western Blot und durch Immunfluoreszenzmikroskopie eindeutig bestätigt, vergleiche Kapitel 4.3.1.2. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass in HEY- und in OVCAR-3-Zellen das P2Y₁-Rezeptorprotein exprimiert ist, demgegenüber der P2X₇-Rezeptor aber nicht vorhanden ist, vergleiche Abbildung 94 und Abbildung 95. Für die OVCAR-3-Zellen zeigten sich im Rahmen der PCR-Analysen erste Hinweise darauf, dass neben dem P2Y₁- und dem P2Y₂-Rezeptor auch der P2Y₆-Rezeptor vorhanden sein könnte, siehe Abbildung 93 B.

Im Calcium-Assay wurde die funktionelle Integrität der exprimierten P2Y-Rezeptoren in beiden Zelllinien überprüft, siehe 4.3.2. Die beiden physiologischen P2Y₂-Agonisten ATP und UTP riefen hier konzentrationsabhängig einen Anstieg in der intrazellulären Calciumionen-Konzentration hervor und erwiesen sich an beiden Zelllinien als ungefähr äquipotent, vergleiche Abbildung 97 und Abbildung 98.

Tabelle 73: Vergleich der mittels Calcium-Assay bestimmten EC₅₀-Werte für die Nukleotide ATP, UTP, ADP und UDP an den Zelllinien HEY und OVCAR-3 mit den EC₅₀-Werten der jeweiligen rekombinanten P2Y-Rezeptorsubtypexprimierenden 1321N1-Zelllinie. Gezeigt sind die mittleren EC₅₀- bzw. pEC₅₀-Werte (Mittelwerte ± SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Mit „/“ = nicht bestimmt.

EC ₅₀ [nM]									
	HEY	OVCAR-3	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄	P2Y ₆	P2Y ₁₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃
ATP	107	87	1.600	25	181	/	53	/	/
UTP	64	31	/	10	2	150	/	/	/
ADP	5.200	3.350	400	/	/	/	/	98	577
UDP	1.800	95	/	/	/	11	/	/	/

Die anhand der Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten EC₅₀-Werte für ATP bzw. UTP (HEY: EC₅₀ (ATP) = 107 nM, EC₅₀ (UTP) = 64 nM bzw. OVCAR-3: EC₅₀ (ATP) = 87 nM, EC₅₀ (UTP) = 31 nM) stimmten sowohl mit den Literaturwerten (36), siehe Tabelle 71, als auch mit den EC₅₀-Werten überein, welche in dieser Arbeit an der P2Y₂-Rezeptor-überexprimierenden Zelllinie 1321N1-P2Y₂ (EC₅₀ (ATP) = 25 nM, EC₅₀ (UTP) = 10 nM, vergleiche Abbildung 68) bestimmt wurden. Das Diphosphat ADP war an beiden Zelllinien deutlich weniger potent, die EC₅₀-Werte lagen bei 5.200 nM (HEY) bzw. bei 3.350 nM (OVCAR-3), siehe Tabelle 73. Obwohl der P2Y₁-Rezeptor in der PCR und mittels Western Blot bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie in HEY- und in OVCAR-3-Zellen nachgewiesen wurde, konnte an dieser Stelle der Schluss gezogen werden,

dass der P2Y₁-Rezeptor in beiden Zelllinien aufgrund der hohen EC₅₀-Werte für ADP nicht funktionell aktiv ist, vergleiche Tabelle 73. Die für ADP in den hohen Konzentrationen erzielten Fluoreszenzsignale waren vermutlich auf den P2Y₂-Rezeptor zurückzuführen. Für UDP zeigten sich die größten Unterschiede hinsichtlich der Potenz. Die EC₅₀ lag bei 1.800 nM für die HEY-Zellen und bei 95 nM für die OVCAR-3-Zellen, was darauf hindeutete, dass in den OVCAR-3-Zellen ebenfalls ein Uridindiphosphat-sensitiver Rezeptorsubtyp wie der P2Y₆-Rezeptor funktionell aktiv ist, vergleiche Tabelle 73. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen der PCR. Auch hier konnte auf mRNA-Ebene der P2Y₆-Rezeptor in den OVCAR-3-Zellen nachgewiesen werden, siehe Abbildung 93 B.

Durch den Einsatz verschiedener P2Y-Rezeptor-Antagonisten wie dem nicht-selektiven Suramin, dem selektiven P2Y₁₁-Antagonisten NF340, dem in dieser Arbeit identifizierten kompetitiven P2Y₂-Antagonisten NF272, dem kommerziell erwerblichen potenteren und selektiveren P2Y₂-Antagonisten AR-C118925 und dem P2X₇-Rezeptor-Antagonisten A740003 sollten die in den Zelllinien funktionell aktiven P2-Rezeptoren identifiziert werden. NF340 und A740003 blockierten weder das ATP- noch das UTP-induzierte Calcium-Signal in den beiden Zelllinien, vergleiche Abbildung 99, so dass an dieser Stelle eine Beteiligung des ebenfalls ATP-sensitiven P2Y₁₁-bzw. P2X₇-Rezeptors endgültig ausgeschlossen werden konnte. Suramin und die beiden P2Y₂-Antagonisten AR-C118925 bzw. NF272 inhibierten erwartungsgemäß die durch ATP- und auch die durch UTP-induzierten Fluoreszenzsignale in beiden Zelllinien, vergleiche Abbildung 99. Abschließend lässt sich festhalten, dass in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3 die durch ATP und auch durch UTP hervorgerufenen Veränderungen der intrazellulären Calciumionen-Konzentration auf den P2Y₂-Rezeptor zurück zu führen sind. Dieser Rezeptorsubtyp ist somit in beiden Zelllinien funktionell aktiv. Demgegenüber ist der P2Y₁-Rezeptor in beiden Zelllinien nicht aktiv. Für die OVCAR-3-Zellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass der exprimierte P2Y₆-Rezeptor auch funktionell aktiv zu sein scheint.

5.3.2 Effekte extrazellulärer Nukleotide

5.3.2.1 Zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von Nukleotiden

Da Nukleotide über verschiedene Wege abgebaut werden können (8,12,13), wurde zunächst untersucht, ob es Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität von ATP bzw. UTP gab, wenn die Substanzzugabe einmalig für 72 Stunden oder dreimalig nach 0, 24 und 48 Stunden erfolgte, vergleiche Abbildung 101 und Abbildung 102 bzw. Tabelle 45. Aufgrund der sich nicht signifikant voneinander unterscheidenden IC₅₀-Werte wurde entschieden, dass das Nukleotid-haltige Medium nicht alle 24 Stunden neu hinzugegeben werden musste, sondern für den Behand-

lungszeitraum von 72 Stunden einmalig zu den Zellen gegeben werden konnte. Im nächsten Schritt wurde nun die Zytotoxizität von ATP und UTP mittels MTT-Assay bestimmt. Nach der 72-stündigen Behandlung mit ATP wurde eine IC_{50} von 145 μM für die HEY-Zellen und von 240 μM für die OVCAR-3-Zellen bestimmt, vergleiche Tabelle 46. UTP zeigte sich demgegenüber mit IC_{50} -Werten von 1.710 μM (HEY) und 4.010 μM (OVCAR-3) deutlich weniger toxisch. Verglichen mit den IC_{50} -Werten von Cisplatin, Paclitaxel oder Topotecan, welche sich vom unteren nanomolaren bis unteren mikromolaren Bereich bewegten (siehe Tabelle 47), erwiesen sich ATP und vor allem UTP als wenig toxisch für die Zellen.

Für ATP wurden zeit- und auch konzentrationsabhängige Effekte an den Ovarialkarzinomzellen beobachtet. So wurde zunächst registriert, dass durch die 48-stündige Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an ATP sowohl die Größe als auch die Granularität der Zellen verändert wurde, vergleiche Abbildung 104. Die Anzahl teilungsfähiger und intakter Zellen nahm mit steigender ATP-Konzentration deutlich ab. Das Wachstum der HEY-Zellen wurde durch 200 μM ATP auf 65% und durch 500 μM ATP sogar auf nur 35% des Wachstums der unbehandelten Kontrollzellen reduziert. Bei den OVCAR-3-Zellen wurde das Zellwachstum durch 200 μM ATP auf 45% und durch 500 μM ATP auf 30% des Wachstums der Kontrollzellen inhibiert, siehe Abbildung 105. Auffällig war dabei, dass nach der 48-stündigen Behandlung mit 10 μM bzw. 100 μM ATP weitere Zellpopulationen im SSC-FSC-Dotplot detektiert wurden, vergleiche Abbildung 104, welche deutlich kleinere und von der Granularität her veränderte Zellen aufwiesen. Hier zeigten sich erste Hinweise darauf, dass durch die ATP-Behandlung zum einen proliferationshemmende Effekte und zum anderen Effekte, welche die Größe und die Granularität der Zelle beeinflussten, ausgelöst wurden. Ein apoptotischer Zelluntergang geht typischerweise mit charakteristischen morphologischen Veränderungen in der Zelle einher. So runden sich die Zellen deutlich ab bzw. schrumpfen und werden von der Größe her entsprechend kleiner (176–179). Ebenso wird das Zytoplasma kompakter, die Organellen werden deutlich dichter gepackt, das Chromatin kondensiert und letztendlich treten die sogenannten apoptotischen Körperchen auf (176–178). Die in diesem Versuch beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Größe und der Granularität der mit ATP-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen könnten somit durch beginnende apoptotische Vorgänge innerhalb der Zellen zu erklären sein. Auch in der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass durch extrazelluläres ATP Apoptose induziert wird (61,65,179). Der P2X₇-Rezeptor ist der P2-Rezeptorsubtyp, welcher vorwiegend in das durch ATP-vermittelte Apoptosegeschehen involviert ist (8,12,28,65,66). Da im Rahmen der Expressionsanalysen und funktionellen Calcium-Studien keine Hinweise auf ein Vorhandensein des P2X₇-Rezeptors gefunden wurden, siehe Kapitel 4.3.1 und Kapitel 4.3.2, konnten die für ATP beobachteten Effekte an dieser Stelle nicht

P2X₇-Rezeptor-vermittelt sein. Wodurch genau die beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Größe und der Granularität der Zellen zustande kam, müsste noch näher untersucht werden.

Weiter konnte gezeigt werden, dass unter der Behandlung mit ATP die Proliferationskurven für beide Zelllinien deutlich moduliert wurden, vergleiche Abbildung 106. 100 μ M und auch 200 μ M ATP reduzierten dabei das Zellwachstum nach 48 und nach 72 Stunden deutlich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Für UTP ließ sich in dem gewählten Konzentrationsbereich eine solche Modulation des Wachstumsverhaltens weder an den HEY- noch an den OVCAR-3-Zellen beobachten. Die resultierenden Proliferationskurven erschienen deckungsgleich, vergleiche Abbildung 107 A und Abbildung 108 A. Interessanterweise wurde für ADP ebenfalls eine Inhibierung des Zellwachstums, ähnlich wie für ATP, an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien beobachtet, vergleiche Abbildung 107 A und Abbildung 108 A. Wodurch genau dieser Umstand zu begründen ist, dass ATP und ADP im Gegensatz zu UTP das Zellwachstum unterdrücken, müsste noch näher untersucht werden.

Platinhaltige Zytostatika werden klinisch im Rahmen der First-Line-Chemotherapie zur Behandlung des Ovarialkarzinoms eingesetzt (73,77,80,81). Aufgrund seiner hohen Nephrotoxizität, seiner möglichen Ototoxizität und seinem hohem emetogenen Potential, kommt Cisplatin heute eher in der Forschung und weniger in der Klinik zum Einsatz (88). Klinisch werden Carboplatin, als pharmakodynamisches Äquivalent zum Cisplatin, und Oxaliplatin verwendet (88,180). Problematisch gestaltet sich an dieser Stelle immer wieder das hohe Resistenzauftreten. Entweder ist der Tumor von Beginn an bereits resistent gegenüber Platin-Verbindungen, wird es unter der Therapie oder nach Abschluss der initialen Chemotherapie entwickelt sich innerhalb von sechs Monaten ein platinresistenter Tumorrezidiv. Dabei lassen sich die Resistenzmechanismen auf verschiedene Gründe zurückführen. Dies sind beispielsweise genetische Veränderungen der Platin-transportierenden Kupfertransporter, so dass weniger Zytostatikum in die Zelle gelangt; ein gesteigerter Efflux der Platin-Verbindung aus der Zell; eine gesteigerte Inaktivierung des Chemotherapeutikums durch Glutathion oder eine gesteigerte Reparatur platingeschädigter DNA (81). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob durch die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin die Chemosensitivität von Cisplatin an den Ovarialkarzinom-Zelllinien moduliert werden konnte. Durch die gleichzeitige Gabe von ATP (100 μ M bzw. 200 μ M, 48 Stunden prä- und 72 Stunden coinubiert) und Cisplatin wurde die IC₅₀ für Cisplatin signifikant reduziert im Vergleich zu den allein mit Cisplatin behandelten Kontrollzellen. Die Ovarialkarzinomzellen reagierten durch die ATP-Behandlung sensibler gegenüber Cisplatin. Dabei wurde an den HEY-Zellen durch 100 μ M ATP ein Shift-Faktor von 2 und für 200 μ M ATP sogar ein Shift-Faktor von 4,5, siehe Tabelle 48, erzielt. Für die OVCAR-3-Zellen lagen die Shift-

Faktoren bei 2 für 100 μM ATP und bei 1,7 für 200 μM ATP, siehe Tabelle 49. Der sensitivierende Effekt von 200 μM ATP auf die Zytotoxizität von Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen war zwar deutlich weniger stark ausgeprägt, aber die Reduktion der IC_{50} war signifikant. Generell wurden in dieser Arbeit eher niedrige Shift-Faktoren an beiden Zelllinien erzielt, allerdings bewegen sich diese im Bereich der Resistenzfaktoren für Cisplatin, welche in der Literatur für verschiedene Ovarialkarzinom-Zelllinien bereits beschrieben wurden (181,182), so dass man hier durchaus von klinisch relevanten Shift-Faktoren sprechen kann.

Demgegenüber wurde die Zytotoxizität von Paclitaxel oder Topotecan, welche ebenfalls als Chemotherapeutika bei der Behandlung eines Ovarialkarzinoms zum Einsatz kommen können (73,77), durch eine kombinierte Gabe mit ATP nicht beeinflusst, vergleiche Tabelle 48 und Tabelle 49. Folglich scheint es, als würden die durch ATP beeinflussten Wege innerhalb der HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen nicht mit den Mikrotubuli (Paclitaxel) oder den Topoisomerasen (Topotecan) interagieren.

Die Zytotoxizität von Cisplatin ließ sich nicht nur durch ATP an den beiden Zelllinien beeinflussen, sondern auch durch das Diphosphat ADP, vergleiche Abbildung 113 B und Abbildung 114 B. Die IC_{50} von Cisplatin wurde sowohl durch 100 μM als auch durch 200 μM ADP signifikant reduziert, vergleiche Tabelle 50 und Tabelle 51. Die resultierenden Shift-Faktoren waren zwar niedriger als zuvor für ATP bestimmt, lagen dabei aber im klinisch relevanten Bereich von $\text{SF} = 1,5 - 3,0$. Die beiden Uracil-haltigen Nukleotide UTP bzw. UDP übten im gewählten Konzentrationsbereich in der kombinierten Gabe mit Cisplatin keinen sensitivierenden Effekt auf die Toxizität des Zytostatikums aus, vergleiche Tabelle 50 und Tabelle 51. Wodurch genau die unterschiedlichen Effekte der einzelnen Nukleotide auf die Zytotoxizität von Cisplatin zu erklären sind, müsste noch näher untersucht werden. Eine mögliche Erklärung könnte hier die mangelnde Stabilität der Uracil-haltigen Nukleotide im zellulären System sein. UTP wird in der Literatur als wenig stabil beschrieben (40), welches unter physiologischen Bedingungen rasch abgebaut wird (149). Die für UTP im MTT-Assay ermitteltem IC_{50} -Werte, welche mit 1.710 μM (HEY) und mit 4.010 μM (OVCAR-3), siehe Kapitel 4.3.3.2, um mehr als das 10-fache höher liegen wie die für ATP bestimmten IC_{50} -Werte, wären durch die mangelnde Stabilität des UTP ebenfalls erklärbar und warum unter den gewählten Konzentrationen von 100 μM bzw. 200 μM kein sensitivierender Effekt auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität beobachtet wurde.

Weiter konnte für die sensitivierende Wirkung von ATP bzw. ADP auf die Zytotoxizität auf Cisplatin an den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien ein zeitabhängiger Aspekt ausgemacht werden, vergleiche Abbildung 115 bis Abbildung 118 sowie Tabelle 52 bis Tabelle 55. Es konnte gezeigt werden, dass an beiden Zelllinien für ATP bereits die alleinige Präinkubation von 48 Stunden

ausreichend war, um die Zytotoxizität von Cisplatin signifikant zu erhöhen. Für die HEY-Zellen wurde eine signifikante Reduktion der IC_{50} von Cisplatin ebenfalls durch die 6-stündige Präinkubation von ATP mit anschließender Coinkubation von Cisplatin sowie durch die alleinige 72-stündige Coinkubation von Cisplatin beobachtet, vergleiche Tabelle 52. Demgegenüber wurde die Zytotoxizität von Cisplatin an den OVCAR-3-Zellen unter diesen Versuchsbedingungen nicht beeinflusst, vergleiche Tabelle 53. Die HEY-Zellen reagierten demnach deutlich sensitiver auf die ATP-Behandlung.

An den OVCAR-3-Zellen wurde für ADP nur eine signifikante Beeinflussung der IC_{50} von Cisplatin beobachtet, wenn ADP 48 Stunden präinkubiert und dann 72 Stunden mit Cisplatin coinkübiert wurde. An den HEY-Zellen wurden im Vergleich zu den OVCAR-3-Zellen deutlichere Effekte für ADP ausgemacht, welche allerdings nicht das Ausmaß der ATP-vermittelten Shift-Faktoren erreichten. Eine signifikante Reduktion der IC_{50} von Cisplatin wurde hier durch die 6-stündige Präinkubation von ADP mit anschließender Coinkubation mit Cisplatin sowie durch die alleinige 72-stündige Coinkubation mit Cisplatin erzielt, vergleiche Tabelle 54. Die für ADP deutlich weniger stark ausgeprägten Effekte auf die Zytotoxizität von Cisplatin wiesen an dieser Stelle darauf hin, dass die beobachteten Effekte für ATP nicht durch ADP als eventuelles Abbauprodukt von ATP hervorgerufen wurden. In der Literatur gibt es bereits Veröffentlichungen, die den Effekt von Adenosin in verschiedenen Krebszelllinien studiert haben. Es wird beispielsweise berichtet, dass in humanen Gebärmutterhalskrebszellen die Toxizität von extrazellulärem ATP auf dessen Abbauprodukt Adenosin zurückzuführen ist (183). Ähnliches wurde ebenfalls für die Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und A2780 gezeigt (144,180). Hier wurde einerseits veranschaulicht, dass extrazelluläres Adenosin selbst über wachstumshemmende Effekte und Apoptose-induzierende Eigenschaften verfügt und andererseits ebenfalls einen synergistischen Einfluss auf die Zytotoxizität von Cisplatin ausübt und dessen Chemosensitivität erhöht (144).

Doch um die in dieser Arbeit beobachteten Effekte für ATP auf dessen Abbauprodukt Adenosin zurückführen zu können, müssten die HEY- und auch die OVCAR-3-Zellen die Enzymsysteme (CD39 und CD73), welche ATP zu Adenosin abbauen, exprimieren. Im Rahmen der DNA-Microarray-Analyse wurde die Expression dieser beiden Enzyme untersucht, vergleiche Abbildung 90. Hier fanden sich keine Anhaltspunkte dafür, dass die beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien die Ektonukleotidasen CD39 (= ENTPDase 1) bzw. CD73 (= 5'Ectonukleotidase) exprimierten, welche ATP entsprechend abbauen könnten. Allerdings müsste noch untersucht werden, ob die beiden Ektonukleotidasen auf Proteinebene wirklich nicht exprimiert sind, um die gerade getroffene Aussage zu bestätigen.

Interessanterweise konnte in Gegenwart des P2Y₂-Antagonisten NF272, welcher 1 Stunde vor

Beginn der ATP-Präinkubation zu den Zellen gegeben wurde, der sensitivierende Effekt von ATP auf die Cisplatin-Zytotoxizität an den HEY-Zellen vollständig inhibiert werden. Dies wurde für die HEY-Zellen sowohl für die 48-stündige Prä- mit anschließender 72-stündigen Coinkubation von Cisplatin als auch für die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin für 72 Stunden gezeigt, vergleiche Abbildung 122 und Abbildung 123 sowie Tabelle 60 und Tabelle 61. NF272 selbst beeinflusste die IC_{50} von Cisplatin weder an den HEY- noch an den OVCAR-3-Zellen, vergleiche Tabelle 59 und Abbildung 121. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass der sensitivierende Effekt von ATP auf die Cisplatin-Zytotoxizität P2Y₂-Rezeptor vermittelte erfolgte. Bestätigt werden konnte diese These durch den Einsatz des deutlich potenteren und selektiveren P2Y₂-Antagonisten AR-C118925. Sowohl an der Zelllinie HEY als auch OVCAR-3 wurde die sensitivierende Wirkung von ATP auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität durch den Einsatz von AR-C118925 aufgehoben, siehe Tabelle 63 bis Tabelle 66, ohne dass AR-C118925 selbst einen Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität ausübt (Tabelle 62). Auf der anderen Seite war der P2Y₁-Rezeptor-Antagonist MRS2211 nicht in der Lage den sensitivierenden Effekt von ADP auf die Cisplatin-Zytotoxizität an den HEY-Zellen zu inhibieren, vergleiche Abbildung 130, so dass eine mögliche Beteiligung des P2Y₁-Rezeptors an dieser Stelle endgültig ausgeschlossen werden konnte. Das P2Y₁-Rezeptorprotein ist zwar exprimiert, aber scheinbar nicht funktionell aktiv. Demgegenüber konnte die ADP-Wirkung in Gegenwart des P2Y₂-Antagonisten NF272 zumindest teilweise revertiert werden, was wiederum für eine Beteiligung des P2Y₂-Rezeptors sprach. Allerdings hätten dann auch Effekte von UTP auf das Zellwachstum oder auf die Cisplatin-Zytotoxizität beobachtet werden müssen, wenn der P2Y₂-Rezeptor involviert ist, da UTP und ATP als vergleichsweise äquipotente Agonisten am P2Y₂-Rezeptor beschrieben sind (4,5). Dass für UTP weder wachstumshemmende noch sensitivierende Effekte bzgl. der Cisplatin-Zytotoxizität an den Ovarialkarzinom-Zelllinien zu beobachten waren, lässt sich vermutlich, wie bereits zuvor erläutert, durch die Instabilität des UTPs selbst erklären (40). Um für UTP entsprechende Effekte erzielen zu können, hätte dessen Konzentration vermutlich deutlich erhöht werden müssen. In der Literatur sind an der epidermoiden Krebszelllinie A-431 wachstums-hemmende Effekte für UTP beschrieben, wenn UTP in einer Konzentration im Bereich von 500 mM – 3000 mM eingesetzt wurde (184). Auf der anderen Seite ist in der Literatur ebenfalls die Tatsache beschrieben, dass, obwohl ATP und UTP ähnliche Potenzen am P2Y₂-Rezeptor aufweisen, teilweise unterschiedliche Effekte zu beobachten sind. Beispielsweise berichten *Erb et al.*, dass in HEK293 der P2Y₂-Rezeptor, je nach Agonist verschiedenartig an β -Arrestin1 und β -Arrestin2 gekoppelt (142). So führt ATP zu einer starken Interaktion mit β -Arrestin1 und einer schwachen Interaktion mit β -Arrestin2. Demgegenüber werden durch UTP β -Arrestin1 und β -Arrestin2 gleichermaßen stark aktiviert (142,185). Dies wiederum resultiert in einer durch die

β -Arrestine hervorgerufenen unterschiedlich langandauernden Aktivierung von ERK1/2 (142,186). Möglicherweise lässt sich auch so erklären, warum an den Zelllinien HEY- und OVCAR-3 nicht dieselben Effekte für UTP zu beobachten sind wie für ATP.

5.3.2.2 Synergismus von ATP und Cisplatin

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATP die Zytotoxizität von Cisplatin an beiden Zelllinien zeit- und auch konzentrationsabhängig zu erhöhen vermochte. Die Kombination von ATP und Cisplatin erwies sich sowohl an den HEY-Zellen als auch an den OVCAR-3-Zellen als synergistisch. Die jeweiligen Kombinationsindizes (CI) wurden dabei nach der Chou-Talalay-Methode berechnet, siehe Tabelle 69 und Tabelle 70. Erwartungsgemäß wurden die CI-Werte mit steigender Konzentration an ATP und steigender Konzentration an Cisplatin entsprechend kleiner. Ebenso wurde eine verstärkte Apoptose-Induktion beobachtet, wenn die Zellen gleichzeitig mit ATP und Cisplatin behandelt wurden. An den HEY-Zellen nahm die Anzahl apoptotischer Nuclei (= Sub G₁-Fraktion) unter der Behandlung mit ATP (10, 100, 200, 500 μ M) nur marginal zu, die Anzahl apoptotischer Nuclei lag hier jeweils bei < 5%. Durch die Kombination von ATP mit Cisplatin wurde die Induktion der Apoptose deutlich verstärkt im Vergleich zu den Zellen, welche nur mit den Einzelsubstanzen behandelt wurden, vergleiche Abbildung 132. Die Analyse der Anzahl apoptotischer Zellen ergab, dass es sich hierbei um einen synergistischen Effekt handelte, vergleiche Abbildung 133. Des Weiteren wurde gezeigt, dass in Gegenwart des unspezifischen Caspase-Inhibitors QVD-OPh die Induktion der Apoptose durch die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin vollständig inhibiert wurde, da die Anzahl der apoptotischen Zellen auf Kontrollniveau zurückgedrängt wurde. Folglich wurde in den so behandelten Zellen keine Apoptose mehr induziert. Cisplatin als klassisches Zytostatikum kann die Apoptosekaskade bekanntermaßen sowohl auf dem extrinsischen als auch auf dem intrinsischen Weg auslösen (117,187,188). Beide Wege haben gemein, dass schlussendlich die Effektor-Caspase 3 aktiviert wird, welche den apoptotischen Zelluntergang einleitet. Dass die Caspase 3 und auch die Caspase 7 tatsächlich aktiviert wurden unter der kombinierten Behandlung mit ATP und Cisplatin, wurde fluoreszenzmikroskopisch eindeutig nachgewiesen, siehe Abbildung 134 und Abbildung 135. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass durch den Einsatz des unspezifischen Caspase-Inhibitors QVD-OPh die Auslösung der Apoptose durch Blockade der Caspase unterdrückt wurde. Außerdem wurde durch diesen Versuch gezeigt, dass durch die gleichzeitige Gabe von ATP und Cisplatin apoptotische und nicht nekrotische Zelluntergänge induziert wurden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Literatur. Auch hier wurde schon mehrfach berichtet, dass ATP die Caspase-3-Aktivierung und den programmierten Zelltod induziert (189,190), neu ist an dieser Stelle die durch ATP synergistische Verstärkung der Cisplatin-induzierten Caspase 3/7-Aktivierung in den Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY und OVCAR-3, siehe

Abbildung 134.

Ebenso wurde gezeigt, dass die durch ATP-induzierte erhöhte Cisplatin-Zytotoxizität neben der verstärkten Apoptose-Induktion auch mit einer verstärkten, synergistischen Aktivierung der Caspase 3/7 in HEY- bzw. OVCAR-3-Zellen assoziiert war, siehe Abbildung 134.

Weiter wurde der Effekt von ATP auf den Zellzyklus der jeweiligen Zellen untersucht, um so zu überprüfen, ob die für ATP beobachteten wachstumshemmenden Effekte durch einen eventuellen Arrest des Zellzyklus hervorgerufen wurden. Die Arretierung des Zellzyklus während der S-Phase unter der Behandlung mit ATP ist in der Literatur sowohl für humane, kardiale Fibroblasten (191) als auch für nasopharyngeale (61), ösophageale (65) bzw. kolorektale (64) Krebszellen beschrieben. Allerdings wurden diese Effekte teilweise nach dem Einsatz von deutlich höheren Konzentrationen an ATP (bis 1 mM) beobachtet. In dieser Arbeit wurde für die Zellzyklusanalyse maximal 500 μ M ATP eingesetzt. Ein wie in der Literatur dargestellter ATP-vermittelter Arrest des Zellzyklus in der S-Phase wurde hier weder für die HEY- noch für die OVCAR-3-Zellen in dieser Deutlichkeit detektiert, vergleiche Abbildung 136 bis Abbildung 139. Hierbei zeichneten sich erste Hinweise auf einen möglichen S-Phase-Arrest für die HEY-Zellen ab, wenn sie mit 500 μ M ATP behandelt wurden und für die OVCAR-3-Zellen, wenn sie mit 100, 200 oder 500 μ M ATP behandelt wurden. Möglicherweise waren hier die Konzentrationen für ATP zu niedrig gewählt, um den Arrest in der S-Phase entsprechend zu beobachten.

5.3.2.3 Mechanistische Untersuchungen zur ATP-vermittelten Wirkung

Ein vermehrtes Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen nach der kombinierten Gabe von ATP und Cisplatin ließ sich nicht beobachten, siehe Kapitel 4.3.5.1. Die Anzahl der Foci pro Zellkern für die mit ATP und Cisplatin behandelten Zellen unterschied sich nicht signifikant von der Anzahl der Foci pro Zellkern für die Zellen, welche mit den Einzelsubstanzen behandelt wurden. Die sensitivierende Wirkung von ATP auf die Cisplatin-induzierte Zytotoxizität ging folglich nicht mit einem vermehrten Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen, also einer erhöhten Schädigung der DNA, einher.

Western Blot-Analysen von mit ATP-behandelten HEY-Zellen zeigten, dass die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors deutlich zunimmt, wenn die Zellen für 48 Stunden mit zunehmenden Konzentrationen an ATP inkubiert wurden. Die in HEY-Zellen deutlich beobachtete Phosphorylierung des EGF-Rezeptors nach ATP-Behandlung steht im Einklang mit der Literatur: eine Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors kann zur Transaktivierung des co-lokalierten EGF-Rezeptors führen (14,42,43,192).

Weiter konnte gezeigt werden, dass durch die ATP-Behandlung die Expression des Proteins mTOR zunimmt (HEY) oder gleichbleibt (OVCAR-3), vergleiche Abbildung 146 und Abbildung 147. Die Expression des unter anderem für das Zellwachstum verantwortlichen Proteins mTOR

wurde in HEY-Zellen durch Cisplatin reduziert, die detektierten Banden waren deutlich schwächer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, vergleiche Abbildung 146. Interessanterweise konnte durch die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin in beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien die Expression von mTOR fast vollständig unterdrückt werden, siehe Abbildung 146 und Abbildung 147. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg involviert sein könnte. Dass P2-Rezeptoren diesen Signalweg stimulieren können, wurde bereits von *Franke et al.* beschrieben (193). Ebenso scheint dieser Signalweg im Krebsgeschehen allgemein (194,195), aber vor allen in Ovarialkarzinom-Zelllinien (80,196) eine wichtige Rolle zu spielen. Allerdings bleibt unklar, wie die ATP-bedingte verstärkte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und die verstärkte Expression von mTOR in HEY-Zellen bei der Kombination von ATP mit Cisplatin zu einer Dephosphorylierung des EGF-Rezeptors und massiven Abnahme der mTOR-Expression führt. Dies muss in weiterführenden Studien geklärt werden. An dieser Stelle bleibt deskriptiv festzuhalten, dass es möglich ist in Ovarialkarzinom-Zelllinien über P2Y₂-Rezeptoren sowohl das Proliferationsverhalten zu modulieren als auch die Chemosensitivität von Cisplatin zu erhöhen. Auf eine Stimulation mit ATP wurden P2Y₂-vermittelt intrazellulär Calciumionen freigesetzt, die Expression des EGF-Rezeptors und seine Phosphorylierung nahmen zu und die Expression von mTOR wurde gesteigert. Durch die kombinierte Gabe von ATP und Cisplatin wurden synergistische Effekte hinsichtlich der erhöhten Zytotoxizität von Cisplatin beobachtet, welche sich in Gegenwart des P2Y₂-Antagonisten NF272 oder AR-C118925 revertieren ließen. Die verstärkte, synergistische Apoptose-Induktion sowie Caspase 3/7-Aktivierung könnte im Zusammenhang mit der massiven Verringerung der Expression von mTOR stehen. Neben dem P2Y₂-Rezeptor scheint die Expression des EGF-Rezeptors hier eine wichtige Rolle zu spielen. Denn für die HEY-Zellen, welche im Vergleich zu den OVCAR-3-Zellen mehr EGF-Rezeptor-Protein exprimieren, wurden deutlichere Effekte für ATP beobachtet. Möglicherweise ist die durch ATP-vermittelte erhöhte Zytotoxizität von Cisplatin sowohl P2Y₂-Rezeptor-vermittelt als auch gekoppelt an den EGF-Rezeptor und dessen Signaltransduktion.

Abbildung 151 fasst die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Chemosensitivitätssteigerung von Cisplatin durch ATP nochmals zusammen. Durch die synergistische Wirkung von ATP und Cisplatin, an dem der P2Y₂- und der EGF-Rezeptor beteiligt sind, wurde gezeigt, dass sich purinerge Rezeptoren als Zielstrukturen für die Therapie eines Ovarialkarzinoms eignen. Möglicherweise kann so die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Platin-Verbindungen verhindert bzw. verlangsamt und das Wachstum entarteter Zellen reduziert werden. Die Therapie des Ovarialkarzinoms könnte durch die gezielte Modulation des P2Y₂-Rezeptors entsprechend weiterentwickelt werden.

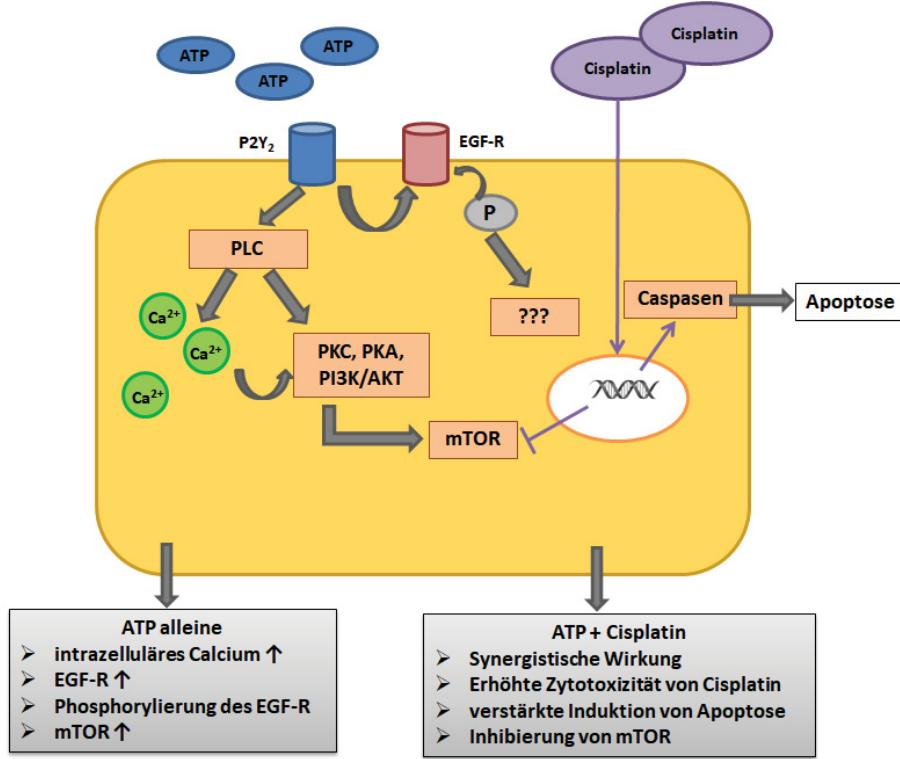


Abbildung 151: Zusammenfassung dieser Arbeit. AKT = PKB (Proteinkinase B), EGF-R: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKA: Proteinkinase A, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, mTOR: mammalian Target of Rapamycin, P: Phosphatrest (zeigt die Phosphorylierung an).

Literaturverzeichnis

1. Cummings PB. What is the function of ATP? | Socratic [Internet]. [cited 2017 Feb 20]. Available from: <https://socratic.org/questions/what-is-the-function-of-atp>
2. Falzoni S, Donvito G, Di Virgilio F. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2018 Oct 24];3(3):20120101. Available from: <http://rsfs.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsfs.2012.0101>
3. Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett* [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Nov 12];205:16–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30439478>
4. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2006 Sep [cited 2016 Jun 9];58(3):281–341. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968944>
5. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Jun [cited 2016 Jun 8];110(3):415–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257449>
6. von Kugelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016 May [cited 2016 May 23];104:50–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519900>
7. Müller CE, Baqi Y, Namasivayam V. Agonists and Antagonists for Purinergic Receptors. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2020 [cited 2019 Nov 9]. p. 45–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31646479>
8. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018 Oct 13 [cited 2018 Nov 16];18(10):601–18. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41568-018-0037-0>
9. Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiology and therapeutic potential. *Keio J Med* [Internet]. 2013 [cited 2016 Jun 7];62(3):63–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24067872>
10. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2006 Mar [cited 2016 Jun 7];58(1):58–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507883>
11. Rayah A, Kanellopoulos JM, Di Virgilio F. P2 receptors and immunity. *Microbes Infect* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Oct 25];14(14):1254–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457912001839>
12. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* [Internet]. 2017 Jan 20 [cited 2018 Nov 19];36(3):293–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27321181>

13. Praetorius HA, Leipziger J. Intrarenal purinergic signaling in the control of renal tubular transport. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2010 Mar 17 [cited 2017 Feb 20];72(1):377–93. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021909-135825>
14. Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY, et al. P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2010 Jun 13 [cited 2018 Nov 12];41(2–3):356–66. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-010-8115-7>
15. Coade SB, Pearson JD. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res* [Internet]. 1989 Sep [cited 2018 Oct 25];65(3):531–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548757>
16. Forrester T. An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J Physiol* [Internet]. 1972 Aug [cited 2018 Oct 25];224(3):611–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5071932>
17. Pellegatti P, Raffaghelli L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. El Khoury J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2008 Jul 9 [cited 2018 Oct 31];3(7):e2599. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002599>
18. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Oct 25];118(3):251–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524456>
19. Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Aug 12 [cited 2018 Oct 25];269(32):20584–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519611>
20. Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P. Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2001 Dec 21 [cited 2018 Oct 25];289(5):1275–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X01961248>
21. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* [Internet]. 2001 Sep [cited 2018 Oct 25];26(8–9):959–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699948>
22. D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal* [Internet]. 2011 Feb [cited 2018 Oct 25];23(2):305–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688156>
23. Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2005 Aug [cited 2018 Oct 25];16(8):3659–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944221>
24. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic

- inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1970 Dec [cited 2018 Nov 3];40(4):668–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322041>
25. Burnstock G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2016 Aug 5 [cited 2018 Oct 31];371(1700):20150422. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27377731>
 26. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jun 7];99(1):16–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078669>
 27. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1998 Sep [cited 2018 Nov 3];50(3):413–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9755289>
 28. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* [Internet]. 2010 Sep 26 [cited 2018 Nov 4];29(39):5346–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20661219>
 29. Jacobson KA, Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 26];104:31–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686393>
 30. Mörike K. P2X3-Rezeptor-Antagonisten — eine Renaissance für wirksame Antitussiva? *Pneumo News* [Internet]. 2015 Oct 14 [cited 2018 Oct 31];7(5):12–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s15033-015-0215-7>
 31. Prof. Dr. rer. nat. Sträter N. P10: Human5'-NT and P2X receptors: Structure, function and inhibitor design [Internet]. [cited 2018 Oct 26]. Available from: http://biochemie.medizin.uni-leipzig.de/for748/index.php?option=com_content&view=article&id=18&Itemid=25
 32. Jacobson KA, Müller CE. Medicinal chemistry of adenosine, P2Y and P2X receptors. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016 May [cited 2016 Jun 7];104:31–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26686393>
 33. Burnstock G, Verkhratsky A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* [Internet]. 2010 Jan 14 [cited 2018 Nov 5];1(1):e9–e9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21364628>
 34. Boeynaems J-M, Communi D, Robaye B. Overview of the pharmacology and physiological roles of P2Y receptors. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* [Internet]. 2012 Sep 28 [cited 2016 Jun 2];1(5):581–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wmts.44>
 35. Jacobson KA, Boeynaems J-M. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today* [Internet]. 2010 Jul [cited 2016 Jun 7];15(13–14):570–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594935>
 36. Jacobson KA, Ivanov AA, de Castro S, Harden TK, Ko H. Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal* [Internet]. 2009 Mar [cited 2016 Jun 8];5(1):75–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600475>

37. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 Sep 25 [cited 2018 Oct 31];8:661. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28993732>
38. Abdulqawi R, Dockry R, Holt K, Layton G, McCarthy BG, Ford AP, et al. P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2015 Mar 28 [cited 2018 Nov 3];385(9974):1198–205. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614612551>
39. Wirkstoff gegen chronischen Husten in Sicht | *Pharmazeutische Zeitung* [Internet]. [cited 2018 Oct 31]. Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/2018-05/wirkstoff-gegen-chronischen-husten-in-sicht/>
40. Kaulich M, Streicher F, Mayer R, Müller I, Müller CE. Flavonoids - novel lead compounds for the development of P2Y₂ receptor antagonists. *Drug Dev Res* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2018 Oct 4];59(1):72–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ddr.10203>
41. Hillmann P, Ko G-Y, Spinrath A, Raulf A, von Kügelgen I, Wolff SC, et al. Key Determinants of Nucleotide-Activated G Protein-Coupled P2Y₂ Receptor Function Revealed by Chemical and Pharmacological Experiments, Mutagenesis and Homology Modeling. *J Med Chem* [Internet]. 2009 May 14 [cited 2018 Nov 15];52(9):2762–75. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm801442p>
42. Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, et al. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2005 [cited 2016 Jun 7];31(1–3):169–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953819>
43. Li W-H, Qiu Y, Zhang H-Q, Tian X-X, Fang W-G. P2Y2 Receptor and EGFR Cooperate to Promote Prostate Cancer Cell Invasion via ERK1/2 Pathway. Chai KX, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 16 [cited 2019 Jan 2];10(7):e0133165. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133165>
44. Ko G-Y. Molecular Modelling Untersuchungen am humanen P2Y2-Rezeptor und seinen Liganden. [cited 2018 Nov 15]; Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=6993>
45. Rafehi M, Burbiel JC, Attah IY, Abdelrahman A, Müller CE. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signal* [Internet]. 2017 Mar 20 [cited 2017 Jun 9];13(1):89–103. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11302-016-9542-3>
46. Seye CI, Yu N, González FA, Erb L, Weisman GA. The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Aug 20 [cited 2016 Jun 7];279(34):35679–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175347>
47. Eun SY, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. P2Y(2)R activation by nucleotides released from oxLDL-treated endothelial cells (ECs) mediates the interaction between ECs and immune cells through RAGE expression and reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2014 Apr [cited 2016 Jun 7];69:157–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486339>

48. Stachon P, Peikert A, Michel A, Wolf D, Hoppe N, Dufner B, et al. Extracellular ATP induces atherosclerosis and vascular inflammation via purinergic receptor 2 (P2Y2) in mice. *Cardiovasc Res*. 2014;103(suppl 1):S97.
49. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MAM, Muskens F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* [Internet]. 2007 Aug [cited 2016 Jun 7];13(8):913–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17632526>
50. Müller T, Idzko M. P2Y receptors in lung inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* [Internet]. 2012 Nov [cited 2016 Jun 7];1(6):755–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/wmts.69>
51. Vanderstocken G, Bondue B, Horckmans M, Di Pietrantonio L, Robaye B, Boeynaems J-M, et al. P2Y2 receptor regulates VCAM-1 membrane and soluble forms and eosinophil accumulation during lung inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2016 Jun 7];185(6):3702–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720203>
52. Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Grimm M, Jakob T, et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* [Internet]. 2010 Dec [cited 2016 Jun 7];65(12):1545–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880147>
53. Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C. Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2002 Dec 5 [cited 2016 Jun 7];54(11):1463–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458155>
54. Kellerman D, Rossi Mospan A, Engels J, Schaberg A, Gorden J, Smiley L. Denufosal: a review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Jun 7];21(4):600–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276176>
55. Lau OCF, Samarawickrama C, Skalicky SE. P2Y2 receptor agonists for the treatment of dry eye disease: a review. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 7];8:327–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511227>
56. Keating GM. Diquafosol ophthalmic solution 3 %: a review of its use in dry eye. *Drugs* [Internet]. 2015 May [cited 2016 Jun 7];75(8):911–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25968930>
57. Wang S, Iring A, Strilic B, Albarrán Juárez J, Kaur H, Troidl K, et al. P2Y₂ and Gq/G₁₁ control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2016 Jun 7];125(8):3077–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168216>
58. Magni G, Merli D, Verderio C, Abbracchio MP, Ceruti S. P2Y2 receptor antagonists as anti-allodynic agents in acute and sub-chronic trigeminal sensitization: role of satellite glial cells. *Glia* [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Jun 7];63(7):1256–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779655>
59. Li N, Lu Z, Yu L, Burnstock G, Deng X, Ma B. Inhibition of G protein-coupled P2Y2 receptor induced analgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Mol Pain* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 7];10:21. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642246>
60. Li W-H, Qiu Y, Zhang H-Q, Liu Y, You J-F, Tian X-X, et al. P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer* [Internet]. 2013 Sep 17 [cited 2016 Jun 7];109(6):1666–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23969730>
 61. Yang G, Zhang S, Zhang Y, Zhou Q, Peng S, Zhang T, et al. The inhibitory effects of extracellular ATP on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells via P2Y2 receptor and osteopontin. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 9];33:53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961145>
 62. Li H, Wang L, Qu H, Yu L, Burnstock G, Ni X, et al. P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011 May 16 [cited 2016 Jun 9];338(1–2):28–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356271>
 63. Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, et al. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Jul 4 [cited 2018 Nov 14];289(27):19137–49. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M113.540047>
 64. Yaguchi T, Saito M, Yasuda Y, Kanno T, Nakano T, Nishizaki T. Higher concentrations of extracellular ATP suppress proliferation of Caco-2 human colonic cancer cells via an unknown receptor involving PKC inhibition. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2010 [cited 2016 Jun 9];26(2):125–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798496>
 65. Maaser K, Höpfner M, Kap H, Sutter AP, Barthel B, von Lampe B, et al. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y(2)-receptors. *Br J Cancer* [Internet]. 2002 Feb 12 [cited 2016 Jun 9];86(4):636–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870549>
 66. White N, Burnstock G. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2006 Apr [cited 2017 Feb 20];27(4):211–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614706000538>
 67. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal* [Internet]. 2013 Dec [cited 2016 Jun 7];9(4):491–540. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797685>
 68. Ratjen F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, et al. Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2012 Dec [cited 2016 Jun 7];11(6):539–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682898>
 69. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2018 Nov 15];46(1–3):3–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259830>
 70. Weyler S, Baqi Y, Hillmann P, Kaulich M, Hunder AM, Müller IA, et al. Combinatorial synthesis of anilinoanthraquinone derivatives and evaluation as non-nucleotide-derived P2Y2 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2018

- May 19];18(1):223–7. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X07012644>
71. Meghani P. The design of P2Y2 antagonists for the treatment of inflammatory diseases. *Abstr Pap Am Chem Soc* [Internet]. 2002 Jul 19 [cited 2018 Nov 15];224(1–2):12. Available from: <https://eurekamag.com/research/035/866/035866420.php>
 72. Fehrman RSN, Li X-Y, van der Zee AGJ, de Jong S, Te Meerman GJ, de Vries EGE, et al. Profiling studies in ovarian cancer: a review. *Oncologist* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2018 Nov 19];12(8):960–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17766655>
 73. Zhang X-Y, Zhang P-Y. Recent perspectives of epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2018 Nov 17];12(5):3055–8. Available from:
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.5107>
 74. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2017 Feb [cited 2018 Nov 15];14(1):9–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28443200>
 75. Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut. Krebs - Eierstockkrebs [Internet]. Krebs in Deutschland. 2017 [cited 2018 Feb 22]. p. 88–91. Available from:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs_node.html
 76. Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut. Krebs - Krebs gesamt [Internet]. Krebs in Deutschland. 2017 [cited 2018 Feb 22]. p. 16–23. Available from:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html
 77. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. 2017;(November):1–130. Available from:
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035-OLI_Ovarialkarzinom_2017-11.pdf
 78. Krebs - Eierstockkrebs [Internet]. [cited 2018 Nov 19]. Available from:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs_node.html
 79. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* [Internet]. 2004 May [cited 2018 Nov 21];164(5):1511–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111296>
 80. Dobbin Z, Landen C. The Importance of the PI3K/AKT/MTOR Pathway in the Progression of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013 Apr 15 [cited 2018 Nov 26];14(4):8213–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591839>
 81. Agarwal R, Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2018 Nov 26];3(7):502–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835670>
 82. Vetter MH, Hays JL. Use of Targeted Therapeutics in Epithelial Ovarian Cancer: A Review of Current Literature and Future Directions. *Clin Ther* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2018

- Nov 17];40(3):361–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29482922>
83. Kigawa J. New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Med* [Internet]. 2013 Jun [cited 2018 Nov 26];56(2):43–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031151>
84. Kassack MU, Braun K, Ganso M, Ullmann H, Nickel P, Böing B, et al. Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X1 receptor antagonist. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2004 Apr [cited 2016 Jun 7];39(4):345–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072843>
85. Ullmann H, Meis S, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Nickel P, et al. Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency. *J Med Chem* [Internet]. 2005 Nov 3 [cited 2016 Jun 7];48(22):7040–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16250663>
86. Rettinger J, Braun K, Hochmann H, Kassack MU, Ullmann H, Nickel P, et al. Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X1 receptor antagonist. *Neuropharmacology* [Internet]. 2005 Mar [cited 2016 Jun 7];48(3):461–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721178>
87. Meis S, Hamacher A, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Eckstein N, et al. NF546 [4,4'-(carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene-alpha, alpha'-diphosphonic acid) tetrasodium salt] is a non-nucleotide P2Y11 agonist and stimulates release of interleukin-8 from human monoc. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;332(1):238–47.
88. Eberle S. Untersuchungen zur Rolle des humanen Kupfertransporters 2 bei Tumorresistenzen gegen Platinkomplexe [Internet]. Heinrich Heine Universität Düsseldorf; 2012 [cited 2017 Feb 21]. Available from: <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=21747>
89. ONKO Internetportal [Internet]. 2012 [cited 2016 Jun 29]. Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hirntumor/astrozytome-und-glioblastome.html>
90. Foster SJ, Perkins JP. Glucocorticoids increase the responsiveness of cells in culture to prostaglandin E1. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1977 Nov [cited 2016 Jun 29];74(11):4816–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/200933>
91. Pontén J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* [Internet]. 1968 [cited 2016 Jun 29];74(4):465–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4313504>
92. Buick RN, Pullano R, Trent JM. Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* [Internet]. 1985 Aug [cited 2016 Jun 29];45(8):3668–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4016745>
93. Selby PJ, Thomas JM, Monaghan P, Sloane J, Peckham MJ. Human tumour xenografts established and serially transplanted in mice immunologically deprived by thymectomy, cytosine arabinoside and whole-body irradiation. *Br J Cancer* [Internet]. 1980 Jan [cited 2016 Jun 29];41(1):52–61. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7362779>
94. Wolf JK, Mills GB, Bazzet L, Bast RC, Roth JA, Gershenson DM. Adenovirus-Mediated p53 Growth Inhibition of Ovarian Cancer Cells Is Independent of Endogenous p53 Status. *Gynecol Oncol* [Internet]. 1999 Nov [cited 2018 Oct 31];75(2):261–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10525383>
 95. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* [Internet]. 1983 Nov [cited 2016 Jun 29];43(11):5379–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6604576>
 96. Yaginuma Y, Westphal H. Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* [Internet]. 1992 Aug 1 [cited 2018 Oct 31];52(15):4196–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1638534>
 97. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* [Internet]. 1977 Jul [cited 2016 Jun 29];36(1):59–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304>
 98. Meis S. Molekulare und funktionelle Charakterisierung des P2Y11-Rezeptors sowie pharmakologische Evaluierung neuer Agonisten und Antagonisten [Internet]. Heinrich Heine Universität Düsseldorf; 2008 [cited 2017 Feb 21]. Available from: <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=8239>
 99. Urban C. Pharmakologische Charakterisierung und QSAR-basiertes Design neuartiger Liganden des FFAR1 (Freie-Fettsäure-Rezeptor 1) [Internet]. Heinrich Heine Universität Düsseldorf; 2012 [cited 2017 Feb 21]. Available from: <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=21695>
 100. Flp-In System For Generating Stable Mammalian Expression Cell lines by Flp Recombinase-Mediated Integration. In: User Manual. Invitrogen; 2010.
 101. O’Gorman S, Fox DT, Wahl GM. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* [Internet]. 1991 Mar 15 [cited 2016 Jun 29];251(4999):1351–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900642>
 102. Stratagene Technical Services. XL1-Blue Competent Cells. 2004.
 103. Schachter JB, Harden TK. An examination of deoxyadenosine 5’(α-thio)triphosphate as a ligand to define P2Y receptors and its selectivity as a low potency partial agonist of the P2Y1 receptor. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1997 [cited 2018 Oct 4];121(2):338. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1564685/>
 104. Brunschweiger A, Muller C. P2 Receptors Activated by Uracil Nucleotides - An Update. *Curr Med Chem* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2018 Oct 5];13(3):289–312. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=13&issue=3&spage=289>
 105. Besada P, Shin DH, Costanzi S, Ko H, Mathé C, Gagneron J, et al. Structure activity relationship of uridine 5'-diphosphate analogues at the human P2Y6 receptor. *J Med Chem* [Internet]. 2006 [cited 2018 Oct 5];49(18):5532. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405152/>

106. Ding Z. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2018 Oct 5];101(10):3908–14. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-10-3027>
107. Marteau F. Pharmacological Characterization of the Human P2Y13 Receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2018 Oct 5];64(1):104–12. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.64.1.104>
108. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, et al. ADP Is the Cognate Ligand for the Orphan G Protein-coupled Receptor SP1999. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Mar 16 [cited 2018 Oct 5];276(11):8608–15. Available from: <http://www.jbc.org/content/276/11/8608.long>
109. Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, von Jonquieres G, Lage H, et al. Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *Int J cancer* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2016 Jun 8];123(9):2013–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688867>
110. Eßer D. Synthese und biologische Evaluation von Harnstoffen mit Arylcarnbonsäuren als P2Y11-Rezeptorantagonisten. 2011.
111. Kassack MU, Höfgen B, Lehmann J, Eckstein N, Quillan JM, Sadée W. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen* [Internet]. 2002 Jun [cited 2016 Jun 7];7(3):233–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097186>
112. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1973 Dec 1 [cited 2016 Jun 7];22(23):3099–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4202581>
113. Cheng HC. The power issue: determination of KB or Ki from IC50. A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations. *J Pharmacol Toxicol Methods* [Internet]. [cited 2016 Jun 7];46(2):61–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12481843>
114. ARUNLAKSHANA O, SCHILD HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* [Internet]. 1959 Mar [cited 2016 Jun 7];14(1):48–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13651579>
115. Lew MJ, Angus JA. Analysis of competitive agonist-antagonist interactions by nonlinear regression. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 1995 Oct [cited 2016 Jun 7];16(10):328–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491710>
116. Hamacher A, Weigt M, Wiese M, Hoefgen B, Lehmann J, Kassack MU. Dibenzazecine compounds with a novel dopamine/5HT2A receptor profile and 3D-QSAR analysis. *BMC Pharmacol* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2017 Feb 20];6(1):11. Available from: <http://bmcpharma.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2210-6-11>
117. Engelke L. Neue Ansätze zur Überwindung oder Verhinderung der Cisplatinresistenz in verschiedenen Krebszelllinien [Internet]. Heinrich Heine Universität Düsseldorf; 2015 [cited 2017 Feb 21]. Available from: <http://docserv.uni-due.de/opus4/opus4-ub/13337>

- duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=34668
118. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2017 Feb 17 [cited 2017 Feb 17];37(2):163–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767547>
 119. Abacam. Flow cytometry guide | Abcam [Internet]. [cited 2017 Feb 23]. Available from: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
 120. Leach RM (Haematologist), Drummond M, Doig A. Practical flow cytometry in haematology diagnosis. Wiley-Blackwell; 2013. 248 p.
 121. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* [Internet]. 1991 Jun 3 [cited 2016 Jun 8];139(2):271–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710634>
 122. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 [cited 2016 Jun 8];1(3):1458–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406435>
 123. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* [Internet]. 2001 Jul [cited 2018 Feb 18];3(3):67–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488413>
 124. Henderson L, Bortone DS, Lim C, Zambon AC. Classic “broken cell” techniques and newer live cell methods for cell cycle assessment. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2013;304(10).
 125. Hennicke T, Nieweg K, Brockmann N, Kassack MU, Gottmann K, Fritz G. mESC-based in vitro differentiation models to study vascular response and functionality following genotoxic insults. *Toxicol Sci* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Jun 7];144(1):138–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516496>
 126. Bandolik JJ, Hamacher A, Schrenk C, Weishaupt R, Kassack MU. Class I-Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition is Superior to pan-HDAC Inhibition in Modulating Cisplatin Potency in High Grade Serous Ovarian Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 22 [cited 2019 Oct 8];20(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31234549>
 127. Tirabassi R. How to Identify Supercoils, Nicks and Circles in Plasmid Preps - Bitesize Bio [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 16]. Available from: <https://bitesizebio.com/13524/how-to-identify-supercoils-nicks-and-circles-in-plasmid-preps/>
 128. Li H, Bo H, Wang J, Shao H, Huang S. Separation of supercoiled from open circular forms of plasmid DNA, and biological activity detection. *Cytotechnology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2018 Mar 16];63(1):7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21120691>
 129. Balagurumoorthy P, Adelstein SJ, Kassis AI. Method to eliminate linear DNA from mixture containing nicked circular, supercoiled, and linear plasmid DNA. *Anal Biochem* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2018 Mar 16];381(1):172–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638445>

130. Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1994 Jul [cited 2016 Jun 29];46(1):8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8058061>
131. Nakahata N, Martin MW, Hughes AR, Hepler JR, Harden TK. H1-histamine receptors on human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1986 Feb [cited 2018 Feb 19];29(2):188–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419744>
132. Waldo GL, Harden TK. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2018 Feb 20];65(2):426–36. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.65.2.426>
133. Hechler B, Vigne P, Léon C, Breittmayer JP, Gachet C, Frelin C. ATP derivatives are antagonists of the P2Y1 receptor: similarities to the platelet ADP receptor. *Mol Pharmacol* [Internet]. 1998 Apr [cited 2018 Feb 20];53(4):727–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547364>
134. Guo D, von Kügelgen I, Moro S, Kim Y-C, Jacobson KA. Evidence for the Recognition of Non-Nucleotide Antagonists Within the Transmembrane Domains of the Human P2Y(1) Receptor. *Drug Dev Res* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2018 Feb 20];57(4):173–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ddr.10145>
135. Kim Y-C, Lee J-S, Sak K, Marteau F, Mamedova L, Boeynaems J-M, et al. Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2018 Feb 21];70(2):266–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295205002558>
136. Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR. Cloned and transfected P2Y4 receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br J Pharmacol* [Internet]. 1996 Dec [cited 2016 Jun 7];119(7):1301–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968535>
137. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol*. 1996;50(2).
138. Fricks IP, Carter RL, Lazarowski ER, Harden TK. Gi-dependent cell signaling responses of the human P2Y14 receptor in model cell systems. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2009 Jul [cited 2019 Jan 6];330(1):162–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339661>
139. Kostenis E, Waelbroeck M, Milligan G. Techniques: Promiscuous $\text{G}\alpha$ proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2005 Nov [cited 2019 Jan 6];26(11):595–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183138>
140. Suplat D, Krzemiński P, Pomorski P, Barańska J. P2Y(1) and P2Y(12) receptor cross-talk in calcium signalling: Evidence from nonstarved and long-term serum-deprived glioma C6 cells. *Purinergic Signal* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Jan 6];3(3):221–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404435>
141. Hardy AR, Jones ML, Mundell SJ, Poole AW. Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* [Internet].

- 2004 Sep 15 [cited 2019 Jan 6];104(6):1745–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187029>
142. Erb L, Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 6];1(6):789–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25774333>
143. von Kugelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. Neuropharmacology [Internet]. 2016 May [cited 2016 Jun 7];104:50–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519900>
144. Sureechatchaiyan P, Hamacher A, Brockmann N, Stork B, Kassack MU. Adenosine enhances cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells. Purinergic Signal [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2018 Dec 26];14(4):395–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30078088>
145. Schultze-Mosgau A, Katzur AC, Arora KK, Stojilkovic SS, Diedrich K, Ortmann O. Characterization of calcium-mobilizing, purinergic P2Y(2) receptors in human ovarian cancer cells. Mol Hum Reprod [Internet]. 2000 May [cited 2016 Jun 7];6(5):435–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775647>
146. Brockmann N, Sureechatchaiyan P, Müller D, Hennicke T, Hausmann R, Fritz G, et al. Profiling of a suramin-derived compound library at recombinant human P2Y receptors identifies NF272 as a competitive but non-selective P2Y2 receptor antagonist. Purinergic Signal [Internet]. 2019 Sep 3 [cited 2019 Dec 7];15(3):287–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31270713>
147. Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, Kosenburger K, Yang J-W, Waldhoer M, et al. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2009 Feb [cited 2018 Jul 18];1793(2):325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973777>
148. Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, et al. A-740003 [N-(1-{[(Cyanooimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a Novel and Selective P2X7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat. J Pharmacol Exp Ther [Internet]. 2006 Dec 1 [cited 2019 Mar 25];319(3):1376–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982702>
149. Militello KT, Read LK. Mitochondria Trypanosoma brucei Pathways of mRNA Turnover in UTP-Dependent and-Independent [Internet]. 2000 [cited 2018 Dec 26]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Mitochondria-Trypanosoma-brucei-Pathways-of-mRNA-in-Militello-Read/b8cf2b7be393ba0ad31b1a0735e7b6fbfffee552>
150. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2016 Jun 8];70(2):440–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068163>
151. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2018 Sep 3];58(3):621–81. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.58.3.10>
152. Trubiani O, Ciancarelli M, Rapino M, Di Primio R. Dimethyl sulfoxide induces

- programmed cell death and reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid pre-T cell line. *Immunol Lett* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2018 Oct 21];50(1-2):51-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165247896025187>
153. Château MT, Ginestier-Verne C, Chiesa J, Caravano R, Bureau JP. Dimethyl sulfoxide-induced apoptosis in human leukemic U937 cells. *Anal Cell Pathol* [Internet]. 1996 Mar [cited 2018 Oct 21];10(2):75-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721951>
154. Banič B, Nipič D, Šuput D, Milisav I. DMSO modulates the pathway of apoptosis triggering. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2018 Oct 21];16(2):328-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21442445>
155. Keoni CL, Brown TL. Inhibition of Apoptosis and Efficacy of Pan Caspase Inhibitor, Q-VD-OPh, in Models of Human Disease. *J Cell Death* [Internet]. 2015 [cited 2018 Oct 21];8:1-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922583>
156. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* [Internet]. 2003 Aug [cited 2018 Oct 21];8(4):345-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815277>
157. Wagner JM, Karnitz LM. Cisplatin-induced DNA damage activates replication checkpoint signaling components that differentially affect tumor cell survival. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2018 Oct 21];76(1):208-14. Available from: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.109.055178>
158. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of Events Associated With Cell Cycle Arrest at G2 Phase and Cell Death Induced by Cisplatin. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1990 May 2 [cited 2018 Oct 21];82(9):749-55. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/82.9.749>
159. Olive PL, Banáth JP. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2009 Mar [cited 2018 Aug 24];76B(2):79-90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18727058>
160. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* [Internet]. 2010 Aug 8 [cited 2018 Sep 4];2010. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811617>
161. Sak A, Grehl S, Engelhard M, Wierlemann A, Kaelberlah H-P, Erichsen P, et al. Long-term in vivo effects of cisplatin on gamma-H2AX foci signaling in peripheral lymphocytes of tumor patients after irradiation. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 Apr 15 [cited 2018 Sep 4];15(8):2927-34. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-0650>
162. Hansjosten I. Modulation der Cisplatin-induzierten Apoptose durch bioaktive kleine Moleküle. 2017 [cited 2019 Nov 10]; Available from: <https://publikationen.bibliothek.kit.edu/1000073414>
163. Dong Zhang X, Gillespie SK, Hersey P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and-independent apoptotic pathways [Internet]. 2004 [cited 2018 Dec 5]. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/content/3/2/187.full-text.pdf>

164. Tanramluk D, Schreyer A, Pitt WR, Blundell TL. On the Origins of Enzyme Inhibitor Selectivity and Promiscuity: A Case Study of Protein Kinase Binding to Staurosporine. *Chem Biol Drug Des* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2018 Dec 5];74(1):16–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1747-0285.2009.00832.x>
165. Tee AR, Proud CG. Staurosporine inhibits phosphorylation of translational regulators linked to mTOR. *Cell Death Differ* [Internet]. 2001 Aug 24 [cited 2019 Nov 10];8(8):841–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/4400876>
166. Ding Y, Wang B, Chen X, Zhou Y, Ge J. Staurosporine suppresses survival of HepG2 cancer cells through Omi/HtrA2-mediated inhibition of PI3K/Akt signaling pathway. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 Mar 28 [cited 2019 Nov 10];39(3):101042831769431. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317694317>
167. Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2000 Sep [cited 2019 Jan 2];279(3):F400–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966920>
168. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007 Feb [cited 2017 Feb 20];7(2):79–94. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2069>
169. Wolf C, Rosefort C, Fallah G, Kassack MU, Hamacher A, Bodnar M, et al. Molecular determinants of potent P2X2 antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2016 Jun 7];79(4):649–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191044>
170. Hausmann R, Rettinger J, Gerevich Z, Meis S, Kassack MU, Illes P, et al. The Suramin Analog 4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis (carbonylimino)))tetra-kis-benzenesulfonic Acid (NF110) Potently Blocks P2X3 Receptors: Subtype Selectivity Is Determined by Location of Sulfonic Acid Groups. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 May 20];69(6):2058–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551782>
171. Voogd TE, Vansterkenburg EL, Wilting J, Janssen LH. Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol Rev* [Internet]. 1993 Jun [cited 2016 Jun 7];45(2):177–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396782>
172. Ivanov AA, Ko H, Cosyn L, Maddileti S, Besada P, Fricks I, et al. Molecular modeling of the human P2Y2 receptor and design of a selective agonist, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate. *J Med Chem* [Internet]. 2007 Mar 22 [cited 2019 Jan 6];50(6):1166–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17302398>
173. Batra S, Fadeel I. Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV-3). *Cancer Lett* [Internet]. 1994 Feb 28 [cited 2018 Dec 14];77(1):57–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8162563>
174. Jin H, Eun SY, Lee JS, Park SW, Lee JH, Chang KC, et al. P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 [cited 2016 Jun 7];16(5):R77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25156554>

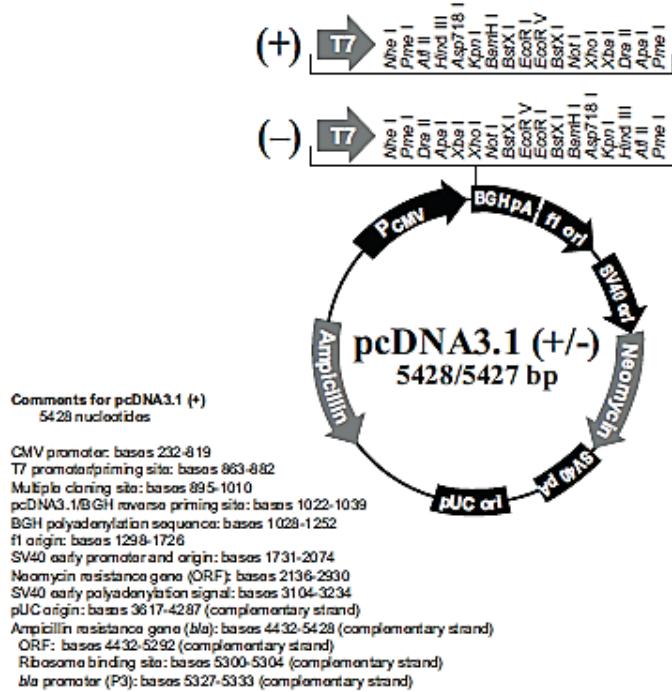
175. Jin H, Ko YS, Kim HJ. P2Y2R-mediated inflammasome activation is involved in tumor progression in breast cancer cells and in radiotherapy-resistant breast cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2018 Sep 4 [cited 2018 Dec 14];53(5):1953–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30226596>
176. Hug H. Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biol unserer Zeit* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2019 Jan 15];30(3):128–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291521-415X%28200003%2930%3A3%3C128%3A%3AAID-BIUZ128%3E3.0.CO%3B2-N>
177. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Jan 13];35(4):495–516. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483>
178. Lawen A. Apoptosis?an introduction. *BioEssays* [Internet]. 2003 Sep [cited 2019 Jan 15];25(9):888–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938178>
179. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* [Internet]. 1991 Jan [cited 2019 Jan 13];112(2):279–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1988462>
180. Sureechatchaiyan P. Role of Purinergic Ligands to Enhance Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer Cells. [cited 2018 Dec 26]; Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=44349>
181. Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, Politz A, Jonquieres G v., Wolf-Kummeth S, et al. Hyperactivation of the Insulin-like Growth Factor Receptor I Signaling Pathway Is an Essential Event for Cisplatin Resistance of Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2009 Mar 24 [cited 2018 Dec 26];69(7):2996–3003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318572>
182. Engelke LH, Hamacher A, Proksch P, Kassack MU. Ellagic Acid and Resveratrol Prevent the Development of Cisplatin Resistance in the Epithelial Ovarian Cancer Cell Line A2780. *J Cancer* [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 7];7(4):353–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918049>
183. Mello P de A, Filippi-Chiela EC, Nascimento J, Beckenkamp A, Santana DB, Kipper F, et al. Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2018 Oct 31];25(19):2905–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103241>
184. Völkl T, Ogilvie A, Neuhuber W, Ogilvie A. Cell Death Induced by Uridine 5'-triphosphate (UTP) in Contrast to Adenosine 5'-triphosphate (ATP) in Human Epidermoid Carcinoma Cells (A-431). *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2008 [cited 2018 Dec 26];22(5–6):441–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088426>
185. Velázquez B, Garrad RC, Weisman GA, González FA. Differential agonist-induced desensitization of P2Y2 nucleotide receptors by ATP and UTP. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2000 [cited 2019 Jan 6];206(1/2):75–89. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1007091127392>
186. Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C, Lohse MJ. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Nov 7 [cited 2019 Jan 6];283(45):30933–41. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703513>
187. Singh M, Chaudhry P, Fabi F, Asselin E. Cisplatin-induced caspase activation mediates PTEN cleavage in ovarian cancer cells: a potential mechanism of chemoresistance. *BMC Cancer* [Internet]. 2013 May 10 [cited 2019 Jan 19];13:233. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663432>
188. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* [Internet]. 2003 Oct 23 [cited 2019 Jan 19];22(47):7265–79. Available from: <http://www.nature.com/articles/1206933>
189. Zeng C-Y, Li C-G, Shu J-X, Xu L-H, Ouyang D-Y, Mai F-Y, et al. ATP induces caspase-3/gasdermin E-mediated pyroptosis in NLRP3 pathway-blocked murine macrophages. *Apoptosis* [Internet]. 2019 Oct 7 [cited 2019 Nov 10];24(9–10):703–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-019-01551-x>
190. TAI C-J, CHANG S-J, CHIEN L-Y, LEUNG PC, TZENG C-R. Adenosine Triphosphate Induces Activation of Caspase-3 in Apoptosis of Human Granulosa-luteal Cells. *Endocr J* [Internet]. 2005 Jun [cited 2019 Nov 10];52(3):327–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006727>
191. Chen J-B, Liu W-J, Che H, Liu J, Sun H-Y, Li G-R. Adenosine-5'-triphosphate up-regulates proliferation of human cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2018 Dec 26];166(3):1140–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2012.01831.x>
192. Sham D, Wesley U V, Hristova M, van der Vliet A. ATP-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor in airway epithelial cells involves DUOX1-dependent oxidation of Src and ADAM17. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2016 Jun 9];8(1):e54391. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349873>
193. Franke H, Sauer C, Rudolph C, Krügel U, Hengstler JG, Illes P. P2 receptor-mediated stimulation of the PI3-K/Akt-pathway *in vivo*. *Glia* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2018 Dec 27];57(10):1031–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19115395>
194. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 2018 Oct 31];4:64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782981>
195. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2004 Apr [cited 2018 Dec 27];30(2):193–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023437>
196. Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong X-S, Walker V, Liu KJ, et al. G₁ cell cycle progression and the expression of G₁ cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2004 Aug [cited 2018 Dec 27];287(2):C281–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028555>

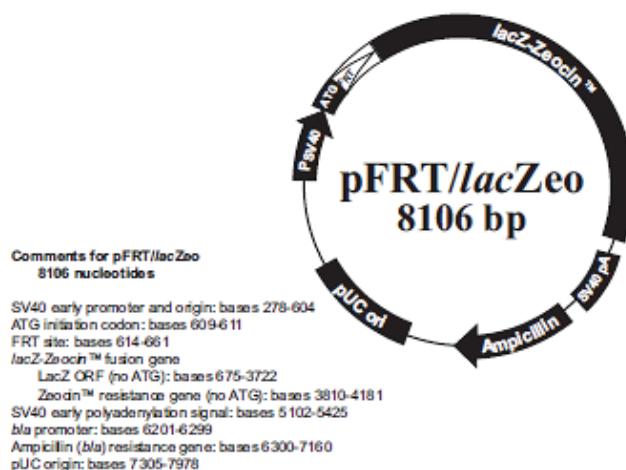
Anhang

A Vektorkarten

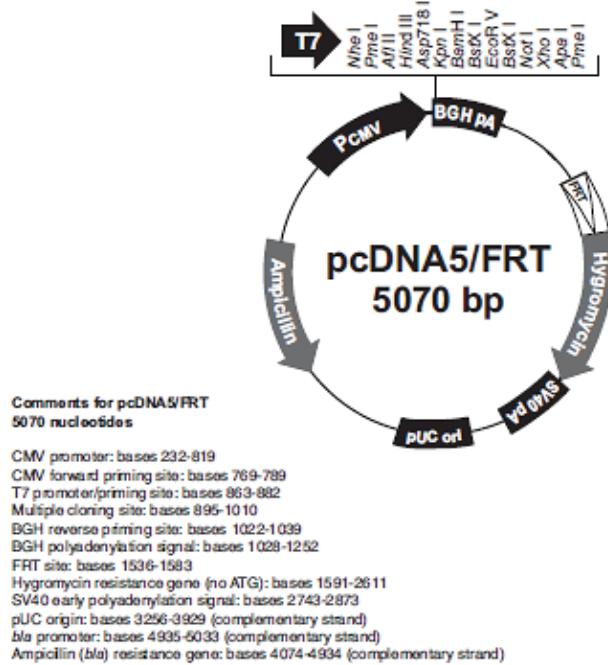
- pcDNA3.1.



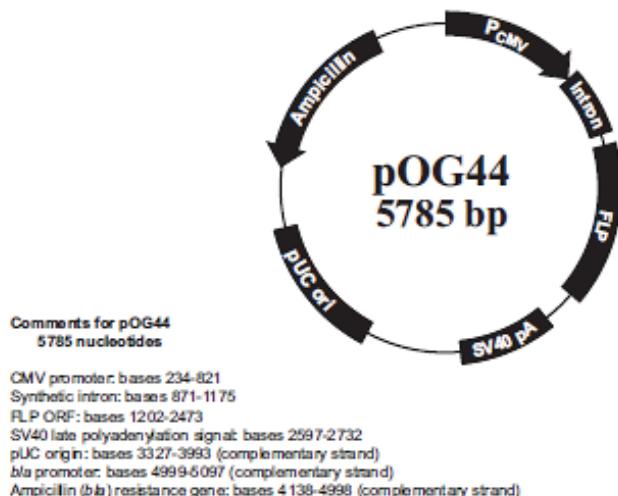
- pFRT/*lacZeo*



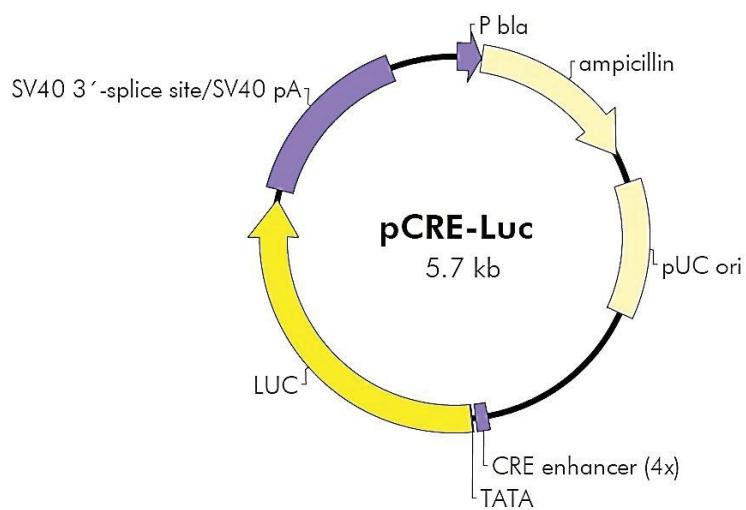
- pcDNA5/FRT



- pOG44



- pCRE-Luc



B cDNA-Sequenzen**Human P2RY1****Accession Number: NM_002563**

atgaccgagg tgctgtggcc ggctgtcccc aacgggacgg acgctgcctt cctggccggt
 ccgggttcgt cctgggggaa cagcacggc gcctccactg ccggcgtctc ctcgtcggtc
 aaatgcgcct tgaccaagac gggcttccag ttttactacc tgccggctgt ctacatctt
 gtattcatca tcggcttccct gggcaacacgc gtggccatct ggatgttcgt cttccacatg
 aagccctgga gccgcacatc cgtgtacatg ttcaatttgg ctctggccga cttcttgcac
 gtgctgactc tgccagccct gatcttctac tacttcaata aaacagactg gatcttcggg
 gatgccatgt gtaaaactgca gaggttcatc tttcatgtga acctctatgg cagcatctt
 tttctgacat gcatcagtgc ccaccggatc agcgggttgg tgcgttccctt caagtccctg
 ggccggctca aaaagaagaa tgcgtatctgt atcagcgtgc tgggtgtggct cattgtggtg
 gtggcgatct cccccatctt cttctactca ggtaccgggg tccgaaaaaa caaaaccatc
 acctgttacg acaccacatc agacgagatc ctgcgaagtt atttcatcta cagcatgtgc
 acgaccgtgg ccatgttctg tgcgttccctt gtcgttattc tgggtgttta cggattaatt
 gtgagagctt tgatttacaa agatctggac aactctcctc tgaggagaaa atcgatttac
 ctggtaatca ttgtactgac tgcgttccctt gtcgttaca tcccttcca tgcgtatgaaa
 acgtgaact tgaggggcccg gcttgcattt cagacccatc caatgtgtgc tttcaatgac
 agggttttagt ccacgtatca ggtgacaaga ggtcttagcaa gtctcaacag ttgtgtggac
 cccattctt atttcttggc gggagatact ttcaagaagg gactctcccg agccacaagg
 aaagcttcta gaagaagtga ggcaatattt caatccaaga gtgaagacat gaccctcaat
 atttacatcg agttcaagca gaatggagat acaagctgtt ga

Human P2RY2**Accession Number: NM_002564**

atggca gcagacctgg gcccctggaa tgacaccatc aatggcacct gggatgggaa
 tgagctgggc tacaggtgcc gcttcaacga ggacttcaag tacgtgtgc tgcctgtgtc
 ctacggcggtg gtgtgcgtgc ttgggtgttgc tctgaacgcc gtggcgctct acatcttctt
 gtgcccgcctc aagacctgga atgcgtccac cacatataatg ttccacactgg ctgtgtctga
 tgcactgtat gcccgcctccc tgccgcgtgt ggtctattac tacgccccggc ggcaccactg
 gcccggcctc acgggtgtct gcaagctgtt ggcgttccctc ttctacacca accttactg
 cagcatcctc ttccctcacatc gcatcagcgt gcaccggatc ctggcgctct tacgacccct
 ggcgtccctg cgctggggcc gggcccgatc cgctcgccgg gtggccgggg ccgtgtgggt
 gttggtgctg gcctgcccagg ccccccgtgtt ctactttgtc accaccagcg cgccgggggg
 ccgcgttaacc tgccacgaca cctcgccacc cgagcttcc acggcttcg tggcctacag
 ctcagtcatg ctggcgctgc tcttcgttgc gcccggatc gtcatcctt tctgttacgt
 gctcatggct cggcgactgc taaagccagc ctacgggacc tcggccggcc tgcctaggc
 caagcgcaag tccgtgcgc ccatcgccgt ggtgtggct gtcttcgc tctgttccct
 gccattccac gtcaccccgca ccctctacta ctccctccgc tcgctggacc tcagctgcc
 caccctcaac gccatcaaca tggcctacaa ggttacccgg ccgctggcca gtgctaacag
 ttgccttgcac cccgtgtctt acttcttggc tggcagagg ctcgtacgtt ttggccgaga
 tgccaagcca cccactggcc ccagccctgc caccggctt ccgcggcaggc tggcctgctg
 cagatccgac agaactgaca tgcagaggat agaagatgtt ttggccgaga gtgaggactc
 taggcggaca gagtccacgc cggctggtag cgagaacact aaggacattc ggctgttag

Human P2RY4**Accession Number: NM_002565**

atggccagta cagagtccctc cctgttgaga tccctaggcc tcagcccagg tcctggcagc
 agtgagggtgg agctggactg ttgggttgc gaggatttca agttcatcct gctgcctgtg
 agctatgcag ttgtcttgc gctgggtttgc ggccttaacg ccccaaccct atggcttcc
 atcttccgccc tccgaccctg ggtgtcaacg gccacccatc tggtccaccc ggcattgtca
 gacacccatgt atgtgtgtc gctgcccacc ctcatctact attatgcagc ccacaaccac
 tggcccttgc gcaactgatc ctgcaagttc gtccgttttcc ttttcttattt gaaaccttac
 tgcagtgtcc ttttcttccatc ctgcatcagc gtgcaccggatc acctggccatc ctggccacca
 ctccggccac tacgtggggcc cccgcctccgc ctgcggccgtt ggcgtttgg
 ttggcgttag ccggctgcct cgtgccaac ctgttcttgc tcacaaccag caacaaagg
 accaccgtcc tgcgtccatga caccactcg cctgaagagt ttgaccacta tgcgtactt
 agctcgccgg tcatggggct gctcttggc gtgcctggcc tggcgtactt tgcgtactt
 ggactcatgg ctcgtcgctt gtatcagccc ttggccaggatc ctgcacatgc gtcttctcg

ctccgctctc tccgcaccat agctgtggc ctgactgtct ttgctgtctg cttcgtgcct
 ttccacatca cccgcaccat ttactacactg gccaggctgt tggaagctga ctgcccagta
 ctgaacattg tcaacgtggc ctataaagtgc actcggcccc tggccagtgca acacagctgc
 ctggatcctg tgctctactt gctcactggc gacaaatatc gacgtcagct ccgtcagctc
 tgtgtgtggc gcaagccccca gccccgcacg gctgcctt ccctggcact agtgtccctg
 cctgaggata gcagctgcag gtggcgcc accccccagg acagtagctg ctctactcct
 agggcagata gattgtaa

Human P2RY6**Accession Number: NM_176798**

atggaatg ggacaaatggc acaggccagg ctctgggctt gccacccacc acctgtgtct
 accgcgagaa cttcaagcaa ctgctgtgc cacctgtgtt ttcggcggtg ctggcggtg
 gcctgcccgtt gaacatctgt gtcattaccc agatctgcac gtcccgccgg gccctgaccc
 gcacggccgtt gtacacccta aaccttgctc tggctgaccc gctatatgcc tgctccctgc
 ccctgctcat ctacaactat gcccaagggtt atcactggcc ctttggcact ttcgcctgccc
 gcctggtccg cttccttcc tatgccaacc tgacggcag catccttcc ctcacactgca
 tcagcttcca gcgctacctg ggcattgtcc acccgctggc cccctggcaca aaacgtgggg
 gccgcccggc tgccctggcta gtgtgtgttag ccgtgtggct ggccgtgaca acccagtggcc
 tgcccacagc catcttcgct gccacaggca tccagcttaa ccgcactgtc tgctatgacc
 tcagcccccc tgccctggcc acccactata tgccttatgg catggctctc actgtcatcg
 gcttcctgtt gccctttgtt gccctgtgg cctgctactg tctcctggcc tgccgcctgt
 gccgcccagga tggcccgccg gaggctgtgg cccaggagcg gcgtggcaag gggccccca
 tggccgtgggt ggtggctgtt gcctttcca tcagcttccat gccttttacatcaccataga
 cagcctacactt ggcagtgcgc tcgacggccgg gcgtccccctg cactgtattt gaggcccttg
 cagcggcccta caaaggcactg cggccgtttt ccagtgccaa cagcgtgctg gacccatcc
 tcttctactt caccsagaag aagttccggcc ggcgaccaca tgagctccta cagaaactca
 cagccaaatg gcagaggcag ggtcgctga

Human P2RY11**Accession Number: NM_002566**

atggcagcc aacgtctcggt gtgccttgc aacttcttgg cagctgcgcga
 cgacaaaactc agtgggttcc agggggactt cctgtggccc atactgggtgg ttgagttct
 ggtggccgtt gccagcaatg gcctggccct gtaccgttcc agcatccggaa agcagcgccc
 atggcaccatc ggcgtggctt tctctgttcca gctggcagtc agcgcacactgc tctgcgcct
 gacgctgccc ccgctggccg cctaccccta tccccccaaag cactggcgct atggggaggc
 cgcgtgcccgc ctggagcgct tcctcttccat ctgcaacctg ctggcgagcg tcatcttcat
 cacctgcatac agcctcaacc gctacctggg catcgtgcac cccttcttgc cccgaaggca
 cctgcgaccc aagcagccct gggccgttag cgctgcggc tgggtcctgg ccgcctgtct
 ggccatgccc acactcagct tctcccacct gaagaggccg cagcagggggg cggcaactg
 cagcgtggcc agggccgggg cctgcatcaa gtgtctgggg acagcagacc acgggctggc
 ggcctacaga gcgtatagcc tgggtgtggc ggggttggc tgccgcctgc cgctgtgtct
 cacgctggca gcctacggcg ccctcgccg ggcgtgcta cgcaagccag gcatgactgt
 ggccgagaag ctgcgtgtgg cagcgttggt ggccagtggt gtggccctct acgcccagctc
 ctatgtgccc taccacatca tgcgggtgtt caacgtggat gctcggcgcc gctggagcac
 cgcgtgccc agtttgcag acatagccca ggccacagca gcccctggagc tggggcccta
 cgtgggtac caggtgtatgc gggccctcat gcccctggcc ttctgtgtcc accctctact
 ctacatggcc gcagtgcctt gctgggtgtt ctgctgcga cactgccccg gctacagggc
 cagctggaaac ccagaggacg ccaagagcac tggccaagcc ctgccttca atgccacagc
 cgccccctaaa ccgtcagagc cccagttccg tgagctgagc caatga

Human P2RY12**Accession Number: NM_176876**

atgcaa gccgtcgaca acctcaccc tgcgcctggt aacaccagtc tgcacccagg
 agactacaaa atcaccagg tcctcttccc actgctctac actgtcctgt tttttgttgg
 atttatcaca aatggcctgg cgtatgaggat tttcttcaa atccggagta aatcaaactt
 tattattttt cttaagaaca cagtcatttc tgcattctc atgattctga cttttccatt
 caaaattttt agtgtatgcca aactggaaac aggaccactg agaacttttgc tgcgtcaagt
 tacctccgtc atattttttt tcacaatgtt tgcattcttgc gactgataac
 tgcgtatgc taccagaaga ccaccaggcc atttaaaaaca tccaaacccca aaaatcttt
 gggggcttaag attctctctg ttgtcatctg ggcattcatg ttcttactct ctttgcctaa
 catgattctg accaacaggc agccgagaga caagaatgtt aagaaatgtt ctttcctttaa

atcagagttc ggtctagtct ggcatgaaat agtaaaattac atctgtcaag tcatttctg
gattaatttc ttaattgtta ttgtatgtta tacactcatt acaaaaagaac tgcgttaccgc
atacgtaaga acgagggggtg taggtaaaagt ccccgaggaaa aaggtaacg tcaaaatgttt
cattatcatt gctgtattct ttatttgttt tgttccttgc cattttgccc gaattccctta
caccctgagc caaaccgggg atgtcttgc ctgcactgtc gaaaatactc tgcgttctatgt
gaaagagagc actctgtggt taacttcctt aaatgcatgc ctggatccgt tcatctatTTT
tttccttgc aagtccctca gaaattcctt gataagttatg ctgaagtgc ccaattctgc
aacatctctg tcccaggaca ataggaaaaaa agaacaggat ggtggtgacc caaatgaaga
gactccaatg taa

Human P2RY13

Accession Number: NM_176894

atgactgcc gccataagaa gacagagaga actgagttatc ctcccaaagg tgacactgga
agcaatgaac accacagtga tgcaaggctt caacagatct gagcggtgcc ccagagacac
tcggatagta cagctggtat tcccagccct ctacacagtg gtttcttga ccggcattct
gctgaatact ttggctctgt ggggtttgt tcacatcccc agctcttca ctttcatcat
ctacctcaaa aacactttgg tggccgactt gataatgaca ctcatgctt ctttcaaaat
cctctctgac tcacacctgg caccctggca gctcagagct tttgtgtgtc gttttcttc
ggtgatattt tatgagacca tgtatgtggg catcgtgctg tttagggctca tagccttga
cagattctc aagatcatca gaccttgag aaatatttt ctaaaaaaaac ctgttttgc
aaaaacggtc tcaatcttca tctgggtctt ttgttcttca atctccctgc caaatacgt
ctttagcaac aaggaagcaa caccatcgtc tgtaaaaaaag tgtgttctt taaaggggcc
tctgggctg aaatggcatc aaatgtaaa taacatatgc cagtttattt tctggactgt
ttttatccta atgcttgggt tttatgtggg tattgtcaaaa aaagtatatg attcttata
aaagtccaaa agtaaggaca gaaaaaaacaa caaaaagctg gaaggcaaag tattgtgt
cgtggctgat ttctttgtgt gtttgctcc atttcatttt gccagagttc catataactca
cagtc当地 aacaataaga ctgactgttag actgaaaaat caactgttta ttgctaaaga
aacaactctc ttttggcag caactaacat ttgttatggat cccttaatat acatattctt
atgtaaaaaa ttacagaaaa agtacccatg tatgcaaggg agaaagacca cagcatcaag
ccaagaaaaat catagcagtc agacagacaa cataaccttta ggctga

Human P2RY14

Accession Number: NM_014879

gatcaattca acctccacac agcctccaga tgaatcctgc tctcagaacc tcctgatcac
tcagcagatc attcctgtgc tgtactgtat ggttcttgcatt gcaggaatcc tactcaatgg
agtgtcagga tggatattct tttacgtgcc cagctctaag agttcatca tctatctcaa
gaacattgtt attgctgact ttgtgatgag cctgacttt ccttcaaga tccttgggtga
ctcaggcctt ggtccctggc agctgaacgt gtttgggtgc agggctctg ccgtgctctt
ctacgtcaac atgtacgtca gcattgtgtt ctttgggctc atcagcttg acagatatta
taaaaattgtt aaggctctt ggacttctt catccagtcgtca gtgagttaca gcaaacttct
gtcagtgata gtatggatgc tcatgctctt ctttgggtttt ccaaatttta ttctcaccaa
ccagagtgtt agggaggtt cacaataaa atgtatagaa ctgaaaagtg aactgggacg
gaagtggcac aaagcatcaa actacatctt cgtggccatc ttctggattt tgtttcttt
gttaatcggtt ttctatactg ctatcacaaa gaaaatctt aagtcccacc ttaagtcaag
tcggaattcc acttcggtca aaaagaatc tagccgcaac atattcagca tcgtgttgt
gtttttgtc tttttgtac cttaccatat tgccagaatc ccctacacaa agagtcagac
cgaagctcat tacagctgcc agtcaaaaga aatcttgcgg tataatgaaag aattcactct
gctactatct gctgcaaatg tatgcttggc ccctattatt tatttcttgc tatgccagcc
gttttagggaa atcttatgtt agaaattgca cattccatataa aagctcaga atgacctaga
catttccaga atcaaaaagag gaaatacaac acttgcgg acaagataactt tgtga

C Sequenzierungs-Ergebnisse

Nachfolgend aufgeführt sind die Ergebnisse der Sequenzierung der klonierten Expressionsvektoren pcDNA5/FRT-GOI, welche bereits mit den Referenzsequenzen, die ihrerseits aus der NCBI-Datenbank entnommen wurden, unter Verwendung der Software Clustal Omega, verglichen wurden. Wie bereits erwähnt wurde jedes Plasmid einmal von der T7 priming site und einmal von der BGH_{rev} priming site sequenziert. Das Programm Reverse Complement wurde verwendet um die Sequenz, welche vom BGH_{rev}-Ende aus erhalten wurde, in die reverse, komplementäre Form, welche für den Abgleich benötigt wurde, umzuwandeln. Die Buchstaben A, C, G und T stehen für die einzelnen DNA-Basen. Sind sie großgeschrieben, so konnte die Base eindeutig bestimmt werden. Ein kleiner Buchstabe sagt aus, dass es sich wahrscheinlich um die Base handelt, die durch diesen Buchstaben abgekürzt wird, handelt. Ein „N“ gibt wiederum an, dass die Base nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Durch das „*“ wird gekennzeichnet, dass die in der Sequenzanalyse ermittelte Base mit der aus der Referenzsequenz an dieser Stelle übereinstimmt.

P2Y₁

pcDNA5/FRT-P2Y₁ T7 priming site

422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	NNNNNNNNNTNNNTAACGCTGGTACCGAGCTGGATCCACCATGACCGAG 50 -----ATGACCGAG 9 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	GTGCTGNGCCGGCTGNCACGGGACGGACGCTGCCTCCTGGCCGG 100 GTGCTGTCGGCCGGCTGCCCCAACGGGACGGACGCTGCCTCCTGGCCGG 59 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	TCGGGGTTCGTCCTGGGGAAACAGCACGGTCGCCTCCACTGCCCGTCT 150 TCGGGGTTCGTCCTGGGGAAACAGCACGGTCGCCTCCACTGCCCGTCT 109 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	CCTCGTCGTTCAAATGCNCCTTGACCAAGACGGGCTTCCAGTTTACTAC 200 CCTCGTCGTTCAAATGCGCCTTGACCAAGACGGGCTTCCAGTTTACTAC 159 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	CTGCCGGCTGTCTACATCTGGTATTCATCATCGGCTTCTGGCAACAG 250 CTGCCGGCTGTCTACATCTGGTATTCATCATCGGCTTCTGGCAACAG 209 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	CGTGGCCATCTGGATGTTCGTCTTCCACATGAAGCCCTGGAGCGGCATCT 300 CGTGGCCATCTGGATGTTCGTCTTCCACATGAAGCCCTGGAGCGGCATCT 259 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	CCGTGTACATGTTCAATTGGCTGGCCGACTTCTGTACGTGCTGACT 350 CCGTGTACATGTTCAATTGGCTGGCCGACTTCTGTACGTGCTGACT 309 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	CTGCCAGCCCTGATCTTCACTACTTCAATAAACAGACTGGATCTTCGG 400 CTGCCAGCCCTGATCTTCACTACTTCAATAAACAGACTGGATCTTCGG 359 *****
422-S1304-NBP2Y1-T7_A01.ab1 NM_002563.2	GGATGCCATGTGTAACAGCAGAGGTCATTTCATGTGAACCTCTATG 450 GGATGCCATGTGTAACAGCAGAGGTCATTTCATGTGAACCTCTATG 409 *****

pcDNA5/FRT-P2Y₁ BGVrev priming site

422-S1304-NBP2Y1-BGHrev_B01.ab NM_002563.2	----- ATGACCGAGGTGCTGTGGCCGGCTGTCCCCAACGGGACGGACGCTGCCCTT 50
422-S1304-NBP2Y1-BGHrev_B01.ab NM_002563.2	----- CCTGGCCGGTCCGGGTCGTCCCTGGGGAACAGCACGGTCGCCTCCACTG 100
422-S1304-NBP2Y1-BGHrev_B01.ab NM_002563.2	----- CCGCCGTCTCCCGTCGTTCAAATGCGCCTTGACCAAGACGGCTCCAG 150
422-S1304-NBP2Y1-BGHrev_B01.ab NM_002563.2	----- TTTTACTACCTGCCGGCTGTCTACATCTGGTATTCTACATCGGCTCCCT 200

P2Y₂

pcDNA5/FRT-P2Y₂ T7 priming site

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

NNNNNNNNNTNNNTAACGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACCATGGCAG 50

ATGGCAG 7

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

CAGACCTGGGCCCTGGAATGACACCATCAATGGCACCTGGGATGGGGAT 100
CAGACCTGGGCCCTGGAATGACACCATCAATGGCACCTGGGATGGGGAT 57

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

GAGCTGGCTACAGGTGCCGCTTCAACGAGGACTTCAAGTACGTGCTGCT 150
GAGCTGGCTACAGGTGCCGCTTCAACGAGGACTTCAAGTACGTGCTGCT 107

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

GCCTGTGTCCTACGGCGTGGTGTGCGTGCTTGGGCTGTGCTGAACGCCG 200
GCCTGTGTCCTACGGCGTGGTGTGCGTGCTTGGGCTGTGCTGAACGCCG 157

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TGGCGCTCTACATCTTGTGCCGCTCAAGACCTGGAATGCGTCCACC 250
TGGCGCTCTACATCTTGTGCCGCTCAAGACCTGGAATGCGTCCACC 207

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

ACATATATGTCACCTGGCTGTGCTGATGCACTGTATGCGGCCTCCCT 300
ACATATATGTCACCTGGCTGTGCTGATGCACTGTATGCGGCCTCCCT 257

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

GCCGCTGCTGGCTATTACTACGCCCGGGCGACCACTGGCCCTTCAGCA 350
GCCGCTGCTGGCTATTACTACGCCCGGGCGACCACTGGCCCTTCAGCA 307

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

CGGTGCTCTGCAAGCTGGTGCCTCCTTCTACACCAACCTTACTGC 400
CGGTGCTCTGCAAGCTGGTGCCTCCTTCTACACCAACCTTACTGC 357

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

AGCATCCTCTCCTCACCTGCATCAGCGTGCACCGGTGCTGGGCGTCTT 450
AGCATCCTCTCCTCACCTGCATCAGCGTGCACCGGTGCTGGGCGTCTT 407

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

ACGACCTCTGCGCTCCCTGCGCTGGGCCGGGCCGCTACGCTCGCCGG 500
ACGACCTCTGCGCTCCCTGCGCTGGGCCGGGCCGCTACGCTCGCCGG 457

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TGGCCGGGGCGCTGTGGGTGTTGGTGTGGCCTGCCAGGCCCCCTGCTC 550
TGGCCGGGGCGCTGTGGGTGTTGGTGTGGCCTGCCAGGCCCCCTGCTC 507

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TACTTTGTCAACCACAGCGCGCGGGGCCGCTAACCTGCCACGACAC 600
TACTTTGTCAACCACAGCGCGCGGGGCCGCTAACCTGCCACGACAC 557

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

CTCGGCACCCGAGCTTCTAGCCGCTCGTGGCCTACAGCTCAGTCATGC 650
CTCGGCACCCGAGCTTCTAGCCGCTCGTGGCCTACAGCTCAGTCATGC 607

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TGGGCCTGCTTCGCGGTGCCCTTGGCGTCATCCTGTGTTACGTG 700
TGGGCCTGCTTCGCGGTGCCCTTGGCGTCATCCTGTGTTACGTG 657

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

CTCATGGCTCGGCAGTCTAAAGCCAGCCTACGGGACCTCGGGCCGCT 750
CTCATGGCTCGGCAGTCTAAAGCCAGCCTACGGGACCTCGGGCCGCT 707

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

GCCTAGGGCCAAGCGCAAGTCCGTGCCACCATGCCNNNGNGCTGGCTG 800
GCCTAGGGCCAAGCGCAAGTCCGTGCCACCATGCCGTGGCTGCTGGCTG 757

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TCTTCGCCCTCTGCTCCNGCCATTCCACGTCACCCGCN----- 839
TCTTCGCCCTCTGCTCCNGCCATTCCACGTCACCCGCACCCCTACTAC 807

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1
NCBI

TCCTTCCCGTTCGCTGGACCTCAGCTGCCACACCCCTCAACGCCATCAACAT 857

422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- GGCCTACAAGGTTACCCGGCCGCTGGCAGTGCTAACAGTTGCCTGACC 907
422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- CCGTGCTCTACTTCCCTGGCTGGGAGAGGCTCGTACGCTTGCCGAGAT 957
422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- GCCAAGCCACCCACTGGCCCCAGCCCTGCCACCCGGCTGCCGCAGGCT 1007
422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- GGCCTGCGCAGATCCGACAGAACTGACATGCAGAGGATAGAAGATGTGT 1057
422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- TGGGCAGCAGTGAGGACTCTAGGCGGACAGAGTCCACGCCGGCTGGTAGC 1107
422-S1004-NBP2Y2A-T7_A01.ab1 NCBI	----- GAGAACACTAAGGACATTGGCTGTAG 1134

pcDNA5/FRT-P2Y₂ BGVrev priming site

422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- ATGGCAGCAGACCTGGGCCCTGGAATGACACCATAATGGCACCTGGGA
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- TGGGGATGAGCTGGGCTACAGGTGCCGCTAACGAGGACTTCAAGTACG 100
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- TGCTGCTGCCTGTGCCTACGGCGTGGTGTGCGTGGCTGTGCTG 150
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- AACGCCGTGGCGCTACATCTTGTGCGCCTAACGACCTGGAATGC 200
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- GTCCACCACATATATGTTCCACCTGGCTGTGCTGATGCACTGTATGCGG 250
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- NNNCGGCGGACCACTGNCCC 21 CCTCCCTGCCGCTGCTGGTCTATTACTACGCCCGCGGACACTGGCCC 300 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- TTCAGCACGGTGCTGCAAGCTGGTGCCTCCCTCTACACCAACCT 71 TTCAGCACGGTGCTGCAAGCTGGTGCCTCCCTCTACACCAACCT 350 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- TTACTGCAGCATCCTCTTCCCTACCTGCATCAGCGTGCACCGGTGTCTGG 121 TTACTGCAGCATCCTCTTCCCTACCTGCATCAGCGTGCACCGGTGTCTGG 400 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- GCGTCTTACGACCTCTGCGCTCCCTGCGCTGGGCGGGCCCGCTACGCT 171 GCGTCTTACGACCTCTGCGCTCCCTGCGCTGGGCGGGCCCGCTACGCT 450 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- CGCCGGGTGGCGGGGGCGTGGGTGTTGGTGTGCGCTGCCAGGCC 221 CGCCGGGTGGCGGGGGCGTGGGTGTTGGTGTGCGCTGCCAGGCC 500 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- CGTGCTCTACTTGTCAACCACCGAGCGCGCGGGGGCGCTAACCTGCC 271 CGTGCTCTACTTGTCAACCACCGAGCGCGCGGGGGCGCTAACCTGCC 550 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- ACGACACCTCGGCACCCGAGCTTCAAGCCGCTTCAGCCGCTACAGCTCA 321 ACGACACCTCGGCACCCGAGCTTCAAGCCGCTTCAGCCGCTACAGCTCA 600 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	----- GTCATGCTGGCCTGCTTCGCGGTGCCCTTGCCGTACCTTGCTG 371 GTCATGCTGGCCTGCTTCGCGGTGCCCTTGCCGTACCTTGCTG 650 *****

422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	TTACGTGCTCATGGCTCGGCAGCTGCTAAAGCCAGCCTACGGGACCTCGG 421 TTACGTGCTCATGGCTCGGCAGCTGCTAAAGCCAGCCTACGGGACCTCGG 700 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	GCGGCCTGCCTAGGGCCAAGCGCAAGTCCGTGCGCACCATGCCGTGGTG 471 GCGGCCTGCCTAGGGCCAAGCGCAAGTCCGTGCGCACCATGCCGTGGTG 750 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	CTGGCTGTCTCGCCCTCTGCTTCCTGCCATTCCACCGTCACCCGCAACCT 521 CTGGCTGTCTCGCCCTCTGCTTCCTGCCATTCCACCGTCACCCGCAACCT 800 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	CTACTACTCCTCCGTTGCTGGACCTCAGCTGCCACACCTCAACGCCA 571 CTACTACTCCTCCGTTGCTGGACCTCAGCTGCCACACCTCAACGCCA 850 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	TCAACATGGCCTACAAGGTTACCCGGCCGTGGCCAGTGTAAACAGTTGC 621 TCAACATGGCCTACAAGGTTACCCGGCCGTGGCCAGTGTAAACAGTTGC 900 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	CTTGACCCCGTGTCTACTTCCTGGCTGGCAGAGGCTCGTACGCTTTGC 671 CTTGACCCCGTGTCTACTTCCTGGCTGGCAGAGGCTCGTACGCTTTGC 950 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	CCGAGATGCCAAGCCACCCACTGGCCCCAGCCCTGCCACCCGGCTCGCC 721 CCGAGATGCCAAGCCACCCACTGGCCCCAGCCCTGCCACCCGGCTCGCC 1000 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01. NCBI	GCAGGGTGGGCCTGCGCAGATCCGACAGAACTGACATGCAGAGGATAGAA 771 GCAGGGTGGGCCTGCGCAGATCCGACAGAACTGACATGCAGAGGATAGAA 1050 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	GATGTGTTGGGCAGCAGTGAGGACTCTAGGCGGACAGAGTCCACGCCGGC 821 GATGTGTTGGGCAGCAGTGAGGACTCTAGGCGGACAGAGTCCACGCCGGC 1100 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01.a NCBI	TGGTAGCGAGAACACTAAGGACATTGGCTGTAGCTGAGTNNNNNNCN 871 TGGTAGCGAGAACACTAAGGACATTGGCTGTAG----- 1134 *****
422-S1004-NBP2Y2A-BGHrev_B01 NCBI	NNNNNN 876 -----

P2Y₄

pcDNA5/FRT-P2Y₄ T7 priming site

422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	NNNNNNNNNNNNNTAACGCTTGGTACCAACCATGGCCAGTACAGAGTCCCTCC 50 -----ATGGCCAGTACAGAGTCCCTCC 21 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	CTGTTGAGATCCCTAGGCCTCAGCCCAGGTCTGGCAGCAGTGAAGGTGGA 100 CTGTTGAGATCCCTAGGCCTCAGCCCAGGTCTGGCAGCAGTGAAGGTGGA 71 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	GCTGGACTGTTGGTTGATGAGGATTCAAGTTCATCCTGCTGCCTGTGA 150 GCTGGACTGTTGGTTGATGAGGATTCAAGTTCATCCTGCTGCCTGTGA 121 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	GCTATGCAGTTGTCCTTGCTGGCTGGCCTTAACGCCCAACCTA 200 GCTATGCAGTTGTCCTTGCTGGCTGGCCTTAACGCCCAACCTA 171 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TGGCTTTCATCTTCCGCCTCCGACCCCTGGGATGCAACGGCCACCTACAT 250 TGGCTTTCATCTTCCGCCTCCGACCCCTGGGATGCAACGGCCACCTACAT 221 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	GTTCCACCTGGCATTGTCAGACACCTTGTATGTGCTGCTGCCACCC 300 GTTCCACCTGGCATTGTCAGACACCTTGTATGTGCTGCTGCCACCC 271 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TCATCTACTATTATGCAGCCCACAACCAACTGGCCCTTGGCACTGAGATC 350 TCATCTACTATTATGCAGCCCACAACCAACTGGCCCTTGGCACTGAGATC 321 *****

422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TGCAAGTTCGCCGTTCTTCTATTGAAACCTCTACTGCAGTGTCCCT 400 TGCAAGTTCGCCGTTCTTCTATTGAAACCTCTACTGCAGTGTCCCT 371 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TTTCCTCACCTGCATCAGCGTGCACCGCTACCTGGGCATCTGCCACCCAC 450 TTTCCTCACCTGCATCAGCGTGCACCGCTACCTGGGCATCTGCCACCCAC 421 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TTCGGGCACTACGCTGGGCCGCCCTCGCCCTCGCAGGCCCTCTGCCTG 500 TTCGGGCACTACGCTGGGCCGCCCTCGCCCTCGCAGGCCCTCTGCCTG 471 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	GCAGTTGGTTGGTCGTAGCCGGCTGCCTCGTGCCAACCTGTTCTTGT 550 GCAGTTGGTTGGTCGTAGCCGGCTGCCTCGTGCCAACCTGTTCTTGT 521 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	CACAACCAGCAACAAAGGGACCAACCGTCTGTGCCATGACACCACCGC 600 CACAACCAGCAACAAAGGGACCAACCGTCTGTGCCATGACACCACCGC 571 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	CTGAAGAGTTGACCACTATGTGCACTTCAGCTCGCGGTATGGGCTG 650 CTGAAGAGTTGACCACTATGTGCACTTCAGCTCGCGGTATGGGCTG 621 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	CTCTTGGCGTGCCTGCCTGGTCACTCTTGTGCTATGGACTCATGGC 700 CTCTTGGCGTGCCTGCCTGGTCACTCTTGTGCTATGGACTCATGGC 671 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TCGTCGCCCTGTATCAGCCCTTGCCAGGCTCTGCACAGTCGCTTCGCC 750 TCGTCGCCCTGTATCAGCCCTTGCCAGGCTCTGCACAGTCGCTTCGCC 721 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TCCGCTCTCTCCGCACCATAGCTGTGGTGTGACTGTCTTGCTGTCTGC 800 TCCGCTCTCTCCGCACCATAGCTGTGGTGTGACTGTCTTGCTGTCTGC 771 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	TTCGTGCCTTCCACATCACCCGCACCATTTACTACCTGGCAGGCTGTT 850 TTCGTGCCTTCCACATCACCCGCACCATTTACTACCTGGCAGGCTGTT 821 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	GGAAGCTGACTGCCGAGTACTGAACATTGTCACGTGGCTATAAAGTGA 900 GGAAGCTGACTGCCGAGTACTGAACATTGTCACGTGGCTATAAAGTGA 871 *****
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	CN----- 902 CTCGGCCCTGGCAGTGCACAGCTGCCTGGATCTGTGCTACTTG 921 *
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	----- CTCACTGGGACAAATATCGACGTCAGCTCCGTAGCTGTGGTGGTGG 971
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	----- CAAGCCCCAGCCCCGCACGGCTGCCTCTCCCTGGCACTAGTGTCCCTGC 1021
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	----- CTGAGGATAGCAGCTGCAGGTGGCGGCCACCCCCCAGGACAGTAGCTGC 1071
422-S1304-NBP2Y4-T7_C01.ab1 NM_002565.3	----- TCTACTCCTAGGGCAGATAGATTGTA 1098

pcDNA5/FRT-P2Y₄ BGVrev priming site

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab NM_002565.3	----- ATGGCCAGTACAGAGTCCTCCCTGTTGAGATCCCTAGGCCTAGCCCAGG 50
422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab NM_002565.3	----- TCCTGGCAGCAGTGGAGCTGGACTGTTGGTTGATGAGGATTCA 100

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

AGTTCATCCTGCTGCCTGTGAGCTATGCAGTTGCTTGCTGGGCTTG 150

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

GCCCTTAACGCCCAACCCATGGCTCTCATCTCCGCTCCGACCCCTG 200

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

---NNCAACGCCAACNTACATGTTCCNCTGGCATTGTCAGACACCTGT 47
GGATGCAACGCCAACCTACATGTTCCACCTGGCATTGTCAGACACCTGT 250

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

ATGTGCTGTCGCTGCCACCCCTCATCTACTATTATGCAGCCCACAACCAC 97
ATGTGCTGTCGCTGCCACCCCTCATCTACTATTATGCAGCCCACAACCAC 300

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

TGGCCCTTGGCACTGAGATCTGCAAGTTCGTCGCCCTTCTTCTATTG 147
TGGCCCTTGGCACTGAGATCTGCAAGTTCGTCGCCCTTCTTCTATTG 350

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

GAACCTCTACTGCACTGTCAGTGTCTTCCACCTGCATCAGCGTGCACCGCT 197
GAACCTCTACTGCACTGTCAGTGTCTTCCACCTGCATCAGCGTGCACCGCT 400

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

ACCTGGGCATCTGCCACCCACTTCGGGCACTACGCTGGGCCGCGCCCTCGC 247
ACCTGGGCATCTGCCACCCACTTCGGGCACTACGCTGGGCCGCGCCCTCGC 450

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CTCGCAGGCCCTCTGCCTGGCAGTTGGTTGGCTGTAGCCGGCTGCCT 297
CTCGCAGGCCCTCTGCCTGGCAGTTGGTTGGCTGTAGCCGGCTGCCT 500

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CGTGCCTAACCTGTTCTTGTCACAACCAGCAACAAAGGGACCACCGTCC 347
CGTGCCTAACCTGTTCTTGTCACAACCAGCAACAAAGGGACCACCGTCC 550

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

TGTGCCATGACACCCTCGGCCTGAAGAGTTGACCACTATGTGCACTTC 397
TGTGCCATGACACCCTCGGCCTGAAGAGTTGACCACTATGTGCACTTC 600

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

AGCTCGGGCATGGGCTGCTTTGGCGTGCCTGCCTGGTCACTCT 447
AGCTCGGGCATGGGCTGCTTTGGCGTGCCTGCCTGGTCACTCT 650

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

TGTTTGCTATGGACTCATGGCTCGTCGCTGTATCAGCCCTGCCAGGCT 497
TGTTTGCTATGGACTCATGGCTCGTCGCTGTATCAGCCCTGCCAGGCT 700

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CTGCACAGTCGTCTCTGCCCTCCGCTCTCCGCACCATAGCTGTGGTG 547
CTGCACAGTCGTCTCTGCCCTCCGCTCTCCGCACCATAGCTGTGGTG 750

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CTGACTGTCTTGCTGTCTGCTTCGCTTCCACATCACCGCACCAT 597
CTGACTGTCTTGCTGTCTGCTTCGCTTCCACATCACCGCACCAT 800

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

TTACTACCTGGCCAGGCTGTTGGAAGCTGACTGCCGAGTACTGAACATTG 647
TTACTACCTGGCCAGGCTGTTGGAAGCTGACTGCCGAGTACTGAACATTG 850

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

TCAACGTGGCTATAAGTGAACCGCCCTGGCCAGTGCACAGCTGC 697
TCAACGTGGCTATAAGTGAACCGCCCTGGCCAGTGCACAGCTGC 900

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CTGGATCCTGCTACTGCTCACTGGGGACAAATATCGACGTCAGCT 747
CTGGATCCTGCTACTGCTCACTGGGGACAAATATCGACGTCAGCT 950

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CCGTCAGCTCTGTGGTGGCAAGCCCCAGCCCCGACGGCTGCCTT 797
CCGTCAGCTCTGTGGTGGCAAGCCCCAGCCCCGACGGCTGCCTT 1000

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab
NM_002565.3

CCCTGGCACTAGTGTCCCTGCCTGAGGATAGCAGCTGCAGGTGGCGGCC 847
CCCTGGCACTAGTGTCCCTGCCTGAGGATAGCAGCTGCAGGTGGCGGCC 1050

422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab NM_002565.3	ACCCCCCAGGACAGTAGCTGCTACTCCTAGGGCAGATAGATTGTAAC 897 ACCCCCCAGGACAGTAGCTGCTACTCCTAGGGCAGATAGATTGTAAC 1098 *****
422-S1304-NBP2Y4-BGHrev_D01.ab NM_002565.3	CGAGTCTNNNGNCCNNNNNN 917 -----

P2Y₆

pcDNA5/FRT-P2Y₆ T7 priming site

422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	NNNNNNNNNNNNNNNTaagCTTGGTACCGAGCTCGGaTCCACCATGGAATGGGACAAT ----- ATGGAATGGGACAAT *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	GGCACAGGCCAGGCTCTGGGCTGCCACCCACCACCTGTGTCTACCGCGAGAACTTCAAG GGCACAGGCCAGGCTCTGGGCTGCCACCCACCACCTGTGTCTACCGCGAGAACTTCAAG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	CAACTGCTGCCACCTGTGTATTGGCGGTGCTGGCGCTGCCCTGCCCTGAACATC CAACTGCTGCCACCTGTGTATTGGCGGTGCTGGCGCTGCCCTGCCCTGAACATC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	TGTGTCAATTACCCAGATCTGCACGTCCCAGGGCCCTGACCCGACGGCGTGTACACC TGTGTCAATTACCCAGATCTGCACGTCCCAGGGCCCTGACCCGACGGCGTGTACACC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	CTAAACCTGCTCTGGCTGACCTGCTATATGCCCTGCCCTGCTCATCTACAAC CTAAACCTGCTCTGGCTGACCTGCTATATGCCCTGCCCTGCTCATCTACAAC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	TATGCCCAAGGTGATCACTGGCCCTTGGCGACTTCGCTGCCCTGGTCCGCTTCC TATGCCCAAGGTGATCACTGGCCCTTGGCGACTTCGCTGCCCTGGTCCGCTTCC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	TTCTATGCCAACCTGCACGGCAGCATCCTCTTCCACCTGCATCAGCTCCAGCGCTAC TTCTATGCCAACCTGCACGGCAGCATCCTCTTCCACCTGCATCAGCTCCAGCGCTAC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab NM_176798	CTGGGCATGCCACCCGCTGGCCCCCTGGCACAAACGTGGGGCCGCCGGCTGCCCTGG CTGGGCATGCCACCCGCTGGCCCCCTGGCACAAACGTGGGGCCGCCGGCTGCCCTGG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	CTAGTGTGTAGCCGTGTGGCTGGCGTGACAACCCAGTGGCTGCCACAGCCATCTTC CTAGTGTGTAGCCGTGTGGCTGGCGTGACAACCCAGTGGCTGCCACAGCCATCTTC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	GCTGCCACAGGCATCCAGCGTAACCGCACTGTCTGCTATGACCTCAGCCCCGCTGCCCTG GCTGCCACAGGCATCCAGCGTAACCGCACTGTCTGCTATGACCTCAGCCCCGCTGCCCTG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	GCCACCCACTATATGCCCTATGGCATGGCTCACTGTCATGGCTTCCCTGCTGCCCTT GCCACCCACTATATGCCCTATGGCATGGCTCACTGTCATGGCTTCCCTGCTGCCCTT *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	GCTGCCCTGCTGCCCTGCTACTGTCTCCTGCCCTGCCCTGTGCCGCCAGGATGGCCCG GCTGCCCTGCTGCCCTGCTACTGTCTCCTGCCCTGCCCTGTGCCGCCAGGATGGCCCG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab NM_176798	GCAGAGCCTGTGGCCCAAGGAGCGGGGTGGCAAGGCAGGCCGATGGCGTGGTGGTGG GCAGAGCCTGTGGCCCAAGGAGCGGGGTGGCAAGGCAGGCCGATGGCGTGGTGGTGG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	GCTGCCTTGCATCAGCTTCTGCCCTTTCACATCACCAAGACAGCCTACCTGGCAGTG GCTGCCTTGCATCAGCTTCTGCCCTTTCACATCACCAAGACAGCCTACCTGGCAGTG *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	CGCTCGACGCCNGGCGTNNN----- CGCTCGACGCCNGGCGTCCCTGCACTGTATTGGAGGCCTTGCAGCGGCCACAAAGGC *****
422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 NM_176798	----- ACGCGGCCGTTGCCAGTGCAACAGCGTGTGGACCCATCCTCTACTTCACCCAG

422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 -----
NM_176798 AAGAAGTTCCGCCGGCGACCACATGAGCTCCTACAGAAACTCACAGCCAAATGGCAGAGG

422-S857-NBP2Y6-T7_C01.ab1 -----
NM_176798 CAGGGTCGCTGA

pcDNA5/FRT-P2Y₆ BGVrev priming site

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.abl -----
NM_176798 ATGGAATGGGACAATGGCACAGGCCAGGCTCTGGGCTTGCCACCCACCACCTGTGTCTAC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.abl -----
NM_176798 CGCGAGAACCTCAAGCAACTGCTGCTGCCACCTGTGTATTCGGCGGTGCTGGCGGCTGGC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 -----
NM 176798 CTGCCGCTGAACATCTGTGTCAATTACCCAGATCTGACAGTCCCAGGGCCCTGACCCGC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 -----NNGTNNNNCNAAC-CTTGCTCTGGNTGNNNGCTATATgCNNGCTCCNNGCC
NM_176798 ACGGCCGTGTACACCTAAACCTTGCTCTGGCTGACCTGCTATATGCCTGCTCCCTGCCC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 CTGNTCCGCTTCTNTCTATGCCAACNTGCACGGCAGCaTCTcTTCCCTCACcTGCaTC
NM_176798 CTGGTCCGCTTCTCTTCTATGCCAACCTGCACTGGCAGCATCCTCTTCCCTCACCTGCACTC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1
NM_176798 AGCTTCCAGCGCTACCTGGGCATCTGCCACCCGCTGGCCCCCTGGCACAAACGTGGGGGC
AGCTTCCAGCGCTACCTGGGCATCTGCCACCCGCTGGCCCCCTGGCACAAACGTGGGGGC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 CGCCGGGCTGCCTGGCTAGTGTGTAGCCGTGGCTGGCGTGACAACCCAGTGCCTG
NM_176798 CGCCGGGCTGCCTGGCTAGTGTGTAGCCGTGGCTGGCGTGACAACCCAGTGCCTG

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 CCCACAGCCATCTCGCTGCCACAGGCATCCAGCGTAACCCACTGTCTGCTATGACCTC
NM_176798 CCCACAGCCATCTCGCTGCCACAGGCATCCAGCGTAACCCACTGTCTGCTATGACCTC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 AGCCCCGCTGCCCTGGCCACCCACTATATGCCCTATGGCATGGCTCTCAGTCATGGC
NM_176798 AGCCCCGCTGCCCTGGCCACCCACTATATGCCCTATGGCATGGCTCTCAGTCATGGC

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1
NM_176798

422-S860-NBP2Y6-BGHrev.ab1 CGCCAGGATGGCCCGCAGAGCTGTGGCCAGGAGCGGCTGGCAAGGGCGCCGCACTGG
NM_176798 CGCCAGGATGGCCCGCAGAGCTGTGGCCAGGAGCGGCTGGCAAGGGCGCCGCACTGG

422-S860-NBPY16-BGrev.apb
NM_176798
GCCGTGTTGGGGCTGCTGCCCTTGCCATCAGCTTCTGCCTTTACATCAACAGACA
GCCGTGGTGGTGGCTGCTGCCCTTGCCATCAGCTTCTGCCTTTACATCAACAGACA

422-S860-NBP216-BGhrev.ab1
NM_176798
GCCATCTGGAGCTGGCTGCCAGCGGGGGCTGCCCTGGCAGTGGAGGCCCTTGGCA
GCCTACTCTGGCAGTGGCTGCCAGCGGGGGCTGCCCTGGCAGTGGAGGCCCTTGGCA

422 3666 NB1210 Benrev.ab1
NM_176798
GGGGCTTACAAAGGGACGGGGGGCTTGGCAGGCCAACAGGCTGGGACCCCCATCTC
CGGGGCCATACAAAGGCACGGCGGCCCTTGGCCAGTGGCAACAGCGGTGCTGGACCCCCATCTC

422-S860-NBF210-BGhiev.ab1
NM_176798
TCTCTACTTACCCAGAGAAGTCTCCGGGACCCATGAGCTCTACAGAATCTACAC
TTCTACTTACCCAGAGAAGTCTCCGGGACCCATGAGCTCTACAGAATCTACAC

P2Y₁₁**pcDNA5/FRT-P2Y₁₁ T7 priming site**

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	NNNNNNNNNTNNNNNNAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAATAGTCCAGTG 50 -----
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	TGGTGGATTACCATGGCAGCCAACGCTCTGGGTGCCAAGTCCTGCCCT 100 -----ATGGCAGCCAACGCTCTGGGTGCCAAGTCCTGCCCT 36 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GCCAACCTCTGGCAGCTGCCGACGACAACACTCAGTGGGTTCCAGGGGA 150 GCCAACCTCTGGCAGCTGCCGACGACAACACTCAGTGGGTTCCAGGGGA 86 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CTTCTGTGGCCCATACTGGTGGTTGAGTCCTGGTGGCCGTGGCCAGCA 200 CTTCTGTGGCCCATACTGGTGGTTGAGTCCTGGTGGCCGTGGCCAGCA 136 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	ATGGCCTGGCCCTGTACCGCTTCAGCATCGGAAGCAGCGCCATGGCAC 250 ATGGCCTGGCCCTGTACCGCTTCAGCATCGGAAGCAGCGCCATGGCAC 186 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CCCGCCGTGGTCTCTCTGTCAGCTGGCAGTCAGCGACCTGCTTGC 300 CCCGCCGTGGTCTCTCTGTCAGCTGGCAGTCAGCGACCTGCTTGC 236 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	TCTGACGCTGCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCCAAGCAGTGGC 350 CCTGACGCTGCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCCAAGCAGTGGC 286 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GCTATGGGAGGCCGCGTGCCTGGAGCGCTTCCTTACCTGCAAC 400 GCTATGGGAGGCCGCGTGCCTGGAGCGCTTCCTTACCTGCAAC 336 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CTGCTGGCAGCGTCATCTTCATCACCTGCATCAGCTCAACCGCTACCT 450 CTGCTGGCAGCGTCATCTTCATCACCTGCATCAGCTCAACCGCTACCT 386 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GGGCATCGTGCACCCCTTCTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCAG 500 GGGCATCGTGCACCCCTTCTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCAG 436 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CCTGGGCCGTGAGCGCTGCCGGCTGGTCTGGCCGCCTGCTGGCCATG 550 CCTGGGCCGTGAGCGCTGCCGGCTGGTCTGGCCGCCTGCTGGCCATG 486 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CCCACACTCAGCTCTCCACCTGAAGAGGCCGAGCAGGGGCGGGCAA 600 CCCACACTCAGCTCTCCACCTGAAGAGGCCGAGCAGGGGCGGGCAA 536 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	CTGCAGCGTGGCCAGGCCAGGCCCTGCATCAAGTGTCTGGGACAGCAG 650 CTGCAGCGTGGCCAGGCCAGGCCCTGCATCAAGTGTCTGGGACAGCAG 586 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	ACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCNGGCGGGTT 700 ACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCNGGCGGGTT 635 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCG 750 GGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCG 685 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCGAGAACGCTGCGT 800 GGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCGAGAACGCTGCGT 735 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GTGGCAGCGTTGGTGGCAGTGGTGTGGCCCTACGCCAGCTCCTATGT 850 GTGGCAGCGTTGGTGGCAGTGGTGTGGCCCTACGCCAGCTCCTATGT 785 *****
422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4	GCCCTTACCATCATGCGGGTGNCAACGCTGGATGNTCGGCGCGCTGGN 900 GCCCTTACCATCATGCGGGTGNCAACGCTGGATGNTCGGCGCGCTGGN 835 *****

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- GCACCCGCTGCCGAGCTTGAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTG 885

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- GAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTATGCGGGCCTCATGCCCT 935

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- GGCCTCTGTGTCCACCCCTACTCTACATGGCCGAGTGCCAGCCTGG 985

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- GCTGCTGCTGCCGACACTGCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAG 1035

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- GACGCCAAGAGCACTGCCAAGCCCTGCCCTCAATGCCACAGCCGCC 1085

422-S1304-NBP2Y11-T7_E01.ab1 NM_002566.4 ----- TAAACCGTCAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA 1125

pcDNA5/FRT-P2Y₁₁ BGVrev priming site

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- ATGGCAGCCAACGTCTCGGGTGCCAAGTCCTGCCCTGCCAACTTCTGGC 50

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- AGCTGCCGACGACAAACTCAGTGGTTCCAGGGGACTTCCTGTGCCCA 100

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- TACTGGTGGTGAGTTCTGGTGGCGTGGCCAGCAATGCCCTGGCCCTG 150

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- TACCGCTTCAGCATCCGGAAGCAGCGCCATGGCACCCGCCGTGGTCTT 200

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- CTCTGTCCAGCTGGCAGTCAGCAGCTGCTCTGCGCCCTGACGCTGCC 250

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- CGCTGGCCNCCTACCTCTNTCCCCCCCAGCACNGGCCTATGGGAGGC 63
CGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCC-AAGCACTGGCCTATGGGAGGC 299

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- CGCGTGCCGCTGGAGCGCTTCCTCTCACNTGCAACNTGCTGGCAGCG 113
CGCGTGCCGCTGGAGCGCTTCCTCTCACNTGCAACNTGCTGGCAGCG 349

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- TCATCTTCATCACCTGCATCAGCCTCAACCGCTACCTGGGATCGTGCAC 163
TCATCTTCATCACCTGCATCAGCCTCAACCGCTACCTGGGATCGTGCAC 399

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- CCCTTCTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCACGCCCTGGCCGTGAG 213
CCCTTCTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCACGCCCTGGCCGTGAG 449

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- CGCTGCCGGCTGGTCCTGGCCGCCCTGCTGGCCATGCCACACTCAGCT 263
CGCTGCCGGCTGGTCCTGGCCGCCCTGCTGGCCATGCCACACTCAGCT 499

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- TCTCCCACCTGAAGAGGCCGAGCAGGGGGGGCAACTGCGAGCTGGCC 313
TCTCCCACCTGAAGAGGCCGAGCAGGGGGGGCAACTGCGAGCTGGCC 549

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ----- AGGCCCGAGGCCCTGCATCAAGTGTCTGGGACAGCAGACCAACGGGCTGGC 363
AGGCCCGAGGCCCTGCATCAAGTGTCTGGGACAGCAGACCAACGGGCTGGC 599

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 GGCCTACAGAGCGTATAAGCTGGTCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGC 413
GCGCTACAGAGCGTATAAGCTGGTCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGC 649

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 CGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCCTCGGGCGGGCGTGC 463
CGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCCTCGGGCGGGCGTGC 699

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 CGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGG 513
CGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGG 749

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 GGCCAGTGGTGTGGCCCTACGCCAGCTCTATGTGCCCTACCACATCA 563
GGCCAGTGGTGTGGCCCTACGCCAGCTCTATGTGCCCTACCACATCA 799

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 TGCGGGTGTCAACGTGGATGCTCGGCGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCG 613
TGCGGGTGTCAACGTGGATGCTCGGCGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCG 849

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 AGCTTGCAAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGCCCTA 663
AGCTTGCAAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGCCCTA 899

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 CGTGGGCTACCAGGTGATGCCGGCCTCATGCCCTGGCCTCTGTGTCC 713
CGTGGGCTACCAGGTGATGCCGGCCTCATGCCCTGGCCTCTGTGTCC 949

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 ACCCTCTACTCTACATGCCCGCAGTGCCAGCCCTGGCTGCTGCCGA 763
ACCCTCTACTCTACATGCCCGCAGTGCCAGCCCTGGCTGCTGCCGA 999

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 CACTGCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCAC 813
CACTGCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCAC 1049

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 TGGCCAAGCCCTGCCCTCAATGCCACAGCCGCCCTAAACCGTCAGAGC 863
TGGCCAAGCCCTGCCCTCAATGCCACAGCCGCCCTAAACCGTCAGAGC 1099

422-S1304-NBP2Y11-BGHrev_F01.a NM_002566.4 CCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGACTCGANTNNNNNNNNNNNNNN 909
CCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA----- 1125

P2Y₁₂

pcDNA5/FRT-P2Y₁₂ T7 priming site

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 NNNNNNNNNNNTNAACTTAAGCTTGGTACCAACCATGCAAGCCGTGACA 50
-----ATGCAAGCCGTGACA 16

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 ACCTCACCTCTGCGCCTGGAACACCAGTCTGTGCACCAGAGACTACAAA 100
ACCTCACCTCTGCGCCTGGAACACCAGTCTGTGCACCAGAGACTACAAA 66

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 ATCACCCAGGTCTCTTCCCCTACTGCTCTACACTGTCCTGTTTGTGG 150
ATCACCCAGGTCTCTTCCCCTACTGCTCTACACTGTCCTGTTTGTGG 116

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 ACTTATCACAAATGGCCTGGCGATGAGGATTTCTTCAAATCCGGAGTA 200
ACTTATCACAAATGGCCTGGCGATGAGGATTTCTTCAAATCCGGAGTA 166

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 AATCAAACCTTATTATTTCTTAAGAACACAGTCATTCTGATCTCTC 250
AATCAAACCTTATTATTTCTTAAGAACACAGTCATTCTGATCTCTC 216

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1 ATGATTCTGACTTTCCATTCAAAATTCTTAGTGTGATGCCAAACTGGGAAC 300
ATGATTCTGACTTTCCATTCAAAATTCTTAGTGTGATGCCAAACTGGGAAC 266

422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	AGGACCACTGAGAACCTTGTGTCAAGTTACCTCCGTATTTTATT 350 AGGACCACTGAGAACCTTGTGTCAAGTTACCTCCGTATTTTATT 316 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	TCACAATGTATATCAGTATTCATTCCTGGGACTGATAACTATCGATCGC 400 TCACAATGTATATCAGTATTCATTCCTGGGACTGATAACTATCGATCGC 366 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	TACAGAAGACCACCAGGCCATTAAAACATCCAACCCAAAAATCTTT 450 TACAGAAGACCACCAGGCCATTAAAACATCCAACCCAAAAATCTTT 416 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	GGGGCTAAGATTCTCTGTGTCACTGGCATTTCATGTTTACTCT 500 GGGGCTAAGATTCTCTGTGTCACTGGCATTTCATGTTTACTCT 466 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	CTTGCCTAACATGATTCTGACCAACAGGCAGCCGAGAGACAAGAATGTG 550 CTTGCCTAACATGATTCTGACCAACAGGCAGCCGAGAGACAAGAATGTG 516 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	AAGAAATGCTTTCCCTAAATCAGAGTTCGGCTAGTCTGGCATGAAAT 600 AAGAAATGCTTTCCCTAAATCAGAGTTCGGCTAGTCTGGCATGAAAT 566 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	AGTAAATTACATCTGCAAGTCATTTCTGGATAATTCTTAATTGTTA 650 AGTAAATTACATCTGCAAGTCATTTCTGGATAATTCTTAATTGTTA 616 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	TTGTATGTTACACTCATTACAAAAGAACGTACCGGTACGTAAAGA 700 TTGTATGTTACACTCATTACAAAAGAACGTACCGGTACGTAAAGA 666 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	ACGAGGGGTGAGGTAAAGTCCCCAGGAAAAGNNGAACGTCAAAGTTT 750 ACGAGGGGTGAGGTAAAGTCCCCAGGAAAAGGTGAACGTCAAAGTTT 716 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	CATTATCATTGCTGTATTCTTATTGNTTGTTCCTTCCATTGGCC 800 CATTATCATTGCTGTATTCTTATTGNTTGTTCCTTCCATTGGCC 766 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	GAATTCTTACACCCTGAGCAAACCCGGANGTCNTNGACTGCACTGCT 850 GAATTCTTACACCCTGAGCAAACCCGGATGCTTGTACTGCACTGCT 816 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	GAAAANAN----- 858 GAAAATACTCTGTTCTATGTGAAAGAGAGCACTGTGGTTAACCTCCTT 866 *****
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	----- AAATGCATGCCTGGATCCGTTCATCTATTTTCTTGTCAAGTCCTTC 916
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	----- GAAATTCTTGATAAGTATGCTGAAGTGCCTTCAACATCTCTG 966
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	----- TCCAGGACAATAGGAAAAAGAACAGGATGGTGGTACCCAAATGAAGA 1016
422-S857-NBP2Y12-T7_E01.ab1 NM_176876.1	----- GACTCCAATGTAA 1029

pcDNA5/FRT-P2Y₁₂ BGVrev priming site

NM_176876.1	ATGCAAGCCGTCGACAACCTCACCTCTGCGCCTGGTAACACCAGTCTGTG 50
422-S860-NBP2Y12-BGHrev_C03.ab	-----
NM_176876.1	CACCAAGAGACTACAAATCACCCAGGTCTTCCCCTGCTCTACACTG 100
422-S860-NBP2Y12-BGHrev_C03.ab	-----

P2Y₁₃**pcDNA5/FRT-P2Y₁₃ T7 priming site**

422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	NNNNNNNNNNNTNNNTNAAGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCAG 50 -----
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	TGTGGTCCAATTCAACCATGACTGCCATAAGAAGACAGAGAGAACTGA 100 -----ATGACTGCCATAAGAAGACAGAGAGAACTGA 34 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GTATCCTCCAAAGGTGACACTGGAAGCAATGAACACCAACTGATGCAA 150 GTATCCTCCAAAGGTGACACTGGAAGCAATGAACACCAACTGATGCAA 84 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GGCTCAACAGATCTGAGCGGTGCCAGAGACACTCGGATAGTACAGCT 200 GGCTCAACAGATCTGAGCGGTGCCAGAGACACTCGGATAGTACAGCT 134 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GGTATTCCCAGCCCTCTACACAGTGGTTCTGACCGCATTGCTGA 250 GGTATTCCCAGCCCTCTACACAGTGGTTCTGACCGCATTGCTGA 184 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	ATACTTGGCTCTGTGGGTGTTGTTCACATCCCCAGCTCCACCTTC 300 ATACTTGGCTCTGTGGGTGTTGTTCACATCCCCAGCTCCACCTTC 234 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	ATCATCTACCTCAAAAACACTTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCAT 350 ATCATCTACCTCAAAAACACTTGGTGGCCGACTTGATAATGACACTCAT 284 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GCTTCCTTCAAAATCCTCTGACTCACACCTGGCACCCCTGGCAGCTCA 400 GCTTCCTTCAAAATCCTCTGACTCACACCTGGCACCCCTGGCAGCTCA 334 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	NAGCTTTGTGTGCGTTCTCGGTGATATTATGAGACCATGTAT 450 GAGCTTTGTGTGCGTTCTCGGTGATATTATGAGACCATGTAT 384 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GTGGGCATCGTGTAGGGCTCATAGCCTTGACAGATTCCCTCAAGAT 500 GTGGGCATCGTGTAGGGCTCATAGCCTTGACAGATTCCCTCAAGAT 434 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	CATCAGACCTTGAGAAATATTTCTAAAAAACCTGTTTGCAAAAA 550 CATCAGACCTTGAGAAATATTTCTAAAAAACCTGTTTGCAAAAA 484 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	CGGCTCAATCTCATCTGGTTCTTGTCTCATCTCCCTGCCAAT 600 CGGCTCAATCTCATCTGGTTCTTGTCTCATCTCCCTGCCAAT 534 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	ATGATCTTGAGCAACAAGGAAGCAACACCATCGTCTGTGAAAAAGTGTGC 650 ACGATCTTGAGCAACAAGGAAGCAACACCATCGTCTGTGAAAAAGTGTGC 584 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	TTCCTTAAAGGGCCTCTGGGCTGAAATGGCATCAAATGGTAAATAACA 700 TTCCTTAAAGGGCCTCTGGGCTGAAATGGCATCAAATGGTAAATAACA 634 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	TATGCCAGTTATTTCTGGACTGTTTATCCTAATGCTTGTGTTTAT 750 TATGCCAGTTATTTCTGGACTGTTTATCCTAATGCTTGTGTTTAT 684 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GTGGTTATTGCAAAAAAGTATATGATTCTATAGAAAGTCAAAGTAA 800 GTGGTTATTGCAAAAAAGTATATGATTCTATAGAAAGTCAAAGTAA 734 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	GGACAGAAAAACACAAAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTGTTGTCGTGG 850 GGACAGAAAAACACAAAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTGTTGTCGTGG 784 *****
422-S1304-NBP2Y13-T7_G01.ab1 NM_176894.2	CTGTCTCTTGTGTGTTGCTCCATTTCATTGCCCCATTTGCCAGAGTCCATAT 900 CTGTCTCTTGTGTGTTGCTCCATTTCATTGCCCCATTTGCCAGAGTCCATAT 834 *****

422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	AAGTATATGATCTTATAGAAAGTCCAAAAGTAAGGACAGAAAAAACAC 594 AAGTATATGATCTTATAGAAAGTCCAAAAGTAAGGACAGAAAAAACAC 750 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	AAAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTGTTGTCGTGGCTGTCTCTTG 644 AAAAGCTGGAAGGCAAAGTATTGTTGTCGTGGCTGTCTCTTG 800 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	TTTGCTCCATTCATTTGCCAGAGTCCATACTCACAGTCAAACCA 694 TTTGCTCCATTCATTTGCCAGAGTCCATACTCACAGTCAAACCA 850 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	ACAATAAGACTGACTGTAGACTGCAAAATCAACTGTTATTGCTAAAGAA 744 ACAATAAGACTGACTGTAGACTGCAAAATCAACTGTTATTGCTAAAGAA 900 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	ACAACCTCTTTGGCAGCAACTAACATTGTATGGATCCCTTAATATA 794 ACAACCTCTTTGGCAGCAACTAACATTGTATGGATCCCTTAATATA 950 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	CATATTCTTATGAAAAATTACACAGAAAAGCTACCATGTATGCAAGGGA 844 CATATTCTTATGAAAAATTACACAGAAAAGCTACCATGTATGCAAGGGA 1000 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	GAAAGACCACAGCATCAAGCCAAGAAAATCATAGCAGTCAGACAGACAAC 894 GAAAGACCACAGCATCAAGCCAAGAAAATCATAGCAGTCAGACAGACAAC 1050 *****
422-S1304-NBP2Y13-BGHrev_H01.a NM_176894.2	ATAACCTTAGGCTGACTCGAGTNNNNNNNNNNNNNNN 930 ATAACCTTAGGCTGA----- 1065 *****

P2Y₁₄

pcDNA5/FRT-P2Y₁₄ T7 priming site

422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	NNNNNNNGTNNNTAACGTTGGTACCGAGCTGGATCCACCATGATCAAT 50 -----ATGATCAAT 9 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	TCAACCTCCACACAGCCTCCAGATGAATCTGCTCTCAGAACCTCCTGAT 100 TCAACCTCCACACAGCCTCCAGATGAATCTGCTCTCAGAACCTCCTGAT 59 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	CACTCAGCAGATCATTCTGTCGTGACTGTATGGTCTCATTCAGGAA 150 CACTCAGCAGATCATTCTGTCGTGACTGTATGGTCTCATTCAGGAA 109 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	TCCTACTCAATGGAGTGTCAAGGATGGATATTCTTTACGTGCCAGCTCT 200 TCCTACTCAATGGAGTGTCAAGGATGGATATTCTTTACGTGCCAGCTCT 159 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	AAGAGTTTCATCATCTATCTCAAGAACATTGTTATTGCTGACTTGTAT 250 AAGAGTTTCATCATCTATCTCAAGAACATTGTTATTGCTGACTTGTAT 209 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	GAGCCTGACTTCCCTTCAAGATCCTGGTACTCAGGCCTGGTCCCT 300 GAGCCTGACTTCCCTTCAAGATCCTGGTACTCAGGCCTGGTCCCT 259 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	GGCAGCTGAACGTGTTGTCAGGCTCTGCGCTGCTTCTACGTC 350 GGCAGCTGAACGTGTTGTCAGGCTCTGCGCTGCTTCTACGTC 309 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	AACATGTACGTACGATTGTTCTTGGGCTCATCAGCTTGACAGATA 400 AACATGTACGTACGATTGTTCTTGGGCTCATCAGCTTGACAGATA 359 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	TTATAAAATTGTAAGCCTCTTGACTCTTCATCCAGTCAGTGAGTT 450 TTATAAAATTGTAAGCCTCTTGACTCTTCATCCAGTCAGTGAGTT 409 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	ACAGCAAACCTCTGTCAGTGATAGTATGGATGCTCATGCTCCTTGCT 500 ACAGCAAACCTCTGTCAGTGATAGTATGGATGCTCATGCTCCTTGCT 459 *****

422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	GTTCCAAATATTCTCACCAACCAGAGTGTAGGGAGGTTACACAAAT 550 GTTCCAAATATTCTCACCAACCAGAGTGTAGGGAGGTTACACAAAT 509 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	AAAATGTATAGAAGTGAACGGACGGAAGTGGCACAAAGCAT 600 AAAATGTATAGAAGTGAACGGACGGAAGTGGCACAAAGCAT 559 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	CAAACATCTCGTGGCCATCTTCTGGATTGTGTTCTTTGTTAATC 650 CAAACATCTCGTGGCCATCTTCTGGATTGTGTTCTTTGTTAATC 609 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	GTTTCTATACTGCTATCACAAAGAAAATCTTAAGTCCCACCTTAAGTC 700 GTTTCTATACTGCTATCACAAAGAAAATCTTAAGTCCCACCTTAAGTC 659 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	AAGTCGGAATTCCACTTCGGTCAAAAAGAAATCTAGCCGAAACATATTCA 750 AAGTCGGAATTCCACTTCGGTCAAAAAGAAATCTAGCCGAAACATATTCA 709 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	GCATCGTGTGTTGTGTTTGTCTGTTGTACCTTACCATATTGCCAGA 800 GCATCGTGTGTTGTGTTTGTCTGTTGTACCTTACCATATTGCCAGA 759 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	ATCCCCCTACACAAAGAGTCAGACCGAAGGCTCATTACAGCTGCCAGTC 850 ATCCCCCTACACAAAGAGTCAGACCGAAGGCTCATTACAGCTGCCAGTC 809 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	AGAAATCTTGCCTGTTATGAAAGAAATTCACTGCTACTATCTGCTGCAA 881 AGAAATCTTGCCTGTTATGAAAGAAATTCACTGCTACTATCTGCTGCAA 859 *****
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	----- ATGTATGCTGGACCCTATTATTTATGCTTCTATGCCAGCCGTTAGG 909
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	----- GAAATCTTATGTAAGAAATTGCACATTCCATTAAAGCTCAGAATGACCT 959
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	----- AGACATTTCCAGAACATCAAAGAGGAAATACAACACTTGAAAGCACAGATA 1009
422-S1304-NBP2Y14-T7_A02.ab1 NM_014879.3	----- CTTTGTGA 1017

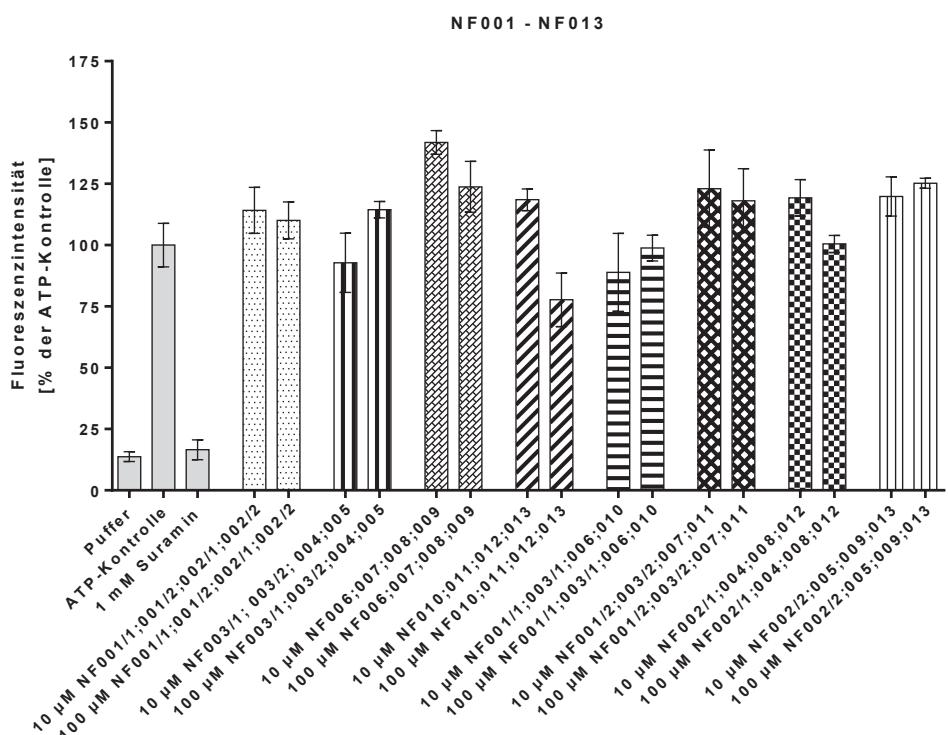
pcDNA5/FRT-P2Y₁₄ BGVrev priming site

422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	----- ATGATCAATTCAACCTCCACACAGCCTCCAGATGAATCCTGCTCTCAGAA 50
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	----- CCTCCTGATCACTCAGCAGATCATTCTGTGCTGTACTGTATGGTCTTCA 100
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	-----N 1 TTGCAGGAATCTACTCAATGGAGTGTCAAGGATGGATTCTTTACGTG 150
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	NCCAGCTCTAACAGAGTTCATCATCTATCTCAAGAACATTGTTATTGCTGA 51 CCCAGCTCTAACAGAGTTCATCATCTATCTCAAGAACATTGTTATTGCTGA 200 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CTTGTGATGAGCCTGACTTTCTTCAAGATCCTGGTGACTCAGGCC 101 CTTGTGATGAGCCTGACTTTCTTCAAGATCCTGGTGACTCAGGCC 250 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	TTGGTCCCTGGCAGCTGAACGTGTTGTGCAGGGTCTGCCGTGCTC 151 TTGGTCCCTGGCAGCTGAACGTGTTGTGCAGGGTCTGCCGTGCTC 300 *****

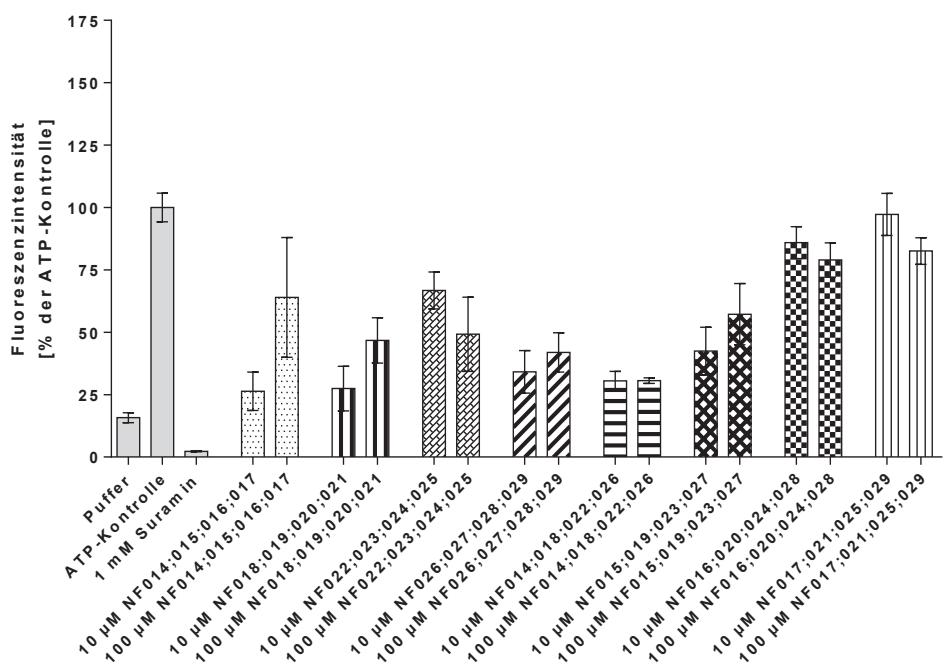
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	TTCTACGTCAACATGTACGTACGCATTGGTCTTGGCTCATCAGCTT TTCTACGTCAACATGTACGTACGCATTGGTCTTGGCTCATCAGCTT *****	201 350 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	TGACAGATATTATAAAATTGTAAAGCCTCTTGGACTCTTCATCCAGT TGACAGATATTATAAAATTGTAAAGCCTCTTGGACTCTTCATCCAGT *****	251 400 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CAGTGAGTTACAGCAAACCTCTGTCAGTGATAGTATGGATGCTCATGCTC CAGTGAGTTACAGCAAACCTCTGTCAGTGATAGTATGGATGCTCATGCTC *****	301 450 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CTCCTTGCTGTCCAATATTCTCACCAACCAGAGGTAGGGAGGT CTCCTTGCTGTCCAATATTCTCACCAACCAGAGGTAGGGAGGT *****	351 500 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	TACACAAATAAAATGTATAGAACTGAAAGTGAACGGAGCGAAGTGGC TACACAAATAAAATGTATAGAACTGAAAGTGAACGGAGCGAAGTGGC *****	401 550 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	ACAAAGCATCAAACATACATCTCGTGGCCATCTCTGGATTGTGTTCTT ACAAAGCATCAAACATACATCTCGTGGCCATCTCTGGATTGTGTTCTT *****	451 600 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	TTGTTAACGTTTCTATACTGCTATCACAAAGAAAATCTTAAGTCCC TTGTTAACGTTTCTATACTGCTATCACAAAGAAAATCTTAAGTCCC *****	501 650 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CCTTAAGTCAGCGAATTCACACTCGGTCAAAAGAAAATCTAGCCGCA CCTTAAGTCAGCGAATTCACACTCGGTCAAAAGAAAATCTAGCCGCA *****	551 700 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	ACATATTCAGCATCGTGGTTGTGTTTTGTCTGTTTGACCTTACCAT ACATATTCAGCATCGTGGTTGTGTTTTGTCTGTTTGACCTTACCAT *****	601 750 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	ATTGCCAGAACATCCCTACACAAAGAGTCAGACCGAAGCTCATTACAGCTG ATTGCCAGAACATCCCTACACAAAGAGTCAGACCGAAGCTCATTACAGCTG *****	651 800 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CCAGTCAAAAGAAATCTGCGGTATATGAAAGAATTCACTCTGCTACTAT CCAGTCAAAAGAAATCTGCGGTATATGAAAGAATTCACTCTGCTACTAT *****	701 850 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CTGCTGCAAATGTATGCTGGACCTATTATTATTCCTTCTATGCCAG CTGCTGCAAATGTATGCTGGACCTATTATTATTCCTTCTATGCCAG *****	751 900 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	CCGTTAGGGAAATCTTATGTAAGAAATTGCACATTCCATTAAAAGCTCA CCGTTAGGGAAATCTTATGTAAGAAATTGCACATTCCATTAAAAGCTCA *****	801 950 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	GAATGACCTAGACATTCCAGAATCAAAGAGGAAATAAACACTTGAAA GAATGACCTAGACATTCCAGAATCAAAGAGGAAATAAACACTTGAAA *****	851 1000 *****
422-S1304-NBP2Y14-BGHrev_B02.a NM_014879.3	GCACAGATACTTGTACTCGAGTNNNNNNNNNNNNN GCACAGATACTTGTAA----- *****	889 1017 *****

D Ergebnis kombinatorisches Screening

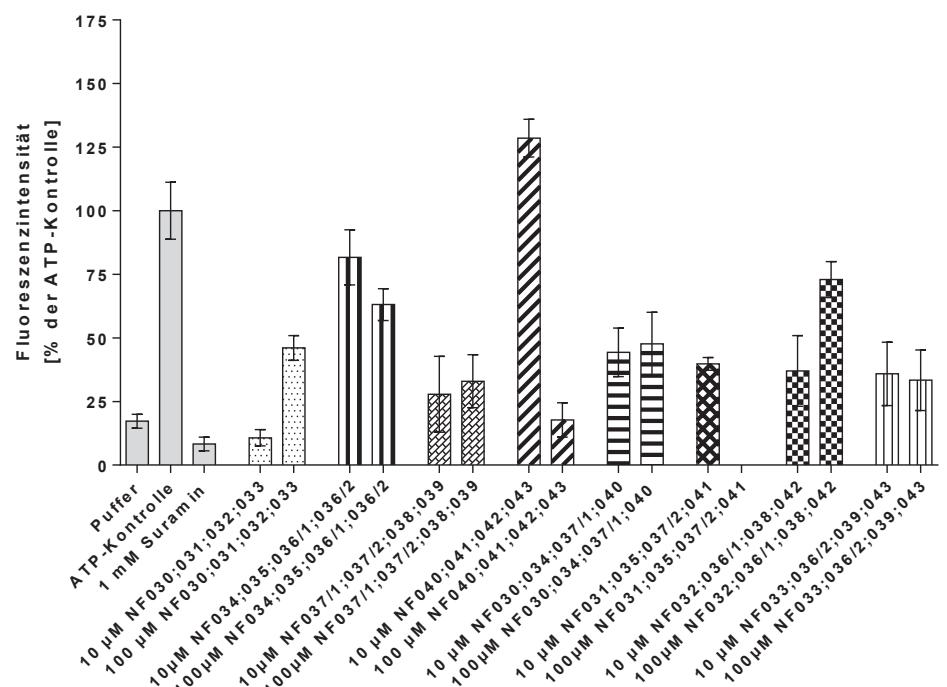
Nachfolgend sich die Resultate der einzelnen Calcium-Assays des kombinatorischen Screenings gezeigt. Fehlende Balken in den Balkendiagrammen, vorwiegend für Kombinationslösungen in der Konzentration von 100 μ M, sind darauf zurückzuführen, dass negative Fluoreszenzwerte bestimmt wurden, welche in den Diagrammen nicht dargestellt werden konnten. Fluoreszenzintensitäten > 100% der ATP-Kontrolle sind auf mögliche agnostische Effekte der NF-Substanzen am P2Y₂-Rezeptor zurückzuführen. Beispielsweise wurde mit NF546 bereits ein potenter, selektiver P2Y₁₁-Rezeptoragonist in der Literatur beschrieben (87).

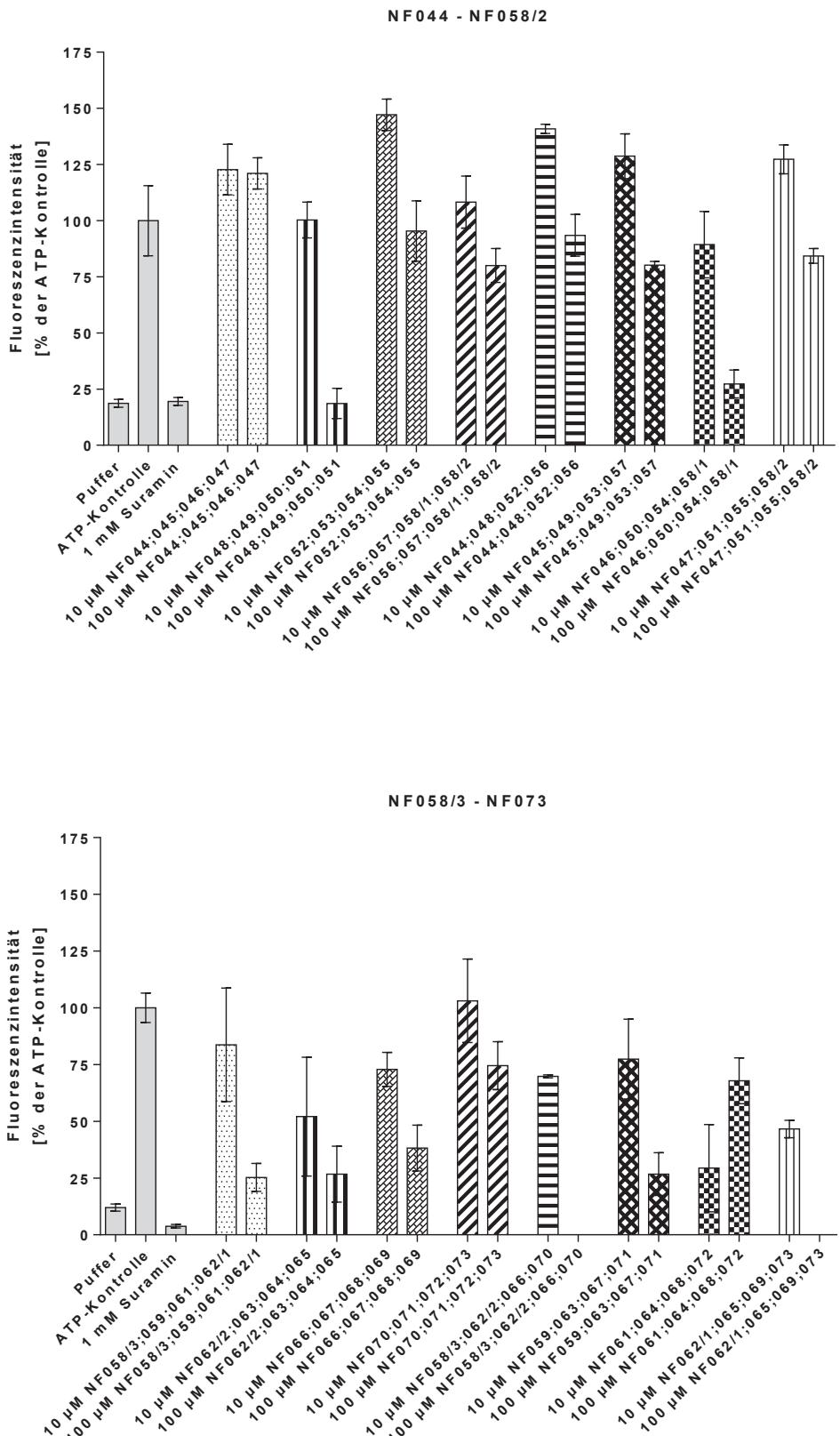


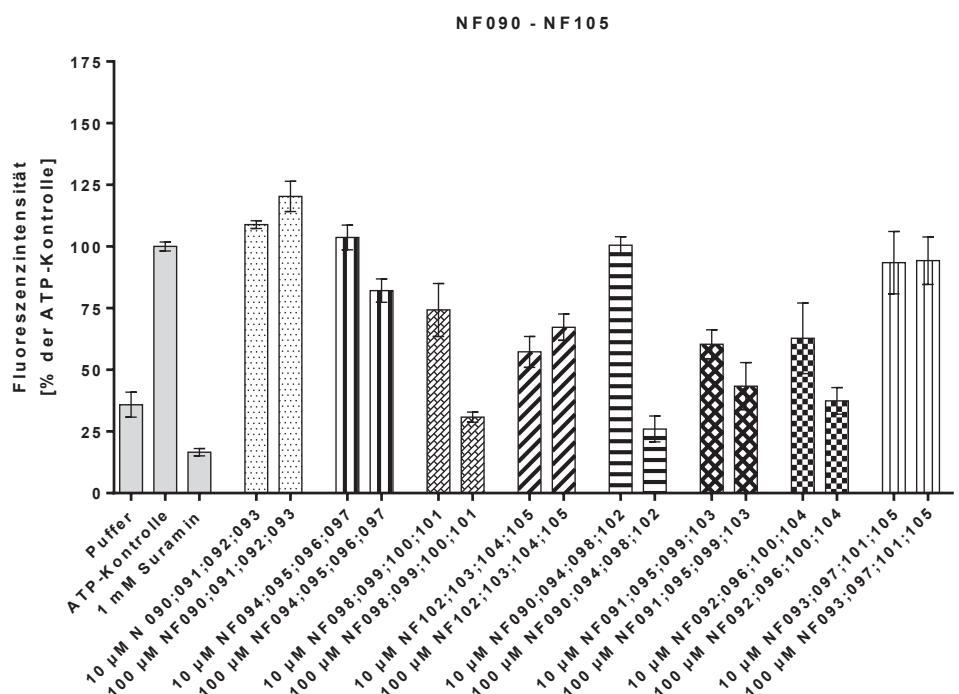
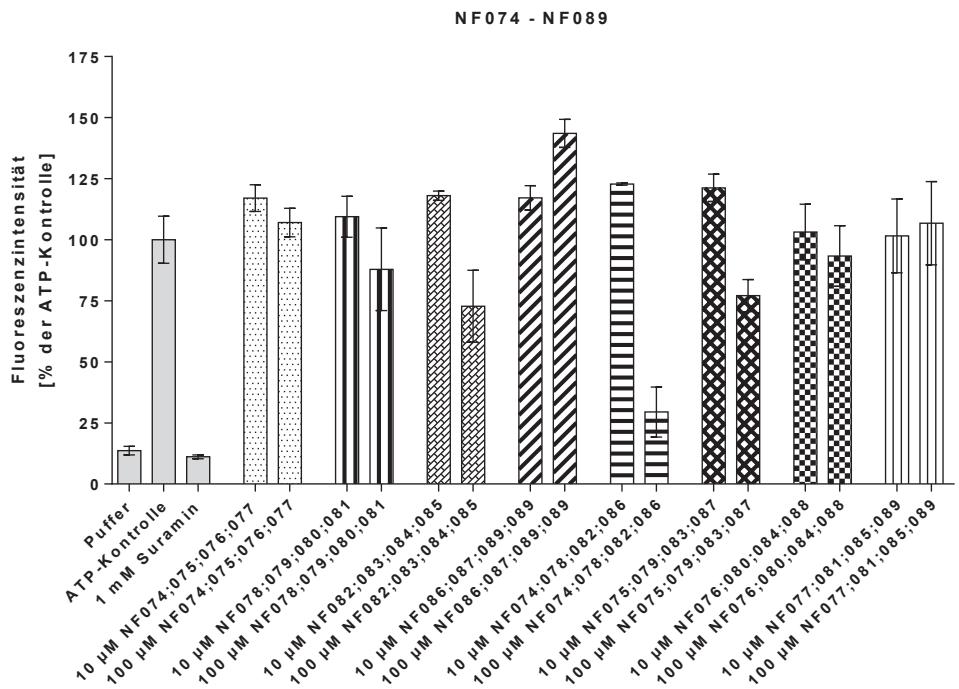
NF014 - NF029

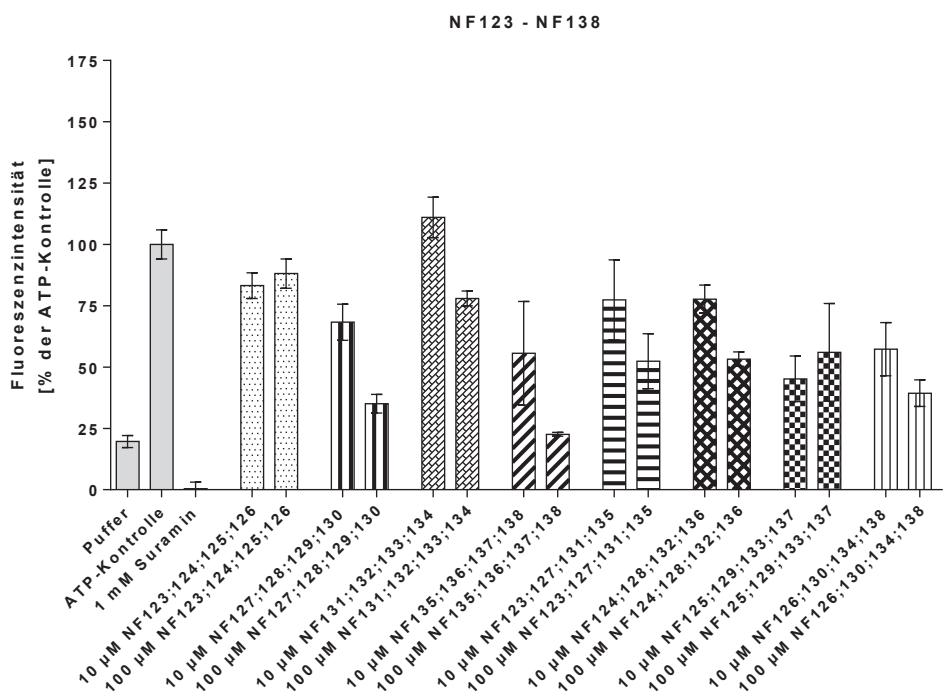
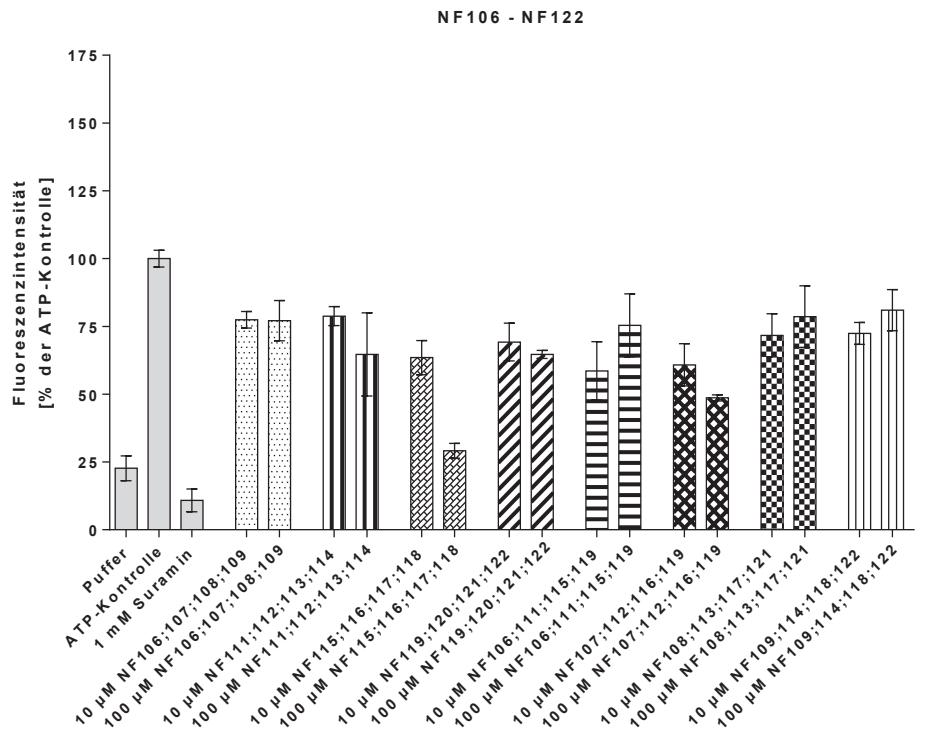


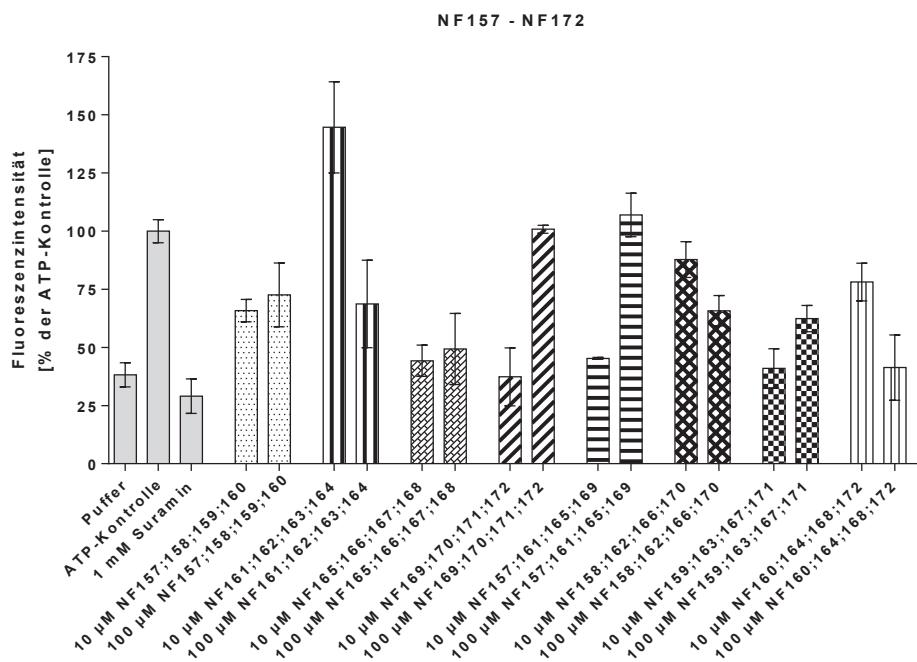
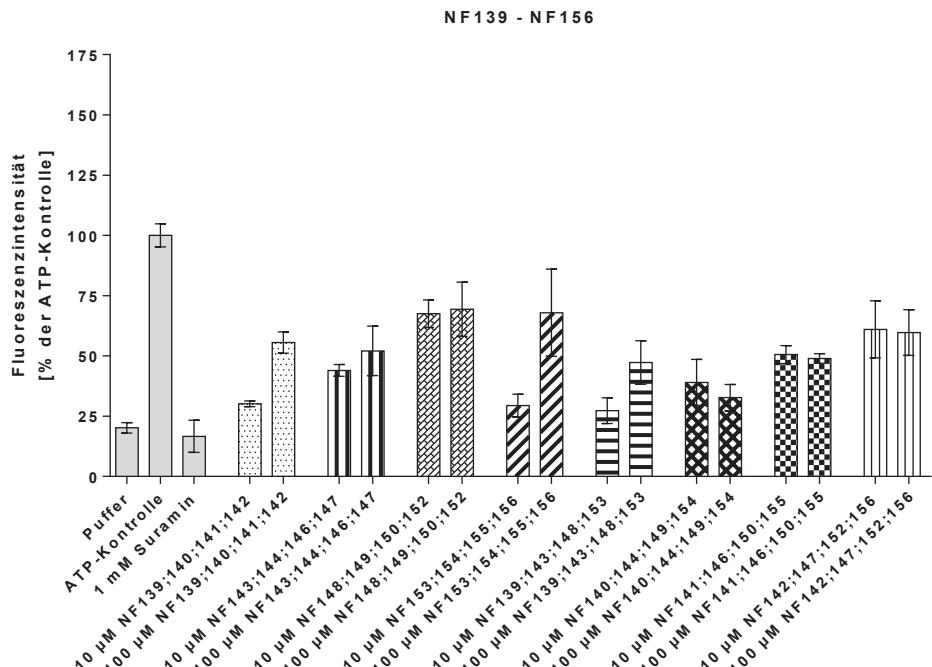
NF030 - NF043



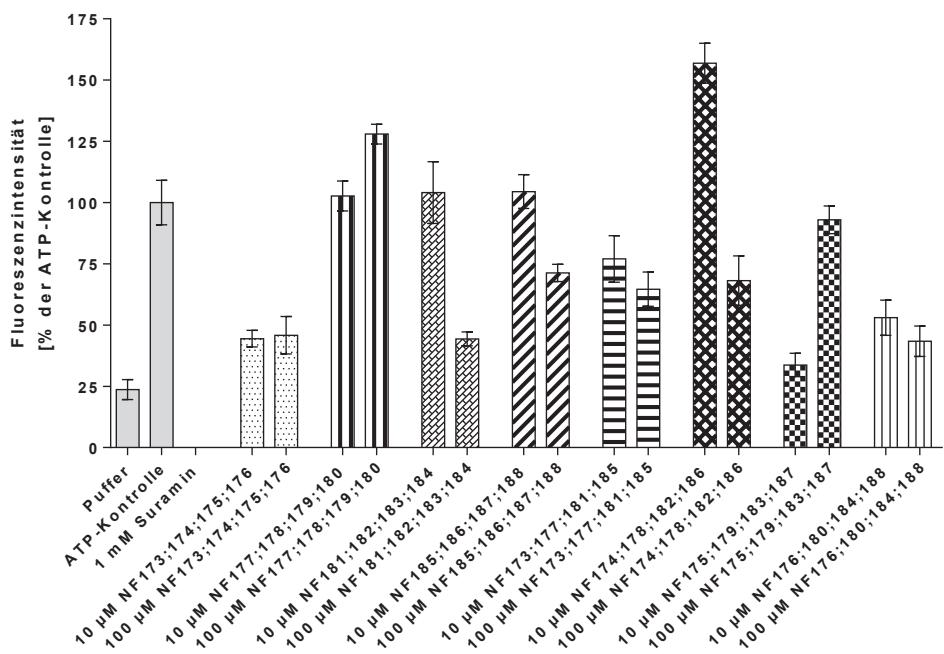




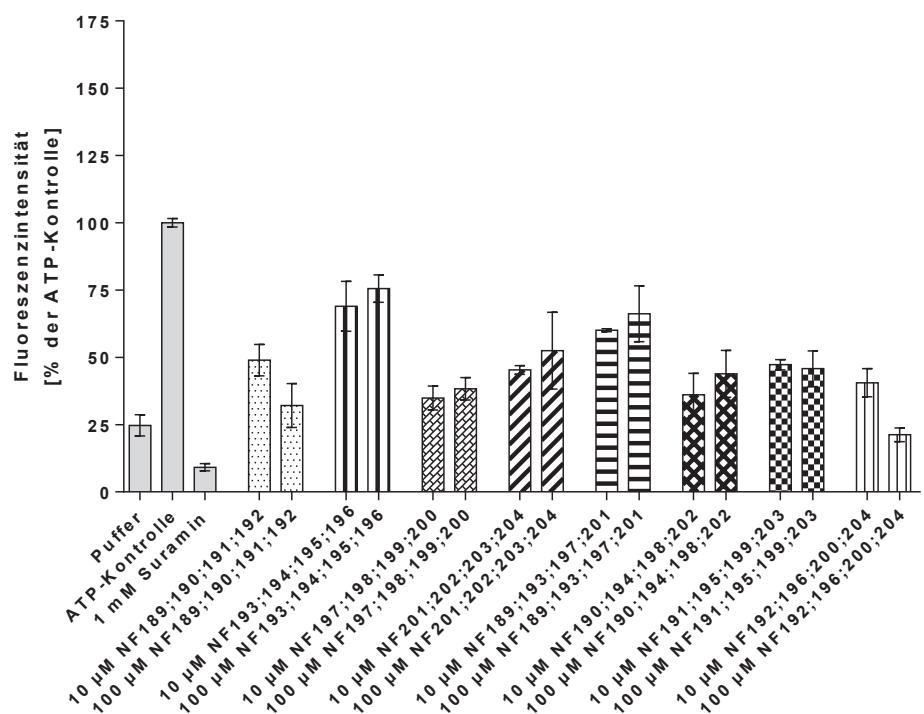


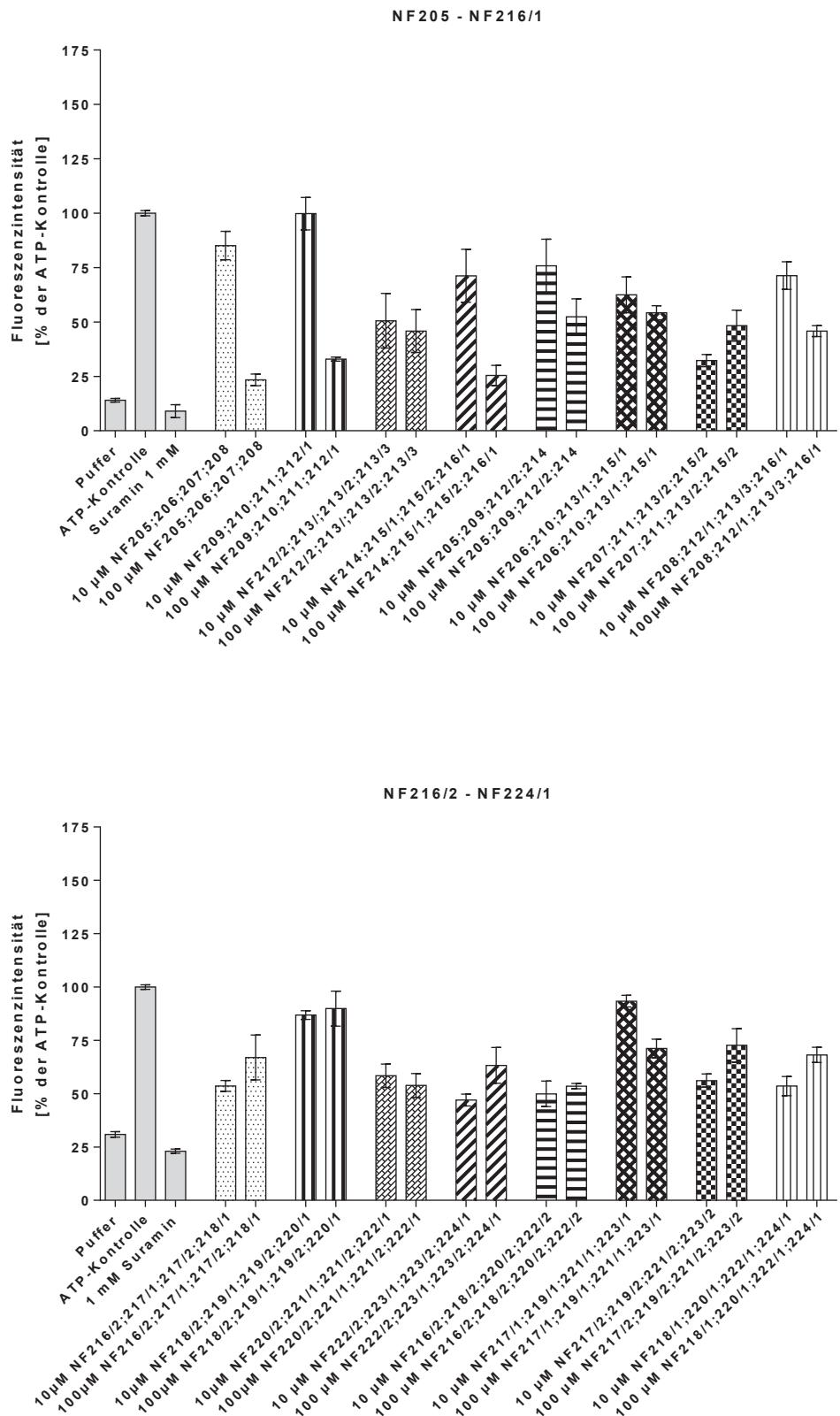


NF173 - NF188

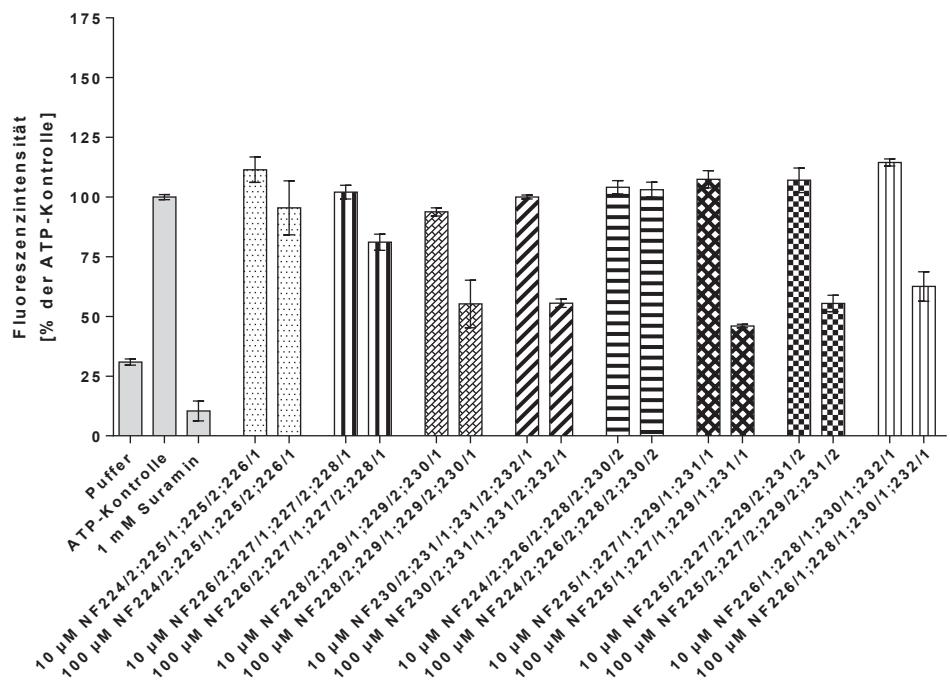


NF189 - NF204

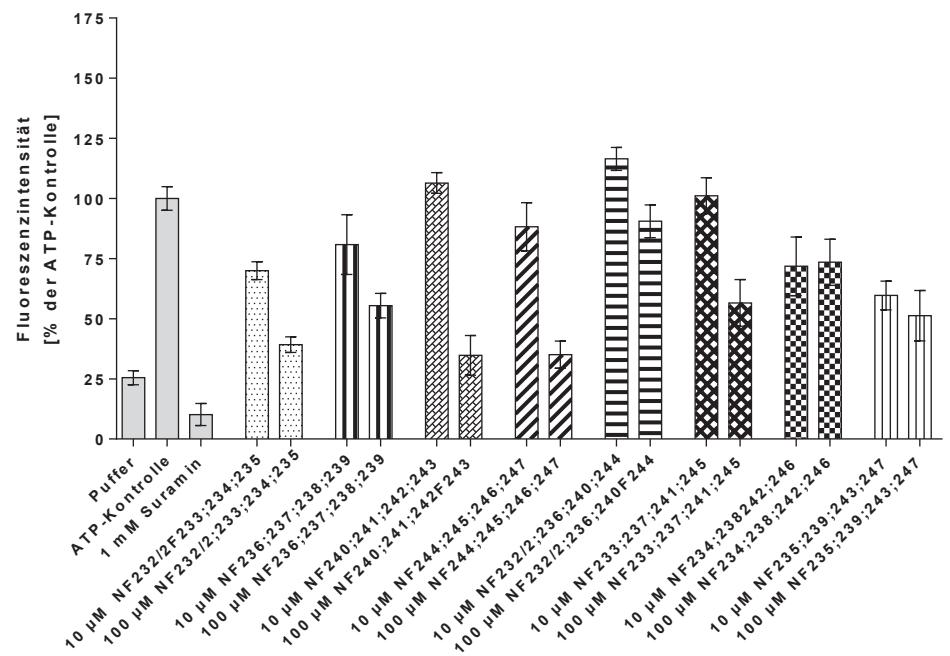




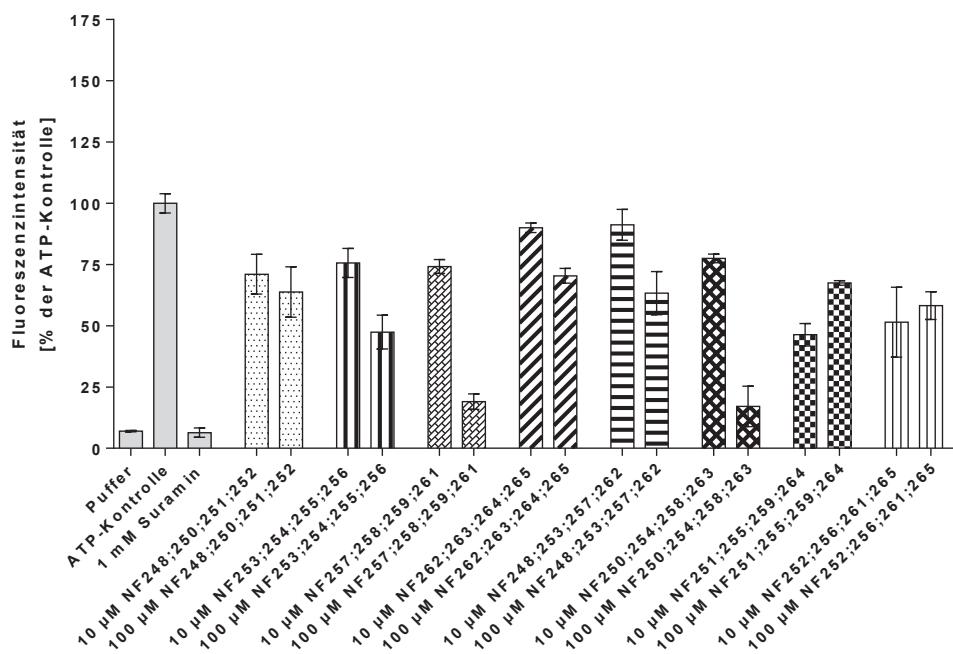
NF 224/2 - NF 232/1



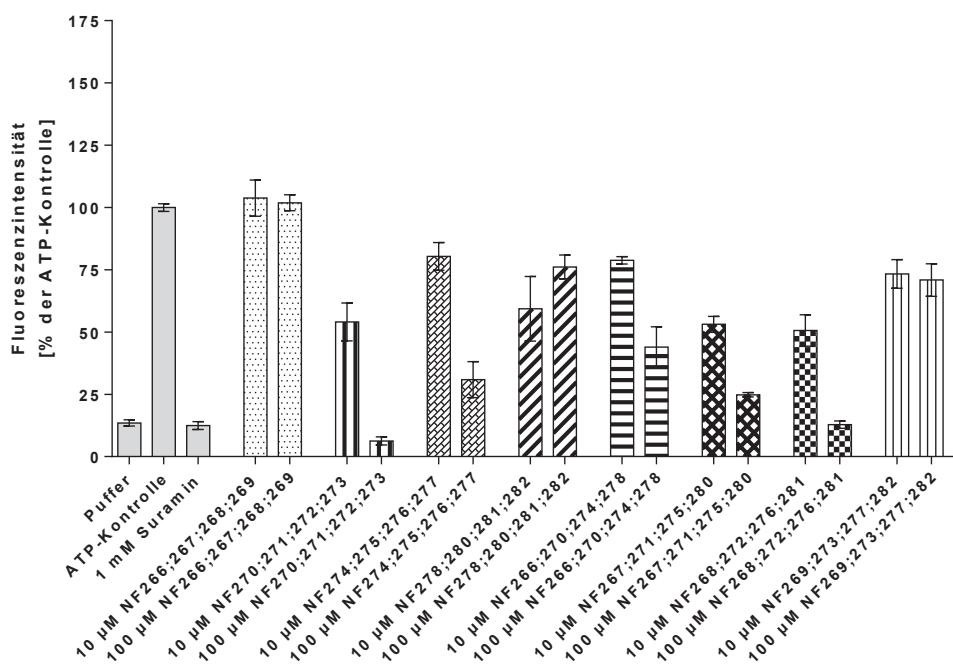
NF 232/2 - NF 247



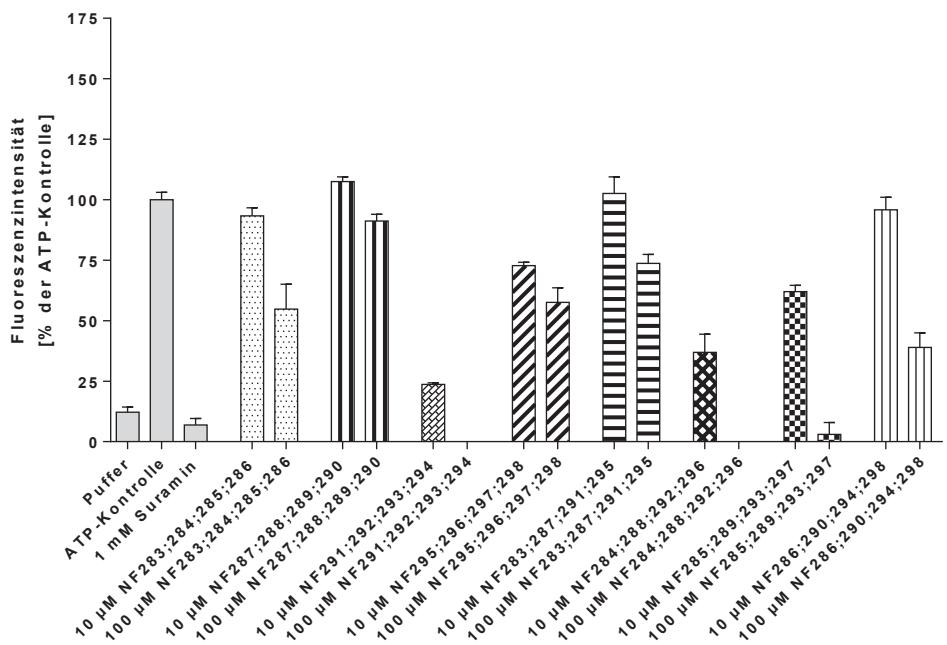
NF248 - NF265



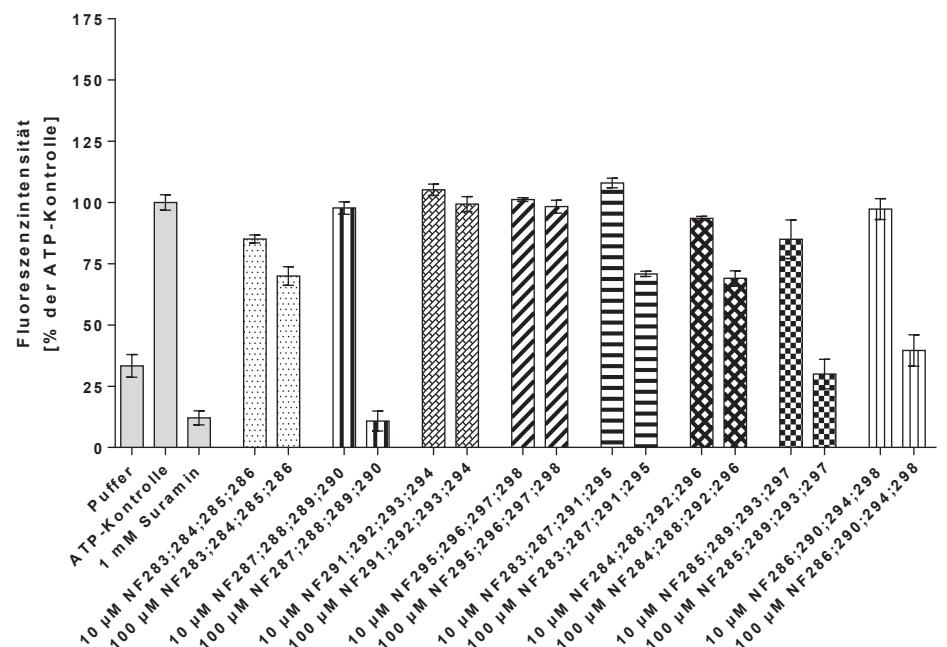
NF266 - NF282

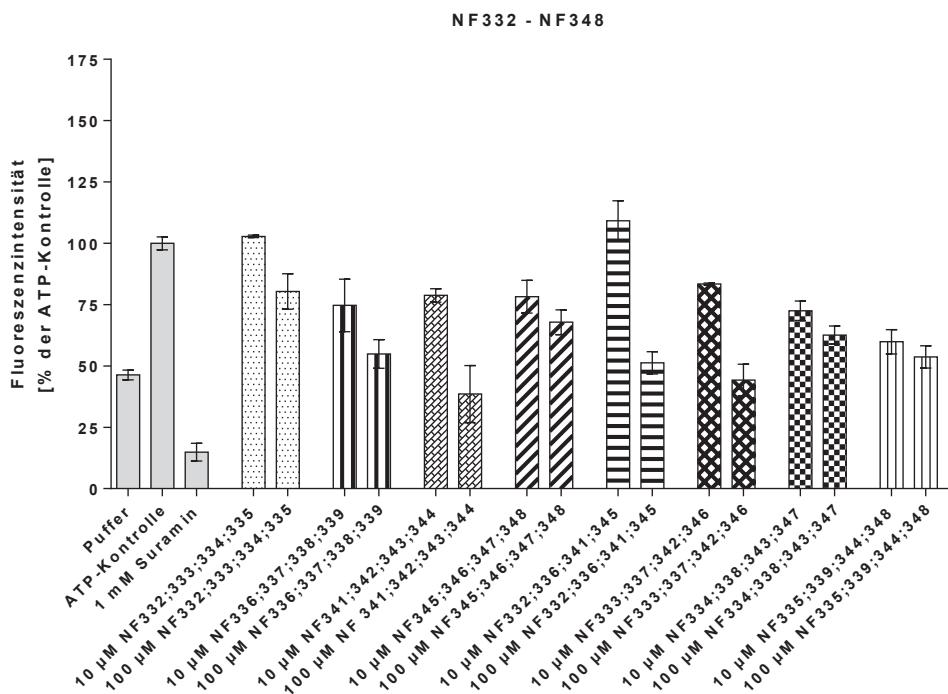
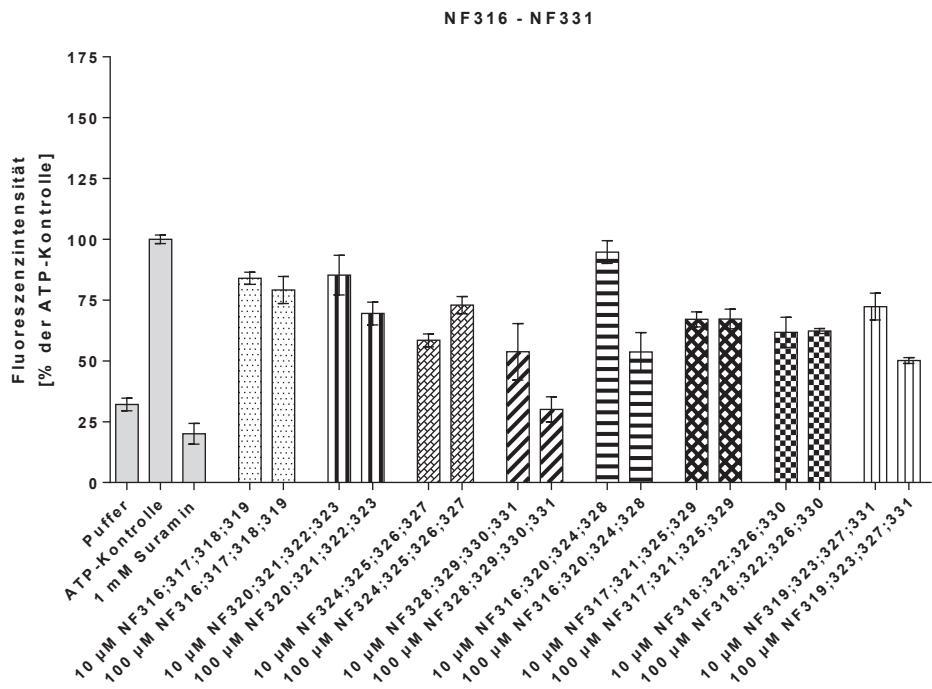


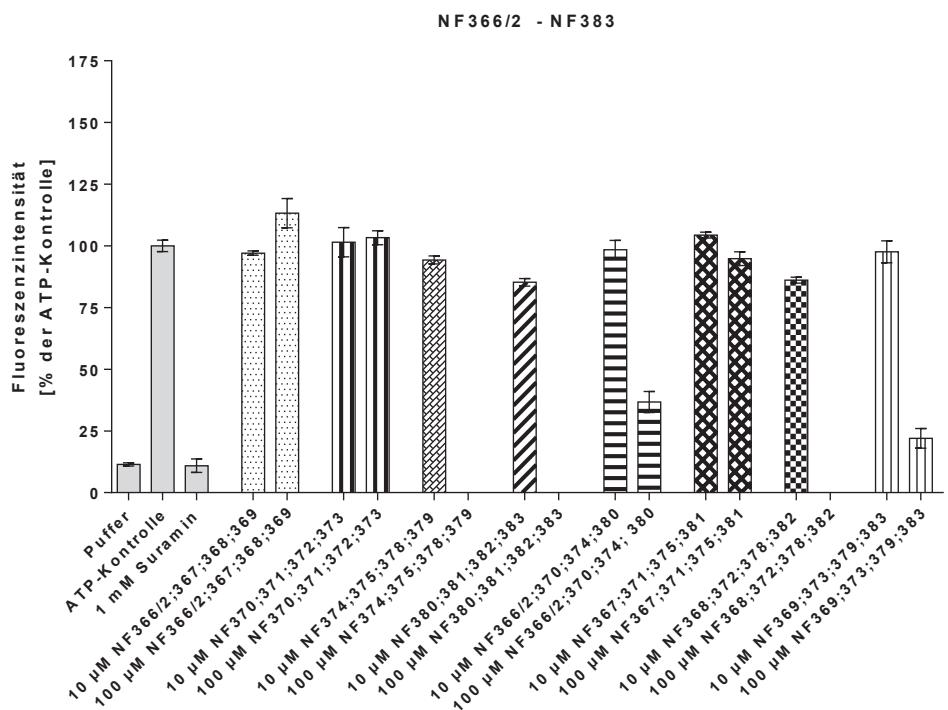
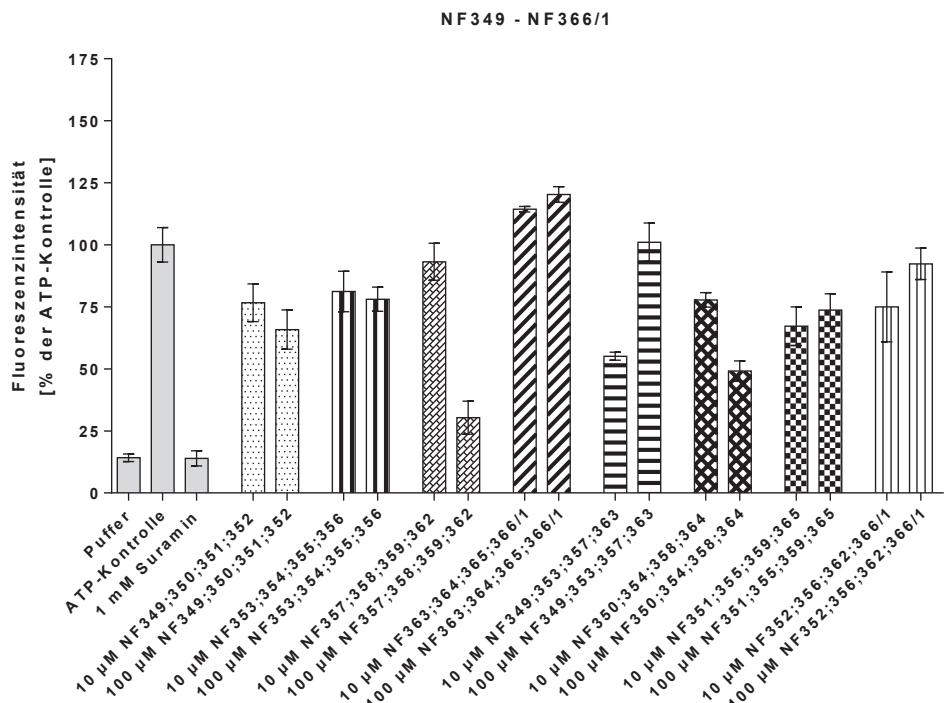
NF 283 - NF 298



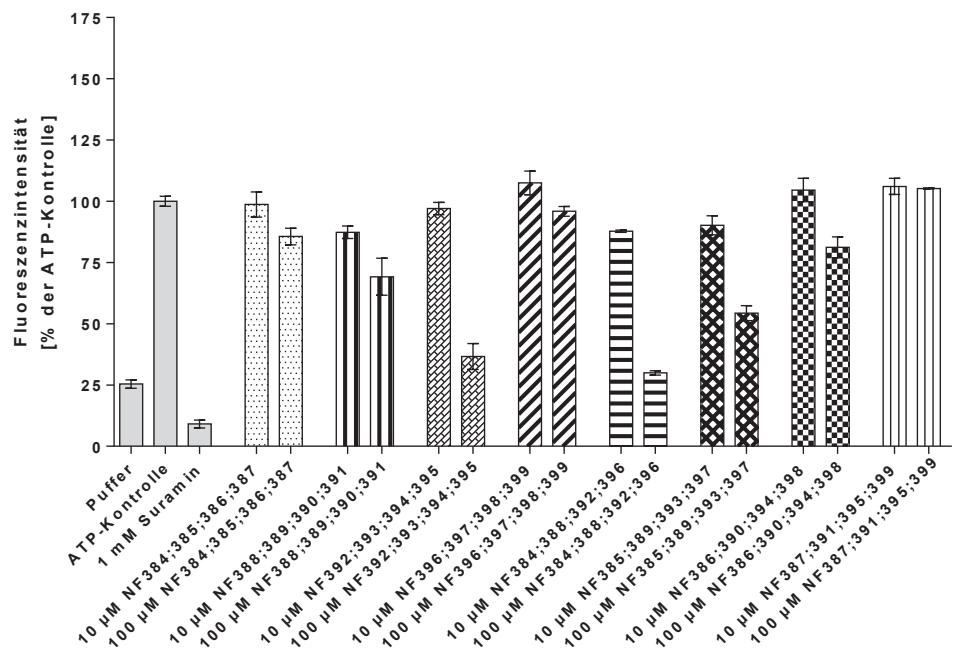
NF 299 - NF 315



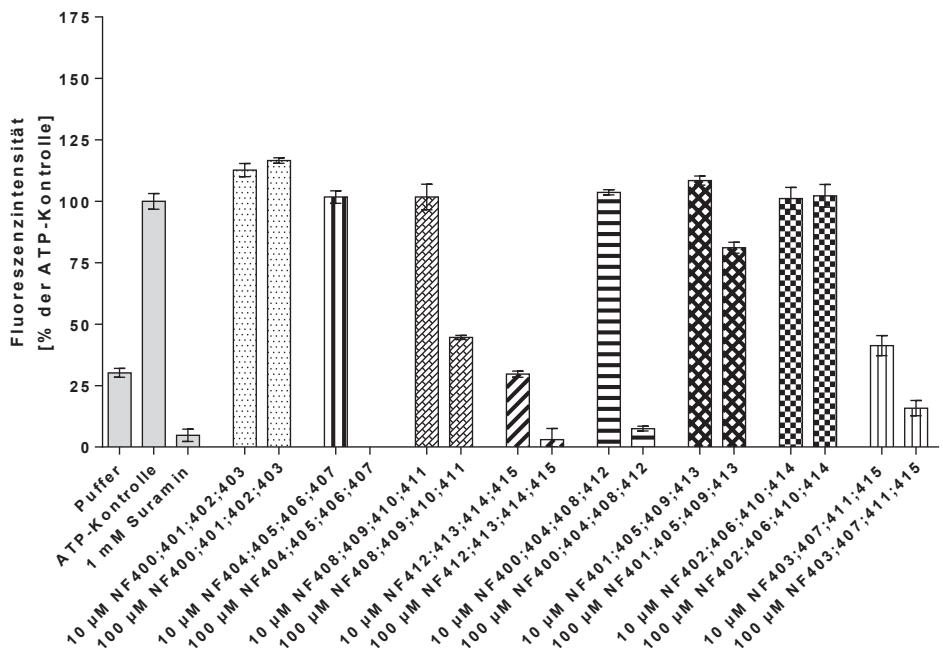




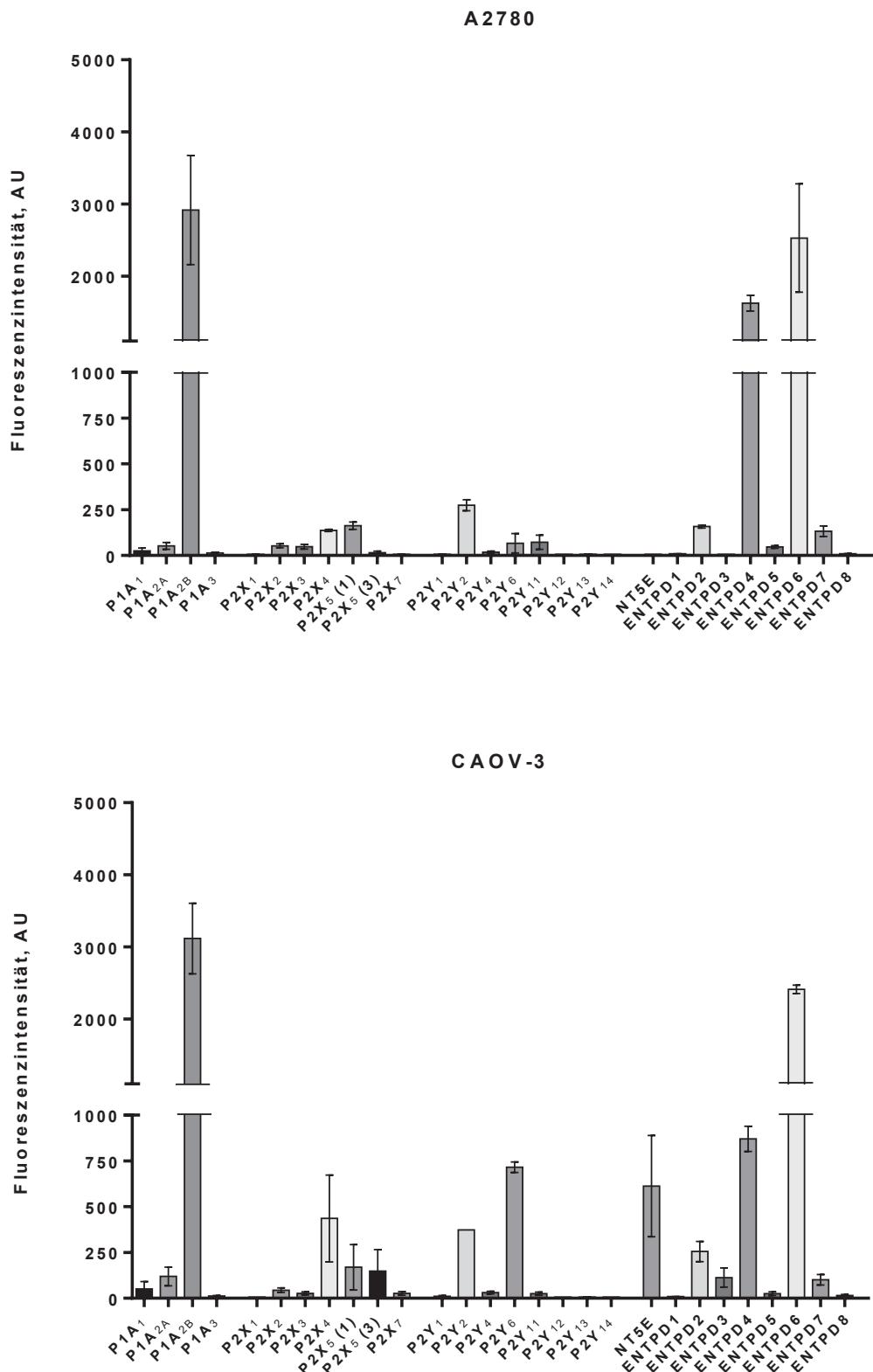
NF 384 - NF 399

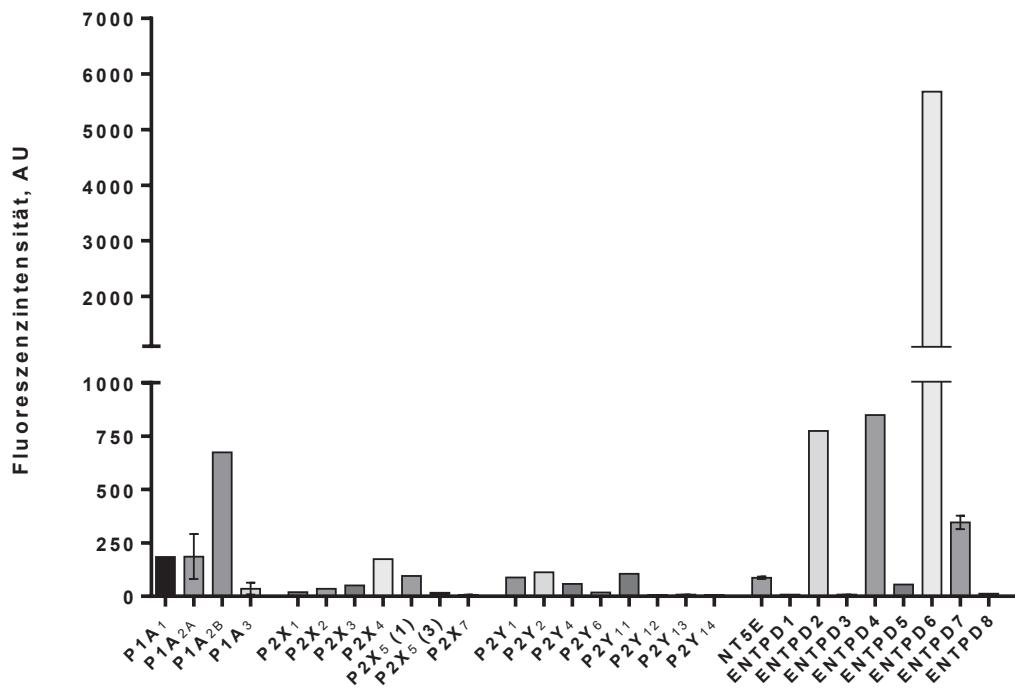
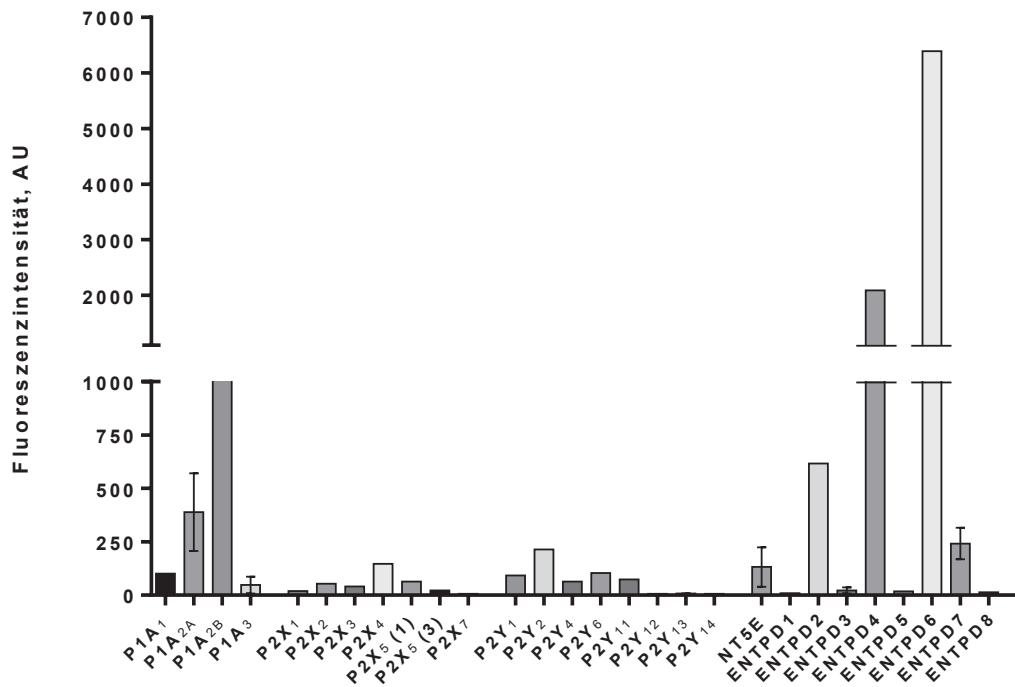


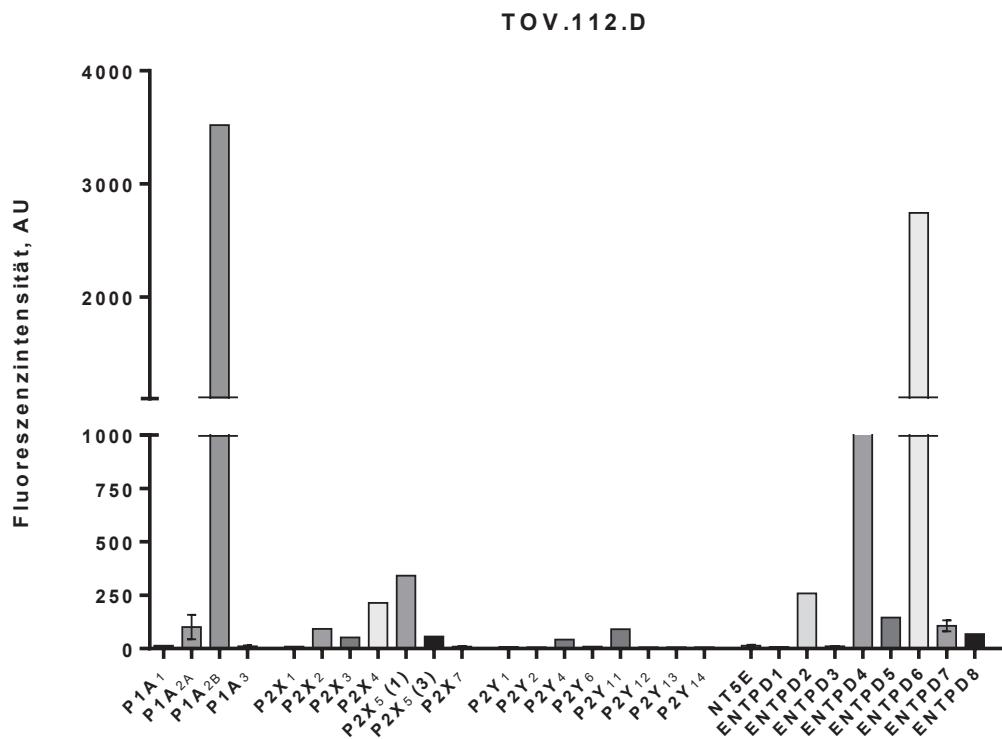
NF 400 - NF 415



E Ovarialkarzinom-Zelllinien — Expressionsdaten



O A W .42**P A .1**



Lebenslauf

Nicole Brockmann, geb. 13.04.1986, Osnabrück

Schulische Ausbildung

08/1992 – 07/1996	Grundschule, GHOS Gesmold
08/1996 – 07/1998	Orientierungsstufe, GHOS Gesmold
08/1998 – 06/2005	Gymnasium, Gymnasium Melle
06/2005	Abitur

Akademische Laufbahn

10/2005 – 09/2009	Pharmaziestudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2007	1. Staatsexamen
10/2009	2. Staatsexamen
12/2010	3. Staatsexamen
01/2011	Approbation als Apothekerin
12/2010 – 09/2014	Promotionsstudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias U. Kassack
10/2018	Promotionshörerin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufserfahrung

2006/2007	2 x 4 Wochen Famulatur in der Wiesen-Apotheke, Bissendorf-Wissingen
11/2009 – 04/2010	Pharmaziepraktikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
05/2010 – 10/2010	Pharmaziepraktikum, Elefanten-Apotheke, Düsseldorf
10/2014 – 01/2016	Angestellte Apothekerin in der Hirsch-Apotheke, Melle-Neuenkirchen
Seit 02/2016	Filialleiterin der Wiesen-Apotheke, Bissendorf-Wissingen

Publikationen

Extended Abstracts

„Program and Abstracts of the 5th Joint Italian-German Purine Club Meeting: Fostering translational research on Purines by Italian-German joint efforts,“ *Purinergic Signaling*, Vol.10(2), pp. 369-417, 2014

„Abstracts from Purines 2014, an International Conference on Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases, held in Bonn, Germany, from July 23-27,2014,“ *Purinergic Signaling*, Vol.10(4), pp. 657-854, 2014

Poster-Präsentationen

N. Brockmann, A. Peltek, A. Hamacher und M.U. Kassack, „Involvement of P2Y receptors in proliferation, apoptosis and survival,“ 5th Joint Italian-German Purine Club Meeting, Rimini, IT, 18.-23. September 2013

N. Brockmann, A. Hamacher und M.U. Kassack, „Extracellular ATP suppresses cell proliferation and increases Cisplatin-induced cytotoxicity in the human ovarian cancer cell line HEY,“ Purines 2014, Bonn, 23.-27. Juli 2014

Veröffentlichungen

F. Khosravani, T. Suvorava, **N. Brockmann**, V.T. Dao, M. Bisha, M. U. Kassack, M. Bas and G. Kojda, „Effects of NO on the expression and function of bradykinin type 2 receptors. Role for angioedema?,“ *European Heart Journal* Bd. 34, Issue suppl_1, 2013 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eht309.P4173>

T. Hennicke, K. Nieweg, **N. Brockmann**, M. U. Kassack, K. Gottmann und G. Fritz, „mESC-based in vitro Differentiation Models to Study Vascular Response and Functionality Following Genotoxic Insults,“ *Toxicological Science*, Bd. 144, pp. 138-150, 2015

F. Khosravani, T. Suvorava, V.T. Dao, **N. Brockmann**, O. Kocgirli, F.F. Herbst, S. Valcaccia, M. U. Kassack, M. Bas and G. Kojda, „Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH,“ *Allergy*, Bd. 70, pp. 285-294, 2015

P. Sureechatchaiyan, A. Hamacher, **N. Brockmann**, B. Storck and M. U. Kassack, „Adenosine enhances cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells,“ *Purinergic Signal*, Bd. 14, pp 395-408, 2018

N. Brockmann, P. Sureechatchaiyan, D. Mueller, T. Hennicke, R. Hausmann, G. Fritz, A. Hamacher and M. U. Kassack, „Profiling of a suramin-derived compound library at recombinant human P2Y receptors identifies NF272 as a competitive but non-selective P2Y₂ receptor antagonist,“ *Purinergic Signal*, 2019; <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09663-4>

Danksagung

Viele liebe Menschen haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit (doch noch) vollendet werden konnte. Daher möchte ich mich herzlich bedanken bei...

...meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias U. Kassack, für die Möglichkeit zur Promotion und für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie für die anregenden Diskussionen rund um meine Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Gerhard Fritz für die Übernahme des Korreferats, sowie für die Möglichkeit, dass ich die Versuche, für welche das Fluoreszenzmikroskop benötigt wurde, in seiner Arbeitsgruppe unter der Anleitung von Frau Tatiana Hennicke durchführen durfte.

...meinen ehemaligen Kollegen Frau Dr. Susanne Eberle, Herrn Dr. Daniel Eßer, Herrn Dr. Christian Urban und Frau Dr. Alexander Hamacher für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, sowie für die stets kompetente Einführung in die Durchführung der Arbeiten im Zell- und im Syntheselabor und die anregenden und konstruktiven Diskussionen hinsichtlich der Versuche und Ergebnisse.

...meinen ehemaligen Büro-Kolleginnen Frau Dr. Katharina Gohr, Frau Dr. Ana Moita, sowie meinem Arbeitskollegen Herrn David Müller für die gute Zusammenarbeit, die unkomplizierten Absprachen, wenn es um Arbeiten im Zelllabor ging, für die vielen lustigen Momente im Büro (oder auch im Pausenraum) und für die stets amüsanten Mittagspausen, vor allem freitags.

...Frau Dr. Parichat Sureechatchaiyan danke ich für die Durchführung der Experimente mit den Substanzen A740003 und AR-C118925 und Frau Chenyin Wang für die Durchführung Versuche zur Caspase-Aktivierung.

...unseren beiden TAs Magda Matyja und Kathrin Christoph. Eure Hilfe im Zelllabor und euer Zuspruch in den vergangenen Jahren war goldwert. Frau Matyja danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung des kombinatorischen Screenings und Frau Christoph danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Zytotoxizitätsbestimmungen. Die Zusammenarbeit mit euch war stets kollegial, unterhaltsam und hat mir große Freude bereitet.

...meinen lieben Arbeitskollegen aus der Wiesen-Apotheke, der Hirsch-Apotheke und der Apotheke Schledehausen für das unermüdliche Motivieren diese Arbeit endlich zum Abschluss zu bringen, das stetige interessierte Nachfragen, wie weit ich denn nun endlich bin, die aufmun-

ternden Worte, wenn es mal wieder stockte und nicht voran zu gehen schien und dass ihr mir netterweise alle den Rücken freigehalten habt, um diese Arbeit endlich fertig schreiben zu können.

...Malte Schinke danke ich für seinen IT-Support in Sachen Software (Prism) und für die immer schnelle Hilfe, wenn Word mal wieder nicht das gemacht hat, was ich wollte oder der Meinung war alle Abbildungen schlucken zu müssen.

...den ganzen Korrekturlesern, Tatiana Hennicke, Laura Engelke und Harry Pieper, für ihren unermüdlichen Einsatz diese Arbeit immer und immer wieder zu lesen und für ihre konstruktive Kritik sowie fachlichen Anregungen und positiven Zusprüche.

...Frau Dr. Tatiana Hennicke für die gute Zusammenarbeit am DFG-Projekt (;-)) und ihre Unterstützung bei den ganzen fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten. Außerdem möchte ich mich herzlich für das bedanken, was sich aus dieser „Zwangszusammenarbeit“ entwickelt hat: unsere Freundschaft.

...bei meiner lieben Freundin Frau Dr. Laura Engelke. Danke für die tolle Zusammenarbeit im Zelllabor, für deine Unterstützung bei diversen Versuchen und für die gemeinsamen Bench-Putz-Freitage ;-). Was sich doch alles entwickeln kann, wenn man zufällig am selben Tag mit seiner Promotion anfängt. Aber vor allem möchte ich mich für die Zeit außerhalb des Labors bedanken. Für unsere gemeinsamen Urlaube, für unsere gemeinsamen Koch-Abende, wenn ich mich mal wieder in eurer Küche austoben (musste) durfte und für den Zuspruch diese Arbeit doch noch zu schreiben.

...Herrn Harry Pieper. Wenn ich damals nicht bei euch untergekommen wäre, hätte das mit dem Studium nicht geklappt und alles andere auch nicht. Danke, dass ihr mir die Möglichkeit gegeben habt mein Studium antreten zu können. Und danke für die moralische Unterstützung der letzten Jahre und deinen unermüdlichen Zuspruch.

...meinen Eltern und meiner Schwester. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt, mir den Rücken gestärkt habt und immer für mich da ward, sowohl während des Studiums als auch während der Promotion und der finalen Schreibphase, welche sich bekanntermaßen ziemlich gezogen hat. Danke, dass ihr während der ganzen Zeit meine Launen ausgehalten habt.

...Markus – Danke, dass ich dich kennen lernen durfte und du die finale Schreibphase (inklusive diverser Motivationstiefs, Frustrations- und Panikmomente) mit mir durchgestanden hast. Und jetzt freue ich mich auf das, was die Zukunft für uns beide bereithält.