Molekulare und funktionelle Charakterisierung des $P2Y_{11}$-Rezeptors sowie pharmakologische Evaluierung neuer Agonisten und Antagonisten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sabine Meis

aus Leverkusen

Düsseldorf 2008

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

Referent: Prof. Dr. M.U. Kassack
Koreferent: Prof. Dr. J. Jose
Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2008

Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese oder eine ähnliche Arbeit ist von mir nicht anderweitig als Dissertation eingereicht.

Düsseldorf, 05. Juni 2008

(Sabine Meis)

Für Matthias,
meine Eltern und
meine Schwester

1 Einleitung 1
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren 1
1.2 P2-Rezeptoren 4
1.2.1 Allgemeines 4
1.2.2 P2X-Rezeptoren 4
1.2.3 P2Y-Rezeptoren 5
1.3 $P2Y_{11}$-Rezeptor 8
1.4 Monozyten und dendritische Zellen 13
2 Zielsetzung dieser Arbeit 17
3 Experimenteller Teil 19
3.1 Zellbiologisches Arbeiten und Transfektionsversuche 19
3.1.1 Zellkultur 19
3.1.1.1 Geräte und Material 19
3.1.1.2 Zelllinien 23
3.1.1.3 Durchführung der Zellkultur 23
3.1.1.4 Zellzahlbestimmung 25
3.1.2 Plasmidgewinnung 26
3.1.2.1 Geräte und Material 26
3.1.2.2 Transformation 29
3.1.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA 31
3.1.2.4 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA 33
3.1.3 Herstellung von P2Y-Rezeptor exprimierenden Zellen 34
3.1.3.1 Transfektionsvektor 34
3.1.3.2 Transfektion 35
3.2 Restriktionsanalyse der Plasmide mit Hilfe der Gelelektrophorese 38
3.2.1 Geräte und Material 38
3.2.2 Durchführung 39
3.2.2.1 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA 39
3.2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA 40
3.3 Mutagenese und Mutationsanalyse 41
3.3.1 Geräte und Material 41
3.3.2 Allgemeines 42
3.3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion 42
3.3.2.2 Gerichtete Mutation (site-directed mutagenesis) 42

3.3.2.3 Kontroll-Reaktion für die Mutagenese 44
3.3.3 Durchführung 45
3.3.3.1 Primer Design 45
3.3.3.2 Synthesereaktion des mutierten Plasmids 46
3.3.3.3 DpnI-Verdau 48
3.3.3.4 Transformation und Plasmidisolation 48
3.3.3.5 Bestimmung der Mutagenese-Effizienz 49
3.3.4 Kontrolle der Mutation - Sequenzierung 49
3.4 Expressionskontrolle mit Hilfe des Durchflusszytometers 50
3.4.1 Geräte und Material 50
3.4.2 Allgemeines 51
3.4.3 Durchführung 52
3.5 Expressionskontrolle mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion 54
3.5.1 RNA-Isolierung 54
3.5.1.1 Geräte und Material 54
3.5.1.2 Durchführung 54
3.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA 55
3.5.3 Kontrolle der RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese 56
3.5.3.1 Geräte und Material 56
3.5.3.2 Durchführung 57
3.5.4 cDNA-Synthese 58
3.5.4.1 Geräte und Material 58
3.5.4.2 Durchführung 58
3.5.5 Polymerase-Kettenreaktion 59
3.5.5.1 Geräte und Material 59
3.5.5.2 Durchführung 59
3.5.6 Nachweis der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese 60
3.5.6.1 Geräte und Material 60
3.5.6.2 Durchführung 60
3.6 Testsubstanzen 61
3.6.1 Nukleotid-Analoge 61
3.6.2 NF-Substanzen 61
3.6.3 Naturstoffe 71
3.7 Calcium-Assay 71

3.7.1 Geräte und Material ... 71
3.7.2 Allgemeines ... 74
3.7.3 Durchführung mit Zellen in Suspension ... 75
3.7.4 Durchführung mit angehefteten Zellen ... 76
3.7.5 Messung im NOVOstar ... 77
3.7.5.1 Auswertung der durch Calcium-Freisetzung hervorgerufenen Fluoreszenz-Signale ... 79
3.8 cAMP-Reportergen-Assay ... 82
3.8.1 Geräte und Material ... 82
3.8.2 Allgemeines ... 84
3.8.3 Durchführung ... 85
3.8.3.1 Transfektion ... 85
3.8.3.2 Aussäen der transfizierten Zellen in weiße 96-well-Mikrotiterplatten…. ... 85
3.8.3.3 Inkubation der Testsubstanzen ... 86
3.8.3.4 Messung der Luciferase-Aktivität ... 86
3.8.3.5 Auswertung des Lumineszenz-Signals ... 87
3.9 Isolierung von Monozyten und Herstellung von Dendritischen Zellen ... 87
3.9.1 Geräte und Material ... 87
3.9.2 Allgemeines ... 89
3.9.3 Durchführung ... 91
3.10 ELISA ... 93
3.10.1 TSP-1 ELISA ... 93
3.10.1.1 Geräte und Material ... 93
3.10.1.2 Allgemeines ... 93
3.10.1.3 Durchführung ... 95
3.10.2 IL-12p70 ELISA ... 96
3.11 Apyrase-Assay ... 96
3.11.1 Geräte und Material ... 96
3.11.2 Allgemeines ... 98
3.11.3 Durchführung ... 99
3.11.3.1 Messung ... 100

4 Ergebnisse 101
4.1 Etablierung von $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$-, $P2Y_{11}$- und $P2Y_{12}$-Rezeptor-exprimierenden Zellen 101
4.1.1 Testung von Nukleotiden und Nukleotid-Analogen an 1321N1-WT-Zellen 101
4.1.2 Überprüfung der Plasmide mit cDNA für die verschiedenen P2Y-Rezeptoren 102
4.1.3 Testung der verschiedenen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien 103
4.1.3.1 $P2Y_1$-Rezeptor 104
4.1.3.2 $P2Y_2$-Rezeptor 104
4.1.3.3 $P2Y_4$-Rezeptor 105
4.1.3.4 $P2Y_6$-Rezeptor 106
4.1.3.5 $P2Y_{11}$-Rezeptor 107
4.1.3.6 $P2Y_{12}$-Rezeptor 112
4.1.4 Calcium-Messungen an nativen HEK293-Zellen 112
4.2 Suraminderivate mit Variation der Methyl-Gruppe sowie des Naphthylsulfonsäurerestes als $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten 115
4.2.1 Testung der Substanzen im Calcium-Assay 115
4.2.2 Selektivität von NF157 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber P2X-Rezeptoren 121
4.2.3 Charakterisierung von NF157 122
4.2.3.1 Schild-Analyse von NF157 122
4.2.3.2 Testung von NF157 im cAMP-Reportergen-Assay 123
4.3 Identifizierung des nanomolaren $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten NF340 124
4.3.1 Analoge des NF058 125
4.3.2 Terephthalsäurebisamid- und Isophthalsäurebisamid-Derivate von NF058, NF290, NF294, und NF298 127
4.3.3 Analoge des NF340 mit gleicher Naphthylsulfonsäure 129
4.3.4 Charakterisierung von NF294 133
4.3.5 Charakterisierung von NF340 134
4.3.5.1 cAMP-Reportergen-Assay 134
4.3.5.2 Schild-Analyse von NF340 135
4.3.6 Selektivität von NF340 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber anderen P2Y- und P2X-Rezeptoren 138

4.4 Carbonsäure-Derivate von Suramin 139
4.5 Identifizierung von Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor 141
4.5.1 NF145 141
4.5.1.1 Testung von NF145 im Calcium-Assay 141
4.5.1.2 Selektivität von NF145 gegenüber anderen P2Y-Rezeptoren 144
4.5.1.3 NF145 im cAMP-Reportergen-Assay 145
4.5.1.4 Schild-Analyse von NF157 unter Verwendung des Agonisten NF145 146
4.5.2 NF546 148
4.5.2.1 Testung von benzylischen Phosphonsäuren im Calcium-Assay 148
4.5.2.2 Selektivität von NF546 gegenüber anderen P2-Rezeptoren 152
4.5.2.3 Testung von NF546 im cAMP-Reportergen-Assay 154
4.5.2.4 Schild-Analyse von NF157 und NF340 unter Verwendung des Agonisten NF546 155
4.5.3 NF709 158
4.5.3.1 Testung von aromatischen Phosphonsäuren im Calcium-Assay 158
4.5.3.2 Selektivitätstestung von NF709 an anderen P2Y-Rezeptoren 165
4.5.3.3 Testung von NF709 im cAMP-Reportergen-Assay 166
4.5.3.4 Schild-Analyse von NF340 unter Verwendung des Agonisten NF709 167
4.5.4 Marine Naturstoffe 173
4.6 Testung der Agonisten NF546 und NF709 und des Antagonisten NF340 an dendritischen Zellen 176
4.6.1 Bestimmung von Interleukin-12 176
4.6.2 Bestimmung von Thrombospondin-1 177
4.6.3 Testung von nativen Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen im Calcium-Assay 179
4.7 Etablierung eines Apyrase-Assays und Überprüfung der Selektivität der gefundenen $P2Y_{11}$-Rezeptor-Liganden 182
4.8 Mutagenese-Studien am $P2Y_{11}$-Rezeptor 183
4.8.1 Transfektion und Expression des his$P2Y_{11}$-Rezeptors 184
4.8.2 Herstellung, Transfektion und Expression von his$P2Y_{11}$-Rezeptor-Mutanten 190
4.8.2.1 Auswahl der Mutationspunkte 190

4.8.2.2 Untersuchung der Mutation Cystein → 102 → Alanin (C102A) .. 193
4.8.2.3 Untersuchung der Mutation Arginin → 275 → Alanin (R275A) ... 194
4.8.2.4 Untersuchung der Mutation Arginin → 276 → Alanin (R276A) ... 196
5 Diskussion ... 201
5.1 Etablierung der verschiedenen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zellen ... 201
5.2 Antagonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor ... 202
5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung der getesteten Antagonisten ... 203
5.3 Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor ... 209
5.3.1 NF546 - ein Vollagonist ... 209
5.3.2 NF709 - ein Partialagonist oder ein allosterer Agonist? ... 210
5.3.3 NF145 - eine Substanz mit agonistischen Effekten ... 213
5.3.4 Vergleich der Agonisten NF546, NF709 und NF145 im Calcium- und cAMP-Reportergen-Assay ... 213
5.4 Selektivität der $P2Y_{11}$-Liganden gegenüber anderen P2-Rezeptoren ... 215
5.4.1 NF157 ... 215
5.4.2 NF340 ... 216
5.4.3 Agonisten NF546, NF145 und NF709 ... 216
5.5 Funktionsnachweis der Agonisten und Antagonisten in physiologischen Systemen ... 217
5.6 Mutagenese am $P2Y_{11}$-Rezeptor ... 219
5.6.1 his$P2Y_{11}$-Rezeptor ... 219
5.6.2 his$P2Y_{11}$-Rezeptor-Mutanten ... 220
5.6.3 Vergleich der his$P2Y_{11}$-Rezeptor-Mutante R276A mit dem his$P2Y_{11}$-WT-Rezeptor ... 222
6 Zusammenfassung ... 224
7 Abstract ... 225
8 Abkürzungsverzeichnis ... 226
9 Literaturverzeichnis ... 230
10 Veröffentlichungen ... 241
11 Anhang ... 244
Ergebnis der Sequenzierung der verschiedenen Plasmide ... 244
Ergebnis der Sequenzierung der Plasmide für den mutierten $P2Y_{11}$-Rezeptor ... 245
Ergebnisse des Screenings von NF-Substanzen ... 248

Standardkurve des Thrombospondin-1 ELISA 251
Kalibrierkurve des Apyrase-Assay 252

1 Einleitung

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G protein-coupled receptor, GPCR) gehören zu einer der größten Proteinfamilien im menschlichen Genom. Bisher wurden mindestens 948 GPCRs identifiziert (Takeda *et al.*, 2002). Sie machen damit ungefähr 5 % der Gene des menschlichen Genoms aus (Zhang *et al.*, 2006; Fredriksson *et al.*, 2003; Venter *et al.*, 2001). Im Jahr 2001 waren 50 % der Medikamente auf dem weltweiten Markt Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren (Klabunde and Hessler, 2002). Diese Rezeptoren stellen also wichtige Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente dar. Die Hauptaufgabe der Rezeptoren ist die Umwandlung von extrazellulären Stimuli in intrazelluläre Signale. Allen G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie sieben transmembranäre Helices (7-TM) besitzen, wobei das N-terminale Ende des Proteins außerhalb der Zelle und das C-terminale Ende intrazellulär vorliegt (Abb. 1.1).

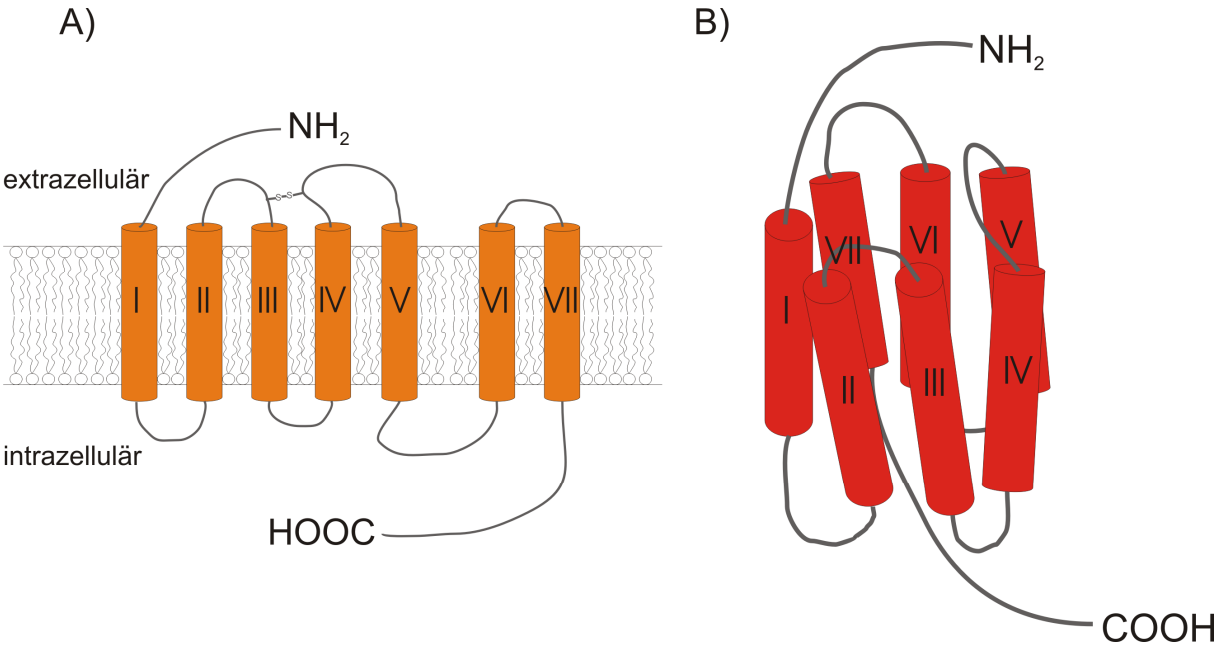


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors; in A) ist die generelle Struktur dargestellt und in B) die ungefähre Anordnung im Raum.

Bisher sind das Rhodopsin vom Rind und vom Kurzflossenkalmar *Todarodes pacificus*, sowie ein Fusionsprotein des humanen β_2-adrenergen-Rezeptors als

einzige GPCRs kristallisiert und ihr Aufbau durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (Murakami and Kouyama, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2007; Palczewski *et al.*, 2000). Anfang der 1990er Jahre wurde ein System zur Klassifizierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren etabliert (Kolakowski, Jr., 1994; Fredriksson and Schiöth, 2006). Dabei wurden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren in sechs Gruppen (A bis F) eingeteilt. Zu der Gruppe A gehören die Rezeptoren, die dem Rhodopsin verwandt sind. Die Gruppe B umfasst die Rezeptoren, die den Secretin- und Calcitonin-Rezeptoren ähneln, während in Gruppe C die metabotropen Glutamat-Rezeptoren zusammengefasst sind. Den Gruppen D und E werden Rezeptoren zugeordnet, die bisher noch nicht in Wirbeltieren identifiziert worden sind (Pheromon-Rezeptoren aus Pilzen; cAMP-Bindungs-Rezeptoren in Nematoden). Zu der letzten Gruppe, der Gruppe F, gehören Opsin-Rezeptoren aus den Archaebakterien (Kolakowski, Jr., 1994). 2003 wurde von Fredriksson et al. ein weiteres System zur Klassifizierung von GPCRs eingeführt. Dieses sogenannte GRAFS-System beruht auf einer phylogenetischen Untersuchung von ungefähr 800 humanen GPCRs. Es beinhaltet fünf Hauptfamilien. Dies sind die Glutamat-Rezeptor-Familie (G), die Rhodopsin-Rezeptor-Familie (R), die Adhesion-Rezeptor-Familie (A), die Frizzled/Taste2-Rezeptor-Familie (F) sowie die Secretin-Rezeptor-Familie (S) (Fredriksson *et al.*, 2003).

GPCRs sind an Guanylnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) gekoppelt, die aus einem Komplex mit drei Untereinheiten (α, β, γ) bestehen. Bisher sind 18 verschiedene Subtypen des humanen Gα-Proteins, fünf Subtypen des Gβ-Proteins und elf Subtypen des Gγ-Proteins bekannt (Hermans, 2003).

Im Ruhezustand bindet die Gα-Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP). Der erste Schritt in der Signaltransduktion durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor ist die Bindung eines Liganden an den Rezeptor. Durch Konformationsänderung des Rezeptors wird Kontakt zum G-Protein aufgebaut. Dabei wird das GDP von der Gα-Untereinheit abgelöst und an seiner Stelle bindet ein Guanosintriphosphat (GTP). Gleichzeitig löst sich die α-Untereinheit von der $\beta\gamma$-Untereinheit ab und kann in der Plasmamembran über Diffusion Kontakt zu Effektorproteinen aufnehmen. Auch die $\beta\gamma$-Untereinheit kann Effektorproteine beeinflussen (Clapham and Neer, 1997). Durch die GTPase-Aktivität der α-Untereinheit wird das GTP in GDP und ein anorganisches Phosphat gespalten. Dies ist der Auslöser für ein Ablösen der α-Untereinheit vom Effektorprotein und ein Zusammenlagern mit der $\beta\gamma$-Untereinheit. Der

Ursprungszustand ist wieder hergestellt. Effektorproteine der Gα-Untereinheit sind zum Beispiel die Adenylatzyklase, die durch $G\alpha_i$ (inhibitorisch) und $G\alpha_s$ (stimulierend) beeinflusst wird, oder die Phospholipase C, die durch das $G\alpha_q$-Protein aktiviert wird. In Abb. 1.2 sind die Zusammenhänge der Signaltransduktion vereinfacht dargestellt (modifiziert nach Marinissen and Gutkind (2001)).

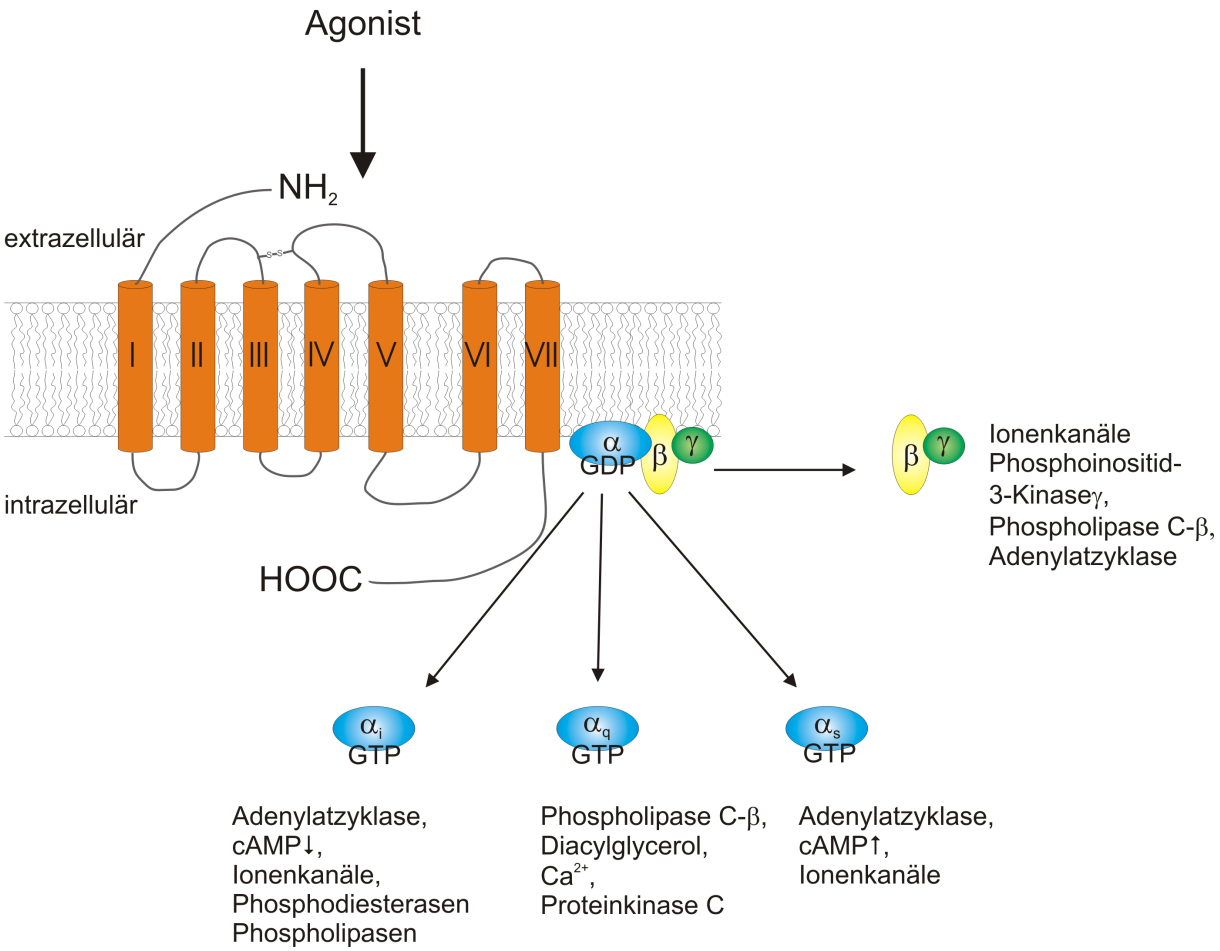


Abb. 1.2 Signaltransduktionswege von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (modifiziert nach Marinissen and Gutkind (2001)).

Für den funktionellen Readout zur Bestimmung der Aktivität eines G-Protein gekoppelten Rezeptors kann z. B. die Änderung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels nach Aktivierung einer $G\alpha_q$-Einheit ($Ca^{2+}\uparrow$) oder die durch Beeinflussung der Adenylatzyklase hervorgerufene Änderung der cAMP-Konzentration in der Zelle bestimmt werden ($G\alpha_i$: cAMP↓; $G\alpha_s$: cAMP↑).

1.2 P2-Rezeptoren

1.2.1 Allgemeines

Das Konzept, dass ATP neben den bereits bekannten Aufgaben in der Zelle (Energieträger und Baustein von Nukleinsäuren) ein extrazelluläres Signalmolekül darstellt, brauchte eine lange Zeit der Etablierung (Burnstock, 1997). Durch Drury und Szent-Györgyi wurde 1929 beschrieben, dass ein Extrakt, der Purine enthielt, einen Effekt auf das menschliche Herz hatte (Cheek *et al.*, 2000). 1976 wurde dann zum ersten Mal von Geoffrey Burnstock postuliert, dass an der Zelloberfläche Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide vorhanden sind („purinerge Rezeptoren“) (Burnstock, 1976). 1978 folgte, ebenfalls durch Burnstock, die Einteilung in P1- (Adenosin-) und P2- (ATP- und ADP-) Rezeptoren (Burnstock, 1978). 1985 wurde auf Grund der strukturellen Eigenschaften die Einteilung von P2-Rezeptoren in P2Y- und P2X-Rezeptoren vorgenommen (Kennedy and Burnstock, 1985). In den frühen 1990er Jahren wurden die ersten Rezeptoren für Purine geklont. Bis heute sind vier humane P1-Rezeptor-Subtypen (A_1, A_{2A}, A_{2B} und A_3) mit Adenosin als natürlichem Liganden, sowie sieben P2X-Rezeptoren ($P2X_{1\text{-}7}$) und acht P2Y-Rezeptoren ($P2Y_{1,2,4,6,11\text{-}14}$) im menschlichen Genom identifiziert und charakterisiert worden (Abbracchio *et al.*, 2006; Ralevic and Burnstock, 1998). P2-Rezeptoren spielen im Immunsystem (Marteau *et al.*, 2005; Di Virgilio *et al.*, 2001), für die Thrombozytenaggregation (Gachet, 2006), in der Neurotransmission (Franke *et al.*, 2006), auf Tumoren (White and Burnstock, 2006) und bei Entzündungen und Schmerz (Burnstock, 2004) eine wichtige Rolle.

1.2.2 P2X-Rezeptoren

Die P2X-Rezeptoren sind Ligand-gesteuerte Ionenkanäle. Die Aktivierung dieser Kationenkanäle erfolgt durch ATP (North, 2002). Alle Subtypen haben die gleiche Grundstruktur. Sie besitzen zwei transmembranäre Domänen, die durch eine lange extrazelluläre Schleife verbunden sind. Intrazellulär liegen die Amino- und Carboxy-terminalen Enden des Proteins (Gever *et al.*, 2006). Durch Zusammenlagerung von drei Einheiten bilden sie eine Pore. Dabei bilden sich sowohl Homomere ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_3$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_7$) als auch Heteromere ($P2X_{2/3}$, $P2X_{1/5}$, $P2X_{2/6}$, $P2X_{4/6}$) aus (Gever *et al.*, 2006; North, 2002). P2X-Rezeptoren werden im gesamten menschlichen Körper exprimiert. So ist der $P2X_1$-Rezeptor vorwiegend auf der

glatten Muskulatur und auf Thrombozyten exprimiert, wo er die Kontraktilität der Muskeln bzw. verschiedene prothrombotische Funktionen steuert (Gever *et al.*, 2006). Als potenter Antagonist an $P2X_1$-Rezeptoren mit einem pA_2-Wert von 10,7 wurde das NF449 beschrieben (Kassack *et al.*, 2004; Hulsmann *et al.*, 2003). NF449 ist ein von Suramin abgeleitetes symmetrisches Oktasulfonsäure-Derivat. $P2X_3$-Rezeptoren spielen fast ausschließlich an sensorischen Neuronen eine Rolle und stellen damit ein neues Target für die Entwicklung von antinozizeptiven Medikamenten dar. Als Antagonist an $P2X_3$-Rezeptoren wurde das NF110, ein Tetrasulfonsäure-Derivat des NF449, identifiziert. Es blockiert rekombinante, humane $P2X_3$-Rezeptoren mit einem pK_i-Wert von 7,4 (Hausmann *et al.*, 2006). Ein weiteres Beispiel sind die $P2X_7$-Kanäle, die hauptsächlich auf Immun- und Gliazellen lokalisiert sind, wo sie die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die Zellteilung und die Apoptose vermitteln (Gever *et al.*, 2006).

1.2.3 P2Y-Rezeptoren

Die acht humanen P2Y-Rezeptoren ($P2Y_{1,\ 2,\ 4,\ 6,\ 11\text{-}14}$) gehören in die große Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (siehe Kapitel 1.1). Sie werden der Gruppe A, den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, zugeordnet. Die fehlenden Ziffern bei der Bezeichnung der $P2Y_{1\text{-}14}$-Rezeptor-Sequenzen stellen GPCRs dar, die entweder auf Nukleotide keine funktionelle Antwort geben oder als P2Y-Rezeptoren aus anderen Spezies isoliert wurden. Eine Einteilung der P2Y-Rezeptoren kann aus pharmakologischer Sicht, aber auch aus phylogenetischer bzw. struktureller Sicht vorgenommen werden.

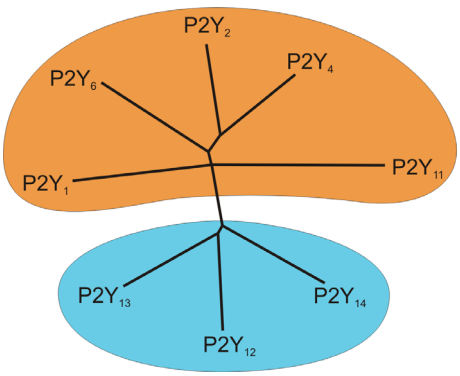


Abb. 1.3 Phylogenetischer Stammbaum der P2Y-Rezeptor-Familie (modifiziert nach Abbracchio *et al.* (2003)). Dargestellt sind hier die verwandschaftlichen Beziehungen der bekannten P2Y-Rezeptoren. Sie können zwei Gruppen eingeteilt werden.

Pharmakologisch werden die acht Rezeptoren auf Grund ihrer Reaktion auf die verschiedenen Nukleotide eingeteilt. Die erste Gruppe reagiert hauptsächlich auf Adeninnukleotide in Form von ADP und ATP ($P2Y_{1, 11, 12, 13}$), die zweite Gruppe auf Uracilnukleotide in Form von UTP bzw. UDP ($P2Y_{4, 6}$) und die dritte Gruppe sowohl auf Adenin- als auch auf Uracilnukleotide ($P2Y_2$). Die vierte Gruppe besteht bisher aus dem $P2Y_{14}$-Rezeptor, der durch Nukleotide aktiviert wird, an die ein Zuckerrest gebunden ist (z. B. UDP-Glukose) (Abbracchio *et al.*, 2006).

Phylogenetisch bzw. strukturell können zwei Gruppen unterschieden werden, die mit 21 bis 56 % Sequenzhomologie relativ geringe Übereinstimmungen in den Sequenzen aufweisen (Abbracchio *et al.*, 2003). In die erste Gruppe können $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren eingeordnet werden (Abb. 1.3). Der anderen Gruppe können die Rezeptoren $P2Y_{12}$-, $P2Y_{13}$- und $P2Y_{14}$ zugeordnet werden (Abbracchio *et al.*, 2003). Innerhalb der ersten Gruppe fällt der $P2Y_{11}$-Rezeptor durch einige Besonderheiten auf. Zum einen gibt es zu diesem Rezeptor kein Gegenstück im Ratten- oder Mausgenom und zum anderen weist er eine Besonderheit in der G-Protein-Kopplung auf. Alle Rezeptoren der ersten Gruppe einschließlich des $P2Y_{11}$-Rezeptors weisen eine $G_{q/11}$-Kopplung auf. Für den $P2Y_{11}$-Rezeptor ist jedoch auch eine G_s-Kopplung beschrieben (Qi *et al.*, 2001a; Communi *et al.*, 1999). Für die zweite Gruppe ($P2Y_{12-14}$) ist eine $G_{i/o}$-Kopplung nachgewiesen (Abbracchio *et al.*, 2006).

P2Y-Rezeptoren sind ebenso wie die P2X-Rezeptoren im ganzen Körper exprimiert. Am besten untersucht ist der $P2Y_1$-Rezeptor. Für diesen Rezeptor sind verschiedene Site-directed-mutagenesis-Studien veröffentlicht worden, mit deren Hilfe durch Molecular-modeling-Studien ein Modell der räumlichen Struktur des Rezeptors und der möglichen Bindungstasche der Liganden beschrieben worden ist (Costanzi *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 1998). Außerdem liegen für den $P2Y_1$-Rezeptor selektive Agonisten (MRS2365, (Chhatriwala *et al.*, 2004)) und Antagonisten (MRS2279, (Boyer *et al.*, 2002; Nandanan *et al.*, 2000)), einschließlich eines Radioliganden ([^{3}H]MRS2279, (Waldo *et al.*, 2002)) vor, die bei der Charakterisierung des Rezeptors hilfreich sind.

Es sind schon einige selektive und potente Agonisten und Antagonisten für P2Y-Rezeptoren beschrieben worden. In Tab. 1.1 ist eine kurze Übersicht über bekannte Liganden an P2Y-Rezeptoren dargestellt. Bisher sind keine nicht-nukleotidischen

Agonisten an P2Y-Rezeptoren beschrieben worden (Abbracchio *et al.*, 2006; von Kugelgen, 2006).

Tab. 1.1 Übersicht über Agonisten und Antagonisten an P2Y-Rezeptoren. Die Daten wurden aus von Kugelgen (2006) und Abbracchio et al. (2006) zusammengestellt. Nicht-nukleotidische Agonisten an P2Y-Rezeptoren sind bisher nicht bekannt.

	nukleotidische Agonisten[a]	nukleotidische Antagonisten[a]	nicht-nukleotidische Antagonisten
$P2Y_1$	2-MeSADP, ADP, ADPβS, MRS2365	A3P5PS, A3P5P, MRS2179, MRS2279	PPADS, Reactive blue 2, Suramin
$P2Y_2$	UTP, ATP, dCp4U (INS37217), Up4U (INS365)	-	Suramin, Reactive blue 2
$P2Y_4$	UTP, UDP	ATP	PPADS
$P2Y_6$	UDP, UDPβS	-	PPADS, Reactive blue 2, MRS2567, MRS2578, MRS2575
$P2Y_{11}$	ATP, ATPγS, BzBzATP, AR-C67085	-	Suramin
$P2Y_{12}$	2-MeSADP, 2-MeSATP, ADP	INS50589	Metabolite von Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel
$P2Y_{13}$	2-MeSADP, Ap_3A, ADPβS, 2-MeSATP	AR-C69931MX	PPADS, Suramin
$P2Y_{14}$	UDP-Glukose, UDP-Galaktose	-	-

[a] Zu den nukleotidischen Agonisten/Antagonisten werden auch solche Substanzen gezählt, die die Grundstruktur von Nukleotiden (Nukleobase-Zucker-Phosphatgruppe) aufweisen, jedoch an einem der drei Bausteine modifiziert wurden.

1.3 $P2Y_{11}$-Rezeptor

Der $P2Y_{11}$-Rezeptor ist der Prototyp eines ATP-sensitiven Rezeptors. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, besitzt der $P2Y_{11}$-Rezeptor ein einzigartiges Profil unter den P2Y-Rezeptoren: Bisher konnte im Nagetiergenom (Maus und Ratte) kein orthologer Rezeptor identifiziert werden (Brautigam *et al.*, 2005). Außerdem besitzt er als einziger P2Y-Rezeptor ein Intron in der Kodierungssequenz (Abbracchio *et al.*, 2006; Communi *et al.*, 2001). Im Jahr 2001 beschrieb die belgische Arbeitsgruppe um D. Communi eine Spleißvariante des $P2Y_{11}$-Rezeptors. Durch das 1,9 kb große Intron wird das Exon, das für die ersten sechs Aminosäuren des Rezeptors codiert, von dem zweiten Exon, das für den Rest des Proteins codiert, getrennt. Das Gen für den humanen $P2Y_{11}$-Rezeptor liegt direkt neben dem humanen Ortholog des Ssf1-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*. Das Ssf1-Gen aus *S. cerevisiae* codiert für ein nukleäres Protein, das in der Fortpflanzung der Hefe beim zweiten Schritt des mRNA-Spleißens eine Rolle spielt (Suarez-Huerta *et al.*, 2000). Bei dem humanen Ortholog des Ssf1-Gens wird eine generelle Rolle im Zellwachstum angenommen (Communi *et al.*, 2001). Durch Cotranskription und intergenetisches Spleißen wird ein chimäres Protein gebildet, das sich vom „richtigen“ $P2Y_{11}$-Rezeptor durch die ersten Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Rezeptors unterscheidet (Communi *et al.*, 2001). Die erste Sequenz, die von Communi et al. vom $P2Y_{11}$-Rezeptor veröffentlicht wurde, stellt diese Spleiß-Variante dar (Communi *et al.*, 1999; Communi *et al.*, 1997). Im Jahr 2001 wurde dann die korrekte Sequenz des $P2Y_{11}$-Rezeptors veröffentlicht (Communi *et al.*, 2001). Die mRNA beider Spleiß-Varianten konnte in verschiedenen Geweben im menschlichen Körper nachgewiesen werden (Communi *et al.*, 2001).

Es wurden verschiedene Studien zur Rolle des $P2Y_{11}$-Rezeptors im menschlichen Körper und zur Bestimmung seiner molekularen Topologie durchgeführt. Zur Klärung der Nukleosidtriphosphat- (ATP-, ATPγS-) Präferenz des $P2Y_{11}$-Rezeptors konnten Qi et al. durch zielgerichtete Mutagenese zeigen, dass ein Arginin an Position 265 (Arg265) für die Triphosphat- (ATP-) gegenüber der Diphosphat- (ADP-) Selektivität bei humanen $P2Y_{11}$-Rezeptoren mit verantwortlich ist (Qi *et al.*, 2001b). Diese Studie wurde an der Ssf1/$P2Y_{11}$-Spleißvariante des Rezeptors durchgeführt. Damit entspricht das Arginin an Position 265 dem Arginin an Position 268 im korrekten $P2Y_{11}$-Rezeptor. Dieses Arginin befindet sich an der Übergangstelle der sechsten transmembranären Domäne zum dritten extrazellulären Loop. Ein Austausch des

Arginins gegen Glutamin erhöht die Sensitivität des $P2Y_{11}$-Rezeptors gegenüber ADP und führt zur Äquipotenz von ATP und ADP. Auch die Arbeitsgruppen um G. Reiser und B. Fischer haben sich mit Hilfe von Mutagenese-Studien und einem Homologie-Modell mit der Ligand-Bindungsstelle des $P2Y_{11}$-Rezeptors beschäftigt. Ihre Studien gaben Hinweise darauf, dass die Arginine an den Positionen 106, 268 und 307 sowie die Glutaminsäure an Position 186 im Rezeptor für die Wechselwirkung mit den Phosphatgruppen des ATP verantwortlich sind. Das Methionin an Position 310 scheint mit dem Adeninring des ATP zu interagieren, während ein Serin an Position 261 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem γ-Phosphat des ATP bildet (Zylberg *et al.*, 2007). Für das Homologie-Modell benutzte diese Arbeitsgruppe die Sequenz des korrekten $P2Y_{11}$-Rezeptors.

Wie in Tab. 1.1 dargestellt, sind bisher nur wenige selektive Liganden für den $P2Y_{11}$-Rezeptor verfügbar. Suramin ist als unspezifischer Antagonist mit einem K_i-Wert nahe 1 µM beschrieben worden (Communi *et al.*, 1999). Suramin ist ein symmetrisches polysulfoniertes Naphthylamin-Derivat eines Harnstoffs (siehe Abb. 1.4). Es wurde 1916 zum ersten Mal von Chemikern der Firma Bayer synthetisiert und ursprünglich gegen den Erreger der Schlafkrankheit (*Trypanosoma* spec.) eingesetzt, später auch gegen die Onchozerkose als Filarizid (Voogd *et al.*, 1993). 1979 fand De Clercq heraus, dass Suramin in therapeutischen Dosen in vitro eine Hemmung der Reversen Transkriptasen hervorruft (De Clercq, 1979). Daher untersuchten Mitsuya et al. Mitte der achtziger Jahre die Wirkung von Suramin auf den HI-Virus und kamen zu dem Ergebnis, dass Suramin in therapeutischen Dosen hier eine Wirkung zeigt (Mitsuya *et al.*, 1984). Später wurde Suramin auch in der Krebstherapie eingesetzt, da durch Suramin zum einen verschiedene Wachstumsfaktoren blockiert und zum anderen die Angiogenese stark gehemmt wird. Vor allem in der Behandlung von Prostatakrebs zeigt Suramin Wirkung (Kaur *et al.*, 2002). 1988 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass Suramin auch ein Antagonist an P2-Rezeptoren ist (Dunn and Blakeley, 1988).

Als Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor sind ATP und ATPγS, ein hydrolysestabileres Analogon des ATP (siehe Abb. 1.4), bekannt (Communi *et al.*, 1999; Communi *et al.*, 1997). Beide Substanzen vermögen sowohl die cAMP-Konzentration, als auch die IP_3-Konzentration in der Zelle zu erhöhen. Auch die Substanzen BzBzATP und AR-C67085 (siehe Abb. 1.4), die ursprünglich von der Firma AstraZeneca als

$P2Y_{12}$-Antagonist entwickelt wurde, sind Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor (Communi *et al.*, 1999).

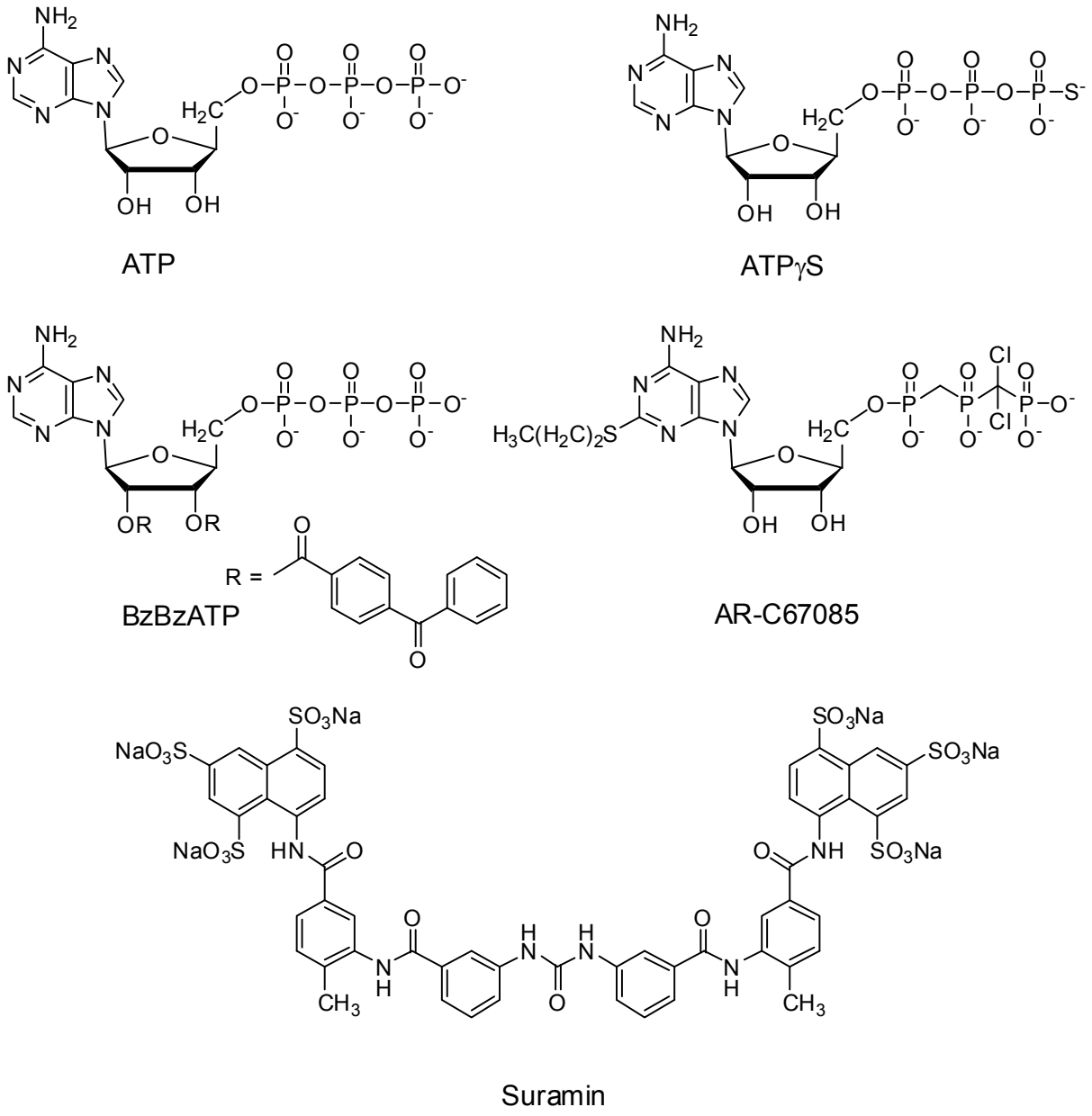


Abb. 1.4 Strukturformeln der in der Literatur beschriebenen Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor (ATP: Adenosin-5′-triphosphat; ATPγS: Adenosin-5′-[γ-thio]triphosphat; BzBzATP: (2′ oder 3′)-O-[(4-Benzoyl)benzoyl)-ATP; AR-C67085: 2-Propylthio-β,γ-dichloromethylen-D-ATP; Suramin: 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylen)carbonylimino))-bis(naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure)hexanatrium-Salz).

Neuere Studien zeigten, dass auch β–NAD^+ und $NAADP^+$ Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor sein können (Moreschi *et al.*, 2007; Moreschi *et al.*, 2006). NAD^+ (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) stellt ein Kosubstrat in der menschlichen Zelle

dar. Es ist hier verantwortlich für Redoxreaktionen (z. B. bei der Alkoholdehydrogenase). Liegt NAD^+ extrazellulär vor, kann es humane Granulozyten aktivieren. Dies drückt sich in einem erhöhten cAMP-Spiegel in der Zelle aus (G_s-Kopplung des $P2Y_{11}$-Rezeptors), was zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führt. Zudem wird die ADP-Ribosylcyclase aktiviert, wodurch die Konzentration an cyclischer ADP-Ribose (cADPR), einem Calcium-Mobilisierer (Guse, 2004), in der Zelle ansteigt. Außerdem konnte ein Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Granulozyten nach Behandlung mit NAD^+ nachgewiesen werden (Moreschi *et al.*, 2006). $NAADP^+$ (Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) wird z.B. durch die CD38-Ectoenzymfamilie aus $NADP^+$ gebildet und stellt in der Zelle einen Sekundärbotenstoff dar, der für eine Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern verantwortlich ist. Bei Versuchen an Granulozyten führte $NAADP^+$ gleichermaßen wie NAD^+ zu einer Reaktion und zeigte in stabil transfizierten 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen ähnliche Ergebnisse (Calcium-, IP_3-, cAMP- und cADPR-Freisetzung). Diese Reaktionen in der Zelle konnten durch den $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten NF157, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisiert wurde, gehemmt werden (Moreschi *et al.*, 2007).

Es gibt einige Untersuchungen zur Identifizierung der Expression und der Funktion des $P2Y_{11}$-Rezeptors im menschlichen Körper. Eine Arbeitsgruppe um Crosson et al. hat über RT-PCR die Expression von $P2Y_{11}$-Rezeptoren im Trabekelmaschenwerk des menschlichen Auges nachgewiesen (Crosson *et al.*, 2004). Auch über eine Stimulation der Zellen mit verschiedenen Nukleotiden (ATP, UTP, ADP, UDP, 2 MeSATP) konnte eine Existenz des $P2Y_{11}$-Rezeptors neben dem $P2Y_1$ und $P2Y_4$-Rezeptor nachgewiesen werden. Damit könnten $P2Y_{11}$-Liganden möglicherweise im Rahmen einer Therapie gegen Glaukom eingesetzt werden.

Auch im Bereich der Epithelien-Zellen der Nase spielt der $P2Y_{11}$-Rezeptor vermutlich eine wichtige Rolle. Scheinbar kontrolliert er, wie auch die $P2Y_2$- und $P2Y_6$-Rezeptoren, die Sekretion von Schleim und Flüssigkeit in diesen Zellen (Choi *et al.*, 2003).

Die Firma Bayer HealthCare AG hat ein Patent auf den Einsatz von Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor im Bereich der Erythropoese angemeldet. Mit Hilfe der RT-PCR wurde festgestellt, dass der $P2Y_{11}$-Rezeptor eine Rolle bei der Blutbildung im menschlichen Körper spielt (Fröhlen and Kauschat, 2004). Demnach könnten

Agonisten möglicherweise als Prophylaxe und/oder zur Therapie der Anämie eingesetzt werden.

Die schwedische Arbeitsgruppe um D. Erlinge untersuchte im Rahmen der „Malmö Diät- und Krebsstudie“ (Malmö diet and cancer study), welche Rolle der $P2Y_{11}$-Rezeptor in Bezug auf das Risiko eines akuten Myokard-Infarkts (AMI) spielen kann (Amisten *et al.*, 2007). Dazu untersuchten sie den Einfluss des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) an Position 87 des $P2Y_{11}$-Rezeptors, an der ein Alanin gegen ein Threonin ausgetauscht ist. Außerdem nutzten sie die Messungen der verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren im Rahmen dieser Studie (z. B. Body-Mass-Index, Diabetes mellitus, Blutdruck, C-reaktives Protein, Blutfette usw.), um auch hier einen Zusammenhang zu dem Ala87Thr-Polymorphismus zu finden. In die Untersuchung wurden ca. 10.000 Personen aufgenommen und in eine Kontrollgruppe mit Personen ohne Myokardinfarkt, eine Gruppe mit Personen, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, und eine Gruppe für die Auswertung der kardiovaskulären Risikofaktoren aufgeteilt. Dabei stellte sich heraus, dass der Ala87Thr-Polymorphismus bei einem Fünftel der untersuchten Personen vorlag. Diese Personen zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko, an einem AMI zu erkranken. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei den Personen, die an Position 87 ein Threonin aufweisen, ein erhöhter Spiegel des C-reaktiven Proteins, einem Akut-Phase-Protein, vorliegt. Die Gruppe um Erlinge vermutet deshalb, dass hier ein inflammatorischer Prozess eine Rolle spielt, der mit dem $P2Y_{11}$-Rezeptor zusammenhängt (Amisten *et al.*, 2007).

Wang et al. haben mit Hilfe der RT-PCR die Expression der verschiedenen P2-Rezeptoren auf Lymphozyten, Monozyten und $CD34^+$-Stammzellen untersucht (Wang *et al.*, 2004). Die Arbeitsgruppe fand eine erhöhte Expression des $P2Y_{11}$-Rezeptors gegenüber dem $P2Y_1$-Rezeptor auf Monozyten, eine vergleichbare Expression bei Lymphozyten und auf $CD34^+$-Stammzellen eine geringere Expression des $P2Y_{11}$-Rezeptors gegenüber dem $P2Y_1$-Rezeptor. Conigrave et al. untersuchten den Einfluss von ATP und anderer Nukleotide auf frisch isolierte B-Lymphozyten von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie. Auch hier konnte mit Hilfe der RT-PCR und des pharmakologischen Profils die Expression des $P2Y_{11}$-Rezeptors nachgewiesen werden. Der Rezeptor scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung von normalen B-Lymphozyten zu spielen (Conigrave *et al.*, 2001). Wilkin et al. konnten 2001 außerdem zeigen, dass der $P2Y_{11}$-Rezeptor für die ATP-vermittelte

Maturierung von dendritischen Zellen, die von Monozyten abgeleitet sind, verantwortlich ist. Zum einen zeigte sich eine ähnliche Reihenfolge der Potenzen der verwendeten Nukleotid-Analoge wie sie auch beim rekombinanten $P2Y_{11}$-Rezeptor gefunden wurde, zum anderen wurde eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in den dendritischen Zellen detektiert, die durch die G_s-Kopplung des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu erklären ist (Wilkin *et al.*, 2001).

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des Rezeptors im Immunsystem fand die Gruppe um P. J. Hanley. Sie untersuchte die Rolle von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf humanen Monozyten und ihr Zusammenspiel mit P2-Rezeptoren (Kaufmann *et al.*, 2005). Eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren, z. B. durch Lipopolysaccharide (TLR-4) oder Liganden an TLR2 oder TLR2/6, ruft eine proinflammatorische Reaktion hervor, die eindringende Pathogene eliminieren, aber auch körpereigenes Gewebe schädigen kann. Diese überschießende Reaktion auf Grund der Aktivierung der TLR ist zu vermeiden. Kaufmann et al. fanden heraus, dass dies durch extrazelluläres ATP an menschlichen Monozyten möglich ist. Zum einen begünstigt ATP die Migration von Immunzellen und zum anderen agiert ATP als ein „host tissue damage"- Signal über den G_s-gekoppelten $P2Y_{11}$-Rezeptor. Es erhöht so die cAMP-Konzentration in der Zelle und reguliert negativ das TLR-Signal. Dadurch kann eine überschießende Reaktion und somit eine Schädigung des Gewebes verhindert werden.

Die Gruppe um D. Communi konnte vor kurzem zeigen, dass die Expression von zwei Mediatoren, die in die Immunsuppression involviert sind, durch eine Stimulation von $P2Y_{11}$-Rezeptoren auf humanen dendritischen Zellen durch ATP erhöht wird. Bei diesen Mediatoren handelt es sich um Thrombospondin-1 (TSP-1) und um Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO). TSP-1 ruft durch eine Interaktion mit CD47 einen anti-proliferativen Effekt bei T-$CD4^+$-Lymphozyten hervor. IDO ist ein negativer Regulator der T-Lymphozyten-Proliferation. Dies bedeutet, dass mögliche Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor ein nützliches Werkzeug für die auf dendritischen Zellen basierende Immuntherapie (Immunsuppression) darstellen (Marteau *et al.*, 2005).

1.4 Monozyten und dendritische Zellen

P2-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Modulation des Immunsystems durch ihre Funktion auf verschiedenen Blutzellen, z. B. Monozyten, Mastzellen,

dendritische Zellen, Neutrophile und Eosinophile (Myrtek and Idzko, 2007). In Tab. 1.2 sind Expressionsprofile von P2X- und P2Y-Rezeptoren auf verschiedenen Blutzelltypen zusammengefasst, die mit Hilfe von RT-PCR-Studien bestimmt wurden. Mehrere Forschergruppen konnten zeigen, dass der $P2Y_{11}$-Rezeptor hier, insbesondere auf Monozyten und dendritischen Zellen, eine wichtige Rolle spielt (vgl. Kapitel 1.3).

Tab. 1.2 Expressionsprofil von P2X- und P2Y-Rezeptoren auf verschiedenen humanen Blutzellen, bestimmt mit Hilfe von RT-PCR-Studien. Die Daten wurden aus der Veröffentlichung von Myrtek und Idzko (2007) zusammengefasst.

	P2X-Rezeptoren	P2Y-Rezeptoren
Neutrophile	$P2X_7$	$P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$
Eosinophile	$P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_7$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{14}$
Mastzellen	$P2X_1$, $P2X_4$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$
Lymphozyten	$P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_7$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$
Monozyten/Makrophagen	$P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_7$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$
dendritische Zellen	$P2X_1$, $P2X_4$, $P2X_5$, $P2X_7$	$P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$

Monozyten stellen ca. 6 % der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) dar. Sie werden aus myeloischen Vorläuferzellen über das Stadium der Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen im Knochenmark zu Monozyten ausgebildet. Diese Zellen werden dann ins Blut abgegeben und zirkulieren dort ca. 1 bis 3 Tage. Dann wandern sie ins Gewebe ein, wo sie sich zu Makrophagen ausdifferenzieren. Sie werden durch Chemokine, z. B. Interleukin 8, zu Infektionsherden gelockt (Chemotaxis). Sie docken an die Erregerzellen an und vernichten sie durch Phagozytose (Lyse, Freisetzung von Oxidantien, Proteasen und Entzündungsmediatoren). Außerdem sind Makrophagen in der Lage, eine T-Zellaktivierung durch Präsentation des Antigens auf ihrer Zelloberfläche hervorzurufen. Monozyten sind somit Bestandteil der

angeborenen wie auch der erworbenen Immunantwort im menschlichen Körper (Vollmar and Dingermann, 2005).

Dendritische Zellen (dendritic cells, DCs) spielen im Immunsystem des Menschen ebenfalls eine wichtige Rolle (Banchereau and Steinman, 1998). Bereits 1868 beschrieb Paul Langerhans die nach ihm benannten Langerhans-Zellen der Epidermis, die eine eindrucksvolle Morphologie aufweisen. Langerhans ordnete diese Zellen jedoch dem Nervensystem und noch nicht dem Immunsystem zu. Über die wahre Funktion wurde lange spekuliert. Erst 1973 beschrieben Steinmann und Cohn morphologisch ähnliche Zellen, die sie in der Milz von Mäusen entdeckten (Steinman and Cohn, 1973). Es zeigte sich, dass beide Zelltypen hoch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen sind und eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen (Steinman, 1991). Typisch für dendritische Zellen sind lange Zellausläufer (Zytoplasmafortsätze), die sich baumartig verzweigen (δένδρον (dendron) = griech. für Baum (Abb. 1.5)). Diese Zellausläufer dienen der effektiven Aufnahme von Antigenen und deren Präsentation an der Oberfläche.

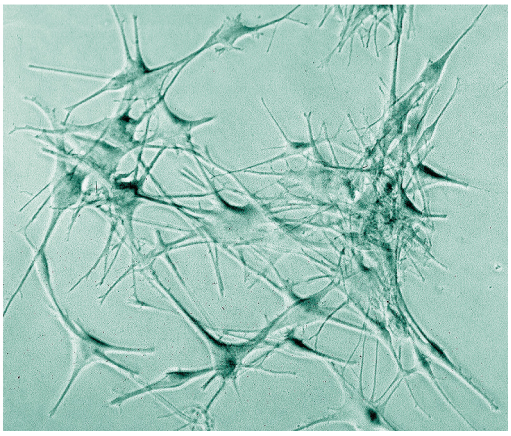


Abb. 1.5 Dendritische Zellen (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Fraunhofer IGB).

Bisher sind dendritische Zellen in allen Organen und Geweben außer dem zentralen Nervensystem und der Hornhaut des menschlichen Auges gefunden worden (Satthaporn and Eremin, 2001). In vivo konnten verschiedene Zelltypen der dendritischen Zellen identifiziert werden, z. B. Langerhans Zellen in der Epidermis oder interdigitierende dendritische Zellen (IDC) in Lymphknoten und anderen lymphatischen Organen (Vollmar and Dingermann, 2005). DCs werden durch die Aufnahme von Antigenen aktiviert. Sie wandern in T-Zellareale lymphoider Gewebe ein und können durch Antigenpräsentation T-Zellen aktivieren. Sie stellen die

potentesten Stimulatoren von T-Zellen dar (Vollmar and Dingermann, 2005; Banchereau and Steinman, 1998).

Es ist sehr schwierig, aus menschlichem Blut oder Gewebe für Untersuchungen ausreichende Mengen dendritische Zellen zu isolieren. Daher war es ein großer Fortschritt als Sallusto et al. und Romani et al. 1994 eine Methode beschrieben, wie aus Monozyten, die aus dem menschlichen Blut isoliert wurden, in vitro durch Behandlung mit GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und IL-4 (Interleukin-4) dendritische Zellen generiert werden können (Romani *et al.*, 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Der $P2Y_{11}$-Rezeptor ist der Prototyp eines ATP-sensitiven Rezeptors und ist ein vergleichsweise wenig untersuchter Rezeptorsubtyp (Burnstock, 2007). Er stellt ein interessantes Target dar, da er anscheinend im Immunsystem, bei der Erythropoese sowie als Risikofaktor beim akuten Myokardinfarkt eine Rolle spielt.

Communi et al. konnten zwei Spleißvarianten des $P2Y_{11}$-Rezeptors im menschlichen Körper identifizieren (Communi *et al.*, 1997; Communi *et al.*, 2001). Diese beiden Rezeptorvarianten, die sich in der Anfangssequenz am Amino-terminalen Ende unterscheiden, sollten auf ihre Vergleichbarkeit hin überprüft werden, da zu Beginn der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit unklar war, ob die unterschiedlichen Anfangssequenzen einen Einfluss auf die Ansprechbarkeit des Rezeptors haben. Dazu sollten die Potenzen verschiedener Nukleotide und Nukleotid-Analoga an diesen Rezeptorvarianten bestimmt werden.

Mit Suramin wurde in der Literatur der erste, wenig selektive Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor beschrieben (Communi *et al.*, 1999). Da auch an anderen P2-Rezeptoren Suramin-Analoge als Liganden beschrieben wurden (Hulsmann *et al.*, 2003; Damer *et al.*, 1998; Bültmann *et al.*, 1996), konnte vermutet werden, dass sich unter den in den Arbeitsgruppen von Prof. Nickel und Prof. Kassack synthetisierten Suramin-Analogen auch Liganden für den $P2Y_{11}$-Rezeptor finden würden. Diese Liganden sollten mit Hilfe eines Grobscreenings identifiziert und anschließend pharmakologisch evaluiert werden.

Die pharmakologische Charakterisierung von Substanzen im rekombinanten System sollte mit Hilfe eines funktionellen Calcium-Assays und eines funktionellen cAMP-Reportergen-Assays durchgeführt werden. Der Effekt der potentesten Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor sollte dann an humanen dendritischen Zellen, die den $P2Y_{11}$-Rezeptor natürlicherweise exprimieren, durch Bestimmung von Thrombospondin-1- und Interleukin-12-Konzentrationen im Zellüberstand mit Hilfe von ELISA-Assays überprüft werden.

Des Weiteren sollten durch die Methode der „site-directed-mutagenesis“ gezielt Punktmutationen am $P2Y_{11}$-Rezeptor eingeführt werden, um mit ihrer Hilfe einige zur Bindung von Liganden notwendige Aminosäuren zu identifizieren. Über diese Aminosäuren war zuvor wenig bekannt. Die Expression der mutierten Rezeptoren sollte mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers in einem FACS®-Assay

detektiert und die Ansprechbarkeit der Rezeptormutanten auf die potentesten Liganden im Calcium-Assay überprüft werden. Da zu Beginn der Arbeit kein gegen den $P2Y_{11}$-Rezeptor gerichteter Antikörper kommerziell erhältlich war, sollte eine Rezeptorvariante erzeugt werden, die am N-terminalen Ende einen sechsfachen Histidin-Rest aufweist und dadurch mit Hilfe eines anti-His-Antikörpers mittels Durchflusszytometrie detektierbar sein sollte.

3 Experimenteller Teil

3.1 Zellbiologisches Arbeiten und Transfektionsversuche

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Geräte und Material

Geräte

Zentrifuge	AVANTI-J25, Beckman, Krefeld
Tischzentrifuge	UNIVERSAL 32 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Inkubator	CO_2 Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, Waltham, USA
Zellzählsystem	CASY®1 Modell TT, Schärfe-System, Reutlingen
Mikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Göttingen
Pipettierhilfe	Accu-Jet, Brand, Wertheim
Pipetten	Eppendorf Research, diverse Größen; Finnpipette, diverse Größen

Material

Zellkulturflaschen Filter Top (T175, T75, T25)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Multiwell-Platten (6-well, 24-well, 96-well), steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
CASY®Cups	Schärfe System, Reutlingen
PP-Röhrchen 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht Starlab, Ahrensburg
Cryoröhrchen 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glas-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim

Chemikalien

Fetal bovine serum (Fötales Kälber-Serum, FKS)	Gibco (10500-064, Lot-Nr.: 3079122), Karlsruhe Sigma-Aldrich (F7525, ch. 114K3397), Taufkirchen
G418 (Geneticin-disulfat)	Carl Roth, Karlsruhe bzw. Calbiochem, San Diego, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma-Aldrich (P0781), Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich (G7513), Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamax-I (= L-Alanyl-L-Glutamin), 4500 mg/l Glucose	Gibco (31966-021), Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 4500 mg/l Glucose	Sigma-Aldrich (D6546), Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12)	Sigma-Aldrich (D6421), Taufkirchen
Trypsin-EDTA 1X (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA)	Sigma-Aldrich (T3924), Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RPMI1640 (am Roswell Park Memorial Institute entwickelt)	Sigma-Aldrich (R8758), Taufkirchen
CASY®ton	Schärfe System, Reutlingen
NaCl (Natriumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogen-phosphat), p.A.	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogen-phosphat), p.A.	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

Zellkulturmedien

DMEM-Medium (Gibco):		500 ml DMEM mit Glutamax-I
	mit	10 % FKS
		100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		400 µg/ml G418 (bei Wildtyp (WT)-Zellen wird dieser Zusatz weggelassen)
DMEM-Medium (Sigma-Aldrich):		500 ml DMEM
	mit	10 % FKS
		100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		4,8 mM L-Glutamin
		400 µg/ml G418 (bei WT-Zellen wird dieser Zusatz weggelassen)
DMEM/F12-Medium		500 ml DMEM/F12
	mit	10 % FKS
		100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		4,8 mM L-Glutamin
RPMI1640-Medium		500 ml RPMI1640
	mit	10 % FKS (Hitze-inaktiviert, 30 min bei 58 °C)
		100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		4 mM L-Glutamin

Puffer

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer	8,0 g NaCl
	1,44 g Na_2HPO_4
	0,24 g KH_2PO_4
	0,20 g KCl
	mit Reinstwasser auf 800 ml auffüllen
	mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

mit Reinstwasser auf 1000 g auffüllen
autoklavieren

Herstellung von G418-Stammlösung

G418 (Geneticin-disulfat) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Aminoglykoside. Es hemmt die Proteinbiosynthese in der Zelle durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen. Dadurch wird sowohl der Beginn der Proteinsynthese als auch die Verlängerung der begonnenen Peptidketten gehemmt. Außerdem ruft die Bindung der Aminoglykoside an die Ribosomen Ablesefehler bei der Translation hervor (Mutschler *et al.*, 2006). Geneticin hemmt in besonderem Maße die Proteinbiosynthese von höheren Organismen (z. B. Säugetierzellen) und wird deshalb nicht in der antibiotischen Therapie eingesetzt. In der Zellbiologie wird es zur Selektion von stabil transfizierten Zellen verwendet. Dazu wird das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen „Neo'" in die Zellen eingeschleust, das für eine bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH) kodiert, die das Geneticin an endständigen Hydroxylgruppen phosphoryliert und damit unwirksam macht (Southern and Berg, 1982).
Das G418-Pulver wurde zu ca. 5 g eingewogen, die Einwaage wurde genau notiert. Mit Hilfe der Aktivität (µg/mg) wurde die Menge Wasser zum Lösen des G418 berechnet, die notwendig ist, um eine Wirkstärke von 100 mg/ml zu erhalten (siehe Formel 1).

Formel 1

$$Wasserzugabe\left[\mu l\right] = \frac{Aktivität\left[\mu g / mg\right] \cdot Einwaage\left[mg\right]}{100\left[mg / ml\right]}$$

Das G418 wurde mit einem Vortexer in der so berechneten Wassermenge gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und zu jeweils 1 ml in sterile 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Um eine Konzentration von 400 µg/ml im Nährmedium zu erreichen, wurden 2 ml der Geneticin-Stammlösung zu 500 ml des Nährmediums gegeben.

3.1.1.2 Zelllinien

1321N1

Die Zelllinie 1321N1 ist eine humane Astrozytom-Zelllinie. Astrozytome sind Tumore die von Astrozyten ausgehen, die zum Stützgewebe des Gehirns gehören. Sie werden deshalb den Gliomen zugeordnet. Die Zelllinie wurde 1972 als Subklon der primären Zelllinie 1181N1 isoliert (Foster and Perkins, 1977). 1181N1 wurde von einer humanen, zerebralen Glioblastoma multiforme isoliert (Ponten and Macintyre, 1968). 1321N1-Zellen wachsen adhärent und wurden in DMEM-Medium mit einem hohen Glucoseanteil kultiviert.

HEK293

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen. Sie wurden 1977 von Graham et al. etabliert. Dazu wurde die primäre Zelllinie HEK, die Anfang der 1960er Jahre aus der Niere eines totgeborenen Fötus gewonnen wurde, mit der DNA von Adenovirus-5 stabil transfiziert (Graham *et al.*, 1977). HEK293-Zellen wachsen adhärent und wurden in DMEM/F12 kultiviert.

3.1.1.3 Durchführung der Zellkultur

Allgemeine Arbeiten

Um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Luftstrom unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die verschiedenen Zelllinien wurden in Gewebekulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C, unter 5 % CO_2 und bei einer relativen Luftfeuchte von 96 % inkubiert. Die CO_2-Konzentration ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Bicarbonat-CO_2-Puffers im Nährmedium. Der Puffer hält den pH-Wert des Nährmediums konstant auf pH 7,2 bis 7,4. Der zugesetzte Indikator Phenolrot zeigt gegebenenfalls eine Abweichung des pH-Wertes an. Im angestrebten pH-Wert-Bereich ist er rot bis orange. Wenn das Medium zu sauer wird, z. B. durch zu lange Kulturdauer der Zellen im gleichen Medium, schlägt die Farbe des Indikators nach gelb um, ist das Medium zu basisch, z. B. durch zu niedrige CO_2-Konzentration im Inkubator, nimmt der Indikator Farben von Dunkelrot bis Lila an.

Da sich die Eigenschaften einer Zelllinie nach längerer Kulturdauer verändern können, wurde eine Zelllinie maximal 12 Wochen in Kultur gehalten.

Adhärent wachsende Zelllinien

Inkulturnahme der Zellen

Zunächst wurden 20 ml des auf 37 °C vorgewärmten Kulturmediums in einer T75-Kulturflasche vorgelegt. Dann wurden die Zellen aus der Cryo-Lagerung bei -196 °C entnommen und im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut. 1 ml der Zellsuspension wurde in die vorbereitete Flasche gegeben. Die Passage der Zellen wurde vermerkt.

Pflege und Vermehrung der adhärent wachsenden Zellen

Am Tag nach der Inkulturnahme wurde das Medium gewechselt, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Dazu wurde durch eine sterile Pasteurpipette mit Hilfe einer Pumpe das Medium vorsichtig aus der Kulturflasche entfernt. Danach wurden 20 ml frisches Nährmedium zugegeben. Zum Füttern der Zellen wurde nach dem gleichen Verfahren verbrauchtes Medium gegen frisches ersetzt. Eine Erneuerung des Mediums fand in der Regel alle 2 bis 3 Tage statt.

Wenn die Zellen ca. 95 bis 100 % des Bodens der Zellkulturflasche bedeckten, das heißt konfluent waren, wurden die Zellen aufgeteilt (gesplittet). Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA bzw. 3 ml sterilem PBS-Puffer gespült.

Nach kurzem Schwenken wurde das Trypsin-EDTA bzw. der PBS-Puffer wieder abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA versetzt. Im Gegenlicht wurde beobachtet, ob sich der Zellrasen von der Zellkulturflasche ablöste. Bei den ersten Anzeichen für das Ablösen wurden ca. 10 ml frisches Nährmedium zum Trypsin-EDTA und den Zellen in die Zellkulturflasche gegeben. Die Zellen wurden durch mehrfaches kräftiges Auf- und Abpipettieren mechanisch von der Wandung der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 266 x g bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Trypsin-EDTA-haltige Medium abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellen (z. B. 1 ml oder 2 Tropfen) wurde zur Weiterkultivierung in eine neue mit 20 bzw. 30 ml Nährmedium befüllte

Zellkulturflasche (T75 bzw. T175) gegeben. Der Rest der Zellen wurde entweder verworfen oder für einen Assay verbraucht. Nach diesem Vorgang wurde die Zelllinie mit einer um eins erhöhte Passagennummer versehen.

Lagerung der Zellen

Um genügend Zellen als Vorrat zu behalten, wurden Zellen mit möglichst niedriger Passage eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgeerntet, in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 266 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Trypsin-EDTA-haltige Medium wurde abgesaugt und die Zellen, je nach Größe der Kulturflasche, mit 2 ml (T75) bzw. 3 ml (T175) einer Mischung aus 90 % FKS und 10 % DMSO resuspendiert. DMSO wird als Cryoprotector eingesetzt, um Zellrupturen durch Kristallbildung von Wasser zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in Mengen von je 1 ml in Cryoröhrchen gefüllt und zunächst bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen dann zur längeren Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt.

Suspensionszellen

Pflege der Zellen

Üblicherweise werden Suspensionskulturen in Roll-Flaschen inkubiert, die sich kontinuierlich drehen und dadurch die Zellen in Suspension halten. Da dies technisch nicht möglich war, wurden die Kulturflaschen in Abständen von 8 bis 12 Stunden geschwenkt, um die Zellen zu resuspendieren. Zum Füttern wurde entweder nur frisches Medium zu der Zellsuspension gegeben oder es wurden ca. 10 ml des Mediums, möglichst ohne Zellen, abgesaugt und das entsprechende Volumen mit frischem Medium wieder aufgefüllt.

3.1.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde das Gerät CASY®1 verwendet. Das Verfahren beruht auf elektrischen Widerstandsmessungen zur Partikel-/Zellmessung. Die Signalauswertung erfolgt mittels Pulsflächenanalyse. Das Verfahren liefert Informationen zu Zellkonzentrationen, Zellvolumina und Aggregationszustand. Für

eine Messung wurden 20 µl der Zellsuspension in ein mit 10 ml sterilfiltriertem CASY®ton befülltes CASY®Cup gegeben und im CASY®1 vermessen.

3.1.2 Plasmidgewinnung

3.1.2.1 Geräte und Material

Geräte

Schüttler	Orbital Shaker, Forma Scientific, Marietta, USA
UV/VIS-Spektrophotometer	Ultrospec 2100 pro, biochrome, Cambridge, Großbritannien

Material und Kits

Petrischalen 100 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Falcon Tubes 2059	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 500 ml, 50 ml	Nalgene, Hereford, Großbritannien
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
imMedia®Amp Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Drigalskispatel	Carl Roth, Karlsruhe
Suprasil® Quarzglas UV-Micro-Küvette	Hellma, Müllheim/Baden

Chemikalien

Trypton	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Carl Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NZamin (Casein Hydrolysat)	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (Natriumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
D-Glucose-Monohydrat, für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
Agar	Merck, Darmstadt

Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, absolut, p.A.	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut, p.A.	Merck, Darmstadt
Glycerol, 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe

Plasmide

pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe

Bakterien-Stämme

E. coli DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
E. coli TOP10´F	Invitrogen, Karlsruhe
E. coli XL-Blue supercompetent Cells	Stratagene, La Jolla, Canada

Puffer und Lösungen

Bakterien-Medien

LB-Medium	5,0 g Trypton
	2,5 g Hefe-Extrakt
	5,0 g NaCl
	ad 500 ml H_2O (pH 7,4)
LB-Amp-Medium	500 ml LB-Medium
	1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)
SOC-Medium	2,0 g Trypton
	0,5 g Hefe-Extrakt
	0,05 g NaCl
	95 ml H_2O
	1 ml 250 mM KCl-Lösung
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen,
	autoklavieren und im Kühlschrank lagern
	vor Gebrauch Zufügen von:
	0,5 ml 2 M $MgCl_2$-Lösung
	2 ml 1 M Glucose-Lösung

NZY^+ Broth-Medium	1 g NZamin
	0,5 g Hefe-Extrakt
	0,5 g NaCl
	auf 100 ml mit H_2O auffüllen
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen,
	autoklavieren
	vor Gebrauch Zufügen von:
	1,25 ml 1 M $MgCl_2$-Lösung
	1,25 ml 1 M $MgSO_4$-Lösung
	2 ml 1 M Glucose-Lösung
LB-Amp-Agar	500 ml LB-Medium
	1,5 % Agar
	1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)

Puffer-Zusammensetzungen

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der Puffer aus dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit bzw. dem Plasmid Mini Kit von Qiagen gemäß Spezifikation des Herstellers zusammengestellt:

Puffer P1 (Resuspendierungspuffer)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA,
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysepuffer)	200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)
Puffer P3 (Neutralisierungspuffer)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT (Äquilibrierungspuffer)	750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0),
	15 % Isopropanol, 0,15 % Triton X-100
Puffer QC (Waschpuffer)	1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0),
	15 % Isopropanol
Puffer QN (Elutionspuffer)	1,6 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0),
	15 % Isopropanol
Puffer TE	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Puffer ER (EndoFree Plasmid Maxi Kit)	Zusammensetzung nicht spezifiziert

3.1.2.2 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in eine Wirtszelle. Die meisten Bakterien nehmen Fremd-DNA nur in sehr begrenztem Umfang auf. Um Bakterien transformieren zu können, müssen sie chemisch und/oder physikalisch behandelt werden (z. B. Behandlung von E. colis mit $CaCl_2$ bei 0 °C). So behandelte Zellen werden als kompetente Bakterien bezeichnet. In dieser Arbeit wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des Hitzeschock-Verfahrens in Zellen eingebracht.

Herstellung von LB-Amp-Agar und Gießen von Agar-Platten

500 ml LB-Medium wurden mit 1,5 % (= 7,5 g) Agar versetzt. Die Agar-LB-Medium-Mischung wurde im Wasserbad auf ca. 60 °C erhitzt und so lange geschüttelt, bis sich das Agar gelöst hatte. Anschließend wurde die Mischung autoklaviert. Nachdem das Medium auf 50 °C abgekühlt war, wurde 1 ml einer sterilfiltrierten Ampicillin-Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml hinzugegeben und der Agar blasenfrei in Petrischalen ausgegossen. Oberflächenblasen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze an den Rand der Schale gezogen oder mit Hilfe einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Die Petrischalen wurden nach vollständiger Abkühlung bis zum Gebrauch umgedreht im Kühlschrank gelagert.
Für die Kontrollreaktion der Mutagenese wurden spezielle Ampicillin-Agarplatten hergestellt, die für ein Blau-Weiß-Screening geeignet sind. Dafür wurde ein Beutel von imMedia® Amp Blue, das bereits Ampicillin, X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) enthält, in 200 ml Wasser in der Mikrowelle bei mittlerer Stufe erhitzt, bis das Pulver vollständig gelöst war. Der Agar wurde wie oben beschrieben in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Platten bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

Durchführung

Plasmid-DNA und kompetente E. colis wurden auf Eis über einen Zeitraum von etwa einer Stunde aufgetaut. Danach wurden 100 µl (DH5α, TOPO 10´F) bzw. 50 µl (XL1-Blue Supercompetent Cells) der Bakteriensuspension in ein auf Eis gekühltes Falcon-Tube 2059 pipettiert. 1 µl der konzentrierten Plasmid-Lösung (Konzentration ca. 100 ng/µl) wurde dazugegeben. Die Mischung wurde 30 min auf Eis stehen gelassen. Nun wurde das Falcon mit der DNA-Bakterien-Mischung für 45 sec in ein

42 °C warmes Wasserbad gehalten. Dieser Ansatz wurde noch einmal für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 500 µl auf 42 °C vorgewärmtes SOC-Medium (DH5α, TOPO 10´F) bzw. NZY$^+$ Broth-Medium (XL1-Blue Supercompetent Cells) zu dem Ansatz gegeben und für eine Stunde auf einem Schüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. In dieser Zeit werden von den Bakterien β-Lactamasen gebildet, die später auf ampicillinhaltigem Agar das Überleben der Zellen ermöglichen. Die Resistenz gegen β-Lactam-Antibiotika durch Bildung von β-Lactamasen ist auf dem transformierten Plasmid, hier pcDNA3.1(+), codiert.

Ausplattieren der Bakterien

Es wurden jeweils 150 µl, 100 µl und 80 µl der Bakterienlösung auf je eine LB-Amp-Agarplatte pipettiert. Im Falle der XL1-Blue Supercompetent Cells mit mutierter DNA wurden 250 µl der Bakterienlösung auf je eine Platte gegeben. Dazu wurde der Drigalskispatel in Isopropanol getaucht und in einer Bunsenbrennerflamme abgeflämmt. Nach dem Abkühlen des Drigalskispatels wurde die auf die Agarplatte aufgebrachte Flüssigkeit mit Hilfe des Spatels verteilt. Die beimpften Agarplatten wurden für ca. 16 bis 18 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert.

Selektion und Vermehrung der transformierten Bakterien

Die Agarplatten wurden nach der Inkubation auf Wachstum von Bakterienkolonien kontrolliert. Für die weiteren Arbeiten wurde jeweils die Agarplatte verwendet, die die meisten klar abgegrenzten Bakterien-Kolonien aufwies. Von dieser Platte wurden jeweils zwei Kolonien in freier Umgebung mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse gepickt und in 50 ml PP-Röhrchen mit 12 ml sterilem LB-Amp-Medium gegeben. Die Deckel der PP-Röhrchen wurden nur lose aufgelegt, um eine Luftzufuhr zu gewährleisten. Die Gefäße wurden bei 37 °C und 200 rpm 8 Stunden geschüttelt. Am Ende der Inkubationszeit wurde anhand der Trübung der Bakteriensuspension überprüft, welcher der beiden Ansätze besser gewachsen war. Eine stärkere Trübung weist auf ein stärkeres Wachstum hin.

Für die Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA wurde eine Maxi-Prep durchgeführt. Dafür wurde ein PP-Röhrchen pro Ansatz ausgesucht und komplett in einen 2 l-Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml LB-Amp-Medium überführt. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm für 16 Stunden über Nacht geschüttelt

(Übernachtkultur, große Schüttelkultur). Aus dieser Kultur wurde die Plasmid-DNA isoliert.
Für die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde aus den 12 ml-Ansätzen jeweils ein Tropfen in ein neues PP-Röhrchen mit 4 ml LB-Amp-Medium überführt. Dieser Ansatz (kleine Schüttelkultur) wurde für ca. 8 bis 12 Stunden geschüttelt.

Herstellung und Verwendung eines Glycerolstocks

Aus der Übernachtkultur wurde eine Rückstellprobe der transformierten Bakterien gewonnen. Dazu wurden 900 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl einer sterilen 60%igen Glycerollösung versetzt. Die Mischung wurde in ein Cryovial gegeben und bei -80 °C eingefroren. Aus diesem Glycerolstock wurde bei Bedarf ein wenig des gefrorenen Bakterienmaterials entnommen und direkt in die kleine Schüttelkultur mit 12 ml LB-Amp-Medium gegeben (s.o.).

3.1.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA

Je nach benötigter Menge DNA wurden entweder eine Mini-Prep (Bakterien aus 4 ml LB-Amp-Medium; entspricht bis ca. 20 µg Plasmid-DNA) oder eine Maxi-Prep (Bakterien aus 250 ml LB-Amp-Medium; entspricht bis ca. 500 µg Plasmid-DNA) durchgeführt. Dazu wurden Kits der Firma Qiagen benutzt. Die Plasmid-Isolierungen wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Daher werden hier nur allgemeine Vorgehensweisen vorgestellt, die für beide Kits gelten. Die Informationen wurden aus dem Qiagen Plasmid Handbuch (erschienen: 01/2000) entnommen.
Die Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe der Qiagen-Produkte basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix (Qiagen Resin). Bei niedriger Salzkonzentration werden die isolierten Bestandteile an den Anionenaustauscher gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration werden Verunreinigungen wie RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Stoffe entfernt. Zum Schluss wird bei hohen Salzkonzentrationen die Plasmid-DNA aus der Säule eluiert, mit Hilfe von Isopropanol gefällt und aufkonzentriert.
Abhängig vom Replikationsursprung (origin of replication, ORI) des verwendeten Vektors werden die Plasmide in high- oder low-copy-Plasmide (Anzahl der Kopien) eingestuft. Der verwendete Expressionsvektor pcDNA3.1(+) besitzt eine pUC origin

und gehört damit zu einem high-copy-Plasmid. Die Einstufung hängt jedoch zusätzlich von der Größe des Plasmids und des jeweiligen Inserts (cDNA-Sequenz des zu exprimierenden Gens) ab.

Durchführung

Aus der Übernachtkultur wurden Bakterien in entsprechend große Zentrifugengläser überführt und abzentrifugiert. Nach dem Ernten wurden die Bakterien im Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe des Puffers P2 (NaOH-SDS) in Anwesenheit von RNase A lysiert. Die RNase A soll vorhandene RNA spalten, da RNA-Fragmente unter den gegebenen Bedingungen nicht an die Anionenaustauscher-Matrix binden. Durch das SDS wurden Phospholipide und Proteine aus der Zellmembran herausgelöst und damit der Zellinhalt der Bakterien freigesetzt. Die Natronlauge denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA ebenso wie Proteine. Unter diesen Bedingungen dürfen die Bakterien nicht zu lange verbleiben, da möglichst nur Plasmid-DNA, nicht aber chromosomale DNA freigesetzt werden soll. Außerdem wird die Plasmid-DNA bei zu langer Lyse irreversibel denaturiert. Durch Zugabe des Puffers P3 (Kaliumacetat) wurde das Lysat neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration bewirkt die Ausfällung des SDS, das dabei denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer einschließt. Die kleinere Plasmid-DNA renaturiert dagegen und bleibt in Lösung. Die Reaktionsgefäße wurden leicht geschwenkt, damit die Präzipitation vollständig ablaufen konnte. Die Gefäße dürfen nicht zu stark geschüttelt werden, da chromosomale DNA durch die Scherkräfte in Fragmente überführt wird. Diese Fragmente würden dann ebenfalls in Lösung bleiben und die Plasmid-DNA verunreinigen. Beim Mini-Prep-Protokoll wurde das Lysat zentrifugiert, um das Präzipitat und die Zelltrümmer abzutrennen. Beim Maxi-Prep-Protokoll wurde das Lysat über eine Qiafilter-Filtrationseinheit abgetrennt.

Anschließend wurde das gereinigte Lysat über das equilibrierte, mit einer Anionenaustauscher-Matrix gefüllte Qiagen-tip gegeben. Die Säule wurde mit einem Puffer mittlerer Ionenstärke (Puffer QC) gewaschen, um gebundene RNA und Proteine zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Hochsalz-Puffer (Puffer QN) aus der Säule gewaschen. Die eluierte Plasmid-DNA wurde nun durch eine Isopropanol-Fällung entsalzt und aufkonzentriert. Das Pellet wurde nach einer Zentrifugation noch einmal mit Ethanol gewaschen und getrocknet und in einer

kleinen Menge TE-Puffer wieder gelöst. Zur längeren Lagerung wurde die Plasmid-Lösung bei -20 °C eingefroren.

Entfernen von Endotoxinen

Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien (z.B. E. coli). Es sind Lipopolysaccharide (LPS), die aus dem Lipoid A, dem „Core"-Polysaccharid und einer O-spezifischen Polysaccharidkette (O-Antigen) bestehen. Das Lipoid A ist für die toxische Wirkung verantwortlich. Endotoxine werden während der Wachstumsphase in kleinen Mengen und beim Absterben der Bakterien in großen Mengen freigesetzt.

Endotoxine können einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz empfindlicher Zellen haben. Daher müssen diese Moleküle bei der Plasmidisolation entfernt werden. Dazu bietet Qiagen einen speziellen Puffer (Puffer ER) an, der dafür sorgt, dass die Endotoxine nicht an die Anionenaustauscher-Matrix binden und dadurch von der Plasmid-DNA abgetrennt wurden.

3.1.2.4 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt in einem UV/Vis-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Diese Messung wird in einer Mikro-Quarzküvette durchgeführt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Stassen, 2002). Die UV-Messung kann auch genutzt werden, um eine Kontamination des Plasmid-DNA-Präparats mit Proteinen zu detektieren. Dazu wird die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei 280 nm ausgenutzt. Es wird der Quotient der Extinktionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) gebildet. Ist das DNA-Präparat frei von Proteinen liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 (Stassen, 2002).

Die Plasmid-Lösung wurde 1:50 in TE-Puffer verdünnt und mit Hilfe der Quarz-Mikroküvette im Spektrophotometer bei 260 nm und 280 nm vermessen.

3.1.3 Herstellung von P2Y-Rezeptor exprimierenden Zellen

3.1.3.1 Transfektionsvektor

Für die Expression von P2Y-Rezeptoren wurde der eukaryonte Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Karlsruhe) mit einer Größe von ca. 5,4 kb verwendet (Abb. 3.1). Das Plasmid besitzt einen Promotor aus dem Cytomegalievirus (P_{CMV}), der vor der Multiple Cloning Site (MCS) liegt. Er sorgt dafür, dass das Insert, das in der MCS liegt, effizient abgelesen und exprimiert wird. BGH pA (Bovine Growth Hormone Polyadenylation Signal) hängt der mRNA nach dem Ablesen ein PolyA-Segment an und bewirkt damit die Termination des Ablesens und eine Stabilisierung der mRNA. SV40 ori ist ein starker Promotor vor dem Neomycin-Resistenz-Gen und SV40 pA hängt das PolyA-Segment an. Die pUC origin bewirkt eine Replikation mit hoher Kopienzahl in E. coli. Das Ampicillin-Resistenz-Gen (β-Lactamase) erlaubt eine Selektion der Bakterien.

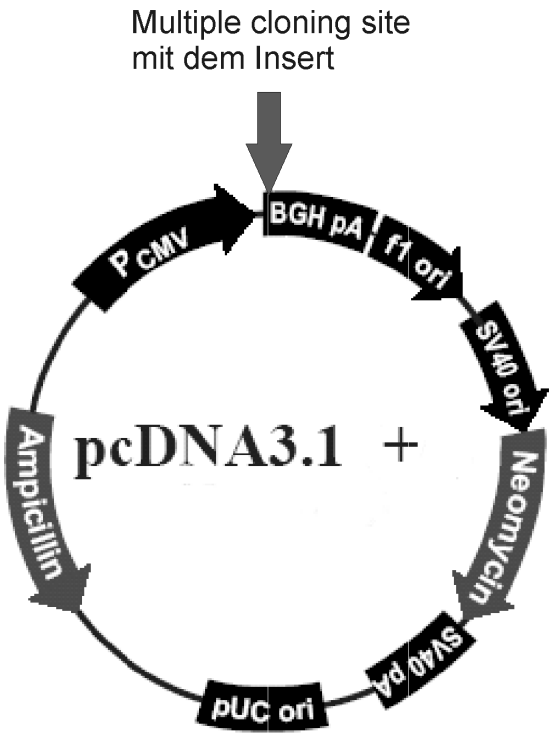


Abb. 3.1 Struktur des Transfektionsvektors pcDNA3.1(+).

Die Plasmide mit der für $P2Y_1$- (Gene Bank Accession Number: AY136752), $P2Y_2$- (AY136753), $P2Y_6$- (AF498920) und $P2Y_{11}$-Rezeptoren (AY449733) kodierenden cDNA wurden vom Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org) bezogen.

Mit Unterstützung von Prof. Schmalzing, Aachen, wurde durch Mutation ein sechsfacher Histidin-Rest an das Amino-terminale Ende des $P2Y_{11}$-Proteins kloniert ($hisP2Y_{11}$). Mit Hilfe dieses Vektors wurden die mutierten Rezeptoren erzeugt (siehe Kapitel 3.3).

3.1.3.2 Transfektion

Geräte und Material

Material

Cellstar Zellkulturschale 100 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkultur-Multiwell-Platten (6-well, 24-well, 96-well), steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht bzw. Starlab, Ahrensburg

Chemikalien

Polyfect	Qiagen, Hilden
G418 (Geneticin-disulfat)	Carl Roth, Karlsruhe bzw. Calbiochem, San Diego, USA
DMEM ohne Zusätze	Gibco, Karlsruhe bzw. Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Allgemeines

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA bzw. -RNA in eukaryontische Zellen eingeschleust. Es wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird die DNA in die Zelle eingebracht, jedoch nicht ins Genom aufgenommen, bei der stabilen Transfektion dagegen wird die eingebrachte DNA dauerhaft in das Genom der Zelle integriert. Es sind mittlerweile viele verschiedene Methoden zur Transfektion entwickelt worden, darunter physikalische, chemische und biologische Verfahren. Die in dieser Arbeit angewandte Methode gehört zu den chemischen Verfahren. Das verwendete Reagenz Polyfect ist ein kationisches Dendrimer. Es besitzt eine kugelförmige Struktur mit vom Kern ausgehenden Ästen. Diese Äste besitzen am Ende positiv

geladene Aminogruppen, die mit der negativen Ladung der Phosphatgruppen der DNA interagieren. Ein DNA-Molekül kann so von vielen Polyfect-Molekülen eingeschlossen werden. Dieser Komplex kann sich nun an die Oberfläche der Zelle binden und über unspezifische Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Durch die spezielle Formulierung des Polyfect-Reagenzes wird nach der Aufnahme in die Zelle und der Verschmelzung des Polyfect/DNA-Komplexes mit Lysosomen der pH-Wert in den Lysosomen so abgepuffert, dass die lysosomalen Nukleasen inhibiert werden und so die DNA nicht zerstört wird.

Durchführung der Transfektion

Am Tag vor der Transfektion wurden 1321N1-WT-Zellen wie beim „Splitten“ (siehe Kapitel 3.1.1.3) von der Kulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die Anzahl der Zellen wurden mit Hilfe des CASY®1 bestimmt (siehe Kapitel 3.1.1.4). Es wurden 8×10^5 Zellen in eine 100 mm Zellkulturschale ausgesät, die zuvor mit 7 ml Medium beschickt wurde. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 40 - 80 % aufweisen.

Zunächst wurden 4 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA als Lösung mit einer minimalen DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl mit Medium ohne Serum, Proteinen oder Antibiotika auf ein Volumen von 150 µl verdünnt. Die Lösung wurde homogenisiert und für wenige Sekunden zentrifugiert, um die Tropfen vom Deckel des 1,5 ml Reaktionsgefäßes zu entfernen. Anschließend wurden 40 µl des Polyfect-Transfektions-Reagenz zur DNA-Lösung dazugegeben. Die Probe wurde durch 10 s auf einem Schüttler gemischt und dann für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bilden sich die DNA-Polyfect-Komplexe. Es ist wichtig, dass bei diesem Schritt weder Serum noch Proteine oder Antibiotika anwesend sind, da diese Stoffe in die Komplexbildung eingreifen und die Effizienz deutlich mindern würden.

Währenddessen wurde von der Zellkulturschale das Medium abgenommen und die Zellen mit 6 ml neuem Medium (mit FKS und Antibiotika) versetzt. Nach der Inkubation der Plasmid-DNA mit dem Polyfect-Reagenz wurde 1 ml Medium (mit FKS und Antibiotika) zum Reaktionsansatz pipettiert und durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde sofort auf die Zellen in der 100 mm Zellkulturschale gegeben. Dabei wurde die Zellkulturschale vorsichtig bewegt, um

eine gleichmäßige Verteilung der Komplexe sicherzustellen. Die Zellen wurden nun wieder bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Bei der transienten Transfektion wurden die Zellen maximal 72 h mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Zellen wurden, falls sie gefüttert werden mussten, mit Medium ohne G418-Zusatz versetzt.

Bei der stabilen Transfektion wurde bei den Zellen je nach Konfluenz nach 24 bis 48 h das Transfektionsreagenz-haltige Medium gegen G418-haltiges Medium ausgetauscht.

Klonale Selektion bei der stabilen Transfektion

Nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums G418 kultiviert. Die Wirkung des G418 setzte nach ca. einer Woche in Form eines deutlichen Absterbens der Zellen ein. Wurden die Zellen in dieser Zeit trotzdem in der Schale konfluent, wurden sie gesplittet und auf mehrere Zellkulturschalen verteilt.

Nur eine Zelllinie, die aus einer einzigen Zelle hervorgegangen ist, kann ein dauerhaftes und reproduzierbares Ergebnis liefern. Daher sollten einzelne Zellklone isoliert werden. Dazu wurden nach ca. zwei Wochen die Zellen mit Hilfe von Trypsin wieder von den Zellkulturschalen abgelöst, abzentrifugiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und dann rein rechnerisch auf 1 Zelle pro 200 µl Medium eingestellt. Diese Mischung wurde unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:2, 1:5 und 1:10 mit einer Multikanal-Pipette mit einem Volumen von 200 µl in sterile 96-well-Mikrotiterplatten für Zellkultur pipettiert. Die Platten wurden dann unter dem Mikroskop untersucht. Lagen zu viele Zellen in einem well vor, wurde die Mischung noch einmal verdünnt. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag nach dem Aussähen wurden die Platten noch einmal unter dem Mikroskop kontrolliert. Jede Kavität mit nur einer Zelle wurde gekennzeichnet und im Verlauf der folgenden Tage beobachtet. In vielen Fällen starben weitere Zellen zum einen durch den Selektionsdruck, zum anderen auf Grund fehlender Zellkontakte ab. Vermehrten sich die Zellen in den markierten Kavitäten, wurden sie weiter gezüchtet. Von den erhaltenen Zellklonen wurden je mindestens fünf Backups eingefroren.

3.2 Restriktionsanalyse der Plasmide mit Hilfe der Gelelektrophorese

3.2.1 Geräte und Material

Geräte

Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
Bio-Rad Power Pac 200	Bio-Rad, München
Intas Multi-Darkbox, Intas UV-Kasten (Weißlicht und 312 nm UV), Intas Manuelles Zoom Objektiv, Sony Intas Video Graphic Printer UP-890CE	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Material

1,5 ml Mikroreaktionsgefäße	Starlab, Ahrensburg

Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, [0,5 µg/µl] mit 6x Gel-Ladepuffer	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
SYBR® Green II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma®-Base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CH_3COOH (Essigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Enzyme

XhoI	Promega GmbH, Mannheim
EcoRI	Promega GmbH, Mannheim
BamHI	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot

KpnI	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
XbaI	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot

Puffer und Lösungen

50x TAE-Puffer	2 M Trizma®-Base pH 10,5 - 12,0 1 M CH_3COOH 50 mM EDTA in H_2O lösen, pH 8,5 einstellen und autoklavieren
1x TAE-Puffer	50x TAE-Puffer 1:50 mit H_2O verdünnen
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 7,5
SYBR®-Green-II-Lösung	SYBR® Green II 1:100 in 1x TE pH 7,5 verdünnen und aliquotieren, Aliquots bei -20 °C lagern

3.2.2 Durchführung

3.2.2.1 Enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

Zur Analyse der DNA wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen in definierte Bruchstücke gespalten. Dazu wurden für das jeweilige Plasmid zwei Enzyme ausgesucht, die in der Nähe des jeweiligen Inserts schneiden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Verwendete Enzyme für die Restriktionsanalyse mit Angabe der Größe der erwarteten Fragmente.

	Restriktions-enzym 1	Restriktions-enzym 2	Erwartete Größe des Fragments
pcDNA3.1(+) -$P2Y_1$	BamHI	XhoI	1134 bp
pcDNA3.1(+) -$P2Y_2$	BamHI	XhoI	1154 bp
pcDNA3.1(+) -$P2Y_{11}$	EcoRI	XhoI	1134 bp
pcDNA3.1(+)-his$P2Y_{11}$	XbaI	KpnI	1181 bp

Dazu wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA mit 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffers und 2 µl des ersten Restriktionsenzyms in einem Reaktionsvolumen von 20 µl bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die einmal geschnittene Plasmid-DNA wurde dann mit Hilfe von Natriumacetat und Ethanol ausgefällt (siehe Kapitel 3.3.4) und mit 2 µl des entsprechenden zehnfach konzentrierten Puffers und 2 µl des zweiten Restriktionsenzyms in einem Reaktionsvolumen von 20 µl bei 37 °C für 3 h inkubiert.

3.2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA

Entsprechend der Größe der erwarteten Fragmente (ca. 1,2 kb für die Inserts und 5,4 kb für das restliche Plasmid) wurde ein 0,9%iges Agarose-Gel hergestellt, das einen Bereich von 0,5 bis 7 kb abdeckt (Schrimpf, 2002). Zur Herstellung wurde die entsprechende Menge Agarose in ein Becherglas eingewogen und mit 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 50 - 60 °C wurde das Gel in eine vorbereitete Form gegossen. Luftblasen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze an den Rand gezogen. Sobald das Gel erstarrt war, wurde es in die Laufkammer gestellt und vollständig mit dem Laufpuffer (1x TAE-Puffer) bedeckt.

10 µl der Plasmid-DNA aus dem Enzymverdau wurden mit 5 µl eines Ladepuffer-Gemisches (1 Teil 6x Gel-Ladepuffer + 1 Teil SYBR®-Green-II-Lösung) versetzt. 2,5 µl des gleichen Ladepuffer-Gemisches wurden zu 5 µl des DNA-Größenstandards gegeben. Die Proben wurden nun vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Danach wurde die Laufkammer angeschlossen und das Gel bei 125 V 45 min laufen gelassen.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel aus der Kammer genommen und mit Hilfe des Intas-Systems unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

3.3 Mutagenese und Mutationsanalyse

3.3.1 Geräte und Material

Geräte

Thermocycler	Opticon™ DNA Engine, MJ Research, Waltham (MA), USA

Material

PCR-Reaktionsgefäße: 8er-Streifen, klar (thin-walled tubes) + ultraklare Deckel	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen:	
2,5 µl Safe Sale-Tips	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
0,5 - 10 µl Filter Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg
1 - 100 µl Bevelled Filter Tips	

Chemikalien und Kits

Ampuwa (Reinstwasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (30 reactions)	Stratagene (Cat.No:200518), La Jolla, USA
imMedia® Amp Blue	Fluka-Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol, reinst (HPLC-grade)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$NaCH_3COO$ (Natriumacetat), p.A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene, La Jolla, USA

3.3.2 Allgemeines

3.3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion, engl. Polymerase Chain Reaction (PCR), wurde als erstes 1986 von Mullis et al. beschrieben (Mullis *et al.*, 1986). Diese Methode wird verwendet, um DNA in vitro ohne Einsatz von Mikroorganismen exponentiell zu vermehren. Dazu wird ein Gemisch aus der zu vermehrenden DNA (Matrize), zwei kurzen DNA-Strängen, die jeweils komplementär zu bestimmten Sequenzen Ursprungsstrang sind (Oligonukleotide oder Primer), einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z. B. Taq- oder PfuTurbo®-Polymerase) und Desoxynukleotid-triphosphaten (dNTPs) in einem spezifischen Puffer hergestellt. Dieses Gemisch wird in einen Thermocycler gegeben. Zunächst wird die Mischung auf 94 - 96 °C erhitzt. Dabei trennen sich die Stränge der doppelsträngigen DNA (Denaturierung/ Melting). Dann wird die Temperatur wieder auf ca. 3 °C unter die Schmelztemperatur der Primer (ca. 50 - 65 °C) gesenkt, damit sich die Primer spezifisch an die DNA anlagern können (Primer Annealing). Danach wird die Temperatur leicht erhöht, je nach verwendeter Polymerase auf 68 - 72 °C. Hier verlängert die Polymerase beginnend an den angelagerten Primern den DNA-Strang (Elongation). Der Zyklus aus Melting – Annealing – Elongation beginnt wieder von vorne. Da bei jedem neuen Zyklus die zuvor synthetisierten Stränge als Matrize mitbenutzt werden können, wird die Ziel-DNA exponentiell vermehrt.

3.3.2.2 Gerichtete Mutation (site-directed mutagenesis)

Die site-directed mutagenesis beruht auf dem Prinzip der PCR (siehe Kapitel 3.3.2.1). Dazu werden zwei komplementäre Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, als Primer synthetisiert. Diese Mutagenese-Primer können sich nach der Denaturierung an die Plasmid-DNA anlagern. Die Polymerase erzeugt dann in der PCR an der DNA-Matritze neue, mutierte Plasmide, die versetzt auf beiden Strängen einen Strangbruch aufweisen. Nach Transformation in XL1-Blue Supercompetent Cells werden diese Strangbrüche repariert.

Für diese Methode wurde ein kommerziell erhältliches Kit (QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) verwendet (Abb. 3.2).

Bei der PCR wurde als Polymerase die *PfuTurbo*®Polymerase benutzt. Diese Polymerase kann DNA-Doppelstränge bis zu 10 kb amplifizieren. Sie besitzt eine

proof-reading-Funktion, das heißt, die Polymerase ist in der Lage, den Einbau der Basen zu kontrollieren und bei einem Fehler das unpassende Nukleotid wieder zu entfernen. Die *PfuTurbo*®Polymerase kann damit die Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation mit hoher Genauigkeit vermehren.

Am Ende der PCR enthält das Reaktionsgefäß zwei Sorten von DNA, zum einen die gewünschte, neusynthetisierte DNA mit der Mutation und zum zweiten die unveränderte Matrizen-DNA.

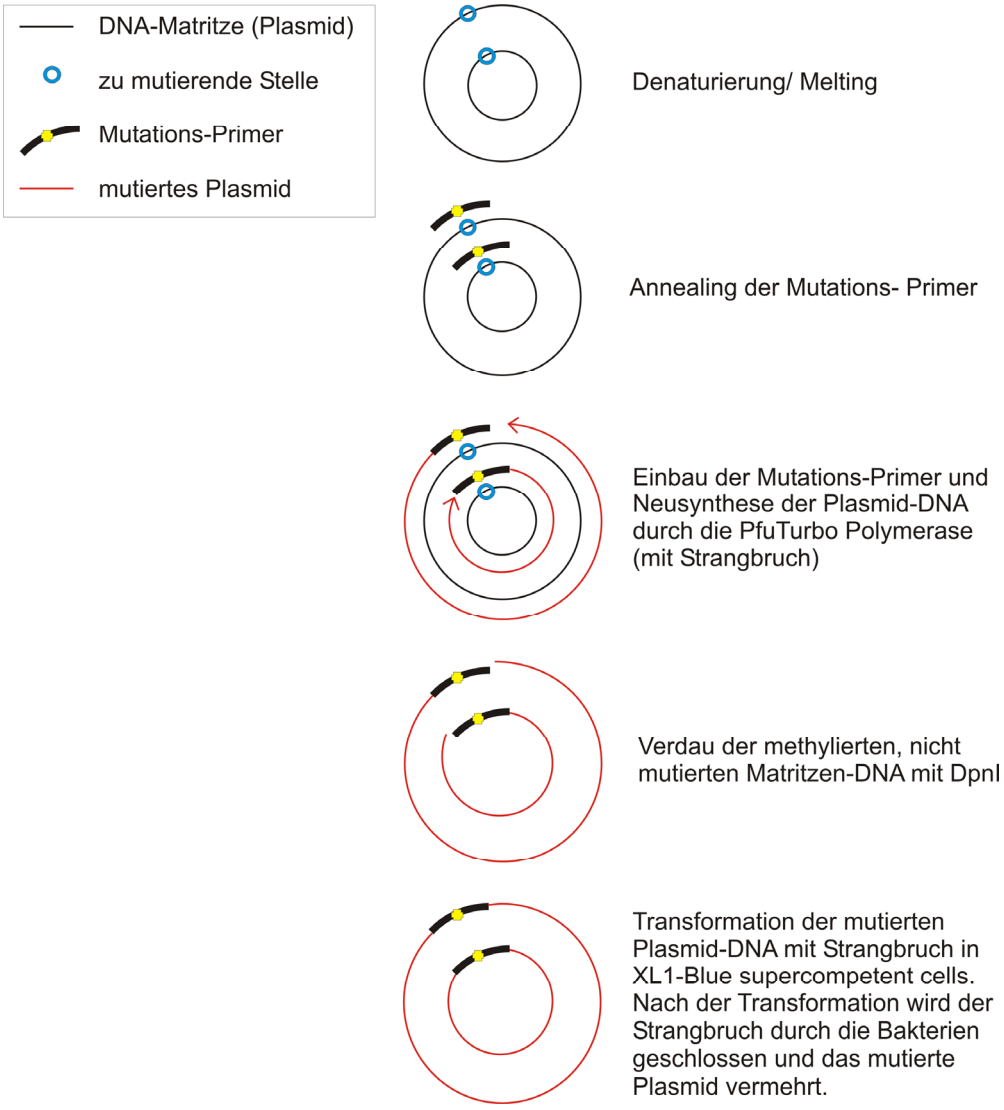


Abb. 3.2 Prinzip der verwendeten Mutagenese-Methode.

Um diese beiden DNA-Sorten zu trennen, wird der Reaktionsansatz vor der Transformation mit dem Restriktionsenzym DpnI-Endonuklease versetzt. Dieses Enzym verdaut methylierte DNA. Es spaltet spezifisch methylierte $G^{Me6}ATC$-Sequenzen (Lacks and Greenberg, 1977). Da die eingesetzte Matrizen-DNA aus

einem E. coli-Bakterien-Stamm isoliert wurde, der Plasmid-DNA methyliert (DH5α: dam$^+$), kann sie mit diesem Enzym selektiv abgebaut werden. Die in der PCR neu gebildete, mutierte DNA ist hingegen nicht methyliert und wird somit auch nicht angegriffen. Nach diesem Schritt enthält der Ansatz also nur noch die gewünschte, neu synthetisierte DNA (PCR-Produkt) (Abb. 3.2).

3.3.2.3 Kontroll-Reaktion für die Mutagenese

Das beim QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit mitgelieferte Plasmid pWhitescript™ 4.5-kb wird dazu benutzt, die Effizienz der Mutagenese-Reaktion zu kontrollieren. Es besitzt ein Stopp-Codon (TAA) an der Position eines Glutamin-Codons (CAA) im β-Galaktosidase-Gen. Die ebenfalls mitgelieferten Mutations-Primer rufen eine Punktmutation in dem pWhitescript™-Plasmid hervor, wobei das Thymin im Stopp-Codon (TAA) zu einem Cytosin mutiert wird (CAA). Dadurch wird die Funktionalität des β-Galaktosidase-Gens wieder hergestellt.

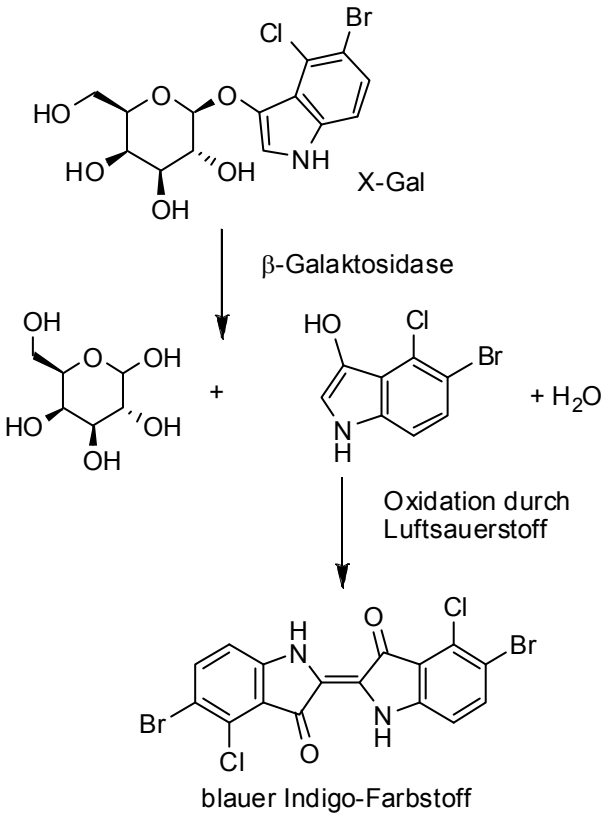


Abb. 3.3 Farbreaktion von X-Gal durch Umsetzung durch die β-Galaktosidase. X-Gal wird zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgewandelt. Die Bakterien mit der Mutation erscheinen blau auf dem Nährboden.

IPTG induziert die Produktion der β-Galaktosidase. X-Gal ist ein Substrat der β-Galaktosidase und wird zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt (Abb. 3.3). Wenn Bakterien mit dem pWhitescript™-Plasmid transformiert werden, erscheinen sie auf LB-Amp-Agarplatten, die IPTG und X-Gal enthalten, auf Grund des fehlerhaften β-Galaktosidase-Gens weiß. Nach der Transformation mit dem mutierten Plasmid erscheinen die Kolonien dagegen blau, wenn die Mutation erfolgreich war.

3.3.3 Durchführung

3.3.3.1 Primer Design

Nach Festlegung der gewünschten Mutationen wurden die jeweiligen Primer entworfen. Hierfür wurden folgende Vorgaben beachtet:

- Die Primer sollten 25 - 45 bp lang sein.
- Der Schmelzpunkt der Primer („T_m“) sollte bei > 78 °C liegen. Er wurde nach Formel 2 aus der Anleitung des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits berechnet:

Formel 2

$$T_m = 81{,}5 + 0{,}41 \times (\%GC) - \frac{675}{N} - \%Austausch$$

  wobei „%GC“ der prozentuale Anteil der Basen Guanin und Cytosin, „%Austausch“ der prozentuale Anteil der mutierten Nukleotide innerhalb der Primersequenz und „N“ die Primerlänge ist.
- Die Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen und von 10 - 15 bp eingeschlossen werden, die die richtige Sequenz besitzen.
- Im Idealfall sollten die Primer einen Gehalt von mind. 40 % GC (Guanin und Cytosin) besitzen und an den Enden mehr als ein G oder C aufweisen.
- Die Primer mussten gereinigt werden (HPLC oder besser PAGE).
- Die Primer sollten im Überschuss eingesetzt werden.

Ein hoher Guanin-Cytosin-Gehalt der Primer (> 40 % GC) ist von Vorteil, da die Basenpaarung Guanin-Cytosin (GC) mit drei Wasserstoffbrückenbindungen stabiler ist als die Basenpaarung Adenin-Thymin mit nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Die Primer wurden bei der Firma operon, Köln, über das Internet (www.operon.com) bestellt. Die Sequenzen sind in Tab. 3.2 dargestellt.

Die Primer wurden bei -20 °C gelagert und vor dem Gebrauch in TE-Puffer gelöst und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

Tab. 3.2 Verwendete Primer-Sequenzen für die Mutationen am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor. Die im Vergleich zur Ursprungssequenz veränderten Basen sind fettgedruckt.

Bezeichnung	Sequenz	Tm
C102A forw.	5'-GGGGAGGCCGCG**GC**CCGCCTGGAGCGC-3'	85,53 °C
C102A rev.	3'-CCCCTCCGGCGC**CG**GGCGGACCTCGCG-5'	
C188A forw.	5'-GGCCAGGCCCGAGGCC**GC**CATCAAGTGTCTGGGG-3'	85,91 °C
C188A rev.	3'-CCGGTCCGGGCTCCGG**CG**GTAGTTCACAGACCCC-5'	
C191A forw.	5'-GCCCGAGGCCTGCATCAAG**GCC**CTGGGGACAGCAGA CCACGGGC-3'	89,16 °C
C191A rev.	3'-CGGGCTCCTTACGTAGTTC**CGG**GACCCCTGTCGTC TGGTGCCCG-5'	
D196A forw.	5'-GGGGACAGCAG**C**CCACGGGCTGGCGGCC-3'	87,5 °C
D196A rev.	3'-CCCCTGTCGTC**G**GGTGCCCGACCGCCGG-5'	
R203A forw.	5'-CGGGCTGGCGGCCTAC**GC**AGCGTATAGCCTGG-3'	83,63 °C
R203A rev.	3'-GCCCGACCGCCGGATG**CG**TCGCATATCGGACC-5'	
R275A forw.	5'-GCGGGTGCTCAACGTGGATGCT**GC**GCGGCGCTGG AGCACCCGC-3'	91,66 °C
R275A rev.	3'-CGCCCACGAGTTGCACCTACGA**CG**CGCCGCGACCTC GTGGGCG-5'	
R276A forw.	5'-GGTGCTCAACGTGGATGCTCGG**GC**GCGCTGGAGCAC CCGC-3'	89,35 °C
R276A rev.	3'-CCACGAGTTGCACCTACGAGCC**CG**CGCGACCTCGTG GGCG-5'	
R277A forw.	5'-CGTGGATGCTCGGCGG**GC**CTGGAGCACCCGC-3'	86,34 °C
R277A rev.	3'-GCACCTACGAGCCGCC**CG**GACCTCGTGGGCG-5'	
C282A forw.	5'-GGCGCTGGAGCACCCGC**GC**CCCGAGCTTTGC-3'	85,02 °C
C282A rev.	3'-CCGCGACCTCGTGGGCG**CG**GGGCTCGAAACG-5'	
R307A forw.	5'-GGGCTACCAGGTGATG**GC**GGGCCTCATGCCCC-3'	83,62 °C
R307A rev.	3'-CCCGATGGTCCACTAC**CG**CCCGGAGTACGGGG-5'	
P311A forw.	5'-GCGGGGCCTCATG**G**CCCTGGCCTTCTGTGTCC-3'	86,75 °C
P311A rev.	3'-CGCCCCGGAGTAC**C**GGGACCGGAAGACACAGG-5'	
P311S forw.	5'-GCGGGGCCTCATG**T**CCCTGGCCTTCTGTGTCC-3'	85,46 °C
P311S rev.	3'-CGCCCCGGAGTAC**A**GGGACCGGAAGACACAGG-5'	

3.3.3.2 Synthesereaktion des mutierten Plasmids

Als Matrizen-DNA wurde das pcDNA3.1(+)-hisP2Y$_{11}$-Plasmid verwendet. Zunächst wurde die Kontrollreaktion mit dem pWhitescript^{TM}-Plasmid angesetzt.

Die in Tab. 3.3 aufgelisteten Reagenzien wurden direkt in eine Kavität der PCR-Reaktionsgefäße pipettiert.

Tab. 3.3 Pipettierschema der Mutagenese-Kontroll-Reaktion.

Menge	Reagenz
5 µl	10x Reaktionspuffer
2 µl (10 ng)	pWhitescript™ 4.5-kb Plasmid (5 ng/µl)
1,25 µl (125 ng)	Kontroll-Primer #1 (100 ng/µl) 5´-CCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCAC-3´
1,25 µl (125 ng)	Kontroll-Primer #2 (100 ng/µl) 5´-GTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGG-3´
1 µl	dNTP Mix
39,5 µl	Ampuwa-Wasser

Als nächstes wurden die Ansätze für die verschiedenen Mutationen pipettiert. Es wurden pro Reaktion 20 ng des hisP2Y$_{11}$-Plasmids eingesetzt. Die Stammlösung des Plasmids wurde deshalb auf die Konzentration von 20 ng/µl eingestellt. Es wurde ein Mastermix mit der in Tab. 3.4 aufgelisteten Zusammensetzung hergestellt.

Tab. 3.4 Pipettierschema des Mastermixes für die Mutationsreaktion.

Menge pro Ansatz	Reagenz
5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl (20 ng)	hisP2Y$_{11}$-Plasmid (20 ng/µl)
1 µl	dNTP Mix
40,5 µl	Ampuwa-Wasser

Von dem Mastermix wurden jeweils 47,5 µl pro Ansatz in die Kavitäten der PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Dazu wurden je 1,25 µl des jeweiligen Primers (forward- und reverse-Primer mit einer Konzentration von je 100 ng/µl) gegeben, was einer Menge von je 125 ng entspricht. Im Anschluss wurde die *PfuTurbo*®Polymerase (2,5 U/ml) langsam auf Eis aufgetaut. Sobald sie aufgetaut war, wurde jeweils 1 µl in jede Kavität einschließlich der Kavität mit der Kontroll-Reaktion pipettiert. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden nun vorsichtig mit einem Deckel verschlossen und in den Thermocycler gesetzt.

Der Vektor pcDNA3.1(+) ist 5,4 kb groß. Der P2Y$_{11}$-Rezeptor mit dem sechsfachen Histidin-Tag besitzt ungefähr 1140 Basen. Damit ist das für die Mutation eingesetzte Plasmid 6,5 kb groß. Mit dieser Angabe wurde die Zeit für die Elongation in der PCR berechnet (siehe Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Parameter für die PCR.

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 s
2	16	95 °C	30 s
		55 °C	1 min
		68 °C	6,5 min*

*1 min/kb: Das hisP2Y$_{11}$-Plasmid hat 6,5 kb und braucht deshalb 6,5 min für die Elongination.

Die erforderliche Zyklenzahl hängt nach den Angaben des Herstellers davon ab, welche Mutation eingeführt wird. So wurde im Benutzerhandbuch angegeben, dass bei einer Punktmutation (Austausch von nur einer Base) 12 Zyklen ausreichen. Beim Austausch zwei bis drei Basen müssen 16 Zyklen gefahren werden. Wenn mehrerer Aminosäuren ausgetauscht werden oder wenn Deletionen oder Insertionen durchgeführt werden, müssen mindestens 18 Zyklen im Segment 2 (Tab. 3.5) durchlaufen werden. Da es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsreaktionen bis auf zwei Ausnahmen um den Austausch von mindestens zwei Basen handelt, um eine Aminosäure zu verändern, wurde die Zahl der Zyklen auf 16 festgesetzt.
Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Reaktionsgefäße für 2 min auf Eis gesetzt, um die Ansätze auf ≤ 37 °C abzukühlen.

3.3.3.3 DpnI-Verdau

Zu jedem Mutations-Ansatz wurde nun 1 µl des DpnI-Restriktionsenzyms (10 U/µl) gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Lösung gemischt. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden dann zurück in den Thermocycler gestellt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die so hergestellte Plasmid-DNA wurde weiter verwendet.

3.3.3.4 Transformation und Plasmidisolation

Die gewonnene Plasmid-DNA wurde, wie im Kapitel Plasmidgewinnung (Kapitel 3.1.2) beschrieben, in XL1-Blue Supercompetent Cells transformiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe einer Mini-Prep aus den Bakterien isoliert.

3.3.3.5 Bestimmung der Mutagenese-Effizienz

Auch das Plasmid aus der Mutagenese-Kontroll-Reaktion wurde in XL1-Blue Supercompetent Cells transformiert. Diese Zellen wurden auf zwei Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Gesamt-Kolonienzahl bestimmt. Außerdem wurden die blau erscheinenden Kolonien ausgezählt. Daraus wurde dann die Mutagenese-Effizienz (ME) nach folgender Formel berechnet (Formel 3):

Formel 3 $$ME = \frac{Anzahl\ der\ blauen\ Kolonien}{Gesamtzahl\ der\ Kolonien} x\ 100\%$$

Mehr als 80 % der Kolonien sollten die Mutation enthalten und demnach blau auf den mit IPTG und X-Gal behandelten Agarplatten erscheinen.

3.3.4 Kontrolle der Mutation - Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG, Ebersberg, durchgeführt. Die Plasmid-DNA musste entweder in Wasser gelöst oder luftgetrocknet verschickt werden. Der TE-Puffer, in dem alle Plasmide gelöst wurden, stört die Sequenzierungs-Reaktion, da das im Puffer enthaltene EDTA die für die Reaktion wichtigen Ionen komplexiert. Daher wurden die Plasmide mit Hilfe von Natriumacetat ausgefällt und luftgetrocknet.

Für die Fällung wurden 2,5 µg Plasmid eingesetzt, um sicherzustellen, dass am Ende der Reaktion mehr als 1 µg DNA im Mikroreaktionsgefäß vorhanden war. Zu der Plasmid-DNA-Lösung wurden 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumenanteile Ethanol pipettiert. Das Mikroreaktionsgefäß wurde dann für 10 min bei -80 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Ethanol/Natriumacetat/TE-Puffer-Gemisch abdekantiert und die ausgefällte Plasmid-DNA wurde bei Raumtemperatur mehrere Minuten lang trocknen gelassen. Danach wurde noch einmal mit 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen wie oben zentrifugiert. Dann wurde das Lösungsmittel wieder dekantiert und die DNA getrocknet, bis kein Ethanol mehr vorhanden war. Für die Sequenzierung wurden, je nach Lage der Mutation, entweder der Standardprimer T7 für den Vektor pcDNA3.1(+) oder ein Primer mit der

Sequenz (5'-ACTCAGCTTCTCCCACCTGA-3'), der weiter in der Mitte des his$P2Y_{11}$-Gens angreift, verwendet.

3.4 Expressionskontrolle mit Hilfe des Durchflusszytometers

3.4.1 Geräte und Material

Geräte

Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellzählsystem	CASY®1 Modell TT, Schärfe-System, Reutlingen

Material

2 ml amberfarbene Reaktionsgefäße	Starlab GmbH, Ahrensburg
50 ml PP-Röhrchen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Chemikalien

NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaN_3 (Natriumazid)	Fluka-Riedel-de Haën, Seelze
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PentaHis Alexa Fluor 488 Conjugate	Qiagen, Hilden
NaOH (Natriumhydroxid) p.A.	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer	8,0 g NaCl 1,44 g Na_2HPO_4 0,24 g KH_2PO_4 0,20 g KCl

	mit Reinstwasser auf 800 ml auffüllen
	mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
	mit Reinstwasser auf 1000 g auffüllen
	autoklavieren
Waschpuffer (0,5 % BSA)	200 ml steriler PBS-Puffer
	1 g BSA
Natriumazid-Puffer	200 ml steriler PBS-Puffer
	1 g BSA
	0,2 g NaN_3

3.4.2 Allgemeines

Für die Kontrolle der Expression des his$P2Y_{11}$-Rezeptors und der his$P2Y_{11}$-Rezeptormutanten wurde die Methode der Durchflusszytometrie benutzt. Dabei passieren Zellen in einer Messküvette einzeln einen Laserstrahl. Dies wird dadurch erreicht, dass die Suspension mit den Zellen mit Unterdruck durch eine Kapillare gezogen wird und im Bereich der Messküvette einen laminaren Strom erreicht. Der verwendete Laser ist ein Argonlaser, der bei 488 nm monochromatisches Licht aussendet. Das Licht des Lasers regt die markierten Zellen an und das von den Zellen ausgesendete Signal wird durch Spiegel und Linsen auf Detektoren geleitet und analysiert. Auch mit dem Durchtritt einer unmarkierten Zelle durch den Laserstrahl können Informationen über die Zelle gesammelt werden. Das nach vorne abgelenkte Licht (Forwardscatter/FSC) ist ein Maß für die Größe der gemessenen Zelle. Das in einem 90°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht wird als Sidescatter (SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgranularität (Luttmann *et al.*, 2006a). Wenn die Zelle nun z. B. durch ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper markiert ist, wird ein Teil des Lichts von dem Fluorochrom absorbiert und Fluoreszenzlicht mit einer längeren Wellenlänge emittiert. Dieses Licht wird über Linsen und Filter geleitet und von den jeweiligen Detektoren registriert. Das Signal kann mit der entsprechenden Software (CellquestPro, Becton Dickinson, Heidelberg) am PC dargestellt und ausgewertet werden. In der Durchflusszytometrie kann nur partikel- bzw. zellgebundene Fluoreszenz detektiert werden. Das heißt, wenn in der Lösung nicht an Zellen gebundene Fluorochrome vorliegen, wird die entsprechende Fluoreszenz nicht detektiert.

Da G-Protein gekoppelte Rezeptoren an der Oberfläche der Zelle exprimiert werden, kann der hisP2Y$_{11}$-Rezeptor durch eine Zelloberflächenmarkierung detektiert werden. Zum Markieren der Zellen wird ein Antikörper benutzt, der spezifisch an einen fünffachen Histidin-Rest bindet. Der hisP2Y$_{11}$-Rezeptor hat sechs Histidin-Reste am Amino-terminalen (extrazellulären) Ende. Der Antikörper ist an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 gekoppelt. Dieser Farbstoff wird bei 488 nm angeregt und emittiert bei ca. 520 nm. Damit kann die Zelle im Durchflusszytometer detektiert werden, wenn sie den hisP2Y$_{11}$-Rezeptor oder die jeweilige Mutante auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 3.4). Diese Methode wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als FACS-Assay bezeichnet. FACS ist ein eingetragenes Markenzeichen der Firma Becton Dickinson und steht für „Fluorescence Activated Cell Sorting“.

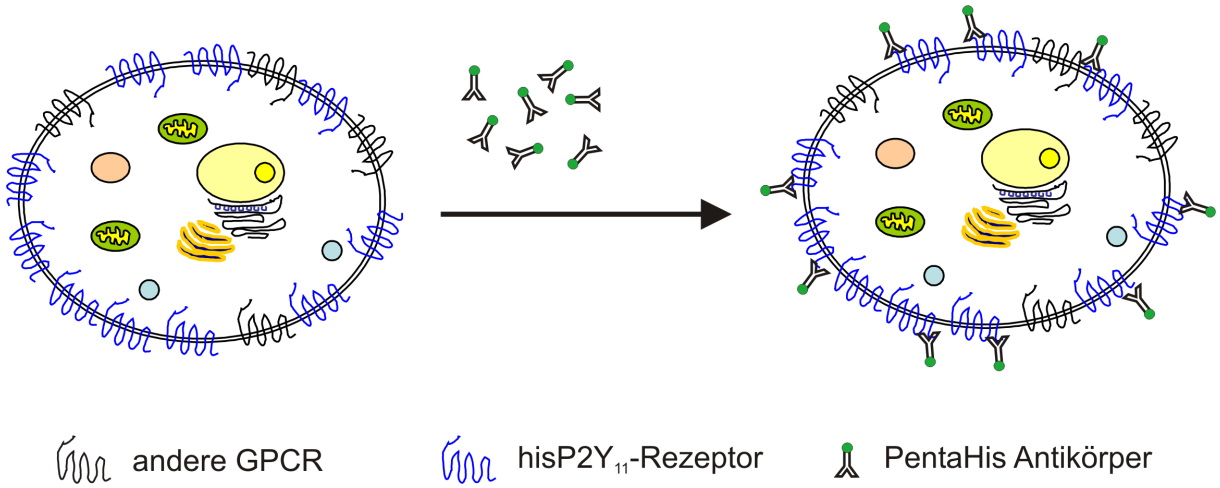


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Markierung einer Zelle, die den hisP2Y11-Rezeptor exprimiert.

3.4.3 Durchführung

Bei dieser Methode ist es besonders wichtig, dass die Zellen möglichst schonend behandelt werden (schnelles Arbeiten, Lagerung auf Eis). Die Zellen wurden wie unter 3.1.1.3 beschrieben von der Zellkulturschale abgeerntet. Sie wurden nach der Zentrifugation in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Mit Hilfe des CASY®1 wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.1.1.4). Von dieser Zellsuspension wurden 2 x 10^6 Zellen in ein neues 50 ml PP-Röhrchen pipettiert und erneut zentrifugiert, um das Nährmedium zu entfernen. Aus Gründen der Zeitersparnis wurde hier und nach den folgenden Zentrifugationsschritten der Überstand nicht abgesaugt, sondern

abdekantiert. Die Zellen wurden dann mit 2 ml auf Eis gekühltem Waschpuffer gewaschen und bei 4 °C und 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 2 ml auf Eis gekühltem Natriumazid-Puffer aufgenommen und erneut gewaschen. Nach der folgenden Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl Natriumazid-Puffer aufgenommen und jeweils zu 100 µl in 2 ml amberfarbene Reaktionsgefäße aliquotiert. In eines der 2 ml-Reaktionsgefäße wurden 2,5 µl Antikörper gegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Das andere Aliquot wurde ebenfalls auf Eis inkubiert, jedoch ohne Antikörper-Zugabe. Nach der Inkubation wurden die Zellen noch einmal mit Natriumazid-Puffer gewaschen, in 1000 µl Waschpuffer aufgenommen und in je ein Falcon Tube #2052 pipettiert. Die so vorbereiteten Zellen wurden im FACSCalibur vermessen. Bis zur Messung wurden alle Zellen auf Eis gelagert.
Die Expression des his$P2Y_{11}$-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen wurde im Fluoreszenz-Kanal 1 des FACSCalibur bestimmt. Die Einstellungen des Gerätes sind in Tab. 3.6 wiedergegeben. Um die Grundfluoreszenz der Zellen zu bestimmen, wurden die nicht mit dem Antikörper inkubierten Zellen bei den gleichen Einstellungen vermessen. Um die spezifische Fluoreszenz für die einzelnen Zellklone zu bestimmen, wurde die Grundfluoreszenz von der Fluoreszenz der Zellen mit Antikörper-Inkubation abgezogen.

Tab. 3.6 Einstellung des FACSCalibur. (FCS = Forwardscatter; SSC = Sidescatter; FL1 = Fluoreszenzkanal 1)

Parameter	Detektor	Voltage	AmpGain	Modus
P1	FSC	E-01	5,00	lin
P2	SSC	350	1,00	lin
P3	FL1	580	1,00	log

3.5 Expressionskontrolle mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

3.5.1 RNA-Isolierung

3.5.1.1 Geräte und Material

Material

Zellkulturflaschen Filter Top (T25)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
1,5 ml Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht bzw. Starlab, Ahrensburg

Chemikalien

TRI®-Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform p.A.	Merck, Darmstadt
Isopropanol absolut p.A.	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.A.	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser	0,1 % DEPC in Reinstwasser, für ein bis zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubieren, danach autoklavieren
PBS-Puffer	siehe Kapitel 3.4.1
75%iger Ethanol/DEPC	Ethanol absolut p.A. mit DEPC 3:1 verdünnen

3.5.1.2 Durchführung

HEK293-Zellen wurden in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit auf Eis gekühltem PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 ml TRI®-Reagenz versetzt. Dabei wurden die Zellen komplett mit dem Reagenz

benetzt, was zur Lyse der Zellen führte. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber zusammen geschoben und nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Sie wurden dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zu der Probe gegeben. Diese Mischung wurde 30 s auf dem Vortexer gemischt und weitere 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurde für 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dabei bildeten sich drei Phasen im Mikroreaktionsgefäß. Die untere, organische Phase enthält die Proteine der Zelle, in der Interphase sammelt sich die DNA und in der oberen Phase findet sich die RNA wieder. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. In dieses Gefäß wurden noch zusätzlich 0,5 ml Isopropanol für die Fällung der RNA gegeben. Diese Mischung wurde erneut 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 10 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet vorsichtig mit 75%igem Ethanol/DEPC gewaschen. Dann wurde wieder zentrifugiert (5 min, 4 °C und 12000 x g) und der Überstand abgenommen. Letzte Reste des Ethanol/DEPC-Gemisches wurden vorsichtig aus dem Mikroreaktionsgefäß entfernt und das RNA-Pellet kurz an der Luft trocknen gelassen. Das Pellet wurde dann in 100 µl DEPC-Wasser gelöst und bei -20 °C zur längeren Lagerung eingefroren.

3.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA wurde ähnlich durchgeführt wie die Bestimmung von Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.1.2.4). Die Bestimmung erfolgte ebenfalls im UV/Vis-Spektrophotometer mit Hilfe einer Mikro-Quarzküvette. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Saubere RNA-Präparationen weisen E_{260}/E_{280}-Verhältnisse von 1,7 bis 2,0 auf (Stassen, 2002).

3.5.3 Kontrolle der RNA mittels denaturierender Gelelektrophorese

3.5.3.1 Geräte und Material

Geräte

Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, München
Bio-Rad Power Pac 200	Bio-Rad, München
Intas Multi-Darkbox, Intas UV-Kasten (Weißlicht und 312 nm UV), Intas Manuelles Zoom Objectiv, Sony Intas Video Graphic Printer UP-890CE	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Material

1,5 ml Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht bzw. Starlab, Ahrensburg

Chemikalien

Seakem® LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
RNA Ladder High Range (incl. 2X Gel-Ladepuffer)	Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot
SYBR® Green II	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$NaCH_3COO$ (Natriumacetat), p.A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd 37 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser	siehe oben
10X HEPES-Puffer	200 mM HEPES

	10 mM EDTA
	50 mM $NaCH_3COO$
	in DEPC-Wasser, pH 7,2, autoklavieren
1X HEPES-Laufpuffer	10X HEPES-Puffer 1:10 mit H_2O verdünnen

3.5.3.2 Durchführung

Die Proben wurden gemäß dem Pipettierschema in Tab. 3.7 zusammenpipettiert.

Tab. 3.7 Pipettierschema für die zu untersuchende Probe auf einem denaturierenden RNA-Agarose-Gel.

Menge	Reagenz
1 µg	RNA
1,6 µl	10X HEPES-Puffer
0,3 µl	Formamid
1,5 µl	Formaldehyd 37 %
8,0 µl	2X Gel-Ladepuffer
ad 16 µl	DEPC-Wasser

Zudem wurden 2 µl der RNA-Leiter mit 2 µl des 2X Gel-Ladepuffers versetzt. Alle Proben wurden für 10 min auf 70 °C erhitzt. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte auf Eis.

Für 30 ml eines 2%igen RNA-Agarose-Gels wurden 0,6 g Agarose eingewogen und mit 27 ml DEPC-Wasser in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe von 3 ml 10X HEPES-Puffer wurde die Lösung abkühlen gelassen. Dann wurden 0,5 ml Formaldehyd 37 % zu der Lösung gegeben und gut vermischt. Anschließend wurde das Gel gegossen. Nach seinem Erstarren wurde es in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1X HEPES-Puffer befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Nun wurde der Kamm aus dem Gel entfernt. Die vorbereiteten Proben wurden vorsichtig in die Kammtaschen pipettiert. Das Gel wurde bei einer Spannung von 100 V 45 min laufen gelassen.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel aus der Kammer entnommen und mit Hilfe des Intas-Systems unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Da im verwendeten Gel-Ladepuffer auch Ethidiumbromid enthalten war, konnten die Banden für 18C und 28S rRNA gut detektiert werden.

3.5.4 cDNA-Synthese

3.5.4.1 Geräte und Material

Material

PCR-Reaktionsgefäße	
8er-Streifen, klar (thin-walled tubes) + ultraklare Deckel	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Filterspitzen:	
2,5 µl Safe Seal-Tips	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
0,5 - 10 µl Filter Tips	Starlab GmbH, Ahrensburg
1 - 100 µl Bevelled Filter Tips	

Chemikalien und Kits

Ampuwa (Reinstwasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
High-Capacity cDNA Archive Kit (incl. Puffer, dNTPs und MultiScribe™-Reverse-Transkriptase)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Oligo-dT-Primer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.5.4.2 Durchführung

Für die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde der in Tab. 3.8 dargestellte Reaktionsansatz zusammenpipettiert.

Tab. 3.8 Pipettierschema für die reverse Transkription.

Menge	Reagenz
2,0 µg	RNA
2,0 µl	10X Reverse-Transkriptase-Puffer
0,8 µl	25X dNTPs
1,0 µl	Oligo-dT-Primer [70 µM]
0,4 µl	Reverse-Transkriptase [50 U/µl]
ad 20 µl	Ampuwa-Wasser

Dieser Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C im Opticon™ Thermocycler inkubiert und danach im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

3.5.5.1 Geräte und Material

Chemikalien und Kits

QuantiTect SYBR® Green PCR Kit Qiagen, Hilden

Primer

Die Primer wurden mit Hilfe der im Internet verfügbaren Software Primer3 (http://odo.wi.mit.edu) entworfen (Rozen and Skaletsky, 2000). Die Synthese der Primer wurde bei der Firma operon, Köln, (www.operon.com) beauftragt. Die Primer wurden mit einer Konzentration von 125 µM in TE-Puffer gelöst (Tab. 3.9).

Tab. 3.9 Verwendete Primer-Sequenzen für die Expressionskontrolle von $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren.

Bezeichnung	Sequenz	Größe des PCR-Produkts
$P2Y_1$ forward	5´-TTACGACACCACCTCAGACG-3´	389 bp
$P2Y_1$ reverse	5´-TGAAAGTATCTCCCGCCAAG-3´	
$P2Y_2$ forward	5´-AGTGGTCTGGAATGGACTGG-3´	247 bp
$P2Y_2$ reverse	5´-TTGGAGAAAGGACCCTTGTG-3´	

3.5.5.2 Durchführung

Für jedes zu untersuchende Gen wurde gemäß dem Pipettierschema in Tab. 3.10 der Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Um den Pipettieraufwand zu minimieren, wurde ein Mastermix für diese Reaktion hergestellt.

Tab. 3.10 Pipettierschema für die Polymerase-Kettenreaktion.

Menge	Reagenz
1,5 µl	cDNA aus 3.5.4.2
0,8 µl	forward Primer [125 µM]
0,8 µl	reverse Primer [125 µM]
10,0 µl	2X QuantiTect-SYBR®-Green-Master-Mix
ad 20,0 µl	Ampuwa

Nach dem Pipettieren wurden die Gefäße in den Thermocycler gesetzt und die Reaktion gestartet. In Tab. 3.11 ist das Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion angegeben.

Tab. 3.11 Parameter für die PCR.

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	120 s
2	40	94 °C	20 s
		59 °C	30 s
		72 °C	60 s

3.5.6 Nachweis der PCR-Produkte mit Hilfe der Gelelektrophorese

3.5.6.1 Geräte und Material

siehe Kapitel 3.2.1

abweichend:

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot
ready-to-use [0,1 µg/µl]
(incl. 6X Gel-Ladepuffer)

3.5.6.2 Durchführung

Diese Methode wurde bereits in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben. Abweichend davon wurde bei dieser Elektrophorese ein 2%iges Gel verwendet, das einen Bereich von 0,1 bis 2 kb abdeckt (Schrimpf, 2002). Die Agarose wurde entsprechend dem Protokoll in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst, abkühlen gelassen und in die vorbereitete Form gegossen. Wenn das Gel erstarrt war wurde es in die Gelelektrophoresekammer überführt, darin vollständig mit dem Laufpuffer bedeckt und der Kamm vorsichtig entfernt.

10 µl des PCR-Produkts aus Kapitel 3.5.5.2 wurden mit 5 µl eines Ladepuffer-Gemisches (1 Teil 6X Gel-Ladepuffer + 1 Teil SYBR®-Green-II-Lösung) versetzt. 3 µl des gleichen Ladepuffer-Gemisches wurden zu 6 µl des DNA-Größenstandards gegeben. Die Proben wurden nun in die Taschen des Gels pipettiert.

Danach wurde die Kammer angeschlossen und das Gel bei 125 V 45 min laufen gelassen.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel aus der Kammer entnommen und mit Hilfe des Intas-Systems unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

3.6 Testsubstanzen

3.6.1 Nukleotid-Analoge

α,β-Me-ADP (Adenosin 5'-(α,β-methylene)diphosphat)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen (M-3763)

ADP (Adenosin 5′-diphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (A-2754)

ADPβS (Adenosin 5′-[β-thio]diphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (A-8016)

ATP (Adenosin 5′-triphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (A-7699)

ATPγS (Adenosin 5′-[γ-thio]triphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (A-1388)

BzBzATP (2′(3′)-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin 5′-triphosphat)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen (B-6396)

2-MeSADP (2-(Methylthio)adenosin 5′-diphosphat)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen (M-152)

2-MeSATP (2-(Methylthio)adenosin 5′-triphosphat)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen (A-023)

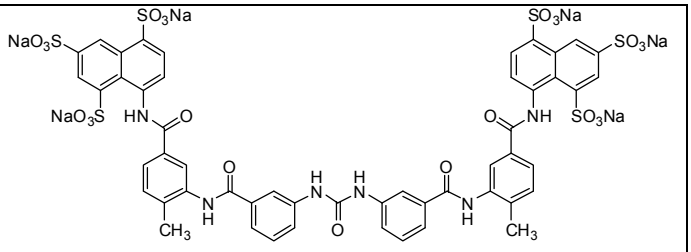
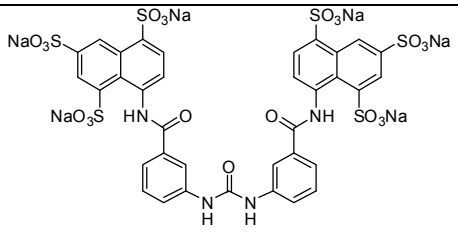
UTP (Uridin 5′-triphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (U-6625)

UDP (Uridin 5′-diphosphat) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (U-4125)

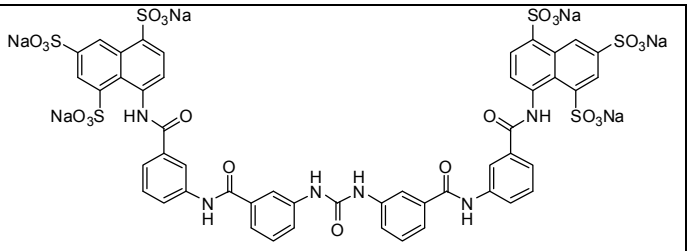
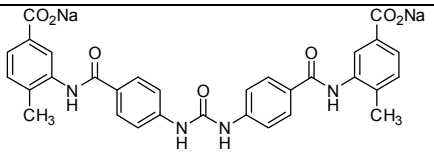
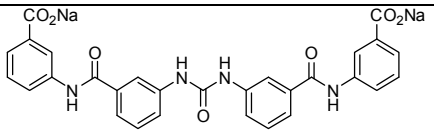
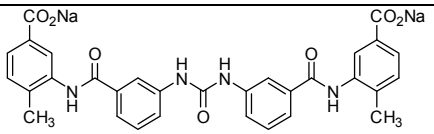
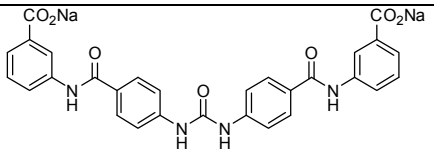
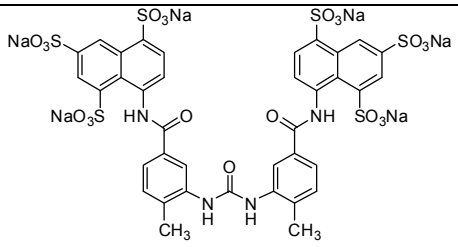
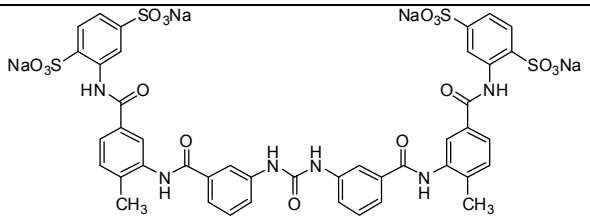
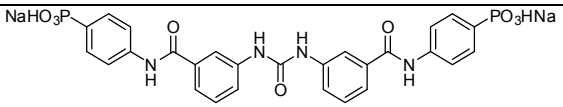
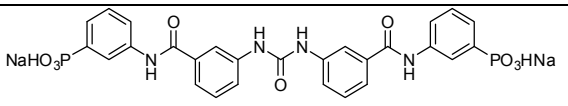
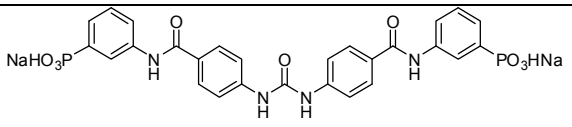
3.6.2 NF-Substanzen

Die getesteten NF-Substanzen wurden in den Arbeitskreisen von Prof. Nickel und Prof. Kassack synthetisiert. Suramin wurde freundlicherweise von der Firma Bayer zur Verfügung gestellt.

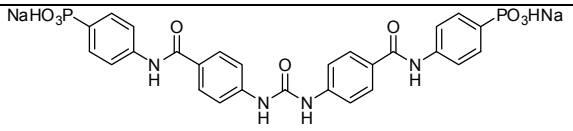
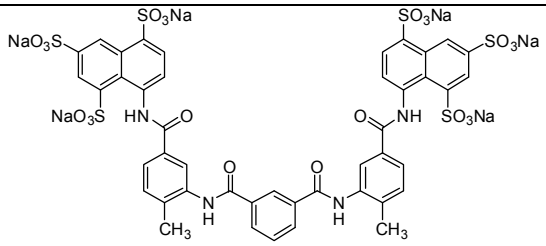
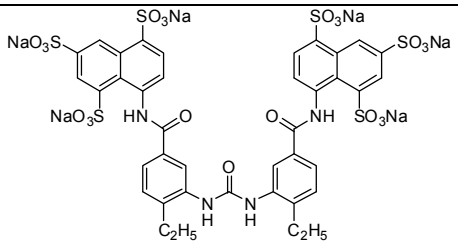
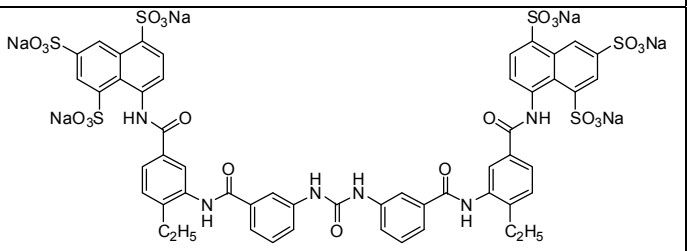
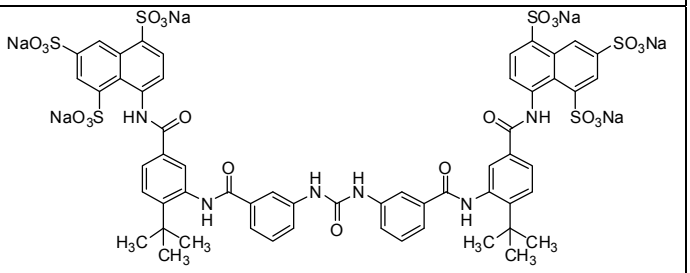
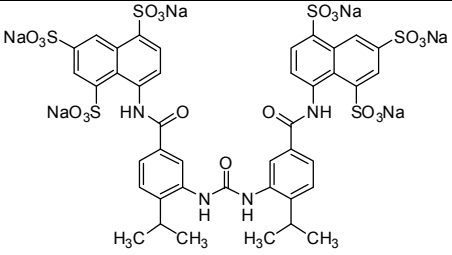
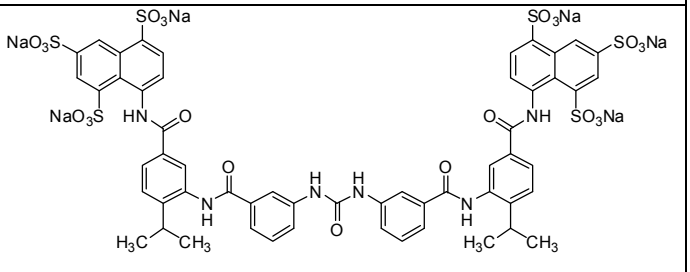
Tab. 3.12 Strukturformeln der verwendeten NF-Substanzen

Suramin	
NF023	

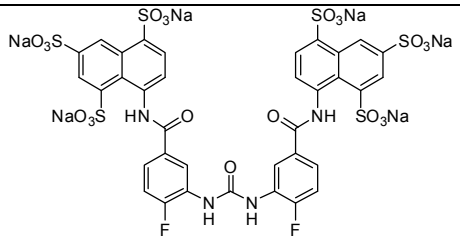
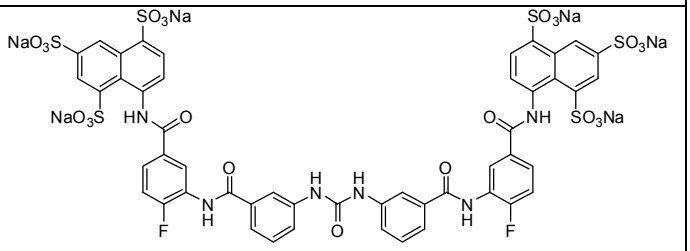
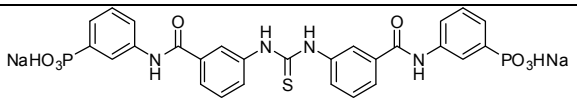
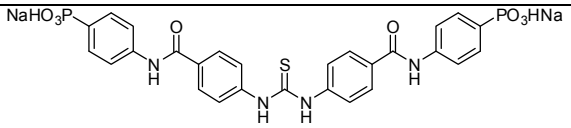
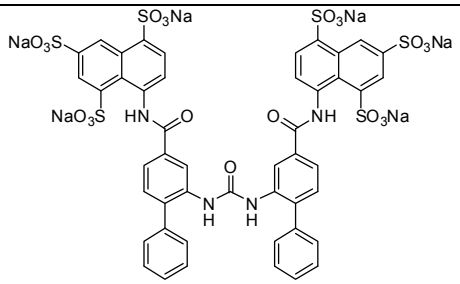
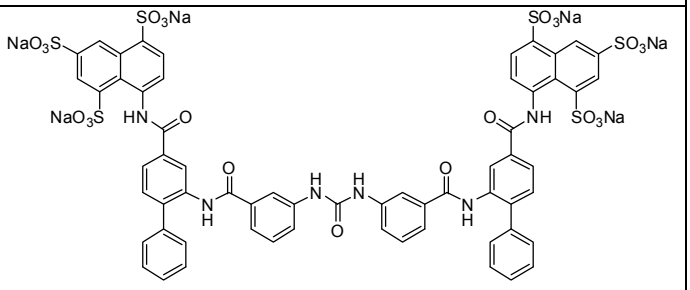
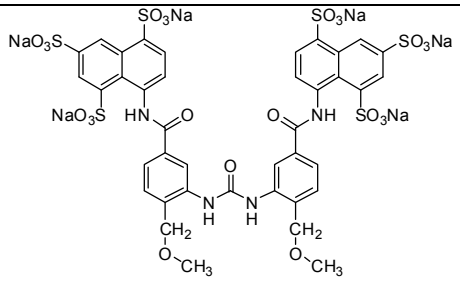
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF037	
NF053	
NF054	
NF055	
NF056	
NF058	
NF063	
NF067 = NF710	
NF068 = NF708	
NF069 = NF709	

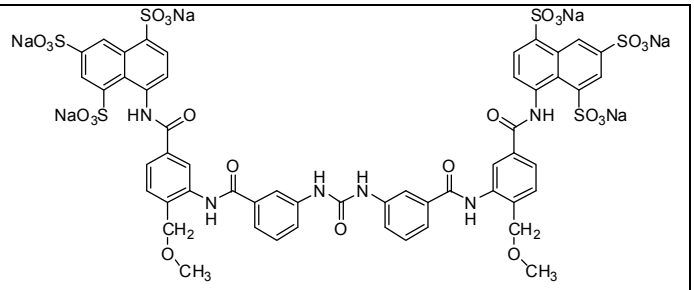
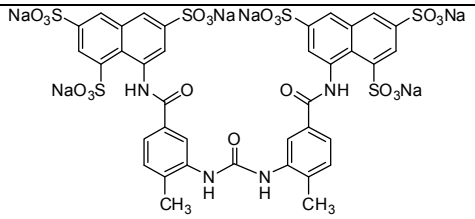
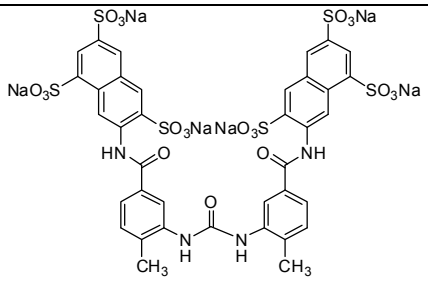
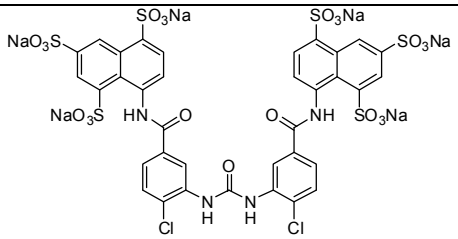
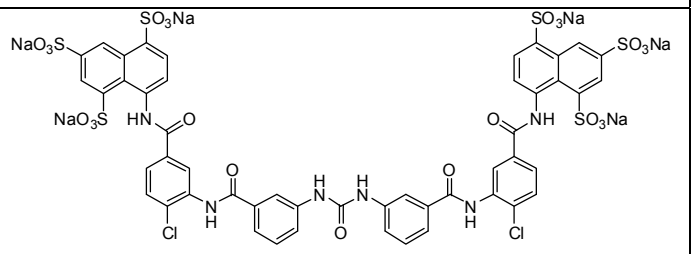
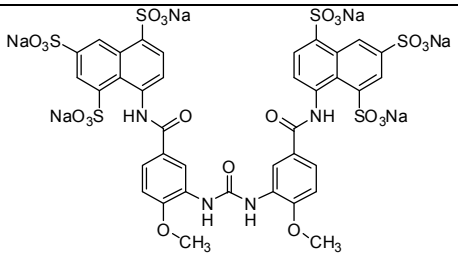
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF070 = NF681	
NF107	
NF124	
NF127	
NF145	
NF150	
NF151	

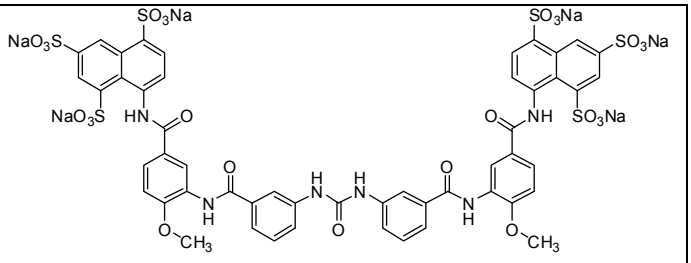
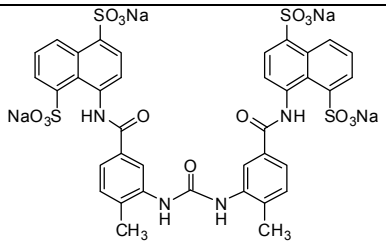
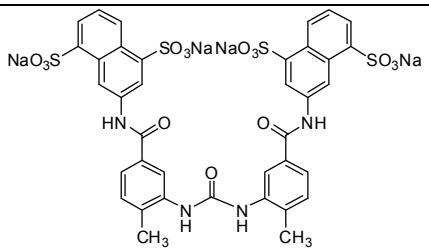
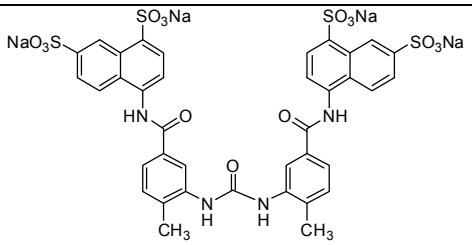
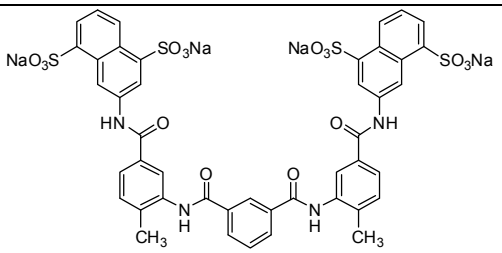
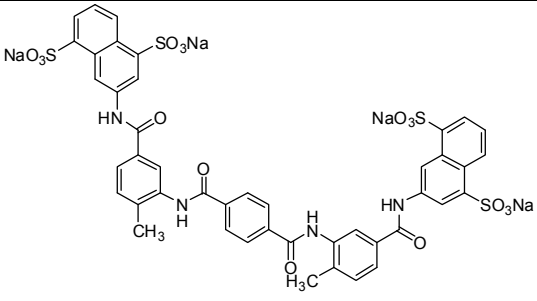
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF156	
NF157	
NF159	
NF162	
NF195	
NF198	
NF221	

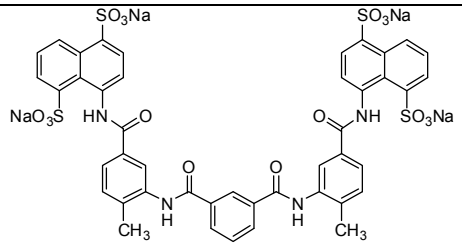
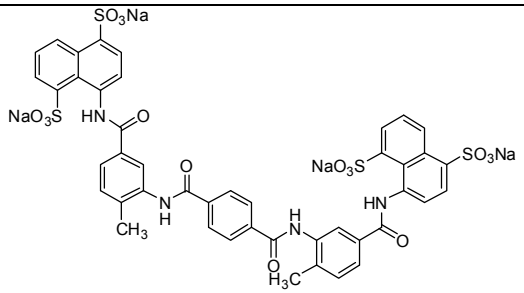
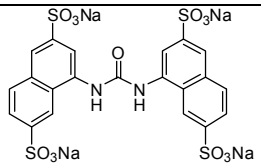
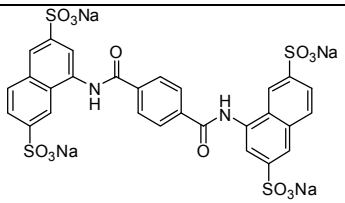
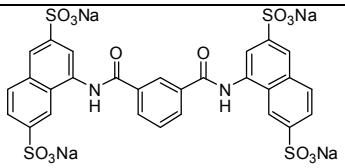
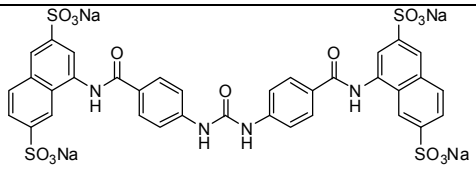
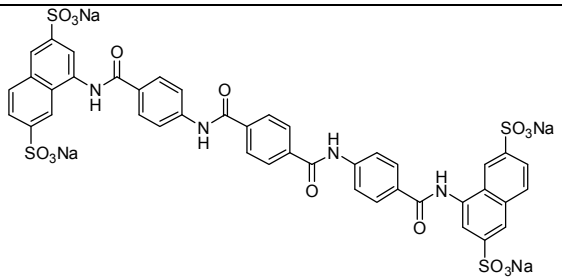
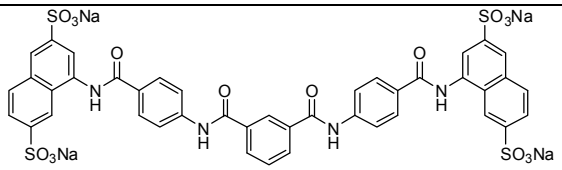
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF222	
NF248	
NF252	
NF255	
NF258	
NF259	

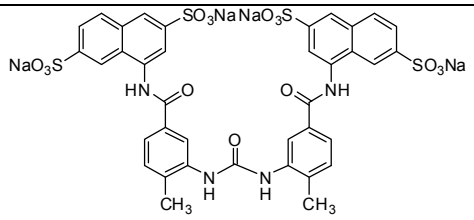
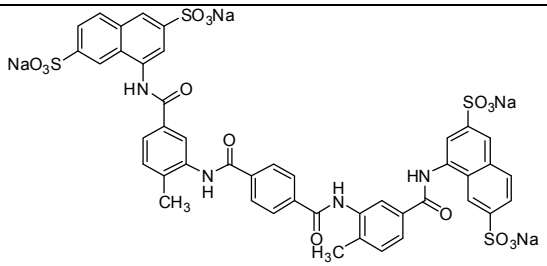
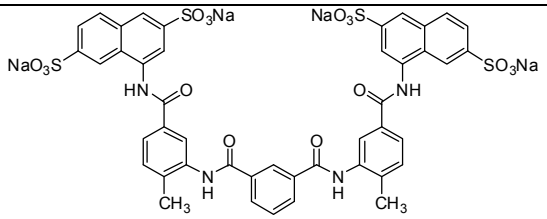
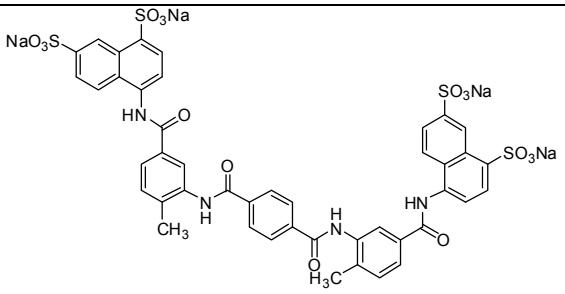
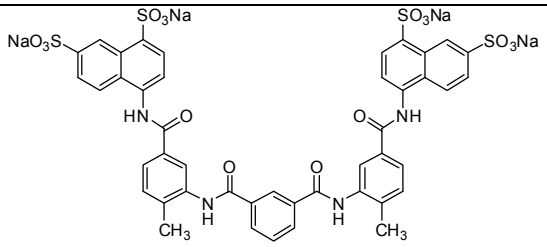
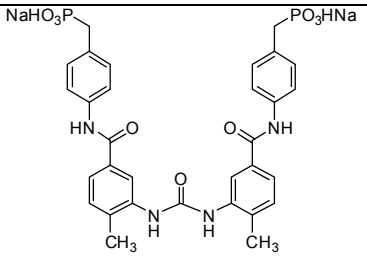
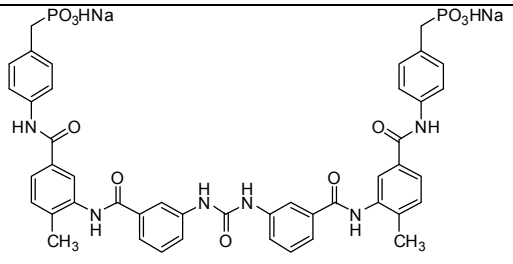
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF260	
NF290	
NF294	
NF298	
NF324	
NF325	

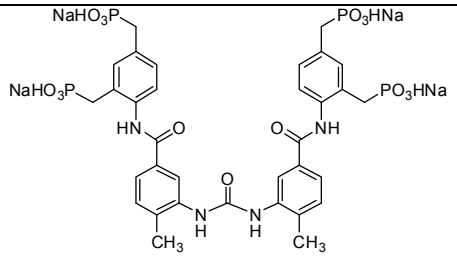
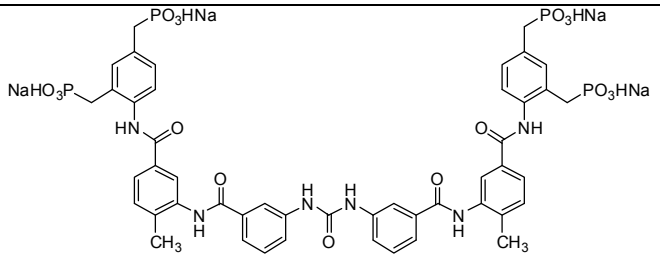
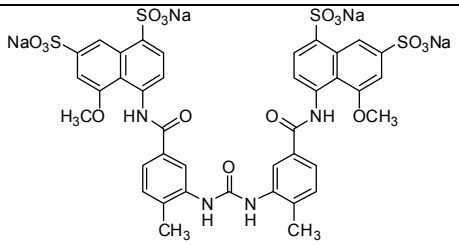
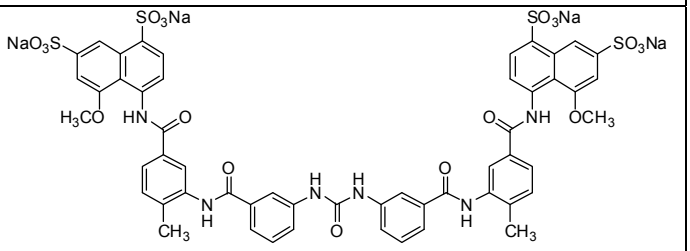
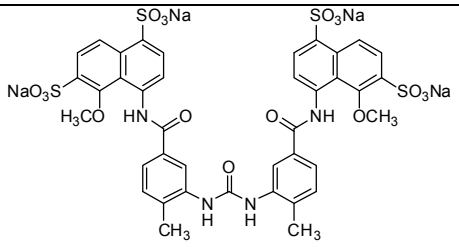
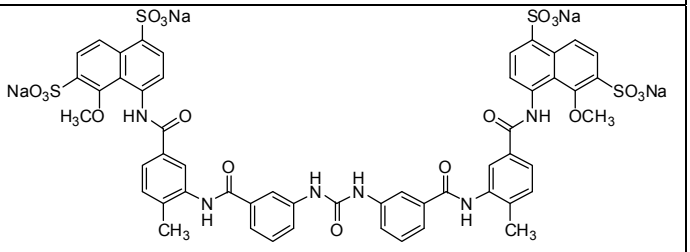
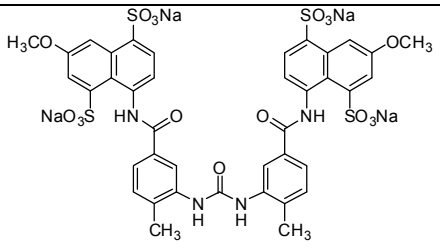
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF332	
NF333	
NF334	
NF335	
NF336	
NF337	
NF338	
NF339	

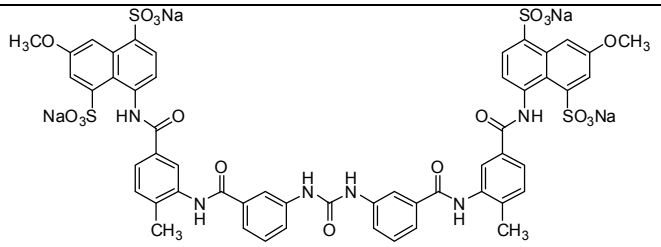
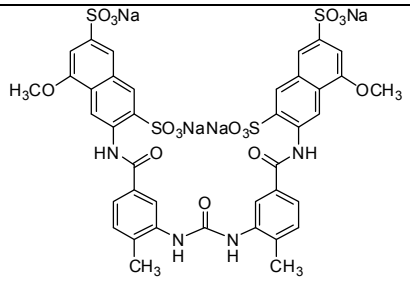
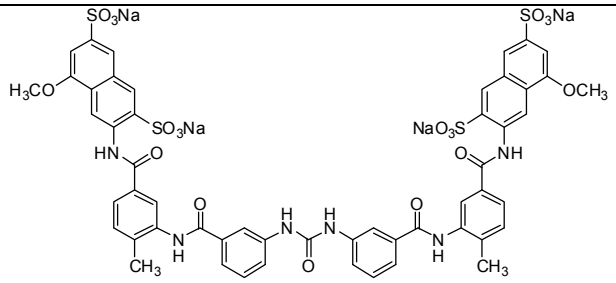
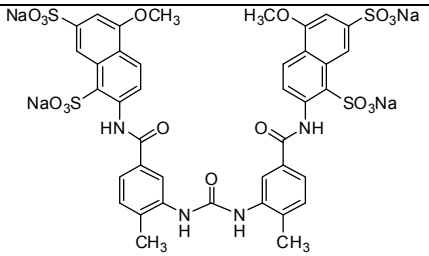
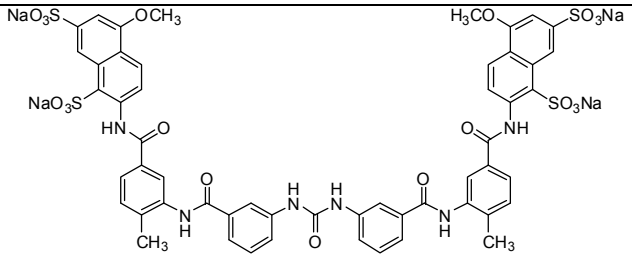
Fortsetzung der Tab. 3.12

NF340	
NF341	
NF342	
NF382	
NF383	
NF540	
NF542	

Fortsetzung der Tab. 3.12

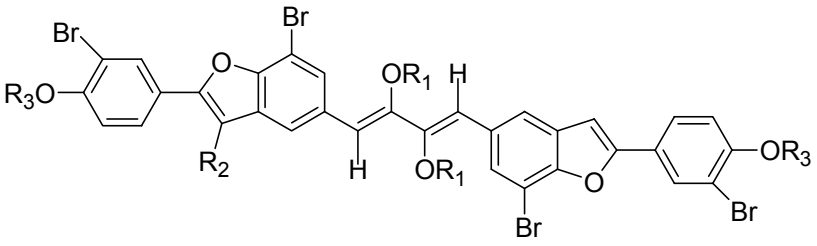
NF544	
NF546	
NF739	
NF742	
NF755	
NF756	
NF762	

Fortsetzung der Tab. 3.12

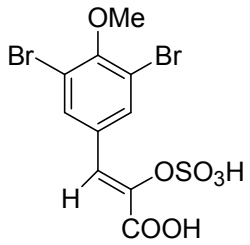
NF763	
NF769	
NF770	
NF776	
NF778	

3.6.3 Naturstoffe

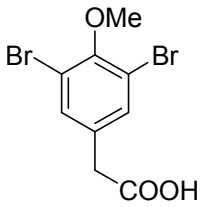
Die Substanzen aus dem Schwamm *Ianthella quadrangulata* wurden im Rahmen einer Kooperation mit Frau Prof. G. König, Institut für pharmazeutische Biologie an der Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.



	R_1	R_2	R_3
1	$-SO_3Na$	H	H
2	$-SO_3Na$	COOH	H



3



4

Abb. 3.5 Strukturformeln der isolierten Substanzen aus dem Schwamm *Ianthella quadrangulata* (Fundort: Australien); (**1** = Iso-iantheran A; **2** = 8-Carboxy-iso-iantheran A; **3** = (Z)-3-(3,5-Dibromo-4-methoxyphenyl)-2-(sulfoxy)-2-propensäure; **4** = 2-(3,5-Dibromo-4-methoxyphenyl)essigsäure) (Greve *et al.*, 2007).

3.7 Calcium-Assay

3.7.1 Geräte und Material

Geräte

NOVOstar®	BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg

Material

96-well-Mikrotiterplatte, U-Form	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96-well-Mikrotiterplatte, F-Form	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Zellkultur-Multiwell-Platte (96-well, steril)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reagenzreservoir	Brand, Wertheim

Chemikalien

NaCl (Natriumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid), p.A.	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogen-phosphat), p.A.	Merck, Darmstadt
$NaHCO_3$ (Natriumhydrogen-carbonat), p.A.	Merck, Darmstadt
D-Glucose-Monohydrat, für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$CaCl_2$ x $2H_2O$ (Calciumchlorid-Dihydrat), p.A.	Merck, Darmstadt
$MgSO_4$ x $7H_2O$ (Magnesiumsulfat-Heptahydrat), p.A.	Merck, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid), p.A.	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM	Molecular Probes (Invitrogen), Eugene, USA
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

Calciumchlorid 1 M	1,47 g Calciumchlorid-Dihydrat werden in 10 ml Reinstwasser gelöst
Magnesiumsulfat 1 M	2,465 g Magnesium-Heptahydrat werden in 10 ml Reinstwasser gelöst
Krebs-HEPES-Puffer 5X (KHP 5X)	17,33 g NaCl 0,876 g KCl 0,408 g KH_2PO_4

	0,882 g $NaHCO_3$ 5,796 g D-Glucose-Monohydrat 5,958 g HEPES auf ca. 450 ml in einem 500-ml Messkolben auffüllen; mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen und auf ein Volumen von 500 ml auffüllen, Aliquots von je 100 ml werden abgefüllt und können bei -20 °C tiefgefroren werden
Krebs-HEPES-Puffer 1X (KHP 1X)	100 ml der konzentrierten KHP 5X-Lösung werden in einen 500-ml Messkolben überführt. Mit Reinstwasser wird auf ein Volumen von ca. 400 ml mit aufgefüllt. Danach werden 650 µl der 1 M Calciumchlorid-Lösung und 600 µl der 1 M Magnesiumsulfat-Lösung zugesetzt. Mit Reinstwasser wird dann der Messkolben auf 500 ml aufgefüllt.

Herstellung der Stamm-Lösungen der jeweiligen Testsubstanzen

Alle Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und es wurde eine 10 mM-Stammlösung hergestellt. Bei in Reinstwasser nicht löslichen Substanzen wurden ein bis zwei Tropfen 0,1 N NaOH zu dem Substanz-Wasser-Gemisch gegeben. Falls auch dies nicht zum Lösen der Substanz führte, wurde sie neu eingewogen und mit Hilfe von DMSO gelöst. Die Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe von KHP hergestellt. Die in Abb. 3.5 dargestellten Naturstoffe wurden in DMSO gelöst und ebenfalls in KHP weiter verdünnt.

Herstellung der Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM-Gebrauchslösung

Die Substanz Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM wurde speziell abgepackt von Molecular Probes bestellt (10 x 50 µg). Ein Aliquot von 50 µg wurde in 39,7 µl DMSO gelöst, mit Hilfe des Vortexers gemischt und zu jeweils 3 µl in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Die hergestellte Lösung hat eine Konzentration von

1 mM. Die Lösung wurde dann bei -20 °C bis zum Gebrauch eingefroren. Da das Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM sehr lichtempfindlich ist, wurde die Lösung immer erst kurz vor Gebrauch in der jeweiligen Menge aus dem Tiefkühlschrank entnommen.

3.7.2 Allgemeines

Die Methode zur Messung von intrazellulärem Calcium wurde von Lin et al. beschrieben und durch Kassack et al. weiterentwickelt (Lin *et al.*, 1999; Kassack *et al.*, 2002). Im sogenannten Calcium-Assay werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM beladen, der nach Spaltung des Acetoxymethyl-(AM)-Esters Ca^{2+} binden kann und dadurch seine Fluoreszenz verstärkt. Oregon Green® 488 BAPTA-1 ist ein "Ein-Wellenlängen-Farbstoff", dessen Fluoreszenzintensität direkt proportional zur intrazellulären Calcium-Konzentration ist. Das Anregungsmaximum liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 525 nm.
Durch Injektion von steigenden Konzentrationen des Agonisten zu den mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen wird in der Zelle Calcium freigesetzt. Dadurch steigt die gemessene Fluoreszenz an. Wird ein Antagonist zu den Zellen injiziert, kommt es zu einer geringeren Aktivierung des Rezeptors und Calcium in der Zelle wird weniger freigesetzt. Dadurch wird hier ein geringer Fluoreszenzanstieg detektiert. Wird auf diese Mischung (Zellen + Antagonist) nun eine fixe Konzentration des Standardagonisten gegeben, kann bei steigender Konzentration des Antagonisten eine Abnahme des durch den Standardagonisten hervorgerufenen Fluoreszenz-Signals gemessen werden. Die Abnahme des Fluoreszenz-Signals rührt daher, dass der vorinkubierte Antagonist und der neu injizierte Agonist um die Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren. Bei niedrigen Antagonist-Konzentrationen kann der Agonist noch seinen Effekt voll entfalten. Bei höheren Antagonist-Konzentrationen sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass der Agonist an den Rezeptor gelangt. Die Menge des ausgeschütteten Calciums sinkt, wodurch auch das Fluoreszenz-Signal abnimmt. Daher kann in diesem Assay funktionell zwischen Agonisten und Antagonisten unterschieden werden.

3.7.3 Durchführung mit Zellen in Suspension

Die Zellen werden wie unter 3.1.1.3 beschrieben abgeerntet. Beim Abernten wurden die Zellen so kurz wie möglich unter dem Einfluss von Trypsin gehalten und möglichst geringer mechanischer Belastung ausgesetzt (z. B. Ablösen der Zellen durch Klopfen gegen die Zellkulturschale), da beides bereits zur Ausschüttung von intrazellulärem Calcium führt. Die Zellen wurden nach dem Ablösen und Zentrifugieren in 10 ml frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde dann ein Teil für ein Backup in eine neue mit Medium befüllte Zellkulturschale gegeben. Der Rest wurde für den Assay verwendet. Aus der Zellsuspension wurden 20 µl entnommen und wie unter 3.1.1.4 beschrieben die Zellzahl bestimmt. Das 50 ml PP-Röhrchen mit dem Rest der Zellsuspension wurde mit offenem Deckel zurück in den Inkubator gestellt und bei 37 °C und 5 % CO_2 20 min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen wieder bei 266 x g und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde ein Aliquot Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM aus dem Tiefkühlschrank entnommen. Zu den 3 µl 1 mM Oregon Green®-Lösung wurden 3 µl einer 20%igen (m/V) Lösung von Pluronic F127 in DMSO gegeben. Nach der Zentrifugation der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit 800 µl KHP gewaschen. Beim ersten Waschen wurden die Zellen vom 50 ml PP-Röhrchen in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 500 µl KHP aufgenommen und auf das Oregon Green®/Pluronic-Gemisch gegeben. Dieses Mikroreaktionsgefäß mit den Zellen wurde dann 45 min bei 600 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt. Während der 45-minütigen Inkubation wurde die Reagenzienplatte pipettiert. Pro Kavität wurden 80 µl der Testsubstanzen bzw. Puffer als Kontrolle in die 96-well-Mikrotiterplatte (U-Form) pipettiert. Pro Substanz bzw. Kontrolle wurden 3 Kavitäten nebeneinander (Triplikat) bestückt. Nach der 45-minütigen Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden danach erneut mit 800 µl KHP gewaschen, um letzte Reste des Farbstoffs zu entfernen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 1 ml KHP aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde nun in ein Reagenzreservoir für Mehrkanalpipetten überführt. Entsprechend Tab. 3.13 wurde KHP zu den Zellen gegeben und gut resuspendiert.

Tab. 3.13 KHP-Volumen beim Ausplattieren der Zellen im Ca^{2+}-Assay.

	Zellsuspension (KHP + Zellen)	für 96-well-Platte (incl. Verlust-Überschuss)
nur Agonist-Screen	180 µl	18,0 ml
nur Antagonist-Screen	160 µl	16,5 ml
Agonist- und Antagonist-Screen	160 µl	16,5 ml

Es sollte immer ein Endvolumen von 200 µl je Kavität in der Messplatte erreicht werden. In Tab. 3.14 ist dargestellt, wie sich bei den verschiedenen Versuchstypen das Volumen von 200 µl zusammensetzt.

Tab. 3.14 Zusammensetzung des Endvolumens pro Kavität bei den verschiedenen Versuchstypen.

	Zellsuspension (KHP+Zellen)	Testsubstanz	Standardagonist
nur Agonist-Screen	180 µl	20 µl	-
nur Antagonist-Screen	160 µl	20 µl	20 µl
Agonist- und Antagonist-Screen	160 µl	20 µl	20 µl

Entsprechend dem geplanten Assay wurde nun entweder 160 µl oder 180 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Multikanalpipette in die Kavitäten der 96-well-Mikrotiterplatte (F-Form) überführt. Im Falle eines alleinigen Antagonist-Screen wurden die zu testenden Substanzen zu jeweils 20 µl in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Darauf wurden dann die 160 µl Zellsuspension pipettiert. Für die Puffer- und Agonist-Kontrollen auf der Platte wurden jeweils 20 µl KHP in die Kavität vorgelegt und auch darauf wurden die 160 µl Zellsuspension pipettiert (vgl. Tab. 3.14).

3.7.4 Durchführung mit angehefteten Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.1.1.3 beschrieben am Tag vor dem Assay abgeerntet und es wurde die Zellzahl wie unter 3.1.1.4 beschrieben bestimmt. Es wurden 40000 Zellen/Kavität in eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Platte wurde dann 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag des Assays wurde das Medium vorsichtig aus jeder Kavität abgesaugt und die Zellen wurden dreimal unter

Zuhilfenahme einer Multikanalpipette mit 150 µl KHP/Kavität gewaschen. Es wurde darauf geachtet, so wenige Zellen wie möglich abzusaugen. Dazu wurde auf die verwendete Pasteurpipette noch eine gelbe 200-µl-Pipettenspitze aufgesetzt, um den Luftstrom zu verringern. Außerdem wurde die Berührung des Bodens der Kavität mit der Pipettenspitze möglichst vermieden. Nach dem Waschen wurden die Zellen je Kavität mit 20 µl einer Mischung von Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM und Pluronic in KHP versetzt. Dazu wurden 3 µl der Oregon Green®-Gebrauchslösung mit 3 µl einer 20%igen (m/V) Lösung von Pluronic F127 in DMSO zusammenpipettiert und in einem 2-ml-Mikroreaktionsgefäß mit 2 ml KHP versetzt. Diese Mischung wurde kurz auf dem Schüttler homogenisiert und mit Hilfe eines Dispensers auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden dann 30 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Analog zur Durchführung mit Zellen in Suspension (siehe Kapitel 3.7.3) wurden während der Inkubation die Reagenzienplatten pipettiert. Anders als bei der Durchführung mit Zellen in Suspension wurde die Farbstofflösung nach der Inkubation nicht von den Zellen entfernt. Wurde ein Agonist-Screening durchgeführt, so wurden 160 µl KHP auf die Zellen mit den 20 µl der Puffer/Farbstoff-Lösung gegeben, um ein Volumen von 180 µl zu erreichen (vgl. Tab. 3.14). Sollten die Substanzen nur auf Antagonismus geprüft werden, wurden nach der Inkubation 140 µl KHP auf die Zellen mit den 20 µl des Puffer/Farbstoff-Lösung gegeben. Anschließend wurden die Substanzen mit jeweils 20 µl/Kavität in die Platte pipettiert. Wurde auf Agonismus und Antagonismus geprüft, wurden analog 140 µl KHP pro Kavität zu den Zellen mit den 20 µl des Puffer/Farbstoff-Lösung pipettiert (vgl. Tab. 3.14).

3.7.5 Messung im NOVOstar

Wenn die Platten fertig pipettiert waren, wurden sie zur Inkubation 20 min in den auf 37°C vorgeheizten NOVOstar® gestellt. Nach diesem Inkubationsschritt wurde der gain (Verstärkung) bei einem Required Value von 50 % (Prozentsatz des maximalen dynamischen Bereichs) in mindestens 5 Kavitäten der Platte bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert bestimmt und in der NOVOstar®-Software eingegeben. Anschließend wurde die Messung gestartet.

Tab. 3.15 Zeitverlauf einer Messung in einer Kavität mit Hilfe des NOVOstar®.

	Anzahl der Intervalle	Intervalzeit [sek.]	Anzahl der Lichtblitze	Zeitpunkt [sek.]
Grundfluoreszenz	4	1	10	0 - 4
Injektion	-	-	-	11,5
Fluoreszenz nach Injektion	45	0,4	10	11,6 - 29,6

In Tab. 3.15 ist der Zeitverlauf einer Messung einer Kavität beschreiben. Die Vermessung einer kompletten 96-well-Mikrotiterplatte dauert ca. 52 min.
Die Grundfluoreszenz, die in den ersten 4 Sekunden einer Messung an jeder Kavität bestimmt wird, stellt die Fluoreszenz dar, die die Zellen nach der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff zeigen und die mit der Grundkonzentration an Calcium in der Zelle korreliert.
Wurde nur ein Agonist-Screen durchgeführt, wurden die zu testenden Substanzen in die Reagenzienplatte pipettiert und während der Messung im NOVOstar® mit Hilfe des Pipettors auf die Zellen überführt. Führten die Substanzen zu einem Effekt in den Zellen, wurde dieser direkt detektiert. Wurden die Substanzen ausschließlich auf ihre antagonistische Wirkung untersucht, wurden sie in der Messplatte vorgelegt und zusammen mit den Zellen inkubiert. In die Reagenzienplatte wurde bei diesem Testsystem der Standardagonist vorpipettiert, dessen Konzentration 10- bis 20-fach über seiner vorher bestimmten EC_{50} (Konzentration, bei der 50 % des Maximaleffekts erreicht wird) lag. Wurde mit einer Messplatte sowohl ein Agonist- als auch ein Antagonist-Screen durchgeführt, wurde zunächst die Reagenzienplatte mit den zu testenden Substanzen ins Gerät gestellt und vermessen (Testung auf agonistische Wirkung). Wenn dieser Testlauf beendet war, wurde sie gegen eine nur mit einer fixen Konzentration des Standardagonisten (10- bis 20-fache EC_{50}) bestückte Reagenzienplatte ausgetauscht. Durch Pipettieren des Agonisten auf das Substanz/Zell-Gemisch wurde die antagonistische Wirkung der Testsubstanzen untersucht. In Tab. 3.16 sind für die verwendeten Zelllinien bzw. den jeweiligen Rezeptor Standardagonistkonzentrationen für den Antagonist-Test wiedergegeben. Bei Calcium-Messungen an HEK293-Zellen Standardagonistkonzentrationen 31,6 nM 2-MeSADP ($P2Y_1$) bzw. 3,16 µM UTP ($P2Y_2$) eingesetzt.

Tab. 3.16 Konzentration der Standardagonisten am jeweiligen Rezeptor für den Antagonist-Test in 1321N1-Zellen.

Rezeptor	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_4$	$P2Y_6$	$P2Y_{11}$
Substanz	2-MeSADP	UTP	UTP	UDP	ATPγS
Konzentration	31,6 nM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
EC_{50} [nM]	3,5 ± 1,2	139 ± 17	20 ± 6	129 ± 15	55,5 ± 3,4

3.7.5.1 Auswertung der durch Calcium-Freisetzung hervorgerufenen Fluoreszenz-Signale

Zur Auswertung wurde die Software des NOVOstar® benutzt. Es handelt sich um ein auf Microsoft Excel® basierendes System. Pro Messpunkt wurde ein Wert in willkürlichen geräte- und einstellungsspezifischen Fluoreszenzeinheiten aufgenommen. Für die Auswertung wurde eine so genannte „Max-Min-Auswertung“ gewählt. Dabei wurden mit Hilfe der Software das Minimum und das Maximum der Fluoreszenz-Messung bestimmt. In der Regel wurde vorgegeben, dass das Programm aus den ersten beiden Werten nach der Injektion der Testsubstanzen das Minimum und aus den Werten ab Sekunde 14 das Maximum bestimmen sollte. Danach wurde mit Hilfe von Excel® der Minimum-Wert vom Maximum-Wert abgezogen und die jeweiligen Differenzen der entsprechenden Konzentration der Testsubstanz zugeordnet. Wurde ein Substanz-Screening auf Aktivität an den Rezeptoren durchgeführt, so wurden die agonistischen bzw. antagonistischen Signale zu denen des mitgetesteten Standardagonisten ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurde der Mittelwert der Standardagonist-Messwerte (Kontrolle) verwendet. Im Falle eines Agonisten-Tests wurden die Ergebnisse als „% der Kontrolle“ und im Falle eines Antagonisten-Tests als „% Hemmung“ dargestellt. Dafür wurde das erhaltene Ergebnis (% der Kontrolle) von 100 % subtrahiert, um die durch die Testsubstanz hervorgerufene Inhibition zu erhalten. Wurde in dem Versuch eine Aktivitätsbestimmung (Bestimmung der EC_{50} bzw. der IC_{50}) durchgeführt, wurden die Ergebnisse (Differenzen der Fluoreszenzsignale: Maximum-Minimum) der Messungen mit verschiedenen Konzentrationen derselben Substanz in das Programm GraphPad Prism® überführt. Hier wurde der Datensatz zunächst einer Normalisierung unterzogen, wobei der höchste gemessene Wert in dem jeweiligen Datensatz auf 100 % und der kleinste gemessene Wert auf 0 % gesetzt wurde. Damit

stellt die Bezeichnung „% der Kontrolle“ bei dieser Form der Auswertung den prozentualen Anteil der in diesem Versuch erreichten maximalen Antwort auf Stimulation mit der jeweiligen Substanz dar. Mit einer Testsubstanz wurden mindestens drei Versuche mit jeweils mindestens drei Replikaten pro Versuch durchgeführt. Pro Versuch wurde dann der Mittelwert der normalisierten Replikate gebildet. Diese Daten wurden in ein eigenes Datenblatt von GraphPad Prism® eingefügt. Die gepoolten Daten, in Einzelfällen jedoch auch die Daten einzelner Versuche, wurden einer Auswertung nach der „Vier-Parameter logistischen Gleichung“ unterzogen (Formel 4).

Formel 4

$$Y = Min + \frac{Max - Min}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \times Hillslope}}$$

X = Logarithmus der Konzentration der Substanz
Y = Zellantwort nach Stimulation mit der Substanz
Max = Maximale Zellantwort auf Stimulation mit der Substanz
Min = Minimale Zellantwort (z.B. Grundfluoreszenz der Zelle)
Hillslope = Steigung der Kurve im Wendepunkt

Der Wendepunkt dieser sigmoid verlaufenden Kurve stellt bei einer agonistisch wirkenden Substanz die EC_{50} (Effektive Konzentration bei 50 % der Zellantwort), bei einer antagonistisch wirkenden Substanz die IC_{50} (Inhibitorische Konzentration bei 50 % der Zellantwort) dar. In der Regel sind in den Abbildungen dieser Arbeit die gepoolten Daten dargestellt. In Ausnahmefällen werden auch die Ergebnisse einzelner Versuche gezeigt, worauf dann jedoch explizit hingewiesen wird. Alle Ergebnisse von Agonisten sind als Mittelwert der bestimmten pEC_{50}-Werte mit der Standardabweichung angegeben.
Aus der IC_{50} konnte unter Anwendung der Gleichung nach Cheng und Prusoff ein apparenter funktioneller K_i-Wert berechnet werden (Formel 5) (Cheng and Prusoff, 1973). Alle Ergebnisse von Antagonisten sind als Mittelwert der pK_i-Werte mit der Standardabweichung angegeben.

Formel 5

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

IC_{50} = Inhibitorische Konzentration 50 % des Antagonisten
EC_{50} = Effektive Konzentration 50 % des Agonisten
L = molare Konzentration des Agonisten

Mit Hilfe einer Analyse nach Schild konnte das antagonistische Verhalten der Testsubstanzen näher beschrieben werden (Arunlakshana and Schild, 1959). Dazu wurde die EC_{50} des Agonisten in Anwesenheit und Abwesenheit des Antagonisten bestimmt. Mit Hilfe der Formel 6 kann der so genannte Verschiebungsfaktor (VF) berechnet werden.

Formel 6

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

Nun wurde der dekadische Logarithmus der Differenz (VF-1) gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Antagonisten aufgetragen (Schild-Plot). Mit Hilfe der Formel 7 konnte der pA_2-Wert des Antagonisten ermittelt werden.

Formel 7

$$\log(VF - 1) = pA_2 + \log[A]$$ „Schild-Gleichung“

Der pA_2-Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des Antagonisten, bei der der Verschiebungsfaktor des Agonisten = 2 ist. Wenn Agonist und Antagonist kompetitiv sind, hat der Schild-Plot eine Steigung von 1 und der Schnittpunkt mit der X-Achse (pA_2-Wert) entspricht dem pK_d des Antagonisten.

3.8 cAMP-Reportergen-Assay

3.8.1 Geräte und Material

Geräte

LUMIstar® Galaxy	BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg

Material

96-well-Mikrotiterplatte, F-Form, weiß, zellkulturgeeignet, mit durchsichtigem Boden	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reagenzreservoir	Brand, Wertheim
Cellstar Zellkulturschale 100 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht bzw. Starlab, Ahrensburg

Chemikalien

Polyfect	Qiagen, Hilden
DMEM	Gibco, Karlsruhe bzw. Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich (D6434), Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tricin (N-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin)	Merck, Darmstadt
DTT (DL-Dithiothreitol)	AppliChem, Darmstadt
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X 100	Carl Roth, Karlsruhe
$MgSO_4$ x 7 H_2O (Magnesiumsulfat-Heptahydrat)	Merck, Darmstadt

Forskolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP (Adenosin 5′-triphosphat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Luciferin, Kaliumsalz	Synchem, Felsberg/Altenberg

Plasmid

pCRE-Luc-Plasmid	Stratagene, La Jolla, Canada

Puffer und Lösungen

Medium für den Assay incl. Verdünnungsreihe

		500 ml DMEM/F-12 Ham ohne Phenolrot
	mit	100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		4,8 mM L-Glutamin
Lyse-Reagenz		8 mM Tricin
		2 mM EDTA
		1 mM DTT
		5 % Triton-X 100
		auf pH 7,8 einstellen
Luciferase-Assay-Reagenz		30 mM Tricin
		10 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O
		0,5 mM EDTA
		10 mM DTT
		auf pH 7,8 einstellen
		frisch zufügen am Tag des Versuchs:
		0,5 mM ATP
		0,5 mM Coenzym A
		0,5 mM D-Luciferin

Für die Testsubstanzlösungen wurden die gleichen Stammlösungen benutzt wie beim Calcium-Assay (siehe Kapitel 3.7.1). Die Verdünnungen wurden jedoch, abweichend vom Calcium-Assay, in DMEM/F-12 Ham ohne Phenolrot hergestellt.

3.8.2 Allgemeines

Zur Messung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde der in der AG Kassack von Dr. A. Hamacher an Dopamin-D1- und Dopamin-D2-Rezeptoren etablierte cAMP-Luciferase-Reportergen-Assay verwendet (Hamacher *et al.*, 2006; Stratowa *et al.*, 1995). Durch die Aktivierung eines G_s-gekoppelten Rezeptors (z. B. $P2Y_{11}$-Rezeptor), wird in der Zelle mehr ATP in cAMP umgewandelt und der cAMP-Spiegel steigt an. Ist der Rezeptor G_i-gekoppelt (z. B. $P2Y_{12}$-Rezeptor), wird nach seiner Aktivierung die Bildung von cAMP aus ATP inhibiert. Um die Änderung des cAMP-Spiegels nach Aktivierung eines G_i-gekoppelten Rezeptors in der Zelle detektieren zu können, wird die Adenylatcyclase unspezifisch durch eine fixe Konzentration von Forskolin aktiviert, wodurch der cAMP-Spiegel in der Zelle ansteigt. Wird nun der G_i-gekoppelte Rezeptor aktiviert, kann der künstlich erhöhte cAMP-Spiegel reduziert werden. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an cAMP führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und damit zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein). Die rezeptorexprimierenden Zellen wurden für diesen Versuch mit dem pCRE-luc-Plasmid transfiziert (Abb. 3.6).
Dieses Plasmid ermöglicht es, über die Bindung des Transkriptionsfaktors Phospho-CREB an den Promotor CRE (cAMP responsive element) die Aktivierung des cAMP-Transduktionsweges zu verfolgen. Wenn CREB phosphoryliert worden ist, lagert es sich zu einem Dimer zusammen und bindet an den Promotor CRE, das auf dem pCRE-luc-Plasmid vorhanden ist. Dies hat zur Folge, dass die Transkription des ebenfalls auf dem Plasmid vorhandenen Gens für Luciferase aus Photinus pyralis angeregt wird. Die dann in den Zellen exprimierte Luciferase setzt mit Hilfe des ATP als Energielieferant D-Luciferin zu Oxyluciferin und einem Lichtquant um (Abb. 3.7)

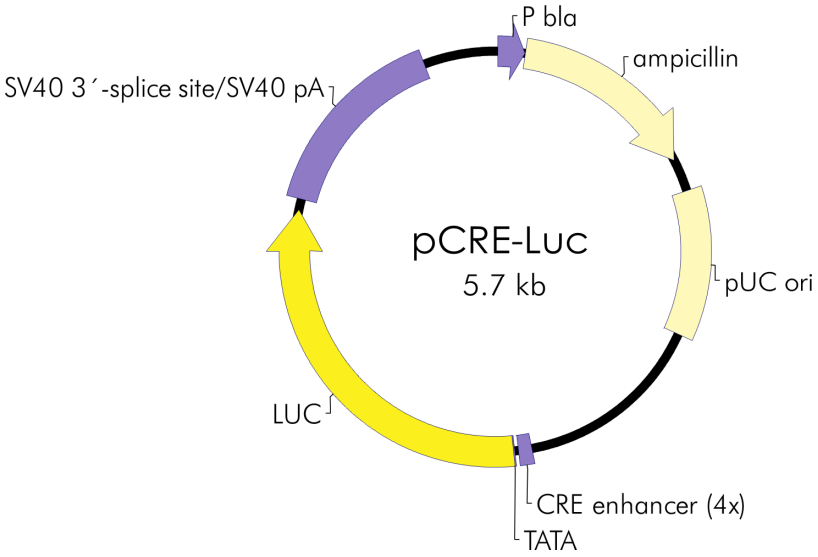


Abb. 3.6 Plasmid-Karte des pCRE-Luc-Plasmid (Stratagene®).

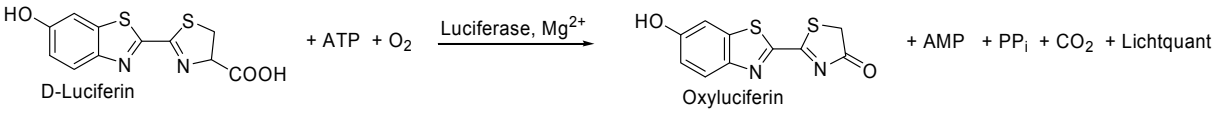


Abb. 3.7 Reaktionsgleichung: Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Freisetzung eines Lichtquants durch das Enzym Luciferase.

3.8.3 Durchführung

3.8.3.1 Transfektion

Die Transfektion wurde analog zu in Kapitel 3.1.3.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Abweichend zu diesem Protokoll wurden zu Beginn 2,5 x 10^6 Zellen in 8 ml Medium ausgesät. Zur Transfektion wurden 30 µg pCRE-Luc-Plasmid eingesetzt. Die Plasmid-Lösung wurde auf ein Volumen von 300 µl verdünnt. 80 µl Polyfect-Reagenz wurde hinzugegeben und 7 min inkubiert.

Die Zellen wurden 24 h in Anwesenheit des Transfektionsreagenzes bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator inkubiert.

3.8.3.2 Aussäen der transfizierten Zellen in weiße 96-well-Mikrotiterplatten

24 h nach der Transfektion mit dem pCRE-luc-Plasmid wurden die Zellen von der 100 mm Zellkulturschale abgeerntet (siehe Kapitel 3.1.1.3). Nach der Zentrifugation wurden alle Zellen in 40 ml frischem Medium aufgenommen (incl. Phenolrot, FKS)

und in ein steriles Reagenzreservoir überführt. Die Zellsuspension wurde gut durchgemischt. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden nun jeweils 200 µl in jede Kavität von zwei weißen 96-well-Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden pipettiert. Beim Pipettieren wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension immer wieder durchgemischt wurde. Die beiden Platten wurden nun 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

3.8.3.3 Inkubation der Testsubstanzen

Am Tag des Assays wurde das Medium von den Zellen entfernt. Die Testsubstanzen wurden in einem Volumen von je 100 µl auf den Zellen inkubiert. Für den $P2Y_{11}$-Rezeptor (G_s-Kopplung) wurden im Falle eines Agonisten 90 µl Medium ohne Phenolrot und FKS auf die Zellen vorgelegt und 10 µl der jeweiligen Testsubstanz dazupipettiert. Agonisten wurden genau 3 h auf den Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Wurde auf Antagonismus getestet, wurden 80 µl Medium ohne Phenolrot und FKS auf die Zellen pipettiert. Dazu wurden dann 10 µl des Antagonisten gegeben und 30 min im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 vorinkubiert. Auf die Mischung wurden anschließend 10 µl des Standardagonisten (10- bis 20-fache EC_{50}) gegeben und erneut unter den gleichen Bedingungen 3 h inkubiert. Für den $P2Y_{12}$-Rezeptor (G_i-Kopplung) wurden im Falle eines Agonisten 80 µl Medium ohne Phenolrot und FKS pipettiert. Dazu wurden dann 10 µl einer 100 µM Forskolin-Lösung und 10 µl der jeweiligen Testsubstanz gegeben. Auch hier wurde 3 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Im Falle eines Antagonisten wurden in jede Kavität 70 µl Medium ohne Phenolrot und FKS gegeben. Dazu wurden 10 µl des Antagonisten pipettiert und 30 min vorinkubiert. Danach wurden wie beim Agonisten 10 µl der Forskolin-Lösung sowie 10 µl des Standardagonisten (10- bis 20-fache EC_{50}) dazugegeben und noch einmal für 3 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Für den Antagonist-Test wurde beim $P2Y_{11}$-Rezeptor 1 µM ATPγS als Standardagonist verwendet, beim $P2Y_{12}$-Rezeptor 100 nM 2-MeSATP.

3.8.3.4 Messung der Luciferase-Aktivität

Nach der Inkubation wurde das Inkubationsmedium vorsichtig von den Zellen abgesaugt. Mit Hilfe einer Multikanalpipette wurden dann 100 µl des Lyse-Reagenz auf die Zellen gegeben und bei 4 °C in Dunkelheit 20 min inkubiert. Während der

Inkubation wurde das Luciferase-Assay-Reagenz zusammenpipettiert und der LUMIstar® Galaxy auf die Messung vorbereitet (Durchspülen der Schläuche mit dem Luciferase-Assay-Reagenz und Temperierung auf 25 °C). Sofort nach der Inkubation wurde die Platte in den LUMIstar® überführt und die Messung nach 5- bis 10-minütiger Inkubation im Gerät (Adaption auf 25 °C) gestartet. Es wurde im well-Mode gemessen, wobei jede Kavität einzeln vermessen wird. Die Injektion von 100 µl des Luciferase-Assay-Reagenz durch das Injektionssystem des LUMIstar® wurde nach 0,3 s gestartet. Jede Kavität wurde 13 s lang vermessen. Wenn Luciferase exprimiert worden war, stieg die Lumineszenz nach Injektion des Luciferase-Assay-Reagenzes an, was vom LUMIstar® aufgezeichnet wurde. Es dauerte ca. 2 s, bis die Lumineszenz maximale Werte erreichte.

3.8.3.5 Auswertung des Lumineszenz-Signals

Zur Auswertung wurde die Software des LUMIstar® verwendet. Es ist ein auf Microsoft Excel® basierendes System. Pro Messpunkt wurde ein Wert in willkürlichen geräte- und einstellungsspezifischen Lumineszenzeinheiten aufgenommen. Für die Auswertung wurde mit Hilfe der Software der Mittelwert der Lumineszenz einer Kavität ab Sekunde 2,4 bis Sekunde 13 bestimmt. Die restliche Auswertung erfolgte analog zur Auswertung des Ca^{2+}-Assays (siehe Kapitel 3.7.5.1)

3.9 Isolierung von Monozyten und Herstellung von Dendritischen Zellen

3.9.1 Geräte und Material

Geräte

Zentrifuge	AVANTI-J25, Beckman, Krefeld

Material

Zellkultur-Multiwell-Platten (6-well, 24-well), steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen 50 ml,	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen Filter Top (T75)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Chemikalien

RPMI1640	Sigma-Aldrich (R8758), Taufkirchen
Fetal bovine serum (FKS)	Sigma Aldrich (F7525, ch. 114K3397), Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Biosource, Camarillo (CA), USA
Recombinant Human Interleukin-4 (IL-4)	Biosource, Camarillo (CA), USA
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

RPMI1640-Medium		500 ml RPMI1640
	mit	10 % FKS
		100 U/ml Penicillin
		0,1 mg/ml Streptomycin
		4 mM L-Glutamin

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer mit EDTA (Waschpuffer)

PBS mit
0,59 g EDTA (2mM)
mit PBS auf 800 ml auffüllen,
solange erhitzen, bis sich alles gelöst hat,
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

auf 1000 g mit PBS auffüllen und autoklavieren

Herstellung der GM-CSF- und IL-4-Gebrauchslösungen

Das humane rekombinante GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor) und das rekombinante IL-4 (Interleukin-4) wurde von der Firma Biosource lyophilisiert geliefert. Beide Proteine wurden in Reinstwasser gelöst. Entsprechend wurde die im Analysenzertifikat angegebene ED_{50} in die spezifische Aktivität umgerechnet:

Formel 8

$$spez.\ Aktivität\ (U/mg) = \frac{1x10^6}{ED_{50}\ (ng/ml)}$$

Wenn die ED_{50} im Datenblatt als Bereich angegeben war, wurde der Mittelwert dieses Bereiches berechnet und in die Gleichung eingesetzt. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität wurde dann die benötigte Menge Reinstwasser berechnet, um eine GM-CSF-Lösung mit einer Konzentration von 800 U/ml und eine IL-4-Lösung mit einer Konzentration von 500 U/ml herzustellen.

3.9.2 Allgemeines

Das menschliche Blut setzt sich zu ca. 44 % aus zellulären Anteilen und zu ca. 55 % aus Plasma zusammen. Das Plasma ist eine wässrige Lösung von Proteinen, Salzen, Nährstoffen und verschiedenen anderen gelösten Bestandteilen. Bei den zellulären Anteilen unterscheidet man Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten (weiße Blutkörperchen), die sich wiederum aus drei Arten von Granulozyten (basophil, neutrophil und eosinophil), Lymphozyten und Monozyten zusammensetzen.

Durch Dichteunterschiede der verschiedenen Zelltypen und durch unterschiedliches Adhäsionsverhalten können einzelne Zellpopulationen isoliert und gewonnen werden. Dazu wird eine modifizierte isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzt. Dabei wird verdünntes Blut auf Pancoll mit einer Dichte von 1,077 g/ml geschichtet. Pancoll ist nach Herstellerangaben eine Trennlösung, die aus einem

neutralen, hoch vernetzten, hydrophilen Polymer der Sucrose (durchschnittliches Molekulargewicht 400000 Da) besteht. Durch die Zentrifugation bildet sich eine Population von mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) in einer Interphase zwischen Blutplasma und Pancoll. Diese Phase ist fast vollständig von Erythrozyten und den meisten Granulozyten gereinigt. Diese Zellen sind auf den Boden des Zentrifugenröhrchens abgesunken. Die Thrombozyten bleiben zum großen Teil im Plasma, das sich oberhalb der Interphase befindet. Thrombozyten haben zwar eine ähnliche Dichte wie Monozyten und Lymphozyten, besitzen jedoch einen geringeren Durchmesser und sinken bei der Zentrifugation im Röhrchen langsamer ab (Abb. 3.8).

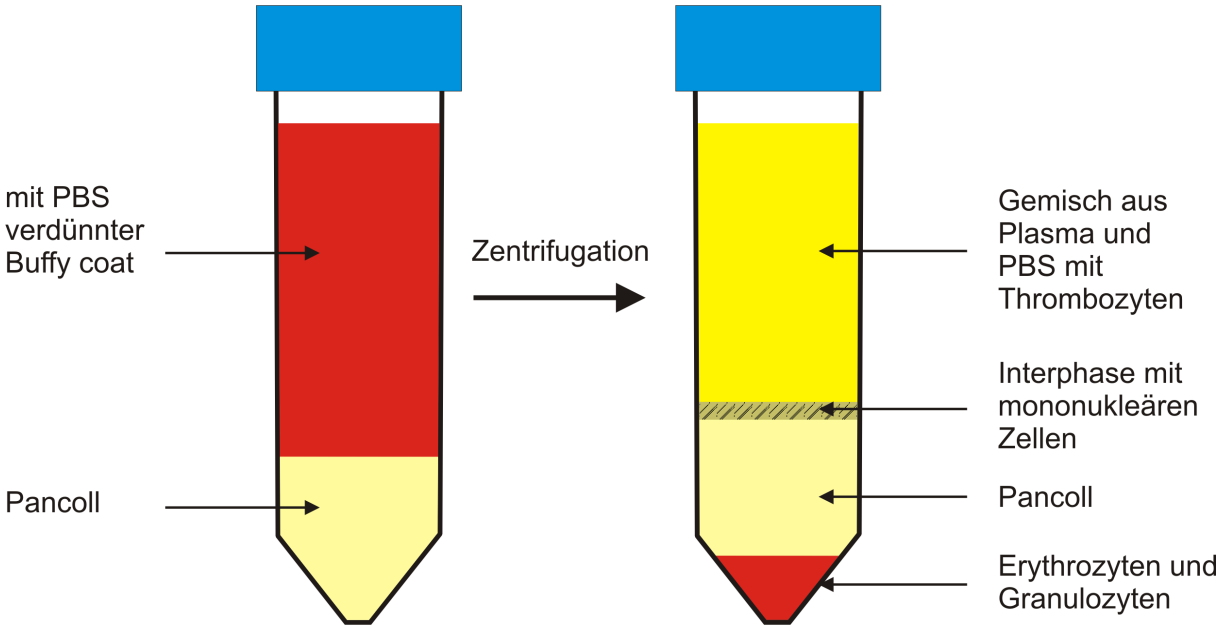


Abb. 3.8 Isolierung von peripheren mononukleären Blutzellen über Dichtezentrifugation.

Die Interphase wird abpipettiert. Die gewonnen peripheren mononukleären Blutzellen (PMBC) werden nach verschiedenen Waschschritten im Brutschrank inkubiert. Dabei heften sich Monozyten an die Zellkulturschale an, während Lymphozyten in Suspension bleiben. Durch einen Waschschritt können die beiden Zelltypen nun getrennt werden. Durch Inkubation der Monozyten mit 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 über fünf Tage differenzieren sich diese Zellen zu dendritischen Zellen aus (Romani *et al.*, 1994).

Das Blut wurde in Form von frischen Buffy coats vom Institut für Hämatologie der Universitätsklinik Bonn bezogen. Unter „Buffy coats“ versteht man ein Leukozyten-

Konzentrat, das noch mit Erythrozyten, Granulozyten und Plasma verunreinigt ist. Es wurde bei der Aufbereitung von gespendetem Blut gewonnen.

3.9.3 Durchführung

Die Buffy coats wurden jeweils gegen Mittag frisch aus dem Institut für Hämatologie der Universitätskliniken Bonn abgeholt und stammten aus der Aufbereitung der Blutspenden desselben Tages. Das Blut wurde aus dem Beutel auf drei leere, sterile 50 ml PP-Röhrchen aufgeteilt (ca. 15 - 20 ml je PP-Röhrchen). Mit PBS incl. EDTA wurde jeweils auf 50 ml aufgefüllt (Verdünnung des Blutes auf etwa 1:2 bis 1:3). Dann wurden ungefähr 16,5 ml Pancoll in leere, sterile 50 ml PP-Röhrchen vorgelegt und mit ca. 33 ml des Blut/Puffer-Gemisches überschichtet. Die beiden Phasen dürfen sich während der Überschichtung nicht vermischen. Anschließend wurde das gefüllte Röhrchen 30 min bei 800 x g zentrifugiert. Zuvor wurde die Bremse der Zentrifuge deaktiviert, da sich sonst beim Bremsvorgang die vorher getrennten Phasen wieder vermischen können. Nun wurde die Interphase, eine weiße, wenige mm dicke Schicht zwischen Plasma und Pancoll, mit Hilfe einer sterilen Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml PP-Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde mit Waschpuffer auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt.
Anschließend wurden mehrere je 7 min lange Zentrifugationsschritte mit 640 x g, 500 x g, 400 x g, 300 x g und schließlich 200 x g durchgeführt. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit Waschpuffer gewaschen. Dazu wurde es in 10 ml Waschpuffer aufgenommen, resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Der Zyklus aus Waschen und Zentrifugation bei 200 x g wurde so lange wiederholt, bis das Pellet nicht mehr rot war.
War das Pellet nach der Zentrifugation bei 400 x g noch stark rot, wurde noch einmal mit einem Pancoll-Gradient zentrifugiert. Dazu wurden 5 ml Pancoll in neues Röhrchen vorgeben, das Pellet in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und auf das Pancoll geschichtet. Dann wurde wiederum 30 min mit 800 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Das Volumen wurde mit Waschpuffer auf 50 ml ergänzt und die Zellsuspension bei 640 x g für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Wachpuffer aufgenommen und mit dem Zentrifugationsschritt bei 300 x g fortgefahren.

Das saubere Pellet wurde in 20 - 25 ml RPMI-Medium resuspendiert. Mit Hilfe des CASY®1 (siehe Kapitel 3.1.1.4) wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde dann durch Zugabe von weiterem RPMI-Medium auf 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde nun auf 6-well-Platten mit 5 ml/Kavität verteilt und 1 h lang bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden nicht adhärente Zellen (Lymphozyten) mit dem überstehenden Medium entnommen und, wenn sie weiterverwendet werden konnten, in neue T75-Kulturflaschen gegeben und bis zum Gebrauch bei 37 °C inkubiert. Die adhärenten Zellen (Monozyten) wurden dreimal mit Medium und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Mit Hilfe des Mikroskops wurde kontrolliert, ob und wie viele Zellen nicht angeheftet waren. Wenn viele abgekugelte Zellen erkennbar waren, wurde die Kavität erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Wenn Monozyten oder Lymphozyten für Versuche benötigt wurden, wurden sie entweder direkt verwendet oder über Nacht weiter in RPMI-Medium kultiviert. Wurden dendritische Zellen benötigt, wurden die Zellen dagegen nun mit RPMI-Medium gefüttert, das 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 enthielt. Drei Tage später wurde das Medium gewechselt. Da nun die meisten Zellen in Suspension vorlagen, wurde das Medium mit den Zellen abgenommen, in ein steriles 50 ml PP-Röhrchen gegeben und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann erneut in RPMI-Medium mit GM-CSF und IL-4 aufgenommen. Weitere drei Tage später wurden die Zellen in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und gezählt. Mit RPMI-Medium mit GM-CSF und IL-4 wurde eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils ein ml der Zellsuspension wurde dann in je einer Kavität einer 24-well-Platte gegeben und die aus den Stammlösungen in RPMI-Medium verdünnten Testsubstanzen (siehe Kapitel 3.7.1) dazupipettiert. Nach 24 h Inkubation wurden die dendritischen Zellen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Zellen und Überstand wurden einzeln bei -80 °C bis zum Gebrauch eingefroren.

3.10 ELISA

3.10.1 TSP-1 ELISA

3.10.1.1 Geräte und Material

Geräte

FLUOstar® Optima	BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg

Material

PP-Röhrchen 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Chemikalien, Puffer und Lösungen

ChemiKine™ Human TSP-1 EIA Kit Chemicon International, UK (CYT168)
(incl. Waschpuffer; TSP-1-Antikörper vom Kaninchen; TSP-1-Standard; biotinyliertes TSP-1 (TSP-1 Conjugat); Farb-Reagenzien; Streptavidin-Alkalische Phosphatase; Stopplösung; ELISA-Platte (96-well), beschichtet mit Antikörpern von der Ziege, die gegen Antikörper vom Kaninchen (Anti-Rabbit) gerichtet sind)

Die Reagenzien wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Da es sich bei den zu vermessenden Proben um Kulturüberstände handelt, wurde der TSP-1-Standard im gleichen Medium ohne Zusätze (z.B. FKS) verdünnt.

3.10.1.2 Allgemeines

Bei dem Chemikine™ Human TSP-1 EIA Kit handelt es sich um einen käuflich zu erwerbenden EIA-Test (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest), der das humane Thrombospondin-1 detektieren kann. Er nutzt das Prinzip eines kompetitiven Enzym-Immunoassays. Das Kit enthält so genannte “Pre-coated goat anti rabbit antibody plates“, d. h. ELISA-Platten, die mit Antikörpern von der Ziege beschichtet sind, die gegen Antikörper vom Kaninchen gerichtet sind. Die ELISA-Platte fängt spezifisch den gegen das humane TSP-1 gerichteten Antikörper vom Kaninchen. Dieser Antikörper bindet wiederum spezifisch entweder das zugesetzte biotinylierte TSP-1 oder das TSP-1 aus der Probe bzw. des Standards. Das biotinylierte TSP-1 und das

TSP-1 aus Probe oder Standard konkurrieren um die spezifische Bindung am TSP-1-Antikörper. Ist mehr TSP-1 in der Probe vorhanden, so bindet mehr TSP-1 und weniger biotinyliertes TSP-1 an den Antikörper. Um die Reaktion sichtbar zu machen, wird ein Konjugat von Streptavidin und Alkalischer Phosphatase zugegeben. Das Streptavidin bindet an das Biotin des biotinylierten TSP-1 (Abb. 3.9).

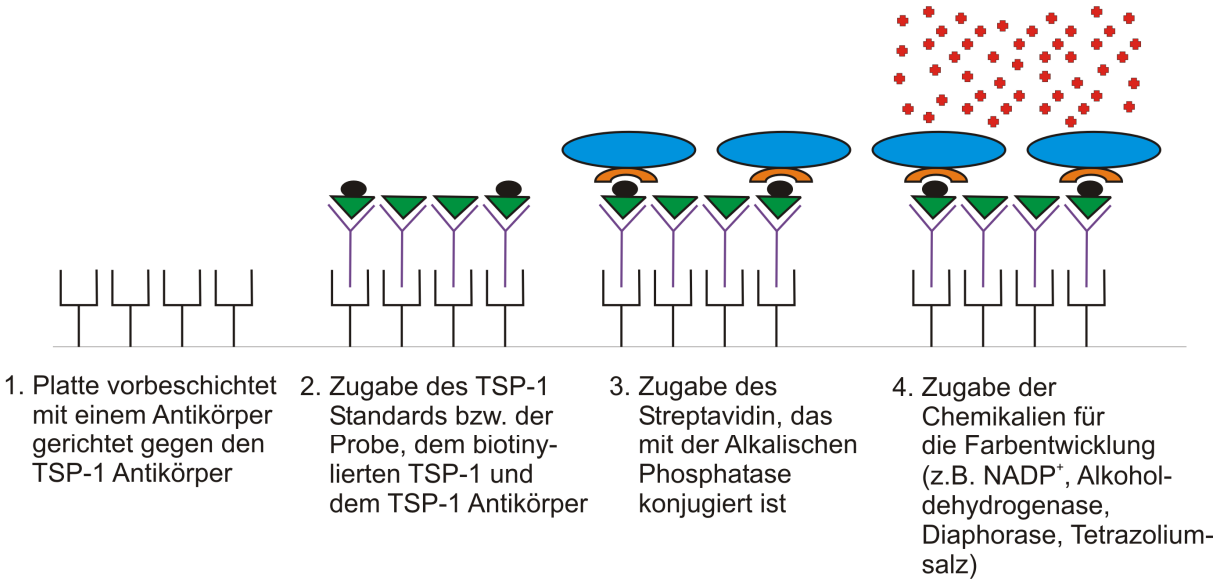


Abb. 3.9 Schematische Darstellung des Prinzips des Chemikine™ HumanTSP-1 EIA Kits (modifiziert nach der Anwendungsbeschreibung der Firma Chemicon).

Die Alkalische Phosphatase wandelt nun $NADP^+$ zu NAD^+ um. NAD^+ aktiviert eine zyklische Redoxreaktion von der Alkoholdehydrogenase und der Diaphorase, wobei ein Tetrazoliumsalz in ein tiefrotes Produkt (Formazan) umgewandelt wird (Abb. 3.10). Diese Farbstoffproduktion kann mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Messgeräts über die Absorption bei 490 nm quantifiziert werden.

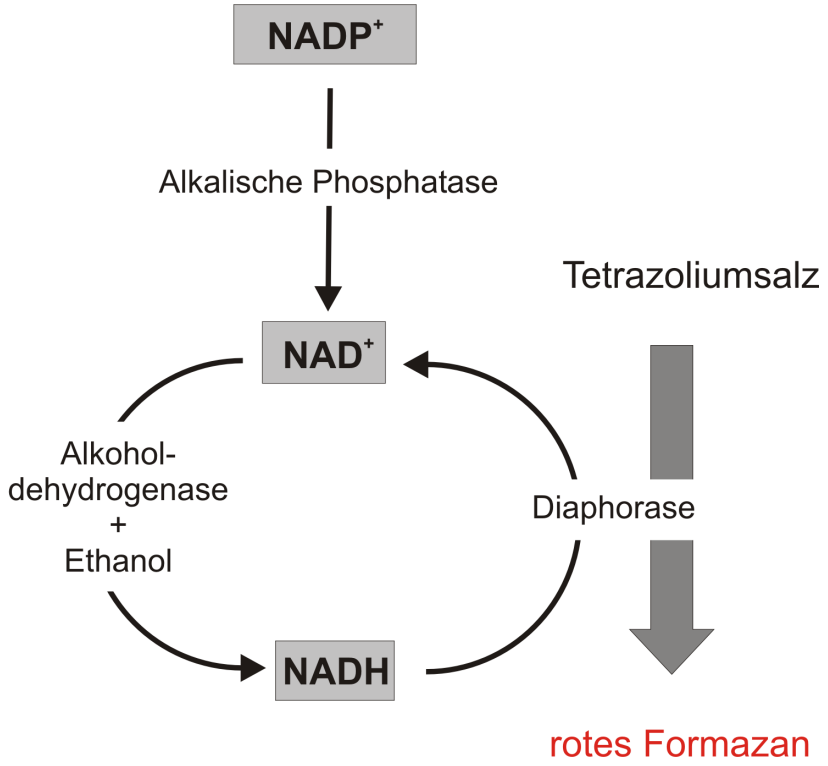


Abb. 3.10 Prinzip der Farbreaktion, die bei dem genutzten ELISA angewendet wurde (Luttmann *et al.*, 2006b).

3.10.1.3 Durchführung

Von den Zellüberständen der mit Testsubstanzen inkubierten dendritischen Zellen (siehe Kapitel 3.9.3) wurden 1:10-Verdünnungen in Medium ohne Zusätze hergestellt. Diese Proben wurden in dem Assay als Duplikat eingesetzt. Proben und Standards wurden in die ELISA-Platte pipettiert und anschließend der gegen das humane TSP-1 gerichtete Antikörper zugefügt. Die Platte wurde drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das biotinylierte TSP-1 in jede Kavität gegeben und die Platte erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Platte gewaschen. Dazu wurde sie über einem Waschbecken ausgeschlagen und für kurze Zeit auf einem Zellstoffpapier abtropfen gelassen. Dann wurde Waschpuffer in jede Kavität pipettiert und die Platte wieder über dem Waschbecken ausgeschlagen. Dieser Waschschritt wurde viermal wiederholt. Danach wurde noch einmal Waschpuffer in die Kavitäten pipettiert und die Platte 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig aus der Platte entfernt. Nun wurde das Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in die Kavitäten gegeben und 30 min inkubiert. Hiernach wurde erneut viermal gewaschen. Dann wurden die Farbreagenzien zugegeben und die Nullprobe auf der Platte bei 490 nm im FLUOstar® vermessen. Sobald ihre

optische Dichte (O. D.) einen Wert von 1,6 erreichte, wurde die Stopplösung zugegeben und die Platte erneut vermessen.
Die O.-D.-Werte, die für die Standardkonzentrationen des TSP-1 ermittelt wurden, wurden in Graph Pad Prism gegen die Konzentration eingetragen und einer Auswertung mit der Vier-Parameter logistischen Gleichung unterzogen. Über den lineraren Teil dieser Standardkurve wurden die Konzentrationen des sezernierten TSP-1 in den Proben berechnet (Konzentration: Menge TSP-1/10^6 Zellen in einem ml Medium). Zur Darstellung der Ergebnisse wurde Menge TSP-1, die im Überstand Kontrolle (DC nur mit Medium) bestimmt wurde, von den Ergebnissen der behandelten Zellen abgezogen.

3.10.2 IL-12p70 ELISA

Die Bestimmung der Konzentration von IL-12p70 wurde von Nathalie Bles aus der Arbeitsgruppe von D. Communi und J.M. Boeynaems am Institute of Interdisciplinary Research der Faculty of Medicine an der Université Libre de Bruxelles durchgeführt. Die Messungen erfolgten analog der Veröffentlichung von Wilkin et al. (Wilkin *et al.*, 2001). Humanes IL-12p70 wurde in den Überständen der stimulierten Dendritischen Zellen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) bestimmt. Bei IL-12p70 handelt es sich um die bioaktive Form des Interleukin-12. Es stellt ein Heterodimer mit einer Größe von ca. 70 kDa dar.

3.11 Apyrase-Assay

3.11.1 Geräte und Material

Geräte

FLUOstar® Optima	BMG LabTechnologies GmbH, Offenburg

Material

Filterspitzen	Starlab, Ahrensburg
Blaubandfilter (589/3)	Whatman GmbH, Dassel
96-well-Mikrotiterplatte, F-Form	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

Chemikalien

Malachitgrün	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniummolybdat	Carl Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
$CaCl_2$ x $2H_2O$ (Calciumchlorid-Dihydrat)	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$ x $8H_2O$ (Magnesiumchlorid-Octahydrat)	Merck, Darmstadt
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Glucose-Monohydrat für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
Apyrase Grade VI	Sigma-Aldrich (A6410), Taufkirchen
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Carl Roth, Karlsruhe
HCl 37 % (Salzsäure)	Fluka-Riedel-de Haën, Seelze
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix®

Puffer und Lösungen

Modifizierte Ringer-Lösung	125 mM NaCl 5,2 mM KCl 20 mM HEPES 2 mM $CaCl_2$ x $2H_2O$ 1,2 mM $MgCl_2$ 5 mM D-Glucose-Monohydrat
Citrat-Lösung	34 % (m/V) tri-Na-Citrat in Reinstwasser
Lösung 1	0,045 % (m/V) Malachitgrün in Reinstwasser
Lösung 2	4,2 % (m/V) Ammoniummolybdat-Lösung in 4 N HCl
Lanzetta-Lösung	3 Teile Lösung 1 und 1 Teil Lösung 2 zusammenmischen und 1 h rühren

	lassen; 2 ml einer 1%igen TritonX-Lösung pro 100 ml dazugeben und ca. 10 min weiterrühren; entstandene Lösung zweimal über einen Blaubandfilter abfiltrieren. Die Lösung ist eine Woche haltbar.
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung	KH_2PO_4 wurde mehrere Stunden im Trockenschrank getrocknet, dann einwogen und 1 mM Lösung hergestellt. Für die Verdünnungen der Stammlösung wurde modifizierte Ringer-Lösung benutzt.
Nukleotid-Lösungen (ATP, ADP, AMP)	10 mM Lösungen in H_2O hergestellt (siehe Kapitel 3.7.1). Für die Verdünnungen auf 200 µM wurde modifizierte Ringer-Lösung benutzt.

Enzym-Lösung

Bei diesem Assay wurde das Enzym Apyrase Grade VI eingesetzt. Es wurde mit einer Konzentration von 1 mg Protein/ml Wasser gelöst. Bei einer angegebenen Aktivität von 324 U/mg enthalten 3,09 µl dieser Stammlösung also 1 Unit Enzym. Diese Menge wurde in einzelne sterile Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Um eine Konzentration von 0,04 U/ml zu erreichen, wurde ein Aliquot des Enzyms in 25 ml modifizierter Ringer-Lösung verdünnt.

Die Enzym-Lösung muss immer frisch hergestellt werden, da die Aktivität bei längerer Lagerung stark nachlässt. Das Enzym muss in konzentrierter Form immer auf Eis gelagert werden. Nur wenn das Enzym kurz vor einem Versuch in modifizierter Ringer-Lösung verdünnt wurde, kann es bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.11.2 Allgemeines

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ecto-Nukleotidase-Assay etabliert. Dieser Assay wurde zur Selektivitätstestung der gefundenen Agonisten und Antagonisten eingeführt. Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolasen (NTPDasen) kontrollieren im extrazellulären Raum die Konzentration von Nukleotiden

(Zimmermann, 2000). Zum einen können sie durch den Abbau von Nukleotiden die purinerge Signalweiterleitung unterbrechen, zum anderen können sie die Ansprechbarkeit für Nukleotid- oder Adenosin-Rezeptoren steuern. Bisher sind sieben NTPDasen beschrieben worden (Bigonnesse F *et al.*, 2004; Zimmermann, 2000).

Beim Abbau von ATP wird anorganisches ortho-Phosphat (P_i) freigesetzt.

$$ATP \longrightarrow ADP + P_i \longrightarrow AMP + 2\ P_i$$

P_i wird mit Hilfe eines Malachitgrün-Phosphat-Assays photometrisch bestimmt. Die Methode ist ausführlich bei Lanzetta et al. beschrieben worden (Lanzetta *et al.*, 1979).

Da die verschiedenen ecto-Nukleotidasen nicht rekombinant verfügbar waren, wurde ein Modellsystem verwendet. Die Apyrase aus der Kartoffel stellt eine in der Literatur gut beschriebene Alternative dar (Horner *et al.*, 2005). Es wurde die Apyrase Grade VI eingesetzt. Dieses Enzym baut hauptsächlich ATP zu ADP ab. Der Abbau von ADP zu AMP findet dagegen nur marginal statt.

3.11.3 Durchführung

Aufnahme einer Enzym-Kinetik

Es wurde eine Enzym-Kinetik aufgenommen, um die ideale Inkubationszeit zu ermitteln. Dazu wurden je 25 µl der verschiedenen 200 µM Nukleotid-Lösungen in Mikroreaktionsgefäße vorpipettiert. Dann wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (90 min, 80 min, 70 min, 60 min, 50 min, 40 min, 30 min, 20 min, 15 min, 12,5 min, 10 min, 7,5 min, 5 min, 2,5 min, 1 min, 0,5 min) 225 µl der Enzym-Lösung dazupipettiert.. Die Zeiten wurden genau eingehalten bzw. genau notiert. Als beste Vorgehensweise hat sich herausgestellt, mit den längsten Inkubationszeiten zu beginnen, um später die Reaktion bei allen Ansätzen gleichzeitig stoppen zu können. Die Reaktion der Nukleotide mit der Apyrase wurde gestoppt, indem die Mikroreaktionsgefäße für 2 min auf 130 °C erhitzt wurden, um den Reaktionsansatz zum Kochen zu bringen und dadurch das Enzym zu zerstören. Anschließend wurden aus jedem Mikroreaktionsgefäß 20 µl des Ansatzes entnommen und im Triplikat in eine Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. Als Kontrolle wurden die

verwendeten Nukleotid-Lösungen ebenfalls untersucht, um eventuell vorhandenes Phosphat zu detektieren. Dazu wurden 25 µl der Nukleotid-Lösung mit 225 µl der modifizierten Ringer-Lösung (ohne Enzym) aufgefüllt. Auch hier wurde die Reaktion der Nukleotide mit der Apyrase gestoppt, indem die Mikroreaktionsgefäße für 2 min auf 130 °C erhitzt wurden. Von dieser Lösung wurden dann ebenfalls 20 µl in die Mikrotiterplatte pipettiert.

Kalibrierkurve

Für die Kalibrierkurve wurden von verschiedenen Verdünnungen der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung je 20 µl im Triplikat in die Mikrotiterplatte pipettiert. Um Nullwerte aufzunehmen, wurden Kavitäten der Mikrotiterplatte nur mit modifizierter Ringer-Lösung bestückt.

Testung von Substanzen

Um Testsubstanzen auf ihre Hemmung der Apyrase zu überprüfen, wurden sie mit dem Enzym vorinkubiert. Dazu wurden 25 µl der jeweiligen Testsubstanz vorgelegt und 225 µl der Enzymlösung zugegeben. Für die Kontrolle wurden an Stelle der Testsubstanz 25 µl Puffer vorgelegt. Diese Mischungen wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 25 µl der 200 µM ATP-Lösung dazupipettiert. Die Reaktion wurde 40 min nach der ATP-Zugabe durch Erhitzen gestoppt (s.o.). Je Ansatz wurden 20 µl in die Mikrotiterplatte überführt.

3.11.3.1 Messung

Die mit 20 µl Probenlösung gefüllten Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit je 160 µl der Lanzetta-Lösung versetzt. Anschließend wurden je 20 µl der Citrat-Lösung dazupipettiert, um die Farbreaktion zu stoppen. Nun wurde die Platte noch einmal 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde sie bei 620 nm im FLUOstar® vermessen. Die Absorptions-Werte, die für die Standardkonzentrationen der Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung ermittelt wurden, wurden in Graph Pad Prism gegen die Konzentration eingetragen und einer Auswertung mit Hilfe der linearen Regression unterzogen. Über diese Standardkurve wurden die Konzentrationen des Phosphats in den Proben berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$-, $P2Y_{11}$- und $P2Y_{12}$-Rezeptor-exprimierenden Zellen

4.1.1 Testung von Nukleotiden und Nukleotid-Analogen an 1321N1-WT-Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die verwendete humane Zelllinie 1321N1 auf Behandlung mit verschiedenen Nukleotiden mit Calcium-Ausschüttung reagiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Zellen keine funktionellen P2-Rezeptoren besitzen (Filtz *et al.*, 1994). Als Kontrollsubstanz wurde Histamin eingesetzt, da die 1321N1-Zellen nativ den Histamin-(H1-)Rezeptor exprimieren, bei dem es sich ebenfalls um einen G_q-gekoppelten Rezeptor handelt (Nakahata *et al.*, 1986). Die Nukleotide bzw. Nukleotid-Analogen wurden an den 1321N1-Wildtyp-Zellen im Calcium-Assay in einer Konzentration von 10 µM getestet (Abb. 4.1). Diese Konzentration wurde ausgewählt, da für alle P2Y-Rezeptoren die in der Literatur beschrieben EC_{50}-Werte deutlich unter den 10 µM liegen (Abbracchio *et al.*, 2006).

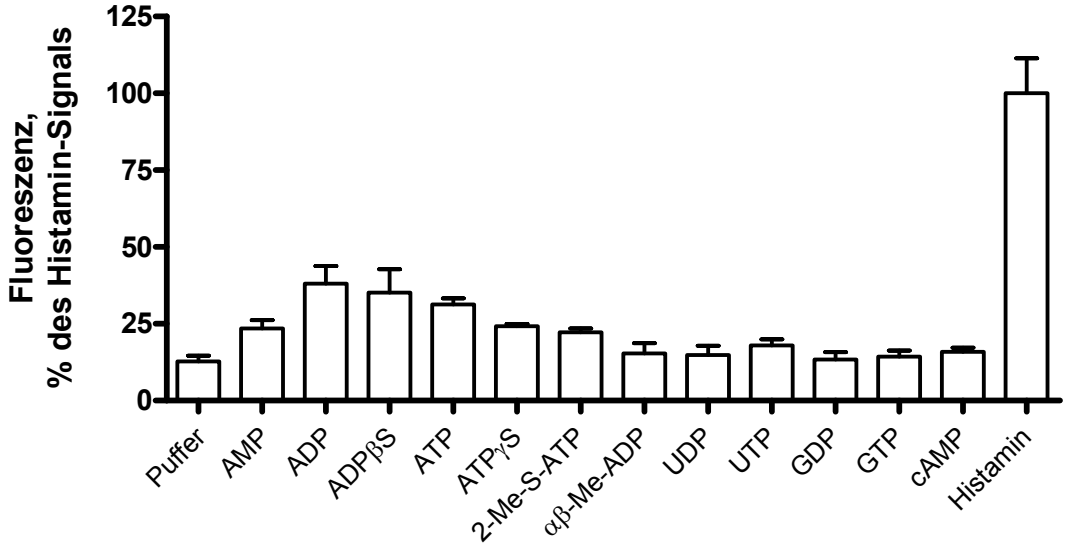


Abb. 4.1 Untersuchung von verschiedenen physiologischen und nicht-physiologischen Nukleotiden sowie Histamin an 1321N1-WT-Zellen im Calcium-Assay in einer Konzentration von 10 µM. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der durch 10 µM Histamin in den Zellen hervorgerufenen Fluoreszenz dargestellt.

Es zeigte sich, dass die getesteten Uracil- und Guanin-Nukleotide sowie α,β-Me-ADP keine Calcium-Ausschüttungen verursachten, die von der Pufferkontrolle signifikant verschieden waren (Abb. 4.1). Die Adenin-Nukleotide zeigten dagegen eine von der Pufferkontrolle signifikant verschiedene Calcium-Antwort. Das Calcium-Signal lag zwischen 22 und 38 % des durch Histamin hervorgerufenen Signals. Die Injektion von Puffer ergab einen Fluoreszenzanstieg, der bei 13 % der von Histamin hervorgerufenen Calcium-Antwort lag. Bei der Testung der Adenin-Nukleotide bei einer Konzentration von 1 µM zeigten die Zellen dagegen kein vom Puffer verschiedenes Signal. Die Befunde zeigten somit, dass die 1321N1-Wildtyp-Zellen auf eine Behandlung mit Adenin-Nukleotiden und seinen Derivaten zwar reagieren, dass sie jedoch nur einen Bruchteil der in diesen Zellen möglichen Calcium-Antwort (z. B. auf Histamin) zeigten. Zudem liegen die zu erwartenden EC_{50}-Werte nach der Transfektion mit P2Y-Rezeptoren deutlich unter der Konzentration, die in den Wildtyp-Zellen überhaupt erst eine signifikant vom Puffer verschiedene Calcium-Ausschüttung hervorrufen (vgl. Kapitel 4.1.3). Deshalb konnten 1321N1-Wildtyp-Zellen als Wirts-Zelllinie für die stabile Transfektion und Expression von P2Y-Rezeptoren genutzt werden. Auch andere Arbeitsgruppen nutzten diese Zelllinie als Wirts-Zelllinie für die Expression von P2Y-Rezeptoren. Als Beispiele seien hier der $P2Y_1$-Rezeptor (Filtz *et al.*, 1994), der $P2Y_2$-Rezeptor (Erb *et al.*, 1995) oder der $P2Y_6$-Rezeptor (Communi *et al.*, 1996) genannt.

4.1.2 Überprüfung der Plasmide mit cDNA für die verschiedenen P2Y-Rezeptoren

Die Plasmide für die $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren wurden vom Missouri S&T cDNA Resource Center bezogen (www.cdna.org). Zusätzlich wurde beim $P2Y_{11}$-Rezeptor mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Prof. Schmalzing (RWTH Aachen) durch site-directed mutagenesis eine Sequenz eingefügt, die am N-terminalen Ende des Rezeptors für einen sechsfachen Histidin-Rest („his-tag“) codiert. Von diesen Rezeptoren wurden Proben zur Sequenzierung an die Firma MWG geschickt. Im Anhang sind die Ergebnisse dieser Sequenzierung dargestellt (siehe Kapitel 11). Durch Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit der cDNA-Sequenz des jeweiligen Rezeptors konnte die Korrektheit der Plasmidsequenz bestätigt werden (siehe Anhang, Kapitel 11). Zur weiteren Absicherung wurde für die

Rezeptoren $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$ und $hisP2Y_{11}$ eine Restriktionsanalyse durchgeführt, um die korrekte Größe von Wirtsplasmid und Insert zu kontrollieren. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, die Plasmide einem Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen unterzogen. In Tab. 3.1 sind die Enzyme für das jeweilige Plasmid aufgelistet. In Abb. 4.2 ist die gelelektrophoretische Auftrennung nach dem Verdau dargestellt.

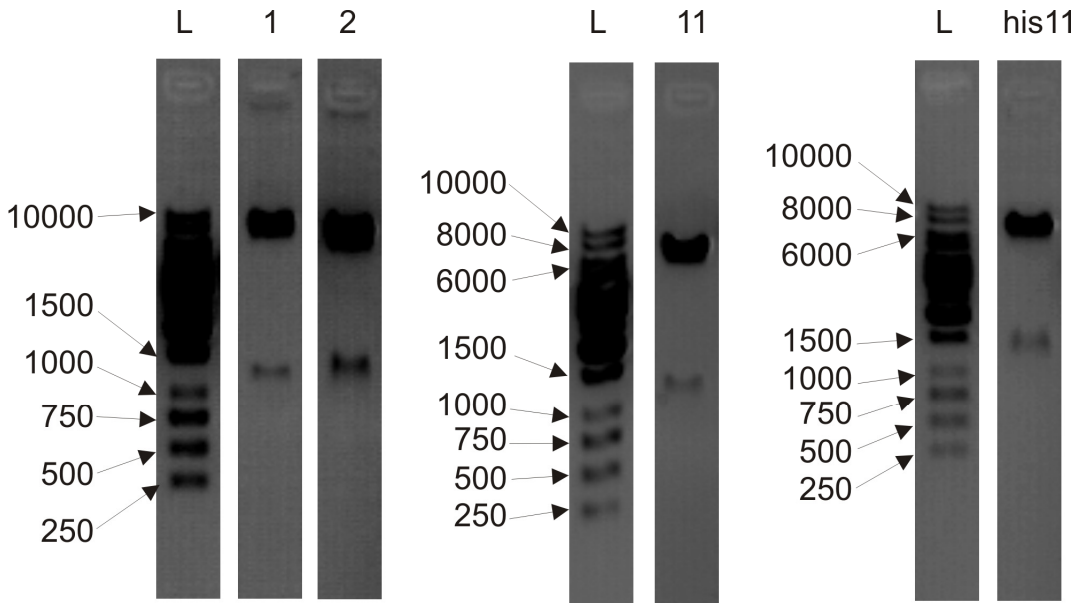


Abb. 4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von pcDNA3.1(+)-Plasmiden mit einklonierter cDNA von P2Y-Rezeptoren nach Restriktionsanalyse. Die Auftrennung erfolgte auf einem 0,9%igen Agarose-Gel (L = Leiter, 1 = pcDNA3.1(+)-$P2Y_1$, 2 = pcDNA3.1(+)-$P2Y_2$, 11 = pcDNA3.1(+)-$P2Y_{11}$, his11 = pcDNA3.1(+)-$hisP2Y_{11}$).

Wie in Abb. 4.2 dargestellt sind die herausgeschnittenen Inserts ca. 1,3 kb groß, während der Rest des Plasmids eine Größe von ca. 5,4 kb ausmacht. Diese Banden konnten bei allen vier untersuchten Plasmiden detektiert werden. Bei dem Plasmid pcDNA3.1(+)-$P2Y_1$ ist die Bande bei 1,2 kb in Abb. 4.2 nur schwach zu erkennen.

4.1.3 Testung der verschiedenen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zelllinien

Die verschiedenen P2Y-Rezeptoren wurden in 1321N1-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 3.1.3). Funktionelle Untersuchungen an selektierten Klonen mit Hilfe des

Ca^{2+}-Assays sollten zeigen, ob der exprimierte Rezeptor funktionell ist und die Ergebnisse liefert, die den jeweiligen Literaturwerten entsprechen.

4.1.3.1 $P2Y_1$-Rezeptor

Am $P2Y_1$-Rezeptor wurden im Calcium-Assay für den Standardagonisten 2-MeSADP ein pEC_{50}-Wert von 8,46 ± 0,18 (n = 5; EC_{50}: 3,5 nM) und für ATP ein pEC_{50}-Wert von 6,62 ± 0,18 (n = 3; EC_{50}: 243 nM) bestimmt (Abb. 4.3).

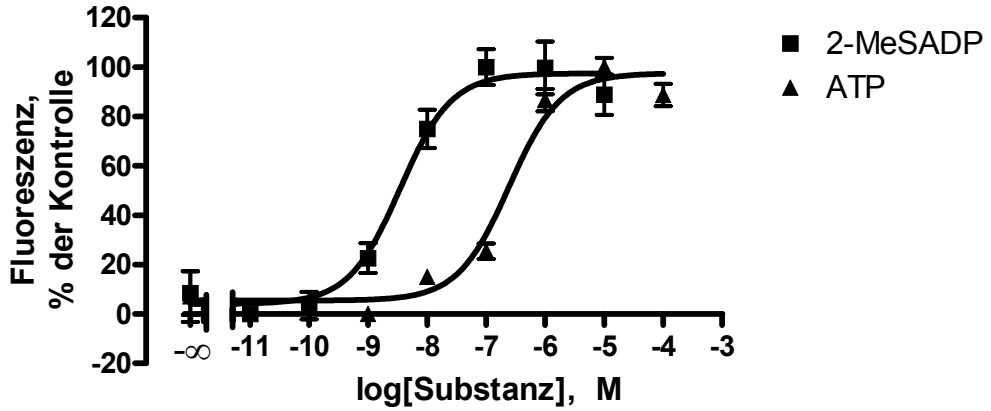


Abb. 4.3 Konzentrations-Effekt-Kurve von 2-MeSADP und ATP am $P2Y_1$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit 2-MeSADP bzw. ATP maximal erreichten Antwort. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus fünf Experimenten (2-MeSADP) bzw. drei Experimenten (ATP). Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

4.1.3.2 $P2Y_2$-Rezeptor

Auch der $P2Y_2$-Rezeptor wurde rekombinant in 1321N1-Zellen eingebracht. Am $P2Y_2$-Rezeptor wurden für die beiden Standardagonisten UTP und ATP pEC_{50}-Werte von 6,86 ± 0,05 (n = 6; EC_{50}: 139 nM) bzw. von 6,74 ± 0,06 (n = 5; EC_{50}: 181 nM) im Ca^{2+}-Assay bestimmt (Abb. 4.4).

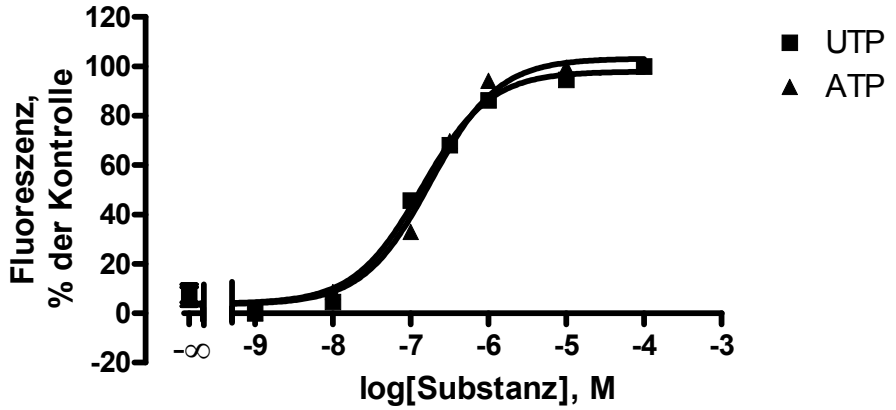


Abb. 4.4 Konzentrations-Effekt-Kurve von UTP und ATP als Agonisten am $P2Y_2$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit UTP bzw. ATP maximal erreichten Antwort. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus sechs Experimenten (UTP) bzw. fünf Experimenten (ATP). Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

4.1.3.3 $P2Y_4$-Rezeptor

1321N1-$P2Y_4$-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Gachet aus Straßburg zur Verfügung gestellt. Der pEC_{50}-Wert für den Standardagonisten UTP wurde auch für diese Zelllinie im Ca^{2+}-Assay bestimmt (Abb. 4.5). Mit 7,69 ± 0,15 (n = 3; EC_{50}: 20 nM) liegt der pEC_{50}-Wert etwas über dem in der Literatur angegebenen Bereich von 7,30 bis 6,10 (Brunschweiger and Muller, 2006; Muller, 2002). Letztere Werte wurden jedoch mit Hilfe von IP_3-Messungen bestimmt.

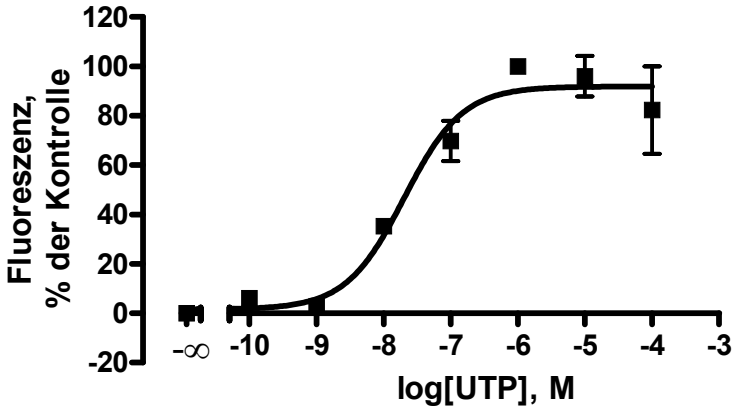


Abb. 4.5 Konzentrations-Effekt-Kurve von UTP am $P2Y_4$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit UTP maximal erreichten Antwort dar. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus drei Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

4.1.3.4 $P2Y_6$-Rezeptor

Auch der $P2Y_6$-Rezeptor wurde stabil in 1321N1-Zellen transfiziert und im Ca^{2+}-Assay untersucht. Für den Standardagonisten UDP wurde ein pEC_{50}-Wert von 6,89 ± 0,12 (n = 5; EC_{50}: 129 nM) bestimmt (Abb. 4.6).

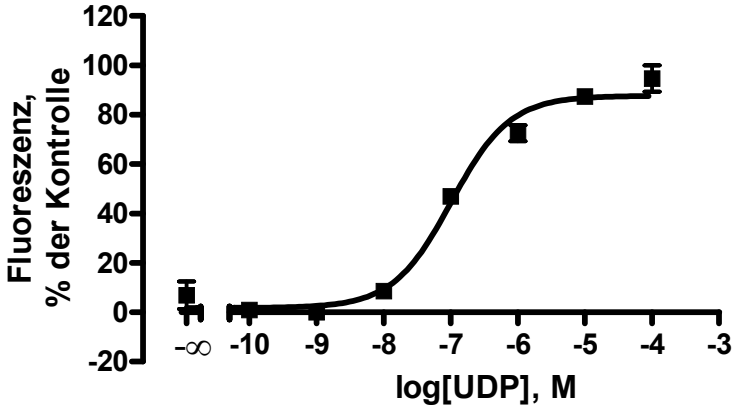


Abb. 4.6 Konzentrations-Effekt-Kurve von UDP am $P2Y_6$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit UDP maximal erreichten Antwort dar. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus fünf Experimenten. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

4.1.3.5 $P2Y_{11}$-Rezeptor

Wie bereits in Kapitel 1.3 erläutert, werden im menschlichen Körper zwei Spleiß-Varianten des $P2Y_{11}$-Rezeptors exprimiert (Communi *et al.*, 2001). Die Ssf1-Spleiß-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors wurde von der belgischen Arbeitsgruppe um D. Communi und J.M. Boeynaems zur Verfügung gestellt. Diese war stabil in 1321N1-Zellen transfiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie 1321N1-$P2Y_{11}$ genannt. Das Plasmid, das die korrekte cDNA für den $P2Y_{11}$-Rezeptor trug, wurde vom Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org) bezogen und rekombinant in 1321N1-Zellen eingebracht. Diese Zelllinie wurde 1321N1-$P2Y_{11}$GU (GU von Guthrie Foundation, einem früheren Namen des Missouri S&T cDNA Resource Center) genannt, um sie von der Zelllinie mit der Ssf1-Spleiß-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu unterscheiden. Beide Zelllinien wurden durch Testung von verschiedenen Nukleotid-Analogen im Calcium-Assay charakterisiert und verglichen.

<u>Vergleich der beiden $P2Y_{11}$-Rezeptor-Varianten</u>

Die beiden Varianten des $P2Y_{11}$-Rezeptors unterscheiden sich in der Anfangssequenz am Amino-terminalen-Ende des Rezeptors. Die ersten drei Aminosäuren des zuerst veröffentlichten Rezeptors („MDR-“) stellen das Ergebnis des intergenetischen Spleißens dar und gehören zum Ssf1-Gen. Die Sequenz „MAANVS-“ repräsentiert den korrekten Beginn des $P2Y_{11}$-Rezeptors. Die MAANVS-Variante scheint die physiologisch relevante zu sein (Communi *et al.*, 2001).

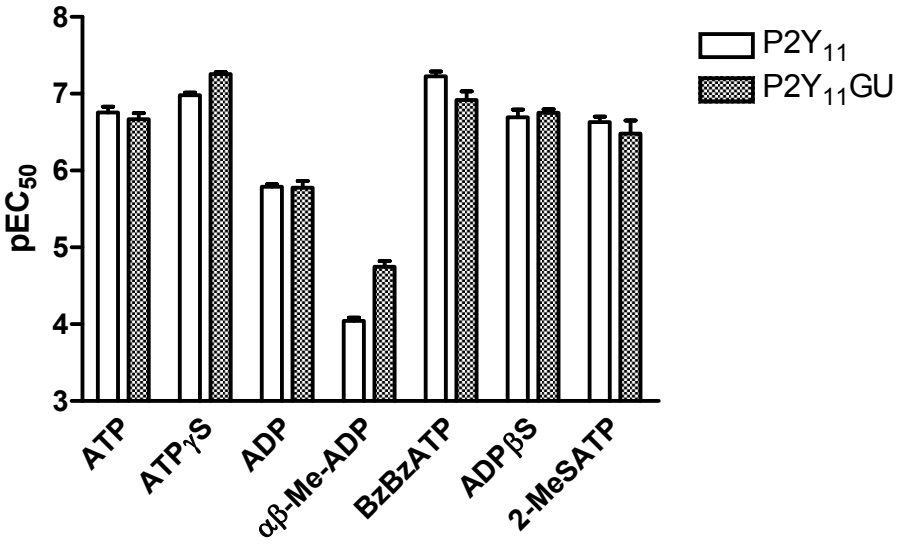


Abb. 4.7 pEC_{50}-Werte von Adenin-Nukleotiden, bestimmt im Ca^{2+}-Assay an 1321N1-$P2Y_{11}$ (MDR-) und 1321N1-$P2Y_{11}$GU (MAANVS-). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, n ≥ 3.

In den meisten Publikationen wurde die MDR-Spleiß-Variante benutzt (White *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2001; Qi *et al.*, 2001b; Qi *et al.*, 2001a; Communi *et al.*, 1999; Communi *et al.*, 1997). Um sicherzugehen, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit den veröffentlichten verglichen werden können, wurden die Potenzen verschiedener ATP-Analoge im Calcium-Assay an beiden Rezeptor-Varianten bestimmt. Außer bei α,β-Me-ADP konnten bei den beiden Rezeptor-Varianten keine signifikanten Abweichungen in den Potenzen der getesteten ATP-Analogen bestimmt werden (Abb. 4.7). Die Reihenfolge der Potenzen ist bei beiden Rezeptor-Varianten gleich (ATPγS ≈ BzBzATP > ATP ≈ ADPβS ≥ 2-MeSATP > ADP > α,β-Me-ADP) und stimmt mit den veröffentlichten Ergebnissen überein (Communi *et al.*, 1999). Dies bedeutet, dass die Ergebnisse, die an den zwei verschiedenen Zelllinien bestimmt wurden, im Wesentlichen wechselseitig übertragbar sind. Für die ersten Untersuchungen wurde die MDR-Variante (1321N1-$P2Y_{11}$) verwendet, für spätere Untersuchungen dagegen die MAANVS-Variante (1321N1-$P2Y_{11}$GU). Die jeweils verwendeten Variante wird bei der Präsentation der Ergebnisse im Folgenden explizit angegeben.

Einfluss der Zellzahl auf die Potenz des Standardagonisten ATPγS im Calcium-Assay

Für einen Calcium-Assay gemäß Kapitel 3.7.3 mit Zellen in Suspension wurde im Allgemeinen eine zu ca. 90 bis 95 % konfluente T175-Zellkulturschale verwendet. Die Zellzahl wurde dabei nach jedem Abernten bestimmt und für jeden Assay dokumentiert. Die eingesetzten Zellkonzentrationen lagen in einem Bereich von 100.000 bis 300.000 Zellen/Kavität. Um zu überprüfen, ob es bei verschiedenen Zellkonzentrationen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommt, wurde jeweils für den Standardagonisten ATPγS mit Hilfe des Calcium-Assays bei gleicher Signalverstärkung im NOVOstar® Konzentrations-Effekt-Kurven für drei verschiedene Zellkonzentrationen aufgenommen. Die Zellen wurden mit Oregon Green® inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt, verschiedene Zellmengen in die einzelnen Kavitäten pipettiert und das Volumen auf ein Endvolumen von 180 µl aufgefüllt (siehe Kapitel 3.7.3). Pro Kavität wurden 100.000, 200.000 bzw. 300.000 Zellen ausplattiert. In Abb. 4.8 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS bei den entsprechenden Zellzahlen wiedergegeben.

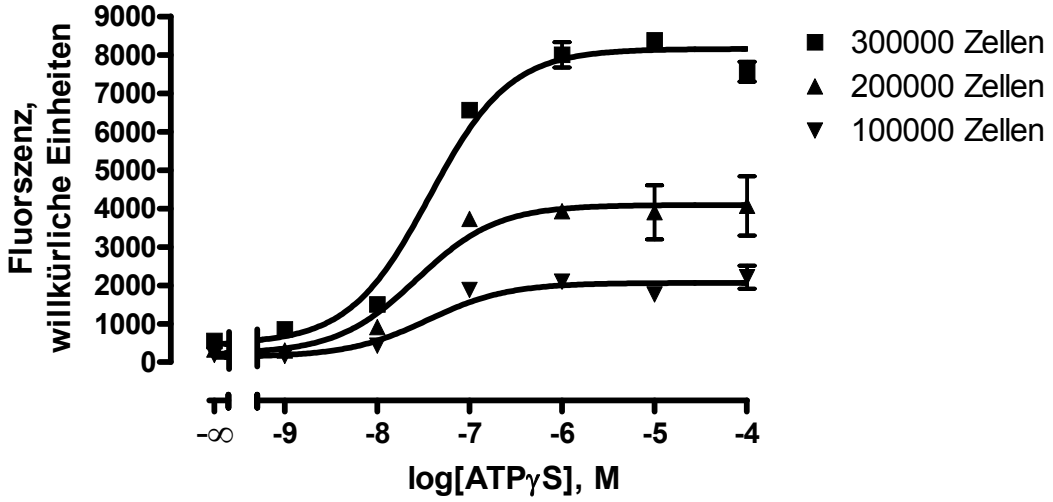


Abb. 4.8 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Der Effekt von ATPγS auf die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde bei verschiedenen Zellkonzentrationen mit gleicher Verstärkung im NOVOstar® vermessen.

Wie in Abb. 4.8 dargestellt, ist die Höhe des Calcium-Signals unterschiedlich. Das durch die Calcium-Ausschüttung hervorgerufene Fluoreszenz-Signal ist umso niedriger, je kleiner die Zellzahl war. Bei 200.000 Zellen entspricht das Signal ca.

50 %, bei 100.000 Zellen ca. 25 % des von 300.000 Zellen hervorgerufenen Signals. Zu jeder Konzentrations-Effekt-Kurve von ATPγS wurde nun die pEC_{50} berechnet. Bei einer Zellzahl von 300.000 Zellen je Kavität beträgt sie 7,43 ± 0,07, bei 200.000 Zellen je Kavität 7,57 ± 0,19 und bei 100.000 Zellen je Kavität 7,45 ± 0,20. Die pEC_{50}-Werte und damit die Potenzen des Agonisten sind nicht signifikant verschieden. Daher können verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Zellkonzentrationen untereinander verglichen werden.

Testung von Suramin im Calcium-Assay

Zu Beginn dieser Arbeit war Suramin der beste in der Literatur beschriebene Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor. Deshalb wurde zur Überprüfung des Testsystems eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve von Suramin am $P2Y_{11}$-Rezeptor aufgenommen. Dazu wurde Suramin 30 min auf den mit Oregon Green® inkubierten Zellen bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten mit Hilfe des NOVOstar® mit 1 µM ATPγS (10-fache EC_{50}) versetzt und die Fluoreszenz aufgenommen. Die durch unterschiedliche Konzentrationen von Suramin hervorgerufene Inhibition des ATPγS-Signals ist in Abb. 4.9 dargestellt.

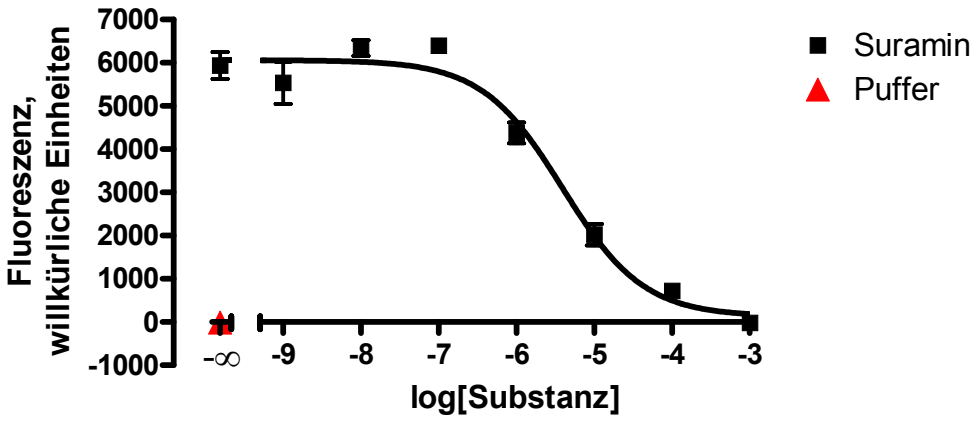


Abb. 4.9 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch Suramin als Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus sechs Experimenten.

Es konnte ein apparenter pK_i-Wert von 6,52 ± 0,13 (n = 6; K_i: 302 nM) für Suramin ermittelt werden. Abb. 4.9 zeigt, dass mit Hilfe des Antagonisten Suramin eine Hemmung des ATPγS-Signals auf Puffer-Niveau erreicht wird. Die Hemmung durch den Antagonisten auf Pufferniveau wurde jeweils vor einer Prozentualisierung der Messdaten überprüft. Wenn dies nachgewiesen werden konnte, wurde die Normalisierung der Daten wie in Kapitel 3.7.5.1 beschrieben durchgeführt.

cAMP-Messung mit Hilfe des cAMP-Reportergen-Assays am $P2Y_{11}$-Rezeptor

In Kapitel 1.2.3 wurde bereits beschrieben, dass für die Ssf1-Spleiß-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors neben der G_q-Kopplung auch eine G_s-Kopplung und damit die Aktivierung der Adenylatzyklase (Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle) nachgewiesen wurde (Communi *et al.*, 1997).

Für die cAMP-Messung in der vorliegenden Arbeit wurde der cAMP-Reportergen-Assay eingesetzt (siehe Kapitel 3.8). Entsprechende Messungen wurden ausschließlich an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen durchgeführt.

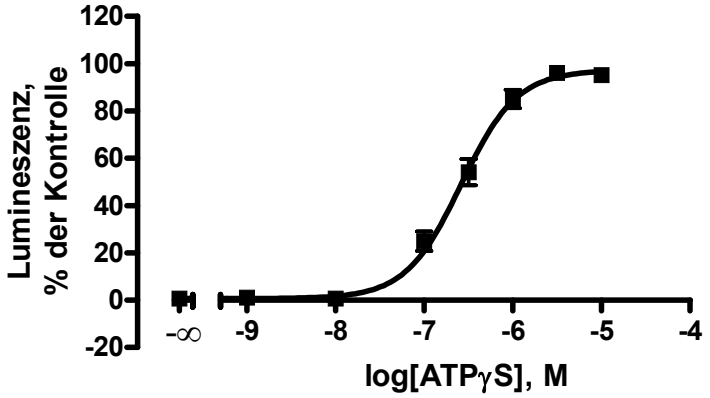


Abb. 4.10 Konzentrations-Effekt-Kurve von ATPγS (n = 12) im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Bei der Zelllinie 1321N1-$P2Y_{11}$GU konnte ein cAMP-Signal nach Stimulation mit dem Agonisten ATPγS detektiert werden. Es wurde eine pEC_{50} von 6,59 ± 0,04 (n = 12; EC_{50}: 261 nM) bestimmt (Abb. 4.10). Der pEC_{50}-Wert von ATPγS, der im Calcium-Assay bestimmt wurde, liegt bei 7,25 ± 0,03 (n = 46; EC_{50}: 55 nM; vgl. Abb. 4.44) und

liegt somit höher als die im cAMP-Assay ermittelten Werte. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Qi et al. überein. Auch hier wurden über die G_q-Kopplung höhere pEC_{50}-Werte als über die G_s-Kopplung bestimmt (Qi *et al.*, 2001b; Qi *et al.*, 2001a).

4.1.3.6 P2Y$_{12}$-Rezeptor

Wie beim $P2Y_4$-Rezeptor wurde auch die $P2Y_{12}$-Rezeptor-exprimierende Zelllinie 1321N1-$P2Y_{12}$ von Prof. Gachet aus Straßburg zur Verfügung gestellt (Gao *et al.*, 2008). Da der $P2Y_{12}$-Rezeptor G_i-gekoppelt ist, wurden die Zellen im cAMP-Reportergen-Assay auf ihre Funktionalität untersucht (siehe Kapitel 3.8). In dieser Arbeit wurde ein pEC_{50}-Wert für 2-MeSADP von 8,96 ± 0,14 (n = 3; EC_{50}: 1,1 nM) bestimmt (Abb. 4.11).

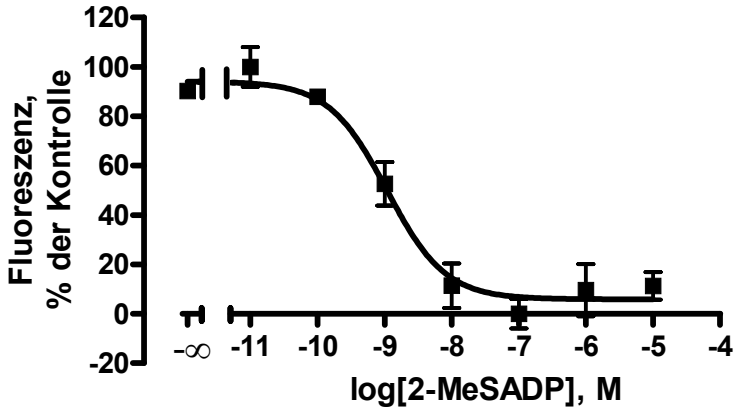


Abb. 4.11 Konzentrations-Effekt-Kurve von 2-MeSADP nach Behandlung mit 10 µM Forskolin im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{12}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit 2-MeSADP maximal erreichten Antwort. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus drei Experimenten.

4.1.4 Calcium-Messungen an nativen HEK293-Zellen

Calcium-Messungen an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren wurden bei der Untersuchung von Suramin-Derivaten mit Variation der Methyl-Gruppen an HEK293-Zellen von Herrn Heiko Ullmann im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt. Die Messungen an HEK293- Zellen wurden zu Beginn der Untersuchungen zur Bestimmung der Selektivität der Testsubstanzen benutzt, solange noch keine Zellen vorhanden waren, die den $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptor rekombinant exprimierten.

HEK293-Zellen besitzen den $P2Y_1$- und den $P2Y_2$-Rezeptor nativ (Fischer *et al.*, 2005). Durch Stimulation mit selektiven Agonisten ($P2Y_1$: 2-MeSADP; $P2Y_2$: UTP) kann in diesen Zellen ein rezeptorspezifisches Ca^{2+}-Signal erzeugt werden. Abb. 4.12 zeigt Konzentrations-Effekt-Kurven von 2-MeSADP und Inhibitionskurven von PPADS (Pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure) an HEK293-Zellen im Calcium-Assay. Für den $P2Y_1$-Rezeptor wird für 2-MeSADP in der Literatur ein pEC_{50}-Wert von 8,18 ± 0,16 (Chhatriwala *et al.*, 2004) und für PPADS ein pA_2-Wert von 6,0 (Lambrecht, 2000) angegeben. Durch H. Ullmann wurde an HEK293-Zellen für 2-MeSADP ein pEC_{50}-Wert von 8,44 ± 0,09 (n = 3; EC_{50}: 3,6 nM) und für PPADS ein pK_i-Wert von 6,1 ± 0,10 (n = 3; K_i: 1,3 µM) bestimmt (Abb. 4.12).

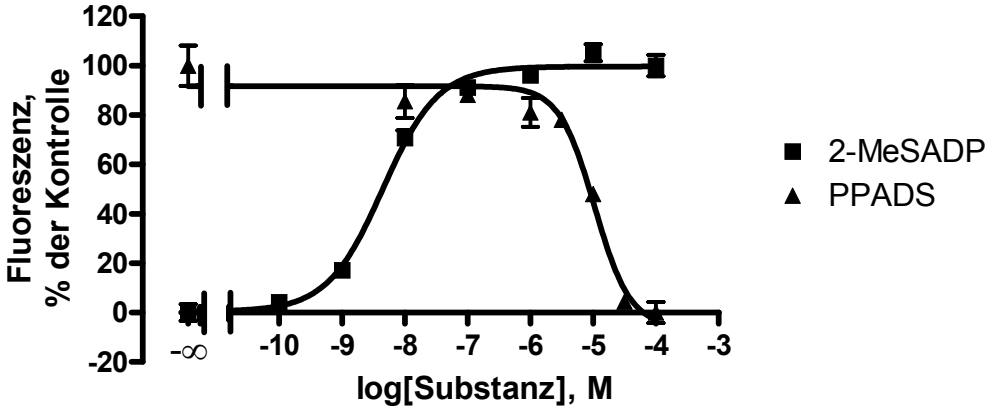


Abb. 4.12 Konzentrations-Effekt-Kurve von 2-MeSADP und -Inhibitionskurve von PPADS am $P2Y_1$-Rezeptor, exprimiert in nativen HEK293-Zellen (Daten von Ullmann et al. (2005)). „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit 2-MeSADP maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

In Abb. 4.13 sind Konzentrations-Effekt-Kurven von UTP und Inhibitionskurven von Suramin an HEK293-Zellen im Calcium-Assay dargestellt. Für UTP wird in der Literatur ein pEC_{50}-Wert von 6,85 angegeben (Jacobson *et al.*, 2000), der deutlich über dem von H. Ullmann an HEK293-Zellen bestimmten pEC_{50}-Wert von 6,19 ± 0.06 (n = 3; EC_{50}: 646 nM) liegt. Da UTP jedoch mehr als fünfhundertfach selektiver für $P2Y_2$ gegenüber $P2Y_1$ ist, konnte dieses System trotzdem verwendet werden (Jacobson *et al.*, 2002). Für Suramin als Antagonist am $P2Y_2$-Rezeptor wird in der Literatur ein pA_2-Wert von 4,32 ± 0,13 angegeben (Charlton *et al.*, 1996), während von H. Ullmann an HEK293-Zellen ein pK_i-Wert von 5,30 ± 0,15 (n = 3; K_i: 5,01 µM) ermittelt werden konnte.

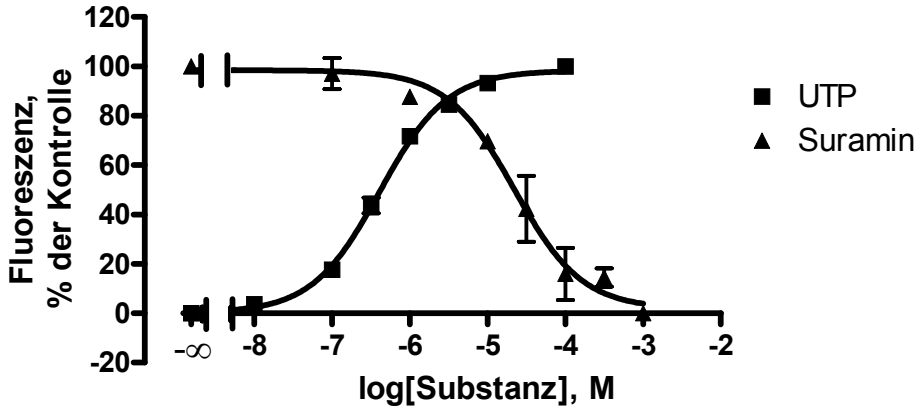


Abb. 4.13 Konzentrations-Effekt-Kurve von UTP und -Inhibitionskurve von Suramin am $P2Y_2$-Rezeptor, exprimiert in nativen HEK293-Zellen (Daten von Ullmann et al. (2005)). „% der Kontrolle“ ist der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit UTP maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Mit Hilfe der PCR wurde gezeigt, dass beide Rezeptoren ($P2Y_1$ und $P2Y_2$) in HEK293-Zellen exprimiert werden (Abb. 4.14; siehe auch Kapitel 3.5). Die Größe der PCR-Produkte wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung kontrolliert (vgl. Tab. 3.9).

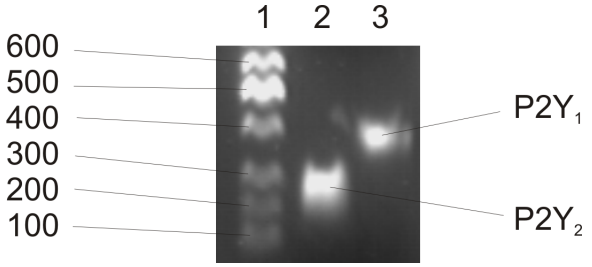


Abb. 4.14 Agarose-Gelelektrophorese der durch PCR vermehrten Rezeptor-Fragmente von $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren in nativen HEK293-Zellen. Linie 1: 100bp DNA-Leiter; Linie 2: $P2Y_2$ (Größe des PCR-Produkts: 247bp); Linie 3: $P2Y_1$ (Größe des PCR-Produkts: 389bp). Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe von SYBR-Green.

4.2 Suraminderivate mit Variation der Methyl-Gruppe sowie des Naphthylsulfonsäurerestes als $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten

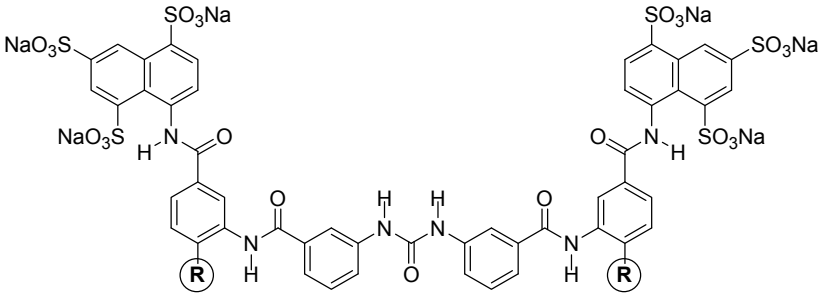
4.2.1 Testung der Substanzen im Calcium-Assay

Ziel dieser Untersuchung war es, Auswirkungen von Variationen an der Methyl-Gruppe bzw. am Naphthylsulfonsäurerest des Suramins zu untersuchen.

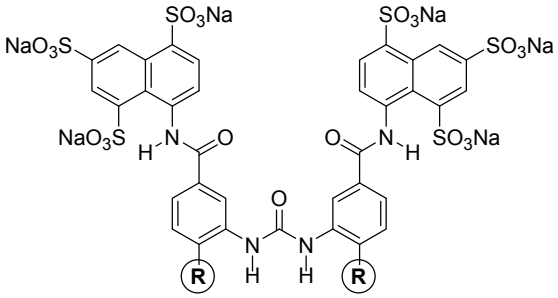
Die Testungen von Variationen an der Methyl-Gruppe wurden an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen durchgeführt, die die Ssf1/$P2Y_{11}$-Spleiß-Variante exprimierten („1321N1-$P2Y_{11}$“). Da zu Beginn dieser Studie $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren noch nicht rekombinant vorlagen, wurden für die Prüfung auf Selektivität an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren HEK293-Zellen verwendet. Die Daten an HEK293-Zellen wurden von H. Ullmann im Rahmen seiner Dissertation erhoben. Dagegen wurden Testungen von Variationen des Naphthylsulfonsäurerestes an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen durchgeführt, die die korrekte Rezeptor-Variante exprimierten („1321N1-$P2Y_{11}$GU“). Für die Selektivitätstestung an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren wurden die in Kapitel 4.1.3.1 und 4.1.3.2 beschriebenen Zellen verwendet.

Die Strukturformeln der Suramin-Derivate mit Variation der Methyl-Gruppe sind in Abb. 4.15 wiedergegeben. Zunächst wurden alle Substanzen in einer Konzentration von 100 µM auf Antagonismus getestet. In Tab. 4.1 und Tab. 4.2 sind die inhibitorischen Potenzen der getesteten Substanzen als „% Hemmung“ dargestellt.

Die Strukturformeln der Suramin-Derivate mit Variation des Naphthylsulfonsäurerestes sind in Abb. 4.16 wiedergegeben. Zunächst wurden hier alle Substanzen in einer Konzentration von 10 µM auf Antagonismus getestet. In Tab. 4.3 ist die inhibitorische Potenz der getesteten Substanzen als „% Hemmung“ dargestellt.



„großer Harnstoff“



„kleiner Harnstoff“

Rest **R**	-H	-C_2H_5	-$CH(CH_3)_2$	-F		-CH_2OCH_3	-Cl	-OCH_3	-CH_3
großer Harnstoff	NF037	NF127	NF151	NF157	NF198	NF222	NF258	NF260	Suramin
großer Harnstoff	NF023	NF124	NF150	NF156	NF195	NF221	NF255	NF259	NF058

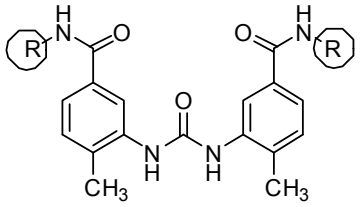
Abb. 4.15 Strukturformeln von Suramin-Derivaten mit Variation der Methyl-Gruppen. Dargestellt ist die Grundstruktur von Suramin, sowie die um jeweils eine Benzamid-Gruppe verkürzte Grundstruktur für die „kleinen Harnstoffe“.

Tab. 4.1 Inhibitorische Potenz der Suramin-Analogen bei 100 µM im Calcium-Assay, gemessen an nativen $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren in HEK293-Zellen und am $P2Y_{11}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als „% Hemmung“ ± SD dargestellt.

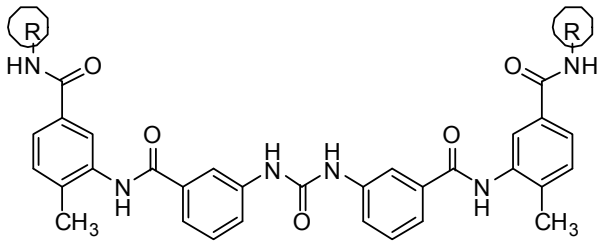
Substanz	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_{11}$
NF037	59,3 ± 15,6	31,6 ± 25,3	89,5 ± 2,0
NF127	48,7 ± 18,9	48,8 ± 13,9	84,9 ± 5,3
NF151	45,0 ± 17,0	31,1 ± 31,6	83,1 ± 1,9
NF157	63,3 ± 26,9	42,8 ± 17,9	96,6 ± 5,1
NF198	75,1 ± 8,8	73,2 ± 16,7	79,9 ± 1,9
NF222	47,5 ± 12,9	44,3 ± 11,3	71,6 ± 5,2
NF258	40,6 ± 41,9	55,2 ± 16,5	93,0 ± 2,0
NF260	23,2 ± 50,9	44,9 ± 16,3	92,2 ± 2,0
Suramin	54,5 ± 17,9	50,5 ± 24,1	93,7 ± 1,4

Tab. 4.2 Inhibitorische Potenz der „kleinen Harnstoffe“ bei 100 µM im Calcium-Assay, gemessen an nativen $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren in HEK293-Zellen und am $P2Y_{11}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als „% Hemmung“ ± SD dargestellt.

Substanz	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_{11}$
NF023	19,7 ± 18,1	24,0 ± 6,7	54,2 ± 1,8
NF124	38,4 ± 16,7	20,8 ± 0,4	39,9 ± 3,1
NF150	28,7 ± 1,8	14,2 ± 1,8	23,2 ± 9,3
NF156	60,0 ± 9,9	0,0 ± 13,0	64,7 ± 3,1
NF195	34,2 ± 4,3	0,0 ± 13,7	35,9 ± 1,5
NF221	31,7 ± 10,5	13,0 ± 4,4	23,8 ± 3,1
NF255	57,8 ± 6,9	0,0 ± 18,2	59,0 ± 3,1
NF259	40,0 ± 8,6	53,6 ± 4,7	11,2 ± 3,3
NF058	0,0 ± 7,2	28,4 ± 4,4	86,6 ± 2,9



„kleiner Harnstoff“



„großer Harnstoff“

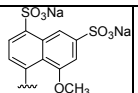
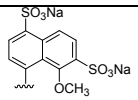
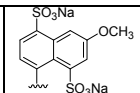
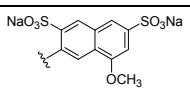
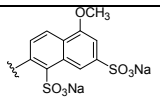
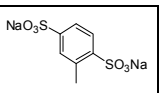
Rest R						
großer Harnstoff	NF739	NF755	NF762	NF769	NF776	-
großer Harnstoff	NF742	NF756	NF763	NF770	NF778	NF063

Abb. 4.16 Strukturformel von Suramin und des „kleinen Harnstoffs“ NF058 mit Variation des Naphthylsulfonsäurerestes.

Tab. 4.3 Inhibitorische Potenz der Suramin-Derivate mit Variation des Naphthylsulfonsäurerestes bei 10 µM im Calcium-Assay, gemessen an $P2Y_1$- und $P2Y_2$- und $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als „% Hemmung“ ± SD dargestellt.

Substanz	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_{11}$
NF739	3,2 ± 0,6	3,7 ± 0,6	18,4 ± 6,3
NF742	3,1 ± 7,6	0,0 ± 7,6	0,0 ± 5,2
NF755	0,7 ± 7,1	0,0 ± 7,1	8,2 ± 8,0
NF756	0,0 ± 3,1	0,3 ± 3,1	10,9 ± 15,0
NF762	8,7 ± 5,0	2,8 ± 5,0	30,2 ± 27,4
NF763	4,5 ± 5,0	0,0 ± 5,0	81,8 ± 4,8
NF769	0,0 ± 8,9	17,6 ± 4,5	3,9 ± 5,1
NF770	11,1 ± 7,3	27,3 ± 7,3	16,1 ± 9,9
NF776	0,0 ± 2,2	0,0 ± 2,2	16,0 ± 14,6
NF778	4,1 ± 3,5	0,0 ± 3,5	23,3 ± 11,2
NF063	23,7 ± 5,6	17,5 ± 6,8	70,2 ± 11,0

Tab. 4.1, Tab. 4.2 und Tab. 4.3 zeigen, dass alle getesteten Substanzen an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren nur eine geringe Hemmung (< 35 %) hervorrufen. Nur bei NF037, NF156, NF157, NF198, NF255 und Suramin konnte bei 100 µM eine Hemmung von mehr als 50 % (54 bis 75 %) am $P2Y_1$-Rezeptor gemessen werden. Bei einer Konzentration von 10 µM ist an diesem Rezeptor jedoch keine Hemmung erkennbar (Inhibition < 35 %; Daten nicht gezeigt). Auch beim $P2Y_2$-Rezeptor zeigen einige Substanzen bei 100 µM eine Hemmung zwischen 50 % und 73 % (NF198, NF258, NF259 und Suramin). Bei einer Konzentration von 10 µM rufen diese Substanzen auch hier keine Inhibition hervor (Inhibition < 20 %, Daten nicht gezeigt). Alle Substanzen zeigen demnach bei $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren IC_{50}-Werte von > 10 µM. Die am $P2Y_{11}$-Rezeptor inhibierende Substanz weist NF157 am $P2Y_1$-Rezeptor eine IC_{50} von 1811 ± 312 µM auf, was einem apparenten funktionellen pK_i-Wert von 3,73 entspricht. Am $P2Y_2$-Rezeptor wurde für NF157 eine IC_{50} von 170 ± 17 µM bestimmt, was einem apparenten funktionellen pK_i-Wert von 4,54 entspricht (Ullmann *et al.*, 2005). Weitere Ergebnisse von Selektivitätstestungen von NF157 an P2X-Rezeptoren und im Apyrase-Assay sind in Kapitel 4.2.2 bzw. Kapitel 4.7 dargestellt.

Am $P2Y_{11}$-Rezeptor blockieren alle Suramin-Derivate mit Variation der Methyl-Gruppe bis auf NF124, NF150, NF195, NF221 und NF259 in einer Konzentration von 100 µM das durch ATPγS hervorgerufene Agonist-Signal um mehr als 50 %. 100 µM der Substanzen Suramin, NF157, NF258 und NF260 konnten das Agonist-Signal sogar um mehr als 90 % inhibieren.

Bei den Suramin-Derivaten mit Variation des Naphthylsulfonsäurerestes zeigten einzig NF763 und NF063 an $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren eine Inhibition von > 35 %. Bei allen anderen Substanzen liegt die Hemmung bei unter 35 %. Dies bedeutet, dass die IC_{50}-Werte der Substanzen bei > 10 µM liegen.

Für alle Substanzen, die eine Hemmung von mehr als 70 % hervorriefen, wurden vollständige Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen. In Abb. 4.17 sind die Konzentrations-Inhibitions-Kurven von NF763 und NF063 am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor dargestellt. Es konnten apparente funktionelle pK_i-Werte von 6,57 ± 0,16 (n = 3; K_i: 269 nM) für NF763 und 6,40 ± 0,15 (n = 5; K_i: 398 nM) für NF063 am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor bestimmt werden.

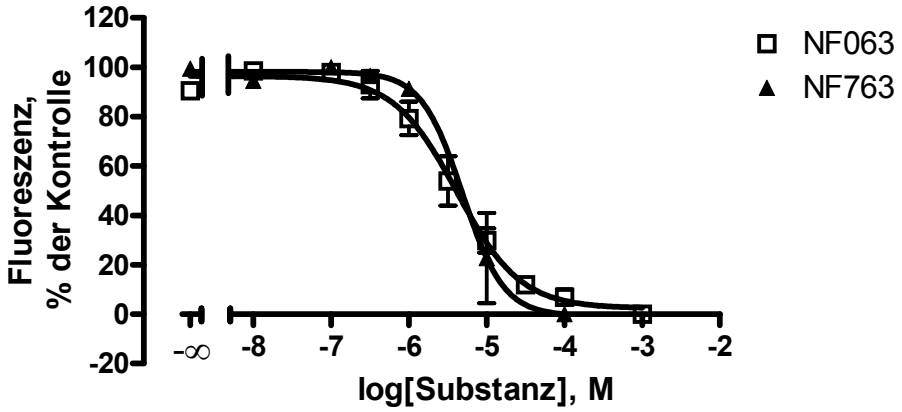


Abb. 4.17 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF763 (n = 3) und NF063 (n = 5) am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort dar. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

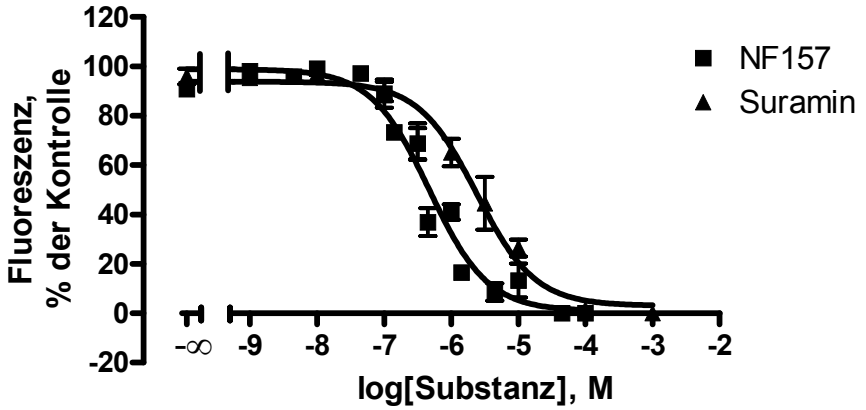
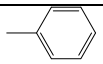


Abb. 4.18 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch Suramin (n = 6) im Vergleich zu NF157 (n = 7) am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

In Abb. 4.18 ist eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve von NF157 im Vergleich zum bisherigen Standardantagonisten Suramin wiedergegeben. Für Suramin wurde am $P2Y_{11}$-Rezeptor eine IC_{50} von 2470 ± 465 nM bestimmt, was einem apparenten funktionellen pK_i-Wert von 6,52 ± 0,13 (n = 6; K_i: 302 nM) entspricht. Bei NF157 konnte eine IC_{50} von 463 ± 59 nM ermittelt werden, was einem apparenten pK_i-Wert von 7,35 ± 0,06 (n = 7; K_i: 44,3 nM) entspricht. Damit ist NF157 am $P2Y_{11}$-Rezeptor etwa siebenfach potenter als Suramin.

In Tab. 4.4 sind funktionelle apparente pK_i-Werte der Suramin-Analogen aufgelistet. Neben den „großen Harnstoffen" wurde auch für den „kleinen Harnstoff" NF058 (86,6 ± 2,9 % Hemmung bei 100 µM) ein apparenter pK_i-Wert bestimmt (pK_i = 5,12 ± 0,13).

Tab. 4.4 Apparente funktionelle pK_i-Werte ± SD der Suramin/NF157-Analoge bestimmt am $P2Y_{11}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay.

	—H	$-C_2H_5$	$-CH(CH_3)_2$	—F		$-CH_2OCH_3$	—Cl	$-OCH_3$	$-CH_3$
Substanz	NF037	NF127	NF151	NF157	NF198	NF222	NF258	NF260	Suramin
pK_i	6,95	6,00	6,35	7,35	6,52	5,62	6,97	7,12	6,52
± SD	0,14	0,12	0,16	0,06	0,17	0,08	0,06	0,04	0,13

Außer NF058 weisen nur NF127 (R = Ethyl) und NF222 (R = Methoxymethyl) pK_i-Werte < 6 auf. Alle anderen getesteten Harnstoffe zeigen eine Potenz im submikromolaren Bereich. Bei fünf der getesteten Substanzen (NF037, NF198, NF260, NF258 und NF157) wurden gleiche oder bessere inhibitorische Eigenschaften als beim Suramin gefunden. NF157 ist mit einem pK_i-Wert von 7,35 der potenteste Antagonist unter den getesteten Substanzen.

Auch die Amin- und Nitro-Vorstufen der Suramin-Analoga („halbe Harnstoffe“) wurden an allen drei Rezeptoren getestet. Sie zeigten bis zu einer Konzentration von 100 µM keine Inhibition (< 40 % Hemmung; Daten sind nicht gezeigt). Alle Substanzen wurden zudem auf ihre agonistische Wirkung am $P2Y_{11}$-Rezeptor untersucht. Sie verursachten keine Calcium-Ausschüttung nach Injektion. Damit kann ein Agonismus für diese Substanzen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Selektivität von NF157 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber P2X-Rezeptoren

Neben den Selektivitätstestungen von NF157 an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren (Kapitel 4.2.1) und der Apyrase (Kapitel 4.7), wurde NF157 auch an verschiedenen P2X-Rezeptoren aus dem Menschen (h) bzw. aus der Ratte (r) getestet, die rekombinant in *Xenopus-laevis*-Oozyten exprimiert wurden. Diese Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralf Hausmann und Prof. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen durchgeführt. Es wurden Daten an $rP2X_1$, $rP2X_2$, $rP2X_3$, $rP2X_4$, $rP2X_7$, $hP2X_1$, $hP2X_3$ und $hP2X_4$ erhoben. Die durch die Agoniststimulation von P2X-Rezeptoren verursachten Ströme wurden mit Hilfe einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme elektrophysiologisch vermessen. Diese Methode ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Rettinger *et al.*, 2005; Rettinger *et al.*, 2000). In Tab. 4.5 sind die pIC_{50}-Werte von NF157 an den verschiedenen P2X-Rezeptoren dargestellt (Ullmann *et al.*, 2005). Die K_i-Werte an den P2X-Rezeptoren stimmen etwa mit der jeweiligen IC_{50} überein (siehe Ullmann et al., 2005).

Tab. 4.5 Inhibitorische Potenz von NF157 an P2X-Rezeptoren rekombinant exprimiert in *Xenopus-laevis*-Oozyten (Ullmann *et al.*, 2005).

P2X-Rezeptor	pIC_{50} ± SD
$rP2X_1$	7,09 ± 0,09
$rP2X_2$	6,86 ± 0,06
$rP2X_3$	6,11 ± 0,12
$hP2X_1$	7,20 ± 0,08
$hP2X_3$	6,45 ± 0,05
$rP2X_4$, $hP2X_4$	< 6
$rP2X_7$	< 5,5

4.2.3 Charakterisierung von NF157

4.2.3.1 Schild-Analyse von NF157

Der Hillslope der in Abb. 4.18 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurve von NF157 ist nicht signifikant verschieden von 1. Dies deutet auf ein kompetitives Verhalten von NF157 gegenüber ATPγS am $P2Y_{11}$-Rezeptor hin. Um dies zu bestätigen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven des Agonisten ATPγS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 aufgenommen.

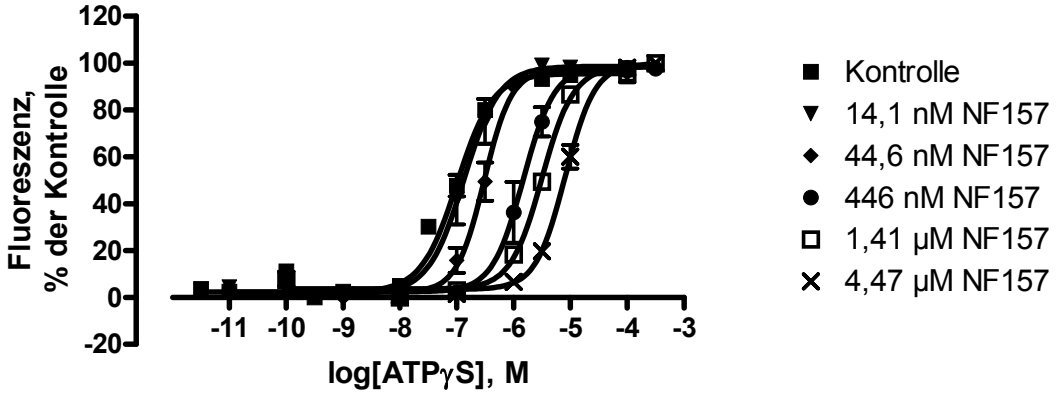


Abb. 4.19 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen im Calcium-Assay. ATPγS wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 getestet. Die Kurven setzen sich aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten je verwendeter Konzentration von NF157 zusammen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch

Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

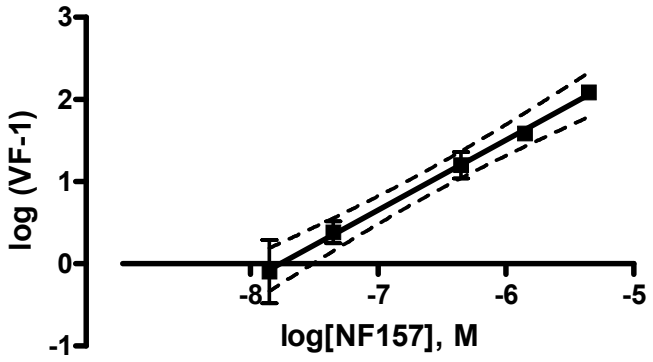


Abb. 4.20 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF157 an der Zelllinie 1321N1-$P2Y_{11}$ (Schild-Analyse). Für die Analyse wurde die durch NF157 vermittelte Inhibition der ATPγS-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Der pA_2-Wert wurde mit 7,77 ± 0,18 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.6 Einfluss von NF157 auf die pEC_{50} von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF157 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 14,1 nM NF157	+ 44,6 nM NF157	+ 446 nM NF157	+ 1,41 µM NF157	+ 4,47 µM NF157
pEC_{50}	6,99 ± 0,03	6,88 ± 0,06	6,52 ± 0,04	5,83 ± 0,05	5,50 ± 0,03	5,09 ± 0,03
n	4	2	4	4	3	3

Abb. 4.19 zeigt die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven und Tab. 4.6 die entsprechenden pEC_{50}-Werte von ATPγS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157. Die entsprechende Analyse nach Schild ist in Abb. 4.20 wiedergegeben. Die Schild-Analyse ergibt eine gerade Linie, deren Steigung nicht signifikant verschieden von 1 ist (Steigung: 0,851 ± 0,076; 95%iges Konfidenzintervall: 0,680 bis 1,023). Damit ist ein weiterer Hinweis auf einen kompetitiven Mechanismus gegeben. Der pA_2-Wert wurde mit 7,77 ± 0,18 bestimmt und liegt im gleichen Bereich wie der apparente pK_i-Wert von NF157 (vgl. Tab. 4.4).

4.2.3.2 Testung von NF157 im cAMP-Reportergen-Assay

Neben den Testungen im Calcium-Assay wurde die Potenz von NF157 auch im cAMP-Reportergen-Assay bestimmt. Dabei wurde ein IC_{50}-Wert von 759 ± 70 nM bestimmt, was einem apparenten pK_i-Wert von 6,80 ± 0,04 entspricht (Abb. 4.21).

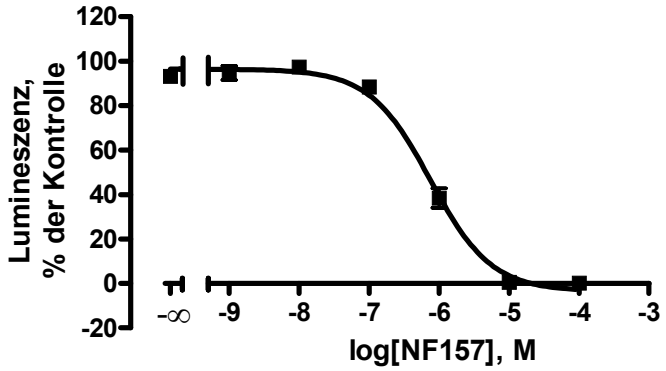


Abb. 4.21 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen cAMP-Antwort durch NF157 (n = 5) als Antagonist am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Da der Hillslope wiederum nicht signifikant verschieden von 1 ist, kann auch durch diesen Assay auf ein kompetitives Verhalten von NF157 am $P2Y_{11}$-Rezeptor geschlossen werden. Zudem liegen der apparente pK_i-Wert in beiden Assay-Systemen sowie der im Schild-Plot bestimmte pA_2-Wert in der gleichen Größenordnung.

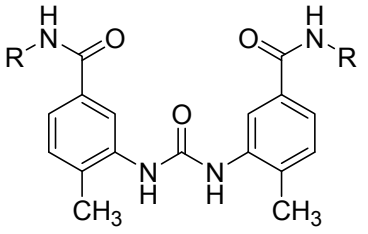
4.3 Identifizierung des nanomolaren $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten NF340

In der Serie der Suraminanalogen sind auch Derivate von NF058, dem einzigen „kleinen Harnstoff“-Analogon von Suramin, welches eine nennenswerte Aktivität besaß (siehe Kapitel 4.2.1). Bei den „kleinen Harnstoffen“ variieren in die Anordnung und die Anzahl der Sulfonsäuren am Naphthylring und die Position der Aminofunktion des Naphthylrestes (Abb. 4.22). Eine weitere Variation stellt die Verknüpfung über eine Isophthalsäurebisamid- bzw. Terephthalsäurebisamid-Gruppe statt über den zentralen Harnstoff dar (Abb. 4.24). Zudem wurden auch Substanzen

getestet, die im Vergleich zur Muttersubstanz entweder auf jeder Seite des symmetrischen Moleküls um eine Benzamid-Gruppe verkleinert sind oder die eine para-Verknüpfung anstelle einer meta-Verknüpfung sowie keine Methyl-Substituierung aufweisen. Auch von diesen Substanzen wurden die Isophthalsäurebisamid- bzw. Terephthalsäurebisamid-Derivate getestet (siehe Abb. 4.26)

4.3.1 Analoge des NF058

Zunächst wurden die NF058-analogen Substanzen mit Variation des Naphthylsulfonsäurerestes in einem Grobscreening auf ihre Wirksamkeit an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen getestet, die die Ssf1/$P2Y_{11}$-Spleiß-Variante exprimierten (siehe Abb. 4.22). Dazu wurden sie mit 10 µM bzw. 100 µM im Calcium-Assay vorinkubiert und die durch sie hervorgerufene Hemmung des Calcium-Anstiegs nach Injektion von 1 µM ATPγS bestimmt (siehe Tab. 4.7, Ergebnisse angegeben als „% Hemmung“).



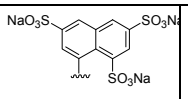
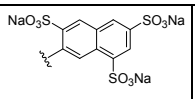
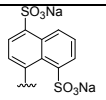
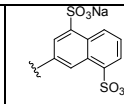
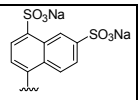
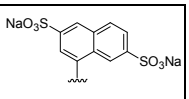
Rest R						
Substanz	NF248	NF252	NF290	NF294	NF298	NF340

Abb. 4.22 Strukturformeln der Substanzen mit dem Grundgerüst von NF058 mit Variation der Naphthyl-sulfonsäure.

Tab. 4.7 Inhibitorische Potenz der NF058-Analogen bei 10 µM bzw. 100 µM im Calcium-Assay, gemessen am $P2Y_{11}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als „% Hemmung“ ± SD dargestellt.

Substanz	% Hemmung ± SD
NF058 - 100 µM	86,6 ± 2,9
NF248 - 10 µM	72,7 ± 13,9
NF252 - 10 µM	83,0 ± 12,4

NF290 - 10 µM	28,3 ± 5,2
NF294 - 10 µM	91,8 ± 10,9
NF298 - 10 µM	9,1 ± 2,8
NF340 - 10 µM	89,9 ± 7,9

Zwei Substanzen dieser Testreihe hemmen das durch 1 µM ATPγS hervorgerufene Signal bei 10 µM um weniger als 35 % (NF290, NF298). Dies bedeutet, dass diese Substanzen eine IC_{50} von > 10 µM aufweisen. Nur für die Substanzen, bei denen eine Hemmung von mehr als 35 % bestimmt wurde, wurde eine vollständige Konzentrations-Inhibitions-Kurve aufgenommen (siehe Abb. 4.23).
Eine agonistische Aktivität konnte für keine der Substanzen detektiert werden. Außerdem wurden die Substanzen an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren bei einer Konzentration von 10 µM getestet. An beiden Rezeptoren wurde dabei keine Inhibition der durch 2-MeSADP bzw. UTP hervorgerufenen Signale beobachtet.

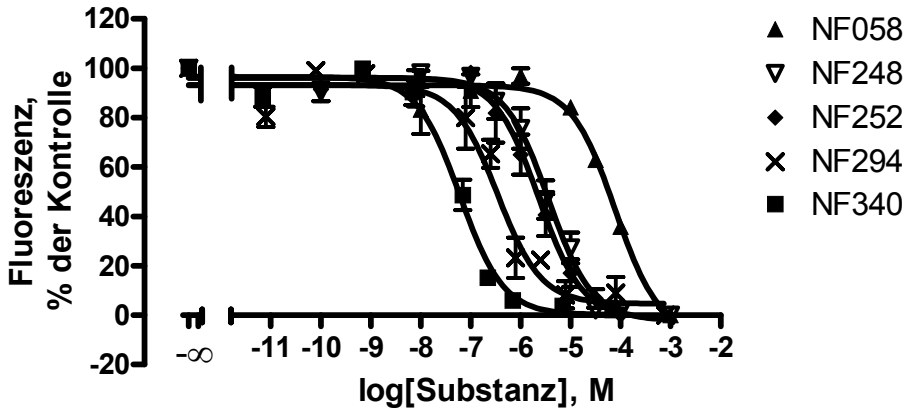


Abb. 4.23 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF058 (n = 3), NF248 (n = 5), NF252 (n = 5), NF294 (n = 4) und NF340 (n = 6) am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind jeweils nicht signifikant verschieden von 1.

In Abb. 4.23 und sind Inhibitionskurven und in Tab. 4.8 die entsprechenden apparenten pK_i-Werte für die fünf Substanzen, getestet an 1321N1-$P2Y_{11}$, dargestellt.

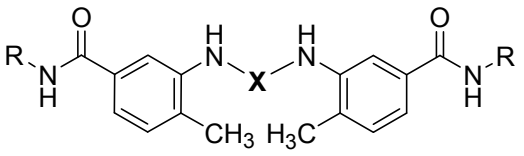
Tab. 4.8 Apparente funktionelle pK_i-Werte ± SD der NF058-Analoge am $P2Y_{11}$-Rezeptor.

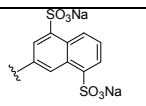
Substanz	pK_i ± SD
NF058	5,12 ± 0,13
NF248	6,47 ± 0,08
NF252	6,66 ± 0,09
NF294	7,42 ± 0,11
NF340	8,24 ± 0,07

NF058 weist mit 5,12 den niedrigsten pK_i-Wert der getesteten Substanzen auf. Die pK_i-Werte von NF248 und NF252 zeigen eine vergleichbare Hemmung des ATPγS-induzierten Calcium-Signals. NF248 und NF252 sind ca. 20-fach potenter als NF058, jedoch ca. neunfach weniger potent als NF157 (pK_i = 7,35) am $P2Y_{11}$-Rezeptor. NF294 zeigt mit einem pK_i-Wert von 7,48 einen Wert in der gleichen Größenordnung wie NF157. NF340 weist schließlich mit einem pK_i-Wert von 8,24 noch einmal eine etwa sechsfach höhere Potenz als NF157 oder NF294 am $P2Y_{11}$-Rezeptor auf. NF340 zeigt damit den höchsten pK_i-Wert in dieser Testreihe.

4.3.2 Terephthalsäurebisamid- und Isophthalsäurebisamid-Derivate von NF058, NF290, NF294, und NF298

Neben den Harnstoff-Derivaten wurden auch die Terephthalsäurebisamid- und die Isophthalsäurebisamid-Derivate der vier Naphthylsulfonsäuren NF294, NF290, NF298 und NF058 im Calcium-Assay an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen getestet, die die Ssf1/$P2Y_{11}$-Spleiß-Variante exprimierten. Die Strukturformeln dieser Substanzen sind in Abb. 4.24 zusammengefasst.



	NF325	NF324

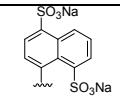
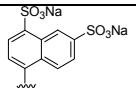
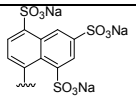
	NF333	NF332
	NF382	NF383
	-	NF107

Abb. 4.24 Isophthalsäurebisamid-Derivate und Terephthalsäurebisamid-Derivate von NF294, NF290, NF298 und NF058.

Tab. 4.9 Inhibitorische Potenz der Terephthalsäurebisamid- und Isophthalsäurebisamid-Derivate bei 10 µM im Calcium-Assay, gemessen am $P2Y_{11}$-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als „% Hemmung“ ± SD dargestellt.

Substanz	% Hemmung ± SD
NF107	34,5 ± 8,2
NF324	85,1 ± 14,2
NF325	43,0 ± 3,6
NF332	0,0 ± 12,6
NF333	1,5 ± 11,6
NF382	0,0 ± 5,5
NF383	4,3 ± 4,8

In Tab. 4.9 ist die Hemmung des durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Signals durch diese Substanzen dargestellt. Nur das Terephthalsäurebisamid- (NF325) und das Isophthalsäurebisamid-Derivat (NF324) von NF294 zeigten eine Hemmung von > 35 %. Daher wurden diese beiden Substanzen näher untersucht. In Abb. 4.25 sind die jeweiligen Konzentrations-Inhibitions-Kurven im Vergleich zu NF294 dargestellt.

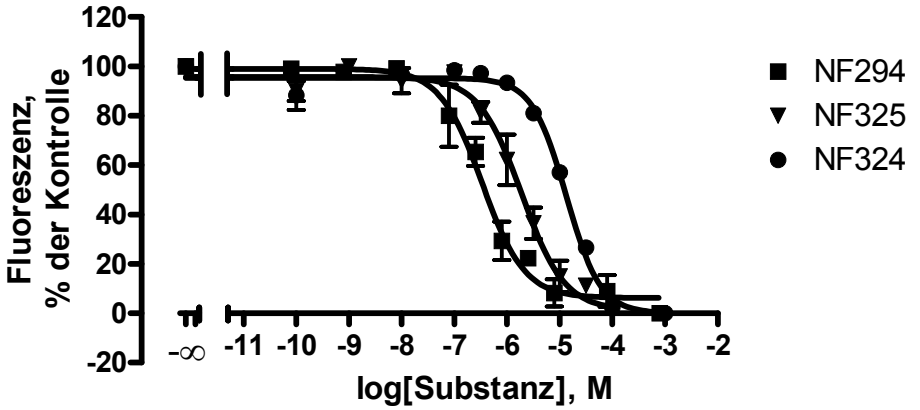
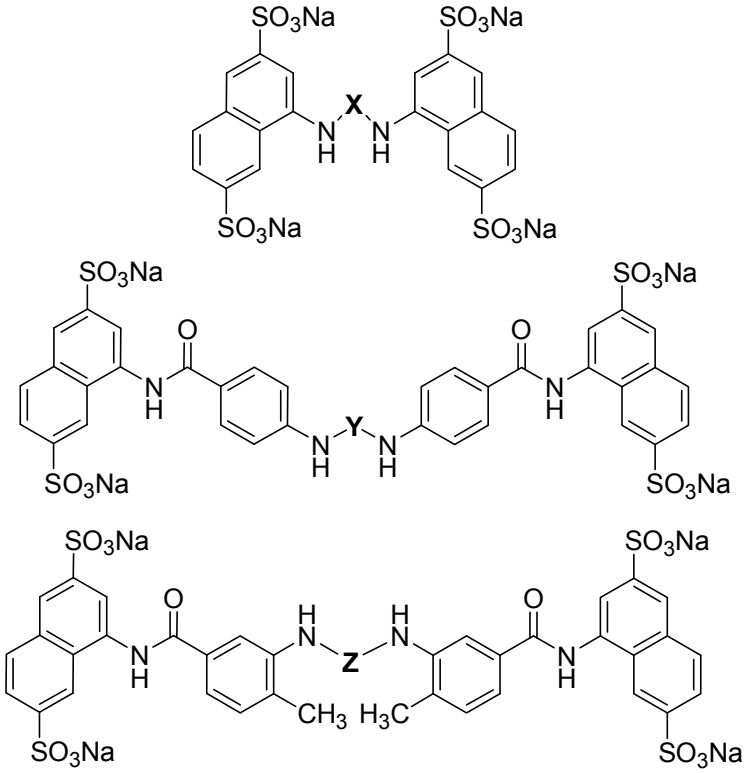


Abb. 4.25 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF325 (n = 5), NF324 (n = 3) und NF294 (n = 4) am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Für NF324 konnte ein apparenter pK_i-Wert von 5,85 ± 0,06 und für NF325 ein Wert von 6,73 ± 0,07 bestimmt werden. Damit sind beide Substanzen deutlich weniger potent als NF294 (pK_i = 7,42 ± 0,11) und NF157 (pK_i = 7,35 ± 0,06).
Eine agonistische Aktivität konnte hier ebenfalls nicht detektiert werden. Außerdem wurden die Substanzen an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren bei einer Konzentration von 10 µM getestet. An beiden Rezeptoren wurde dabei keine Inhibition der durch 2-MeSADP bzw. UTP hervorgerufenen Signale beobachtet.

4.3.3 Analoge des NF340 mit gleicher Naphthylsulfonsäure

Von NF340 wurden, wie auch von den in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Substanzen, Terephthalsäurebisamid- und Isophthalsäurebisamid-Derivate getestet (NF341 und NF342). Außerdem wurden zwei Substanzen mit der gleichen Naphthylsulfonsäure wie NF340 getestet, die entweder auf jeder Seite des Harnstoffs um eine Benzamidgruppe verkürzt sind (NF334) oder eine para-Verknüpfung anstelle einer meta-Verknüpfung in der Benzamidgruppe sowie keine Methyl-Substituierung aufweisen (NF337). Auch von diesen Substanzen wurden wiederum Terephthalsäurebisamid- und Isophthalsäurebisamid-Derivate getestet. Die Formeln und Bezeichnungen aller untersuchten Derivate von NF340 sind in Abb. 4.26 dargestellt.



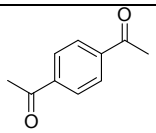
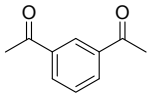
			
X	NF334	NF335	NF336
Y	NF337	NF338	NF339
Z	NF340	NF341	NF342

Abb. 4.26 Analoge des NF340 mit gleicher Naphthylsulfonsäure.

Die Substanzen wurden bei einer Konzentration von 10 µM an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen getestet. Außerdem wurden sie mit derselben Konzentration an P2Y$_1$, P2Y$_2$, P2Y$_4$ und P2Y$_6$-Rezeptoren im Calcium-Assay und an P2Y$_{12}$-Rezeptoren im cAMP-Reportergen-Assay eingesetzt. In Tab. 4.10 sind die Ergebnisse der Testungen als % Hemmung dargestellt. Alle Substanzen wurden zudem auf agonistische Aktivität getestet. Keine der Substanzen zeigte jedoch an den genannten Rezeptoren eine agonistische Wirkung.

Tab. 4.10 Inhibitorische Potenz der NF340-Derivate bei 10 µM im Calcium-Assay, gemessen an $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen, und im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{12}$-Rezeptoren, ebenfalls rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als % Hemmung ± SD dargestellt.

Substanz	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_4$	$P2Y_6$	$P2Y_{11}$	$P2Y_{12}$
NF334	26,4 ± 11,3	21,5 ± 10,9	6,5 ± 4,8	27,0 ± 17,4	0,0 ± 11,1	3,9 ± 3,8
NF335	27,5 ± 7,4	0,0 ± 0,3	0,0 ± 5,6	18,0 ± 13,1	0,0 ± 6,2	5,6 ± 20,3
NF336	9,9 ± 10,3	0,0 ± 2,3	0,0 ± 7,6	0,0 ± 20,0	0,0 ± 4,7	0,0 ± 8,6
NF337	0,0 ± 4,4	0,0 ± 4,2	0,0 ± 8,9	0,0 ± 23,0	2,5 ± 2,0	0,0 ± 8,0
NF338	3,5 ± 11,8	0,0 ± 2,5	5,0 ± 17,4	0,0 ± 27,8	2,5 ± 9,6	0,0 ± 3,6
NF339	13,8 ± 4,1	0,0 ± 5,2	18,9 ± 11,3	0,0 ± 11,8	2,8 ± 7,4	1,9 ± 15,3
NF340	7,6 ± 12,9	3,2 ± 4,1	0,0 ± 6,9	7,9 ± 17,6	**93,1 ± 3,3**	0,0 ± 7,0
NF341	13,6 ± 2,3	2,3 ± 5,9	0,0 ± 6,1	0,0 ± 17,0	38,7 ± 1,3	0,0 ± 2,7
NF342	17,2 ± 5,7	8,6 ± 3,8	0,0 ± 6,4	0,0 ± 27,2	35,8 ± 7,6	0,0 ± 8,2

NF340 zeigt bei 10 µM eine Inhibition von 93,3 % am $P2Y_{11}$-Rezeptor, während diese Substanz an den anderen P2Y-Rezeptoren keine Inhibition bewirkt (Inhibition < 10 %). Die anderen Testsubstanzen rufen eine Inhibition von weniger als 35 % an allen überprüften Rezeptoren hervor. Nur NF341 und NF342 zeigen am $P2Y_{11}$-Rezeptor eine Inhibition von 38,7 % bzw. 35,8 %. Am $P2Y_{11}$-Rezeptor wurden für die beiden potentesten Substanzen NF340 und NF341 Konzentrations-Inhibitions-Kurven aufgenommen, die in Abb. 4.27 im Vergleich zu NF157 dargestellt sind.

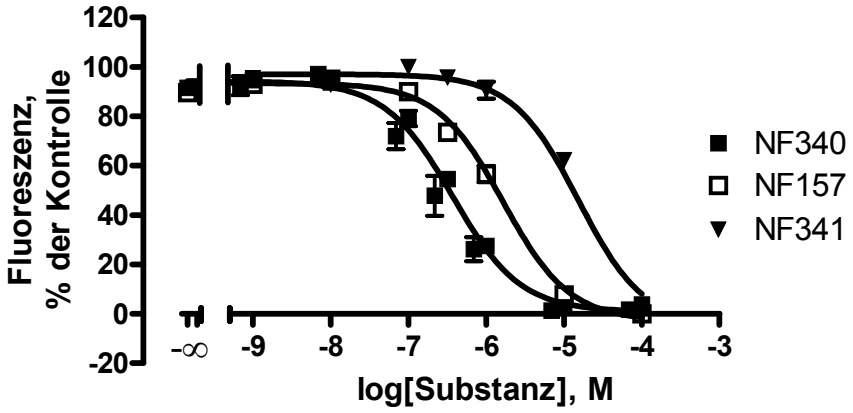


Abb. 4.27 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF340 (n = 28), NF341 (n = 3) und NF157 (n = 12) am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Für NF157, NF340 und NF341 wurden am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor apparente pK_i-Werte von 7,10 ± 0,05 (n = 12; K_i: 79 nM), 7,71 ± 0,04 (n = 28; K_i: 19 nM) bzw. 6,11 ± 0,14 (n = 3; K_i: 776 nM) berechnet. NF341 zeigt damit einen K_i-Wert, der in der gleichen Größenordnung wie der des Suramins liegt. NF340 ist im Calcium-Assay an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen 3,9-mal potenter als NF157.

Unter Betrachtung der Ergebnisse an der Ssf1-Spleiß-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors und der des korrekten $P2Y_{11}$-Rezeptors, ergibt sich ein signifikanter Unterschied für die beiden Antagonisten NF157 und NF340. Die Ergebnisse der Ssf1-Spleiß-Variante sind in Kapitel 4.2.1 (NF157, pK_i = 7,35 ± 0,06) und Kapitel 4.3.1 (NF340, pK_i =8,24 ± 0,07) beschrieben. An 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen ist NF340 damit 6-mal potenter als NF157, an den 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen nur 3,9-mal potenter (s.o.). Diese Befunde werden in Kapitel 5.2 diskutiert.

4.3.4 Charakterisierung von NF294

Aus der Reihe der an Position 3 verknüpften Naphthalin-1,5-disulfonsäuren zeigte NF294 die besten inhibitorischen Eigenschaften. In Abb. 4.25 ist die Inhibitionskurve für NF294 wiedergegeben. Da der Hillslope nicht signifikant verschieden von 1 ist, kann ein kompetitiver Mechanismus vermutet werden. Um dies zu überprüfen, wurde für die Substanz eine Schild-Analyse durchgeführt. Dazu wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen NF294 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS als Agonist aufgenommen.

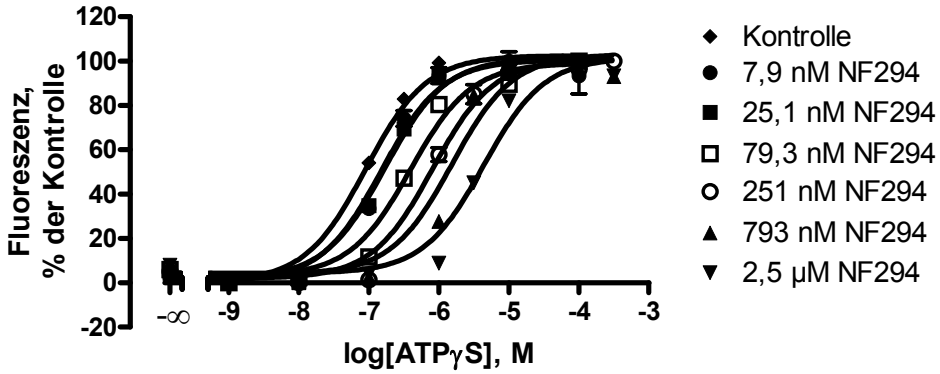


Abb. 4.28 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS an 1321N1-P2Y$_{11}$-Zellen im Calcium-Assay. ATPγS wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF294 getestet. Dargestellt ist hier ein repräsentatives Experiment ausgesucht aus fünf unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

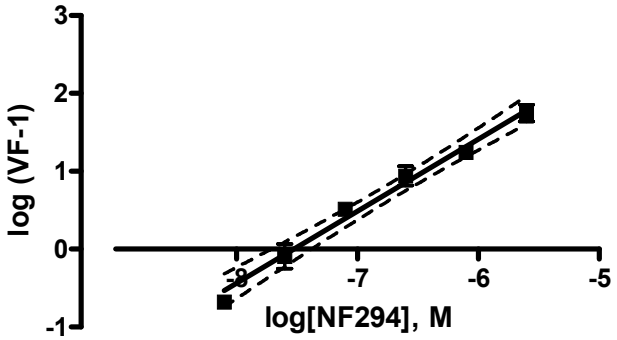


Abb. 4.29 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF294 an der Zelllinie 1321N1-P2Y$_{11}$ (Schild-Analyse). Für die Analyse wurde die durch NF294 vermittelte Inhibition der ATPγS-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Der pA_2-Wert wurde mit 7,53 ± 0,11 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.11 Einfluss von NF294 auf die pEC_{50} von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF294 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 7,9 nM NF294	+ 25,1 nM NF294	+ 79,3 nM NF294
pEC_{50}	7,06 ± 0,14	6,81 ± 0,11	6,78 ± 0,10	6,36 ± 0,09
n	5	3	3	3

	+ 251 nM NF294	+ 793 nM NF294	+ 2,51 µM NF294
pEC_{50}	6,04 ± 0,16	5,86 ± 0,12	5,27 ± 0,16
n	3	3	3

Abb. 4.28 zeigt die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven und Tab. 4.11 die entsprechenden pEC_{50}-Werte von ATPγS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF294. Die entsprechende Analyse nach Schild ist in Abb. 4.29 wiedergegeben. Die Schild-Analyse ergibt eine gerade Linie, deren Steigung nicht signifikant verschieden von 1 ist (Steigung: 0,924 ± 0,060; 95%iges Konfidenzintervall: 0,792 bis 1,057). Damit ist ein weiterer Hinweis auf einen kompetitiven Mechanismus von NF294 gegeben. Der pA_2-Wert wurde mit 7,53 ± 0,11 bestimmt und liegt im gleichen Bereich wie der apparente pK_i-Wert von NF294. Mit der Schild-Analyse konnte nochmals bestätigt werden, dass die Potenzen von NF294 und NF157 in der gleichen Größenordnung liegen.

4.3.5 Charakterisierung von NF340

4.3.5.1 cAMP-Reportergen-Assay

Die Potenz von NF340 wurde auch im cAMP-Reportergen-Assay bestimmt und mit NF157 verglichen (Abb. 4.30). Apparente funktionelle pK_i-Werte wurden für NF157 mit 6,81 ± 0,04 (n = 5; K_i: 156 nM) und für NF340 mit 7,82 ± 0,06 (n = 7; K_i: 156 nM) berechnet. Damit ist NF340 im cAMP-Reportergen-Assay ca. 10-mal potenter als NF157. Auch hier findet sich ein großer Unterschied der Potenzen im Vergleich zum Calcium-Assay. Dieser Befund wird ebenfalls im Kapitel 5 diskutiert.

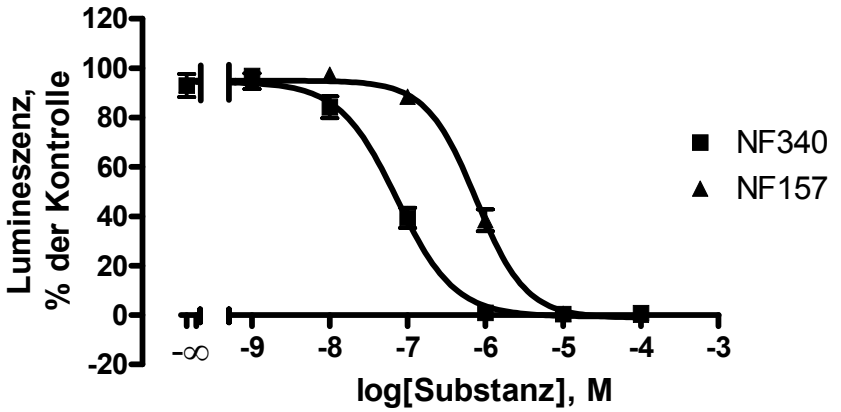


Abb. 4.30 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen cAMP-Antwort durch NF157 (n = 5) und NF340 (n = 7) am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

4.3.5.2 Schild-Analyse von NF340

Im Calcium-Assay und im cAMP-Reportergen-Assay wurden jeweils Hillslopes detektiert, die nicht signifikant verschieden von 1 sind. Dies deutet auf einen kompetitiven Mechanismus an der orthosteren Bindungsstelle von NF340 am $P2Y_{11}$-Rezeptor hin. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Analyse nach Schild durchgeführt. Dazu wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS im Calcium-Assay an den beiden Zelllinien 1321N1-$P2Y_{11}$ und 1321N1-$P2Y_{11}$GU aufgenommen. Die Rechtsverschiebung der Kurven sind in Abb. 4.31, die entsprechenden pEC_{50}-Werte von ATPγS in Tab. 4.12 und Tab. 4.13 und die daraus resultierende Analyse nach Schild in Abb. 4.32 dargestellt.

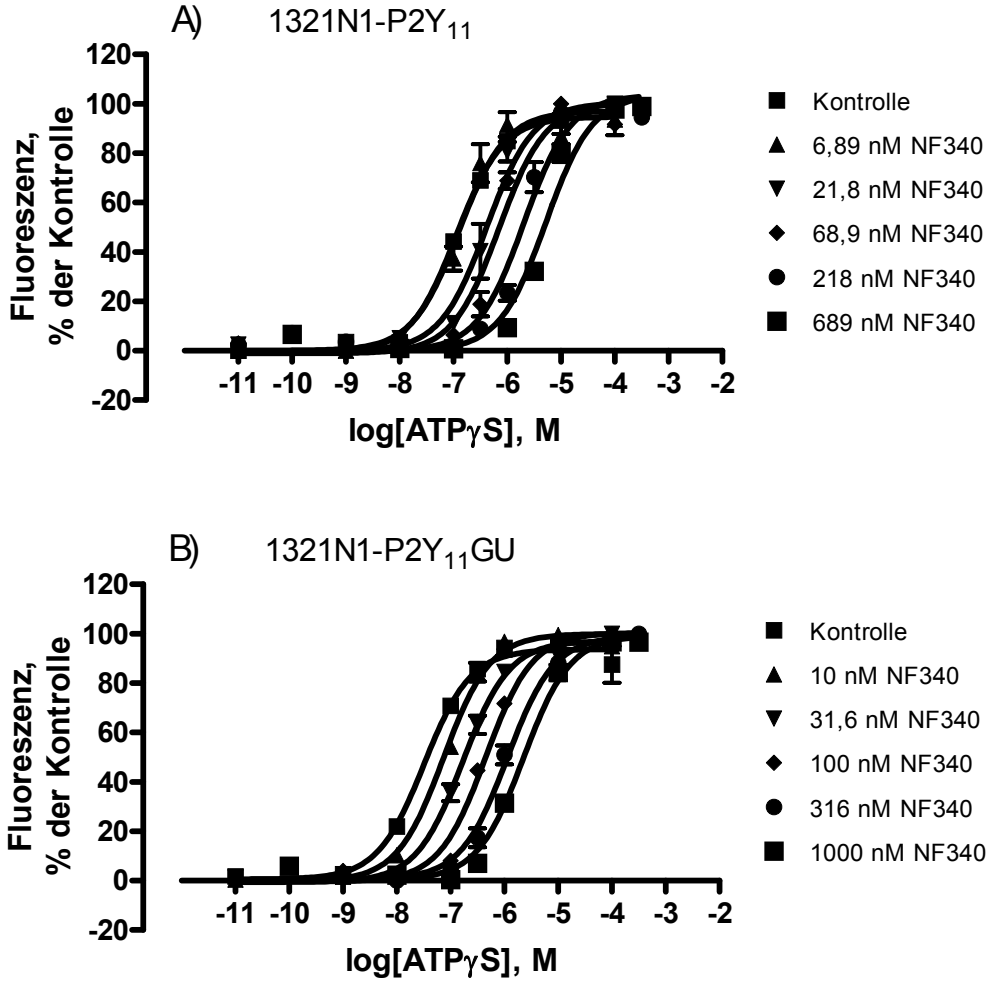


Abb. 4.31 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS an A) 1321N1-P2Y$_{11}$ und B) 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. ATPγS wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 getestet. Die Kurven setzen sich aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten je verwendeter Konzentration von NF340 zusammen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort.

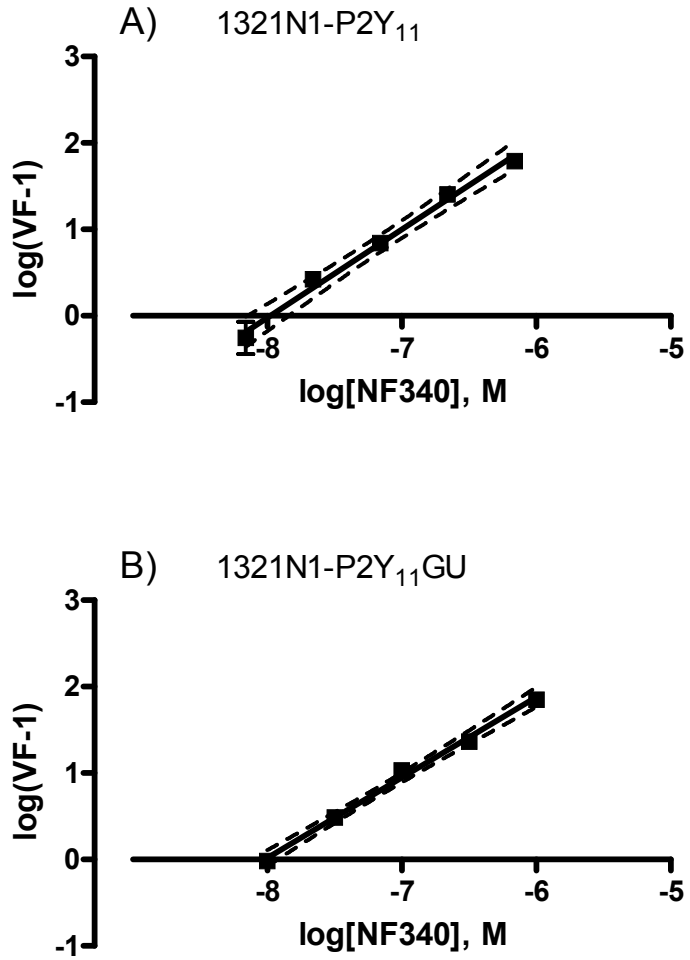


Abb. 4.32 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF340 an den Zelllinien A) 1321N1-$P2Y_{11}$ und B) 1321N1-$P2Y_{11}$GU (Schild-Analyse). Für die Analysen wurde die durch NF340 vermittelte Inhibition der ATPγS-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Die pA_2-Werte wurden mit A) 7,98 ± 0,10 und B) 8,02 ± 0,06 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigungen sind jeweils nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.12 Einfluss von NF340 auf die pEC_{50} von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 6,89 nM NF340	+ 21,8 nM NF340	+ 68,9 nM NF340	+ 218 nM NF340	+ 689 nM NF340
pEC_{50}	6,90 ± 0,05	6,94 ± 0,09	6,38 ± 0,08	6,15 ± 0,08	5,69 ± 0,08	5,28 ± 0,07
n	3	3	3	3	3	3

Tab. 4.13 Einfluss von NF340 auf die pEC_{50} von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 10 nM NF340	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 316 nM NF340	+ 1 µM NF340
pEC_{50}	7,49 ± 0,07	7,13 ± 0,05	6,77 ± 0,04	6,34 ± 0,04	5,94 ± 0,05	5,64 ± 0,06
n	3	3	3	4	3	4

Die Analysen nach Schild zeigen Geraden, die jeweils eine nicht signifikant von 1 verschiedene Steigung aufweisen (Steigung: $P2Y_{11}$-Rezeptor: 1,021 ± 0,06; 95 %iges Konfidenzintervall: 0,882 bis 1,160; $P2Y_{11}$GU-Rezeptor: 0,931 ± 0,039; 95 %iges Konfidenzintervall: 0,844 bis 1,017) Demnach kann ein kompetitiver Mechanismus für NF340 an beiden Rezeptorvarianten angenommen werden. Zudem sind die pA_2-Werte bei beiden Rezeptorvarianten gleich ($P2Y_{11}$-Rezeptor: 7,98; $P2Y_{11}$GU-Rezeptor: 8,02) und liegen nahe bei dem apparenten pK_i-Wert, der im Calcium-Assay bestimmt wurde ($P2Y_{11}$GU-Rezeptor: 7,72 bzw. $P2Y_{11}$-Rezeptor: 8,24; vgl. Abb. 4.27 und Tab. 4.8). In Tab. 4.12 und Tab. 4.13 sind für ATPγS (Kontrolle) einmal ein pEC_{50}-Wert von 6,90 ± 0,05 am $P2Y_{11}$-Rezeptor und ein pEC_{50}-Wert von 7,49 ± 0,07 am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor genannt. Diese Werte sind signifikant verschieden. Im Kapitel 4.1.3.5 wurde jedoch dargelegt, dass die beiden Rezeptor-Varianten keine signifikant verschiedenen Ergebnisse liefern. Die pEC_{50}-Werte, die in Tab. 4.12 und Tab. 4.13 sind nur aus jeweils drei Experimenten gemittelt worden und die in Kapitel 4.1.3.5 berücksichtigen Werte stammen aus 14 ($P2Y_{11}$-Rezeptor) bzw. 46 ($P2Y_{11}$GU-Rezeptor) Experimenten.

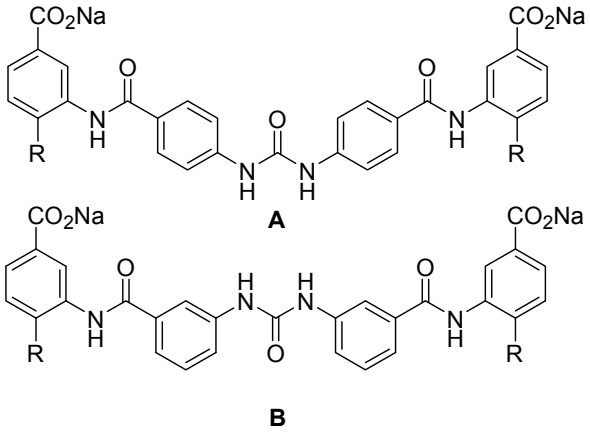
4.3.6 Selektivität von NF340 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber anderen P2Y- und P2X-Rezeptoren

NF340 wurde auch an P2X-Rezeptoren auf seine Aktivität getestet. Die Daten wurden im Labor von Dr. Ralf Hausmann und Prof. Schmalzing am Universitätsklinikum der RWTH Aachen erhoben. Es wurde die Inhibition von NF340 an rekombinanten P2X-Rezeptoren ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_{2/3}$) gemessen (Hausmann *et al.*, 2006; Ullmann *et al.*, 2005). Bei Konzentrationen von bis zu 3 µM wurden keine signifikanten Effekte an diesen Rezeptoren beobachtet (mündliche Mitteilung von Dr. Ralf Hausmann). Die Testung von NF340 an anderen P2Y-Rezeptoren ist in Tab. 4.10 zusammengefasst. NF340 zeigt bei 10 µM eine Inhibition von 93,3 % am $P2Y_{11}$-

Rezeptor, während diese Substanz an den anderen überprüften P2Y-Rezeptoren keine Inhibition bewirkt (Inhibition < 10 %). Das Ergebnis der Testung im Apyrase-Assay ist in Kapitel 4.7 dargestellt.

4.4 Carbonsäure-Derivate von Suramin

Des Weiteren wurden Carbonsäure-Derivate von Suramin auf ihre Wirksamkeit am $P2Y_{11}$-Rezeptor untersucht. Im Folgenden werden nur die Substanzen vorgestellt, die eine Wirkung am $P2Y_{11}$-Rezeptor zeigten. Die Strukturen der getesteten Substanzen sind in Abb. 4.33 dargestellt. Weitere Carbonsäure-Derivate sind mit Strukturformel und der im Calcium-Assay bestimmten Inhibition am $P2Y_{11}$-Rezeptor tabellarisch im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 11).



Rest R	-H	$-CH_3$
A	NF056	NF053
B	NF054	NF055

Abb. 4.33 Grundgerüste von vier Carbonsäure-Derivaten.

Tab. 4.14 Inhibitorische Potenz der Carbonsäure-Derivate von Suramin bei 10 µM im Calcium-Assay, gemessen an $P2Y_1$-, $P2Y_2$- und $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als % Hemmung ± SD dargestellt (n.g. = nicht gemessen).

Substanz	$P2Y_1$	$P2Y_2$	$P2Y_{11}$
NF053	0,0 ± 6,9	0,0 ± 1,1	77,1 ± 3,3
NF054	n.g.	n.g.	35,1 ± 3,6
NF055	11,8 ± 5,4	0,0 ± 1,0	15,8 ± 8,0
NF056	21,1 ± 9,2	10,6 ± 4,6	77,1 ± 1,7

Die beschriebenen Substanzen wurden an $P2Y_1$-, $P2Y_2$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren in einer Konzentration von 10 µM getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.14 dargestellt. Nur die beiden Derivate mit dem Typ-A-Grundgerüst (NF053 und NF056; vgl. Abb. 4.33), zeigen am $P2Y_{11}$-Rezeptor bei einer Konzentration von 10 µM eine Hemmung von jeweils 77 %. Die Derivate mit dem Grundgerüst B (NF054 und NF055; vgl. Abb. 4.33) bewirken dagegen bei einer Konzentration von 10 µM eine Hemmung von ≤ 35 %. Das Grundgerüst B weist im Gegensatz zum Grundgerüst A neben dem zentralen Harnstoffelement eine meta-Verknüpfung anstelle einer para-Verknüpfung auf. An $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren wurde bei allen getesteten Substanzen eine Hemmung von < 35 % detektiert. Auf Grund dieser Befunde wurden für die beiden Substanzen NF053 und NF056 am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor Konzentrations-Inhibitions-Kurven erstellt (siehe Abb. 4.34) und apparente funktionelle pK_i-Werte berechnet (NF053: 7,16 ± 0,05; NF056: 7,15 ± 0,08).

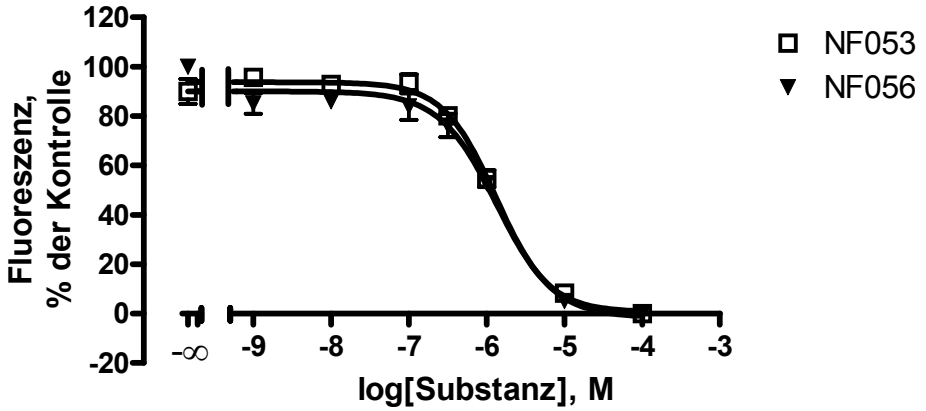


Abb. 4.34 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF053 (n = 3) und NF056 (n = 2) am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle" ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

4.5 Identifizierung von Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor

4.5.1 NF145

4.5.1.1 Testung von NF145 im Calcium-Assay

Bei der Testung der Suramin-Analogen mit Variation der Methyl-Gruppen (vgl. Kapitel 4.2) wurde bei einer Substanz (NF145) ein agonistischer Effekt an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen beobachtet. NF145 besitzt anstelle der Methyl-Gruppen tertiäre Butyl-Reste. Die Strukturformel ist in Tab. 3.12 dargestellt. Für die Prüfung auf Agonismus wurde die Substanz im NOVOstar® auf die mit Oregon Green® vorinkubierten Zellen pipettiert und anhand der Fluoreszenz-Intensität die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration vermessen. In Abb. 4.35 ist der Fluoreszenz-Verlauf nach Injektion von NF145 im Vergleich zum Puffer und zum Standardagonisten ATPγS dargestellt. Von jedem Messwert wurde die Grundfluoreszenz abgezogen und das Ergebnis gegen die Zeit aufgetragen.

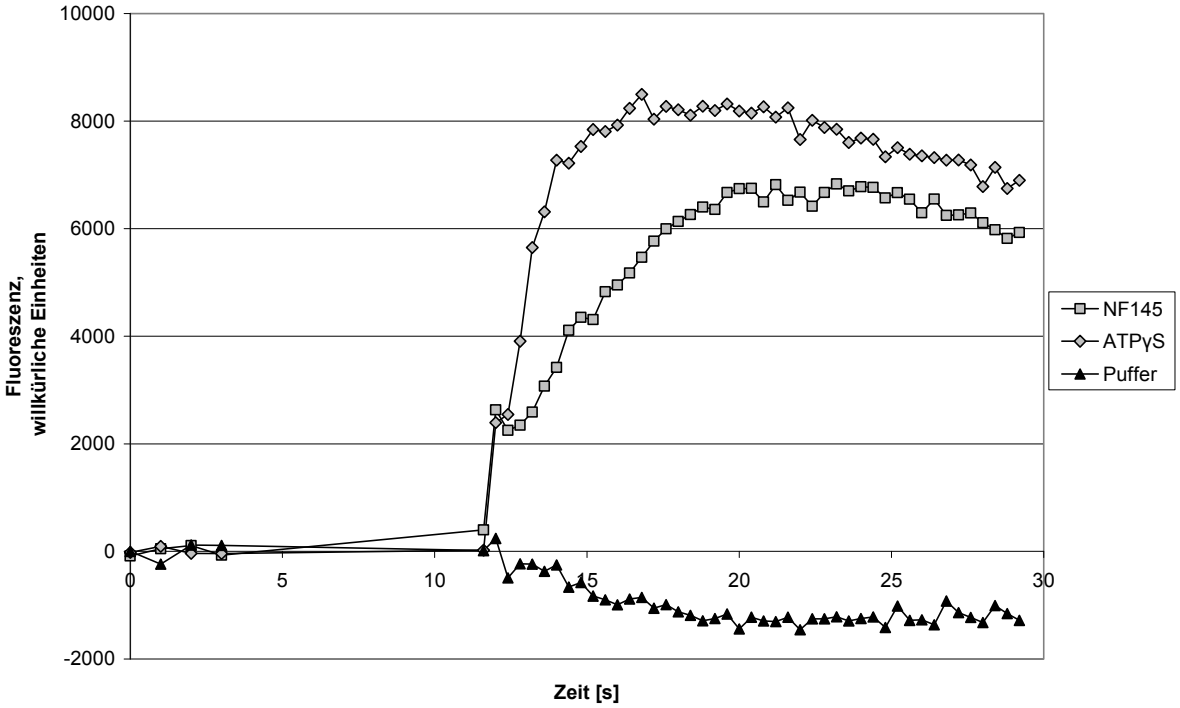


Abb. 4.35 Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz nach Injektion von 10 µM ATPγS, NF145 oder Puffer. Dargestellt sind die aus je drei Replikaten gebildeten Durchschnittskurven. Die Injektion der Substanzen erfolgte zum Zeitpunkt von 11,6 s.

Nach der Injektion von ATPγS und NF145 sind deutliche Anstiege der Calcium-Konzentration zu erkennen. Die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz von verläuft bei NF145 dabei ähnlich wie die von ATPγS. Um einen toxischen Effekt oder die Aktivierung anderer Rezeptoren auszuschließen, wurde versucht das Signal mit dem bereits beschriebenen Antagonisten NF157 (vgl. Kapitel 4.2.1) zu blockieren. Dazu wurden 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen einmal mit und einmal ohne 10 µM NF157 für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde 1 µM NF145 zugegeben und das Calcium-Signal mit Hilfe des NOVOstar® vermessen.

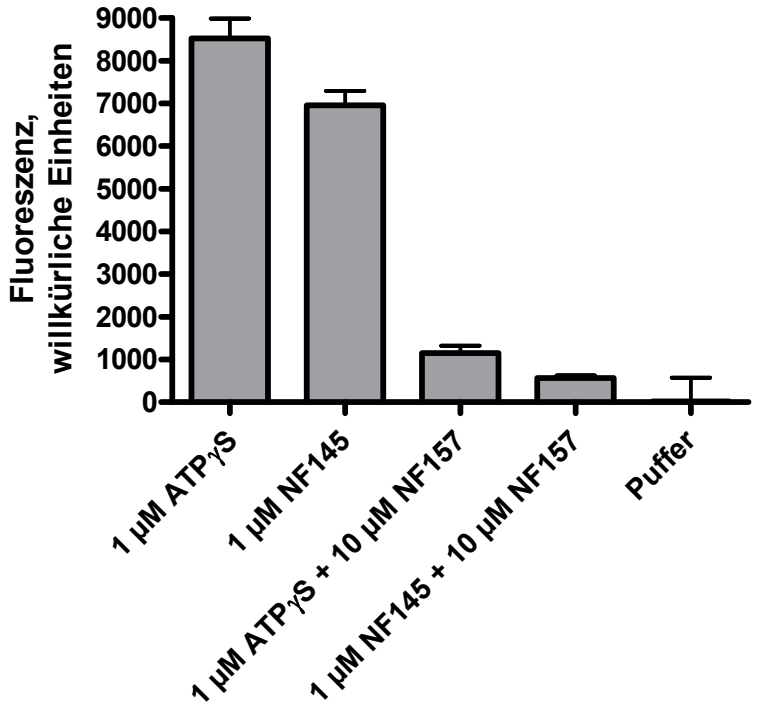


Abb. 4.36 Effekt von ATPγS und NF145 mit bzw. ohne Vorinkubation von NF157 auf die Fluoreszenz im Calcium-Assay an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Das Calcium-Signal von NF145 wurde durch die Vorinkubation mit NF157 blockiert (Abb. 4.36). Dies deutet darauf hin, dass das NF145-Signal tatsächlich über den P2Y$_{11}$-Rezeptor hervorgerufen wird. Um auszuschließen, dass diese Daten Artefakte des Messsystems darstellen, wurde 10 µM NF145 auch an 1321N1-WT-Zellen im Calcium-Assay getestet. Hier konnte kein signifikant verschiedenes Signal im Vergleich zur reinen Puffer-Injektion gemessen werden (willkürliche Fluoreszenzeinheiten: Puffer: 802 ± 869; NF145: 964 ± 382;). In Abb. 4.36 wie auch

in Abb. 4.35 ist zu erkennen, dass sich das durch NF145 hervorgerufene Calcium-Signal signifikant von dem durch ATPγS hervorgerufene unterscheidet. Bei NF145 zeigte sich ein um ca. 20 % reduziertes Signal im Vergleich zu ATPγS. Dies deutet darauf hin, dass NF145 nicht die gleiche intrinsische Aktivität besitzt wie ATPγS und damit kein Voll-Agonist ist. Um die Potenz und das Ausmaß der intrinsischen Aktivität am $P2Y_{11}$-Rezeptor zu bestimmen, wurde eine Konzentrations-Effekt-Kurve von NF145 aufgenommen und mit ATPγS verglichen (Abb. 4.37). Dabei wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen beide Substanzen gleichzeitig vermessen worden waren. Bei der Auswertung wurde der jeweils niedrigste Fluoreszenz-Wert beider Messreihen als 0 % und der höchste Wert der ATPγS-Messreihe als 100 % gesetzt. Dann wurden für jeden Einzelversuch aus den normierten Triplikaten jeweils Mittelwerte gebildet. Die sich aus den sechs Versuchen ergebenden Mittelwerte wurden schließlich einer Auswertung nach der „Vier-Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Formel 4) unterzogen. Es konnte ein pEC_{50}-Wert von 6,75 ± 0,05 für NF145 bzw. von 7,19 ± 0,07 für ATPγS bestimmt werden.

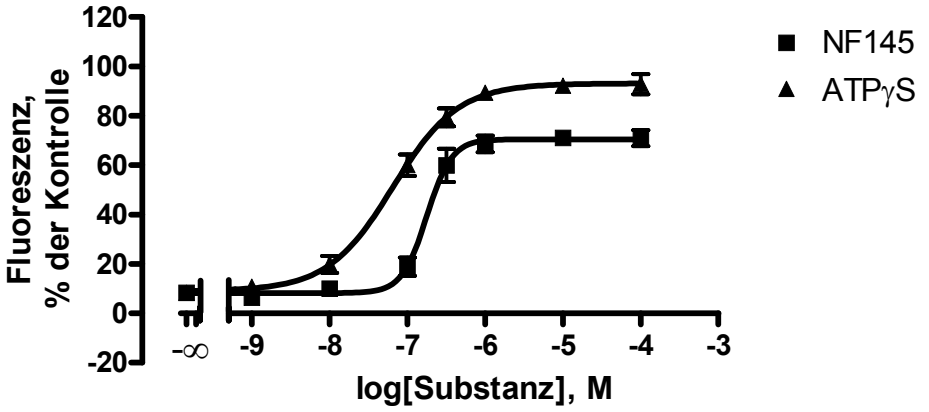


Abb. 4.37 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS und NF145 im Calcium-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen (n = 6). „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort.

In Abb. 4.37 ist wiederum der Unterschied in der intrinsischen Aktivität zu erkennen. Die oberen Plateaus der beiden Substanzen unterscheiden sich signifikant voneinander. NF145 erreicht nur eine intrinsische Aktivität von 75,3 % bezogen auf ATPγS. Zudem ist auffällig, dass die Steigung der Kurven im Wendepunkt unterschiedlich ist. Bei ATPγS konnte ein Hillslope von 1,03 ± 0,14 bestimmt werden.

Im Gegensatz dazu zeigt NF145 einen deutlich steileren Hillslope (2,71 ± 0,49), was auf einen anderen Bindungsmodus als beim ATPγS deuten kann.

4.5.1.2 Selektivität von NF145 gegenüber anderen P2Y-Rezeptoren

Zur Überprüfung der Selektivität wurde NF145 auch an anderen P2Y-Rezeptoren getestet. In Tab. 4.15 sind die Ergebnisse der Testung auf Agonismus dargestellt, in Tab. 4.16 die Ergebnisse der Testung auf Antagonismus. An $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$- und $P2Y_6$-Rezeptoren wurde die Testung im Calcium-Assay durchgeführt, an $P2Y_{12}$-Rezeptoren im cAMP-Reportergen-Assay.

Tab. 4.15 Agonistische Aktivität von 10 µM NF145 an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1,\ 2,\ 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% der Kontrolle“, wobei die Kontrolle den durch eine fixe Konzentration des Standardagonisten (vgl. Tab. 3.16) des jeweiligen Rezeptors hervorgerufenen Effekt darstellt.

Rezeptor	% der Kontrolle ± SD
$P2Y_1$	0 ± 5,3
$P2Y_2$	0 ± 2,8
$P2Y_4$	0 ± 14,7
$P2Y_6$	10,6 ± 5,4
$P2Y_{12}$	20,1 ± 29,5

Tab. 4.16 Inhibitorische Potenz von 10 µM NF145 bei an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1,\ 2,\ 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% Hemmung“ des Effekts einer fixen Konzentration des Standardagonisten (vgl. Tab. 3.16) des jeweiligen Rezeptors.

Rezeptor	% Hemmung ± SD
$P2Y_1$	0 ± 5,4
$P2Y_2$	0 ± 3,1
$P2Y_4$	21,2 ± 3,3
$P2Y_6$	0 ± 4,4
$P2Y_{12}$	3,6 ± 5,0

An allen Rezeptoren zeigte NF145 keine ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$) oder nur eine geringe agonistische Aktivität ($P2Y_6$, $P2Y_{12}$), die 35 % der Kontrollantwort nicht überschreitet. Auch im Antagonist-Screening zeigte NF145 keine nennenswerte Hemmung der durch den jeweiligen Standardagonisten hervorgerufenen Zellantwort. Nur am $P2Y_4$-Rezeptor bewirkte NF145 eine Hemmung von ca. 20 %. Damit scheint NF145 nur am $P2Y_{11}$-Rezeptor eine signifikante Rezeptor-Aktivierung zu bewirken.

4.5.1.3 NF145 im cAMP-Reportergen-Assay

Um die Aktivierung des $P2Y_{11}$-Rezeptors durch NF145 auch im cAMP-Reportergen-Assay zu untersuchen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen aufgenommen. Um auszuschließen, dass NF145 über andere Rezeptoren eine cAMP-Ausschüttung hervorruft, wurde NF145 auch an 1321N1-WT-Zellen getestet. Das Signal von NF145 an 1321N1-WT-Zellen ist nicht signifikant verschieden von dem der Medium-Kontrolle (willkürliche Lumineszenz-Einheiten: Medium: 44 ± 8; NF145: 37 ± 2).

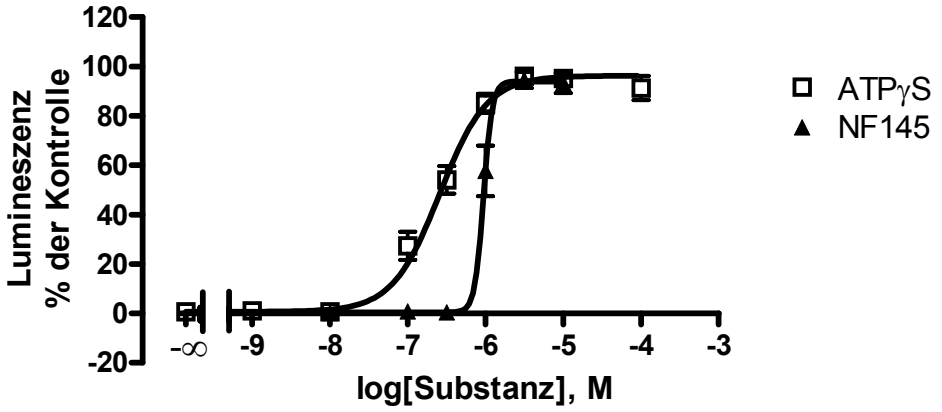


Abb. 4.38 Konzentrations-Effekt-Kurve von NF145 (n = 4) und ATPγS (n = 12) im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS bzw. NF145 maximal erreichten Antwort.

Die Konzentrations-Effekt-Kurve von NF145 (Abb. 4.38) weist einen sehr steilen Hillslope auf (7,72). Es wurde ein pEC_{50}-Wert von 6,02 ± 0,69 (n = 4; EC_{50}: 943 nM) bestimmt, der damit ca. fünffach höher ist als im Calcium-Assay. Dies ist jedoch konform mit dem Befund bei ATPγS (vgl. Kapitel 4.1.3.5). NF145 zeigt im cAMP-

Reportergen-Assay eine intrinsische Aktivität, die nicht signifikant von der intrinsischen Aktivität von ATPγS verschieden ist.

4.5.1.4 Schild-Analyse von NF157 unter Verwendung des Agonisten NF145

Die Hillslopes der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF145 im cAMP-Reportergen-Assay und im Calcium-Assay sind signifikant verschieden von 1 und weisen somit auf keinen eins zu eins Bindungsmodus hin. Es wurde eine Analyse nach Schild durchgeführt. Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von NF145 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 als Agonist aufgenommen. Die Rechtsverschiebung der Kurven ist in Abb. 4.39 dargestellt, die daraus resultierende Analyse nach Schild in Abb. 4.40. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.17 zusammengefasst.

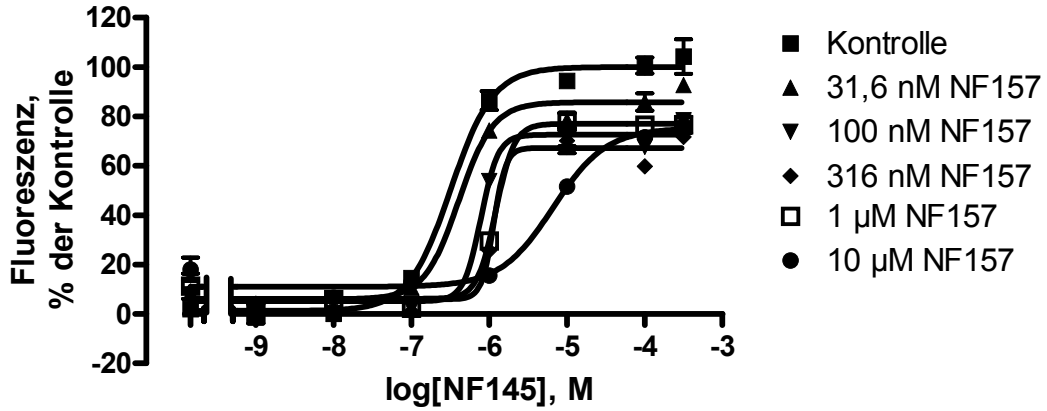


Abb. 4.39 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF145 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. NF145 wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment, ausgesucht aus drei unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit NF145 maximal erreichten Antwort dar.

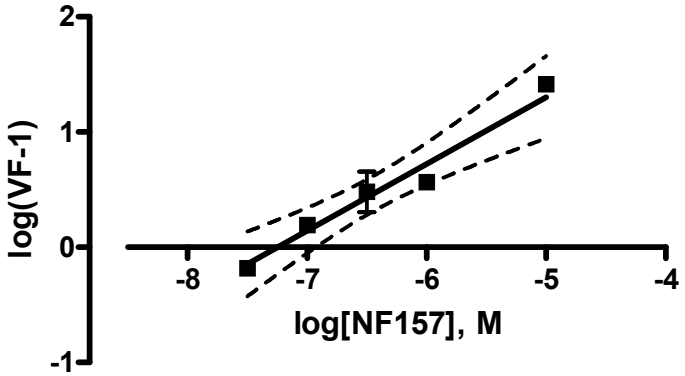


Abb. 4.40 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF157 an der Zelllinie 1321N1-P2Y$_{11}$GU (Schild-Analyse). Für die Analysen wurde die durch NF157 vermittelte Inhibition der NF145-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Der pA_2-Wert wurde mit 7,25 ± 0,27 bestimmt (Mittelwert ± SD).

Tab. 4.17 Einfluss von NF157 auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

NF145	+ Puffer (Kontrolle)	+ 31,6 nM NF157	+ 100 nM NF157	+ 316 nM NF157	+ 1 µM NF157	+ 10 µM NF157
pEC_{50}	6,60 ± 0,15	6,38 ± 0,12	6,20 ± 0,01	5,95 ± 0,18	5,94 ± 0,03	5,17 ± 0,12
E_{max}	100 ± 2 %	86 ± 2 %	73 ± 0 %	70 ± 6 %	73 ± 1 %	73 ± 1 %
n	3	2	3	2	2	2

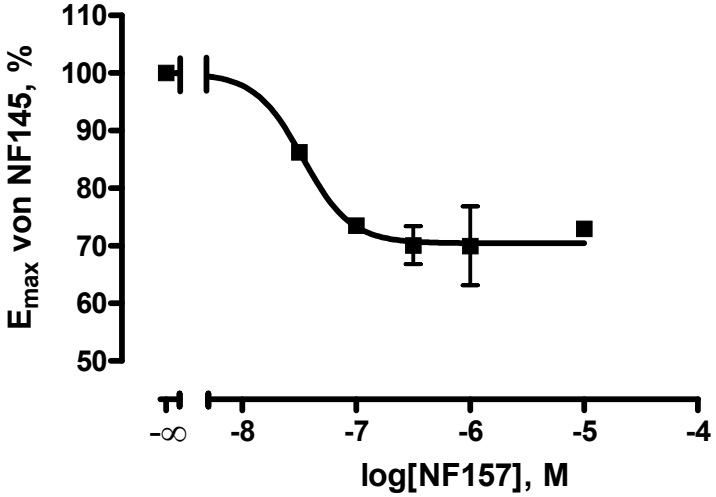


Abb. 4.41 Konzentrationsabhängiger Einfluss von NF157 auf die maximale intrinsische Aktivität (E_{max}) von NF145 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

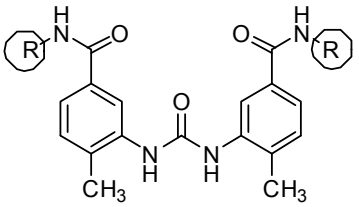
Es zeigte sich, dass die intrinsische Aktivität von NF145 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 abnimmt. Nach den Vorgaben von Schild darf in so einem Fall keine Auswertung erfolgen (Arunlakshana and Schild, 1959; Schild, 1957). Die Ergebnisse wurden dennoch in einem Graphen aufgetragen. Die Analyse nach Schild zeigt eine Gerade, deren Steigung signifikant verschieden von 1 ist (Steigung: 0,5789 ± 0,094; 95 %iges Konfidenzintervall: 0,355 bis 0,802). Demnach kann kein kompetitiver Mechanismus für die Wechselwirkung von NF157 als Antagonist und NF145 als Agonist angenommen werden. Es wurde ein pA_2-Wert von 7,25 berechnet, der im gleichen Bereich wie der apparente pK_i-Wert liegt, der im Calcium-Assay bestimmt wurde (pK_i = 7,35 ($P2Y_{11}$), vgl. Abb. 4.18). Eine Auswertung, bei der die relativen Werte der maximalen Aktivität mit der Konzentration des Antagonisten in Bezug gesetzt werden, wurde auch durchgeführt. Der Wendepunkt des entsprechenden Graphen (Abb. 4.41) liegt bei 7,49 ± 0,16 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration M) und ebenfalls in der gleichen Größenordnung wie der pK_i-Wert von NF157 (s.o.).

4.5.2 NF546

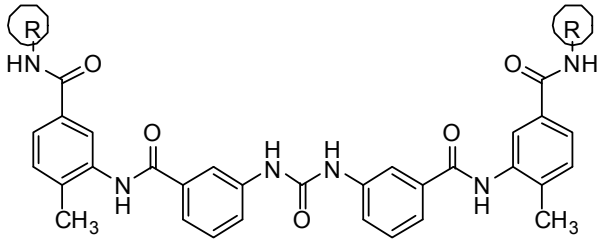
4.5.2.1 Testung von benzylischen Phosphonsäuren im Calcium-Assay

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Derivate mit dem Grundgerüst von Suramin bzw. NF340 getestet, die anstelle der Naphthylsulfonsäure einen benzylischen Phosphonsäurerest besitzen. Die Formeln sind in Abb. 4.42 wiedergegeben.

Zunächst wurden die Substanzen auf Aktivität am $P2Y_{11}$-Rezeptor überprüft. In Tab. 4.18 sind die Ergebnisse der Testung auf Agonismus und in Tab. 4.19 auf Antagonismus aufgelistet. Die monosubstituierten Methylphosphonsäure-Derivate (NF540, NF542) zeigten keine vom Puffer signifikant verschiedene Aktivierung des Rezeptors. Die disubstituierten Derivate (NF544, NF546) führten dagegen zu einer deutlichen Calcium-Ausschüttung in 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen. Beim Test auf Antagonismus konnte nur bei NF546 eine Hemmung des durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Signals von > 35 % am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor detektiert werden.



A



B

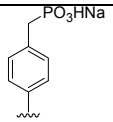
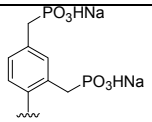
Rest R		
A	NF540	NF544
B	NF542	NF546

Abb. 4.42 Strukturformel von NF546 und Analogen.

Tab. 4.18 Agonistische Aktivität von benzylischen Phosphonsäure-Derivaten am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay. Die Ergebnisse sind angegeben als „% der Kontrolle“, wobei die Kontrolle den von 1 µM ATPγS hervorgerufenen Effekt darstellt.

Substanz	% der Kontrolle ± SD
NF540	7,3 ± 10,3
NF542	14,0 ± 3,0
NF544	84,5 ± 2,5
NF546	93,6 ± 4,1
Puffer	0,0 ± 10,3

Tab. 4.19 Inhibitorische Potenz der benzylischen Phosphonsäure-Derivaten bei 100 µM im Calcium-Assay, gemessen an $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als % Hemmung ± SD dargestellt.

Substanz	% Hemmung ± SD
NF540	9,0 ± 1,1
NF542	22,3 ± 2,7
NF544	23,2 ± 1,7
NF546	60,7 ± 1,5

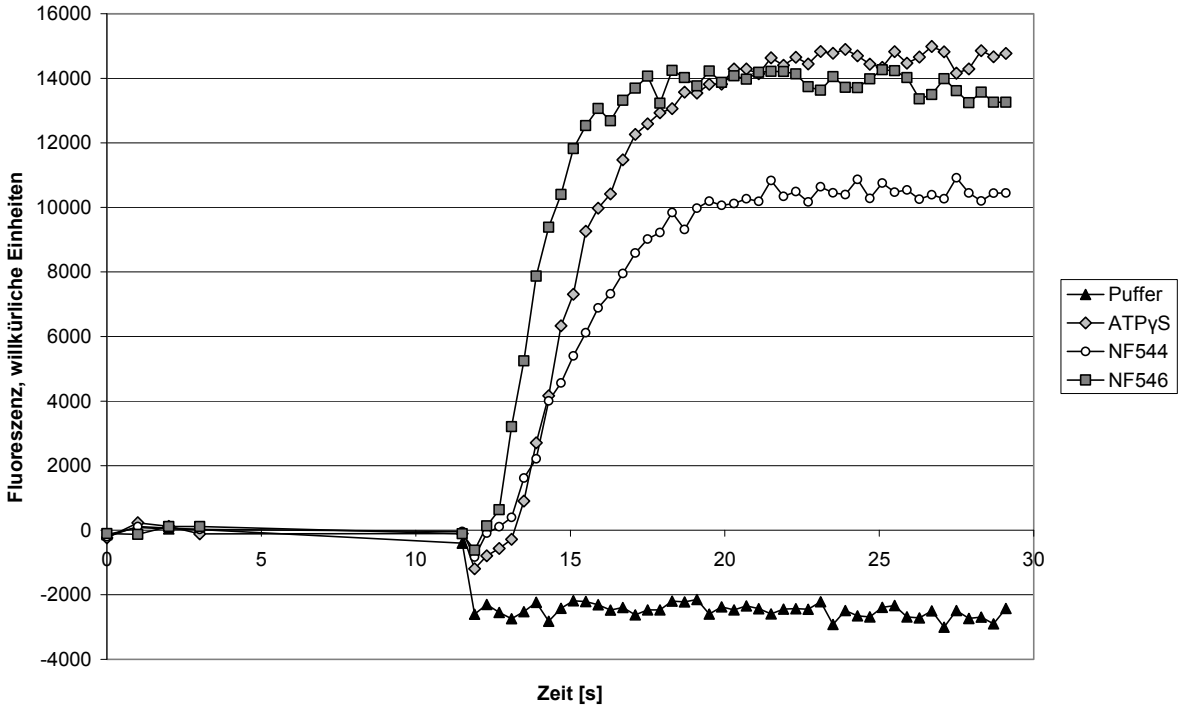


Abb. 4.43 Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz nach Injektion von 10 µM ATPγS, 100 µM NF544, 100 µM NF546 oder Puffer. Dargestellt sind die aus je drei Replikaten gebildeten Durchschnittskurven. Die Injektion der Substanzen erfolgte beim Zeitpunkt von 11,6 s.

Der Verlauf der bei diesen beiden Substanzen bestimmten Fluoreszenz-Signale ist ähnlich dem von ATPγS (Abb. 4.43). Während die Höhe des Fluoreszenz-Signals bei NF546 nicht signifikant verschieden vom ATPγS-Signal ist, ist sie bei NF544 signifikant niedriger. Daher wurde NF544 zusätzlich in den Konzentrationen 10 µM und 1 µM am $P2Y_{11}$-Rezeptor getestet. Bei 10 µM liegt die Aktivität nur noch bei 41,5 ± 7,1 % und bei 1 µM ist das Signal nicht signifikant verschieden vom Puffer

(1 µM NF544: 24,1 ± 1,8 %; Puffer: 21,4 ± 2,9 %). Es konnte ein pEC_{50}-Wert von 4,96 ± 0,07 berechnet werden.

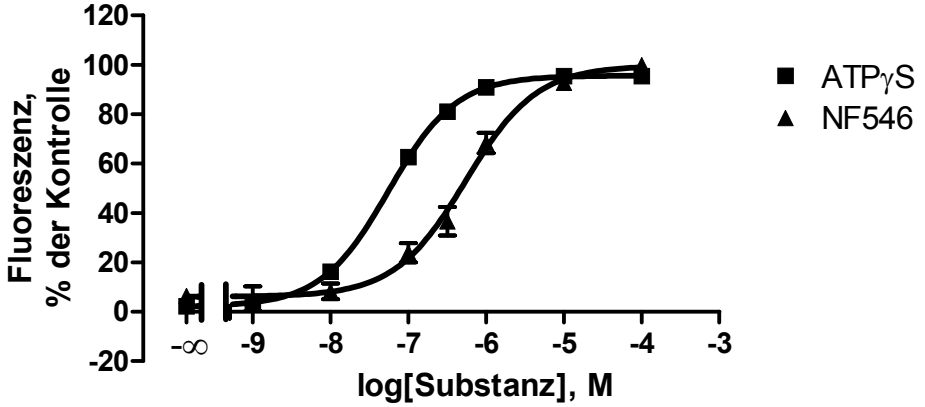


Abb. 4.44 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS (n = 46) und NF546 (n = 12) im Calcium-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit NF546 bzw. ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Um die Potenz von NF546 am $P2Y_{11}$-Rezeptor zu bestimmen, wurde im Calcium-Assay eine Konzentrations-Effekt-Kurve aufgenommen und mit der von ATPγS verglichen (Abb. 4.44). Für NF546 wurde ein pEC_{50}-Wert von 6,27 ± 0,07 (n = 12; EC_{50}: 542 nM) bestimmt. Damit ist NF546 um den Faktor 9,8 weniger potent als ATPγS (7,26 ± 0,03; n = 47; EC_{50}: 55 nM). Im Gegensatz zu NF145 zeigt NF546 jedoch eine intrinsische Aktivität, die sich nicht signifikant von der ATPγS-Aktivität unterscheidet (vgl. Abb. 4.44 und Abb. 4.45). Zudem liegt der Hillslope bei 0,93 ± 0,13. Es wurde überprüft, ob das durch NF546 hervorgerufene Calcium-Signal durch Vorinkubation der Zellen mit dem $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonisten NF157 blockiert wird, um auszuschließen, dass das Calcium-Signal unspezifisch über Rezeptoren an der Zelloberfläche der 1321N1-Zellen vermittelt wurde,. Mit Hilfe von NF157 konnte die Calcium-Ausschüttung tatsächlich verhindert werden (Abb. 4.45). Außerdem wurde NF546 auch an 1321N1-WT-Zellen getestet. Hier konnte nach Injektion von 100 µM NF546 kein vom Puffer signifikant verschiedenes Signal detektiert werden (Puffer: 802 ± 869; NF546: 632 ± 591; jeweils in willkürlichen Fluoreszenzeinheiten).

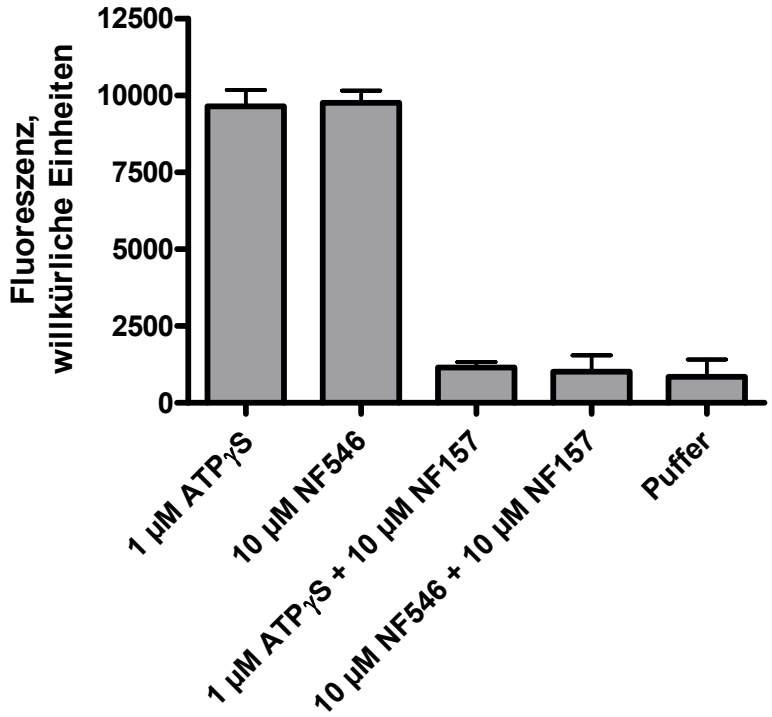


Abb. 4.45 Effekt von ATPγS und NF546 mit bzw. ohne Vorinkubation von NF157 auf die Fluoreszenz im Calcium-Assay an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen.

4.5.2.2 Selektivität von NF546 gegenüber anderen P2-Rezeptoren

Zur Klärung der Selektivität wurde NF546 auch an den anderen zur Verfügung stehenden P2Y-Rezeptoren auf Agonismus und Antagonismus getestet. Die Ergebnisse der Testung auf Agonismus sind in Tab. 4.20 dargestellt, die Ergebnisse der Testung auf Antagonismus in Tab. 4.21. Die Versuche wurden an P2Y$_1$-, P2Y$_2$-, P2Y$_4$-, und P2Y$_6$-Rezeptoren im Calcium-Assay im Vergleich zu den jeweiligen Standardagonisten durchgeführt (vgl. Tab. 3.16). Die Testung am P2Y$_{12}$-Rezeptor wurde mit Hilfe des cAMP-Reportergen-Assays durchgeführt.

Tab. 4.20 Agonistische Aktivität von 10 µM NF546 an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1,\ 2,\ 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% der Kontrolle“, wobei die Kontrolle den durch eine fixe Konzentration des Standardagonisten des jeweiligen Rezeptors hervorgerufenen Effekt darstellt (vgl. Tab. 3.16).

Rezeptor	% der Kontrolle ± SD
$P2Y_1$	0 ± 5,4
$P2Y_2$	42,0 ± 2,1
$P2Y_4$	5,9 ± 5,2
$P2Y_6$	30,9 ± 2,0
$P2Y_{12}$	22,3 ± 12,8

Tab. 4.21 Inhibitorische Potenz von 10 µM NF546 an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1,\ 2,\ 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% Hemmung“ des Effekts einer fixen Konzentration des Standardagonisten des jeweiligen Rezeptors (vgl. Tab. 3.16).

Rezeptor	% Hemmung ± SD
$P2Y_1$	22,1 ± 11,9
$P2Y_2$	30,6 ± 7,0
$P2Y_4$	0,0 ± 12,6
$P2Y_6$	0,0 ± 0,6
$P2Y_{12}$	12,3 ± 23,8

NF546 zeigte bei einer Konzentration von 10 µM an den meisten Rezeptoren keine ($P2Y_1$, $P2Y_4$) oder nur eine geringe Aktivität ($P2Y_6$, $P2Y_{12}$). Nur am $P2Y_2$-Rezeptor konnte eine Aktivität von 42 % der durch 1 µM UTP hervorgerufenen Kontrollantwort gemessen werden. Bei 1 µM NF546 wurde an keinem der Rezeptoren eine vom Puffer signifikant verschiedene Antwort detektiert. Auch bei der Prüfung auf Antagonismus konnte bei keinem Rezeptor eine Hemmung von > 35 % gefunden werden. Dies bedeutet, dass die IC_{50} bzw. die EC_{50} von NF546 an allen überprüften P2Y-Rezeptoren außer beim $P2Y_{11}$-Rezeptor bei > 10 µM liegt.

NF546 wurde ebenfalls an rekombinant exprimierten P2X-Rezeptoren ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_{2/3}$) getestet (Hausmann *et al.*, 2006; Ullmann *et al.*, 2005). Bei Konzentrationen

von bis zu 3 µM NF546 wurden keine signifikanten Effekte an diesen Rezeptoren beobachtet (mündliche Mitteilung von Dr. Ralf Hausmann).

4.5.2.3 Testung von NF546 im cAMP-Reportergen-Assay

Die Aktivität von NF546 am $P2Y_{11}$-Rezeptor wurde auch im cAMP-Reportergen-Assay untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von NF546 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen getestet. Um auszuschließen, dass NF546 über andere Rezeptoren eine cAMP-Ausschüttung hervorruft, wurde die cAMP-Ausschüttung auch an Wildtyp-Zellen vermessen. Hier wurde durch NF546 keine vom Puffer verschiedene cAMP-Antwort ausgelöst (willkürliche Lumineszenzeinheiten: NF546: 38,8 ± 9,0; Puffer: 44,7 ± 7,5;).

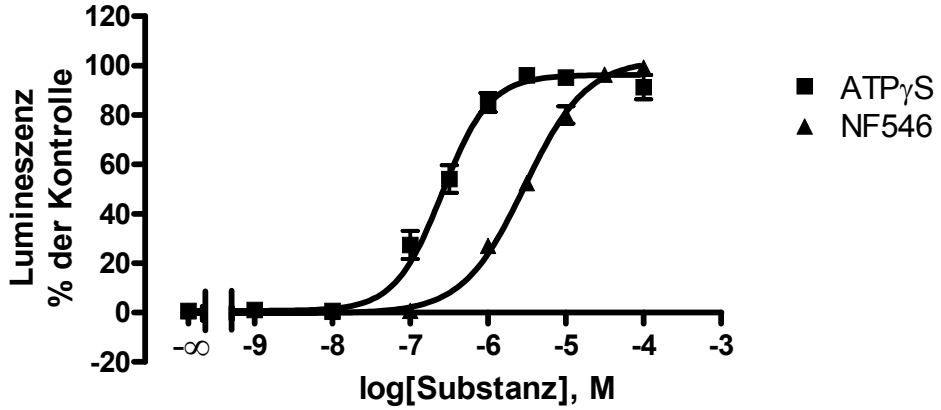


Abb. 4.46 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 (n = 5) und ATPγS (n = 12) im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit NF546 bzw. ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

In Abb. 4.46 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 im Vergleich zum Standardagonisten ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen dargestellt. Für NF546 liegt der pEC_{50}-Wert bei 5,53 ± 0,03 (n = 5; EC_{50}: 2,95 µM) und für ATPγS bei 6,59 ± 0,04 (n = 12; EC_{50}: 257 nM). Das Verhältnis der EC_{50}-Werte (NF546:ATPγS) liegt mit 11,5 in der gleichen Größenordnung wie im Calcium-Assay (9,8).

4.5.2.4 Schild-Analyse von NF157 und NF340 unter Verwendung des Agonisten NF546

Um das Bindungsverhalten von NF546 am $P2Y_{11}$-Rezeptor im Vergleich zu ATPγS, NF157 und NF340 genauer zu untersuchen, wurden zwei Analysen nach Schild durchgeführt. Dabei wurde NF546 als Agonist eingesetzt. Es wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF157 bzw. NF340 aufgenommen. Die Rechtsverschiebung der Kurven ist in Abb. 4.47 dargestellt, die entsprechenden pEC_{50}-Werte von NF546 in Tab. 4.22 und Tab. 4.23 und die daraus resultierenden Analysen nach Schild in Abb. 4.48.

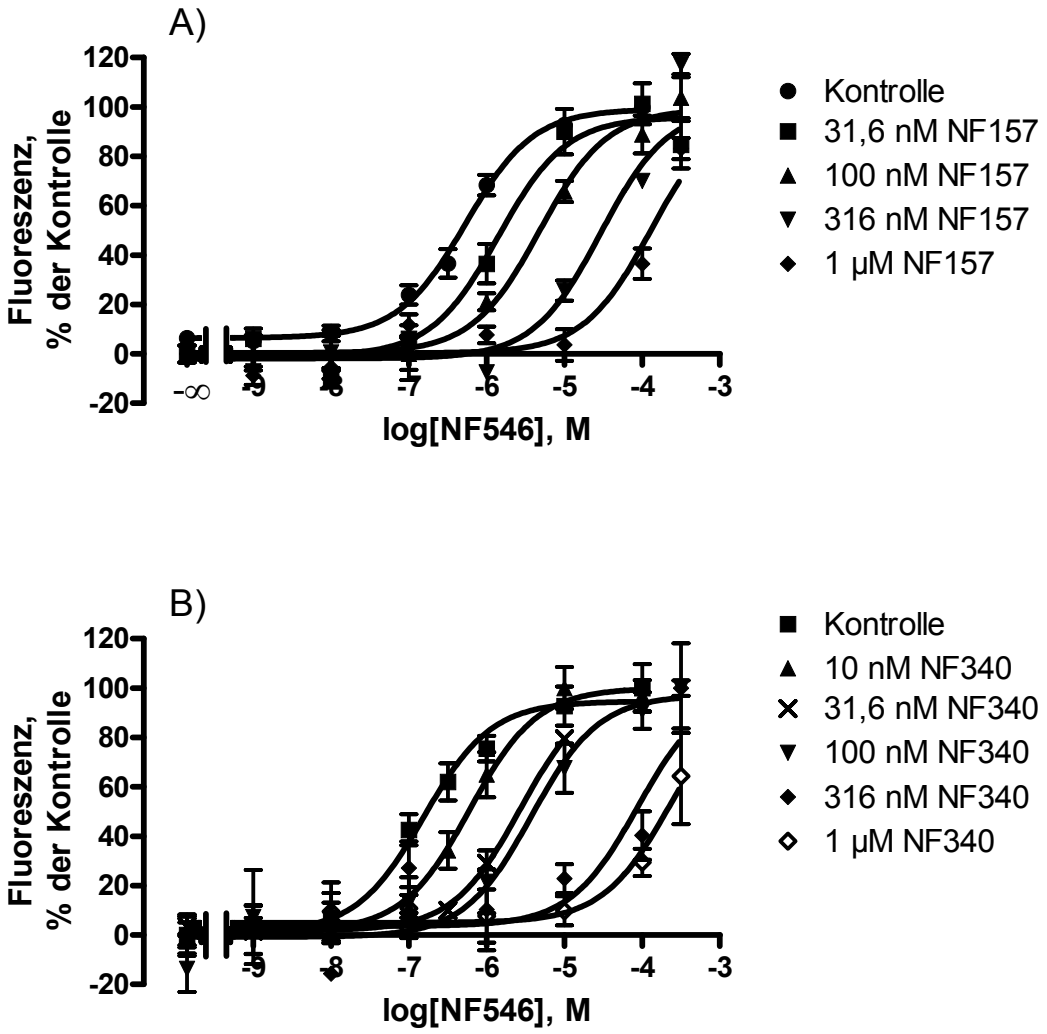


Abb. 4.47 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. NF546 wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von A) NF157 und B) NF340 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus jeweils einem repräsentativen Experiment, ausgesucht aus vier unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit NF546 maximal erreichten Antwort.

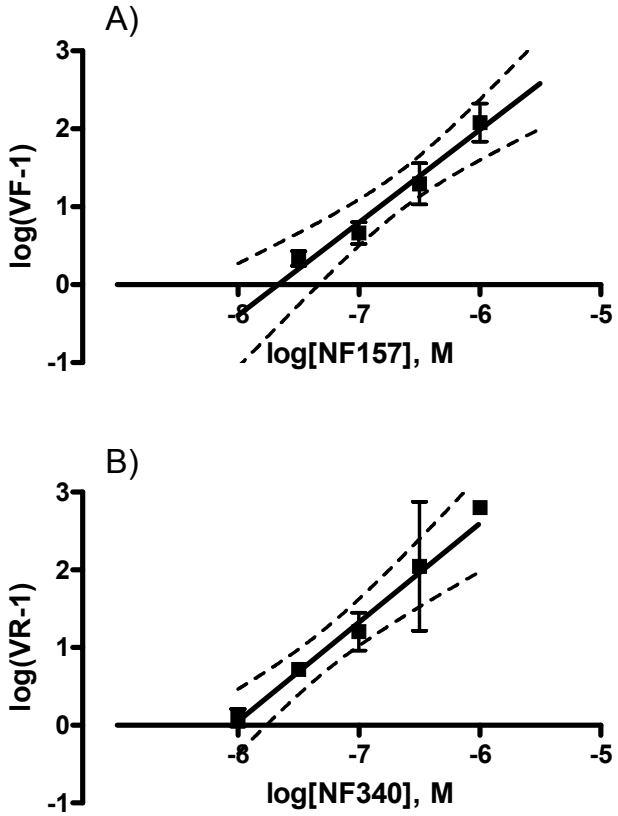


Abb. 4.48 Funktionelle Analysen des antagonistischen Effekts von A) NF157 und B) NF340 an der Zelllinie 1321N1-P2Y$_{11}$GU (Schild-Analyse). Für die Analysen wurde die durch A) NF157 und B) NF340 vermittelte Inhibition der NF546-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Die pA_2-Werte wurden mit A) 7,67 ± 0,29 für NF157 und B) 8,04 ± 0,25 für NF340 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigungen sind jeweils nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.22 Einfluss von NF157 auf die pEC_{50} von NF546 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF157 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 31,6 nM NF157	+ 100 nM NF157	+ 316 nM NF157	+ 1 µM NF157
pEC_{50}	5,60 ± 0,17	5,23 ± 0,22	4,94 ± 0,20	4,13 ± 0,31	3,37 ± 0,30
n	3	3	3	3	3

Tab. 4.23 Einfluss von NF340 auf die pEC_{50} von NF546 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 10 nM NF340	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 316 nM NF340	+ 1 µM NF340
pEC_{50}	6,50 ± 0,16	6,18 ± 0,02	5,80 ± 0,03	5,10 ± 0,09	4,55 ± 0,81	3,64 ± 0,50
n	3	3	3	4	2	2

Die beiden Analysen nach Schild ergeben Geraden, deren Steigungen nicht signifikant verschieden von eins sind (NF546/NF157: 1,19 ± 0,20; NF546/NF340: 1,27 ± 0,20). Demnach kann für NF157 und NF340 im Zusammenhang mit NF546 ein kompetitiver Mechanismus angenommen werden. Bei NF157 ergibt sich ein pA_2-Wert von 7,67, der im gleichen Bereich liegt wie der mit ATPγS bestimmte pA_2-Wert (7,77; vgl. Abb. 4.20). Auch der pA_2-Wert von NF340 mit NF546 fällt mit 8,04 mit dem pA_2-Wert zusammen, der mit ATPγS bestimmt wurde (8,02; vgl. Abb. 4.32). Auch fällt auf, dass der pEC_{50}-Wert von NF546 alleine (Kontrolle) in Tab. 4.22 und Tab. 4.23 stark von einander abweichen (5,60 ± 0,17 gegenüber 6,50 ± 0,16), obwohl beide Werte an der gleichen Zelllinie (1321N1-$P2Y_{11}$GU) erhoben wurden. Diese Werte stellen jeweils den Mittelwert aus drei Versuchen dar, die unabhängig von einander und zu verschiedenen Zeipunkten durchgeführt wurden. Wenn diese Werte zusammen mit pEC_{50}-Werten aus weiteren Versuchen gemittelt wurden (Gesamtanzahl der Experimente n = 12), ergab sich ein pEC_{50}-Wert von 6,27 ± 0,07 (vgl. Abb. 4.44).

Der Hillslope von NF546 ist auch im cAMP-Reportergen-Assay nicht signifikant verschieden von eins (1,09 ± 0,08; vgl. Abb. 4.46). Deshalb wurde auch im cAMP-Reportergen-Assay eine Analyse nach Schild durchgeführt. Dazu wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 Konzentrations-Effekt-Kurven für NF546 aufgenommen. In Abb. 4.49 ist die Rechtsverschiebung der Kurven dargestellt, in Tab. 4.24 und in Abb. 4.50 die daraus resultierende Analyse nach Schild.

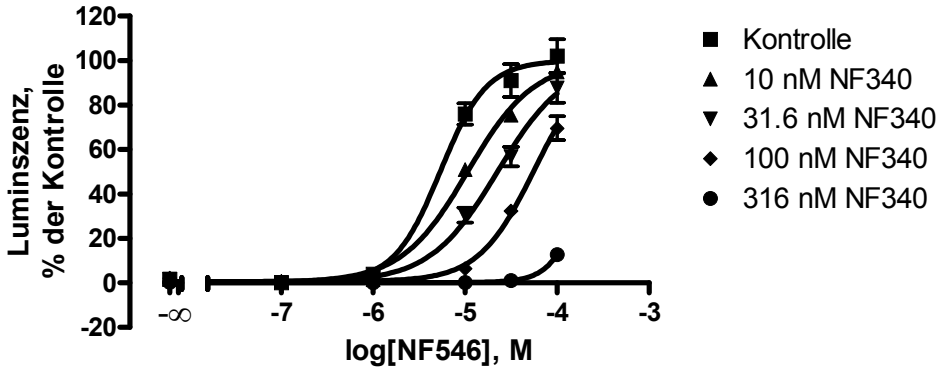


Abb. 4.49 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im cAMP-Reportergen-Assay. NF546 wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment, ausgesucht aus vier unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit NF546 maximal erreichten Antwort.

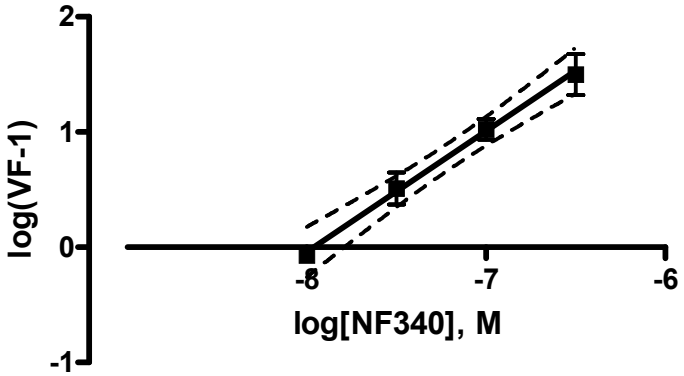


Abb. 4.50 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF340 an der Zelllinie 1321N1-$P2Y_{11}$GU (Schild-Analyse). Für die Analysen wurde die durch NF340 vermittelte Inhibition der NF546-induzierten Erhöhung der intrazellulären [cAMP] gemessen. Der pA_2-Wert wurde mit 7,96 ± 0,13 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.24 Einfluss von NF340 auf die pEC_{50} der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im cAMP-Reportergen-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

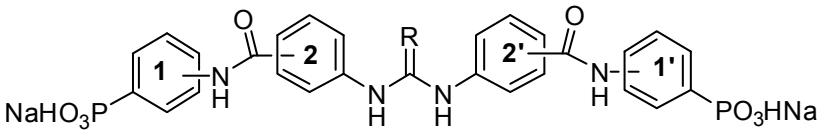
	Kontrolle	+ 10 nM NF340	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 316 nM NF340
pEC_{50}	5,40 ± 0,17	5,13 ± 0,20	4,77 ± 0,33	4,31 ± 0,06	3,85 ± 0,10
n	2	2	2	4	2

Im cAMP-Reportergen-Assay wurde für NF340 gegenüber NF546 ein pA_2-Wert von 7,96 bestimmt. Dieser Wert bestätigt die beiden anderen Analysen für NF340 in Kapitel 4.5.2.4 und 4.3.5.2). Die Steigung ist auch hier nicht signifikant verschieden von eins (1,05 ± 0,10). Somit kann auch aus den Ergebnissen des cAMP-Reportergen-Assays ein kompetitiver Mechanismus für die Wechselwirkung von NF340 als Antagonist und NF546 als Agonist angenommen werden.

4.5.3 NF709

4.5.3.1 Testung von aromatischen Phosphonsäuren im Calcium-Assay

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit aromatische Phosphonsäuren aus dem Substanzkatalog von Prof. Nickel/ Prof. Kassack getestet. Die Strukturformeln der verwendeten Substanzen sind in Abb. 4.51 wiedergegeben.



Substanz	Verknüpfung an Ring 1 und 1’	Verknüpfung an Ring 2 und 2’	Harnstoff mit R=
NF067=NF710	para	meta	O
NF068=NF708	meta	meta	O
NF069=NF709	meta	para	O
NF070=NF681	para	para	O
NF159	meta	meta	S
NF162	para	para	S

Abb. 4.51 Strukturformeln der aromatischen Phosphonsäuren.

Zunächst wurden die Substanzen in einem Grob-Screening auf ihre Aktivität am $P2Y_{11}$-Rezeptor hin überprüft. In Tab. 4.25 ist die Testung auf Agonismus und in Tab. 4.26 die Testung auf Antogonismus dargestellt. Bei der Testung auf Agonismus riefen NF068 und NF070 leichte Anstiege der Fluoreszenz-Signale hervor (22,6 % bzw. 14,6 % der Kontrolle), die jedoch noch im Bereich der Signale des Puffers lagen (vgl. Tab. 4.25). NF069 erreichte dagegen ca. 50 % der durch ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort. Dieser Befund wurde näher untersucht. Bei der Testung auf Antagonismus zeigte einzig NF069 eine Hemmung von mehr als 35 % hervor (87 % der Kontrolle). Da von NF069 nur noch geringe Vorräte vorhanden waren, wurde für die weiteren Untersuchungen eine neue Synthesecharge unter der Bezeichnung NF709 verwendet.

Tab. 4.25 Agonistische Aktivität von aromatischen Phosphonsäure-Derivaten am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay. Die Ergebnisse sind angegeben als „% der Kontrolle“, wobei die Kontrolle den von 1 µM ATPγS hervorgerufenen Effekt darstellt.

Substanz	% der Kontrolle ± SD
NF067	0,0 ± 3,9
NF068	22,6 ± 3,1
NF069	50,9 ± 0,2
NF070	14,6 ± 2,4
NF159	0,0 ± 2,9
NF162	0,0 ± 3,6
Puffer	9,9 ± 3,4

Tab. 4.26 Inhibitorische Potenz der benzylischen Phosphonsäure-Derivaten bei 10 µM im Calcium-Assay, gemessen an $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, jeweils rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Ergebnisse sind als % Hemmung ± SD dargestellt.

Substanz	% Hemmung ± SD
NF067	0,0 ± 1,9
NF068	14,5 ± 0,7
NF069	87,0 ± 5,8
NF070	0,0 ± 5,3
NF159	4,3 ± 1,7
NF162	0,0 ± 1,9

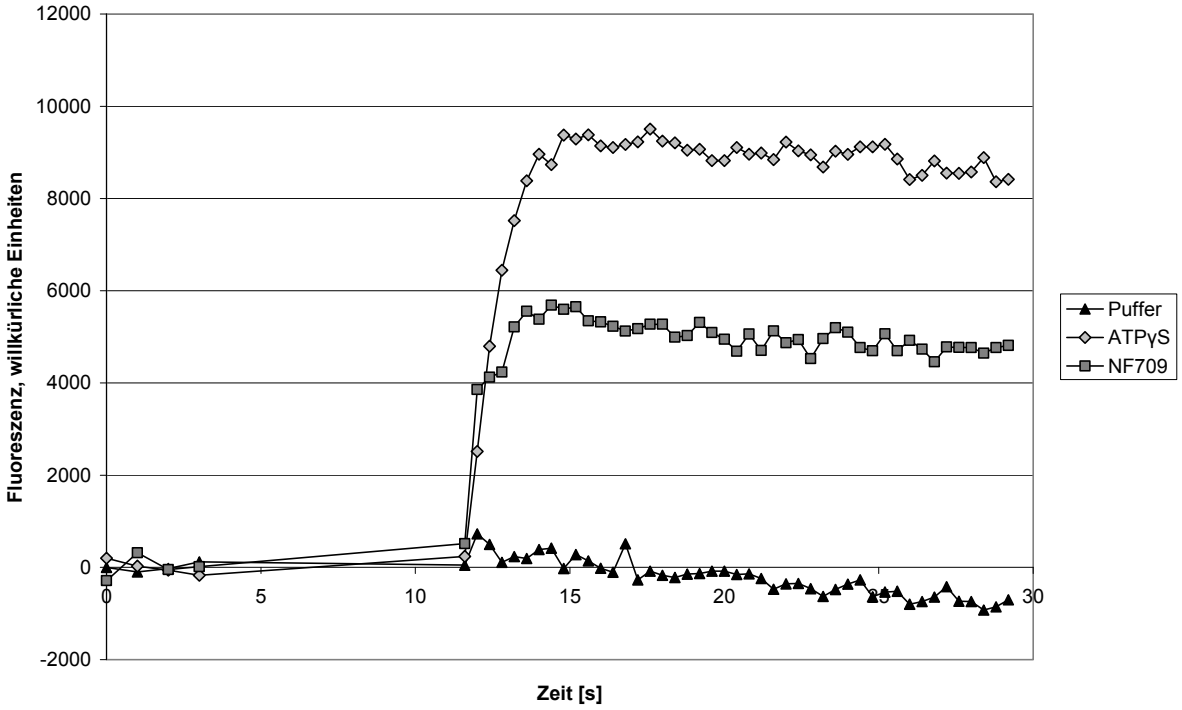


Abb. 4.52 Zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz nach Injektion von 10 µM ATPγS, 10 µM NF709 oder Puffer. Dargestellt sind die aus je drei Replikaten gebildeten Durchschnittskurven. Die Injektion der Substanzen erfolgte nach 11,6 s.

Nach Injektion von NF709 wurde eine Fluoreszenz-Zeitkurve aufgenommen und mit denen von ATPγS und Puffer verglichen. In Abb. 4.52 ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf bei NF709 dem bei ATPγS sehr ähnlich ist. Die Höhe des Fluoreszenz-Signals und damit die Calcium-Konzentration in der Zelle ist bei NF709 jedoch signifikant niedriger als bei ATPγS. NF709 scheint demnach kein Voll-Agonist zu sein. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven für NF709 im Vergleich zu ATPγS aufgenommen. Die Auswertung erfolgte analog zu Kapitel 4.5.1.1. Es wurden nur Versuche ausgewertet, bei denen gleichzeitig NF709 und ATPγS untersucht wurden (vgl. Abb. 4.53).

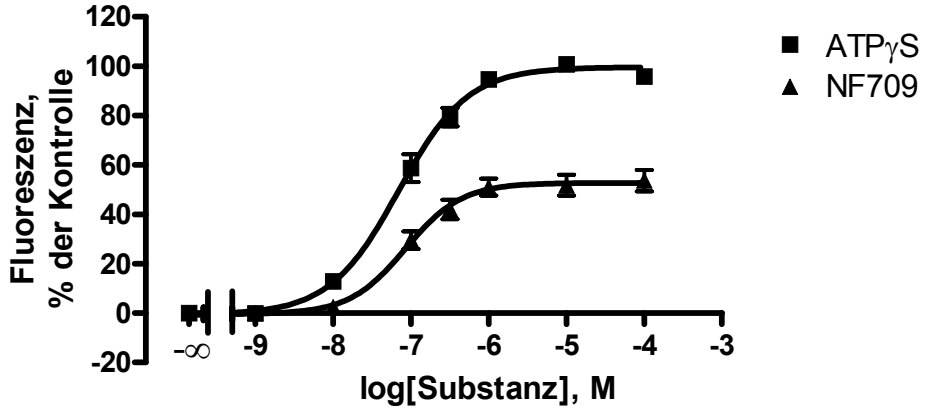


Abb. 4.53 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS und NF709 (je n = 7) im Calcium-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort dar. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

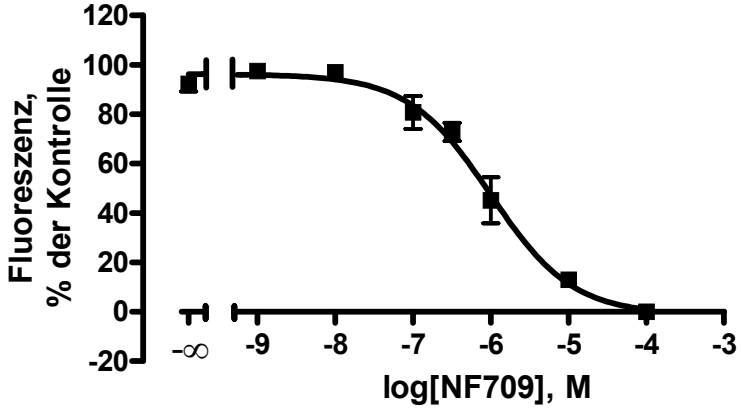


Abb. 4.54 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF709 (n = 5) als Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor, stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort dar. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

Für NF709 wurde ein pEC_{50}-Wert von 7,07 ± 0,09 (n = 5; EC_{50}: 85,2 nM) bestimmt, der damit in derselben Größenordnung wie der pEC_{50}-Wert von ATPγS (7,26 ± 0,03; 55,5 nM) liegt. In Abb. 4.53 wird der Unterschied in der intrinsischen Aktivität der beiden Substanzen am $P2Y_{11}$-Rezeptor deutlich. NF709 erreichte nur 52,7 ± 2,2 % der durch ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort in 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen. Der Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1. Zudem wurde eine Inhibitionskurve

für NF709 im Calcium-Assay aufgenommen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von NF709 auf 1321N1-P2Y$_{11}$-Zellen für 30 min vorinkubiert. Dann wurde durch Injektion von 1 µM ATPγS das Ausmaß der durch NF709 hervorgerufenen Inhibition bestimmt. Die Konzentrations-Inhibitions-Kurve ist in Abb. 4.54 dargestellt. Es konnte ein apparenter funktioneller pK_i-Wert von 7,02 ± 0,12 (n = 5; K_i: 95,1 nM) berechnet werden. Die Ergebnisse deuten auf ein partialagonistisches Verhalten von NF709 hin.

Es wurden weitere Studien durchgeführt, um auszuschließen, dass der Effekt von NF709 ein Artefakt des Messsystems darstellt. Dazu wurde 10 µM NF709 an 1321N1-Wildtyp-Zellen getestet. Hier konnte kein signifikant verschiedenes Signal im Vergleich zur reinen Puffer-Injektion gemessen werden (willkürliche Fluoreszenz-Einheiten: NF709: 494 ± 371; Puffer: 802 ± 869). Außerdem wurde untersucht, ob das Signal mit Hilfe des Antagonisten NF340 in 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen blockiert werden kann. Dazu wurde NF340 zunächst eine halbe Stunde auf den Zellen vorinkubiert. Dann wurde im NOVOstar® NF709 auf die Zellen pipettiert und das resultierende Fluoreszenz-Signal detektiert (Abb. 4.55). Wie bei ATPγS kann auch bei NF709 das Calcium-Signal durch den Antagonisten NF340 am P2Y$_{11}$-Rezeptor blockiert werden. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzzunahme durch NF709 auf Grund einer Aktivierung des P2Y$_{11}$-Rezeptors zustande kommt.

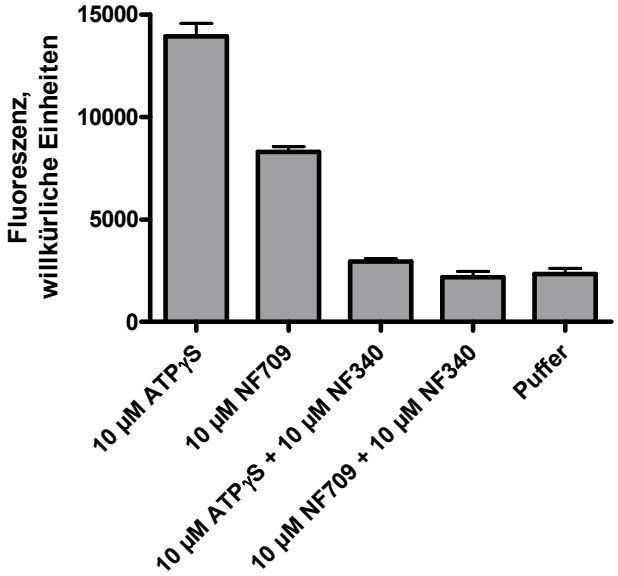


Abb. 4.55 Effekt von ATPγS und NF709 mit bzw. ohne Vorinkubation von NF340 auf die Fluoreszenz im Calcium-Assay an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

Anders als die Agonisten NF546 und NF145 zeigte NF709 eine Temperaturabhängigkeit des Calcium-Signals (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde der Einfluss der Temperatur auf das Calcium-Signal von NF709 im Vergleich zu ATPγS untersucht. Dazu wurde die Heizeinheit des NOVOstar® jeweils auf die entsprechende Temperatur eingestellt und die Zellen mindestens 10 min bei dieser Temperatur inkubiert, bevor die Substanzen zu den Zellen pipettiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.56 dargestellt.

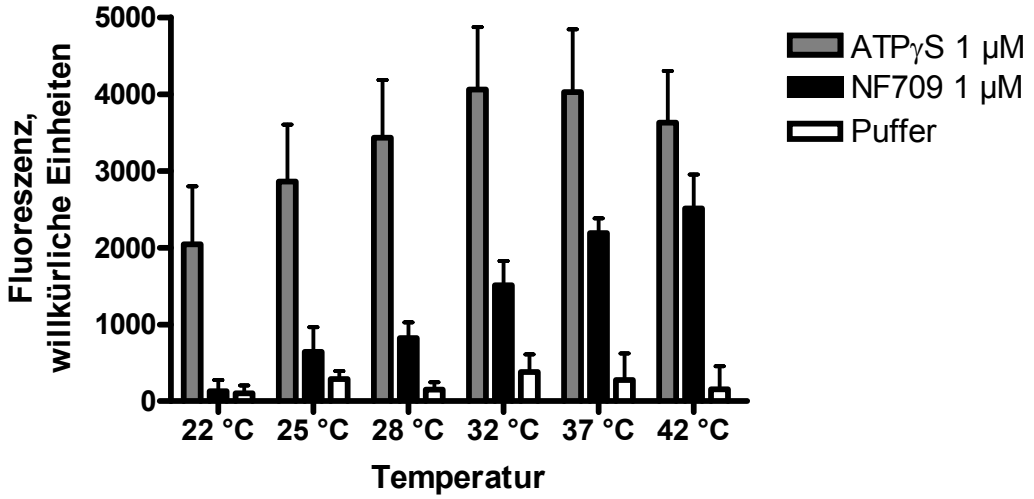


Abb. 4.56 Einfluss der Temperatur auf die Calcium-Freisetzung durch NF709 und ATPγS.

Es zeigte sich, dass bei niedrigen Temperaturen nahe der Raumtemperatur (22 °C, 25 °C) durch 1 µM NF709 im Gegensatz zu ATPγS keine Calcium-Antwort ausgelöst wurde, die signifikant verschieden von der Puffer-Kontrolle war. Mit steigender Temperatur wurde sowohl bei ATPγS als auch bei NF709 ein Anstieg der Intensität des Fluoreszenz-Signals beobachtet. Bis zu einer Temperatur von 37 °C sind die Signale von ATPγS und NF709 signifikant verschieden, wobei das NF709-Signal bei Temperaturen unter 37 °C weniger als 50 % des ATPγS-Signals ausmacht. Erst bei 37 °C erreicht das Signal von NF709 54 % des ATPγS-Signals. Bei 42 °C sind die beiden Signale nicht mehr signifikant verschieden.

4.5.3.2 Selektivitätstestung von NF709 an anderen P2Y-Rezeptoren

NF709 wurde auch an den anderen vorliegenden P2Y-Rezeptoren auf Agonismus und Antagonismus getestet, um die Selektivität der Substanz zu überprüfen. Die Ergebnisse der Testung auf Agonismus sind in Tab. 4.27 dargestellt, die der Testung auf Antagonismus in Tab. 4.28. Die Testung wurde an $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, und $P2Y_6$-Rezeptoren im Calcium-Assay im Vergleich zu den jeweiligen Standardagonisten durchgeführt (vgl. Tab. 3.16). Die Testung an $P2Y_{12}$-Rezeptoren wurde mit Hilfe des cAMP-Reportergen-Assays durchgeführt.

Tab. 4.27 Agonistische Aktivität von 10 µM NF709 an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1, 2, 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% der Kontrolle“, wobei die Kontrolle den durch eine fixe Konzentration des Standardagonisten des jeweiligen Rezeptors hervorgerufenen Effekt darstellt (vgl. Tab. 3.16).

Rezeptor	% der Kontrolle ± SD
$P2Y_1$	0,0 ± 7,9
$P2Y_2$	13,1 ± 9,0
$P2Y_4$	0,0 ± 5,3
$P2Y_6$	21,7 ± 8,4
$P2Y_{12}$	0,0 ± 16,3

Tab. 4.28 Inhibitorische Potenz von 10 µM NF709 bei an verschiedenen P2Y-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen im Calcium-Assay ($P2Y_{1, 2, 4}$ und $_6$) bzw. im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$). Die Ergebnisse sind angegeben als „% Hemmung“ des Effekts einer fixen Konzentration des Standardagonisten des jeweiligen Rezeptors (vgl. Tab. 3.16).

Rezeptor	% Hemmung ± SD
$P2Y_1$	0,0 ± 1,5
$P2Y_2$	17,7 ± 5,6
$P2Y_4$	0,0 ± 5,2
$P2Y_6$	0,0 ± 8,4
$P2Y_{12}$	13,6 ± 4,9

NF709 zeigte an allen Rezeptoren eine Aktivierung von deutlich unter 35 % der jeweiligen Kontrollantwort. Nur am $P2Y_2$-und am $P2Y_6$-Rezeptor konnte eine

Aktivierung von > 10 % der durch 1 µM UTP bzw. UDP hervorgerufenen Kontrollantwort gemessen werden. Bei 1 µM NF709 wurde an keinem Rezeptor eine von Puffer signifikant verschiedene Antwort detektiert. Auch bei der Prüfung auf Antagonismus konnte bei keinem Rezeptor eine Hemmung von > 35 % gefunden werden. Dies bedeutet, dass sowohl die IC_{50} als auch die EC_{50} von NF709 an den überprüften P2Y-Rezeptoren außer beim $P2Y_{11}$-Rezeptor bei > 10 µM liegt.

4.5.3.3 Testung von NF709 im cAMP-Reportergen-Assay

Die Aktivität von NF709 am $P2Y_{11}$-Rezeptor wurde auch mit Hilfe des cAMP-Reportergen-Assay untersucht. Es wurden steigende Konzentrationen von NF709 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen getestet. Um auch hier auszuschließen, dass NF709 über andere Rezeptoren eine cAMP-Ausschüttung hervorruft, wurde die cAMP-Ausschüttung auch an Wildtyp-Zellen vermessen. An 1321N1-WT-Zellen zeigte NF709 keine signifikant von der Kontrolle verschiedene cAMP-Antwort (NF709: 41,9 ± 2,6; Kontrolle: 44,7 ± 7,5; jeweils in willkürlichen Lumineszenzeinheiten).

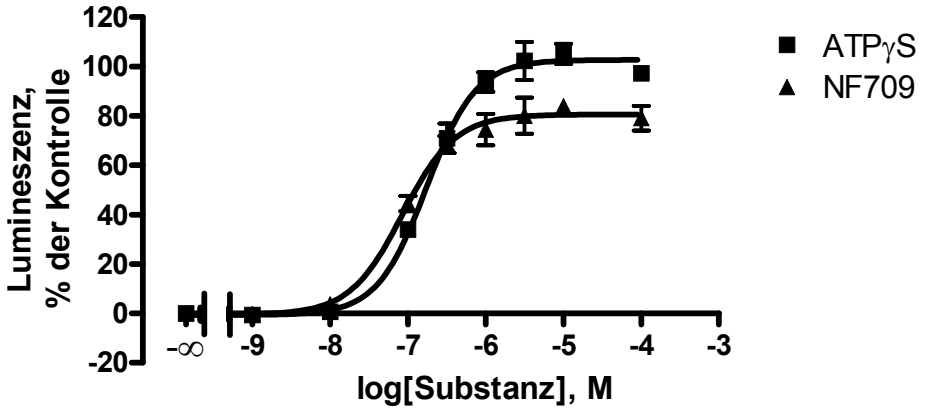


Abb. 4.57 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 (n = 5) und ATPγS (n = 5) im cAMP-Reportergen-Assay am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 im Vergleich zu ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen sind in Abb. 4.57 dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen den partialagonistischen Charakter von NF709. Im cAMP-Reportergen-Assay ist er jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im Calcium-Assay. NF709 erreicht 80,5 ± 2,0 %

der intrinsischen Aktivität des Standardagonisten ATPγS. Die oberen Plateaus sind in den fünf Versuchen, in denen ATPγS und NF709 gleichzeitig getestet wurden, signifikant verschieden. Für NF709 wurde ein pEC_{50}-Wert von 7,07 ± 0,06 (n = 5; EC_{50}: 84,8 nM) bestimmt, der damit hier in der gleichen Größenordnung liegt wie im Calcium-Assay (vgl. Abb. 4.53; pEC_{50}: 7,07 ± 0,09, pEC_{50}: 85,2 nM).

4.5.3.4 Schild-Analyse von NF340 unter Verwendung des Agonisten NF709

Um das Bindungsverhalten von NF709 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber NF340 genauer zu untersuchen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 als Antagonist aufgenommen (Abb. 4.58).

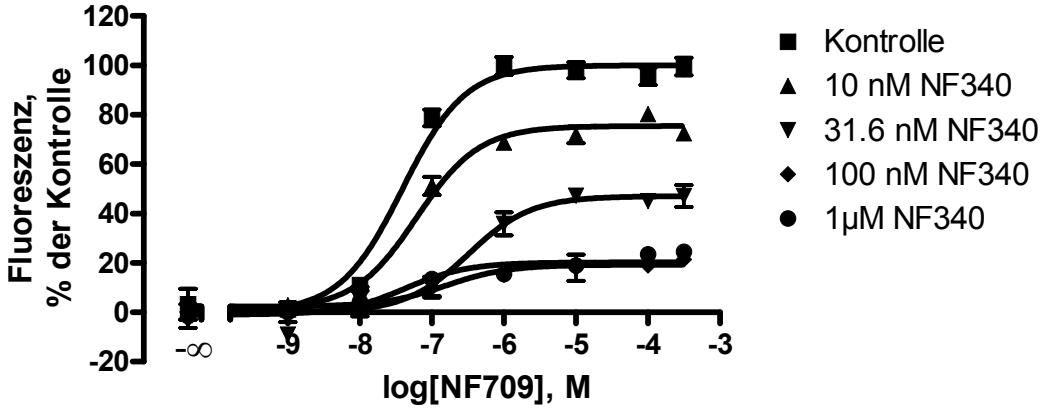


Abb. 4.58 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. NF709 wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment, ausgesucht aus fünf unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle" ist hier der prozentualen Anteil der durch Stimulation mit NF709 maximal erreichten Antwort.

Genau wie bei der Analyse nach Schild von NF157 mit NF145 ist bei steigenden Konzentrationen von NF340 deutlich eine Abnahme der intrinsischen Aktivität von NF709 zu erkennen. Nach den Vorgaben von Schild darf hier keine Auswertung erfolgen (Arunlakshana and Schild, 1959; Schild, 1957). In Tab. 4.29 sind die relativen Maximalwerte der intrinsischen Aktivität (E_{max}) sowie die EC_{50}-Werte in Anwesenheit von NF340 (gemittelt aus mehreren Versuchen) dargestellt. Das 95 %-

Konfidenzintervall des Hillslopes schloss in allen Fällen die 1 mit ein. Daher wurde bei der Auswertung der Kurven der Hillslope konstant auf eins gesetzt.

Bei NF145 (siehe Kapitel 4.5.1.4) konnte eine Rechtsverschiebung der agonistischen Kurven von NF145 in Anwesenheit steigender Konzentrationen NF157 detektiert werden, daher wurde für NF145 dennoch eine Analyse nach Schild durchgeführt. Bei NF709 dagegen kann keine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven gemessen werden. Deshalb wurde eine Analyse nach Schild für NF709 gegenüber NF340 im Calcium-Assay nicht durchgeführt. Stattdessen wurden die relativen Werte der maximalen Aktivität mit der Konzentration des Antagonisten in Bezug gesetzt. Der Wendepunkt des entsprechenden Graphen (Abb. 4.59) liegt bei 7,76 ± 0,11 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration in M) und damit in derselben Größenordnung wie der pK_i-Wert von NF340 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen (7,71 ± 0,04, vgl. Abb. 4.27).

Tab. 4.29 Einfluss von NF340 auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

NF709	+ Puffer (Kontrolle)	+ 10 nM NF340	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 1 µM NF340
pEC_{50}	7,20 ± 0,20	7,02 ± 0,15	6,51 ± 0,39	6,54 ± 0,59	6,74 ± 0,64
E_{max}	100 ± 3%	76 ± 8 %	42 ± 15 %	23 ± 7 %	21 ± 12 %
n	5	5	3	4	2

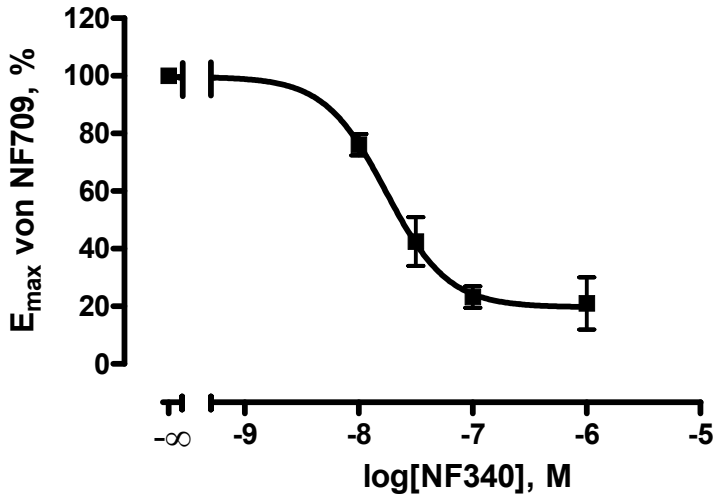


Abb. 4.59 Konzentrationsabhängiger Einfluss von NF340 auf die maximale intrinsische Aktivität (E_{max}) von NF709 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

Durch die unterschiedliche intrinsische Aktivität von NF709 gegenüber dem Vollagonisten ATPγS im Calcium-Assay und im cAMP-Reportergen-Assay (vgl. Abb. 4.53 und Abb. 4.57), liegt die Vermutung nahe, dass NF709 ein Partialagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor ist. Da laut der Definition nach T. Kenakin ein Partialagonist gegenüber Agonisten mit höherer intrinsischer Aktivität ein kompetitives Verhalten aufweisen muss, wenn dieser an die gleiche Bindungsstelle bindet (Kenakin, 1997), wurde mit ATPγS als Agonist und NF709 als Antagonist eine Analyse nach Schild durchgeführt (vgl. Abb. 4.60). Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF709 aufgenommen (Abb. 4.60). Die Ergebnisse sind in Tab. 4.30 dargestellt. Auch hier ist deutlich die Abnahme der intrinsischen Aktivität von ATPγS bei steigenden Konzentrationen von NF709 zu erkennen. Nach den Vorgaben von Schild darf hier keine Auswertung erfolgen (Arunlakshana and Schild, 1959; Schild, 1957). Anstelle dieser Auswertung wurden die relativen Werte der maximalen Aktivität mit der Konzentration des Antagonisten in Bezug gesetzt. Der Wendepunkt des entsprechenden Graphen (Abb. 4.61) liegt bei 7,27 ± 0,21 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration in M) und damit in derselben Größenordnung wie der pEC_{50}-Wert von NF709 (vgl. Abb. 4.53; pEC_{50}: 7,07 ± 0,09). Wenn mit den Daten aus Tab. 4.30 entgegen den Vorgaben, eine Analyse nach Schild durchgeführt wurde, konnte ein pA_2-Wert von 7,28 ± 0,81 ermittelt werden, wobei die Steigung der Ausgleichsgeraden bei 0,820 ± 0,243 liegt (Abb. nicht gezeigt).

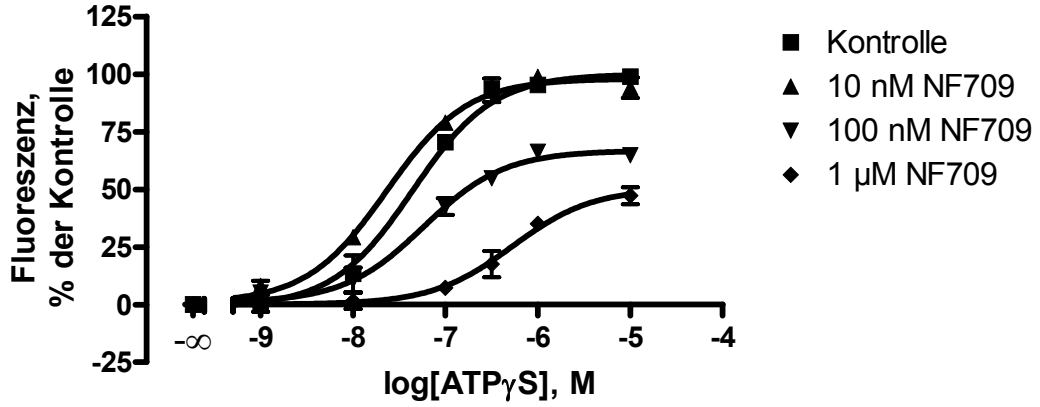


Abb. 4.60 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay. ATPγS wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF709 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einem Experiment, ausgesucht aus drei unabhängigen Experimenten. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort dar.

Tab. 4.30 Einfluss von NF709 auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

ATPγS	+ Puffer (Kontrolle)	+ 10 nM NF709	+ 100 nM NF709	+ 1 µM NF709
pEC_{50}	7,30 ± 0,08	7,36 ± 0,39	7,00 ± 0,43	6,24 ± 0,22
E_{max}	100 ± 1%	94 ± 3 %	64 ± 8 %	54 ± 9 %
n	3	3	3	3

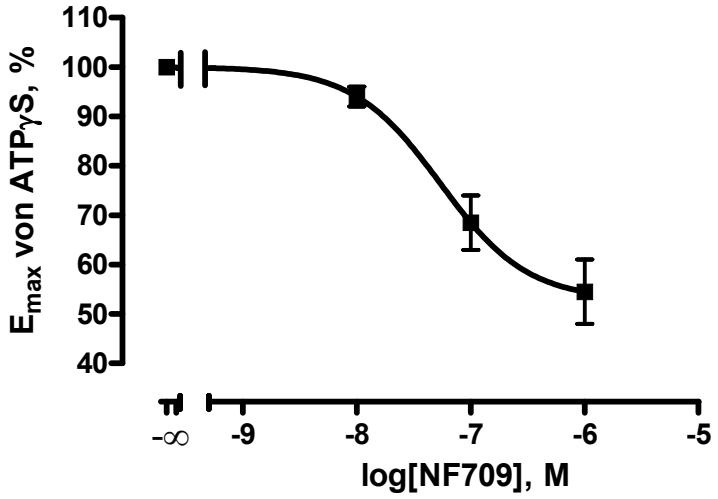


Abb. 4.61 Konzentrationsabhängiger Einfluss von NF709 auf die maximale intrinsische Aktivität (E_{max}) von ATPγS an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im Calcium-Assay.

Die in Abb. 4.61 gezeigte Kurve liefert zwar den angegebenen Wendepunkt (s.o.), jedoch kann aus diesen Daten nicht erkannt werden, ob der Wert bei 10^{-6} M (1 µM) tatsächlich das untere Plateau der Kurve repräsentiert.

Auch im cAMP-Reportergen-Assay wurden Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 aufgenommen. Dabei wurde, wie im Calcium-Assay, eine Abnahme der intrinsischen Aktivität bei Vorinkubation der Zellen mit NF340 detektiert (Abb. 4.62 und Tab. 4.31). Diese Abnahme ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im Calcium-Assay, bei dem die intrinsische Aktivität bei einer Konzentration von 1 µM NF340 auf 21 % reduziert wurde. Im cAMP-Reportergen-Assay wurde das obere Plateau bei 1 µM NF340 auf 65 % der maximalen Antwort reduziert. Gleichzeitig ist eine Rechtsverschiebung der Kurven deutlich erkennbar (vgl. Tab. 4.31).

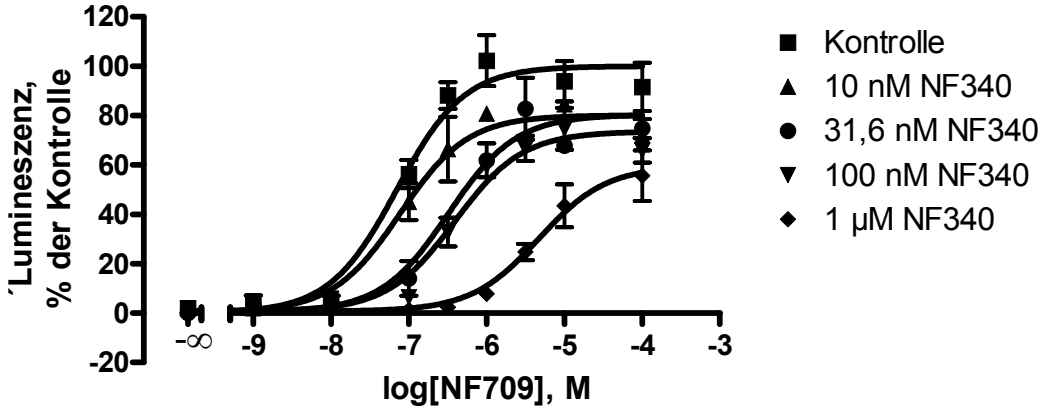


Abb. 4.62 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im cAMP-Reportergen-Assay. NF709 wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 getestet. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus einem repräsentativen Experiment, ausgesucht aus vier unabhängigen Experimenten.

Tab. 4.31 Einfluss von NF340 auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 an 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im cAMP-Reportergen-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 10 nM NF340	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 1 µM NF340
pEC_{50}	7,09 ± 0,17	6,98 ± 0,14	6,55 ± 0,18	6,17 ± 0,17	5,38 ± 0,07
E_{max}	100 ± 4%	91 ± 16 %	94 ± 9 %	79 ± 9 %	64 ± 8 %
n	4	3	3	4	4

Da sich das obere Plateau absenkt, dürfte hier eine Analyse nach Schild nicht durchgeführt werden (Arunlakshana and Schild, 1959; Schild, 1957). Wurden dennoch die Verschiebungsfaktoren der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF709 gegen die eingesetzte Konzentration von NF340 aufgetragen, ergibt sich für NF340 ein pA_2-Wert von 7,56 ± 0,43 der damit im Größenbereich des apparenten pA_2-Wertes für NF340 am P2Y$_{11}$GU-Rezeptor liegt (8,02 ± 0,06, vgl. Abb. 4.32). Die Steigung der Schild-Geraden liegt bei 1,28 ± 0,16. Das 95 %-Konfidenzintervall schließt 1 mit ein. Neben dieser Auswertung wurde auch eine Auswertung durchgeführt, bei der die relativen Werte der maximalen Aktivität gegen die Konzentration des Antagonisten aufgetragen wurden (Abb. 4.64). Wenn das obere Plateau der Kurve auf 100 % und das untere Plateau auf 64 %, den niedrigsten E_{max}-

Wert aus Tab. 4.31 als konstant gesetzt wurde, konnte ein Wendepunkt der Kurve von 7,91 ± 0,34 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration in M) bestimmt werden, der im Bereich des pK_i/pA_2-Wertes von NF340 liegt.

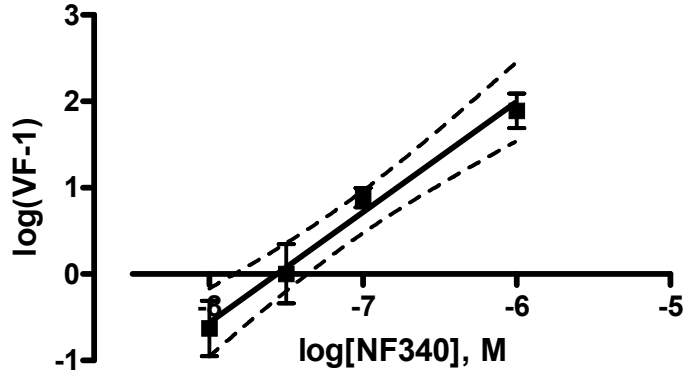


Abb. 4.63 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF340 an der Zelllinie 1321N1-$P2Y_{11}$GU (Schild-Analyse). Für die Analysen wurde die durch NF340 vermittelte Inhibition der NF709-induzierten Erhöhung der intrazellulären [cAMP] gemessen. Der pA_2-Wert wurde mit 7,56 ± 0,22 für NF340 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

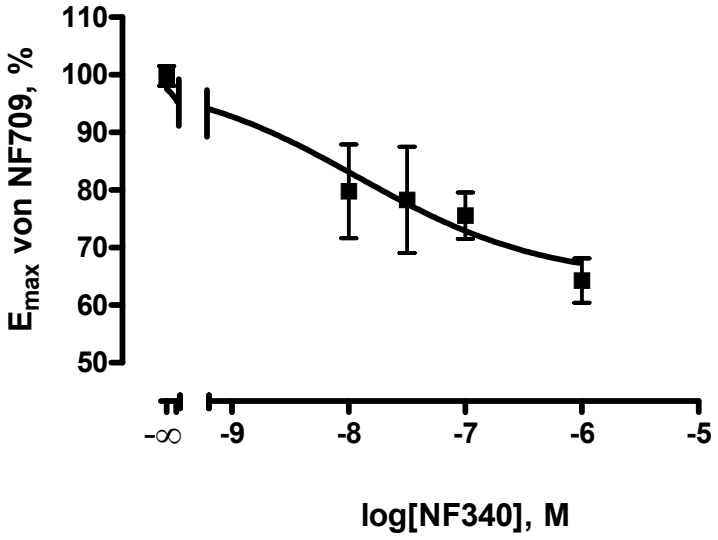


Abb. 4.64 Konzentrationsabhängiger Einfluss von NF340 auf die maximale intrinsische Aktivität (E_{max}) von NF709 an 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im cAMP-Reportergen-Assay.

4.5.4 Marine Naturstoffe

In Kooperation mit der AG Prof. König (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) wurden natürliche sekundäre Metabolite, die aus dem Schwamm *Ianthella quadrangulata* (Fundort: Australien) isoliert wurden (Greve *et al.*, 2007), im Calcium-Assay am $P2Y_{11}$-Rezeptor getestet. Die Strukturformeln der Substanzen 1,2,3 und 4 sind in Abb. 3.5 dargestellt. Auch wurden die Substanzen im Calcium-Assay außerdem an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren getestet, die jeweils rekombinant in 1321N1-Zellen exprimiert waren.

Die vier Naturstoffe wurden in Konzentrationen von 10 µM und teilweise 1 µM an allen drei Rezeptoren auf ihre agonistische Aktivität überprüft. Bei höheren Konzentrationen bewirken die Testsubstanzen einen toxischen Effekt an 1321N1-Zellen (Ca^{2+}-Mobilisation durch Zelllyse). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.65 dargestellt.

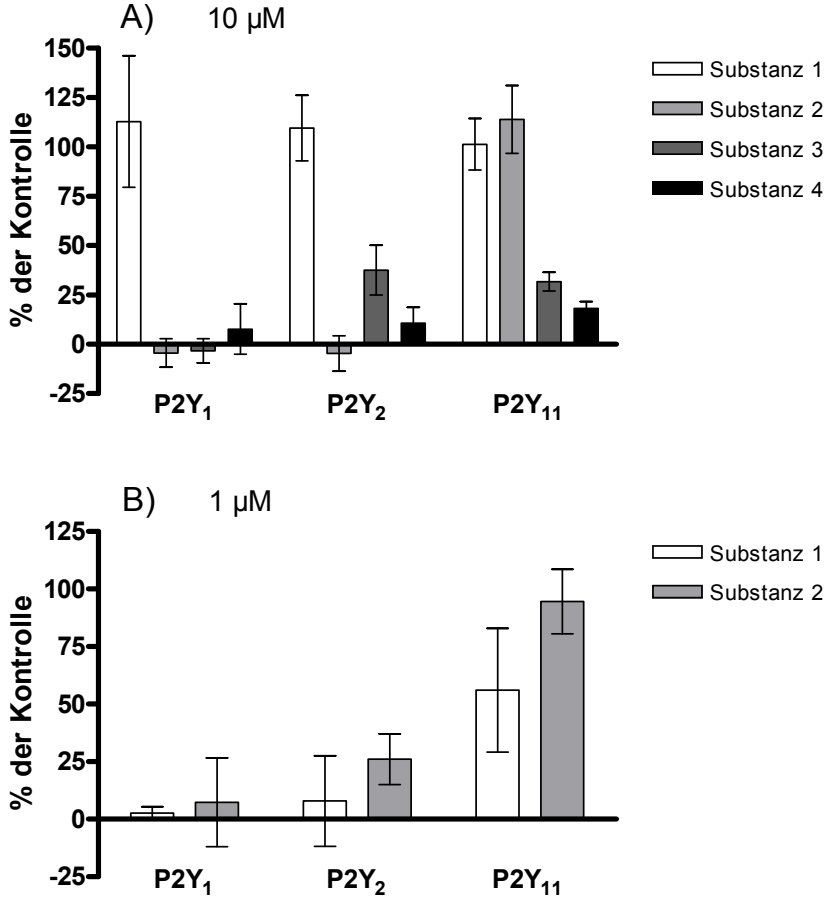


Abb. 4.65 Agonistische Effekte durch A) 10 µM und B) 1 µM der Testsubstanzen, dargestellt als % der Kontrolle (Maximalantwort durch den jeweiligen Standardagonisten), an $P2Y_1$-, $P2Y_2$- und $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD, bestimmt aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Versuchen.

An allen drei untersuchten Rezeptoren zeigten die Substanzen 3 und 4 bei einer Konzentration von 10 µM agonistische Effekte von weniger als 37,5 % der durch den jeweiligen Standardagonisten hervorgerufenen Calcium-Antwort. Substanz 1 zeigte bei dieser Konzentration an allen drei Rezeptoren eine dem jeweiligen Standardagonisten vergleichbare Antwort. Bei einer Konzentration von 1 µM ist dagegen nur am $P2Y_{11}$-Rezeptor eine agonistische Aktivität zu erkennen, während an den anderen beiden Rezeptoren keine Calcium-Antwort mehr detektiert wurde. Substanz 2 bewirkte am $P2Y_{11}$-Rezeptor eine deutliche Erhöhung des Calcium-Spiegels (1 µM: 94,6 %, 10 µM: 113,9 % der ATPγS-Kontrolle), während an $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren nur vernachlässigbare Effekte (< 5,0 %) gemessen wurden. Diese Befunde scheinen auf eine gewisse Selektivität von Substanz 2 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren hinzuweisen.

Um eine unspezifische Reaktion der Zellen auf die Substanzen 1 und 2 auszuschließen, wurden sie auch an 1321N1-Wildtyp-Zellen getestet. Hier zeigte sich bis zu einer Konzentration von 10 µM keine Calcium-Ausschüttung. Dies deutet auf eine spezifische Aktivierung des $P2Y_{11}$-Rezeptors hin.

Um dies zu bestätigen, wurde untersucht, ob die agonistischen Effekte der Substanzen 1 und 2 durch NF340 blockiert werden können. In Abb. 4.66 sind die Calcium-Ausschüttungen nach Injektion der Substanzen im Vergleich zum Standardagonisten ATPγS mit und ohne 30-minütige Vorinkubation von 10 µM NF340 dargestellt.

Der Effekt von 3,16 µM Substanz 1 und von 1 µM Substanz 2 konnte durch die Vorinkubation der Zellen mit 10 µM des Antagonisten NF340 geblockt werden. Dies belegt, dass die Effekte der beiden Testsubstanzen über den $P2Y_{11}$-Rezeptor vermittelt wurden. Um die Potenz der beiden Substanzen am $P2Y_{11}$-Rezeptor zu bestimmen, wurden von beiden Substanzen Konzentrations-Effekt-Kurven aufgenommen (Abb. 4.67). Für Substanz 1 konnte ein pEC_{50}-Wert von 5,89 ± 0,06 bestimmt werden, für Substanz 2 liegt der Wert bei 6,32 ± 0,04. Damit ist 8-Carboxy-iso-iantheran A (Substanz 2) am $P2Y_{11}$-Rezeptor etwa 2,7-fach potenter als das unveränderte Iso-iantheran A (Substanz 1).

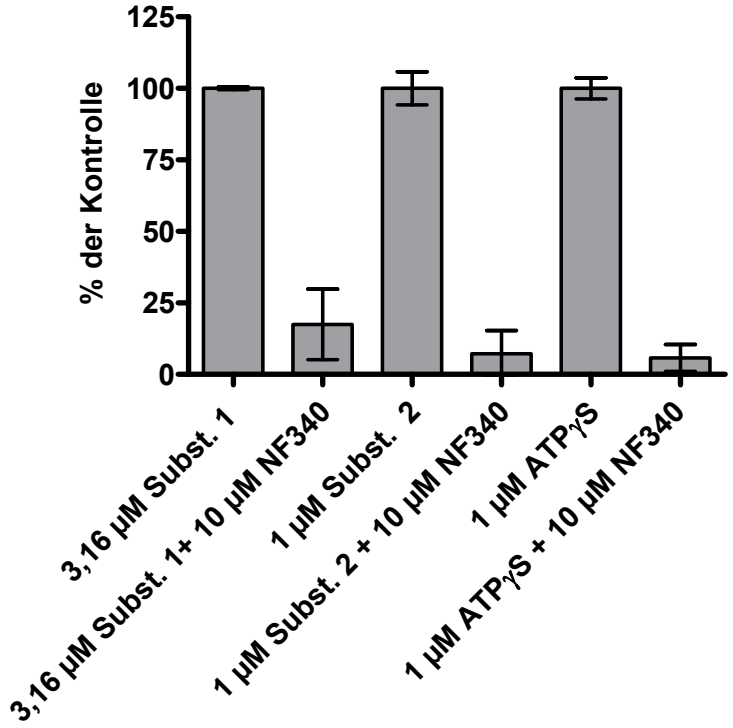


Abb. 4.66 Effekt der Substanzen 1 und 2 sowie von ATPγS mit und ohne Vorinkubation von NF340 an $P2Y_{11}$GU-Rezeptoren im Calcium-Assay. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte ± SD aus zwei unabhängigen Versuchen. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort dar.

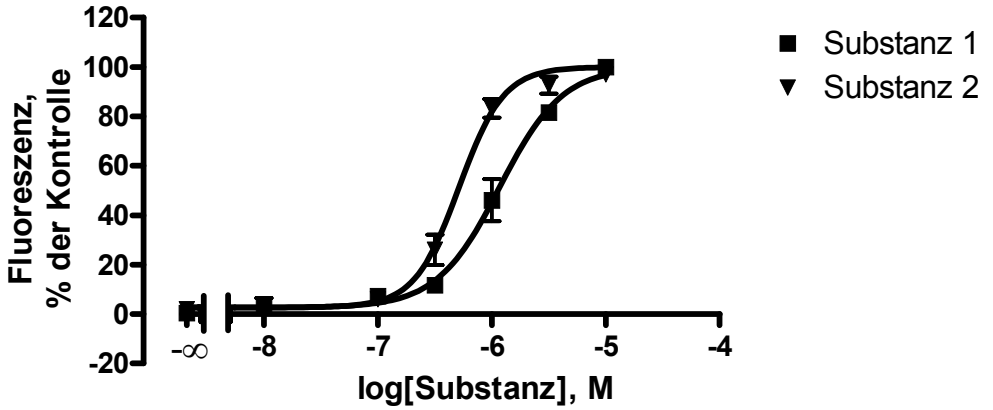


Abb. 4.67 Konzentrations-Effekt-Kurven von Substanz 1 (n = 3) und Substanz 2 (n = 5) am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit Substanz 1 und Substanz 2 maximal erreichten Antwort dar. Für Substanz 1 konnte ein Hillslope von 1,575 ± 0,188 und für Substanz 2 ein Hillslope von 2,216 ± 0,257 bestimmt werden.

4.6 Testung der Agonisten NF546 und NF709 und des Antagonisten NF340 an dendritischen Zellen

Um die interessantesten Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor (NF340, NF546 und NF709) weiter zu charakterisieren und ihre Aktivität auch in einem natürlichen, nicht überexprimierenden System zu belegen, wurden die Liganden an humanen Blutzellen getestet (Monozyten, Lymphozyten und an von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen)

Für die Testung wurden Monozyten und Lymphozyten aus humanen Buffy Coats vom Blutspendedienst der Universitätskliniken Bonn isoliert. Durch Inkubation der Monozyten mit humanem GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und mit IL-4 (Interleukin-4) wurden diese zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. Die Methode ist ausführlich in Kapitel 3.9 beschrieben und geht auf Romani et al. zurück (Romani *et al.*, 1994). Es wurden humane dendritische Zellen als Testsystem für den nativen $P2Y_{11}$-Rezeptor ausgewählt, da mehrere Veröffentlichungen die funktionelle Expression des Rezeptors auf diesen Zellen beschrieben (siehe Kapitel 1.3).

4.6.1 Bestimmung von Interleukin-12

Wilkin et al. berichteten 2002, dass durch Stimulation des $P2Y_{11}$-Rezeptors mit ATP inhibitorische Effekte auf die LPS- (Lipopolysaccharid-) vermittelte Ausschüttung von proinflammatorischem IL-12 (Interleukin-12) erzielt wurde (Wilkin *et al.*, 2002). Die Bestimmung der Inhibition der IL-12-Ausschüttung auf LPS-Stimulus wurde durch die Arbeitsgruppe um D. Communi und J.M. Boeynaems an der Universität Brüssel mit NF546 im Vergleich zu ATPγS durchgeführt. In Abb. 4.68 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Die Ergebnisse beziehen sich auf eine Million Zellen je ml Medium.

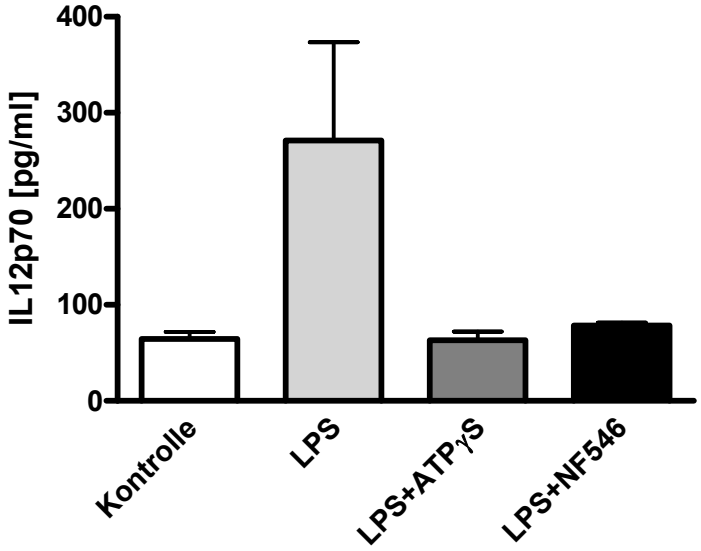


Abb. 4.68 Inhibitorischer Effekt von 100 µM ATPγS und 100 µM NF546 auf die LPS-induzierte Ausschüttung von IL-12 in von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen.

LPS allein (100 ng/ml, 24 h Inkubation) rief eine Ausschüttung von 271 ± 178 pg/ml IL-12 hervor. Wenn zusätzlich 100 µM ATPγS bzw. 100 µM NF546 inkubiert wurden, wurde die LPS-stimulierte IL-12-Ausschüttung auf das Kontrollniveau gesenkt (Kontrolle: 64,4 ± 13,1 pg/ml; 100 µM ATPγS: 63,1 ± 15,8 pg/ml; 100 µM NF546: 78,6 ± 4,9 pg/ml). Durch den relativ großen Fehler bei der Bestimmung der IL-12-Ausschüttung von LPS, sind die Ergebnisse nicht signifikant verschieden. Dennoch kann eine Tendenz gesehen werden. Zu betrachten ist ebenfalls, dass NF546 in den eingesetzten Dosen, genau wie ATPγS, auch eine Reaktion am $P2Y_2$-Rezeptor hervorrufen würde (vgl. zur Selektivität von NF546 Tab. 4.20 und Tab. 4.21).

4.6.2 Bestimmung von Thrombospondin-1

Im Jahr 2005 beschrieben Marteau et al. die Sekretion von TSP-1 (Thrombospondin-1) durch Stimulation des $P2Y_{11}$-Rezeptors mit ATP und ATPγS in dendritischen Zellen (Marteau *et al.*, 2005). Die Testung von NF709 und NF546 als Agonisten sowie NF340 als Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor an dendritischen Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Dazu wurden die Substanzen analog zu der von Marteau et al. beschriebenen Methode 24 h mit den Zellen inkubiert. Im Zellüberstand wurde dann die Menge des ausgeschütteten TSP-1 mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits bestimmt.

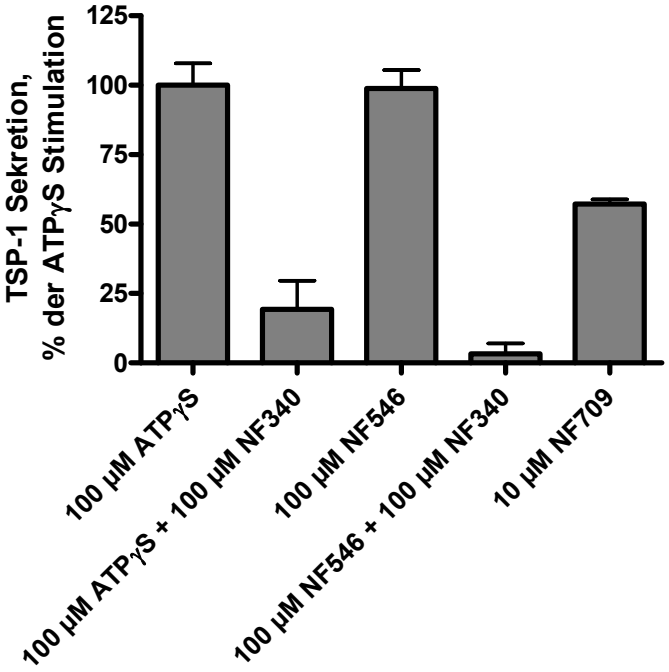


Abb. 4.69 Effekt von ATPγS, NF546, NF709 und NF340 auf die Sekretion von TSP-1 in von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen. Die Werte wurden auf die Konzentration von TSP-1, die nach Stimulation mit ATPγS ausgeschüttet wurde, bezogen (Mittelwert ± SD).

Bei der Bestimmung der TSP-1-Konzentration im Überstand der dendritischen Zellen mit Hilfe eines TSP-1-ELISAs zeigte ATPγS in diesem Versuch eine Konzentration von 4211 ± 156 ng TSP-1/ml. Im Überstand der dendritischen Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden (Kontrolle), konnte eine Konzentration von 2210 ± 8 ng TSP-1/ml detektiert werden.

Eine Stimulation der Zellen mit 100 µM ATPγS, 100 µM NF546 oder 10 µM NF709 führte zu einer deutlichen Ausschüttung von TSP-1 (Abb. 4.69). Die ausgeschütteten Mengen sind bei NF546 und bei ATPγS annähernd gleich. NF546 zeigte 98,8 ± 6,7% der nach Stimulation mit ATPγS hervorgerufenen Menge TSP-1. Bei NF709 ist die Konzentration von ausgeschüttetem TSP-1 dagegen signifikant niedriger (57,2 ± 1,6 % des ATPγS-Signals). Die von ATPγS und NF546 hervorgerufene TSP-1-Sekretion konnte durch 100 µM NF340 blockiert werden (19,3 ± 10,4 % (ATPγS) bzw. 3,2 ± 3,8 % (NF546) der durch ATPγS hervorgerufenen TSP-1-Sekretion).

4.6.3 Testung von nativen Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen im Calcium-Assay

Weiterhin wurden native Lymphozyten, native Monozyten und von nativen Monozyten abgeleitete dendritische Zellen im Calcium-Assay untersucht. Die Isolierung der nativen Zellen wurde wie in Kapitel 3.9 beschrieben durchgeführt. Die Messung und Vorbereitung der Zellen für den Calcium-Assay erfolgte analog zu der in Kapitel 3.7 beschriebenen Methode für Zellen in Suspension. Monozyten und Lymphozyten wurden 24 h nach ihrer Isolation für 15 min mit Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM inkubiert. Nach Injektion der Testsubstanzen wurde dann die Fluoreszenz-Änderung mit Hilfe des NOVOstar® detektiert. Die dendritischen Zellen wurden nach einer sechstägigen Differenzierung mit GM-CSF und IL-4 und damit sechs Tage nach der Isolation der Zellen ebenfalls 15 min mit Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM inkubiert. Auch bei diesen Zellen wurde die Fluoreszenz-Änderung nach Injektion von Testsubstanzen im NOVOstar® bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.70 dargestellt. ATP und UTP wurden als nukleotidische Agonisten, NF546 und NF709 als nicht-nukleotidische Agonisten und NF340 als Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor getestet. Für alle Zelltypen wurde das von 100 µM ATP hervorgerufene Signal als 100 %-Wert gesetzt und die anderen Messwerte darauf bezogen.

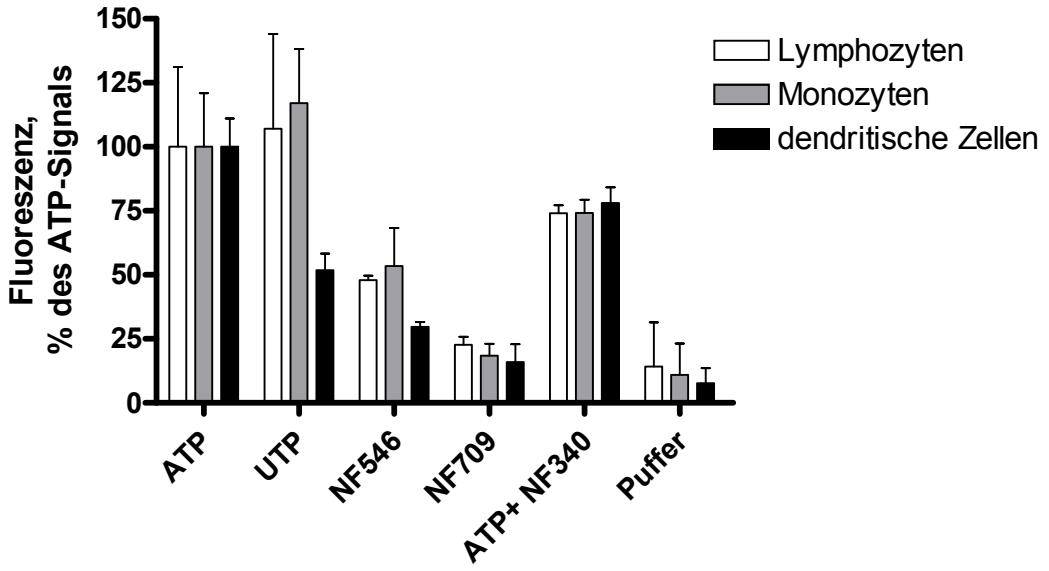


Abb. 4.70 Effekt ATP, UTP, NF546, NF709 und NF340 jeweils in einer Konzentration von 100 µM auf die Calcium-Freisetzung in nativen Lymphozyten, nativen Monozyten und von nativen Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen. Die Messwerte wurden auf das von 100 µM ATP hervorgerufene Calcium-Signal normiert (Mittelwert ± SD).

Die drei untersuchten Zelltypen reagierten mit Calcium-Ausschüttung auf Stimulation mit ATP und UTP. Das Verhalten von Monozyten und Lymphozyten ist dabei annähernd identisch. Bei UTP wurde bei beiden Zelltypen eine von ATP nicht signifikant verschiedene Calcium-Ausschüttung detektiert. Bei den dendritischen Zellen wurde dagegen bei UTP ein Signal gemessen, das nur 52 % der ATP-Antwort entspricht. 100 µM NF546 bewirkte bei allen drei Zelltypen Calcium-Ausschüttungen, die von den Puffer-Werten signifikant verschieden sind. 100 µM NF709 rief dagegen in keinem Fall eine von Puffer verschiedene Calcium-Antwort hervor. Die leichte Reaktion auf NF546 und der fehlende Effekt von NF709 bei Lymphozyten und Monozyten weisen darauf hin, dass das Verhalten der Zellen im funktionellen Calcium-Assay über den ubiquitär verbreiteten $P2Y_2$-Rezeptor gesteuert wird. Der Antagonist NF340 konnte bei einer Konzentration von 100 µM an allen drei Zelltypen das von ATP hervorgerufene Signal um 25 % hemmen. Dies würde wiederum bedeuten, dass Teile der Calcium-Antwort von ATP doch über den $P2Y_{11}$-Rezeptor laufen, da im rekombinanten System eine deutliche Selektivität von NF340 für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gezeigt werden konnte (vgl. Tab. 4.10 und Kapitel 4.3.6).

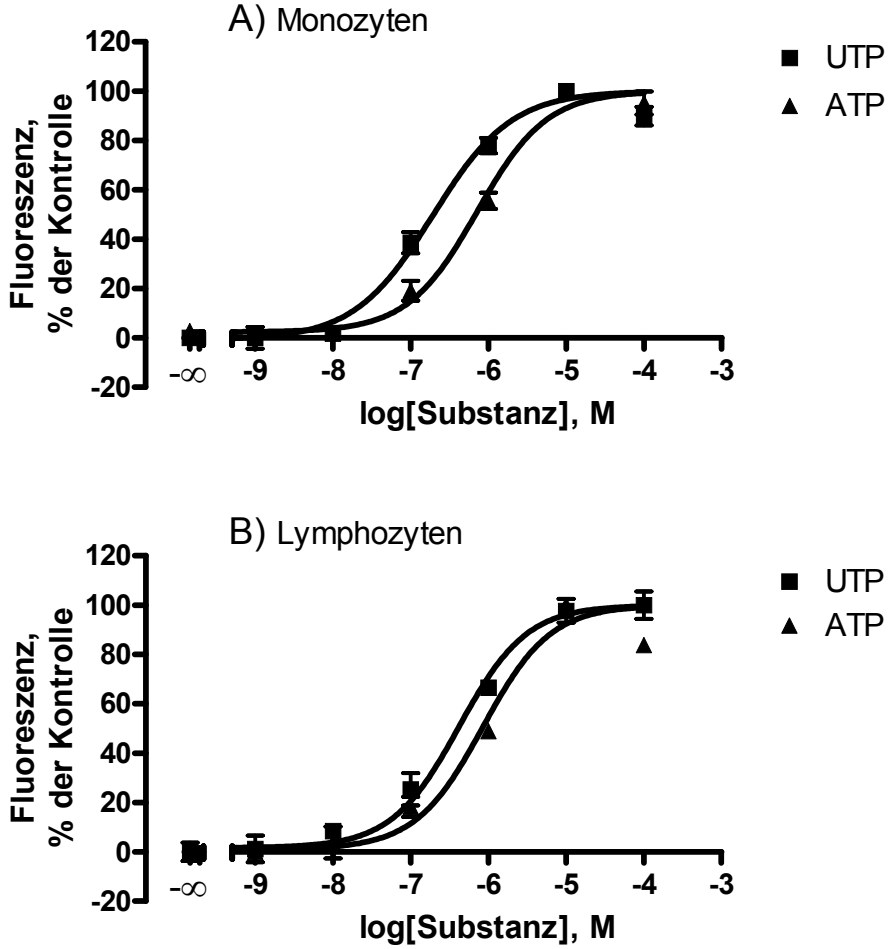


Abb. 4.71 Konzentrations-Effekt-Kurven von UTP und ATP an A) nativen Monozyten und an B) nativen Lymphozyten. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit UTP bzw. ATP maximal erreichten Antwort dar. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Für UTP und ATP wurden Konzentrations-Effekt-Kurven an Monozyten und Lymphozyten aufgenommen (Abb. 4.71). Es konnte an Monozyten ein pEC_{50}-Wert von 6,15 ± 0,08 für ATP und ein pEC_{50}-Wert von 6,72 ± 0,08 für UTP bestimmt werden. An Lymphozyten konnte ein pEC_{50}-Wert von 6,07 ± 0,09 für ATP und ein pEC_{50}-Wert von 6,38 ± 0,10 für UTP bestimmt werden. Die jeweils für ATP und UTP bestimmten pEC_{50}-Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die in der Literatur genannten Werte an rekombinanten Rezeptoren, die bei 6,85 lag (Jacobson *et al.*, 2000).

Da es sich bei den drei Zelltypen um native Zellen handelt, kann durch das sich im Calcium-Assay ergebende Profil keine abschließende Aussage über den Rezeptor getroffen werden.

4.7 Etablierung eines Apyrase-Assays und Überprüfung der Selektivität der gefundenen $P2Y_{11}$-Rezeptor-Liganden

Ectonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolasen (ecto-NTPDasen) kontrollieren im extrazellulären Raum die Konzentration von Nukleotiden (Zimmermann, 2000). Zum einen können sie durch den Abbau von Nukleotiden die purinerge Signalweiterleitung unterbrechen, zum anderen können ecto-NTPDasen die Ansprechbarkeit entweder für Nukleotid- oder für Adenosin-Rezeptoren steuern. Bisher sind sieben ecto-NTPDasen beschrieben worden (Bigonnesse F *et al.*, 2004; Zimmermann, 2000). Da die verschiedenen ecto-NTPDasen unserem Arbeitskreis nicht rekombinant vorlagen, wurde ein Modellsystem verwendet. Die Apyrase aus der Kartoffel stellt eine in der Literatur gut beschriebene Alternative dar (Kettlun *et al.*, 1992). Es wurde die Apyrase Grade VI eingesetzt. Dieses Enzym baut in erster Linie ATP zu ADP ab. Ein Abbau von ADP findet dagegen nur untergeordnet statt. Um den Abbau der unterschiedlichen Adenin-Nukleotide zu charakterisieren, wurde eine Kinetik des Enzyms aufgenommen. Dabei wurde eine Anfangskonzentration von jeweils 200 µM Nukleotid eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb. 4.72 dargestellt. Es ist erkennbar, dass ATP verstärkt, ADP nur in geringem Umfang und AMP gar nicht abgebaut wurde.

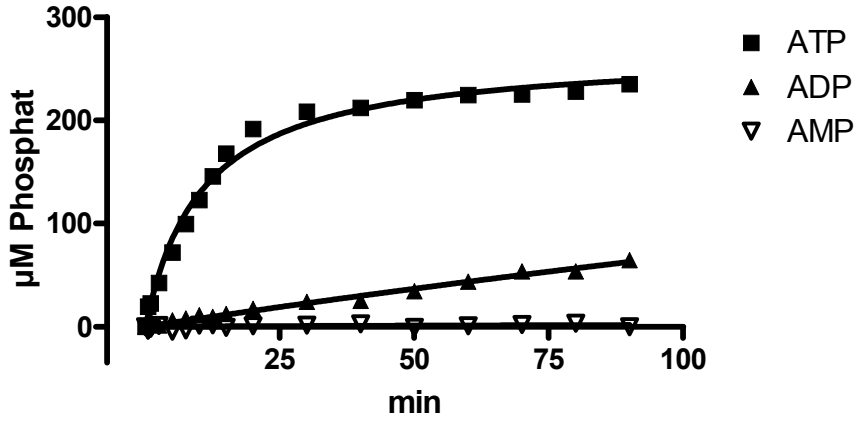


Abb. 4.72 Abbau von Adenin-Nukleotiden durch das Enzym Apyrase. Die Phosphat-Konzentrationen wurden durch ein modifiziertes Verfahren nach Lanzetta et al. photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.11).

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor wurden auf ihre Hemmung der Apyrase untersucht. Dazu wurden 100 µM der jeweiligen Substanz 45 min bei Raumtemperatur zusammen mit 0,04 Einheiten Apyrase und

200 µM ATP inkubiert. Eine Inkubationsdauer von 45 min wurde gewählt, da nach dieser Zeit die eingesetzten 200 µM ATP nahezu vollständig abgebaut waren (vgl. Abb. 4.72). Danach wurde die Konzentration des gebildeten Phosphats photometrisch bestimmt. Die Phosphatkonzentration einer Probe, bei der nur Puffer, Apyrase und ATP 45 min ohne Inhibitor inkubiert wurden, wurde als 100 %-Wert gesetzt und als Kontrolle bezeichnet (Abb. 4.74).

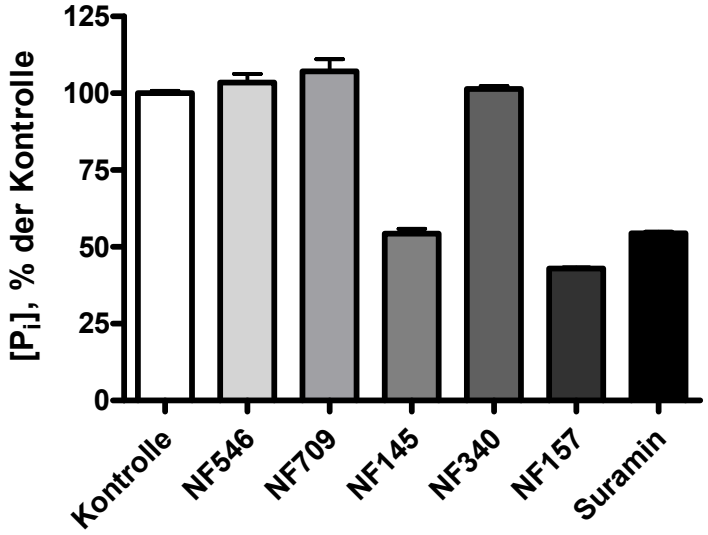


Abb. 4.73 Untersuchung der Hemmung von Suraminanalogen bei einer Konzentration von 100 µM im Apyrase-Assay. Die Phosphatkonzentration einer Probe, bei der nur Puffer, Apyrase und ATP 45 min ohne Inhibitor inkubiert wurden, wurde als 100 %-Wert gesetzt und als „Kontrolle“ bezeichnet. Inkubationsdauer: 45 min, ATP-Konzentration: 200 µM, Apyrase-Konzentration: 0,04 U/ml

Bei einer Konzentration von 100 µM verursachen nur Suramin und die beiden Struktur-Analogen NF157 und NF145 eine Hemmung der Apyrase. Die Hemmung beträgt bei allen drei Substanzen ca. 50 %. Dies bedeutet, dass die IC_{50} dieser Substanzen bei etwa 100 µM liegt, also ca. 10- bis 20-fach über der EC_{50} bzw. IC_{50} der jeweiligen Substanz am $P2Y_{11}$-Rezeptor. NF546, NF709 und NF340 zeigten bis zu einer Konzentration von 100 µM keine Hemmung der Apyrase.

4.8 Mutagenese-Studien am $P2Y_{11}$-Rezeptor

Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, die molekulare Topologie der Ligand-Bindungsstelle des $P2Y_{11}$-Rezeptors näher zu charakterisieren.

Durch gezielt eingeführte Punktmutationen am $P2Y_{11}$-Rezeptor sollten die zur Bindung von Liganden notwendigen Aminosäuren identifiziert werden. Die oben beschriebenen Agonisten und Antagonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor wurden an den so erzeugten Mutanten getestet.

4.8.1 Transfektion und Expression des his$P2Y_{11}$-Rezeptors

Für die geplanten Mutagenese-Studien war es wichtig, eine Möglichkeit zu haben, die ungefähre Dichte der exprimierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu bestimmen, um bei einem Vergleich der Rezeptor-Mutanten und des Rezeptor-Wildtyps auszuschließen, dass die (mutierten) Rezeptoren auf den Zelloberflächen unterschiedlich stark exprimiert sind. Da zu Beginn dieser Studie kein Antikörper, der sich gegen den $P2Y_{11}$-Rezeptor richtete, kommerziel erhältlich war, wurde der Rezeptor am N-terminalen Ende mit einem sechsfachen Histidin-Rest versehen (6xHis-Tag, his$P2Y_{11}$-Rezeptor; siehe Kapitel 3.1.3.1). Der eingeführte „His-Tag“ erlaubt eine Detektion der Rezeptoren durch einen Antikörper.

Zur Detektion der 6xHis-Tags wurde ein PentaHis Alexa Fluor 488 Conjugate benutzt. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper gegen einen fünffachen His-Tag, der gleichzeitig mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (Alexa-Fluor) markiert ist. Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft, ob die Einführung des His-Tags am $P2Y_{11}$-Rezeptor das pharmakologische Profil beeinflusst. Dazu wurden 1321N1-Wildtyp-Zellen mit dem pcDNA3.1(+)-his$P2Y_{11}$-Plasmid stabil transfiziert (vgl. Kapitel 3.1.3). Alle isolierten und vermehrten Zellklone der 1321N1-his$P2Y_{11}$-Zelllinie wurden am gleichen Tag im FACS-Assay auf Expression des his$P2Y_{11}$-Rezeptors und im Calcium-Assay auf ihre Funktionalität (Reaktion auf 10 µM ATPγS) überprüft. Außerdem wurden die 1321N1-his$P2Y_{11}$-Zellklone mit den Zelllinien 1321N1-$P2Y_{11}$GU und 1321N1-WT verglichen. Die Calcium-Messungen wurden mit angehefteten Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.7.4).

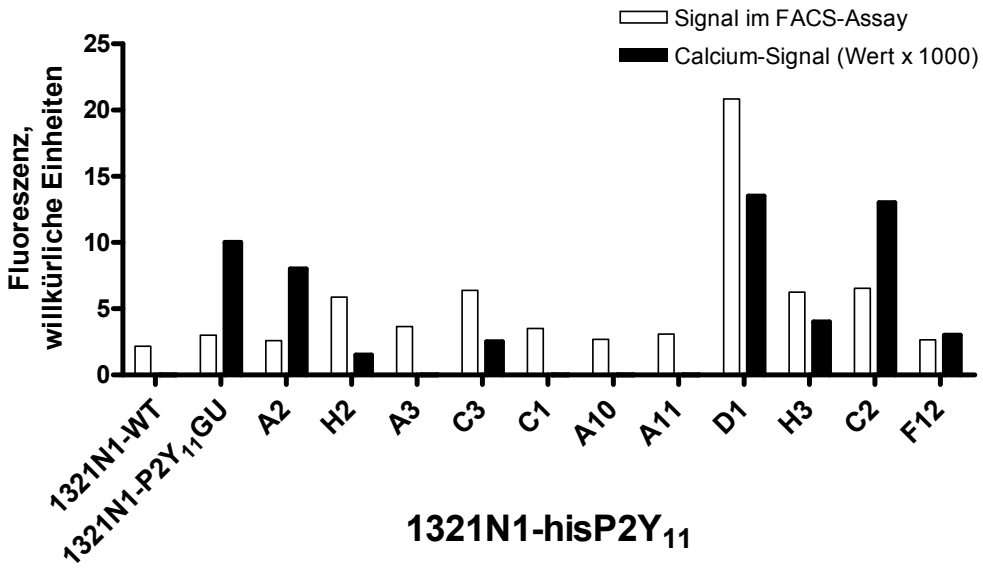


Abb. 4.74 Vergleich verschiedener 1321N1-hisP2Y$_{11}$-Zellklone hinsichtlich der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Fluoreszenz im FACS-Assay) und der Calcium-Ausschüttung nach Stimulation mit 10 µM ATPγS (Fluoreszenz im Calcium-Assay). Die Fluoreszenz der 1321N1-WT- und 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im FACS-Assay gibt die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an den Zellen wieder. Die Daten stellen den geometrischen Mittelwert von 10.000 Zellen dar.

In Abb. 4.74 sind die Intensitäten der Fluoreszenz dargestellt, die durch die spezifische Bindung des anti-His-Antikörpers am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor sowie durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an den verschiedenen Zellen hervorgerufen wird. Das Fluoreszenzsignal bei den Zelllinien 1321N1-WT und 1321N1-P2Y$_{11}$GU wird ausschließlich durch die unspezifische Bindung des Antikörpers an diesen Zellen hervorgerufen. Des Weiteren ist in der Abbildung die Höhe des an den verschiedenen Zellen gemessenen Signals im Calcium-Assay wiedergegeben. Die His-Klone, die ein Ca^{2+}-Signal aufwiesen, zeigten gleichzeitig eine mehr oder weniger deutlich ausgeprägte spezifische Fluoreszenz im FACS-Assay. Eine Ausnahme bildet der Klon A2, bei dem die Fluoreszenz im FACS-Assay im Bereich der unspezifischen Bindung des Antikörpers lag, während im Calcium-Assay eine deutliche Antwort auf den ATPγS-Stimulus erkennbar ist. Bei den Klonen, die eine Rezeptorexpression zeigten und gleichzeitig mit Calcium-Ausschüttung auf den ATPγS-Stimulus reagierten (Klone H2, C3, D1, H3, C2, F12), wurden Konzentrations-Effekt-Kurven zur Bestimmung der EC_{50} der bereits bekannten Agonisten aufgenommen (Abb. 4.75).

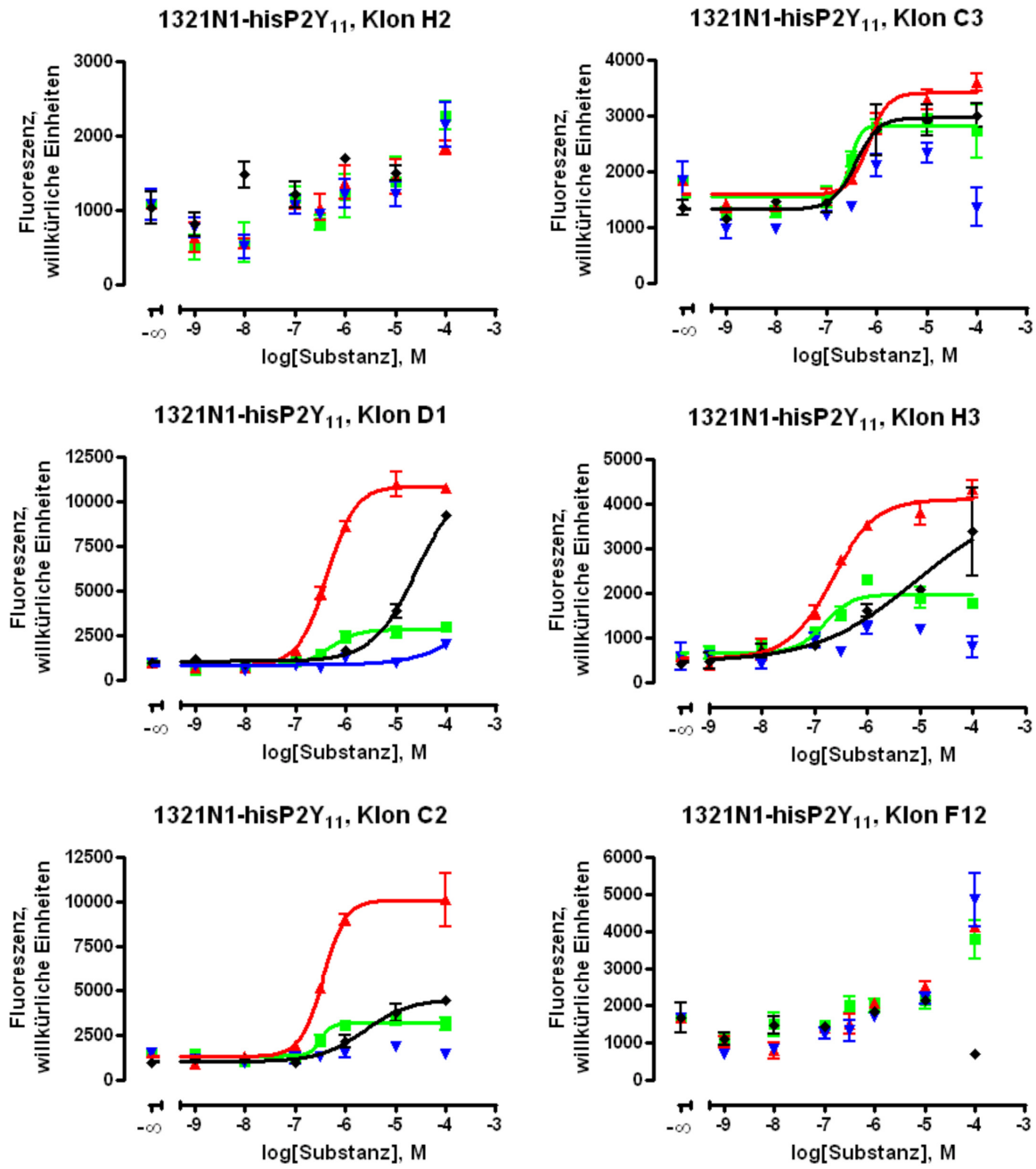


Abb. 4.75 Konzentrations-Effekt-Kurven von ▲ ATPγS; ▼ NF709; ♦ NF546; ■ NF145 an verschiedenen hisP2Y$_{11}$-Zellklonen.

Die in Abb. 4.75 dargestellten Versuche wurden eine Zell-Passage später als die FACS-Assays durchgeführt (vgl. Abb. 4.74). Die Klone F12 und H2 zeigen bereits nach einer Passagierung keine verwertbaren Calcium-Signale mehr. Bei den anderen Zellklonen zeigt sich, dass die Ansprechbarkeit des mit dem 6x-HisTag versehenen Rezeptors auf die drei neuen Agonisten NF145, NF546 und NF709 sowie den Standardagonisten ATPγS stark verändert war. Die Potenzen von ATPγS sind um den Faktor 5 bis 10 zu höheren EC_{50}-Werten hin verschoben. Die anderen

Agonisten konnten den Rezeptor nicht im gleichen Maße aktivieren oder zeigten im Falle von NF709 sogar keine Aktivierung mehr. Die EC_{50}-Werte, die bestimmt werden konnten, sind in Tab. 4.32 zusammengefasst.

Tab. 4.32 EC_{50} und intrinsische Aktivität (normalisiert auf die Aktivität von ATPγS) der drei neu identifizierten Agonisten NF145, NF546 und NF709 sowie von ATPγS an verschiedenen hisP2Y_{11}-Zellklonen, (n.b.: nicht bestimmbar).

	Klon C2		Klon H3		Klon C3		Klon D1	
	EC_{50} [nM]	intrins. Aktivität	EC_{50} [nM]	intrins. Aktivität	EC_{50} [nM]	intrins. Aktivität	EC_{50} [nM]	intrins. Aktivität
NF145	330	31 %	155	48 %	309	82 %	498	28 %
NF709	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
NF546	2530	45 %	8.900	n.b.	379	86 %	24000	100 %
ATPγS	364	100 %	217	100 %	692	100 %	422	100 %

Die EC_{50}-Werte, die für NF145 und ATPγS bestimmt wurden, lagen bei den Klonen C2, H3 und D1 in der gleichen Größenordnung. NF145 zeigte bei diesen Klonen eine intrinsische Aktivität, die zwischen 28 % und 48 % der Aktivität von ATPγS liegt. Am Klon H3 war für NF546 keine auswertbare Konzentrations-Effekt-Kurve bestimmbar. Bei den Klonen C2 und D1 konnten für diese Substanz zwar EC_{50}-Werte bestimmt werden, die intrinsischen Aktivitäten weichen jedoch stark voneinander ab. Sie liegen bei 45 % (Klon C2) bzw. 100 % (Klon D1) des ATPγS-Signals. Beim Klon C3 ergeben sich für NF145, NF546 und ATPγS ähnliche EC_{50}-Werte und auch die intrinsischen Aktivitäten liegen in der gleichen Größenordnung. Dieser Klon zeigte insgesamt ein anderes Verhalten als die restlichen Klone.

Da bei den Zellklonen C2, H3 und C3 bereits nach drei bis sechs Passagierungen keine verwertbaren Calcium-Signale mehr gemessen werden konnten, während der Klon D1 auch nach mehrfacher Passagierung noch unveränderte Signale zeigte, wurde der Klon D1 für die weitere Charakterisierung der Zelllinie verwendet. Im Folgenden wird dieser Klon als 1321N1-hisP2Y_{11}WT bezeichnet. Für die weitere Charakterisierung dieses Klons wurden der Agonist ATPγS und auch die beiden Antagonisten NF157 und NF340 an den Zellen getestet. In Abb. 4.76 die Konzentrations-Effekt-Kurve für ATPγS bzw. in Abb. 4.77 sind die entsprechenden Konzentrations-Inhibitions-Kurven für die Antagonisten dargestellt.

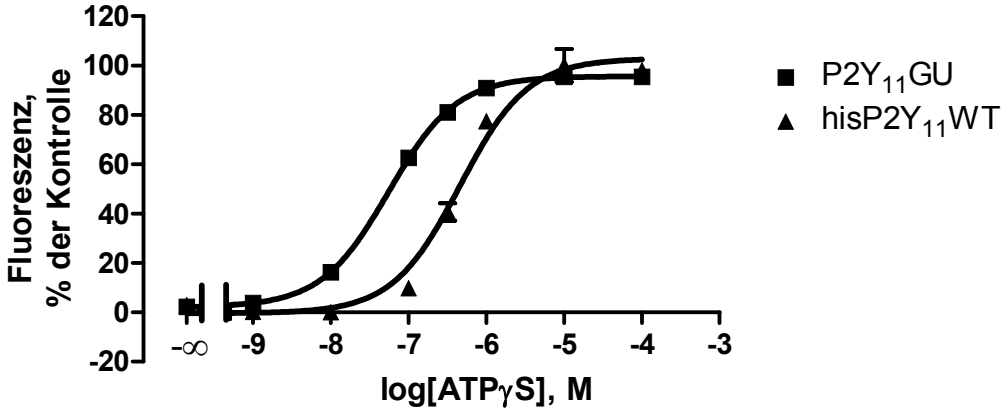


Abb. 4.76 Konzentrations-Effekt-Kurve von ATPγS im Calcium-Assay an 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT-Zellen und 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslope ist nicht signifikant verschieden von 1.

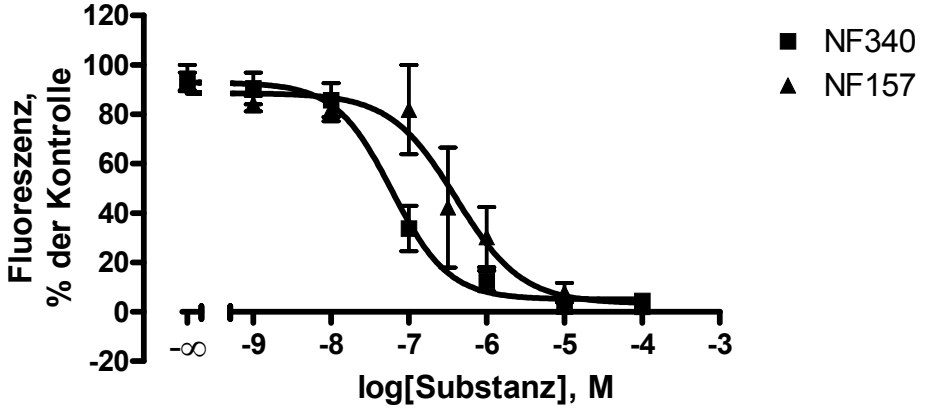


Abb. 4.77 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Antwort von NF340 (n = 6) und NF157 (n = 3) am 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT-Klon. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATPγS maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Der pEC$_{50}$-Wert von ATPγS lag am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor bei 6,31 ± 0,17 (n = 7; EC$_{50}$: 487 nM). Verglichen mit dem pEC$_{50}$-Wert für ATPγS, der am P2Y$_{11}$GU-Rezeptor bestimmt wurde (7,27 ± 0,03, n = 46; EC$_{50}$: 55 nM), lag der pEC$_{50}$-Wert am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor ca. um den Faktor 10 höher. Am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor wurde für NF340 ein apparenter pK$_i$-Wert von 7,76 ± 0,23 und für NF157 von 6,94 ± 0,36 bestimmt. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie beim P2Y$_{11}$GU-Rezeptor (NF157:

7,10 ± 0,05; NF340: 7,71 ± 0,04; vgl. Abb. 4.27) und unterscheiden sich nicht signifikant von diesen Ergebnissen. Weiterhin wurde für NF340 am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor eine Analyse nach Schild durchgeführt. Dazu wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP im Calcium-Assay aufgenommen. Die Rechtsverschiebung der Kurven ist in Abb. 4.78 dargestellt, die daraus resultierende Analyse nach Schild in Abb. 4.79. Die jeweiligen pEC$_{50}$-Werte sind in Tab. 4.33 zusammengefasst.

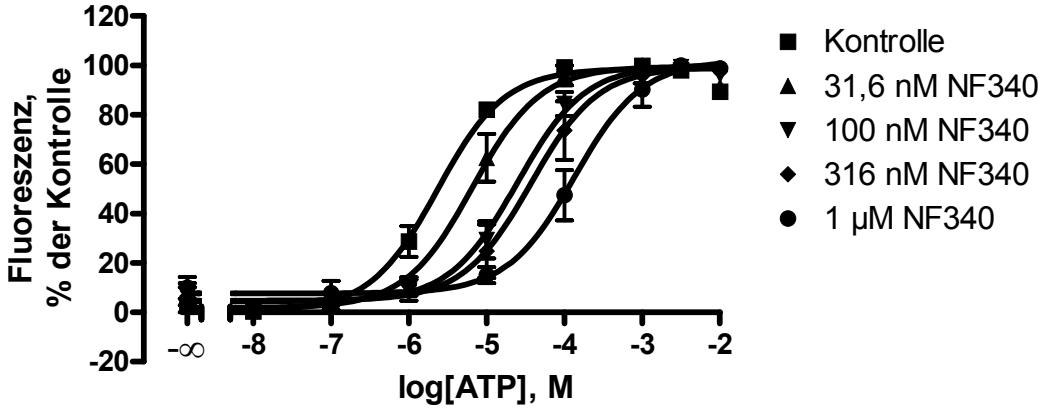


Abb. 4.78 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT-Zellen im Calcium-Assay. ATP wurde in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 getestet. Die Kurven setzen sich aus den Ergebnissen von mindestens drei unabhängigen Experimenten je verwendeter Konzentration von NF340 zusammen. „% der Kontrolle“ stellt hier den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATP maximal erreichten Antwort dar.

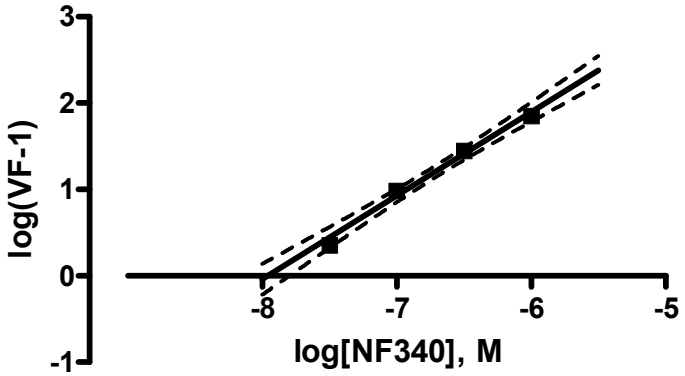


Abb. 4.79 Funktionelle Analyse des antagonistischen Effekts von NF340 an der Zelllinie 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT (Schild-Analyse). Für die Analyse wurde die durch NF340 vermittelte Inhibition der ATP-induzierten Erhöhung der intrazellulären [Ca^{2+}] gemessen. Der pA$_2$-Wert wurde mit 7,96 ± 0,10 bestimmt (Mittelwert ± SD). Die Steigung ist nicht signifikant verschieden von 1.

Tab. 4.33 Einfluss von NF340 auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an 1321N1-hisP2Y$_{11}$-WT-Zellen im Calcium-Assay. Als Kontrolle ist hier die Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit von NF340 bezeichnet.

	Kontrolle	+ 31,6 nM NF340	+ 100 nM NF340	+ 316 nM NF340	+ 1 µM NF340
pEC$_{50}$	5,63 ± 0,06	5,18 ± 0,09	4,61 ± 0,07	4,43 ± 0,12	3,87 ± 0,10
n	4	2	4	3	3

Die Analyse nach Schild ergibt eine Gerade, deren Steigung nicht signifikant verschieden ist von 1. Damit kann für NF340 auch am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor ein kompetitiver Mechanismus angenommen werden. Der pA$_2$-Wert liegt bei 7,96 ± 0,10 und damit im gleichen Bereich wie der apparente pK$_i$-Wert, der im Calcium-Assay bestimmt wurde (7,76 ± 0,23). Zudem liegt der pA$_2$-Wert nah an den pA$_2$-Werten, die am P2Y$_{11}$GU- und am P2Y$_{11}$-Rezeptor ermittelt wurden (P2Y$_{11}$GU: 8,02 ± 0,06 und P2Y$_{11}$: 7,98 ± 0,10; siehe Abb. 4.32).

4.8.2 Herstellung, Transfektion und Expression von hisP2Y$_{11}$-Rezeptor-Mutanten

4.8.2.1 Auswahl der Mutationspunkte

Bereits 1997 und 1999 veröffentlichte die Gruppe um Ken Jacobson (NIH, Bethesda, Maryland, USA) umfangreiche Mutationsstudien am P2Y$_1$-Rezeptor (Jiang *et al.*, 1997; Moro *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 1999). Bei den veröffentlichten Mutationen handelt es sich meist um Punktmutationen unter Einbringung einer neutralen Aminosäure (Alanin), aber auch andere, geladene Aminosäuren wurden eingesetzt. Anhand dieser Studien wurden die Mutationen am P2Y$_{11}$-Rezeptor geplant. Dazu wurde ein Sequenz-Vergleich von der Aminosäuresequenz des P2Y$_1$-Rezeptors mit der Aminosäuresequenz des P2Y$_{11}$-Rezeptors mit Hilfe des im Internet verfügbaren Programms CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt (Abb. 4.80).

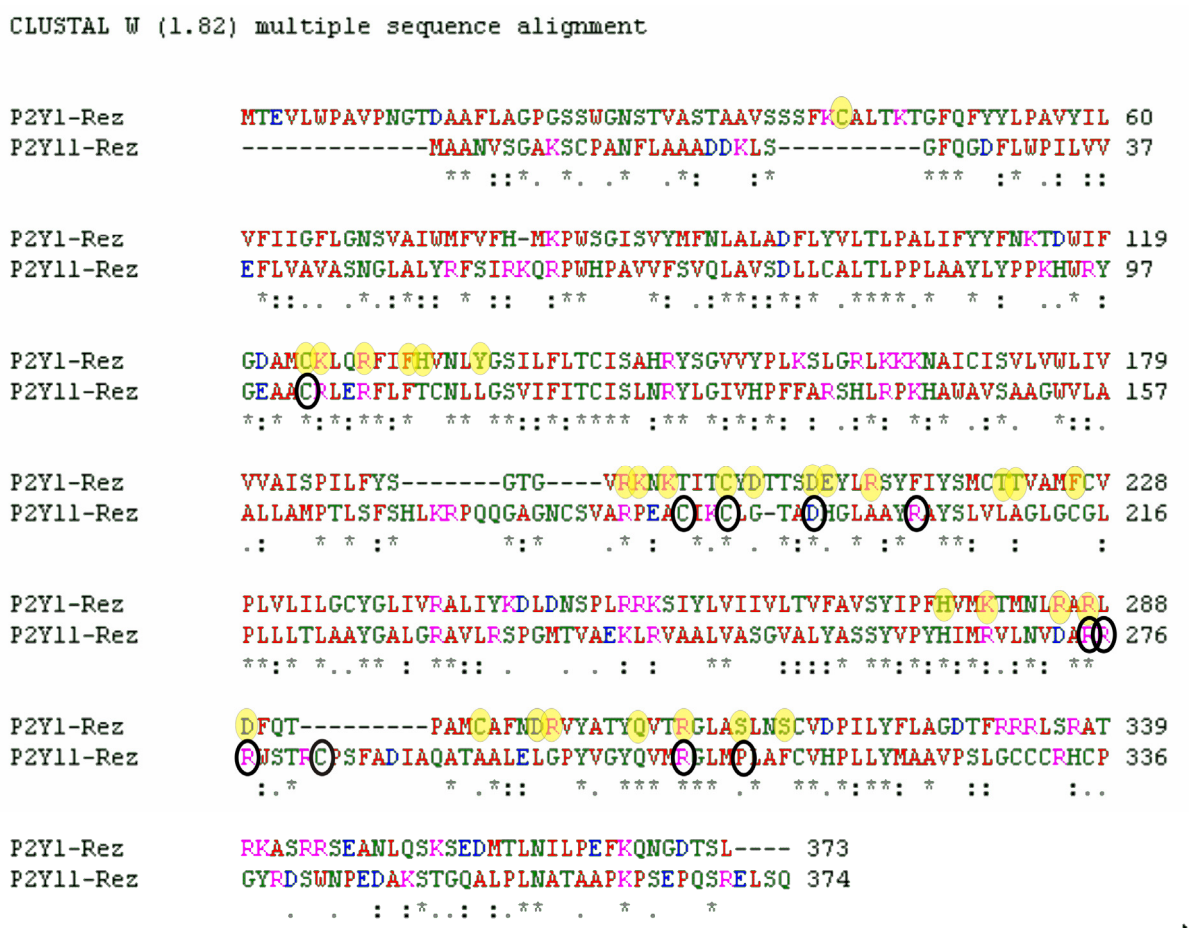


Abb. 4.80 Sequenz-Vergleich der $P2Y_1$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren mit Hilfe des Programms CLUSTAL W (siehe Text für weitere Beschreibung).

Die gelb unterlegten Aminosäuren in Abb. 4.80 sind die punktmutierten Aminosäuren am $P2Y_1$-Rezeptor aus den oben genannten Studien. Die schwarz umrandeten Aminosäuren wurden am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegen Alanin ausgetauscht. Eine Ausnahme bildet das Prolin an Position 311 (P311). Es wurde zum einen gegen ein Alanin und zum anderen gegen ein Serin ausgetauscht, da ein Austausch des Serin gegen ein Alanin an der entsprechenden Stelle im $P2Y_1$-Rezeptor eine Reduktion des Signals des Standardagonisten 2-MeSATP bewirkt (Jiang *et al.*, 1997). Die Cysteine (C) in P2Y-Rezeptoren bzw. in GPCRs allgemein sind wichtig für deren räumliche Anordnung, da der Zusammenhalt der sieben transmembranären Domänen über zwei Disulfidbrücken gewährleistet wird. Dies wurde von Hoffmann et al. postuliert, da die vier Cysteine in allen P2Y-Rezeptoren konserviert sind (Hoffmann *et al.*, 1999). Um die tatsächliche Lage der Disulfidbrücken für ein Modell des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu identifizieren, wurden verschiedene Cysteine gegen je ein Alanin ausgetauscht. Arginin (R) und Asparaginsäure (D) sind geladene

Aminosäuren, die entweder für eine Bindung zu Liganden oder für eine Bindung im Rezeptormolekül selbst wichtig sind.

Bei der Kontrolle des Mutationserfolgs mittels Sequenzierung zeigte sich, dass bei elf der zwölf geplanten Mutationen die entsprechende Sequenz in den Plasmiden wiedergefunden wurde (C102A, C188A, C191A, D196A, R203A, R275A, R276A, R277A, P311A, P311S). Die Ergebnisse der Sequenzierung sind im Anhang dargestellt (siehe Kapitel 11). Bei der Mutante C282A konnten auch nach mehreren Transformationsversuchen des mit DpnI verdauten Mutationsansatzes keine E.-coli-Kolonien auf den Agar-Platten entdeckt werden. Wahrscheinlich fand beim PCR-Schritt keine Synthese des mutierten Tochterstranges statt. Hier könnte eine neue PCR unter optimierten Bedingungen zum Erfolg führen. Die Auswertung der Kontrollreaktionen (siehe Kapitel 3.3.3.5) ergaben eine Mutagenese-Effizienz von 91,1%.

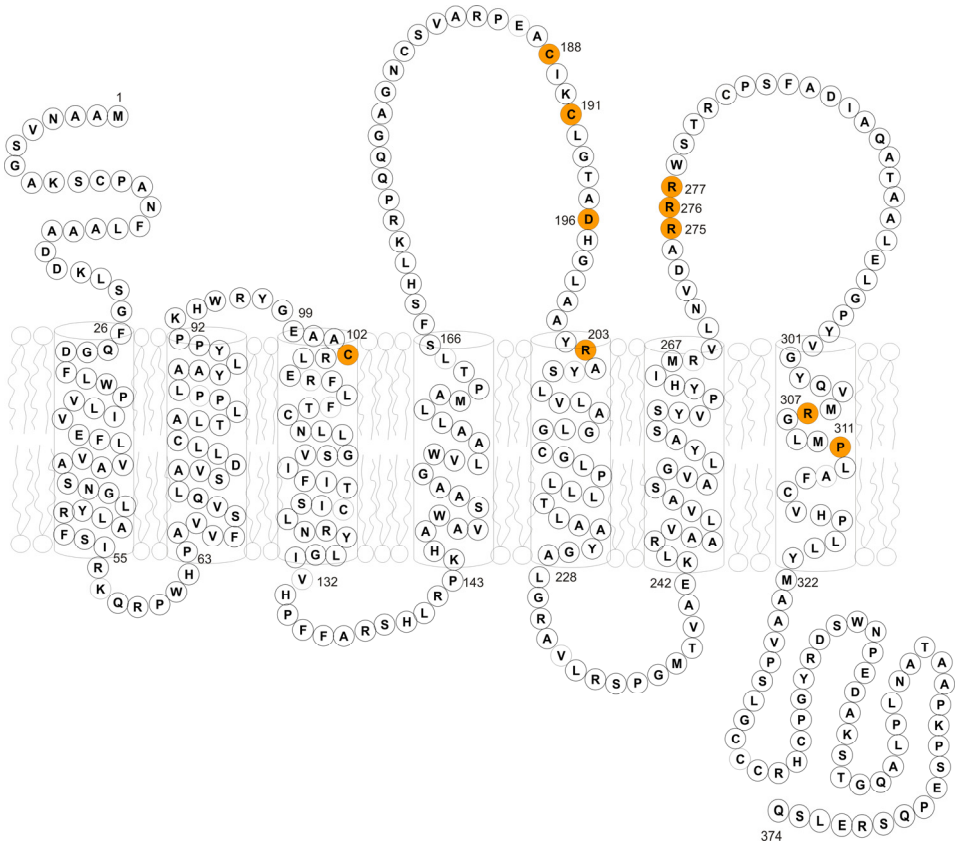


Abb. 4.81 Modell des $P2Y_{11}$-Rezeptors nach Zylberg et al. (2007), dargestellt als Snake-Plot. Aminosäuren, die als Mutationspunkte für den $P2Y_{11}$-Rezeptor ausgewählt wurden, sind bunt gekennzeichnet. In Orange sind die Aminosäuren dargestellt, für die Plasmide mit der mutierten Sequenz vorlagen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf mutierte $P2Y_{11}$-Rezeptor DNA-Sequenzen hergestellt, von denen drei stabil in 1321N1-Zellen transfiziert werden konnten (C102A, R275A, R276A).

4.8.2.2 Untersuchung der Mutation Cystein → 102 → Alanin (C102A)

Das Cystein an Position 102 wurde gegen Alanin ausgetauscht, um die Lage einer Disulfidbrücke im $P2Y_{11}$-Rezeptor zu identifizieren. Das Cystein liegt in der ersten extrazellulären Schleife des Rezeptors.

Die isolierten 1321N1-his$P2Y_{11}$C102A-Zellklone wurden analog zur 1321N1-his$P2Y_{11}$WT-Zelllinie charakterisiert (vgl. Kapitel 4.8.1). Alle Klone wurden am gleichen Tag im FACS-Assay auf die Expression des Rezeptors und im Calcium-Assay auf ihre Funktionalität (Reaktion auf 10 µM ATPγS) überprüft und mit den Zelllinien 1321N1-his$P2Y_{11}$WT, 1321N1-$P2Y_{11}$GU und 1321N1-WT verglichen. Die Calcium-Messungen wurden mit angehefteten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.82 dargestellt.

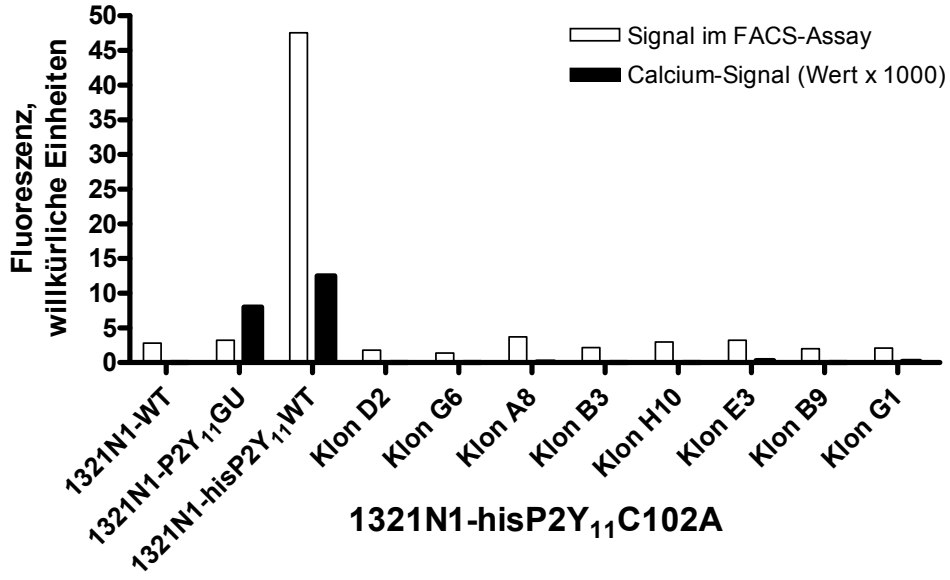


Abb. 4.82 Vergleich verschiedener 1321N1-his$P2Y_{11}$C102A-Zellklone hinsichtlich der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Fluoreszenz im FACS-Assay) und der Calcium-Ausschüttung nach Stimulation mit 10 µM ATPγS (Fluoreszenz im Calcium-Assay). Die Fluoreszenz der 1321N1-WT- und 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im FACS-Assay gibt die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an den Zellen wieder. Die Daten stellen den geometrischen Mittelwert von 10.000 Zellen dar.

Die acht isolierten und vermehrten Klone der Zelllinie 1321N1-hisP2Y$_{11}$C102A zeigten keine Expression des Rezeptors. Dies wird durch die niedrigen Fluoreszenz-Signale im FACS-Assay belegt. Es wurde keine Fluoreszenz detektiert, die über das Hintergrundsignal durch die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an Zellen ohne sechsfachen Histidin-Rest hinausging (vgl. Kapitel 4.8.1).

Im Calcium-Assay wurden bei Injektion von 10 µM ATPγS sowie bei ATP-Konzentrationen von bis zu 316 µM keine Fluoreszenz-Signale detektiert. Erst bei einer Konzentration von 1 mM ATP wurde eine leichte Reaktion beobachtet. Um zu überprüfen, ob die Zellen und ihre Signaltransduktionswege normal funktionierten, wurde auch Histamin getestet, da die 1321N1-Zellen den H1-Rezeptor physiologisch exprimieren (vgl. Kapitel 4.1.1). Bei allen Zellen konnte nach der Injektion von 10 µM Histamin ein maximales Calcium-Signal detektiert werden. Die Calcium-Antwort auf 1 mM ATP macht ca. 20 bis 30 % der maximalen durch Histamin hervorgerufenen Calcium-Anwort aus. Die Wildtyp-Zellen ohne transfizierten Rezeptor zeigten jedoch ebenfalls eine entsprechende Reaktion auf 1 mM ATP.

4.8.2.3 Untersuchung der Mutation Arginin → 275 → Alanin (R275A)

Das Arginin an Position 275 wurde gegen Alanin ausgetauscht, da Moro et al. für ein entsprechendes Arginin (R287) im P2Y$_1$-Rezeptor-Protein eine Beteiligung an der konformativen Anordnung der extrazellulären Loops sowie an der Erkennung von extrazellulärem ATP als Agonist postulierten (Moro *et al.*, 1999). Das Arginin an Position 275 liegt in der dritten extrazellulären Schleife des P2Y$_{11}$-Rezeptors.

Die isolierten 1321N1-hisP2Y$_{11}$R275A-Zellklone wurden analog zur 1321N1-hisP2Y$_{11}$-WT-Zelllinie und zur C102A-Mutante untersucht. Alle Klone wurden am gleichen Tag im FACS-Assay auf die Expression des Rezeptors und im Calcium-Assay auf ihre Funktionalität (Reaktion auf 10 µM ATPγS) überprüft und mit den Zelllinien 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT, 1321N1-P2Y$_{11}$GU und 1321N1-WT verglichen. Die Calcium-Messungen wurden mit angehefteten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.83 dargestellt.

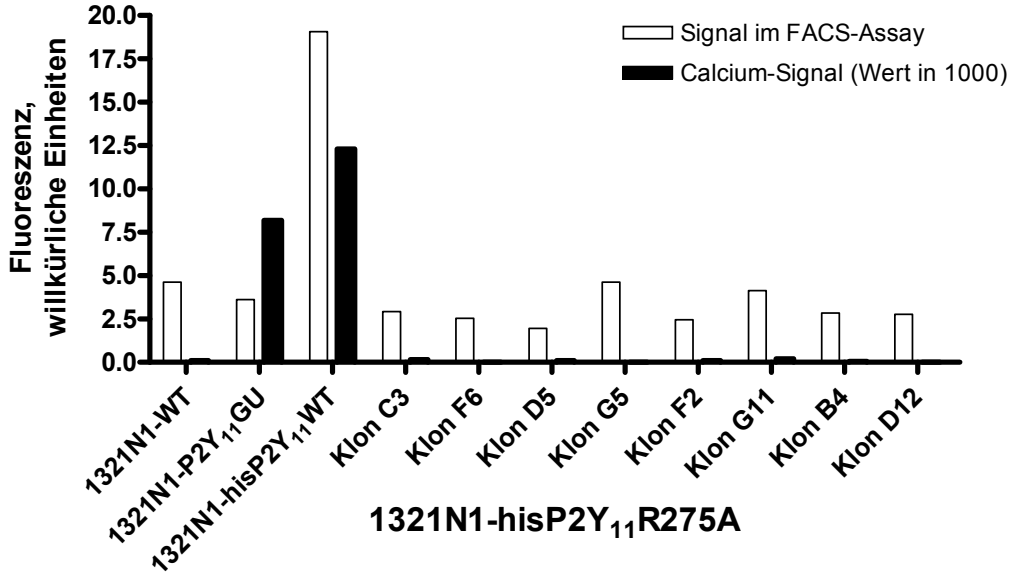


Abb. 4.83 Vergleich verschiedener 1321N1-hisP2Y$_{11}$R275A-Zellklone hinsichtlich der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Fluoreszenz im FACS-Assay) und der Calcium-Ausschüttung nach Stimulation mit 10 µM ATPγS (Fluoreszenz im Calcium-Assay). Die Fluoreszenz der 1321N1-WT- und 1321N1-P2Y$_{11}$GU-Zellen im FACS-Assay gibt die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an den Zellen wieder. Die Daten stellen den geometrischen Mittelwert von 10.000 Zellen dar.

Auch die acht isolierten und vermehrten Klone der Zelllinie 1321N1-hisP2Y$_{11}$R275A zeigten keine Expression des Rezeptors. Dies wird auch hier durch die niedrigen Fluoreszenz-Signale im FACS-Assay belegt. Hier wurde keine Fluoreszenz detektiert, die über das Hintergrundsignal durch die unspezifische Bindung des anti-his-Antikörpers an Zellen ohne Histidin-Rest hinausging (vgl. Kapitel 4.8.1).

Im Calcium-Assay wurden keine Fluoreszenz-Signale bei Injektion von 10 µM ATPγS detektiert. Auch hier wurde zur Kontrolle der Zellfunktionen 10 µM Histamin injiziert. Alle Zellklone zeigten dabei eine Calcium-Ausschüttung. Die Klone C3, D5 und F2 reagierten auf 1 mM ATP mit einem Calcium-Signal, das ca. 35 % des durch Histamin hervorgerufenen Signals entspricht. Bei 3,16 mM ATP erreichte das Fluoreszenz-Signal etwa 80 % der Antwort auf Histamin. Das durch 1 mM ATP hervorgerufene Calcium-Signal konnte durch NF340, das in Konzentrationen zwischen 1 µM und 100 µM auf den Zellen vorinkubiert wurde, nicht blockiert oder reduziert werden. Da außerdem auch bei 1321N1-WT-Zellen ein Calcium-Signal als Reaktion auf 1 mM ATP gemessen wurde, kann die Calcium-Ausschüttung der Klone als Reaktion auf diese Konzentrationen des Nukleotids als nicht spezifisch angesehen werden.

4.8.2.4 Untersuchung der Mutation Arginin → 276 → Alanin (R276A)

Direkt neben dem Arginin an Position 275 liegt ein weiteres Arginin auf Position 276 in der dritten extrazellulären Schleife des $P2Y_{11}$-Rezeptors. Auch dieses Arginin wurde gegen Alanin ausgetauscht, um entsprechend der Ergebnisse von Moro et al. (Moro *et al.*, 1999) zu untersuchen, ob es mit der Erkennung des Agonisten oder bei der konformativen Anordnung der extrazellulären Loops in Zusammenhang steht. Die R276A-Mutante am $P2Y_{11}$-Rezeptor ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden (Zylberg *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2001b).

Die isolierten 1321N1-his$P2Y_{11}$R276A-Zellklone wurden analog zum his$P2Y_{11}$WT-Rezeptor und zu den beiden anderen Mutanten untersucht. Alle Klone wurden am gleichen Tag im FACS-Assay auf die Expression des Rezeptors und im Calcium-Assay auf ihre Funktionalität (Reaktion auf 10 µM ATPγS) überprüft und mit den Zelllinien 1321N1-his$P2Y_{11}$WT, 1321N1-$P2Y_{11}$GU und 1321N1-WT verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.84 dargestellt.

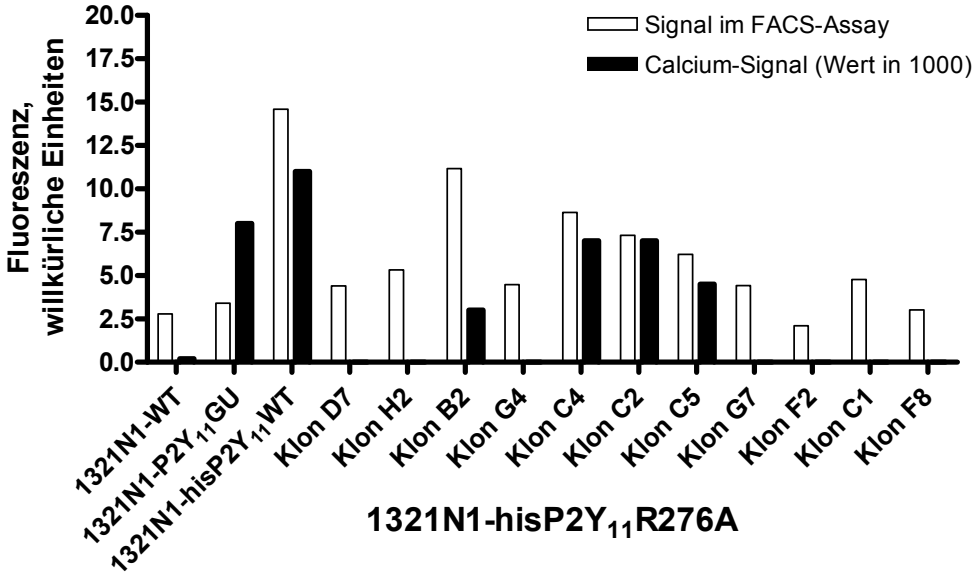


Abb. 4.84 Vergleich verschiedener 1321N1-his$P2Y_{11}$R276A-Zellklone hinsichtlich der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Fluoreszenz im FACS-Assay) und der Calcium-Ausschüttung nach Stimulation mit 10 µM ATPγS (Fluoreszenz im Calcium-Assay). Die Fluoreszenz der 1321N1-WT- und 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen im FACS-Assay gibt die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an den Zellen wieder. Die Daten stellen den geometrischen Mittelwert von 10.000 Zellen dar.

Bei zwei der elf isolierten und vermehrten Klone der Zelllinie 1321N1-his$P2Y_{11}$R276A (F2, F8) wurden im FACS-Assay Fluoreszenzen detektiert, die in der Größenordnung

des Hintergrundsignals durch die unspezifische Bindung des anti-His-Antikörpers an Zellen ohne Histidin-Rest liegen (vgl. Kapitel 4.8.1). Bei fünf weiteren Klonen (D7, H2, G4, G7, C1) liegen die im FACS-Assay gemessenen Fluoreszenzen knapp über dem Hintergrundsignal, während im Calcium-Assay keine Reaktion auf 10 µM ATPγS detektiert wurde. Die restlichen vier Klone (B2, C4, C2, C5) zeigten im FACS-Assay Fluoreszenzsignale, die über das Hintergrundsignal hinausgehen, und gleichzeitig im Calcium-Assay eine deutliche Reaktion auf 10 µM ATPγS. Zwei der vier Klone (B2, C4) lieferten während der weiteren Kultivierung bei der Injektion von ATP bzw. ATPγS im Calcium-Assay keine Signale mehr. Von den beiden verbleibenden Klonen (C2, C5) wurde C2 für die weitere Untersuchung der Mutante $P2Y_{11}R267A$ ausgewählt. Einzelne Versuche mit dem Klon C5 bestätigten die Ergebnisse des Klones C2.

Zunächst wurden an der Zelllinie 1321N1-$hisP2Y_{11}R276A$ Konzentrations-Effekt-Kurven für den Agonisten ATP aufgenommen (Abb. 4.85). Hier zeigte sich, dass ATP den mutierten Rezeptor auch weiterhin aktivieren konnte. Für die 1321N1-$hisP2Y_{11}WT$-Zelllinie wurde ein pEC_{50}-Wert von 6,26 ± 0,04 (n = 4; EC_{50}: 549 nM) und für die R276A-Mutante von 6,26 ± 0,08 (n = 5; EC_{50}: 551 nM) bestimmt. Die EC_{50}-Werte sind somit nicht signifikant verschieden voneinander.

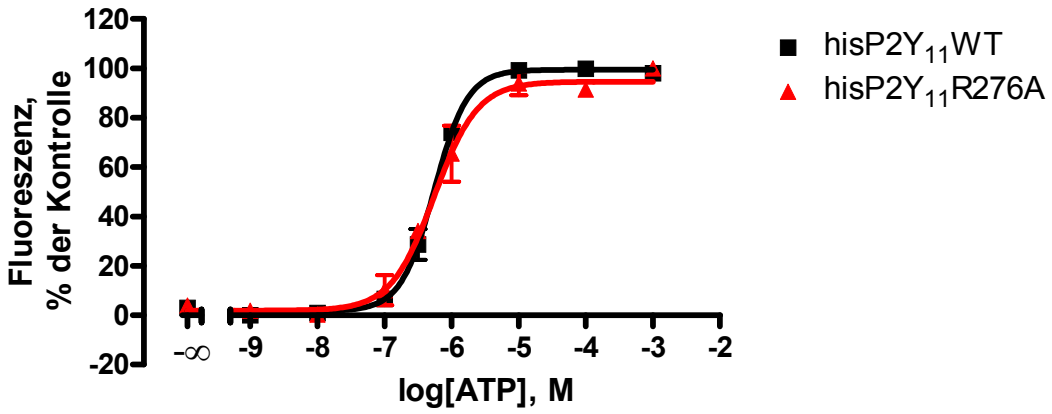


Abb. 4.85 Konzentrations-Effekt-Kurven von ATP an 1321N1-$hisP2Y_{11}WT$-Zellen (n = 4) und 1321N1-$hisP2Y_{11}R278A$-Zellen (n = 5) im Calcium-Assay. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATP maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von 1.

Auch der Antagonist NF340 wurde an diesen Zellen untersucht. Um Konzentrations-Inhibitions-Kurven (Abb. 4.86) aufzunehmen, wurden beide Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen von NF340 vorinkubiert, bevor 10 µM ATP mit Hilfe des NOVOstars® zugegeben wurden.

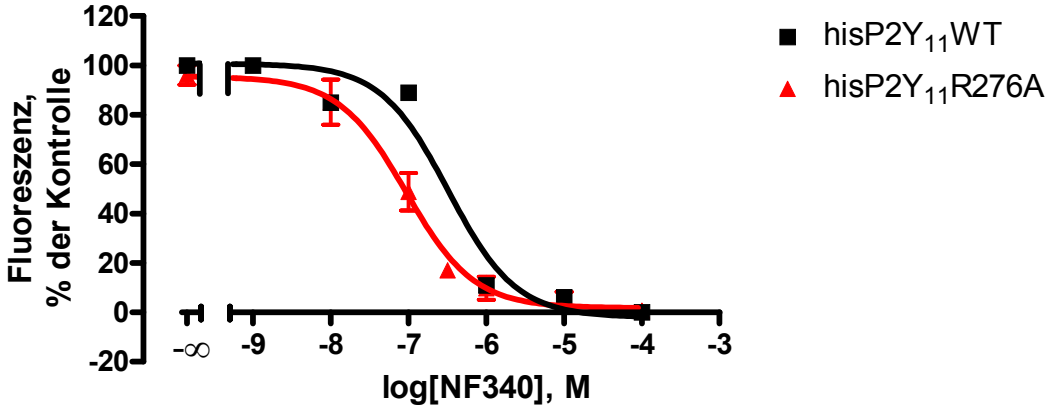


Abb. 4.86 Konzentrationsabhängige Inhibition der durch 10 µM ATP hervorgerufenen Calcium-Antwort durch NF340 am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor (n = 6) und am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor (n = 3), stabil exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATP maximal erreichten Antwort. Die Hillslopes sind nicht signifikant verschieden von1.

Für NF340 konnten funktionelle apparente pK$_i$-Werte von 7,77 ± 0,15 für den hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor und 8,31 ± 0,11 für den hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor mit ATP als Agonist bestimmt werden. Am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor wurde bereits ein funktioneller apparenter pK$_i$-Wert von NF340 von 7,76 ± 0,23 mit ATPγS ermittelt (vgl. Abb. 4.77). Damit liegen die beiden pK$_i$-Werte, die am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor ermittelt wurden, in der gleichen Größenordnung. Der pK$_i$-Wert, der am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor bestimmt wurde, ist jedoch signifikant verschieden ($p < 0,001$) im Vergleich zum pK$_i$-Wert am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor.

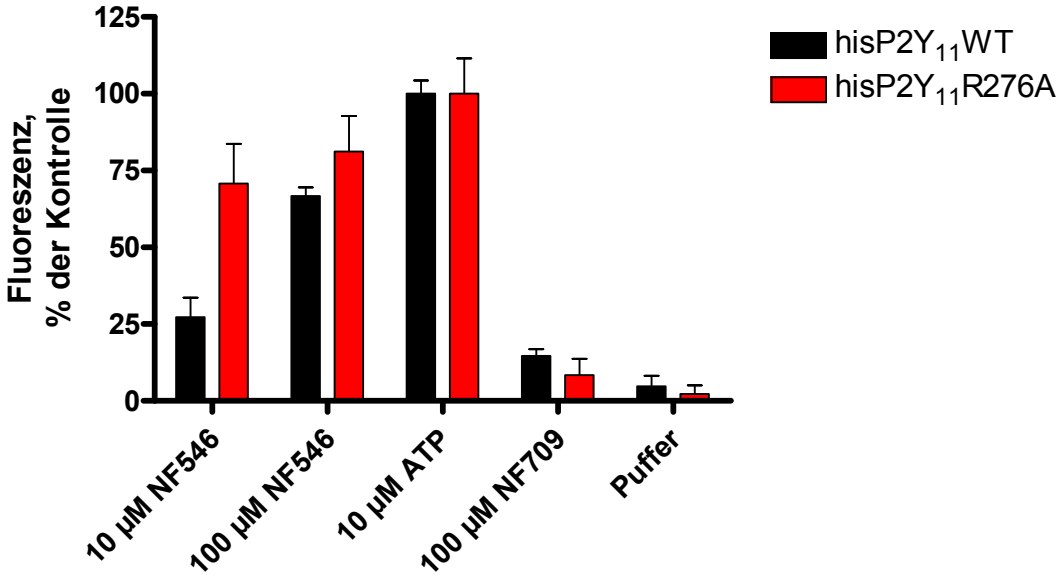


Abb. 4.87 Agonistische Effekte durch 10 µM und 100 µM NF546, 10 µM NF709, sowie 10 µM ATP am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor und am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. „% der Kontrolle“ ist hier der prozentuale Anteil der durch Stimulation mit ATP maximal erreichten Antwort.

Bei weiteren Untersuchungen wurden auch die beiden Agonisten NF546 und NF709 an der Mutante getestet. Bei NF709 wurde ein Calcium-Signal detektiert, das sich nicht signifikant von dem Signal der Puffer-Kontrolle unterscheidet. NF709 konnte demnach den hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor nicht aktivieren. Dagegen verursachte NF546 bei einer Konzentration von 100 µM ein Calcium-Signal an dieser Mutante, das sich nicht signifikant vom Signal der hisP2Y$_{11}$WT-Zellinie unterscheidet (Abb. 4.87; hisP2Y$_{11}$WT: 66,7 ± 4,7 % der ATP-Antwort; hisP2Y$_{11}$R276A: 81,1 ± 23,1 % der ATP-Antwort). Bei einer Konzentration von 10 µM NF546 war beim WT-Rezeptor dagegen nur eine Aktivierung von 27,2 ± 11,1 % der ATP-Antwort zu verzeichnen, während bei der Mutante ein Signal gemessen wurde, das 70,8 ± 25,9 % der ATP-Antwort entspricht. Deshalb wurde an beiden Rezeptoren eine Konzentrations-Effekt-Kurve für NF546 bestimmt (Abb. 4.88).

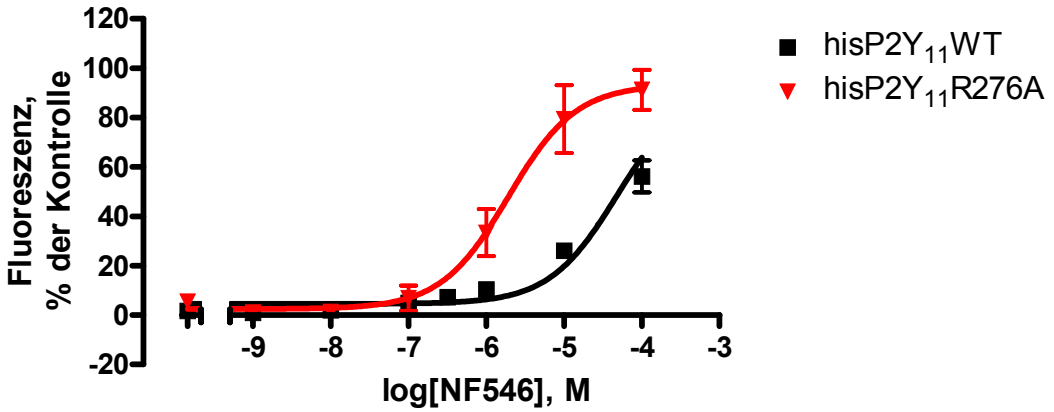


Abb. 4.88 Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 (jeweils n = 4) als Agonisten am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor bzw. am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor, rekombinant exprimiert in 1321N1-Zellen. Die Werte wurden auf die Calcium-Antwort von 10 µM ATP bezogen, daher stellt hier „% der Kontrolle“ den prozentualen Anteil der durch Stimulation mit ATP maximal erreichten Antwort dar.

Für NF546 wurde am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor ein pEC$_{50}$-Wert von 5,71 ± 0,14 (n = 4; EC$_{50}$: 1,92 µM) ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven von NF546 und ATP weichen nicht signifikant voneinander ab. Demnach ist NF546 ein Vollagonist am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor. Mit NF546 konnte am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor nicht das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve erreicht werden. Daher wurde bei der Auswertung der Kurve das obere Plateau auf den Wert von 10 µM ATP festgesetzt. Auf diese Weise wurde ein pEC$_{50}$-Wert von 4,32 ± 0,16 (n = 4; EC$_{50}$: 48 µM) berechnet. Damit ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei den pEC$_{50}$-Werten für NF546 ($p < 0,001$).

5 Diskussion

5.1 Etablierung der verschiedenen P2Y-Rezeptor-exprimierenden Zellen

Von Communi et al. wurden zwei Spleißvarianten des $P2Y_{11}$-Rezeptors identifiziert, die sich in der Sequenz am Amino-terminalen Ende (MDR- bzw. MAANVS-; vgl. Kapitel 1.3 und Kapitel 4.1.3.5) unterscheiden (Communi *et al.*, 1997; Communi *et al.*, 2001). Eine 1321N1-Zellinie mit der stabil transfizierten MDR-Spleißvariante wurde von D. Communi und J.M. Boeynaems für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die MAANVS-Spleißvariante wurde im Rahmen dieser Arbeit durch stabile Transfektion in 1321N1-Zellen eingebracht. Beide Varianten konnten daher anhand des Effekts verschiedener Substanzen funktionell untersucht und charakterisiert werden.

Die beiden Zelllinien liefern hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit durch verschiedene Nukleotide und in den Schild-Analysen des neu identifizierten Antagonisten NF340 keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse (vgl. Abb. 4.7 und Abb. 4.32). Beide Zelllinien liefern gleiche pA_2-Werte für NF340 (MDR-Variante: $pA_2 = 7{,}98 \pm 0{,}10$; MAANVS-Variante: $pA_2 = 8{,}02 \pm 0{,}06$). Auf die unterschiedlichen pK_i-Werte, die für NF340 an beiden Rezeptor-Varianten bestimmt wurden, wird in Kapitel 5.2.1 näher eingegangen. Bei den im Calcium-Assay getesteten ATP- und ADP-Analogen, außer bei $\alpha\beta$-Me-ADP, zeigten sich keine signifikanten Abweichungen in den Potenzen. Die Reihenfolge der Potenzen stimmt für beide Rezeptor-Varianten überein und ist mit der Reihenfolge, die in der Literatur an der MDR-$P2Y_{11}$-Variante beschrieben wurde (Communi *et al.*, 1999), vergleichbar (ATPγS ≈ BzBzATP > ATP ≈ ADPβS > 2-MeSATP > ADP > α,β-Me-ADP). Jedoch traten Unterschiede in den Potenzen von ATPγS bei den Schildplots von NF340 an beiden Rezeptor-Varianten (vgl. Tab. 4.12 und Tab. 4.13) und in den Potenzen von NF546 beim Schildplot mit NF157 bzw. NF340 an der MAANVS-Variante auf (vgl Tab. 4.22 und Tab. 4.23). Diese Befunde können über die Anzahl der Versuche und die unterschiedlichen Zeitpunkte, zu denen die Experimente durchgeführt wurden, erklärt werden. Anders als bei Bindungsstudien unterliegen funktionelle Assays in einem gewissen Rahmen Schwankungen. Durch die Mittelung vieler Experimente ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr. Deshalb müssen un wurden auch pK_i-Werte für den

Vergleich von Antagonisten herangezogen, durch deren Berechnung Assay-bedingte Schwankungen der pIC_{50} heraus gerechnet wurden (Cheng and Prusoff, 1973).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem drei weitere P2Y-Rezeptor-Subtyp-exprimierende Zelllinien hergestellt und etabliert ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$; vgl. Kapitel 4.1.3 und Tab. 5.1). Die Zelllinien 1321N1-$P2Y_4$ und 1321N1-$P2Y_{12}$ wurden von Prof. Gachet für Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Zelllinien wurde die Selektivität der getesteten Substanzen überprüft.

Tab. 5.1 Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen EC_{50}-Werte verschiedener Agonisten an $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren mit Werten aus der Literatur.

	Agonist	EC_{50} [nM] diese Arbeit	EC_{50} [nM] Literaturwert	Literaturstelle
$P2Y_1$	2-MeSADP	3,5 ± 1,2	6	Chhatriwala et al. (2004)
	ATP	243 ± 84	200	Nahum V et al. (2002)
$P2Y_2$	UTP	139 ± 17	140	Jacobson et al. (2000)
	ATP	181 ± 22	230	
$P2Y_4$	UTP	20 ± 6	50-800 (IP_3!)	Brunschweiger *et al.* (2006) Muller (2002)
$P2Y_6$	UDP	129 ± 15	11 (Ca^{2+})/ 300 (IP_3)	Cox et al. (2005) Communi et al. (1996)
$P2Y_{12}$	2-MeSADP	1,1 ± 0,3	0,078 bis 14	Zhong et al. (2004)

5.2 Antagonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor

Bisher sind nur wenige Subtyp-selektive und potente Liganden für P2-Rezeptoren bekannt (vgl. Tab. 1.1, (Abbracchio *et al.*, 2006; von Kugelgen, 2006)). Dies erschwert die Evaluierung der physiologischen Rolle der P2-Rezeptoren. Mit Suramin wurde eine Substanz beschrieben, die relativ unspezifisch mit P2-Rezeptoren interagiert (Charlton *et al.*, 1996; Dunn and Blakeley, 1988). Strukturverwandte Substanzen des Suramins (z. B. NF110, NF449, NF864) konnten bereits sehr erfolgreich als P2X-Rezeptor-selektive Antagonisten mit teilweise subnanomolarer Potenz identifiziert werden (Hausmann *et al.*, 2006; Horner *et al.*, 2005; Kassack *et al.*, 2004). Für den $P2Y_{11}$-Rezeptor wurde in der Literatur bisher nur das Suramin als Antagonist beschrieben (Communi *et al.*, 1999).

Wie bereits in der Einleitung aufgeführt, werden dem $P2Y_{11}$-Rezeptor entweder auf Grund von mRNA-Profilen in verschiedenen Geweben, funktioneller Studien an Immunzellen oder klinischer Studien am Menschen wichtige physiologische Funktionen zugeschrieben (siehe Kapitel 1.3). Der $P2Y_{11}$-Rezeptor scheint demzufolge im Immunsystem, bei der Erythropoese sowie als Risikofaktor beim akuten Myokardinfarkt eine Rolle zu spielen (Amisten *et al.*, 2007; Marteau *et al.*, 2005; Fröhlen and Kauschat, 2004). Sichere Aussagen zur physiologischen Funktion des $P2Y_{11}$-Rezeptors sind auf Grund des Fehlens eines orthologen Rezeptors im Maus- oder Rattengenom und dem Mangel an selektiven Liganden jedoch schwierig (Abbracchio *et al.*, 2006; Brautigam *et al.*, 2005). Um neue Liganden für den $P2Y_{11}$-Rezeptor zu identifizieren, wurde eine Reihe strukturell dem Suramin ähnlicher Substanzen aus dem Substanzkatalog von Prof. Nickel und Prof. Kassack getestet.

5.2.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung der getesteten Antagonisten

21 von insgesamt 60 Substanzen wurden im Calcium-Assay genauer untersucht und apparente pK_i-Werte oder pA_2-Werte bestimmt (vgl. Abb. 5.1). Bei neun dieser 21 Substanzen (NF127, NF151, NF198, NF222, NF058, NF248, NF324, NF341 und NF063) ist der pK_i-Wert kleiner oder gleich dem pK_i-Wert des bekannten Antagonisten Suramin (pK_i = 6,52 ± 0,13).

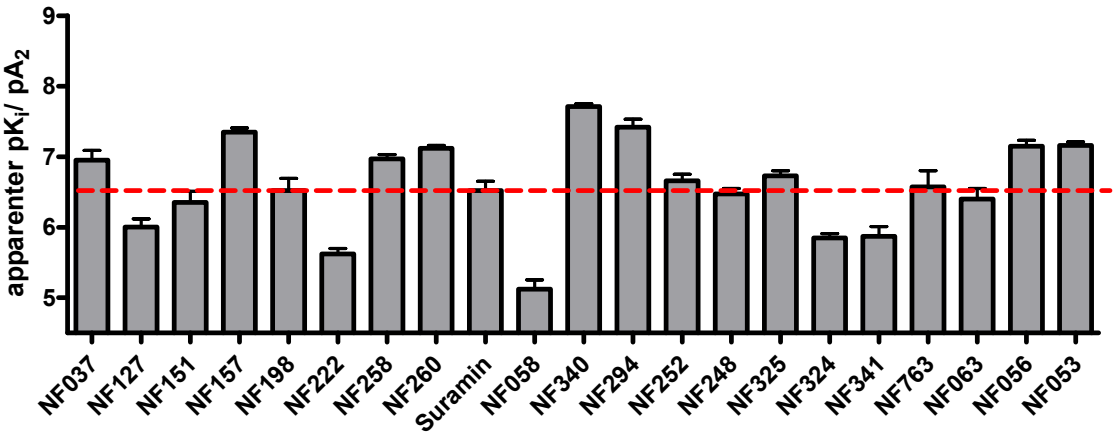


Abb. 5.1 Apparente pK_i-Werte verschiedener NF-Substanzen, bestimmt im Calcium-Assay am $P2Y_{11}$-Rezeptor. Die Strukturformeln sind in Tab. 3.12 dargestellt. ----- pK_i-Wert von Suramin.

Die Substanzen NF037, NF127, NF151, NF157, NF198, NF222, NF258 und NF260 sind direkte Analoge des Suramins (vgl. Tab. 3.12), bei denen nur die Methyl-Gruppen variiert wurden (siehe Abb. 4.16). Bei diesen Substanzen zeigte sich, dass bei größeren Substituenten (Ethyl- (NF127), Isopropyl- (NF151), Phenyl- (NF198) und Methoxymethyl-Reste (NF222)) die Affinität zum $P2Y_{11}$-Rezeptor im Vergleich zum Suramin abnimmt. Substituenten mit einem negativen induktiven Effekt (-I) (-OCH_3, -Cl und -F), bewirken dagegen eine Zunahme der inhibitorischen Potenz gegenüber Suramin.

Mit NF157 wurde ein Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor identifiziert, der einen apparenten pK_i-Wert von 7,35 aufweist. Für diesen Antagonisten konnte ein kompetitives Verhalten nachgewiesen werden. Im Calcium- und im cAMP-Assay sind die Hillslopes der Konzentrations-Inhibitions-Kurven nicht signifikant verschieden von 1 (vgl. Abb. 4.18 und Abb. 4.21). Zudem wurde in einer Analyse nach Schild eine Steigung bestimmt, die nicht signifikant verschieden von 1 ist (vgl. Abb. 4.20), was ebenfalls für einen kompetitiven Mechanismus spricht (Schild, 1957). Der sich aus der Schild-Analyse ergebende pA_2-Wert beträgt 7,77. Diese Befunde wurden von im Journal of Medicinal Chemistry veröffentlicht (Ullmann *et al.*, 2005).

Neben der Methyl-Gruppe wurden weitere Bereiche des Suramin-Moleküls verändert. Einige der untersuchten Substanzen wiesen Variationen des Naphthylsulfonsäurerestes auf. In Abb. 5.2 sind die Struktur-Wirkungs-Beziehungen für Suramin-Analoga zusammenfassend dargestellt.

Bei NF763 und seinen Analogen sind nur die Naphthylsulfonsäure-Reste gegenüber Suramin verändert, während sich die Grundgerüste ansonsten gleichen. Der Austausch der Sulfonsäuregruppe an Position 3 des Naphthylrings gegen eine Methoxygruppe (NF763) zieht keinen signifikanten Verlust der inhibitorischen Potenz nach sich (pK_i = 6,57; vgl. Abb. 4.17 und Abb. 5.2). Wurde jedoch die Sulfonsäure an Position 1 gegen eine Methoxygruppe ausgetauscht (NF742), konnte keine inhibitorische Wirkung der Substanz auf das von 1 µM ATPγS hervorgerufene Signal detektiert werden (vgl. Tab. 4.3). Andere Methoxy-Derivate des Suramins (NF756, NF770, NF778) zeigten ebenfalls keine oder nur eine sehr geringe inhibitorische Potenz am $P2Y_{11}$-Rezeptor (vgl. Tab. 4.3).

Bei NF063 sind die Naphthylreste des Suramins gegen Phenylreste ausgetauscht, die zwei Sulfonsäuren in ortho- und meta-Stellung zur Verknüpfung tragen. Auch bei

dieser Substanz zeigte sich keine signifikante Veränderung der inhibitorischen Potenz gegenüber Suramin (pK_i = 6,40; vgl. Abb. 4.17).

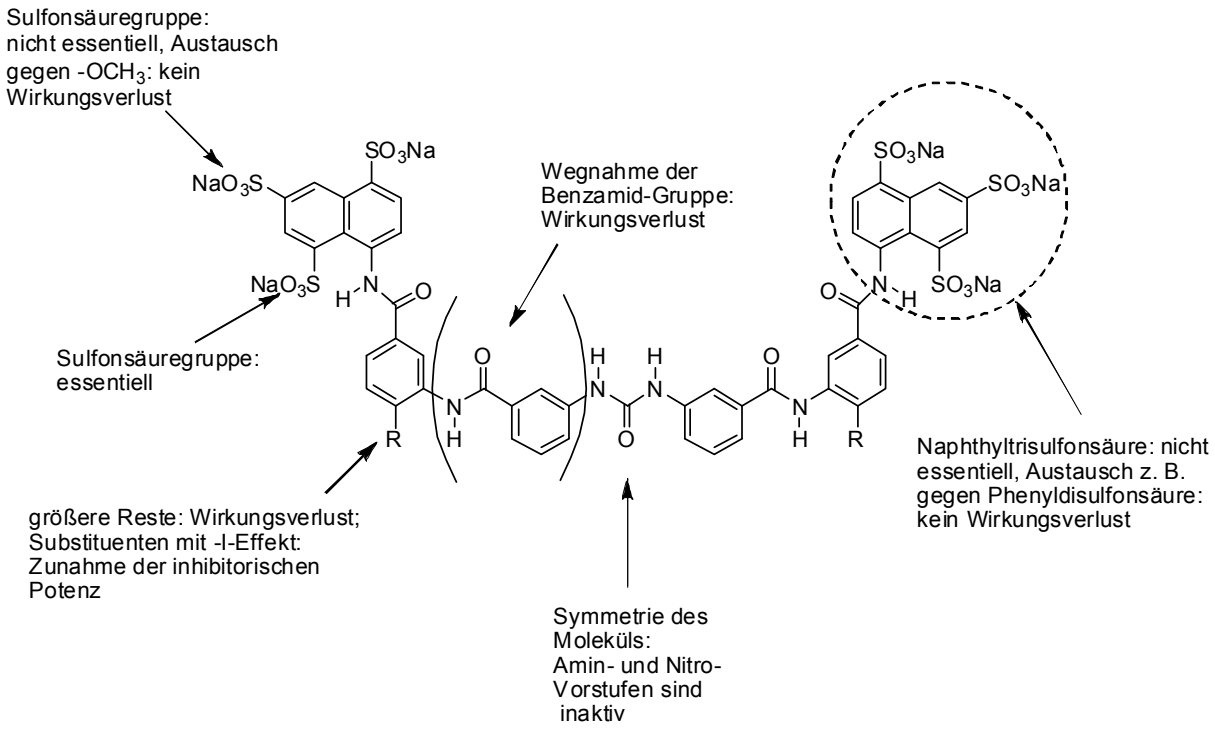


Abb. 5.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Suramin-Analoga auf der Basis von Konzentrations-Inhibitions-Kurven am $P2Y_{11}$-Rezeptor im Calcium-Assay. Anmerkungen gelten auf beiden Seiten des symmetrischen Moleküls.

Bei NF058 ist die Grundstruktur des Suramins bei gleicher Anordnung der Sulfonsäuren auf jeder Seite der Harnstoffbrücke um eine Benzamid-Gruppe verkürzt. Diese Substanz weist eine im Vergleich zu Suramin deutlich niedrigere inhibitorische Potenz auf (pK_i = 5,12 ± 0,13; vgl. Kapitel 4.2.1).

Bereits 1998 konnte von Tuluc et al. durch Untersuchungen mit Reactive-Blue-Derivaten gezeigt werden, dass die Positionen der Sulfonsäuren einen wichtigen Einfluss auf die Potenz von P2-Antagonisten haben (Tuluc *et al.*, 1998). Eine Verschiebung der Sulfonsäure am Phenylring des Reactive-Blue-2 resultierte in einer Erhöhung der Affinität um eine Zehnerpotenz.

Substanzen, bei denen entweder die Anordnung der drei Sulfonsäuren am Naphthylrest oder die Verknüpfung des Naphthylrestes zum Rest des Moleküls gegenüber NF058 verändert sind (vgl. Abb. 4.22), zeigen in einigen Fällen eine höhere inhibitorische Potenz als NF058.

Ist nur die Anordnung der Sulfonsäuren verändert (NF248), so ist eine verbesserte inhibitorische Potenz zu beobachten, die sich durch einen um 1,35 log-Einheiten erhöhten apparenten pK_i-Wert ausdrückt (pK_i = 6,47, vgl. Tab. 4.8). Bei NF252 ist zusätzlich die Verknüpfungsstelle von Position 8 nach Position 7 verschoben (pK_i = 6,66, vgl. Tab. 4.8). Damit liegen die pK_i-Werte dieser beiden Substanzen in der Größenordnung des pK_i-Wertes von Suramin.

Bei NF294 ist gegenüber NF058 die Sulfonsäure an Position 3 entfernt und die Verknüpfungsstelle des Naphthylrestes von Position 8 nach Position 7 verschoben. Hier wurde eine weitere Verbesserung der inhibitorischen Potenz verzeichnet (pK_i = 7,42, vgl. Tab. 4.8). In einer Analyse nach Schild wurde für diese Substanz ein pA_2-Wert von 7,53 bestimmt (vgl. Abb. 4.29). Die Steigung des Schild-Plots ist nicht signifikant verschieden von 1, womit auch für NF294 am $P2Y_{11}$-Rezeptor ein kompetitiver Mechanismus angenommen werden kann (Schild, 1957). Das Disulfonsäure-Derivat NF294 ist am $P2Y_{11}$-Rezeptor damit potenter als der Antagonist NF157.

Das Terephthalsäurebisamid- (NF325) und das Isophthalsäurebisamid-Derivat (NF324) von NF294 weisen eine im Vergleich zu NF294 verringerte inhibitorische Potenz auf. Für NF325 wurde ein pK_i-Wert von 6,73 und für NF324 von 5,85 bestimmt (vgl. Abb. 4.25). Auch bei anderen Phthalsäurebisamid-Derivaten konnte dieses Verhalten beobachtet werden (pK_i: NF341 = 5,87; NF342 < 5,87; vgl. Abb. 4.27 und Tab. 4.10).

Wurde der Verknüpfungspunkt der Naphthylsulfonsäure bei NF294 von Position 7 zu Position 8 verschoben (NF290), zur der Position, über die die Naphthylsulfonsäurereste des NF157 mit dem Rest des Moleküls verbunden sind, so konnte nur eine geringe inhibitorische Aktivität detektiert werden (28 % Hemmung des ATPγS-Signals bei 10 µM NF290; vgl. Tab. 4.7). Auch bei NF298, bei dem gegenüber NF290 eine Sulfonsäure von Position 1 auf Position 3 verschoben ist, wurde keine inhibitorische Aktivität am $P2Y_{11}$-Rezeptor gemessen (vgl. Tab. 4.7).

Durch eine kleine Variation von NF294 konnte der bisher beste Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor identifiziert werden. Bei NF340 sind alle Substituenten am Naphthylrest im Vergleich zu NF294 um jeweils eine Position verschoben (Verknüpfung zum Rest des Moleküls an Position 8, Sulfonsäuren an Positionen 2 und 6). Die Verknüpfungsstelle an Position 8 des Naphthylrings stimmt mit der Verknüpfungsstelle beim NF157 überein. NF340 weist gegenüber NF157 jedoch eine

andere Anordnung der beiden Sulfonsäuren auf und ist durch das Entfernen einer Benzamid-Gruppe auf jeder Seite des symmetrischen Moleküls verkleinert. Bei NF340 konnte unter allen getesteten Substanzen der höchste apparente pK_i-Wert (MAANVS-Rezeptor-Variante: 7,71) und einen sehr hoher pA_2-Wert (MAANVS-Rezeptor-Variante: 8,02) bestimmt werden (vgl. Kapitel 4.3.5.2 und Tab. 5.2). An beiden Rezeptor-Varianten lieferte die Analyse nach Schild nicht signifikant von 1 verschiedene Steigungen der Ausgleichsgeraden. Damit kann auch für NF340 ein kompetitiver Antagonismus am $P2Y_{11}$-Rezeptor angenommen werden (Schild, 1957). Zusammenfassend sind in Abb. 5.3 die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF340 und seinen Analogen dargestellt.

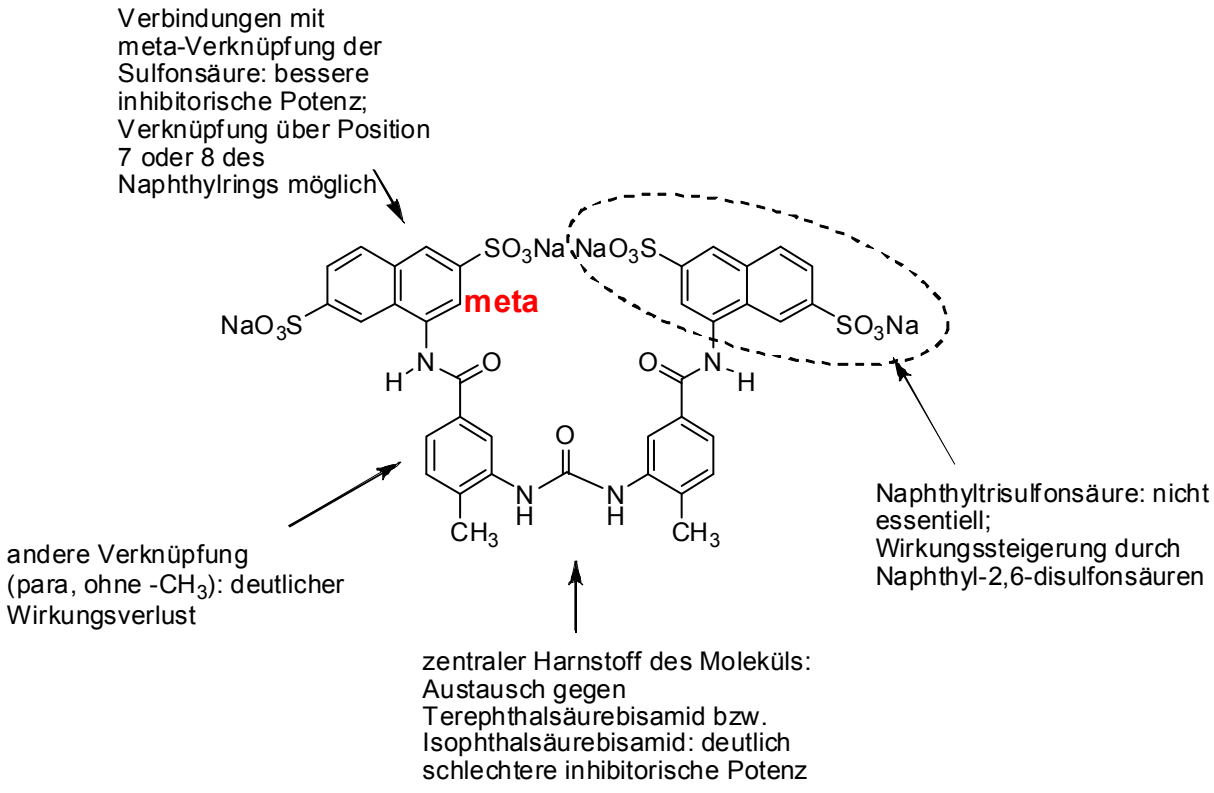


Abb. 5.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF340-Analoga auf der Basis von Konzentrations-Inhibitions-Kurven am $P2Y_{11}$-Rezeptor. Anmerkungen gelten auf beiden Seiten des symmetrischen Moleküls.

Tab. 5.2 Vergleich der ermittelten pK_i- und pA_2-Werte von NF340 im Calcium-Assay bzw. im cAMP-Reportergen-Assay an 1321N1-$P2Y_{11}$-Zellen („MDR"-Variante), 1321N1-$P2Y_{11}$GU-Zellen („MAANVS"-Variante), 1321N1-his$P2Y_{11}$WT-Zellen und 1321N1-his$P2Y_{11}$R276A.

Rezeptor	Assay	verwendeter Agonist	pK_i- oder pA_2-Wert von NF340	
„MDR"-Variante	Calcium	ATPγS	pK_i: 8,24 ± 0,07	Tab. 4.8
	Calcium	ATPγS	pA_2: 7,98 ± 0,10	Abb. 4.32
„MAANVS"-Variante	Calcium	ATPγS	pK_i: 7,71 ± 0,04	Abb. 4.27
	cAMP	ATPγS	pK_i: 7,82 ± 0,06	Abb. 4.30
	Calcium	ATPγS	pA_2: 8,02 ± 0,06	Abb. 4.32
	Calcium	NF546	pA_2: 8,04 ± 0,25	Abb. 4.48
	cAMP	NF546	pA_2: 7,96 ± 0,13	Abb. 4.50
his$P2Y_{11}$WT	Calcium	ATPγS	pK_i: 7,76 ± 0,23	Abb. 4.77
	Calcium	ATP	pK_i: 7,77 ± 0,15	Abb. 4.86
	Calcium	ATP	pA_2: 7,96 ± 0,13	Abb. 4.79
his$P2Y_{11}$R276A	Calcium	ATP	pK_i: 8,31 ± 0,11	Abb. 4.86

In Tab. 5.2 sind die Ergebnisse für NF340 aus dieser Arbeit zusammengestellt. Alle pK_i-Werte aus beiden Assay-Systemen liegen in einem Bereich von 7,71 bis 7,82 mit Ausnahme der pK_i-Werte, die an der MDR-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors (8,24) und an der Rezeptor-Mutante R276A (8,31) bestimmt wurden. Der pK_i-Wert, der am his$P2Y_{11}$R276A-Rezeptor bestimmt wurde, wird in Kapitel 5.6 diskutiert. Mit 8,24 wurde ein pK_i-Wert der MDR-Variante des $P2Y_{11}$-Rezeptors bestimmt, der signifikant verschieden von den anderen ermittelten Werten ist. Dagegen konnten an allen Rezeptor-Varianten in Analysen nach Schild pA_2-Werte ermittelt werden, die zwischen 7,96 und 8,04 liegen. Bei der Bestimmung der pA_2-Werte werden mehrere Konzentrations-Effekt-Kurven eines Agonisten in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen des Antagonisten aufgenommen. Damit fließt eine Vielzahl an Daten in die Auswertung ein (Arunlakshana and Schild, 1959). Bei der Bestimmung der pK_i-Werte wird eine Konzentrations-Inhibitions-Kurve mit einer fixen Konzentration des Agonisten aufgenommen. Nach Cheng und Prusoff sollte die gewählte Konzentration des Agonisten im Bereich seiner EC_{50} liegen (Cheng, 2002; Cheng and Prusoff, 1973). Da jedoch die im Calcium-Assay und im cAMP-Reportergen-Assay bestimmten EC_{50}-Werte für den Agonisten in einem gewissen

Bereich schwanken, wurde für die Aufnahme der Konzentrations-Inhibitions-Kurven eine Konzentration gewählt, die 10- bis 20-fach über der EC_{50} und damit nicht mehr in den Grenzen von Cheng/ Prusoff lag (Cheng and Prusoff, 1973). Daher sind die pA_2-Werte als präzisere Daten gegenüber den pK_i-Werten anzusehen.

5.3 Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor

Bei der Untersuchung der Antagonist-Aktivität der NF-Substanzen wurden alle Substanzen routinemäßig auch auf ihre agonistische Aktivität überprüft. Ursprünglich wurde erwartet, dass Suramin und seine Derivate aus dem Substanzkatalog von Prof. Nickel/ Prof. Kassack ausschließlich antagonistische Effekte am $P2Y_{11}$-Rezeptor zeigen würden, da bisher aus dieser Substanzgruppe nur Antagonisten an P2-Rezeptoren beschrieben wurden. Als Beispiele seien hier NF110 als $P2X_3$-Rezeptor-Antagonist (Hausmann *et al.*, 2006), NF449 und NF864 als $P2X_1$-Rezeptor-Antagonisten (Hulsmann *et al.*, 2003; Horner *et al.*, 2005) oder Suramin selber als unspezifischer P2Y-Rezeptor-Antagonist (Burnstock, 2007) genannt. Außerdem wurden bisher keine nicht-nukleotidischen Agonisten an P2-Rezeptoren beschrieben (vgl. Tab. 1.1). Eine Calcium-Ausschüttung nach Injektion von NF-Substanzen ist daher eine interessante Beobachtung.

5.3.1 NF546 - ein Vollagonist

NF546 ist ein Analogon des Suramins. Es weist anstelle der Naphthylsulfonsäuren einen benzylischen Diphosphonsäurerest auf. NF546 konnte den $P2Y_{11}$-Rezeptor aktivieren und eine Calcium-Ausschüttung hervorrufen. Es zeigt eine intrinsische Aktivität, die sich nicht signifikant von der intrinsischen Aktivität von ATPγS unterscheidet (vgl. Abb. 4.44 und Abb. 4.45). Es wurde ein pEC_{50}-Wert von 6,27 bestimmt. Demnach ist NF546 ca. zehnfach weniger potent als ATPγS (pEC_{50} = 7,26; vgl. Abb. 4.44).

Der Effekt von NF546 konnte durch die Antagonisten NF157 und NF340 gehemmt werden. Mit beiden Antagonisten und NF546 als Agonist wurden Analysen nach Schild durchgeführt. Für beide Antagonisten wurden pA_2-Werte bestimmt, die sich nicht signifikant von den pA_2-Werten unterscheiden, die mit ATPγS als Agonist ermittelt wurden (NF546/NF157: pA_2 = 7,67; ATPγS/NF157: pA_2 = 7,77;

NF546/NF340: pA_2 = 8,04; ATPγS/NF340: pA_2 = 8,02; vgl. Abb. 4.20, Abb. 4.32 und Abb. 4.48). Demzufolge zeigen NF157 und NF340 bei NF546 wie auch bei ATPγS ein kompetitives Verhalten (Schild, 1957). Es kann angenommen werden, dass ATPγS, NF546, NF340 und NF157 um die gleiche Bindungsstelle am $P2Y_{11}$-Rezeptor konkurrieren. Damit wurde mit NF546 der erste nicht-nukleotidische Agonist an P2Y-Rezeptoren identifiziert.

5.3.2 NF709 - ein Partialagonist oder ein allosterer Agonist?

Anders als NF546 bewirkte NF709 nur eine unvollständige Aktivierung des $P2Y_{11}$-Rezeptors. NF709 weist im Calcium-Assay eine intrinsische Aktivität von nur 52 % im Vergleich zu ATPγS auf (vgl. Abb. 4.53), zeigte jedoch mit einem pEC_{50}-Wert von 7,07 eine vergleichbare Potenz wie ATPγS (pEC_{50} = 7,26). Das Signal im Calcium-Assay konnte durch NF340 gehemmt werden (vgl. Abb. 4.55).

Durch die verminderte intrinsische Aktivität und die konzentrationsabhängige Hemmung des ATPγS-Signals durch NF709 (vgl. Abb. 4.53 und Abb. 4.54) liegt die Vermutung nahe, dass NF709 ein Partialagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor ist. Da laut der Definition nach T. Kenakin ein Partialagonist gegenüber Agonisten mit höherer intrinsischer Aktivität ein kompetitives Verhalten aufweisen muss, wenn dieser an die gleiche Bindungsstelle bindet (Kenakin, 1997), wurde mit ATPγS als Agonist und NF709 als Antagonist eine Analyse nach Schild durchgeführt (vgl. Abb. 4.60). Diese Versuche sind jedoch nicht nach den Vorgaben von Schild auswertbar, da sich die Höhe des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven von ATPγS in Anwesenheit von NF709 verringert. Daher konnte mit der Analyse nach Schild ein kompetitiver Mechanismus von NF709 gegenüber ATPγS weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Anstelle der Auswertung nach Schild wurden E_{max}-Werte mit der Konzentration des Antagonisten in Bezug gesetzt. Der Wendepunkt des entsprechenden Graphen (Abb. 4.61) liegt bei 7,27 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration in M) und damit im gleichen Größenbereich wie der pK_i-Wert von NF709 (pK_i = 7,02, Abb. 4.54).

Auch mit NF709 als Agonist und NF340 als Antagonist wurde eine Analyse nach Schild im Calcium-Assay und im cAMP-Reportergen-Assay durchgeführt. Die Versuche dürfen jedoch streng genommen ebenfalls nicht nach Schild ausgewertet werden, da die Höhe des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven von

NF709 in Anwesenheit steigender Konzentrationen von NF340 immer weiter abnimmt (vgl. Abb. 4.58 und Abb. 4.62). Interessanterweise war das Ausmaß der Absenkung des oberen Plateaus in Anwesenheit steigender Konzentrationen NF340 im cAMP-Reportergen-Assay im Vergleich zum Calcium-Assay weniger stark ausgeprägt. Im cAMP-Reportergen-Assay konnte das obere Plateau bei der Vorinkubation mit 1 µM NF340 nur auf 65 % der Kontrolle im Vergleich zu 21 % der Kontrolle im Calcium-Assay gesenkt werden. Im Fall des Calcium-Assays wurden die E_{max}-Werte gegen die entsprechende Konzentration von NF340 aufgetragen. Der Wendepunkt der daraus resultierenden Kurve liegt mit 7,76 (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration in M) in der gleichen Größenordnung wie der apparente pK_i-Wert von NF340 (pK_i = 7,71; vgl. Abb. 4.59). Wurde diese Auswertung mit den Daten aus dem cAMP-Assay durchgeführt, konnte kein Wendepunkt bestimmt werden (Abb. 4.64). Da sich im cAMP-Reportergen-Assay eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven ergab, wurde eine Analyse nach Schild durchgeführt. Sie ergab pA_2-Wert von 7,56 (Abb. 4.63).

Für das Verhalten von NF709 gibt es Erklärungsansätze. Zum Ersten besteht die Möglichkeit, dass sich zwischen Ligand und Rezeptor kein Gleichgewichtszustand einstellt. Zum Zweiten könnte NF709 ein allosterer Modulator am $P2Y_{11}$-Rezeptor sein (Kenakin, 1997), der agonistische Eigenschaften aufweist.

Einen Hinweis für die Erklärung des Verhaltens von NF709 geben zwei Befunde: Die Analysen nach Schild für NF340 mit NF709 als Agonist ergeben eine unterschiedliche Abnahme des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven im Calcium- bzw. cAMP-Reportergen-Assay. Hauptunterschied dieser beiden Assay-Systeme ist die unterschiedliche Inkubationsdauer der Liganden auf den Zellen. Während das Calcium-Signal ein sehr schnelles Signal ist, das maximal 2 bis 3 Sekunden nach der Injektion der Testsubstanzen detektiert werden kann, wurden beim cAMP-Reportergen-Assay die Substanzen drei Stunden auf den Zellen inkubiert. Hier kann sich ein Gleichgewicht einstellen. Da genau im cAMP-Reportergen-Assay das obere Plateau nicht so stark abnimmt wie im Calcium-Assay, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die starke Abnahme des oberen Plateaus im Calcium-Assay auf das Nicht-Vorliegen eines Gleichgewichtszustandes zurückzuführen ist (langsame Assoziation von NF709 am Rezeptor). Dieses Verhalten könnte durch die Interpretation der Calcium-Versuche bei verschiedenen Temperaturen untermauert werden. Hier zeigte sich, dass die Potenz von NF709 im

Gegensatz zu ATPγS ein temperaturabhängig ist (vgl. Abb. 4.56). NF709 konnte bei höheren Temperaturen den Rezeptor deutlich stärker aktivieren als bei niedrigen Temperaturen. Dies würde wiederrum für eine kinetische Ursache des unterschiedlichen Verhaltens von NF709 im Vergleich zum Standardagonisten ATPγS sprechen.

NF709 zeigt ein ähnliches Verhalten wie drei Substanzen am Cannabinoid-CB_1-Rezeptor (Price *et al.*, 2005). Hier konnte in einem funktionellen cAMP-Assay ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion des E_{max}-Wertes von CP55940, einem CB_1-Rezeptor-Agonisten, durch die Inkubation mit steigenden Konzentrationen der Org-Substanzen detektiert werden. Der Arbeitsgruppe um Price et al. stand jedoch ein Radioligand für weitere Untersuchungen zur Verfügung, mit dem das allostere Verhalten der Substanzen nachgewiesen werden konnte. Auch an anderen Rezeptoren konnten allostere Mechanismen belegt werden. Unter anderem wurde mit N-Desmethylclozapin ein allosterer Agonist am muscarinergen M_1-Rezeptor eingeführt (Sur *et al.*, 2003). N-Desmethylclozapin, ein Metabolit des Neuroleptikums Clozapin, ist ein Partialagonist am M_1-Rezeptor mit einer leicht höheren EC_{50} als der des Standardagonisten Acetylcholin. Durch Testung von N-Desmethylclozapin an punktmutierten M_1-Rezeptoren konnte belegt werden, dass die Bindungstasche für diesen Liganden nicht mit der des orthosteren Acetylcholin übereinstimmt. Bei N-Desmethylclozapin handelt es sich somit um einen allosteren Agonisten. Mit AC-42 wurde im Jahr 2006 von Langmead et al. ein weiterer allosterer Agonist am M_1-Rezeptor beschrieben (Langmead *et al.*, 2006).

Auch an purinergen Rezeptoren , z. B. am A_{2A}-Rezeptor (Giorgi *et al.*, 2008), am A_1-Rezeptor (Aurelio *et al.*, 2008) und am $P2Y_1$-Rezeptor (King *et al.*, 1996), wurden bereits allostere Modulatoren beschrieben, die jedoch nicht in der Lage sind, den jeweiligen Rezeptor zu aktivieren.

Um das Verhalten von NF709 am $P2Y_{11}$-Rezeptor zu klären, sollten, wie von Langmead und Christopoulos für die Aufklärung allosterer Mechanismen empfohlen, weitere funktionelle Assays mit unterschiedlichem Readout (IP_3, GTP-[γ]-S) durchgeführt werden (Langmead and Christopoulos, 2006). Außerdem wären Bindungsstudien mit Hilfe eines Radioliganden oder eines Fluoreszenzliganden sicherlich hilfreich. Ohne weitere Versuche bleibt es also unklar, ob NF709 ein allosterer Agonist oder ein Partialagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor ist.

5.3.3 NF145 - eine Substanz mit agonistischen Effekten

NF145 ist ein direktes Analogon von Suramin und gehört in die Substanzreihe um NF157. Gemäß der in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen für diese Substanzreihe wäre eigentlich eine leicht schlechtere inhibitorische Potenz für NF145 im Vergleich zu Suramin am $P2Y_{11}$-Rezeptor zu erwarten gewesen. NF145 konnte diesen Rezeptor jedoch aktvieren.

Wie NF709 zeigte auch NF145 nicht die volle intrinsische Aktivität. Nur ca. 75 % der von ATPγS hervorgerufenen intrinsischen Aktivität wurden erreicht. Der pEC_{50}-Wert von NF145 liegt bei 6,75. Der Hillslope der Konzentrations-Effekt-Kurve ist deutlich größer als 1 (vgl. Abb. 4.37). Dies deutet auf einen anderen Bindungsmodus am $P2Y_{11}$-Rezeptor als bei ATPγS oder NF546 hin. Es wurde eine Schild-Analyse mit NF145 als Agonist und NF157 als Antagonist durchgeführt. Ähnlich wie bei NF709 nahm E_{max} in Anwesenheit steigender Konzentration des Antagonisten ab. Daher durfte auch hier keine Analyse nach Schild erfolgen (Schild, 1957). Dieser Effekt war hier jedoch nicht so deutlich ausgeprägt. Bei Auftragung der E_{max}-Werte gegen die eingesetzte Konzentration des Agonisten konnte ein Wendepunkt der Kurve von 7,49 (negativer dekadischer Logarithmus der NF157-Konzentration M) ermittelt werden (Abb. 4.41). Wurden die erhaltenen Verschiebungsfaktoren der Konzentrations-Effekt-Kurven dennoch gegen die eingesetzten Konzentrationen von NF157 aufgetragen, konnte eine Ausgleichsgerade erstellt werden, die die x-Achse bei einem Wert von 7,25 schneidet (Abb. 4.40). Der pK_i-Wert für NF157 lag bei pK_i = 7,35 (Abb. 4.18). Auch in diesem Fall müssen zur vollständigen Klärung des Bindungsmodus weitere Versuche folgen.

5.3.4 Vergleich der Agonisten NF546, NF709 und NF145 im Calcium- und cAMP-Reportergen-Assay

Die in den vorhergehenden Kapiteln eingehend beschriebenen Agonisten NF546, NF145 und NF709 wurden auch im cAMP-Reportergen-Assay untersucht. In Tab. 5.3 sind die im Calcium-Assay ermittelten Ergebnisse denen aus dem cAMP-Reportergen-Assay gegenübergestellt.

Tab. 5.3 Vergleich der pIC_{50}- bzw. der pK_i-Werte der Antagonisten NF340 und NF157 bzw. Vergleich der pEC_{50}-Werte der Agonisten NF546, NF709, NF145 und ATPγS, ermittelt im Calcium-Assay und im cAMP-Reportergen-Assay. Alle Werte wurden am $P2Y_{11}$GU-Rezeptor bestimmt.

	Calcium-Assay		cAMP-Reportergen-Assay	
Agonisten	pEC_{50}	E_{max} [%]	pEC_{50}	E_{max} [%]
NF546	6,27 ± 0,07	100	5,53 ± 0,03	100
NF709	7,07 ± 0,09	52,7	7,07 ± 0,06	80,5
NF145	6,75 ± 0,05	75,3	6,02 ± 2,81	100
ATPγS	7,26 ± 0,03	100	6,55 ± 0,03	100

Bei den Agonisten NF546, NF145 und dem Standardagonisten ATPγS ist erkennbar, dass die über die G_s-Kopplung des $P2Y_{11}$-Rezeptors im cAMP-Reportergen-Assay bestimmten pEC_{50}-Werte um 0,7 bis 0,8 log-Einheiten niedriger liegen als die über die G_q-Kopplung im Calcium-Assay bestimmten Werte. Diese Beobachtung stimmt mit Angaben aus der Literatur überein: auch Qi et al. fanden über die G_q-Kopplung des $P2Y_{11}$-Rezeptors höhere pEC_{50}-Werte als über die G_s-Kopplung (Qi *et al.*, 2001b; Qi *et al.*, 2001a).

NF709 zeigte interessanterweise ein anderes Verhalten. Es ist in beiden Assay-Systemen equipotent. Zudem weist NF709 in beiden Assay-Systemen eine reduzierte intrinsische Aktivität auf, während NF145, das im Calcium-Assay auch eine geringere intrinsische Aktivität zeigt, im cAMP-Assay einen nicht von ATPγS signifikant verschiedenen E_{max}-Wert erreicht. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, NF709 in weiteren Assay-Systemen zu untersuchen. Möglicherweise kann NF709, anders als die anderen drei Agonisten, den Transduktionsweg über die G_s-Kopplung des Rezeptors stärker aktivieren. Dies würde für einen Mechanismus sprechen, der von Urban et al. mit dem Begriff „funktionelle Selektivität“ (functional selectivity) beschrieben wird (Urban *et al.*, 2007). Dieser Begriff fasst das Phänomen zusammen, dass Liganden ihren Rezeptor in eine Ligand-spezifische Konformation überführen, die häufig eine für diese Konformation charakteristische Signaltransduktion auslöst. Dies kann sich durch Unterschiede in der intrinsischen Aktivität und/oder in der Potenz eines Signalweges gegenüber einem anderen ausdrücken, die nicht über Unterschiede in der Affinität der Liganden am Rezeptor zu erklären sind. Alternativ wäre das unterschiedliche Verhalten von NF709 im Vergleich zu den anderen Agonisten auch über einen möglichen allosteren Mechanismus zu

erklären. Damit würde NF709 ebenfalls eine funktionelle Selektivität aufweisen, die jedoch nicht über die orthostere Bindungstelle des $P2Y_{11}$-Rezeptors vermittelt wird.

5.4 Selektivität der $P2Y_{11}$-Liganden gegenüber anderen P2-Rezeptoren

Da Suramin unspezifisch an alle P2-Rezeptoren bindet, wurden die gefundenen Substanzen, insbesondere die beiden potentesten Antagonisten NF340 und NF157, auch an anderen P2-Rezeptoren getestet, um ihre Selektivität zu überprüfen. Die Ergebnisse der am $P2Y_{11}$-Rezeptor weniger potenten Substanzen sind, soweit sie in dieser Arbeit erhoben wurden, in den jeweiligen Kapiteln im Ergebnisteil dargestellt (siehe Kapitel 4). Bis auf die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Suramin/NF157-Analoga wurde bei allen getesteten Substanzen eine Inhibition von unter 35 % gemessen. Dies entspricht IC_{50}-Werten der Substanzen von > 10 µM an allen jeweils neben dem $P2Y_{11}$-Rezeptor überprüften Rezeptoren.

5.4.1 NF157

NF157 wurde am $P2Y_1$-Rezeptor, einem Vertreter der Adeninnukleotid-sensitiven Gruppe, und am $P2Y_2$-Rezeptor, einem Vertreter der Uracilnukleotid-sensitiven Gruppe, getestet. NF157 zeigte am $P2Y_1$-Rezeptor ein apparenten funktionellen pK_i-Wert von 3,73 und am $P2Y_2$-Rezeptor von 4,54 (Ullmann *et al.*, 2005). Damit zeigt NF157 eine Selektivität für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren, da am $P2Y_{11}$-Rezeptor ein apparenter pK_i-Wert von 7,35 bestimmt werden konnte. NF157 ist somit ca. 650-fach selektiver für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den $P2Y_1$- und $P2Y_2$-Rezeptoren.

In der Arbeitsgruppe von Dr. R. Hausmann und Prof. G. Schmalzing wurden für NF157 Daten an verschiedenen P2X-Rezeptoren erhoben. Für den $hP2X_1$-Rezeptor wurde ein pIC_{50}-Wert von 7,20 bestimmt, was ungefähr dem pK_i-Wert entspricht (vgl. Kapitel 4.2.2). Damit zeigt NF157 am $hP2X_1$-Rezeptor eine ähnliche Potenz wie am $P2Y_{11}$-Rezeptor. Wie man aus Tab. 4.4 und Tab. 4.5 erkennen kann, weist NF157 gegenüber den anderen P2X-Rezeptoren eine gewisse Selektivität auf ($P2X_2$: 3-fach; $P2X_3$: 8-fach). Gegenüber den $P2X_4$- und $P2X_7$-Rezeptoren konnte eine weitaus höhere Selektivität (> 22-fach bzw. 67-fach) bestimmt werden.

NF157 zeigt eine ca. siebenfach höhere Affinität zum $P2Y_{11}$-Rezeptor als Suramin. Es ist dem Suramin somit sowohl hinsichtlich der Potenz, als auch hinsichtlich der Selektivität überlegen. NF157 müsste jedoch als $P2Y_{11}$-Rezeptor-Antagonist noch weiter entwickelt werden, um eine Selektivität gegenüber dem $hP2X_1$-Rezeptor, der vor allen Dingen auf der glatten Muskulatur, auf Thrombozyten und im Nervensystem ein Rolle spielt, zu erlangen (North, 2002).

5.4.2 NF340

NF340 wurde an verschiedenen P2Y-Rezeptoren im Calcium-Assay ($P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$- und $P2Y_6$-Rezeptor) und im cAMP-Reportergen-Assay ($P2Y_{12}$-Rezeptor) getestet. An keinem dieser Rezeptoren wurde eine Inhibition von > 10 % für 10 µM NF340 detektiert (vgl. Tab. 4.10). Dies bedeutet, dass die IC_{50} für NF340 an allen Rezeptoren deutlich größer als 10 µM sein muss. Zudem konnte bis zu einer Konzentration von 3 µM an den humanen $P2X_1$-, $P2X_2$- und $P2X_{2/3}$-Rezeptoren keine signifikante Hemmung erzielt werden (vgl. Kapitel 4.3.6). Damit ist NF340 mindestens 3000-fach selektiver für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren und ca. 1000-fach selektiver gegenüber den $P2X_1$-, $P2X_2$- und $P2X_{2/3}$-Rezeptoren. NF340 zeigt mit einem pK_i-Wert von 7,72 und einem pA_2-Wert von 8,02 eine ca. vierfach höhere inhibitorische Potenz am $P2Y_{11}$-Rezeptor als NF157. Zudem scheint NF340 deutlich selektiver für den $P2Y_{11}$-Rezeptor zu sein. Um ein vollständiges Selektivitäts-Profil zu erstellen, müssen jedoch noch weitere Daten an den fehlenden P2X-Rezeptoren erhoben werden.

5.4.3 Agonisten NF546, NF145 und NF709

NF546 zeigt keine oder nur eine geringe Aktivität an anderen P2-Rezeptoren als der $P2Y_{11}$-Rezeptor (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Die IC_{50} bzw. EC_{50} von NF546 liegt jeweils an $P2Y_1$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren bei > 10 µM, an den untersuchten P2X-Rezeptoren bei > 3 µM ($P2X_1$-, $P2X_2$- und $P2X_{2/3}$). Beim $P2Y_2$-Rezeptor wird die EC_{50} bei ca. 10 µM liegen, da NF546 am $P2Y_2$-Rezeptors bei 10 µM eine Calcium-Signal verursachte, das 42 % des durch 1 µM UTP hervorgerufenen Signals entsprach. NF546 ist damit mindestens 20-fach selektiver gegenüber den $P2Y_1$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren, ein ca. vierfach selektiver gegenüber dem $P2Y_2$-Rezeptor

sowie eine mindestens sechsfach selektiver gegenüber den $P2X_1$-, $P2X_2$-, und $P2X_{2/3}$-Rezeptoren.

Auch NF709 und NF145 wurden an anderen P2Y-Rezeptoren untersucht (vgl. Kapitel 4.5.3.2 und Kapitel 4.5.1.2). Bei allen überprüften Rezeptoren liegen die EC_{50}- bzw. die IC_{50}-Werte bei > 10 µM bei beiden Substanzen. Demnach kann von einer 200-fachen Selektivität von NF709 am $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren ausgegangen werden. Bei NF145 konnte eine mindestens 50-fach höhere Selektivität für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_4$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{12}$-Rezeptoren bestimmt werden. Daten für NF709 und NF145 an den verschiedenen P2X-Rezeptoren liegen bislang nicht vor.

5.5 Funktionsnachweis der Agonisten und Antagonisten in physiologischen Systemen

Die oben beschriebenen Ergebnisse sind alle in rekombinaten Systemen erhoben worden. Um nun auch die Funktion der neu identifizierten Agonisten NF546 und NF709 und dem Antagonisten NF340 im physiologischen System zu belegen, wurden die Substanzen an nativen Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten, aus Monozyten abgeleitete dendritische Zellen) getestet. Nach Myrtek und Idzko sollten die genannten Zellen den $P2Y_{11}$-Rezeptor exprimieren (Myrtek and Idzko, 2007) (vgl. Tab. 1.2).

Um die Funktion der gefundenen Liganden an nativen humanen $P2Y_{11}$-Rezeptoren zu überprüfen, wurden aus von gesunden Spendern gewonnenen Buffy coats Monozyten isoliert und zu dendritischen Zellen ausdifferenziert. An dendritischen Zellen konnte die Arbeitsgruppe um D. Communi und J.M. Boeynaems die Expression von nativen $P2Y_{11}$-Rezeptoren nachweisen und eine Funktion des Rezeptors bei der Ausschüttung von immunsuppressiven Mediatoren (Thrombospondin-1 und Indolamin-2,3-dioxygenase) demonstrieren (Marteau *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass NF546 und NF709 eine TSP-1-Ausschüttung bewirken (vgl. Abb. 4.69). Sie riefen, analog zu den Versuchen im rekombinanten System, eine reduzierte (NF709) bzw. eine mit ATPγS vergleichbare (NF546) Sekretion von TSP-1 hervor. NF340 konnte ebenfalls erfolgreich an dendritischen Zellen getestet werden. Es zeigte eine Inhibition der durch ATPγS bzw. NF546 hervorgerufenen TSP-1-Sekretion (vgl. Abb. 4.69).

Bei weiteren Versuchen wurde an dendritischen Zellen die LPS-induzierte Sekretion von IL-12p70 bestimmt (Wilkin *et al.*, 2002). Hier bewirkte NF546 ebenso wie der Standardagonist ATPγS eine Reduktion der LPS-induzierten IL-12p70-Ausschüttung (vgl. Abb. 4.68). Zu erwähnen ist hier, dass NF546 ebenfalls eine gewisse Affinität zum $P2Y_2$-Rezeptor aufweist. Bisher konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die Reduktion der LPS-induzierten Sekretion von IL-12p70 über den $P2Y_{11}$-Rezeptor vermittelt wird, oder ob nicht vielleicht andere P2Y-Rezeptoren hier eine Rolle spielen.

Bei Testung der Substanzen an nativen Blutzellen (Lymphozyten, Monozyten, aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen) im Calcium-Assay konnten durch Calcium-Ausschüttung hervorgerufene Fluoreszenz-Signale detektiert werden. Sie konnten jedoch nicht zweifelsfrei einem Rezeptor zugeordnet werden. Wahrscheinlich rührt ein Teil der Signale vom ubiquitär verbreiteten $P2Y_2$-Rezeptor her. Alle Zellen reagierten mit Calcium-Ausschüttung auf die Stimulation mit den $P2Y_2$-Rezeptor-Agonisten UTP und ATP (vgl. Abb. 4.70). Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten die Versuche mit einem $P2Y_2$-selektiven Antagonisten wiederholt werden, der zur Zeit allerdings noch nicht vorliegt (Burnstock, 2007). Interessanterweise konnte jedoch das durch 100 µM ATP hervorgerufene Calcium-Signal durch 100 µM NF340 um 25 % reduziert werden. Da NF340, wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben, eine relativ hohe Selektivität für den $P2Y_{11}$-Rezeptor gegenüber den getesteten P2Y- und P2X-Rezeptoren aufweist, könnte hier zum einen ein Hinweis für die Existenz des $P2Y_{11}$-Rezeptors auf Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen gegeben sein und zum zweiten ein Nachweis des Effekts von NF340 im nativen System mit physiologischen Rezeptordichten gegeben sein. Bislang lassen in der Literatur beschriebene Ergebnisse nur den Schluss zu, dass der $P2Y_{11}$-Rezeptor in nativen Systemen nicht über eine Calcium-Ausschüttung, sondern nur über die Stimulation der cAMP-Produktion zu detektieren ist (Vaughan *et al.*, 2007).

Neben NF340, NF709 und NF546 konnte auch NF157 erfolgreich an nativen Systemen getestet werden. In den Studien von Moreschi et al. wurde der Effekt von NAD^+ und $NAADP^+$ an humanen Granulozyten untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Effekt beider Liganden durch NF157 gehemmt wird (Moreschi *et al.*, 2006; Moreschi *et al.*, 2007). Außerdem wurde NF157 an neutrophilen

Granulozyten getestet. Hier bewirkte NF157 eine Inhibition der durch ATPγS-verzögerten Apoptose der neutrophilen Granulozyten (Vaughan *et al.*, 2007).
Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Substanzen zur Erforschung und möglicherweise auch zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden könnten, mit denen der $P2Y_{11}$-Rezeptor in Verbindung gebracht wird. Dazu gehören Immunerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und/oder Erkrankungen, die mit einer gestörten Erythropoese in Zusammenhang stehen (vgl. Kapitel 1.3) (Amisten *et al.*, 2007; Marteau *et al.*, 2005; Fröhlen and Kauschat, 2004). Da das Gen für den $P2Y_{11}$-Rezeptor im Genom der Maus und der Ratte fehlt, kann kein einfaches Knockout-Modell für diesen Rezeptor erstellt werden. Um die physiologische Funktion des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu erforschen, sind daher Versuche notwendig, die selektive und potente Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor verwenden. Solche pharmakologischen Werkzeuge wurden durch diese Arbeit identifiziert und charakterisiert.

5.6 Mutagenese am $P2Y_{11}$-Rezeptor

Zu Beginn dieser Arbeit lag nur die Beschreibung einer einzigen gezielten Mutation am $P2Y_{11}$-Rezeptor vor. Dabei handelte es sich, um die Arg268Glu-Mutante (vgl, Kapitel 1.3, (Qi *et al.*, 2001b)). Diese Mutation erhöht die Sensitivität des $P2Y_{11}$-Rezeptors gegenüber ADP und führt zur Äquipotenz von ADP und ATP. Um einen weiteren Einblick in die molekulare Topologie der Ligand-Bindungsstelle des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu bekommen, sollte mit Hilfe der „site-directed-mutagenesis“ gezielt Punktmutationen eingeführt werden, um die zur Bindung von Liganden notwendigen Aminosäuren zu identifizieren.

5.6.1 his$P2Y_{11}$-Rezeptor

Für die geplanten Mutagenese-Studien war es wichtig, eine Möglichkeit zu haben, die ungefähre Dichte der exprimierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche bestimmen zu können, um bei einem Vergleich der Rezeptor-Mutanten und des Rezeptor-Wildtyps sicherzustellen, dass die (mutierten) Rezeptoren auf den Zelloberflächen ähnlich stark exprimiert sind. Da zu Beginn dieser Studie kein Antikörper, der sich gegen den $P2Y_{11}$-Rezeptor richtete, kommerziel erhältlich war, wurde der Rezeptor am N-terminalen Ende mit einem sechsfachen Histidin-Rest versehen (6xHis-Tag,

hisP2Y$_{11}$-Rezeptor; siehe Kapitel 3.1.3.1). Der eingeführte „His-Tag“ erlaubt eine Detektion der Rezeptoren durch einen Antikörper.

Dieser hisP2Y$_{11}$-Rezeptor zeigt jedoch ein gegenüber den WT-Rezeptoren (P2Y$_{11}$ und P2Y$_{11}$GU) verändertes Verhalten (siehe Kapitel 4.8.1). Bei allen untersuchten hisP2Y$_{11}$-Zellklonen weicht die Ansprechbarkeit auf die drei neuen Agonisten (NF709, NF546, NF145) und den Standardagonisten ATPγS deutlich von den an den WT-Rezeptoren bestimmten Werten ab (vgl. Abb. 4.76 und Tab. 5.3). Der pEC$_{50}$-Wert von ATPγS ist um den Faktor 5 bis 10 zu einem niedrigeren Wert hin verschoben (P2Y$_{11}$: 7,26; hisP2Y$_{11}$: 6,31). Die anderen Agonisten konnten den Rezeptor nicht gleichwertig aktivieren bzw. zeigten im Falle von NF709 keine Aktivierung mehr (Tab. 4.32).

Auch die inhibitorische Potenz der beiden Antagonisten NF157 und NF340 wurde bestimmt. Die pK$_i$-Werte am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor liegen für beide Substanzen in der gleichen Größenordnung wie am P2Y$_{11}$GU- Rezeptor (NF157: 7,10 (P2Y$_{11}$GU), 6,94 (hisP2Y$_{11}$); NF340: 7,71 (P2Y$_{11}$GU), 7,76 (hisP2Y$_{11}$); vgl. Abb. 4.77 und Abb. 4.27). Zudem konnte für NF340 auch am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor mit Hilfe einer Schild-Analyse ein kompetitives Verhalten nachgewiesen werden. Die Steigung der Ausgleichsgeraden ist nicht signifikant verschieden von 1 (vgl. Abb. 4.79). Der aus dieser Analyse resultierende pA$_2$-Wert entspricht denen an den beiden Wildtyp-Rezeptoren (vgl. Tab. 5.2).

Diese Befunde (verringerte Potenz der Agonisten und gleiche Potenz der Antagonisten) weisen darauf hin, dass das mit einem sechsfachen His-Tag versehene Amino-terminale Ende des Rezeptors die Bindung der Liganden beeinflusst. Bei den Agonisten könnte eine sterische Hinderung durch den His-Tag bei der Einnahme der aktivierten Konformation des Rezeptors vermutet werden. Die Konformation für den inaktiven Zustand des Rezeptors, an den die Antagonisten binden, scheint durch die Veränderung am Rezeptor nicht beeinflusst zu werden.

5.6.2 hisP2Y$_{11}$-Rezeptor-Mutanten

Trotz des unterschiedlichen Verhaltens des hisP2Y$_{11}$-Rezeptors gegenüber den P2Y$_{11}$-Wildtyp-Rezeptoren wurden Punktmutationen an dem veränderten Rezeptor durchgeführt. Drei mutierte Plasmide wurden rekombinant und stabil in 1321N1-Zellen eingebracht. Die Plasmide enthielten die Punktmutationen C102A, bei der das

Cystein an Position 102 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, und die Punktmutationen R275A und R276A, bei denen die Arginine an den Positionen 275 und 276 jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht wurden. Alle drei gewählten Mutationspunkte sind auch in der zwischenzeitlich veröffentlichen Studie von Zylberg et al. nicht enthalten (Zylberg *et al.*, 2007).

Keiner der vermehrten Zellklone der Zelllinien 1321N1-his$P2Y_{11}$R275A und 1321N1-his$P2Y_{11}$C102A zeigte messbare Expressionen des Rezeptors auf der Zelloberfläche (vgl. Abb. 4.82 und Abb. 4.83). Damit konnten die Veränderungen, die durch diese Mutationen hervorgerufen wurden, nicht bestimmt werden.

Da die Aminosäure Cystein über eine Thiol-Gruppe verfügt, ist sie in der Lage, mit einem weiteren Cystein eine Disulfidbrücke zu bilden. Disulfidbrücken spielen bei der Formgebung und der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen eine wichtige Rolle. Die nicht nachweisbare Expression der Cystein-Mutante könnte demnach damit erklärt werden, dass das Cystein an Position 102 an einer Disulfidbrücke beteiligt ist, die den $P2Y_{11}$-Rezeptor stabilisiert und zudem am Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche beteiligt ist (Hoffmann *et al.*, 1999). Hoffmann et al. konnten für den $P2Y_1$-Rezeptor zeigen, dass die Mutante mit einem Alanin anstelle des zum C102 im $P2Y_{11}$-Rezeptor analogen Cysteins an Position 124 (vgl. Abb. 4.80) ebenfalls keine Expression an der Zelloberfläche zeigte. Diese Cysteine, die am Beginn der dritten transmembranären Domäne beider Rezeptoren liegen, sind in vielen anderen GPCRs konserviert und bilden mit einem Cystein in dem zweiten extrazellulären Loop eine Disulfidbrücke. Sie werden für die korrekte Funktion der Rezeptoren verantwortlich gemacht (Hoffmann *et al.*, 1999; Berthold and Bartfai, 1997).

Auch für die Arginin-Mutante an Position 275 im $P2Y_{11}$-Rezeptor konnte keine Expression an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt jedoch keine Vermutungen über die Bedeutung des Arginins zu. In der Literatur sind keine vergleichbaren Daten an anderen P2Y-Rezeptoren beschrieben, die die fehlende Expression erklären könnten. Da ein Einfluss des Transfektions-System nicht auszuschließen ist, sollten hier weitere Versuche mit anderen Transfektionsmethoden (z. B. retrovirale Transfektion und Infektion) folgen, die eine höhere Transfektionsrate im Vergleich zur Lipofektion versprechen. Anzumerken ist, dass das System der Transfektion grundsätzlich funktioniert, da im Rahmen dieser Arbeit neben den stabilen Transfektionen der mutierten $P2Y_{11}$-Rezeptor-Plasmid-

DNA, auch andere P2Y-Rezeptor-Plasmid-DNA stabil in die 1321N1-Zellen eingebracht werden konnten (vgl. Kapitel 4.1.3).

5.6.3 Vergleich der hisP2Y$_{11}$-Rezeptor-Mutante R276A mit dem hisP2Y$_{11}$-WT-Rezeptor

Die Zelllinie 1321N1-hisP2Y$_{11}$R276A zeigte dagegen eine Expression (vgl. Abb. 4.84). Daher wurden die Agonisten ATP und NF546 sowie der Antagonist NF340 an dieser Zelllinie getestet.

Tab. 5.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse der Messung von ATP, NF546 und NF340 an 1321N1-hisP2Y$_{11}$WT-Zellen und 1321N1-hisP2Y$_{11}$R276A.

	hisP2Y$_{11}$WT	Quelle	hisP2Y$_{11}$R276A	Quelle
pEC$_{50}$ (ATP)	6,26 ± 0,04	Abb. 4.85	6,26 ± 0,08	Abb. 4.85
pEC$_{50}$ (NF546)	4,32 ± 0,16	Abb. 4.88	5,71 ± 0,14	Abb. 4.88
pK$_i$ (NF340)	7,77 ± 0,15 (ATP)	Abb. 4.86	8,31 ± 0,11 (ATP)	Abb. 4.86
	7,76 ± 0,23 (ATPγS)	Abb. 4.76	-	Abb. 4.76
pA$_2$ (NF340)	7,96 ± 0,10	Abb. 4.79	-	Abb. 4.79

Am mutierten Rezeptor hisP2Y$_{11}$R276A ergab sich die gleiche Potenz des Standardagonisten ATP wie am hisP2Y$_{11}$-Rezeptor (Tab. 5.4). Die Affinitäten des Antagonisten NF340 und des Agonisten NF546 am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor unterscheiden sich dagegen signifikant von den Affinitäten am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor. NF546 und NF340 sind an der Rezeptormutante deutlich potenter. Für NF340 wurde am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor ein apparenter pK$_i$-Wert von 7,76 ± 0,23 und am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor von 8,31 ± 0,11 bestimmt. Für NF546 konnte am hisP2Y$_{11}$WT-Rezeptor ein pEC$_{50}$-Wert von 4,32 und am hisP2Y$_{11}$R276A-Rezeptor von 5,71 ermittelt werden.

Die höhere Potenz der NF-Substanzen nach dem Austausch einer positiv geladenen Aminosäure (Arginin) gegen eine ungeladene Aminosäure (Alanin) könnte dafür sprechen, dass die mutierte Position in einem Bereich der Bindungstasche liegt, der für die Bindung der deutlich größeren NF-Substanzen verantwortlich ist. Beim WT-Rezeptor könnte das positiv geladene Arginin Raum benötigen, der die Bindung der NF-Substanzen verringert.

Die Ergebnisse am his$P2Y_{11}$R276A-Rezeptor stimmen nicht mit denen der Mutagenese- und Molecular-Modeling-Studien am $P2Y_1$-Rezeptor von Hoffmann et al und Moro et al. überein. Beide Autorengruppen untersuchten die analoge Mutante im $P2Y_1$-Rezeptor (Austausch von Arginin an Position 287 gegen Alanin) (Hoffmann *et al.*, 1999; Moro *et al.*, 1999). Diese $P2Y_1$-Rezeptormutante wurde gegenüber dem nicht mutierten Rezeptor erst bei einer mehr als 1000-fach höheren Agonistkonzentration aktiviert. Auf Grund dieser Beobachtung wurde dem ausgetauschten Arginin eine Rolle in der konformativen Anordung der extrazellulären Loops sowie für die Erkennung von extrazellulärem ATP und damit des Agonisten zugeordnet. Diese Funktion scheint das korrespondierende Arg265 im $P2Y_{11}$-Rezeptor nicht auszuüben.

Um die Ergebnisse fundiert interpretieren zu können, müssen Molecular-Modeling-Studien an einem validierten $P2Y_{11}$-Rezeptor-Modell durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Der $P2Y_{11}$-Rezeptor ist ein ATP-sensitiver G-Protein gekoppelter Rezeptor und ein vergleichsweise wenig untersuchter Rezeptorsubtyp. Er stellt ein interessantes Target dar, da er im Immunsystem, möglicherweise bei der Erythropoese sowie als Risikofaktor beim akuten Myokardinfarkt eine Rolle spielt. Bisher sind keine selektiven und potenten Liganden am $P2Y_{11}$-Rezeptor beschrieben, die eine Erforschung der physiologischen Funktion des $P2Y_{11}$-Rezeptors erlauben. Ein wenig potenter und unselektiver Antagonist am $P2Y_{11}$-Rezeptor ist Suramin (pK_i = 6,35).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei von Suramin abgeleitete Antagonisten mit nanomolarer Potenz identifiziert, NF157 und NF340. Sie sind ca. sechsfach (NF157) bzw. dreißigfach (NF340) potenter als Suramin. Beide Substanzen wurden im rekombinanten System mit Hilfe funktioneller Assays (intrazelluläre Calcium- und cAMP-Messungen) charakterisiert und in ex-vivo Studien an Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen mit physiologischer $P2Y_{11}$-Rezeptor-Expression erfolgreich getestet.

Obwohl Suramin-Analoga an anderen P2-Rezeptoren bislang nur als Antagonisten beschrieben wurden, konnten mit NF546, NF709 und NF145 selektive, nicht-nukleotidische Agonisten am $P2Y_{11}$-Rezeptor identifiziert werden. Bei NF546 handelt es sich um einen Vollagonisten mit einem EC_{50}-Wert im submikromolaren Bereich. Mit NF145 und NF709 wurden zwei nanomolare Partialagonisten gefunden. NF546 und NF709 wurden im rekombinanten System charakterisiert und in ex-vivo Studien an dendritischen Zellen über die Bestimmung der Thrombospondin-1-Sekretion erfolgreich getestet.

Um einen Einblick in die molekulare Topologie der Ligand-Bindungsstelle des $P2Y_{11}$-Rezeptors zu erhalten, wurden Mutagenese-Studien durchgeführt. Von drei hergestellten Mutanten des his$P2Y_{11}$-Rezeptors (C102A, R275A, R276A) zeigte einzig die Mutante R276A eine detektierbare Expression. Weitere Untersuchungen des his$P2Y_{11}$R276A-Rezeptors mit ATP, NF546 und NF340 ergaben eine Äquipotenz des Standardagonisten ATP an Mutante und Wildtyp, während NF340 und NF546 am his$P2Y_{11}$R276A-Rezeptor um den Faktor 3,2 bzw. 23 potenter als am his$P2Y_{11}$Wildtyp-Rezeptor waren.

In dieser Arbeit wurden also potente und selektive nicht-nukleotidische Agonisten und Antagonisten für $P2Y_{11}$-Rezeptoren identifiziert und charakterisiert, die eine Untersuchung der physiologischen Funktion des $P2Y_{11}$-Rezeptors erlauben.

7 Abstract

The $P2Y_{11}$-receptor is an ATP-sensitive G protein-coupled receptor and a relatively poorly investigated receptor subtype. It seems to play an important role in the immune system, in erythropoiesis and as a risk factor for myocardial infarctions and is thus an interesting target. Hitherto, no selective and potent ligands at $P2Y_{11}$-receptors are described, which are important for the investigation of the physiological functions of the receptor. A low potency and non-selective antagonist at $P2Y_{11}$-receptors is suramin (pK_i = 6.35).

In this work, two nanomolar potency antagonists derived from suramin were identified, namely NF157 and NF340. Their potency is about 6-fold (NF157) and 30-fold (NF340) higher than the potency of suramin. Both substances were characterized in a recombinant expression system by means of functional assays (determination of intracellular calcium and cAMP) and successfully tested in ex-vivo studies at monocytes, lymphocytes and dendritic cells displaying physiological expression of the $P2Y_{11}$-receptor.

Suramin analogues were so far only described as antagonists at P2-receptors. In this study however, NF546, NF709 and NF145 were identified as selective non-nucleotide agonists at $P2Y_{11}$-receptors. NF546 is a full agonist with a sub-micromolar EC_{50}-value. NF145 and NF709 are nanomolar potency partial agonists. NF546 and NF709 were characterized in a recombinant system and tested successfully in ex-vivo studies in dendritic cells by determination of thrombospondin-1-secretion.

In order to gain insight into the molecular topology of the ligand binding site of the $P2Y_{11}$-receptor, mutagenesis studies were performed. Of three established receptor mutants (C102A, R275A, R276A), only the mutant R276A showed detectable expression. Further analysis of the his$P2Y_{11}$R276A-receptor with ATP, NF546 and NF340 showed equipotency of the standard agonist ATP at the mutant and wild-type receptor, whereas NF340 and NF546 were 3.2 times (NF340) and 23 times (NF546) more potent at the his$P2Y_{11}$R276A than at the his$P2Y_{11}$wild-type receptor.

In conclusion, this work presents potent and selective non-nucleotide agonists and antagonists allowing the subsequent investigation of physiological functions of $P2Y_{11}$-receptors.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosine 5′-diphosphat
ADPβS	Adenosin 5′-[β-thio]diphosphat
AMI	akuter Myokard-Infarkt
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin 5′-monophosphat
Ap_3A	Diadenosin 5', 5'''-P^1, P^3-triphosphat
APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
A3P5PS	Adenosin- 3'-phosphat-5' -phosphosulfat
A3P5P	Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphat
AR-C67085	2-Propylthio-β,γ-dichloromethylen-D-ATP
ATP	Adenosin 5′-triphosphat
ATPγS	Adenosin 5′-[γ-thio]triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (engl.)
BzBzATP	(2′ oder 3′)-O-[(4-Benzoyl)benzoyl)]adenosin 5′-triphosphat
C	Cytosin
cADPR	cyclische ADP-Ribose
cAMP	cyclisches Adenosin 5′-monophosphat
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP Responsive Element Binding Protein
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton (Masseinheit)
DC	dendritic cell (engl.)
dCp4U (INS37217)	P^1-(uridin 5')-P^4-(2'-deoxycytidin 5') tetraphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

EC_{50}	effektive Konzentration 50 %
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EIA-Test	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FKS	Fötales Kälber Serum
forw.	forward (engl.)
G	Guanosin
G418	Geneticin-disulfat
GDP	Guanosin 5′-diphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GPCR	G protein-coupled receptor (engl.)
GTP	Guanosin 5′-triphosphat
HPLC	high performance liquid chromatography (engl.)
IC_{50}	Inhibitorische Konzentration 50 %
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IL-4	Interleukin-4
IL-12	Interleukin-12
INS50589	2' 3'-(Trans) cinnamoylacetal-6-N-ethylurea AMP
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
ME	Mutagenese-Effizienz
2-MeSADP	2-(Methylthio)adenosin 5′-diphosphat
2-MeSATP	2-(Methylthio)adenosin 5′-triphosphat
α,β-Me-ADP	Adenosin 5'-(α,β-methylene)diphosphat

mRNA	messenger - ribonucleic acid (engl.)
MRS2179	2′-Deoxy-N^6-methyl adenosin 3′,5′-diphosphat
MRS2279	2-Chloro N^6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat
MRS2365	(N)-Methanocarba-2-MeSADP
MRS2567	1,2-Di-(4-isothiocyanatophenyl)ethan
MRS2575	1,4-Phenylendiisothiocyanat
MRS2578	N,N''-1,4-Butandiylbis[N'-(3-isothio-cyanatophenyl) thioharnstoff
N	Normal
n.b.	nicht bestimmbar
NAD^+	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
$NAADP^+$	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
$NADP^+$	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF110	4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzentriylbis(carbonylimino)))tetrakis-benzensulfonsäure
NF449	4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzentriylbis(carbonylimino))) tetrakis-benzen-1,3-disulfonsäure
n.g.	nicht gemessen
N-terminal	Amino-terminal
NTPDasen	Nukleosid-triphosphat-diphosphohydrolasen
O.D.	optische Dichte
ORI	origin of replication (engl.)
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.)
PMBC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (engl.)
PP	Polypropylen

PPADS	Pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
rev.	reverse (engl.)
RNA	ribonucleic acid (engl.)
rpm	Revolutions per minute (engl.)
RPMI1640	am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT-PCR	Real-time PCR
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SD	standard deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (engl.)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (engl.)
T	Thymin
TE-Puffer	Tris / EDTA-Puffer
TLR	Toll-like Rezeptor
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Uracil
U	Units (engl.)
UDPβS	Uridin 5′-[β-thio]diphosphat disulfonsäure
Up4U (INS365)	P^1, P^4- di(uridin 5') tetraphosphat
VF	Verschiebungsfaktor
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

9 Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J M, Barnard E A, Boyer J L, Kennedy C, Knight G E, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson K A and Weisman G A (2006) International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol Rev* **58**: pp 281-341.

Abbracchio MP, Boeynaems J M, Barnard E A, Boyer J L, Kennedy C, Miras-Portugal M T, King B F, Gachet C, Jacobson K A, Weisman G A and Burnstock G (2003) Characterization of the UDP-Glucose Receptor (Re-Named Here the P2Y14 Receptor) Adds Diversity to the P2Y Receptor Family. *Trends in Pharmacological Sciences* **24**: pp 52-55.

Amisten S, Melander O, Wihlborg A K, Berglund G and Erlinge D (2007) Increased Risk of Acute Myocardial Infarction and Elevated Levels of C-Reactive Protein in Carriersof the Thr-87 Variant of the ATP Receptor P2Y11. *Eur Heart J* **28**: pp 13-18.

Arunlakshana O and Schild H O (1959) Some Quantitative Uses of Drug Antagonism. *Br J Pharmacol Chemother* **14**: pp 48-58.

Aurelio L, Figler H, Flynn B L, Linden J and Scammells P J (2008) 5-Substituted 2-Aminothiophenes As A1 Adenosine Receptor Allosteric Enhancers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**: pp 1319-1327.

Banchereau J and Steinman R M (1998) Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* **392**: pp 245-252.

Berthold M and Bartfai T (1997) Modes of Peptide Binding in G Protein-Coupled Receptors. *Neurochemical Research* **22**: pp 1023-1031.

Bigonnesse F, Levesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ and Sevigny J. (2004) Cloning and Characterization of Mouse Nucleoside Triphosphatediphosphohydrolase-8. *Biochemistry* **43**: pp 5511-5519.

Boyer JL, Adams M, Gnana Ravi R, Jacobson K A and Kendall Harden T (2002) 2-Chloro N6-Methyl-(N)-Methanocarba-2´-Deoxyadenosine-3´,5´-Bisphosphate Is a Selective High Affinity P2Y1 Receptor Antagonist. *Br J Pharmacol* **135**: pp 2004-2010.

Brautigam VM, Frasier C, Nikodemova M and Watters J J (2005) Purinergic Receptor Modulation of BV-2 Microglial Cell Activity: Potential Involvement of P38 MAP Kinase and CREB. *Journal of Neuroimmunology* **166**: pp 113-125.

Brunschweiger A and Muller C E (2006) P2 Receptors Activated by Uracil Nucleotides - An Update. *Current Medicinal Chemistry* **13**: pp 289-312.

Bültmann R, Wittenburg H, Pause B, Kurz G, Nickel P and Starke K (1996) P2-Purinoceptor Antagonists: III. Blockade of P2-Purinoceptor Subtypes and Ecto-

Nucleotidases by Compounds Related to Suramin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **354**: pp 498-504.

Burnstock G (1976) Purinergic Receptors. *Journal of Theoretical Biology* **62**: pp 491-503.

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: a Multi Disciplinary Approach* (Straub R and Bolis L eds) pp 107-118, Raven Press, New York.

Burnstock G (1997) The Past, Present and Future of Purine Nucleotides As Signalling Molecules. *Neuropharmacology* **36**: pp 1127-1139.

Burnstock G (2004) Introduction: P2 Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **4**: pp 793-803.

Burnstock G (2007) Purine and Pyrimidine Receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **64**: pp 1471-1483.

Charlton SJ, Brown C A, Weisman G A, Turner J T, Erb L and Boarder M R (1996) PPADS and Suramin As Antagonists at Cloned P2Y- and P2U-Purinoceptors. *Br J Pharmacol* **118**: pp 704-710.

Cheek DJ, McHugh J M, Blood-Siegfried J, McFetridge J F and Turner B S (2000) A Historical Perspective on the Discovery of Adenyl Purines. *Biol Res Nurs* **1**: pp 265-275.

Cheng HC (2002) 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* **46**: pp 61-71.

Cheng Y and Prusoff W H (1973) Relationship Between the Inhibition Constant (K1) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: pp 3099-3108.

Chhatriwala M, Ravi R G, Patel R I, Boyer J L, Jacobson K A and Harden T K (2004) Induction of Novel Agonist Selectivity for the ADP-Activated P2Y1 Receptor Versus the ADP-Activated P2Y12 and P2Y13 Receptors by Conformational Constraint of an ADP Analog. *J Pharmacol Exp Ther* **311**: pp 1038-1043.

Choi JY, Namkung W, Shin J H and Yoon J H (2003) Uridine-5'-Triphosphate and Adenosine Triphosphate GammaS Induce Mucin Secretion Via Ca2+-Dependent Pathways in Human Nasal Epithelial Cells. *Acta Otolaryngol* **123**: pp 1080-1086.

Clapham DE and Neer E J (1997) G Protein Subunits. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**: pp 167-203.

Communi D, Govaerts C, Parmentier M and Boeynaems J M (1997) Cloning of a Human Purinergic P2Y Receptor Coupled to Phospholipase C and Adenylyl Cyclase. *J Biol Chem* **272**: pp 31969-31973.

Communi D, Parmentier M and Boeynaems J M (1996) Cloning, Functional Expression and Tissue Distribution of the Human P2Y6Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **222**: pp 303-308.

Communi D, Robaye B and Boeynaems J M (1999) Pharmacological Characterization of the Human P2Y11 Receptor. *Br J Pharmacol* **128**: pp 1199-1206.

Communi D, Suarez-Huerta N, Dussossoy D, Savi P and Boeynaems J M (2001) Cotranscription and Intergenic Splicing of Human P2Y11 and SSF1 Genes. *J Biol Chem* **276**: pp 16561-16566.

Conigrave AD, Fernando K C, Gu B, Tasevski V, Zhang W, Luttrell B M and Wiley J S (2001) P2Y11 Receptor Expression by Human Lymphocytes: Evidence for Two CAMP- Linked Purinoceptors. *Eur J Pharmacol* **426**: pp 157-163.

Costanzi S, Mamedova L, Gao Z G and Jacobson K A (2004) Architecture of P2Y Nucleotide Receptors: Structural Comparison Based on Sequence Analysis, Mutagenesis, and Homology Modeling. *J Med Chem* **47**: pp 5393-5404.

Cox MA, Gomes B, Palmer K, Du K, Wiekowski M, Wilburn B, Petro M, Chou C C, Desquitado C, Schwarz M, Lunn C, Lundell D, Narula S K, Zavodny P J and Jenh C H (2005) The Pyrimidinergic P2Y6 Receptor Mediates a Novel Release of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Monocytic Cells Stimulated With UDP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**: pp 467-473.

Crosson CE, Yates P W, Bhat A N, Mukhin Y V and Husain S (2004) Evidence for Multiple P2Y Receptors in Trabecular Meshwork Cells. *J Pharmacol Exp Ther* **309**: pp 484-489.

Damer S, Niebel B, Czeche S, Nickel P, Ardanuy U, Schmalzing G, Rettinger J, Mutschler E and Lambrecht G (1998) NF279: a Novel Potent and Selective Antagonist of P2X Receptor-Mediated Responses. *Eur J Pharmacol* **350**: pp R5-R6.

De Clercq E (1979) Suramin: a Potent Inhibitor of the Reverse Transcriptase of RNA Tumor Viruses. *Cancer Letters* **8**: pp 9-22.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz J M, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G and Baricordi O R (2001) Nucleotide Receptors: an Emerging Family of Regulatory Molecules in Blood Cells. *Blood* **97**: pp 587-600.

Dunn P and Blakeley A G (1988) Suramin: a Reversible P2-Purinoceptor Antagonist in the Mouse Vas Deferens. *Br J Pharmacol* **93**: pp 243-245.

Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner J T and Weisman G A (1995) Site-Directed Mutagenesis of P[IMAGE] Purinoceptors. *J Biol Chem* **270**: pp 4185-4188.

Filtz TM, Li Q, Boyer J L, Nicholas R A and Harden T K (1994) Expression of a Cloned P2Y Purinergic Receptor That Couples to Phospholipase C. *Mol Pharmacol* **46**: pp 8-14.

Fischer W, Franke H, Gröger-Arndt H and Illes P (2005) Evidence for the Existence of P2Y1,2,4 Receptor Subtypes in HEK-293 Cells: Reactivation of P2Y1 Receptors

After Repetitive Agonist Application. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **371**: pp 466-472.

Foster SJ and Perkins J P (1977) Glucocorticoids Increase the Responsiveness of Cells in Culture to Prostaglandin E1. *PNAS* **74**: pp 4816-4820.

Franke H, Krügel U and Illes P (2006) P2 Receptors and Neuronal Injury. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **452**: pp 622-644.

Fredriksson R and Schiöth H B (2006) G Protein-coupled Receptors in the Human Genome, in *Ligand Design for G Protein-Coupled Receptors* (Rognan D ed) pp 1-25, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Fredriksson R, Lagerstrom M C, Lundin L G and Schiöth H B (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**: pp 1256-1272.

Fröhlen, B. and Kauschat, D. P2Y11 receptor agonists and the use in the field of erythropoiesis. Bayer Healthcare AG. EP20020020415 20020911[EP1398632]. 17-3-2004. Deutschland.
Ref Type: Patent

Gachet C (2006) Regulation of Platelet Functions by P2 Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **46**: pp 277-300.

Gao ZG, Hechler B, Besada P, Gachet C and Jacobson K A (2008) Caged Agonist of P2Y1 and P2Y12 Receptors for Light-Directed Facilitation of Platelet Aggregation. *Biochemical Pharmacology* **75**: pp 1341-1347.

Gever J, Cockayne D, Dillon M, Burnstock G and Ford A (2006) Pharmacology of P2X Channels. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **452**: pp 513-537.

Giorgi I, Biagi G, Bianucci A M, Borghini A, Livi O, Leonardi M, Pietra D, Calderone V and Martelli A (2008) N6-1,3-Diphenylurea Derivatives of 2-Phenyl-9-Benzyladenines and 8-Azaadenines: Synthesis and Biological Evaluation As Allosteric Modulators of A2A Adenosine Receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Graham FL, Smiley J, Russell W C and Nairn R (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA From Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol* **36**: pp 59-72.

Greve H, Meis S, Kassack M U, Kehraus S, Krick A, Wright A D and Konig G M (2007) New Iantherans From the Marine Sponge Ianthella Quadrangulata: Novel Agonists of the P2Y11 Receptor. *J Med Chem* **50**: pp 5600-5607.

Guse AH (2004) Regulation of Calcium Signaling by the Second Messenger Cyclic Adenosine Diphosphoribose (CADPR). *Current Molecular Medicine* **4**: pp 239-248.

Hamacher A, Weigt M, Wiese M, Hoefgen B, Lehmann J and Kassack M (2006) Dibenzazecine Compounds With a Novel Dopamine/5HT2A Receptor Profile and 3D-QSAR Analysis. *BMC Pharmacology* **6**.

Hausmann R, Rettinger J, Gerevich Z, Meis S, Kassack M U, Illes P, Lambrecht G and Schmalzing G (2006) 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* **69**: pp 2058-2067.

Hermans E (2003) Biochemical and Pharmacological Control of the Multiplicity of Coupling at G-Protein-Coupled Receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **99**: pp 25-44.

Hoffmann C, Moro S, Nicholas R A, Harden T K and Jacobson K A (1999) The Role of Amino Acids in Extracellular Loops of the Human P2Y1 Receptor in Surface Expression and Activation Processes. *J Biol Chem* **274**: pp 14639-14647.

Horner S, Menke K, Hildebrandt C, Kassack M, Nickel P, Ullmann H, Mahaut-Smith M and Lambrecht G (2005) The Novel Suramin Analogue NF864 Selectively Blocks P2X1 Receptors in Human Platelets With Potency in the Low Nanomolar Range. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **372**: pp 1-13.

Hulsmann M, Nickel P, Kassack M, Schmalzing G, Lambrecht G and Markwardt F (2003) NF449, a Novel Picomolar Potency Antagonist at Human P2X1 Receptors. *European Journal of Pharmacology* **470**: pp 1-7.

Jacobson KA, Jarvis M F and Williams M (2002) Purine and Pyrimidine (P2) Receptors As Drug Targets. *J Med Chem* **45**: pp 4057-4093.

Jacobson KA, King B F and Burnstock G (2000) Pharmacological Characterization of P2 (Nucleotide) Receptors. *Celltransmission (Fa Sigma)* **16**: pp 3-23.

Jiang Q, Guo D, Lee B X, Van Rhee A M, Kim Y C, Nicholas R A, Schachter J B, Harden T K and Jacobson K A (1997) A Mutational Analysis of Residues Essential for Ligand Recognition at the Human P2Y1 Receptor. *Mol Pharmacol* **52**: pp 499-507.

Kassack MU, Hofgen B, Lehmann J, Eckstein N, Quillan J M and Sadee W (2002) Functional Screening of G Protein-Coupled Receptors by Measuring Intracellular Calcium With a Fluorescence Microplate Reader. *J Biomol Screen* **7**: pp 233-246.

Kassack MU, Braun K, Ganso M, Ullmann H, Nickel P, Boing B, Muller G and Lambrecht G (2004) Structure-Activity Relationships of Analogues of NF449 Confirm NF449 As the Most Potent and Selective Known P2X1 Receptor Antagonist. *European Journal of Medicinal Chemistry* **39**: pp 345-357.

Kaufmann A, Musset B, Limberg S H, Renigunta V, Sus R, Dalpke A H, Heeg K M, Robaye B and Hanley P J (2005) "Host Tissue Damage" Signal ATP Promotes Non-Directional Migration and Negatively Regulates Toll-Like Receptor Signaling in Human Monocytes. *J Biol Chem* **280**: pp 32459-32467.

Kaur M, Reed E, Sartor O, Dahut W and Figg W D (2002) Suramin's Development: What Did We Learn? *Investigational New Drugs* **20**: pp 209-219.

Kenakin T (1997) Competitive Antagonism, in *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction* pp 331-374, Lippincott-Raven, New York.

Kennedy C and Burnstock G (1985) Evidence for Two Types of P2-Purinoceptor in Longitudinal Muscle of the Rabbit Portal Vein. *European Journal of Pharmacology* **111**: pp 49-56.

Kettlun MA, Leyton M, Valenzuela A M, Mancilla M and Traverso-Cori A (1992) Identification and Subcellular Localization of Two Isoenzymes of Apyrase From Solanum Tuberosum. *Phytochemistry* **31**: pp 1889-1894.

King BF, Dacquet C, Ziganshin A U, Weetman D F, Burnstock G, Vanhoutte P M and Spedding M (1996) Potentiation by 2,2'-Pyridylisatogen Tosylate of ATP-Responses at a Recombinant P2Y1 Purinoceptor. *Br J Pharmacol* **117**: pp 1111-1118.

Klabunde T and Hessler G (2002) Drug Design Strategies for Targeting G-Protein-Coupled Receptors. *ChemBioChem* **3**: pp 928-944.

Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-Protein-Coupled Receptor Database. *Receptors and Channels* **2**: pp 1-7.

Lacks S and Greenberg B (1977) Complementary Specificity of Restriction Endonucleases of Diplococcus Pneumoniae With Respect to DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology* **114**: pp 153-168.

Lambrecht G (2000) Agonists and Antagonists Acting at P2X Receptors: Selectivity Profiles and Functional Implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **362**: pp 340-350.

Langmead CJ and Christopoulos A (2006) Allosteric Agonists of 7TM Receptors: Expanding the Pharmacological Toolbox. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**: pp 475-481.

Langmead CJ, Fry V A H, Forbes I T, Branch C L, Christopoulos A, Wood M D and Herdon H J (2006) Probing the Molecular Mechanism of Interaction Between 4-n-Butyl-1-[4-(2-Methylphenyl)-4-Oxo-1-Butyl]-Piperidine (AC-42) and the Muscarinic M1 Receptor: Direct Pharmacological Evidence That AC-42 Is an Allosteric Agonist. *Mol Pharmacol* **69**: pp 236-246.

Lanzetta PA, Alvarez L J, Reinach P S and Candia O A (1979) An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate. *Analytical Biochemistry* **100**: pp 95-97.

Lin K, Sadee W and Quillan J M (1999) Rapid Measurements of Intracellular Calcium Using a Fluorescence Plate Reader. *Biotechniques* **26**: pp 318-6.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M and Myrtek D (2006a) Durchflusscytometrie, in *Der Experimentator-Immunologie* pp 77-103, Elsevier- Spektrum Akademischer Verlag, München.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M and Myrtek D (2006b) Quantitative Immunoassays, in *Der Experimentator-Immunologie* pp 105-133, Elsevier- Spektrum Akademischer Verlag, München.

Marinissen MJ and Gutkind J S (2001) G-Protein-Coupled Receptors and Signaling Networks: Emerging Paradigms. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**: pp 368-376.

Marteau F, Gonzalez N S, Communi D, Goldman M, Boeynaems J M and Communi D (2005) Thrombospondin-1 and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Are Major Targets of Extracellular ATP in Human Dendritic Cells. *Blood* **106**: pp 3860-3866.

Mitsuya H, Popovic M, Yarchoan R, Matsushita S, Gallo R C and Broder S (1984) Suramin Protection of T Cells in Vitro Against Infectivity and Cytopathic Effect of HTLV-III. *Science* **226**: pp 172-174.

Moreschi I, Bruzzone S, Bodrato N, Usai C, Guida L, Nicholas R A, Kassack M U, Zocchi E and De Flora A (2007) NAADP+ Is an Agonist of the Human P2Y11 Purinergic Receptor. *Cell Calcium*.

Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas R A, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, Usai C, Meis S, Kassack M U, Zocchi E and De Flora A (2006) Extracellular NAD+ Is an Agonist of the Human P2Y11 Purinergic Receptor in Human Granulocytes. *J Biol Chem* **281**: pp 31419-31429.

Moro S, Guo D, Camaioni E, Boyer J L, Harden T K and Jacobson K A (1998) Human P2Y1 Receptor: Molecular Modeling and Site-Directed Mutagenesis As Tools to Identify Agonist and Antagonist Recognition Sites. *J Med Chem* **41**: pp 1456-1466.

Moro S, Hoffmann C and Jacobson K A (1999) Role of the Extracellular Loops of G Protein-Coupled Receptors in Ligand Recognition: a Molecular Modeling Study of the Human P2Y1 Receptor. *Biochemistry* **38**: pp 3498-3507.

Muller CE (2002) P2-Pyrimidinergic Receptors and Their Ligands. *Current Pharmaceutical Design* **8**: pp 2353-2369.

Mullis KB, Faloona F A, Scharf S, Saiki R K, Horn G and Erlich H A (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: pp 263-273.

Murakami M and Kouyama T (2008) Crystal Structure of Squid Rhodopsin. *Nature* **453**: pp 363-367.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Ruth P and Schäfer-Korting M (2006) Antibakterielle Hemmstoffe der Proteinsynthese, in *Arzneimittelwirkungen Kompakt* pp 382-383, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Myrtek D and Idzko M (2007) Chemotactic Activity of Extracellular Nucleotideson Human Immune Cells. *Purinergic Signalling* **3**: pp 5-11.

Nahum V, Zündorf G, Lévesque SA, Beaudoin AR and Georg Reiser B F (2002) Adenosine 5'-O-(1-Boranotriphosphate) Derivatives As Novel P2Y1 Receptor Agonists. *J Med Chem* **45**: pp 5384-5396.

Nakahata N, Martin M W, Hughes A R, Hepler J R and Harden T K (1986) H1-Histamine Receptors on Human Astrocytoma Cells. *Mol Pharmacol* **29**: pp 188-195.

Nandanan E, Jang S Y, Moro S, Kim H O, Siddiqui M A, Russ P, Marquez V E, Busson R, Herdewijn P, Harden T K, Boyer J L and Jacobson K A (2000) Synthesis, Biological Activity, and Molecular Modeling of Ribose-Modified Deoxyadenosine Bisphosphate Analogues As P2Y1 Receptor Ligands. *J Med Chem* **43**: pp 829-842.

North RA (2002) Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev* **82**: pp 1013-1067.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C A, Motoshima H, Fox B A, Trong I L, Teller D C, Okada T, Stenkamp R E, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**: pp 739-745.

Patel K, Barnes A, Camacho J, Paterson C, Boughtflower R, Cousens D and Marshall F (2001) Activity of Diadenosine Polyphosphates at P2Y Receptors Stably Expressed in 1321N1 Cells. *European Journal of Pharmacology* **430**: pp 203-210.

Ponten J and Macintyre E H (1968) Long Term Culture of Normal and Neoplastic Human Glia. *Acta path micobiol scandinav* **74**: pp 465-486.

Price MR, Baillie G L, Thomas A, Stevenson L A, Easson M, Goodwin R, McLean A, McIntosh L, Goodwin G, Walker G, Westwood P, Marrs J, Thomson F, Cowley P, Christopoulos A, Pertwee R G and Ross R A (2005) Allosteric Modulation of the Cannabinoid CB1 Receptor. *Mol Pharmacol* **68**: pp 1484-1495.

Qi AD, Kennedy C, Harden T K and Nicholas R A (2001a) Differential Coupling of the Human P2Y11 Receptor to Phospholipase C and Adenylyl Cyclase. *Br J Pharmacol* **132**: pp 318-326.

Qi AD, Zambon A C, Insel P A and Nicholas R A (2001b) An Arginine/Glutamine Difference at the Juxtaposition of Transmembrane Domain 6 and the Third Extracellular Loop Contributes to the Markedly Different Nucleotide Selectivities of Human and Canine P2Y11 Receptors. *Mol Pharmacol* **60**: pp 1375-1382.

Ralevic V and Burnstock G (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**: pp 413-492.

Rettinger J, Schmalzing G, Damer S, Muller G, Nickel P and Lambrecht G (2000) The Suramin Analogue NF279 Is a Novel and Potent Antagonist Selective for the P2X(1) Receptor [In Process Citation]. *Neuropharmacology* **39**: pp 2044-2053.

Rettinger J, Braun K, Hochmann H, Kassack M U, Ullmann H, Nickel P, Schmalzing G and Lambrecht G (2005) Profiling at Recombinant Homomeric and Heteromeric Rat P2X Receptors Identifies the Suramin Analogue NF449 As a Highly Potent P2X1 Receptor Antagonist. *Neuropharmacology* **48**: pp 461-468.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P O, Steinman R M and Schuler G (1994) Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood. *J Exp Med* **180**: pp 83-93.

Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson M A, Rasmussen S G F, Thian F S, Kobilka T S, Choi H J, Yao X J, Weis W I, Stevens R C and Kobilka B K (2007) GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into 2-Adrenergic Receptor Function. *Science* **318**: pp 1266-1273.

Rozen S and Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Methods Mol Biol* **132**: pp 365-386.

Sallusto F and Lanzavecchia A (1994) Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor Alpha. *J Exp Med* **179**: pp 1109-1118.

Satthaporn S and Eremin O (2001) Dendritic Cells (I): Biological Functions. *J R Coll Surg Edinb* **46**: pp 9-19.

Schild HO (1957) Drug Antagonism and PA_X. *Pharmacol Rev* **9**: pp 242-246.

Schrimpf G (2002) Gelelektrophorese von Nucleinsäuren, in *Gentechnische Methoden* (Schrimpf G ed) pp 67, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Southern P and Berg P (1982) Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance With a Bacterial Gene Under Control of the SV40 Early Region Promoter. *Journal of molecular and applied genetics* **1**: pp 327-341.

Stassen M (2002) Absorptionsmessungen, in *Gentechnische Methoden* (Schrimpf G ed) pp 1-3, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Steinman RM (1991) The Dendritic Cell System and Its Role in Immunogenicity. *Annual Review of Immunology* **9**: pp 271-296.

Steinman RM and Cohn Z A (1973) Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lympoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *J Exp Med* **137**: pp 1142-1162.

Stratowa C, Himmler A and Czernilofsky A P (1995) Use of a Luciferase Reporter System for Characterizing G-Protein-Linked Receptors. *Current Opinion in Biotechnology* **6**: pp 574-581.

Suarez-Huerta N, Boeynaems J M and Communi D (2000) Cloning, Genomic Organization, and Tissue Distribution of Human Ssf-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**: pp 37-42.

Sur C, Mallorga P J, Wittmann M, Jacobson M A, Pascarella D, Williams J B, Brandish P E, Pettibone D J, Scolnick E M and Conn P J (2003) N-Desmethylclozapine, an Allosteric Agonist at Muscarinic 1 Receptor, Potentiates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activity. *PNAS* **100**: pp 13674-13679.

Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., and Mitaku, S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. FEBS Letters 520[1], 97-101. 5-6-2002.
Ref Type: Abstract

Thompson JD, Higgins D G and Gibson T J (1994) CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res* **22**: pp 4673-4680.

Tuluc F, B++ltmann R, Gl+ñnzel M, Frahm A W and Starke K (1998) P2-Receptor Antagonists: IV. Blockade of P2-Receptor Subtypes and Ecto-Nucleotidases by Compounds Related to Reactive Blue 2. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **357**: pp 111-120.

Ullmann H, Meis S, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Nickel P, Communi D, Boeynaems J M, Wolf C, Hausmann R, Schmalzing G and Kassack M U (2005) Synthesis and Structure-Activity Relationships of Suramin-Derived P2Y11 Receptor Antagonists With Nanomolar Potency. *J Med Chem* **48**: pp 7040-7048.

Urban JD, Clarke W P, von Zastrow M, Nichols D E, Kobilka B, Weinstein H, Javitch J A, Roth B L, Christopoulos A, Sexton P M, Miller K J, Spedding M and Mailman R B (2007) Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **320**: pp 1-13.

Vaughan KR, Stokes L, Prince L R, Marriott H M, Meis S, Kassack M U, Bingle C D, Sabroe I, Surprenant A and Whyte M K B (2007) Inhibition of Neutrophil Apoptosis by ATP Is Mediated by the P2Y11 Receptor. *J Immunol* **179**: pp 8544-8553.

Venter JC, Adams M D, Myers E W and et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**: pp 1304-1351.

Vollmar A and Dingermann T (2005) Grundlagen der Immunologie, in *Immunologie* pp 3-83, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

von Kugelgen I (2006) Pharmacological Profiles of Cloned Mammalian P2Y-Receptor Subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* **110**: pp 415-432.

Voogd TE, Vansterkenburg E L, Wilting J and Janssen L H (1993) Recent Research on the Biological Activity of Suramin. *Pharmacol Rev* **45**: pp 177-203.

Waldo GL, Corbitt J, Boyer J L, Ravi G, Kim H S, Ji X d, Lacy J, Jacobson K A and Harden T K (2002) Quantitation of the P2Y1 Receptor With a High Affinity Radiolabeled Antagonist. *Mol Pharmacol* **62**: pp 1249-1257.

Wang L, Jacobsen S E, Bengtsson A and Erlinge D (2004) P2 Receptor MRNA Expression Profiles in Human Lymphocytes, Monocytes and CD34+ Stem and Progenitor Cells. *BMC Immunology* **5**: pp 16.

White N and Burnstock G (2006) P2 Receptors and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**: pp 211-217.

White PJ, Webb T E and Boarder M R (2003) Characterization of a Ca2+ Response to Both UTP and ATP at Human P2Y11 Receptors: Evidence for Agonist-Specific Signaling. *Mol Pharmacol* **63**: pp 1356-1363.

Wilkin F, Duhant X, Bruyns C, Suarez-Huerta N, Boeynaems J M and Robaye B (2001) The P2Y11 Receptor Mediates the ATP-Induced Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol* **166**: pp 7172-7177.

Wilkin F, Stordeur P, Goldman M, Boeynaems J M and Robaye B (2002) Extracellular Adenine Nucleotides Modulate Cytokine Production by Human

Monocyte-Derived Dendritic Cells: Dual Effect on IL-12 and Stimulation of IL-10. *Eur J Immunol* **32**: pp 2409-2417.

Zhang Y, DeVries M E and Skolnick J (2006) Structure Modeling of All Identified G Protein-Coupled Receptors in the Human Genome. *PLoS Comput Biol* **2**: pp e13.

Zhong X, Kriz R, Seehra J and Kumar R (2004) N-Linked Glycosylation of Platelet P2Y12 ADP Receptor Is Essential for Signal Transduction but Not for Ligand Binding or Cell Surface Expression. *FEBS Letters* **562**: pp 111-117.

Zimmermann H (2000) Extracellular Metabolism of ATP and Other Nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **362**: pp 299-309.

Zylberg J, Ecke D, Fischer B and Reiser G (2007) Structure and Ligand-Binding Site Characteristics of the Human P2Y11 Nucleotide Receptor Deduced From Computational Modelling and Mutational Analysis. *Biochem J* **405**: pp 277-286.

10 Veröffentlichungen

Orginalarbeiten:

Ullmann H, Meis S, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Nickel P, Communi D, Boeynaems JM, Wolf C, Hausmann R, Schmalzing G, Kassack MU (2005): Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency. *J Med Chem* 48 (22): 7040-7048

Hausmann R, Rettinger J, Gerevich Z, Meis S, Kassack MU, Illes P, Lambrecht G, Schmalzing G (2006): The suramin analogue NF110 potently blocks P2X3 receptors: subtype selectivity is determined by location of sulfonic acid groups. *Mol. Pharmacol.* 69 (6): 2058-67

Moreschi I, Bruzzone S, Nicholas RA, Fruscione F, Sturla L, Benvenuto F, Usai C, Meis S, Kassack MU, Zocchi E, De Flora A (2006): Extracellular NAD+ Is an Agonist of the Human P2Y11 Purinergic Receptor in Human Granulocytes, *J. Biol. Chem.*, 281 (42): 31419 – 31429

Greve H*, Meis S*, Kassack MU, Kehraus S, Krick A, Wright SD, König GM (2007) New Iantherans from the Marine Sponge *Ianthella quadrangulata*: Novel agonists of the $P2Y_{11}$ receptor, *J Med Chem* 50(23):5600-7 (*Henrik Greve and Sabine Meis have contributed equally to this study.)

Vaughan KR, Stokes L, Prince LR, Marriott HM, Meis S, Kassack MU, Bingle CD, Sabroe I, Surprenant A, and Whyte MKB (2007) Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor, *J. Immunol.* 179 (12) 8544-53

Meis S, Hongwiset D, Bles N, Communi D, Boeynaems JM, Kassack MU (2008) Characterisation of a novel, selective non-nucleotide agonist and antagonist at human P2Y11-receptors in recombinant and dendritic cells, in preperation

Patente

Patent WO2008017586/ DE102006037920; Special carbonyl-bis imino compounds for treating immune diseases; Kassack MU, Meis S, Hongwiset D (14.02.2008)

Abstracta/Kongressmitteilungen

Meis S, Ullmann H, Nickel P, Communi D, Boeynaems JM, Kassack MU (2004) The suramin analogue NF157 is the first selective and potent P2Y11 receptor antagonist, Purines 2004, 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides, Chapel Hill, North Carolina, USA (Poster)

Meis S, Ullmann H, Nickel P, Communi D, Boeynaems JM, Kassack MU (2004) The suramin analogue NF157 is the first selective and potent P2Y11 receptor antagonist, *DPhG-Jahrestagung 2004*, Regensburg (Poster)

Zighetti ML, Ullmann H, Lecchi A, Meis S, Kassack MU, Cattaneo M. (2004) Studies of the specificity of the novel suramin analogue (NF449) as P2X1 receptor antagonist. Third International Meeting ADP 2004 P2 Receptors and Other, New Targets for Antithrombotic Drugs. Haematologica 89 (supplement 7): 19. (Poster)

Ullmann H, Meis S, Horner S, Lambrecht G, Nickel P, Kassack MU, (2005) Development of selective and potent ligands at P2X1 ion channels and P2Y11 GPCRs, *GRK677-Berichtskolloquium*, Bonn (Poster)

Marzian C, Meis S, Kassack MU, Wiese M (2005) QSAR and molecular modelling of the P2Y11 receptor and ligands, *GRK677-Berichtskolloquium*, Bonn (Poster)

Hongwiset D, Meis S, Kassack MU (2005) Synthesis and Biological Activity of Asymmetric NF157 Derivatives at P2Y11 Receptors, First Joint Italian-German Purine Club Meeting, Chieti, Italy (Poster and oral presentation)

Meis S, Hongwiset D, Kassack MU (2006) Functinal Comparison of different P2Y11-Receptor variants; *Minisymposium des GRK677*, Bonn (Poster)

Meis S, Hongwiset D, Kassack MU (2006) Discovery of new potent, non-nucleotide ligands at human $P2Y_{11}$-receptors results in NF546, the first non-nucleotide P2Y receptor agonist, and NF340, the so far most potent and selective $P2Y_{11}$ antagonist, 8th International Adenosine and Adenine Nucleotides Symposium, Ferrara (Poster) (Abstract: veröffentlicht in *Purinergic Signal.* 2006, *2*, 177).

Meis S, Hongwiset D, Kassack MU (2006): An allosteric mechanism at P2Y11-receptors?; Internationales Symposium des GRK677, Bonn (Poster)

Maître B., Léon C., Hechler B., Cazenave JPC., Meis S., Kassack MU., Gachet C (2006) Adenine nucleotides interact with dendritic cells not only through the $P2Y_{11}$ but also through the $P2Y_1$ receptor. ADP 2006: 4th International Meeting: Platelet P2 Receptors: from basic Science to clinical Practice, Bischoffsheim (Poster)

König G. M., Greve H., Meis S.,Kassack M. U., Kehraus S., Krick A. (2007) New Iantherans from the Marine Sponge *Ianthella quadrangulata*: Novel agonists of the $P2Y_{11}$ receptor, *DPhG-Jahrestagung 2007,* Erlangen (Poster)

König, G.M., Kehraus, S., Greve, H., Nett, M., Seibert, S., Mehner, C., Kassack, U., Meis, S. (2007) Marine Natural Products – an interdisciplinary challenge, Workshop" Bioactive Natural Products: Current Status and Future Scenarios" im Rahmen des "German Egyptian Year of Science and Technology 2007"

Greve H., Meis S.,Kassack M. U., Kehraus S., Krick A., Wright A. D., König G. M. (2007) New Iantherans from the Marine Sponge *Ianthella quadrangulata*: Novel agonists of the $P2Y_{11}$ receptor (2007), European Conference on marine natural products No. 5 (Poster)

11 Anhang

Ergebnis der Sequenzierung der verschiedenen Plasmide

$P2Y_1$:

ATGACCGAGGTGCTGTGGCCGGCTGTCCCCAACGGGACGGACGCTGCCTTCCTGGCCGGTCCGGGTTCGTCCTGGGGGA
ACAGCACGGTCGCCTCCACTGCCGCCGTCTCCTCGTCGTTCAAATGCGCCTTGACCAAGACGGGCTTCCAGTTTTACTACC
TGCCGGCTGTCTACATCTTGGTATTCATCATCGGCTTCCTGGGCAACAGCGTGGCCATCTGGATGTTCGTCTTCCACATGA
AGCCCTGGAGCGGCATCTCCGTGTACATGTTCAATTTGGCTCTGGCCGACTTCTTGTACGTGCTGACTCTGCCAGCCCTGA
TCTTCTACTACTTCAATAAAACAGACTGGATCTTCGGGGATGCCATGTGTAAACTGCAGAGGTTCATCTTTCATGTGAACCT
CTATGGCAGCATCTTGTTTCTGACATGCATCAGTGCCCACCGGTACAGCGGTGTGGTGTACCCCCTCAAGTCCCTGGGCC
GGCTCAAAAAGAAGAATGCGATCTGTATCAGCGTGCTGGTGTGGCTCATTGTGGTGGTGGCGATCTCCCCCATCCTCTTCT
ACTCAGGTACCGGGGTCCGCAAAAACAAAACCATCACCTGTTACGACACCACCTCAGACGAGTACCTGCGAAGTTATTTCA
TCTACAGCATGTGCACGACCGTGGCCATGTTCTGTGTCCCCTTGGTGCTGATTCTGGGCTGTTACGGATTAATTGTGAGAG
CTTTGATTTACAAAGATCTGGACAACTCTCCTCTGAGGAGAAAATCGATTTACCTGGTAATCATTGTACTGACTGTTTTTGCT
GTGTCTTACATCCCTTTCCATGTGATGAAAACGATGAACTTGAGGGCCCGGCTTGATTTTCAGACCCCAGCAATGTGTGCTT
TCAATGACAGGGTTTATGCCACGTATCAGGTGA

$P2Y_2$:

ATGGCAGCAGACCTGGGCCCCTGGAATGACACCATCAATGGCACCTGGGATGGGGATGAGCTGGGCTACAGGTGCCGCT
TCAACGAGGACTTCAAGTACGTGCTGCTGCCTGTGTCCTACGGCGTGGTGTGCGTGCTTGGGCTGTGTCTGAACGCCGTG
GCGCTCTACATCTTCTTGTGCCGCCTCAAGACCTGGAATGCGTCCACCACATATATGTTCCACCTGGCTGTGTCTGATGCA
CTGTATGCGGCCTCCCTGCCGCTGCTGGTCTATTACTACGCCCGCGGCGACCACTGGCCCTTCAGCACGGTGCTCTGCAA
GCTGGTGCGCTTCCTCTTCTACACCAACCTTTACTGCAGCATCCTCTTCCTCACCTGCATCAGCGTGCACCGGTGTCTGGG
CGTCTTACGACCTCTGCGCTCCCTGCGCTGGGGCCGGGCCCGCTACGCTCGCCGGGTGGCCGGGGCCGTGTGGGTGTT
GGTGCTGGCCTGCCAGGCCCCCGTGCTCTACTTTGTCACCACCAGCGCGCGCGGGGGCCGCGTAACCTGCCACGACACC
TCGGCACCCGAGCTCTTCAGCCGCTTCGTGGCCTACAGCTCAGTCATGCTGGGCCTGCTCTTCGCGGTGCCCTTTGCCGT
CATCCTTGTCTGTTACGTGCTCATGGCTCGGCGACTGCTAAAGCCAGCCTACGGGACCTCGGGCGGCCTGCCTAGGGCCA
AGCGCAAGTCCGTGCGCACCATCGCCGTGGTGCTGGCTGTCTTCGCCCTCTGCTTCCTGCCATTCCACGTCACCCGCACC
CTCTACTACTCCTTCCGTTCGCTGGACCTCAGCTGCCACACCCTCAACGCCATCAACATGGCCTACAAGGTTACCCGGCCG
CTGGCCAGTGCTAACAGTTGCCTTGACCCCGTGCTCTACTTCCTGGCTGGGC

$P2Y_6$:

ATGGAATGGGACAATGGCACAGGCCAGGCTCTGGGCTTGCCACCCACCACCTGTGTCTACCGCGAGAACTTCAAGCAACT
GCTGCTGCCACCTGTGTATTCGGCGGTGCTGGCGGCTGGCCTGCCGCTGAACATCTGTGTCATTACCCAGATCTGCACGT
CCCGCCGGGCCCTGACCCGCACGGCCGTGTACACCCTAAACCTTGCTCTGGCTGACCTGCTATATGCCTGCTCCCTGCCC
CTGCTCATCTACAACTATGCCCAAGGTGATCACTGGCCCTTTGGCGACTTCGCCTGCCGCCTGGTCCGCTTCCTCTTCTAT
GCCAACCTGCACGGCAGCATCCTCTTCCTCACCTGCATCAGCTTCCAGCGCTACCTGGGCATCTGCCACCCGCTGGCCCC
CTGGCACAAACGTGGGGGCCGCCGGGCTGCCTGGCTAGTGTGTGTAGCCGTGTGGCTGGCCGTGACAACCCAGTGCCTG
CCCACAGCCATCTTCGCTGCCACAGGCATCCAGCGTAACCGCACTGTCTGCTATGACCTCAGCCCGCCTGCCCTGGCCAC
CCACTATATGCCCTATGGCATGGCTCTCACTGTCATCGGCTTCCTGCTGCCCTTTGCTGCCCTGCTGGCCTGCTACTGTCT
CCTGGCCTGCCGCCTGTGCCGCCAGGATGGCCCGGCAGAGCCTGTGGCCCAGGAGCGGCGTGGCAAGGCGGCCCGCAT
GGCCGTGGTGGTGGCTGCTGCCTTTGCCATCAGCTTCCTGCCTTTTCACATCACCAAGACAGCCTACCTGGCAGTGCGCT
CGACGCCGGGCGTCCCCTGCACTGTATTGGAGGCCTTTGCAGCGGCCTACAAAGGCACGCGGCCGTTTGCCAGTGCCAA
CAGCGTGCTGGACCCCATCCTCTTCTACTTCACCCAGAAGAAGTTCCGCCGGCGACCACATGAGCTCCTACAGAAACTCAC
AGCCAAATGGCAGAGGCAGGGTCGCT

P2Y$_{11}$GU:

ATGGCAGCCAACGTCTCGGGTGCCAAGTCCTGCCCTGCCAACTTCTTGGCAGCTGCCGACGACAAACTCAGTGGGTTCCA
GGGGGACTTCCTGTGGCCCATACTGGTGGTTGAGTTCCTGGTGGCCGTGGCCAGCAATGGCCTGGCCCTGTACCGCTTCA
GCATCCGGAAGCAGCGCCCATGGCACCCCGCCGTGGTCTTCTCTGTCCAGCTGGCAGTCAGCGACCTGCTCTGCGCTCT
GACGCTGCCCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCCCAAGCACTGGCGCTATGGGGAGGCCGCGTGCCGCCTGGAGCG
CTTCCTCTTCACCTGCAACCTGCTGGGCAGCGTCATCTTCATCACCTGCATCAGCCTCAACCGCTACCTGGGCATCGTGCA
CCCCTTCTTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCACGCCTGGGCCGTGAGCGCTGCCGGCTGGGTCCTGGCCGCCCTG
CTGGCCATGCCCACACTCAGCTTCTCCCACCTGAAGAGGCCGCAGCAGGGGGCGGGCAACTGCAGCGTGGCCAGGCCC
GAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGGGGT
TGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCA
TGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCCCTAC
CACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTT

hisP2Y$_{11}$: (in fetten Buchstaben hervorgehoben sind die 18 Basen, die für den 6xHis-Tag codieren)

ATGCATCACCATCACCATCACGCAGCCAACGTCTCGGGTGCCAAGTCCTGCCCTGCCAACTTCTTGGCAGCTGCCGACGA
CAAACTCAGTGGGTTCCAGGGGGACTTCCTGTGGCCCATACTGGTGGTTGAGTTCCTGGTGGCCGTGGCCAGCAATGGCC
TGGCCCTGTACCGCTTCAGCATCCGGAAGCAGCGCCCATGGCACCCCGCCGTGGTCTTCTCTGTCCAGCTGGCAGTCAGC
GACCTGCTCTGCGCTCTGACGCTGCCCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCCCAAGCACTGGCGCTATGGGGAGGCCG
CGTGCCGCCTGGAGCGCTTCCTCTTCACCTGCAACCTGCTGGGCAGCGTCATCTTCATCACCTGCATCAGCCTCAACCGCT
ACCTGGGCATCGTGCACCCCTTCTTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCACGCCTGGGCCGTGAGCGCTGCCGGCTG
GGTCCTGGCCGCCCTGCTGGCCATGCCCACACTCAGCTTCTCCCACCTGAAGAGGCCGCAGCAGGGGGCGGGCAACTGC
AGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCC
TGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCC

Ergebnis der Sequenzierung der Plasmide für den mutierten P2Y$_{11}$-Rezeptor

hisP2Y$_{11}$C102A

ATGCATCACCATCACCATCACGCAGCCAACGTCTCGGGTGCCAAGTCCTGCCCTGCCAACTTCTTGGCAGCTGCCGACGA
CAAACTCAGTGGGTTCCAGGGGGACTTCCTGTGGCCCATACTGGTGGTTGAGTTCCTGGTGGCCGTGGCCAGCAATGGCC
TGGCCCTGTACCGCTTCAGCATCCGGAAGCAGCGCCCATGGCACCCCGCCGTGGTCTTCTCTGTCCAGCTGGCAGTCAGC
GACCTGCTCTGCGCTCTGACGCTGCCCCCGCTGGCCGCCTACCTCTATCCCCCCAAGCACTGGCGCTATGGGGAGGCCG
CG**GC**CCGCCTGGAGCGCTTCCTCTTCACCTGCAACCTGCTGGGCAGCGTCATCTTCATCACCTGCATCAGCCTCAACCGC
TACCTGGGCATCGTGCACCCCTTCTTCGCCCGAAGCCACCTGCGACCCAAGCACGCCTGGGCCGTGAGCGCTGCCGGCT
GGGTCCTGGCCGCCCTGCTGGCCATGCCCACACTCAGCTTCTCCCACCTGAAGAGGCCGCAGCAGGGGGCGGGCAACTG
CAGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGC
CTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTG
CTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCA
GCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTT
GCAGAC

hisP2Y$_{11}$C188A

GGCGGGCAACTGCAGCGTGGCCAGGCCCGAGGCC**GC**CATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTA
CAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTC
GGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTG

GCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCC
GCTGCCCGAGCTTTGCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCG
GGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGAC
ACTGCCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGC
CGCCCCTAAACCGTCAGAGCCCCAGTC

hisP2Y$_{11}$C191A

GGGGCGGGCAACTGCAGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAG**GCC**CTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGC
CTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCC
CTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGT
GTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCAC
CCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATG
CGGGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCG
ACACTGCCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACA
GCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$D196A

AGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAG**C**CCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGC
CTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTG
CTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCA
GCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTT
GCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATGCCCC
TGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTAC
AGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGT
CAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$R203A

AGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTAC**GC**AGCGTATAGC
CTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTG
CTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCA
GCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTT
GCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATGCCCC
TGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTAC
AGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGT
CAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$R275A

CCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGG
GGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAG
GCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCC
CTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCT**GC**GCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATAGCC
CAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCTGTG
TCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTACAGGGACAGCTG
GAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCCCAG
TCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$R276A

AGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGG
CGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCC
CAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGT
GCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGG**GC**GCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATA
GCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCT
GTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTACAGGGACAG
CTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCC
CAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$R277A

GTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGC
CGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGA
AGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTG
CTCAACGTGGATGCTCGGCGG**GC**CTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGG
AGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATG
GCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAG
AGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATG
A

hisP2Y$_{11}$R307A

GGGGCGGGCAACTGCAGCGTGGCCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCC
TACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCC
TCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTG
TGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACC
CGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATG**G**
CGGGCCTCATGCCCCTGGCCTTCTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGA
CACTGCCCCGGCTACAGGGACAGCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAG
CCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCCCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

hisP2Y$_{11}$P311S

AGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCTGG
CGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAGCC
CAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTATGT
GCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACATA
GCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATG**T**CCCTGGCCTTCT
GTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTACAGGGACAG
CTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCCC
CAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGACTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT

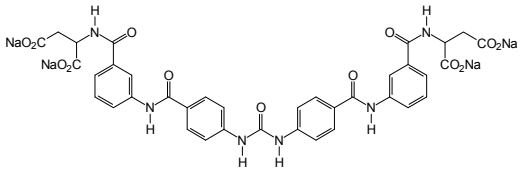
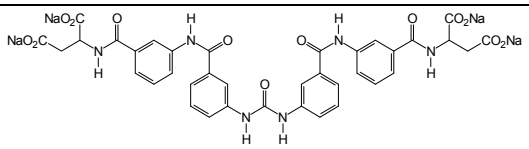
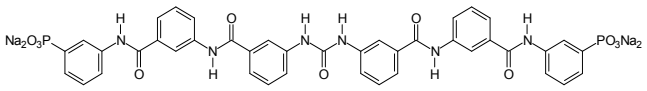
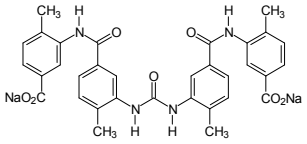
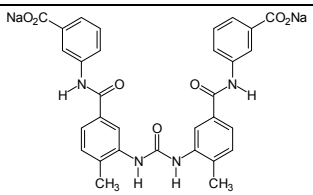
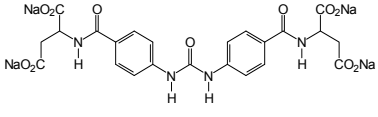
hisP2Y$_{11}$P311A

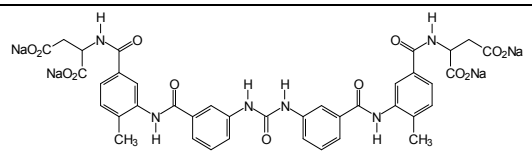
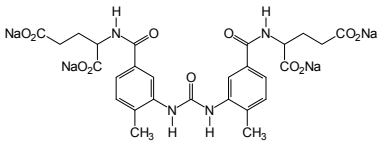
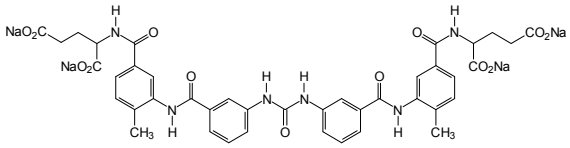
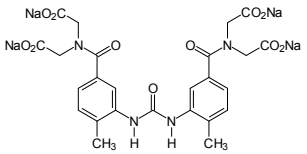
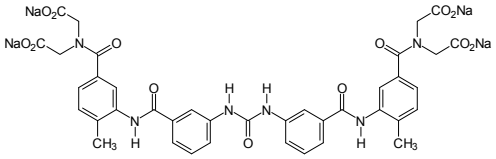
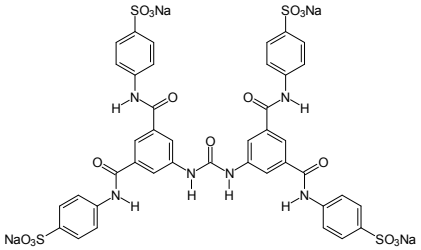
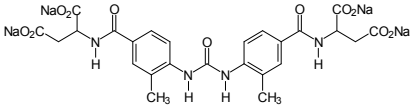
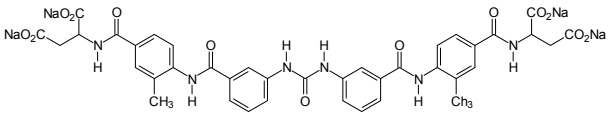
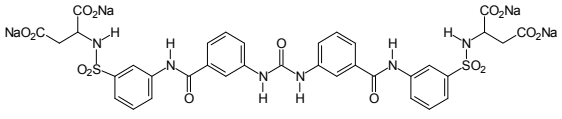
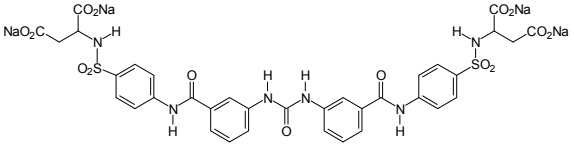
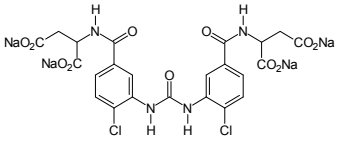
CCAGGCCCGAGGCCTGCATCAAGTGTCTGGGGACAGCAGACCACGGGCTGGCGGCCTACAGAGCGTATAGCCTGGTGCT
GGCGGGGTTGGGCTGCGGCCTGCCGCTGCTGCTCACGCTGGCAGCCTACGGCGCCCTCGGGCGGGCCGTGCTACGCAG

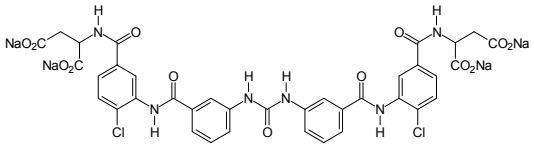
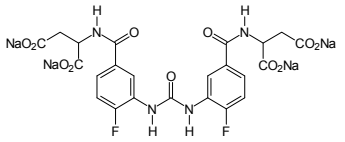
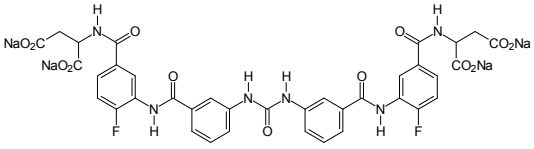
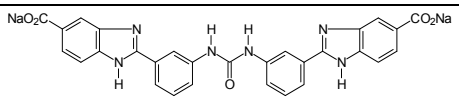
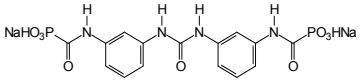
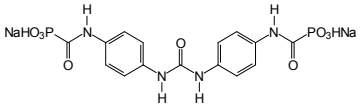
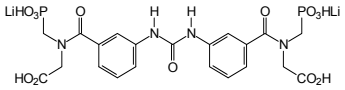
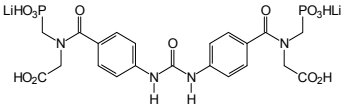
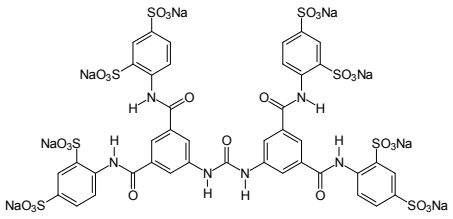
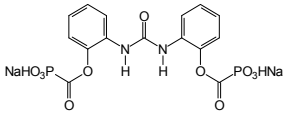
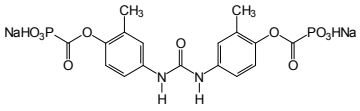
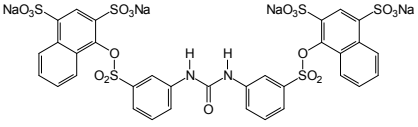
CCCAGGCATGACTGTGGCCGAGAAGCTGCGTGTGGCAGCGTTGGTGGCCAGTGGTGTGGCCCTCTACGCCAGCTCCTAT
GTGCCCTACCACATCATGCGGGTGCTCAACGTGGATGCTCGGCGGCGCTGGAGCACCCGCTGCCCGAGCTTTGCAGACA
TAGCCCAGGCCACAGCAGCCCTGGAGCTGGGGCCCTACGTGGGCTACCAGGTGATGCGGGGCCTCATG**G**CCCTGGCCTT
CTGTGTCCACCCTCTACTCTACATGGCCGCAGTGCCCAGCCTGGGCTGCTGCTGCCGACACTGCCCCGGCTACAGGGACA
GCTGGAACCCAGAGGACGCCAAGAGCACTGGCCAAGCCCTGCCCCTCAATGCCACAGCCGCCCCTAAACCGTCAGAGCC
CCAGTCCCGTGAGCTGAGCCAATGA

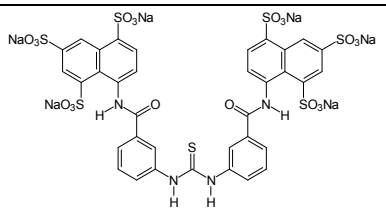
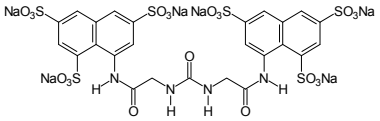
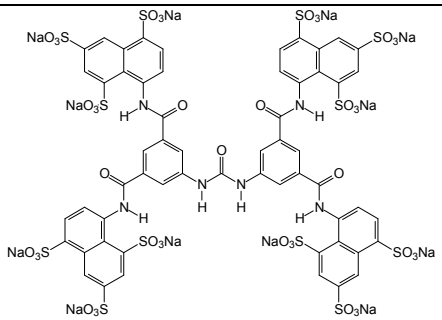
Ergebnisse des Screenings von NF-Substanzen

Im Anhang sind alle restlichen getesteten Substanzen, die in den oberen Kapiteln bisher nicht beschrieben wurden, dargestellt. Alle Substanzen zeigten keine agonistische Aktivität, daher ist hier nur die prozentuale Hemmung des durch 1 µM ATPγS hervorgerufenen Calcium-Signals am $P2Y_{11}$-Rezeptor bzw. $P2Y_{11}$GU-Rezeptor dargestellt. Die Substanzen wurden bei einer Konzentration von 100 µM getestet.

Substanz	Strukturformel	% Hemmung ± SD
NF043		16,6 ± 7,7
NF044		1,4 ± 5,0
NF050		16,0 ± 1,9
NF052		1,4 ± 3,7
NF057		25,7 ± 8,5
NF072		0,0 ± 2,9

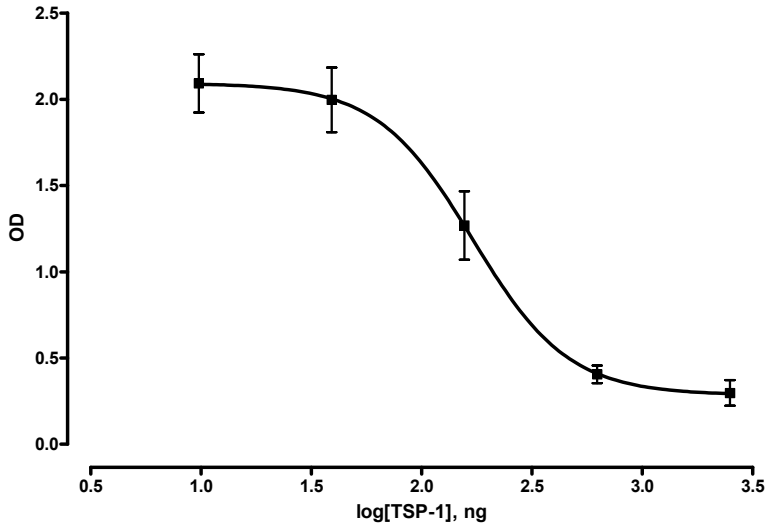
NF075		1,8 ± 2,0
NF076		16,7 ± 6,5
NF077		10,8 ± 4,3
NF091		14,4 ± 7,6
NF092		0,0 ± 1,9
NF110		22,7 ± 2,9
NF178		0,0 ± 3,7
NF179		0,0 ± 5,5
NF186		55,3 ± 2,9
NF191		20,6 ± 2.3
NF228		4,0 ± 3,9

NF229		10,4 ± 2,8
NF230		0,3 ± 4,4
NF231		0,0 ± 3,4
NF417		8,6 ± 3,8
NF427		3,3 ± 1,2
NF428		5,3 ± ,40
NF433		5,9 ± 5,4
NF434		6,8 ± 1,2
NF449		3,1 ± 4,1
NF473		3,6 ± 11,6
NF474		0,0 ± 3,2
NF486		3,2 ± 7,7

NF512		33,6 ± 4,2
NF527		1,2 ± 7,0
NF864		11,2 ± 4,0

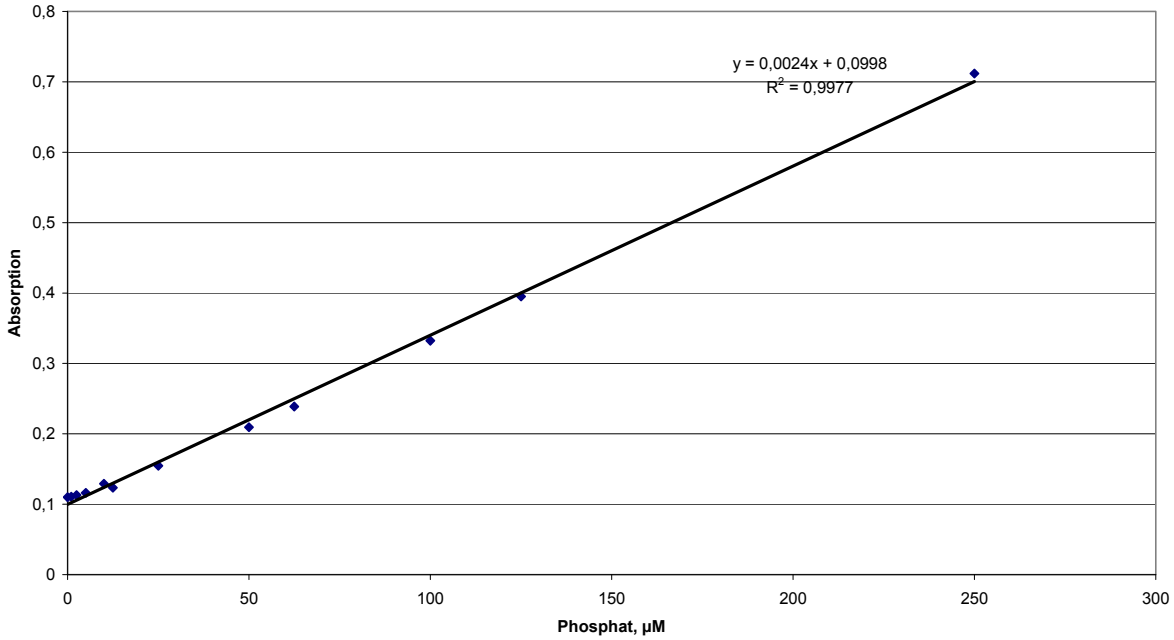
Standardkurve des Thrombospondin-1 ELISA

Dargestellt ist hier die Standardkurve des Thrombospondin-1-ELISA, die mit Hilfe des ChemiKine^{TM} Human TSP-1 EIA Kit bestimmt wurde. Aufgetragen ist der Logaritmus der Konzentration des TSP-1 gegen die optische Dichte (OD) bei 490 nm, gemessen im FLUOstar optima.



Kalibrierkurve des Apyrase-Assay

Dargestellt ist die Standardkurve für die Phosphatmessung im Apyrase-Assay. Aufgetragen ist die Konzentration Phosphat, eingesetzt als KH_2PO_4, gegen die Absorption bei 620 nm, gemessen im FLUOstar optima.



Name	Sabine Meis
geboren am	19.06.1979
in	Leverkusen

Schulbildung

1985 bis 1989	KGS Remigiusschule, Leverkusen
1989 bis 1998	Marienschule Leverkusen-Opladen Staatlich anerkanntes privates katholisches Gymnasium

Studium

10/1998 bis 10/2002	Studium der Pharmazie an der Universität Bonn
11/2002 bis 04/2003	erste Hälfte des Praktischen Jahres in der Struwwelpeter-Apotheke, Leverkusen
05/2003 bis 10/2003	zweite Hälfte des Praktischen Jahres am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
11/2003	Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

11/2003 bis 11/2006	Promotionsstudium am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn unter Betreuung von Prof. Dr. M. U. Kassack
seit 12/2006	Weiterführung der Promotion am Institut für Pharm. und Med. Chemie der Universität Düsseldorf unter Betreuung von Prof. Dr. M. U. Kassack
11/2003 bis 11/2006	Promotionsstipendium des Cusanuswerks (Bischöfliche Studienförderung)
seit 12/2006	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharm. und Med. Chemie der Universität Düsseldorf
seit Januar 2005	Kollegiatin im Graduiertenkolleg 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
Juni 2006	Teilnahme am Meeting of Nobel Laureates 2006 in Lindau “18th Lindau Meeting in Chemistry”

Meinem Betreuer Herrn Professor Dr. M. U. Kassack danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Die fachlichen Diskussionen und Anregungen waren stets hilfreich und haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. J. Jose danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. M. Wiese danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Pharmazeutischen Institut in Bonn.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Kassack (Bonner und Düsseldorfer) danke ich herzlich für die Unterstützung, Motivation, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Heiko Ullmann danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur, die Aufreinigung der NF-Substanzen und die Überlassung der HEK293-Daten. Frau Darunee Hongwiset danke ich für die Neusynthese der „Highlight-Substanzen“. Frau Dr. Alexandra Hamacher danke ich für die Einarbeitung in den cAMP-Reportergen-Assay.

„113a“ wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Allen Kollegen im Zelllabor von Prof. Wiese in Bonn möchte ich herzlich für die gemeinsame Zeit danken. Die gute Atmosphäre wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr und dem gesamten Graduiertenkolleg danke ich für die interessante und lehrreiche Zeit und die Möglichkeit, über das eigene Arbeitsgebiet hinaus Erfahrungen sammeln zu können.

Herrn Prof. Dr. G. Schmalzing und Herrn Dr. R. Hausmann von der RWTH Aachen danke ich für die Messung der Liganden an P2X-Rezeptoren. Herrn Prof. Dr. Schmalzing danke ich für das Anfügen eines His-Tags an den $P2Y_{11}$-Rezeptor.

Prof. Dr. J. M. Boeynaems und Herrn Dr. D. Communi von der Universität Brüssel danke ich für die Überlassung der 1321N1-$P2Y_{11}$-Zelllinie und die Messung von IL-12 an dendritischen Zellen.

Die Plasmid-DNA für die $P2Y_1$-, $P2Y_2$-, $P2Y_6$- und $P2Y_{11}$-Rezeptoren wurden von dem Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org) zur Verfügung gestellt.

Herrn Prof. Dr. C. Gachet von der Universität Straßburg danke ich die Überlassung der 1321N1-$P2Y_4$-Zelllinie und 1321N1-$P2Y_{12}$-Zelllinie.

Dem Cusanuswerk möchte ich für die finanzielle Unterstützung durch ein Graduiertenstipendium danken, ohne die meine Arbeit in dieser Form nicht möglich

gewesen wäre. Insbesondere die begleitende ideelle Förderung hat mir Wege und Perspektiven eröffnet.

Ich danke Mareike und Björn Scholze für die langen Abende mit guten Gesprächen und am Ende dieser Arbeit für das geduldige Korrekturlesen. Vielen Dank für Eure Freundschaft.

Mein größter Dank gilt meinem Verlobten Matthias Böhm für seine Geduld, sein Zuhören, den Rückhalt und den Glauben an mich. Ohne ihn hätte ich die Arbeit nicht geschafft. Ich bin so froh, dass ich dich habe.

Mein zweitgrößter Dank gilt meinen Eltern Klaus und Elisabeth Meis und meiner Schwester Katrin mit ihrem Mann Bodo, die mir in allen Lebenslagen Rückhalt gaben und mich jeder Zeit unterstützt haben. Auf Euch kann ich mich immer verlassen.