

Molekulare Basis der Aktivierung und Modulation des P2Y₂-Nukleotid-Rezeptors

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Petra Hillmann

aus

Bielefeld

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Christa E. Müller

2. Referent: PD Dr. Daniela Gündisch

Tag der Promotion: 10. September 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis August 2007 am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die freundliche Betreuung während meiner Promotion.

Frau PD Dr. Daniela Gündisch danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums sowie für die Kostenübernahme bei Kongressreisen und bei meinem Auslandsaufenthalt im Rahmen des Graduiertenkollegs 804 „Analyse von Zellfunktionen durch kombinatorische Chemie und Biochemie“.

Inhaltsverzeichnis

1	Calcium-Ionen in der Signalübertragung	1
1.1	Calciumverteilung und Calciumspeicher im Körper	1
1.2	Calciumsignale: Lokalisation und Geschwindigkeit	2
1.3	Intrazelluläre Calciumfreisetzung	3
1.3.1	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Weg	4
1.3.2	Calcium-induzierte Calciumfreisetzung	6
1.3.3	cADP-Ribose-Weg	6
1.3.4	Nicotinsäureadenin dinukleotidphosphat-Weg	7
1.3.5	Sphingosin-1-Phosphat-Weg	8
1.4	Calciumkanäle in der Zytoplasmamembran	8
1.4.1	Spannungsabhängige Calciumkanäle	9
1.4.2	Ligandgesteuerte Calciumkanäle	9
1.4.3	Signalmolekül-gesteuerte Calciumkanäle	9
1.4.4	Kapazitative Calciumkanäle	10
1.5	Beeinflussung von Proteinen und Zellfunktionen	11
1.6	Aufgabenstellung	13
2	Mutagenese des humanen P2Y₂-Nukleotid-Rezeptors	15
2.1	Einleitung	15
2.1.1	P2-Rezeptoren	15
2.1.2	Der P2Y ₂ -Rezeptor	17
2.1.3	Durch den P2Y ₂ -Rezeptor vermittelte Signaltransduktion	17
2.1.4	Physiologische und pathologische Rolle des P2Y ₂ -Rezeptors	20
2.1.5	P2Y ₂ -Rezeptor-Liganden	23
2.1.6	P2Y-Rezeptormodelle und Mutagenese-Studien	24
2.1.7	Prinzip der retroviralen Transfektion von P2-Rezeptoren	26
2.1.8	Prinzip der intrazellulären Calciummessungen	28

2.2	Auswahl der Mutationen im P2Y ₂ -Rezeptor	29
2.2.1	P2Y-Rezeptor-Alignment	30
2.2.2	Mutationen auf Grund eines computergenerierten Modells	32
2.3	Mutagenese des humanen P2Y ₂ -Rezeptors	34
2.3.1	Mutagenese-PCR und Detektion von mutierten Monoklonen	34
2.3.2	Sequenzierung	36
2.4	Zusammenfassung und Diskussion	37
2.5	Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1	38
2.5.1	Selektion von Monoklonen der mit pcDNA3.1 transfizierten Zellen	38
2.5.2	Untersuchung der Expressionshöhe der Monoklone mittels Immunfluoreszenz	39
2.5.3	Intrazelluläre Calciummessungen an mit pcDNA3.1 stabil transfizierten Zelllinien	39
2.6	Zusammenfassung und Diskussion	41
2.7	Klonierung von P2Y ₂ -Rezeptorkonstrukten	42
2.8	Retrovirale Transfektion	43
2.8.1	Optimierung der retroviralen Transfektion	43
2.8.2	Retrovirale Transfektion des P2Y ₂ -Rezeptors	44
2.9	Expression und Funktionalität von Rezeptormutanten	44
2.9.1	Etablierung des Zelloberflächen-ELISAs	45
2.9.2	Expressionsraten der einzelnen P2Y ₂ -Rezeptormutanten	46
2.9.3	Reinheit von UTP	46
2.9.4	Anregbarkeit der Zellen in Abhängigkeit von der Expressionsrate	48
2.10	Zusammenfassung und Diskussion	49
2.11	Disulfidbrücken im P2Y ₂ -Rezeptor	51
2.11.1	Chemische Reduktion von Disulfidbrücken	51
2.11.2	Charakterisierung der Cysteinmutanten	52
2.12	Zusammenfassung und Diskussion	56
2.13	Charakterisierung der Rezeptormutanten	58
2.13.1	Aktivität der Mononukleotide UTP und ATP	58
2.13.2	Aktivität der Dinukleotide Ap ₄ A und Ip ₄ U	61
2.13.3	Aktivität der Antagonisten Reactive Blue-2 und SW K16	66
2.14	Rezeptor-Modell in Homologie zum Rinder-Rhodopsin	71

2.15	Zusammenfassung und Diskussion	72
3	Suche nach neuen P2Y-Rezeptor-Antagonisten	79
3.1	Einleitung	79
3.2	Testung von potentiellen Antagonisten	81
3.2.1	Testung von Anthrachinonderivaten	82
3.2.2	Testung von Sulfanilsäureamiden und p-Aminobenzoesäureamiden	87
3.3	Zusammenfassung und Diskussion	93
4	Ammonium-induzierte $[Ca^{2+}]_i$-Anstiege in 1321N1-Astrozytomzellen	95
4.1	Einleitung	95
4.1.1	Verwendung von Ammoniumsalzen in Proteinlösungen	95
4.1.2	Ammonium-Toxizität und Hepatische Encephalopathie	95
4.1.3	Ammonium Transporter: nicht-erythroides Rhesus-Glycoprotein B/C	97
4.2	Calciummobilisierung durch Hexokinase-Lösung	99
4.2.1	Intrazelluläre Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen	99
4.2.2	Auftrennung der Hexokinase-Lösung mittels Millipore-Centricon® Filtern und SDS-PAGE-Gelelektrophorese	102
4.2.3	$[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung durch die Fraktionen der Hexokinase-Lösung	103
4.2.4	Massenspektrometrische Untersuchung der aktiven Centricon®-Fraktion	104
4.3	Zusammenfassung und Diskussion	104
4.4	Ammonium-induzierte intrazelluläre Calciumanstiege	105
4.4.1	Effekte von Ammoniumsulfat auf 1321N1-Astrozytomzellen	105
4.4.2	Zeitlicher Kurvenverlauf und Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung	107
4.5	Inhibition durch Kalium-Ionen	108
4.6	Effekte anderer Ammoniumsalze	108
4.7	Inhibition durch Natriumacetat	110
4.8	Mechanismus der Calciumfreisetzung in 1321N1-Astrozytomzellen	112
4.9	Detektion der Ammoniumtransporter RhBG/RhCG und Rhbg/Rhcg auf mRNA-Ebene	115
4.10	Zusammenfassung und Diskussion	116

5	Zusammenfassung und Ausblick	121
6	Experimenteller Teil	129
6.1	Geräte und Materialien	129
6.1.1	Geräte	129
6.1.2	Kommerziell bezogene Chemikalien	130
6.1.3	Nicht-kommerziell bezogene Chemikalien	133
6.1.4	Chemikalien und Materialien für die Molekularbiologie	133
6.1.5	Zellkulturbedarf und Nährmedien	135
6.1.6	Kultivierte Zelllinien	136
6.2	Puffer und Lösungen	137
6.2.1	Lösungen für die Zellbiologie und Zellkultur	137
6.2.2	Lösungen für intrazelluläre Calciummessungen	139
6.2.3	Lösungen für die Molekularbiologie	140
6.2.4	Lösungen für SDS-PAGE-Gelelektrophorese	141
6.3	Zellkultur	143
6.3.1	Medienzusammensetzung	143
6.3.2	Zellzucht	143
6.3.3	Auftauen von Zellen	144
6.3.4	Einfrieren von Zellen	144
6.4	Molekularbiologische Methoden	145
6.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	145
6.4.2	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel	145
6.4.3	Gießen von Agarplatten	146
6.4.4	Restriktionsverdau	146
6.4.5	Klonierung von Rezeptor-DNA in den Vektor pLXSN	147
6.4.6	Ligation mittels T4 DNA-Ligase	149
6.4.7	Ligation durch die Topoisomerase (TOPO-Cloning)	150
6.4.8	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i>	150
6.4.9	Selektion von Bakterien-Monoklonen	151
6.4.10	Einfrieren und Auftauen von <i>Escherichia coli</i>	151
6.4.11	Colony-PCR	151

6.4.12	Aufreinigung von DNA aus <i>Escherichia coli</i>	152
6.4.13	Konzentrationsbestimmung von DNA-Stocks	152
6.4.14	Sequenzierung	153
6.4.15	Mutagenese des P2Y ₂ -Rezeptors	154
6.4.16	RT –PCR	158
6.4.17	Transfektionsmethoden	160
6.4.18	Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie	161
6.4.19	Selektion einer stabil transfizierten, monoklonalen Zelllinie	161
6.4.20	Retrovirale Transfektion und Infektion	162
6.5	Zelloberflächen ELISA	162
6.6	Fluorimetrische Calciummessungen	164
6.6.1	Einstellungen am Fluostar Galaxy®	164
6.6.2	Einstellungen am Novostar®	165
6.6.3	Messung der intrazellulären Calciumfreisetzung im Fluostar Galaxy®	165
6.6.4	Versuchsdurchführung zur Messung der intrazellulären Calciumfreisetzung im Novostar®	166
6.6.5	Auswertung der Calciummessungen	167
6.6.6	Intrazelluläre Calciummessungen in calciumfreiem Puffer	167
6.6.7	Chemische Reduktion von Disulfid-Brücken	167
6.7	SDS-PAGE-Gelelektrophorese	168
6.7.1	Anfertigung des Gels und Elektrophorese	168
6.7.2	Coomassie-Färbung	168
6.7.3	Silber-Färbung	168
7	Abkürzungsverzeichnis	169
8	Literaturverzeichnis	173

1 Einleitung: Calcium-Ionen in der Signalübertragung

1.1 Calciumverteilung und Calciumspeicher im Körper

Ca^{2+} -Ionen sind ubiquitär im menschlichen Körper zu finden. Die Konzentrationen können sich jedoch stark unterscheiden. Während im Zytoplasma regulär nur sehr geringe Mengen an Calcium vorkommen, sind die extrazellulären Konzentrationen deutlich höher. Im Blutplasma liegen 2,5 mM, in der interstitiellen Flüssigkeit 1,3 mM Ca^{2+} vor. In der Zelle beträgt die Konzentration etwa 1 mM, wobei die Konzentration des freien Calciums im Zytoplasma 100-150 nM ist.¹ Nach einer Stimulation der Zelle, die zu erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führt, werden bis zu 1 μM Ca^{2+} im Zytosol erreicht.²

Neben dem Extrazellulärraum dienen auch Kompartimente in der Zelle als Calciumspeicher. Bei der Aktivierung bestimmter Signalwege kann Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden oder von außen in die Zelle gelangen (Abb. 1-1). Hierzu gehören das **Endoplasmatische Retikulum (ER)** bzw. das **Sarkoplasmatische Retikulum (SR)** in Muskelzellen, **Mitochondrien** und die Lysosomen. Hinzu kommen calciumbindende Proteine **Parvalbumin**, **Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$** und **Calretinin**. Als so genannte zytosolische Ca^{2+} -Puffer halten sie die Ca^{2+} -Konzentration gering. Zudem haben sie Einfluss auf Calciumsignale, die sie in Teilen abfangen, verlängern oder örtlich begrenzen können. Ein weiterer Mechanismus, um Ca^{2+} -Wellen abzumildern, ist eine Aufnahme des freigesetzten Calciums in die **Mitochondrien**.³⁻⁵ Dieses wird während der Ruhephase wieder aus diesem Zellorganell herausgepumpt, wodurch die Calciumsignale kontrolliert und verlängert werden können.

Der Hauptmechanismus zur Kontrolle der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist der Auswärtstransport der Calciumionen über **Ca^{2+} - Na^+ -Antiporter (Na/Ca exchanger, NCX)**, die ein Ca^{2+} -Ion im Austausch gegen drei Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus transportieren. Des Weiteren wird Calcium über eine **Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)** aktiv aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum befördert. Der aktive Transport ins ER/SR wird durch die **Sarkoendoplasmatisches Retikulum-ATPase (SERCA)** bewerkstelligt, der Transport in die Mitochondrien wird von mitochondrialen Uniportern (ATPasen) durchgeführt. Die SERCA und die microsomale Ca^{2+} -ATPase können durch das Sesquiterpenlacton **Thapsigargin** inhibiert werden, was zur Entleerung der

intrazellulären Speicher führt. Thapsigargin hemmt aber auch die Öffnung von nicht-spannungsabhängigen Calciumkanälen wie dem Vanilloid-Rezeptor1, einem Mitglied der TRP- (transient-receptor-potential) Kanal-Familie (s. 1.4), der an der Schmerzempfindung beteiligt ist.⁶

1.2 Calciumsignale: Lokalisation und Geschwindigkeit

Calciumanstiege in der Zelle können lokal oder im gesamten Zytoplasma auftreten.⁷ Ebenso sind ein unterschiedlicher Zeitrahmen und eine unterschiedliche Höhe des Signals möglich.² Es kann zu kurzen Calciumspitzen oder zu lang anhaltenden Signalen sowie zu oszillierenden Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ kommen. Oft folgen globale Calciumwellen einer initialen lokalen Ca^{2+} -Ausschüttung.⁸ Je nach der Eigenschaft dieser Signale kommt es zu schnellen oder langsamen Prozessen in der Zelle.⁹⁻¹¹ Jede Zelle exprimiert eine bestimmte Zusammensetzung an Proteinen, die an der Calcium-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. So können dort jeweils einzigartige Signale durch ein und dasselbe Ion weitergegeben werden.^{2,9}

In Neuronen ist es z.B. wichtig, dass die erhöhten Calciumspiegel sich in gut abgegrenzten Räumen befinden und nicht zur Synapse vordringen. Hierfür sind vor allem die Ca^{2+} -Puffer-Proteine verantwortlich (s. 1.1). Für die Freisetzung von Neurotransmittern, die innerhalb von Mikrosekunden stattfindet (s. 1.5), sind nur kurze, kleine Spitzen nötig. Zur Einleitung anderer Prozesse hingegen werden Wellen aus sich wiederholenden Spitzen von 1–60 Sekunden in der Zelle generiert. Die Frequenz der Spitzen (Oszillation) beeinflusst die Effizienz der Signalübertragung auf einzelne Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren.¹² Bei der Initialisierung der Mitose können diese Wellen sogar bis zu 24 Stunden anhalten. Auch in den erregbaren Herzmuskel-Zellen im **Sinusknoten** führt ein Zusammenspiel von intrazellulären und spannungsabhängigen Calciumkanälen zur Muskelkontraktion und somit zum gewünschten Rhythmus des Herzschlags.⁷

Die Frequenz der Calciumwellen wird durch zwei Proteine bestimmt: **Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II** und **Proteinkinase C**. Zudem ist die Art des Signals abhängig vom Weg, über das es ausgelöst wird.¹³

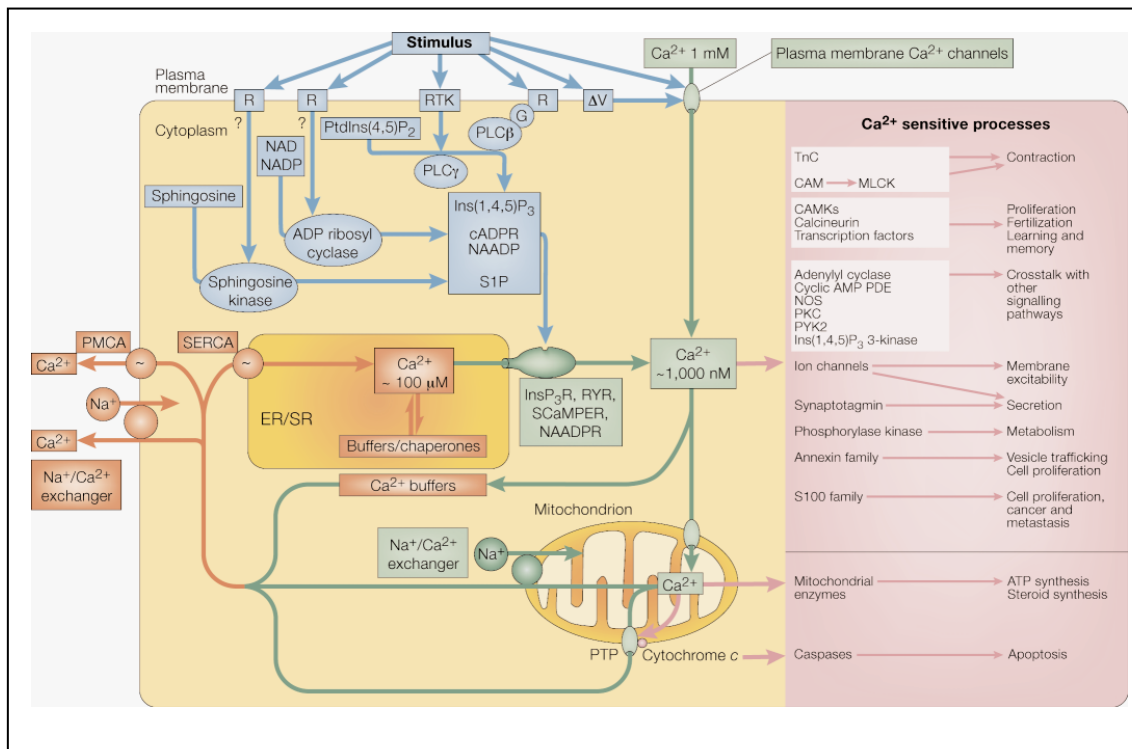


Abb. 1-1: Übersicht über die Calciumfreisetzung in der Zelle und die hierdurch beeinflussten Prozesse.¹⁰

1.3 Intrazelluläre Calciumfreisetzung

Die Rezeptoren für Inositol-1,4,5-trisphosphat (**IP₃-Rezeptor**) und Ryanodin (**Ry-Rezeptor**) bilden Calciumkanäle, die sich in der Membran des ER und SR befinden. Durch ihre Aktivierung kommt es zum Calciumeinstrom aus diesen Organellen in das Zytoplasma (Abb. 1-1). Hinzu kommen Kanäle, die durch Nicotinsäureadeninindinukleotidphosphat (**NAADP**) geöffnet werden können (Abb. 1-2).¹⁴ **Sphingosin-1-phosphat (S1P)** führt ebenfalls zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem ER. Es bindet möglicherweise an so genannte „sphingolipid Ca²⁺ release-mediating proteins“ (ScaMPER), was aber nicht abschließend belegt werden konnte (Abb. 1-2).¹⁵ Neben einem weiteren modulierenden Botenstoff, der cyclischen Adenosindiphosphoribose (**cADPR**, Abb. 1-2)), hat auch Ca²⁺ selbst regulatorische Funktionen in der intrazellulären Calciumfreisetzung.^{16,17}

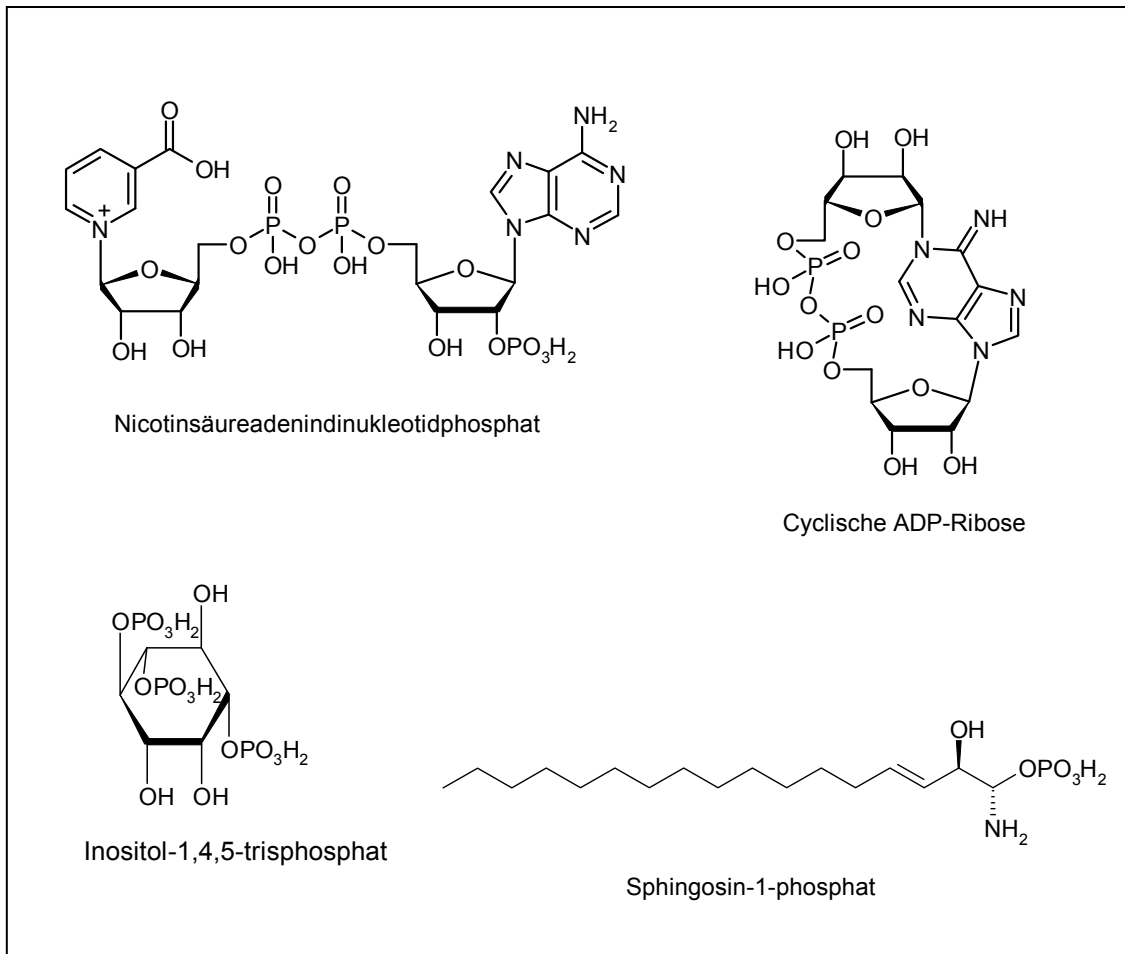


Abb. 1-2: Nicotinsäureadenin dinucleotidphosphat (NAADP), Cyclische ADP-Ribose (cADPR), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Sphingosin-1-phosphat (S1P).

1.3.1 Inositol-1,4,5-trisphosphat-Weg

IP₃ wird durch die Phospholipase C (PLC) gebildet. Dieses membranständige Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃).^{18,19} Es gibt fünf bekannte Isoformen der Phospholipase C, die auf unterschiedlichen Wegen aktiviert werden können.^{9,20}

- Die **PLC β** wird durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit von G_q -Proteinen der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs) aktiviert. Hierzu gehören z.B. die muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, einige P2Y-Rezeptoren, Histamin-Rezeptoren, Angiotensin-Rezeptoren und viele mehr.²¹⁻²⁴
- Tyrosinkinase-Rezeptoren können die **PLC γ** aktivieren. Beispiele für Tyrosinkinase-Rezeptoren sind der Platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor und der Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor. Zusätzlich unterliegt die PLC γ einer Coaktivierung durch PI(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat).²⁰
- Die **PLC δ** wird calciumvermittelt und durch seltene kleine G-Proteine (G_h) reguliert.²⁰
- Durch die kleinen GTPasen H-Ras und Rho kommt es zur Aktivierung der **PLC ϵ** . Diese Phospholipase wird zudem durch $G_{12/13}$ -, nicht jedoch durch G_q -gekoppelte Rezeptoren aktiviert.²⁵ Ras und Rho entstammen komplexen Signaltransduktionsnetzwerken. Rho kann durch Tyrosinkinase-Rezeptoren, trimere $G\alpha_{13}$ Proteine, PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) sowie andere GTPasen und Integrine reguliert werden.^{26,27} Die Regulation von Ras beruht auf Interaktionen mit Tyrosinkinase-Rezeptoren, Ras selbst und N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren.²⁸
- Der jüngste Vertreter ist die **PLC ζ** , die bei der Befruchtung durch das Spermium in die Eizelle übertragen wird.²⁹

Nach der Bildung von IP₃ bindet dieses an Calciumkanäle auf dem ER/SR, die IP₃-Rezeptoren, und führt so zur Calciumfreisetzung aus diesem intrazellulären Speicher. Die IP₃-Rezeptoren bestehen aus vier Untereinheiten mit jeweils sechs transmembranären Domänen, die eine ionenleitende Pore in ihrer Mitte bilden. Je nach dem Weg, auf dem es zu der Aktivierung kommt, kann sich das Ausmaß des Calciumsignals unterscheiden.^{30,31} Ca²⁺ und DAG bewirken anschließend gemeinsam eine Aktivierung der Proteinkinase C (**PKC**), die unterschiedliche Proteine phosphorylieren und somit ihren Funktionszustand verändern kann.³²

Der IP₃-Rezeptor wird auch durch Ca²⁺ selbst reguliert (s. 1.3.3). Zudem haben Proteine aus anderen Signaltransduktionskaskaden modulatorische Effekte auf die Ca²⁺-Freisetzung durch IP₃-Rezeptoren. Hierzu gehören die cGMP abhängige Proteinkinase (PKG), die Proteinkinase C (PKC) und die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA).⁹ Heparin wirkt antagonistisch am IP₃-Rezeptor.³⁰

1.3.2 Calcium-induzierte Calciumfreisetzung

Die Calcium-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (**CICR**, calcium-induced calcium release) ist ein wichtiger Mechanismus, um lokale in globale Calciumsignale umzuwandeln. IP_3 - und Ry-Rezeptoren werden durch viele Faktoren, besonders aber durch Calcium-Ionen beeinflusst. Sind die Ca^{2+} -Konzentrationen im ER/SR hoch, so reagieren die Rezeptoren empfindlicher auf ihre Liganden. Für den IP_3 -Rezeptor wurde gezeigt, dass niedrige zytosolische Calciumkonzentrationen (100 - 300 nM) stimulatorisch wirken, während Konzentrationen über 300 nM der Öffnung dieses Ionenkanals entgegenwirken.^{2,9,33 34} Ähnliches gilt für den Ry-Rezeptor, der in Anwesenheit von nanomolaren und millimolaren Konzentrationen von Ca^{2+} inaktiv ist, während niedrige mikromolare Konzentrationen ihn öffnen.^{2,35} Andererseits kann Ca^{2+} in Anwesenheit der Liganden IP_3 für den IP_3 -Rezeptor bzw. cADPR für den Ry-Rezeptor zu einer zusätzlichen Öffnung der entsprechenden Ionenkanäle führen (Abb. 1-2).³⁰ Auch millimolare Konzentrationen an Coffein machen den Ry-Rezeptor sensitiver für Ca^{2+} und führen so zur Öffnung des Kanals.³⁶ Ruthenium-Rot und Procain sind Antagonisten am Ryanodin-Rezeptor.¹¹

Die Ryanodin-Rezeptoren lassen sich allein durch eine geringfügig gesteigerte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ öffnen. Dies spielt z.B. bei der Depolarisation von Neuronen oder Muskelzellen eine Rolle.³⁷ Hier wird zunächst lokal Ca^{2+} durch einen spannungsabhängigen Calciumkanal in die Zelle transportiert, was zur Öffnung von Ryanodinrezeptoren und somit der intrazellulären Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER/SR führt. Besonders im Herzmuskel ist eine Calcium-induzierte Calciumfreisetzung über den Ryanodin-Rezeptor bekannt, die nach dem Eintritt von Ca^{2+} durch L-Typ-Calciumkanäle auftritt.³⁸

1.3.3 cADP-Ribose-Weg

Cyclische ADP-Ribose kann von der **CD38**-ADP-Ribosylcyclase gebildet werden.³⁹ Dieses Enzym besitzt Synthetase- und Hydrolase-Aktivität. Aus dem Substrat NAD (Nicotinamidadenindinukleotid) entsteht so cADPR. Allerdings befindet sich die aktive Domäne des Enzyms im Extrazellulärraum, so dass cADPR über Transporter in die Zelle gelangen müsste, oder ein cytosolisches, verwandtes Enzym für die Bildung verantwortlich sein müsste. Die CD38 kann durch Nicotinamid inhibiert werden. Die Bildung von cADPR wird während der Differenzierung von Monozyten, bei erhöhten NO-Konzentrationen in der Zelle sowie durch extrazelluläre Stimulation von T-Zell-Rezeptoren oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren induziert.⁴⁰⁻⁴³

cADPR fungiert eher **modulatorisch**. Durch Injektion dieser Substanz allein kommt es nicht zu großen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen. Vor allem bei der **CICR** führen erhöhte cADPR-

Konzentrationen zu vermehrter Calciumfreisetzung über die **Ryanodin-Rezeptoren**, und die basalen Ca^{2+} -Spiegel in Zellen werden erhöht.^{17,44,45} Für P2Y-Rezeptoren konnte in 3T3-Fibroblasten gezeigt werden, dass Stimulation durch ATP die Produktion von cADPR durch CD38 steigert und somit auch das erhaltene Ca-Signal erhöht wird.⁴⁶ Es ist nicht klar, ob cADPR direkt an Ry-Rezeptoren bindet, oder ob es über das so genannte FK506-Bindeprotein 12.6 (FKBP12.6) an den Rezeptor koppelt.¹⁶ Eine Bindungsstelle am Ry-Rezeptor konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Weiterhin hat cADPR starken Einfluss auf den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle.⁴⁷ Hier sind zwei Mechanismen denkbar: cADPR aktiviert endogene Calciumfreisetzung, und daraufhin wird ein kapazitiver Calciumeinstrom (s. 1.4.4) ausgelöst. Oder die Substanz hat direkten Einfluss auf TRPM (transient receptor potential – melastin-like) Kanäle in der Plasmamembran.

Für cADPR ist ein Antagonist bekannt: 7-Desaza-8-Brom-cADPR. Dieser konnte in T-Zellen nicht nur die Calciumfreisetzung hemmen sondern auch die Proliferation der Zellen und die Expression von Antigenen inhibieren.⁴⁸

1.3.4 Nicotinsäureadeninukleotidphosphat-Weg

NAADP ist der potenteste bisher bekannte Botenstoff, der zur Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führt.^{14,49} Es wird ebenfalls von der CD38 gebildet, indem sie NADP (Nicotinamidadeninukleotidphosphat) zu NAADP umsetzt.^{39,50} Es wurde noch nicht geklärt, durch welchen Rezeptor NAADP zur intrazellulären Calciumfreisetzung führt. In Eiern des Seeigels wurden NAADP-sensitive Ca^{2+} -Speicher entdeckt, die den Lysosomen ähneln und Ca^{2+} völlig unabhängig von IP_3 - oder Ry-Rezeptor-Stimulation freisetzen können.⁵¹⁻⁵³ Es wird aber auch diskutiert, dass NAADP Effekte auf Ry-Rezeptoren und somit auf das ER hat, da in T-Lymphozyten Antagonisten anderer Ca^{2+} -Kanäle auch die Effekte von NAADP inhibieren.⁵⁴ In diesen Zellen wird zudem die Ca^{2+} -Freisetzung durch IP_3 und cADPR verstärkt.⁵⁵ Die Wirkung von NAADP ist konzentrationsabhängig. In T-Zellen bewirken geringe Konzentrationen (10–100 nM) von NAADP eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$, während Konzentrationen über 1 μM zu einer Inhibition der IP_3 - und cADPR-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung führen.⁵⁶ Im Gegensatz zu IP_3 - und Ry-Rezeptoren sind die NAADP-sensitiven Rezeptoren nicht durch Ca^{2+} selbst beeinflussbar. Viele Antagonisten der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sowie der P2-Rezeptor Antagonist PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure) wirken antagonistisch auf den von NAADP geöffneten Rezeptor.^{11,57}

1.3.5 Sphingosin-1-Phosphat-Weg

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein Abbauprodukt von Membranlipiden. Es wird aus Sphingosin durch die am ER und im Zytosol befindliche Sphingosinkinase gebildet. Der Signalweg, auf dem die Produktion von S1P stimuliert wird, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Die Aktivierung einiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sowie einiger Wachstumsfaktoren und die Antigenstimulation von Immunzellen führen zu S1P-induzierter Calcium-Mobilisierung.¹⁵ Der durch S1P geöffnete intrazelluläre Calciumkanal konnte bisher nicht gefunden werden. Das Protein ScAMPER, das als S1P-Kanal diskutiert wird, hat strukturell wenig Ähnlichkeit mit IP₃- oder Ry-Rezeptoren. Es befindet sich möglicherweise ebenfalls auf dem ER/SR.⁵⁸ Die Sequenz scheint nur eine transmembranäre Domäne zu haben und bei Überexpression zum Zelltod zu führen, was es unwahrscheinlich macht, dass ScAMPER als Ca²⁺-Kanal fungieren kann.^{15,59}

Zusätzlich aktiviert S1P spezielle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (S1PR₁₋₅), die z.T. über die PLC zu [Ca²⁺]_i-Anstiegen führen können.^{60,61} S1P ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, zu denen Zellwachstum, Migration und Zelldifferenzierung gehören. In Astrozyten setzt S1P Calcium hauptsächlich über einen G_i-gekoppelten S1P-Rezeptor frei. In ausdifferenzierten Neuronen ist S1P hingegen nicht in der Lage, Calciumanstiege auszulösen.⁶²

1.4 Calciumkanäle in der Zytoplasmamembran

Im Wesentlichen unterscheidet man vier Gruppen von Calciumkanälen, die bei ihrer Öffnung zum Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum ins Zytoplasma führen. Auf Grund des Konzentrationsunterschieds zwischen Zellinnerem und der Zellumgebung handelt es sich hier um einen passiven Transport.

- Spannungsabhängige Calciumkanäle (Voltage-operated channels, VOCs)
- Ligandgesteuerte Calciumkanäle (Receptor-operated channels, ROCs)
- Signalmolekülgesteuerte Calciumkanäle (Second messenger-operated channels, SMOCs)
- Kanäle, die durch die Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher geöffnet werden (Kapazitative Kanäle, store-operated channels SOCs, transient receptor potential channels TRPCs)

1.4.1 Spannungsabhängige Calciumkanäle

VOCs werden durch Depolarisation der Zellmembran geöffnet und erlauben den schnellen Einstrom von Ca^{2+} in das Zellinnere.⁶³ Zu den spannungsabhängigen Calciumkanälen gehören einerseits die auf Muskelzellen exprimierte **L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle**. Diese sind maßgeblich an der Muskelkontraktion beteiligt. Sie interagieren mit den Ryanodin-Rezeptoren, so dass zusätzlich zum Ca^{2+} -Einstrom auch Calcium aus dem SR freigesetzt wird. Auf Neuronen werden dagegen Calciumkanäle vom **N-Typ**, **P/Q-Typ** und **T-Typ** exprimiert.¹ Calcium übt hier Effekte auf die Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt aus. Die neuronalen Kanäle führen zur $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung, die oft synergistisch durch metabotrope Rezeptoren gesteigert wird. P/Q-Typ-Kanäle können durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z.B. GABA_B-Rezeptoren, beeinflusst werden.⁶⁴

1.4.2 Ligandgesteuerte Calciumkanäle

Auf der Zellmembran gibt es verschiedene Ligandgesteuerte Ionenkanäle, die bei ihrer Aktivierung für Ca^{2+} -Ionen geöffnet werden. Sehr viele dieser Kanäle befinden sich auf Neuronen. Hierzu gehören einige ionotrope Rezeptoren für Aminosäuren wie Glutamat (**NMDA-Rezeptoren**), für Nucleotide (**P2X-Rezeptoren**) und die **nicotinischen Acetylcholin-Rezeptoren**.⁶⁵⁻⁶⁷

1.4.3 Signalmolekül-gesteuerte Calciumkanäle

Die SMOCs werden durch intrazellulär generierte Signalmoleküle geöffnet. Diese Botenstoffe können aus unterschiedlichen Signaltransduktionswegen stammen. Es gibt Kanäle, die durch cyclische Nucleotide wie cyclisches Adenosinmonophosphat (**cAMP**) und cGMP geöffnet werden. Andere Ca^{2+} -transportierende Proteine reagieren auf Arachidonsäure, einem Botenstoff aus der Schmerz-vermittelnden Arachidonsäure-Kaskade. Viele der SMOCs gehören zur Familie der TRP-Kanäle. Es handelt sich hier um andere Subtypen als die kapazitiven Calciumkanäle (s. 1.4.4).^{68,69}

1.4.4 Kapazitative Calciumkanäle

Der kapazitative Calciumeinstrom findet durch die TRPCs an nicht erregbaren Zellen statt. Einer Hypothese von Putney nach kommt es durch intrazellulär erhöhte Calciumspiegel zusätzlich zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum, weshalb dieses Phänomen auch „store-operated calcium entry“ genannt wird.^{70,71} Hierdurch ist das biphasische Verhalten der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Aktivierung von G_q -gekoppelten Rezeptoren (s. 1.3.2) zu erklären, bei der es am Ende des transienten Calciumanstiegs durch Freisetzung aus dem ER zu einer länger anhaltenden Phase mit erhöhtem Calciumspiegel kommt. Je nach Zelltyp kann sich der kapazitative Calciumeinstrom in Bezug auf das Ausmaß und die zeitliche Dauer unterschiedlich verhalten, was durch das unterschiedliche Expressionsmuster der TRPC-Subtypen auf den Zellen begründet wird.^{39,69}

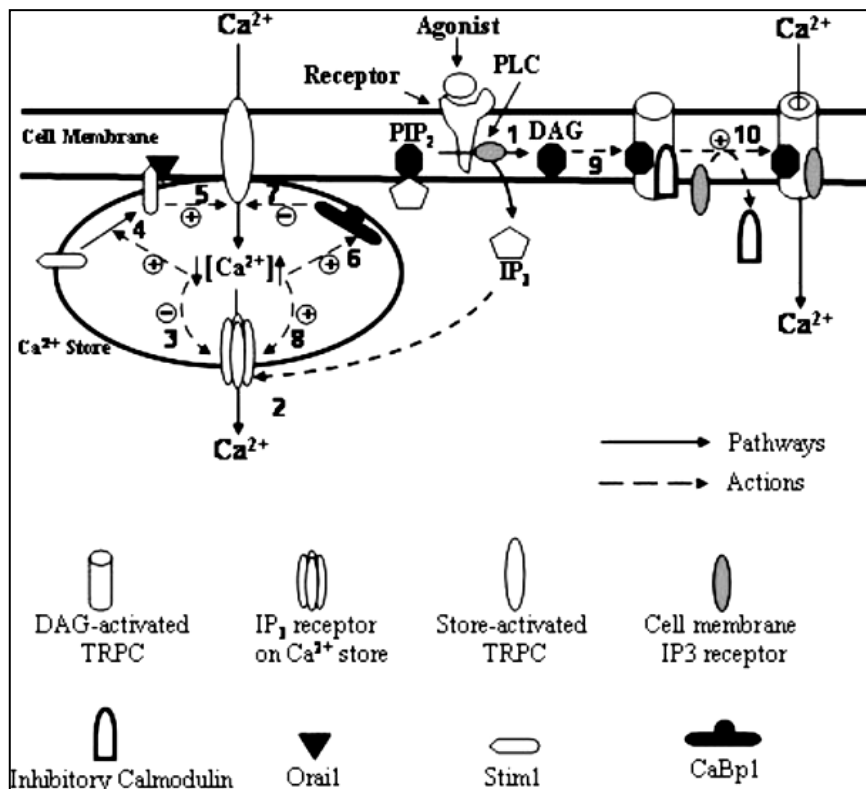


Abb. 1-3: Kapazitiver Calciumanstieg nach Aktivierung eines G_q -Protein gekoppelten Rezeptors.⁷²

Es konnte bisher nicht geklärt werden, durch welchen Mechanismus die Kanäle geöffnet werden. Es ist möglich, dass Calcium selbst der Mediator ist, andere Modelle beschreiben einen Einfluss von IP₃ oder DAG auf die Kanäle.⁷³ Es wurde beschrieben, dass DAG einige TRPCs in der Plasmamembran unabhängig von der PLC und IP₃ öffnen kann.⁷⁴ Zudem scheint es nach einer Hypothese von Chakrabarti *et al.* möglich zu sein, dass Ca²⁺ nach der IP₃-vermittelten Entleerung intrazellulärer Speicher durch so genannte „store-activated (SA) TRPCs“ aus dem Extrazellulärraum direkt in das ER/SR gelangt (Abb. 1-3).⁷² Die bisher gefundenen Modulatoren in diesem Prozess sind Stim1 (stromal interacting molecule 1) im ER und Orai1/2 in der Plasmamembran, die zur Öffnung der SA-TRPCs führen sowie das Calcium-Bindeprotein (CaBp1), das bei hoher Ca²⁺-Konzentration diese Kanäle wieder schließt.^{75,76}

1.5 Beeinflussung von Proteinen und Zellfunktionen

Durch Calciumionen wird eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle reguliert. Hierzu gehören z.B. die Befruchtung, die Entwicklung, Lernprozesse und Gedächtnis, Muskelkontraktion und Sekretion verschiedener Substanzen. Die Transkription und Expression verschiedener Gene wird stark durch Ca²⁺ beeinflusst. Calcium kann auch toxisch sein und zu **Apoptose** führen.^{10,77}

Calcium bindet an zahlreiche Proteine, unter denen man die Ca²⁺-Puffer (s. 1.1) und die Ca²⁺-Sensoren unterscheidet. Diese Proteine sind dafür verantwortlich, dass die unterschiedlichen Charaktere der Calciumsignale zu Stande kommen, und dass Ca²⁺-Ionen spezifische Signale für die Beeinflussung eines bestimmten zellulären Prozesses übertragen können. Die bekanntesten Sensoren sind **Calmodulin** und **Troponin C**.^{9,10} Diese können an andere Proteine binden und ihre Funktion verändern. Der Einfluss von Troponin C ist auf die Muskulatur beschränkt, wo es die Interaktion zwischen Actin und Myosin und somit die **Muskelkontraktion** kontrolliert.⁷⁸ Calmodulin dagegen beeinflusst viele Prozesse wie die Transkription verschiedener Gene, die Interaktion zwischen Signalmolekülen, den Metabolismus verschiedener Substanzen und die Aktivität von IP₃-Rezeptoren. Hinzu kommen diverse Ca²⁺-Sensoren, die spezifisch mit einzelnen Proteinen interagieren.^{33,79}

Bei der **Befruchtung** von Eizellen wird die Entwicklung der Zelle durch eine zweistündige Freisetzung von Calciumspitzen ausgelöst. Die Ionen werden durch die PLC ζ (s. 1.3.2) und die IP₃-Rezeptoren vermittelt aus dem ER abgegeben. In der Entwicklung und Differenzierung von Zellen sind ein ständiger Calciumgradient an der

Entstehung einer Zellachse sowie Calciumspitzen an der Auslösung der Zelldifferenzierung beteiligt.^{10,80}

In ausdifferenzierten Zellen kann Calcium auf verschiedene Signalwege einwirken. Es beeinflusst direkt und indirekt **Transkriptionsfaktoren** und somit die **Expression** verschiedener Gene und die **Zellproliferation**. Zu den Ca^{2+} -sensitiven Genen gehören z.B. Interleukine und apoptotische Proteine wie Fas. Der direkten Kontrolle unterliegen unter anderem NF κ B (nuclear factor κ B), NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) und CREB (cyclic AMP response element-binding protein). Die indirekte Beeinflussung wird über Proteinkinasen (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CaMK) und Proteinphosphatasen (z.B. Calcineurin) ausgeübt.^{12,81}

Ca^{2+} -Ionen können auswärts gerichtete Chloridkanäle regulieren und so zum Ausstrom von Cl^- aus der Zelle führen. Vor allem auf Epithelien ist dieser ein wichtiger Schritt für die **Befeuchtung des Gewebes**. Ein solcher Effekt wird z.B. durch die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten P2Y₂-Rezeptors hervorgerufen.^{82,83}

Tritt Calcium durch N-Typ Kanäle in die Zelle ein, führt dies zur **Freisetzung von Neurotransmittern** wie Acetylcholin, Serotonin oder Dopamin. Die Freisetzung der Neurotransmitter wird über den Calciumsensor Synaptogamin vermittelt.¹³ Die N-Typ Kanäle werden zudem mit Schmerzempfindung in Verbindung gebracht.⁶³

1.6 Aufgabenstellung

Calcium spielt eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen innerhalb der Zelle. Es kann durch verschiedene Signaltransduktionswege aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden oder durch unterschiedliche Kanäle aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen. Calciumsignale unterscheiden sich in ihrem zeitlichen und räumlichen Ausmaß. Sie entstehen oft durch ein Zusammenspiel vieler Proteine und Signalmoleküle in der Zelle und führen so zu einzigartigen Zellantworten. Bereits bekannte Signalwege, bei denen intrazellulär Calciumspiegel erhöht werden, können verwendet werden, um Eigenschaften der an diesen Wegen beteiligten Proteine zu untersuchen. Hierzu werden intrazelluläre Calciummessungen mittels calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. In dieser Arbeit soll die intrazelluläre Calciumfreisetzung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genutzt werden, um diese Rezeptoren und ihre Struktur zu untersuchen und neue Liganden zu identifizieren und zu charakterisieren. Des Weiteren soll ein spezieller, Ammonium-vermittelter Weg der Calciumfreisetzung in Astrozytomzellen näher charakterisiert werden.

- P2Y₂-Rezeptoren führen bei ihrer Aktivierung durch ATP oder UTP zu einer G_q-Protein/PLC-vermittelten Steigerung der [Ca²⁺]_i. Die Rezeptoren sind an diversen Prozessen wie der Befeuchtung von Epithelien, Atherosklerose, Entzündungen und Zellproliferation beteiligt.²³ Ein rekombinantes Testsystem soll durch Expression des P2Y₂-Rezeptors in 1321N1-Astrozytomzellen etabliert werden. Hierzu wird ein retrovirales Transfektionssystem verwendet, und die Expressionsrate soll mittels Zelloberflächen-ELISAs bestimmt werden. Zur näheren Untersuchung des Rezeptors und seiner physiologischen und pathophysiologischen Aufgaben werden neue, potente und selektive Agonisten und Antagonisten als pharmakologische Werkzeuge benötigt.⁸⁴ Bisher sind nur wenige, zumeist metabolisch instabile oder unselektive Liganden für den P2Y₂-Rezeptor bekannt. Um neue Substanzen, die mit hoher Affinität an den Rezeptor binden, zu entwickeln, sollen die an der Aktivierung und Bindung der bekannten nukleotidischen Agonisten und Antagonisten beteiligten Aminosäuren mittels zielgerichteter Mutagenese identifiziert werden. Als Testsystem dienen intrazelluläre Calciummessungen im 96-Well-Format. Die so gewonnenen Informationen werden im Rahmen einer Kooperation in ein computergeneriertes Modell des Rezeptors und seiner Bindungstasche eingebracht.

- Vier Subtypen der P2Y-Nukleotid-Rezeptor-Familie führen nach ihrer Aktivierung zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus IP_3 -sensitiven Speichern. Hierzu gehören neben dem oben genannten P2Y₂-Rezeptor der P2Y₁-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptor. Diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stellen wichtige Arzneistoffziele für unterschiedliche Krankheitsbilder wie Zystische Fibrose, chronische Entzündungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar.⁶⁵ Bisher beschriebene Antagonisten binden überwiegend unselektiv und mit geringer Potenz an die P2Y-Rezeptoren. Die Identifizierung neuer, potenter „small molecules“ als Antagonisten, die sich als Leitstrukturen eignen sollten, soll ebenfalls mit fluorimetrischen Calciumbestimmungen erreicht werden.
- Hohe Blutspiegel an Ammonium können durch Schädigungen der Leber auftreten und führen so zu Hepathischer Encephalopathie (HE), einer Erkrankung, bei der hauptsächlich Astrozyten von der toxischen Wirkung der Ammonium-Ionen betroffen sind.⁸⁵ Neben dem Anschwellen der Zellen und einer veränderten Expression verschiedener Proteine kommt es in den Gliazellen auch zu erhöhten intrazellulären Calciumspiegeln.⁸⁶ 1321N1-Astrozytomzellen sollen als Modellsystem für die nähere Charakterisierung der Schädigung von Astrozyten etabliert werden. Der Fokus liegt auf der Untersuchung des Mechanismus der zur Calciumfreisetzung führt und der Detektion potentieller Inhibitoren für diesen Effekt. Da Neuronen nicht vom Krankheitsbild der HE betroffen sind, wird die neuronale Hybridzelllinie NG108-15 zum Vergleich der auf Calcium-Ebene beobachteten Effekte von Ammonium und der Expression der Ammoniumtransportern RhBG und RhCG auf RNA-Ebene herangezogen.⁸⁷ Neben intrazellulären Calciummessungen werden RT-PCR-Experimente durchgeführt.

2 Mutagenese des humanen P2Y₂-Nukleotid-Rezeptors

2.1 Einleitung

2.1.1 P2-Rezeptoren

Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass Nukleotiden eine wichtige Signalfunktion im Körper zukommt. Die bisher klonierten P2-Nucleotid-Rezeptoren werden in zwei Subfamilien unterteilt: **P2X-Rezeptoren**, die Ligand-gesteuerte Ionenkanäle darstellen, und G-Protein-gekoppelte **P2Y-Rezeptoren**.²³ Bis heute wurden acht humane P2Y-Rezeptor-Subtypen kloniert: P2Y_{1,2,4,6,11,12,13} und P2Y₁₄.⁸⁴ Die Hauptexpressionsgebiete sowie die Agonisten und Effektoren der einzelnen Subtypen sind in Tabelle 2-1 dargestellt.

Die P2Y-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs).⁸⁸ Nach ihrer phylogenetischen Abstammung werden P2Y-Rezeptoren in zwei Gruppen unterteilt, wobei in Gruppe eins die P2Y_{1,2,4,6,11}-Rezeptoren enthalten sind, während die zweite Gruppe aus den Subtypen P2Y_{12,13,14} besteht (Abb. 2-1).⁸⁹ Die Sequenzhomologie zwischen den Rezeptoren ist relativ gering. Der nächste Verwandte des P2Y₂-Rezeptors, der P2Y₄-Rezeptor weist mit diesem eine Homologie von 52% auf.⁹⁰ Die Sequenzhomologie zwischen den entfernt Verwandten der beiden Gruppen liegt zwischen 23% und 32%.²³

Tab. 2-1: P2Y-Rezeptor-Subtypen und ihre endogenen Agonisten. Dargestellt sind Gewebe mit der jeweils höchsten Expression für die einzelnen Rezeptoren sowie das jeweilige Effektor-System.^{23,65,84,91}

Rezeptor	Agonist	Gewebe mit hoher Expression	Effektor
P2Y ₁	ADP	Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Muskulatur, Pankreas, Milz	PLC (G _q)
P2Y ₂	UTP, ATP	Atemwege, Darm, Epithelien, Hirn, Immunzellen, Hoden, Niere, Knochen	PLC (G _q)
P2Y ₄	UTP	Pankreas, Plazenta, Hirn, Herz, Astrozyten, glatte Muskulatur	PLC (G _q)
P2Y ₆	UDP	T-Zellen, Plazenta, Milz, Thymus, Leukozyten, Lunge, Darm	PLC (G _q)
P2Y ₁₁	ATP	Plazenta, Milz, Darm, Granulozyten	PLC (G _q), AC (G _s)
P2Y ₁₂	ADP	Blutplättchen, Hirn	AC (G _i)
P2Y ₁₃	ADP	Hirn, Immunzellen	AC (G _i)
P2Y ₁₄	UDP-Glucose	Hirn, Milz	AC (G _i)

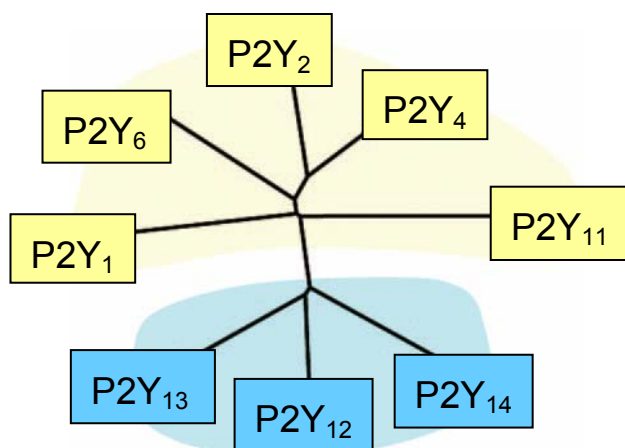


Abb. 2-1: Phylogenetischer Stammbaum der P2Y-Rezeptoren. Die P2Y-Familie lässt sich nach ihrem Verwandtschaftsgrad in zwei Gruppen unterteilen: P2Y₁₋₁₁ und P2Y₁₂₋₁₄.⁶⁵

2.1.2 Der P2Y₂-Rezeptor

Der **P2Y₂-Rezeptor** nimmt eine Sonderstellung unter den P2Y-Rezeptoren ein, da er als einziger Vertreter von zwei physiologischen Nukleotiden, **ATP** und **UTP**, aktiviert werden kann.⁹² Die erste Klonierung des Rezeptors wurde im Jahr 1993 beschrieben.⁹³ Der humane Rezeptor besteht aus 377 Aminosäuren und hat zwei glycosylierte Positionen im N-Terminus (N9, N13). Es sind zwei polymorphe Varianten des Rezeptors bekannt, die sich jedoch in ihren pharmakologischen Eigenschaften nicht unterscheiden.⁹⁴

Wie viele andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zeigt der P2Y₂-Rezeptor eine schnelle Internalisierung, die durch längere Stimulation mit Agonisten induziert werden kann.⁹⁵⁻⁹⁷ Die Wirkung von agonistischen Arzneistoffen könnte hierdurch stark eingeschränkt sein.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Dimere oder Oligomere bilden können. Es ist bisher bekannt, dass der P2Y₂-Rezeptor ein Dimer mit dem Adenosin-A₁-Rezeptor bilden kann und direkte Interaktionen mit olfaktorischen Rezeptoren eingeht.^{98,99} Die Rezeptoren beeinflussen sich gegenseitig in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Zudem liegen P2Y₂-Rezeptoren nach Expression in K562-Leukämiezellen als Homo-Oligomere vor.¹⁰⁰

2.1.3 Durch den P2Y₂-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion

Durch Stimulation des P2Y₂-Rezeptors kommt es zur Aktivierung des G_q-Proteins und somit der Phospholipase C (**PLCβ**) (Abb. 2-2).¹⁰¹ Dieses membranständige Enzym spaltet Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) in Diacylglycerol (**DAG**) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (**IP₃**). IP₃ öffnet einen Calciumkanal im Endoplasmatischen Retikulum (ER), wodurch es zu erhöhten zytosolischen Calciumkonzentrationen ([Ca²⁺]_i) kommt.¹⁰² Dies kann zusätzlich zum Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärbereich führen. [Ca²⁺]_i und DAG aktivieren gemeinsam die **Proteinkinase C**, die dann durch Phosphorylierung verschiedener Proteine in der Zelle eine Reihe von Zellantworten hervorrufen kann.

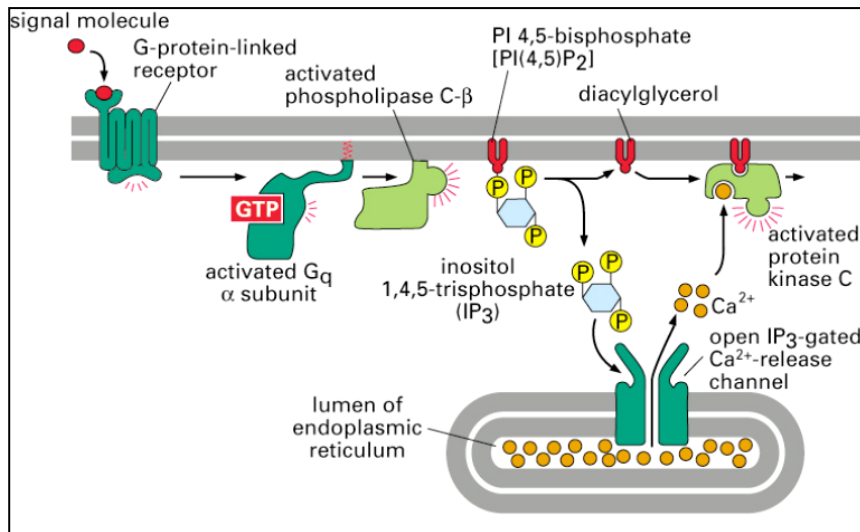


Abb. 2-2: Aktivierung eines G_q-gekoppelten Rezeptors. Durch Aktivierung der PLC kommt es zur Erhöhung von IP₃ und somit von [Ca²⁺]_i. Beide Signalmoleküle aktivieren anschließend die Proteinkinase C.¹⁰³

Neben diesem klassischen Signaltransduktionsweg geht der P2Y₂-Rezeptor Interaktionen mit weiteren Proteinen ein, die durch Rezeptoraktivierung beeinflusst werden können (Abb. 2-3).^{104,105}

Chloridkanäle

Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors führt durch den Nukleotid-vermittelten intrazellulären Calciumanstieg zur Öffnung von Chloridkanälen und somit zum Chloridausstrom aus dem Zellinneren.¹⁰⁶

Integrine

Über die Kopplung an α_vβ₃/β₅ Integrine übt der P2Y₂-Rezeptor Einfluss auf das Zytoskelett sowie auf die Chemotaxis und Migration von Immunzellen aus.¹⁰⁷ Inflammatorische Prozesse werden so unterstützt. Verliert der Rezeptor die Bindung an die Integrine kommt es damit auch zu einer Inhibition der Rezeptoraktivierung durch die Nukleotide UTP und ATP.

Src/VEGF/EGF

Durch direkte Bindung an die Kinase Src kann dieses Enzym den vascular epithelial growth factor (VEGF) und den epithelial growth factor (EGF) aktivieren. Dies führt zum Wachstum von Epithelzellen in Adern und anderen Geweben (s. 2.1.4).^{108,109}

Src/VCAM

UTP-Stimulation des P2Y₂-Rezeptors induziert die Expression des Vaskulären Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1). Hierdurch wird die Rekrutierung von Monozyten unterstützt.¹¹⁰

MAP-Kinasen

Die Aktivierung vieler P2Y-Rezeptoren ist mit der Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) verbunden.²³ Dies gilt auch für den P2Y₂-Rezeptor, der MAP-Kinasen abhängig und unabhängig von der PKC aktivieren kann (s. PI3K). Über den MAP-Kinase-Signalweg beeinflusst der P2Y₂-Rezeptor unabhängig von der PLC und der intrazellulären Calciumfreisetzung nicht nur die Zellproliferation sondern auch die α -Sekretase-abhängige Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP).^{111,112}

PI3K

Über Src kommt es unabhängig von der PLC β zu einer rezeptorvermittelten Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) und somit von Akt (Protein Kinase B) und der MAP-Kinase ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase).^{113,114} Dieser Prozess kann zu verstärkter Zellproliferation führen.

TrkA/NGF/SFK

In Gegenwart ihres endogenen Liganden NGF (neuronal growth factor) wird die Tyrosin-Rezeptor Kinase A (TrkA) phosphoryliert und somit aktiviert. Durch P2Y₂-Rezeptor Aktivierung wird dieser Prozess deutlich verstärkt. So kommt es zu einer Stimulation der Proliferation, Ausdifferenzierung und Regeneration von Neuronen. TrkA aktiviert hierbei den ERK1/2 und Akt Signalweg.¹¹⁵ Die Kinase SFK (Src family kinase) ist essentiell für die Interaktion zwischen dem P2Y₂-Rezeptor und TrkA.¹¹⁶

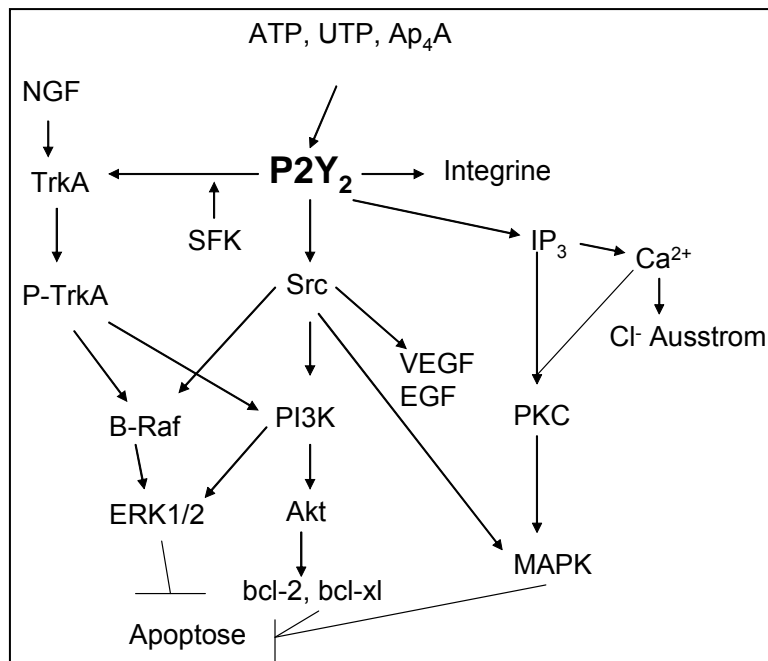


Abb. 2-3: P2Y₂-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion.

2.1.4 Die physiologische und pathologische Rolle des P2Y₂-Rezeptors

Der P2Y₂-Rezeptor wurde mit zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht.¹¹⁷ Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors führt zur **Chloridsekretion auf Epithelien**.¹¹⁸ Dies hat zur Folge, dass die entsprechenden Gewebe wie Lunge und Auge stärker hydratisiert werden. P2Y₂-Knock-out-Mäuse zeigen eine 90%ige Reduktion des Salz- und Wassertransports auf Epithelien nach Gabe von UTP und ATP (Abb. 2-4).^{119,120} Zwei P2Y₂-Rezeptor Agonisten mit Dinukleotidstruktur, Diquafosol (INS 365, Up₄U) und Denufosol (INS 37217), befinden sich zurzeit in klinischen Studien für die Indikationen trockene Augen und Mukoviszidose (Abb. 2-5).^{121,122}

P2Y₂-Rezeptoren zeigen hohe Expressionsraten auf vielen aktivierten Immunzellen und spielen eine Rolle im **Immunsystem**.¹²³ In murinen T-Zellen kommt es direkt nach der Aktivierung zu erhöhter Expression dieses Rezeptors.¹²⁴ In Neutrophilen Granulozyten sind sie zusammen mit Adenosin-A₃-Rezeptoren im vorderen polarisierten Bereich der Zelle an der Chemotaxis beteiligt.¹²⁵ Während P2Y₂-Rezeptoren die Zellorientierung bestimmen, sind die A₃-Rezeptoren für die Geschwindigkeit der Bewegung verantwortlich. Zudem ist der Rezeptor, wie unter 2.1.3 beschrieben, durch die

Kopplung an Integrine und VCAM-1 an **pro-inflammatorischen** Prozessen wie Chemotaxis, Immunzell-Migration und Rekrutierung von Monozyten beteiligt und verstärkt so die Entstehung von **Atherosklerose**.^{104,110} Andererseits wurde gezeigt, dass P2Y₂-Rezeptor-Aktivierung durch NO-Freisetzung zu **Vasodilatation** führt.¹²⁶⁻¹²⁸

Der Einfluss von P2Y₂-Rezeptoren auf die **Zellproliferation** und den Zellzyklus ist noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass P2Y₂-Rezeptor-Agonisten das Wachstum von Krebszellen hemmen. So wird durch Nukleotide in hohen Konzentrationen (UTP, ATP 1 mM) z.B. in den Leukämiezelllinien HL-60 und F-36P, in Oesophaguskrebs-Zellen, Gebärmutterkrebs-Zellen und in Darmkrebs-Zellen Apoptose und ein Zellzyklus-Stopp ausgelöst.¹²⁹⁻¹³² Alle diese Krebszelllinien exprimieren neben anderen P2-Rezeptoren auch den P2Y₂-Rezeptor, der für die pro-apoptotische Wirkung der Nukleotide verantwortlich gemacht wird.

Andererseits wird die Proliferation von Zellen in bestimmten Gewebetypen und Zelllinien durch den P2Y₂-Rezeptor gefördert. So wird z.B. in Ader-Endothelien¹³³ und entsprechenden, aus Endothelien gewonnenen Zelllinien durch die Aktivierung von Src das Zellwachstum verstärkt (s. 2.1.3). Dies hat zusätzlich zu den pro-inflammatorischen Prozessen negative Auswirkungen auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Für die Darmkrebs-Zelllinien HCT8 und Caco-2 konnte gezeigt werden, dass der P2Y₂-Rezeptor die Proliferation fördert während P2X₇ und P2Y₁ Apoptose vermitteln.¹³⁴ Auch in Hepatozyten kann der P2Y₂-Rezeptor über die Aktivierung der MAP-Kinasen dem Zelltod entgegenwirken.¹³⁵ In ARO-Zellen (humane Schilddrüsenkrebs-Zellen) wird ein mitogener, P2Y₂-induzierter Effekt über das Hitzeschockprotein 90 (Hsp 90) vermittelt.¹³⁶ Insgesamt ist noch nicht geklärt, ob es von der Art der Zelllinie oder der Konstellation des Expressionsprofils abhängt wie sich eine Stimulation des P2Y₂-Rezeptors auf die Zellproliferation auswirkt.

Zudem können die in Nervenzellen exprimierten P2Y₂-Rezeptoren **neurodegenerativen Effekten**, die z.B. bei der Parkinsonschen Krankheit, bei Morbus Alzheimer oder nach Verletzungen auftreten, **entgegenwirken**.¹³⁷ Dies scheint zum einen über die oben beschriebene Kopplung an TrkA/NGF vermittelt zu werden. Zum anderen kann durch die positive Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren bcl-2 und bcl-x1, und somit der PI3-Kinase, Apoptose verhindert werden.¹³⁸ Hinzu kommt, dass P2Y₂-Aktivierung die Verstoffwechslung von APP zum nicht an der Plaqubildung beteiligten aAPP α unterstützt.¹¹¹

Durch P2Y₂-Rezeptor Aktivierung wird eine **Hemmung des Knochenaufbaus** verursacht. Diese beruht auf einer Inhibition der Osteoblastenfunktion.¹³⁹ Außerdem kann durch ADP-Agonismus am P2Y₁-Rezeptor in synergistischer Weise die Osteoklastenfunktion und somit der Knochenabbau gefördert werden.

Diese Funktionen machen den P2Y₂-Rezeptor zu einer viel versprechenden Arzneistoffzielstruktur für diverse Krankheitsbilder wie Atherosklerose, neurodegenerative Erkrankungen, Osteoporose, Autoimmunerkrankungen, Krebs und Mukoviszidose.

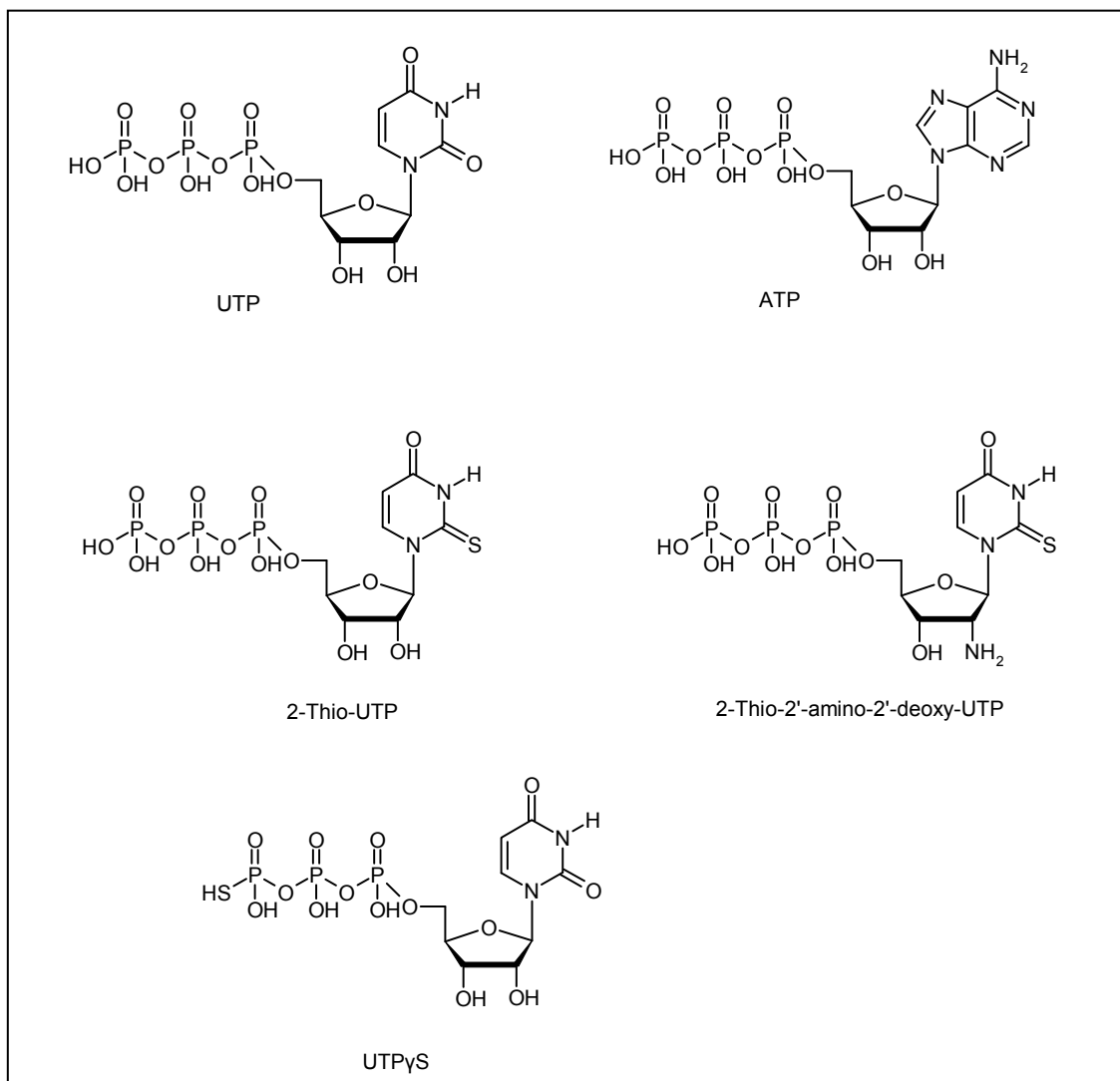


Abb. 2-4: Agonisten am P2Y₂-Rezeptor: UTP, ATP, 2-Thio-UTP, 2-Thio-2'-amino-2'-deoxy-UTP und UTPγS.

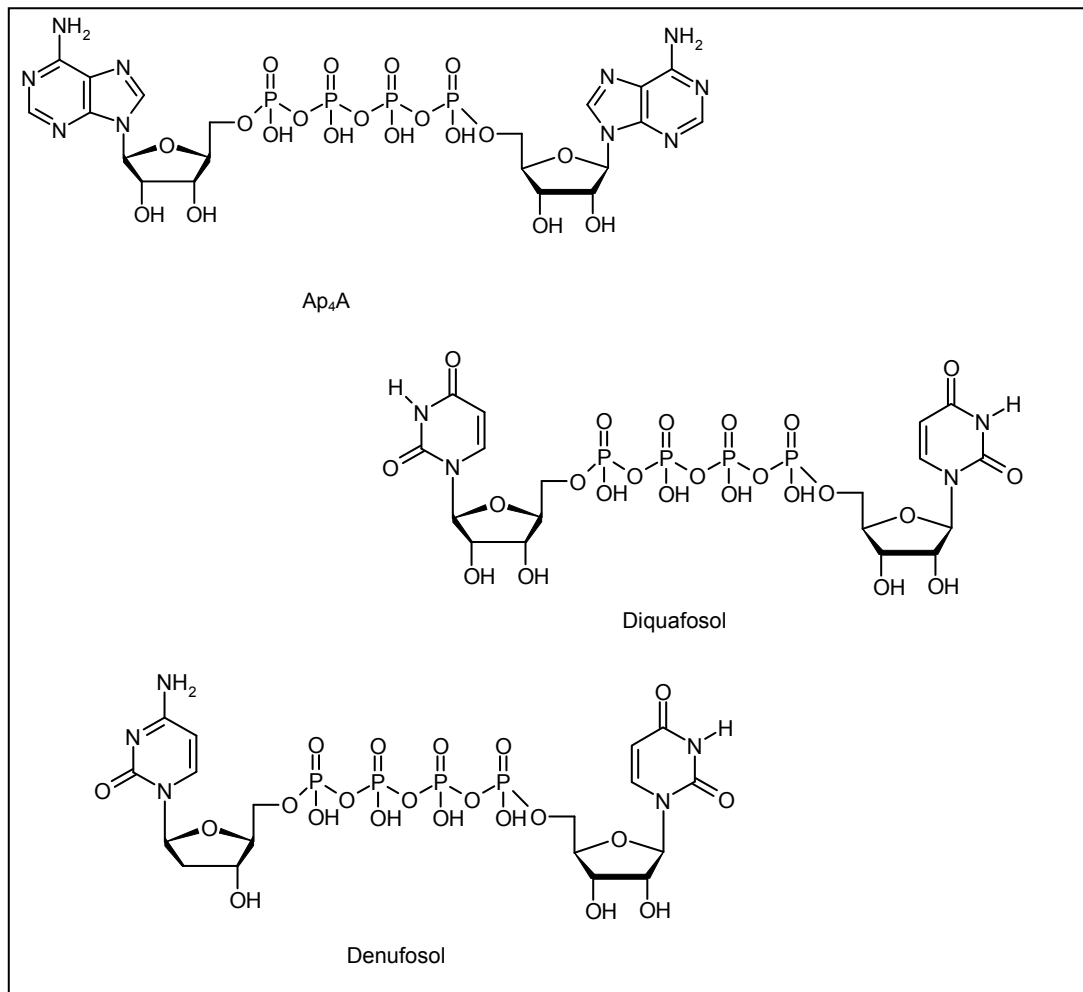


Abb. 2-5: Dinucleotide als Agonisten am P2Y₂-Rezeptor: Ap₄A, Diquafosol (Up₄U, INS 365) und Denufosol (INS 37217).

2.1.5 P2Y₂-Rezeptor-Liganden

Um die Funktionen des P2Y₂-Rezeptors weiter zu untersuchen und um potentielle Arzneistoffe für diesen Rezeptor zu entwickeln, werden dringend potente und selektive Agonisten und Antagonisten für diesen G-Protein-gekoppelten Rezeptor benötigt. Bisher sind nur wenige, zumeist unselektive Liganden bekannt.⁸⁴ Da Nukleotide metabolisch sehr leicht abgebaut werden können, ist es schwierig, neue Leitstrukturen zu finden, bei denen es sich nicht um Nukleotid-Derivate handelt. Als weitere Herausforderung stellt sich die Tatsache, dass zwei weitere P2Y-Rezeptoren, P2Y₄ und

P2Y₆, auch durch Pyrimidinnukleotide aktiviert werden, was oft zu geringer Selektivität der Liganden gegenüber diesen P2Y-Subtypen führt. Für Purinnukleotide und deren Analoge kommt erschwerend hinzu, dass neben anderen P2Y-Rezeptoren auch P2X-Rezeptoren durch diese Strukturen stimuliert werden können.²³

Für den nativen Agonisten UTP werden am humanen Rezeptor (hP2Y₂) EC₅₀-Werte von 16 bis 140 nM, für ATP von 85 bis 230 nM beschrieben.^{140,141} Unter den bisher entwickelten Agonisten für den P2Y₂-Rezeptor zeigen einige UTP-Analoga, vor allem 2-Thio-UTP und 2-Thio-2'-amino-2'-deoxy-UTP (Abb. 2-4) eine gewisse Selektivität gegenüber dem P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptor.^{142,143} UTP_γS (Abb. 2-4) ist ein P2Y₂-Agonist, der hydrolyseresistenter ist als UTP und eine ähnliche Potenz wie dieses aufweist.¹⁴⁴ Dinukleotid-Tetraphosphate wie Up₄U (Diquafosol, INSP 365) und Ap₄A (Abb. 2-5) zeigen agonistisches Verhalten am P2Y₂-Rezeptor, und sind metabolisch stabiler als die Mononukleotide.^{141,145}

Zurzeit sind nur wenige Antagonisten für den P2Y₂-Rezeptor bekannt, die meist auch eine geringe Selektivität gegenüber anderen P2-Rezeptor-Subtypen aufweisen. Standardmäßig werden die wenig potenten und unselektiven Substanzen Reactive Blue-2 (RB2, IC₅₀ 1 μM, hP2Y₂) oder Suramin (IC₅₀ 50 μM, hP2Y₂) verwendet.^{146,147} Die Antagonisten werden ausführlicher in Kapitel 3 beschrieben (Abb. 3-1).

2.1.6 P2Y-Rezeptormodelle und Mutagenese-Studien

Am P2Y₂-Rezeptor wurde bisher eine Mutagenese-Studie durchgeführt.¹⁴⁸ Es wurde gezeigt, dass drei basische Aminosäuren (His²⁶², Arg²⁶⁵ und Arg²⁹²) in den transmembranären Helices 6 und 7 (TM6, TM7) an der Aktivierung des Rezeptors beteiligt sind. Diese Aminosäuren gehen potentiell Interaktionen mit den negativ geladenen Phosphatresten der nativen Agonisten ein. Die Aminosäure Lys²⁸⁹ ist nicht an der Bindung der Nukleotidtriphosphate ATP und UTP beteiligt, erhöht jedoch die Aktivität der Nukleotiddiphosphate ADP und UDP am P2Y₂-Rezeptor.

Mutagenese-Studien am eng mit dem P2Y₂-Rezeptor verwandten **P2Y₄-Rezeptor** zeigen, dass einige Aminosäuren im extrazellulären Loop 2 (EL2) von Bedeutung für die Agonist-Erkennung durch den Rezeptor sind.¹⁴⁹ Ähnliche Interaktionen sind möglicherweise auch für den P2Y₂-Rezeptor zu erwarten.

Es wurden umfassende Mutagenese-Studien am **P2Y₁-Rezeptor** durchgeführt, in denen sich sowohl Aminosäuren in den TMs 3, 5, 6 und 7 als auch in den EL 2 und 3 als relevant für die Aktivierung durch Rezeptor-Agonisten herausstellten. Vor allem Mutationen in den äußeren Bereichen der TM3 und TM7 (R128A, R310A, S314A)

verringern oder verhindern sogar die Rezeptor-Aktivierung.¹⁵⁰ Auch der vom ATP abgeleitete Antagonist MRS2179 (Abb. 3-1) hat eine im Wesentlichen mit ATP übereinstimmende Bindungsstelle am P2Y₁-Rezeptor, in der geladene Aminosäuren in den TM 3, 6 und 7 an die Phosphatreste binden. TM6 und TM7 sind an der Bindung des Adenin-Rings, TM3 und TM7 an der Bindung der Ribose beteiligt.¹⁵¹ In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen am P2Y₄-Rezeptor wurden auch im P2Y₁-Rezeptor basische Aminosäuren in den EL2 und 3 detektiert, die essentiell für die Rezeptoraktivierung sind (Glu²⁰⁹, Arg²⁸⁷).^{152,153} Laut Rezeptormodell von Moro *et al.* gehören diese Aminosäuren zu einer so genannten Meta-Bindungsstelle, die die Aufgabe hat, für einen ersten Kontakt zwischen dem Rezeptor und dem Liganden zu sorgen und an der Einführung des Liganden in die Bindungstasche beteiligt ist.¹⁵⁴

Durch Mutationen weiterer, nicht in der Bindungstasche befindlicher Aminosäuren wurden Interaktionen des P2Y₂-Rezeptors mit verschiedenen Proteinen näher charakterisiert. Die Interaktion mit Signalmolekülen wie kleinen G-Proteinen, und Integrinen wird durch die Mutation der Konsensussequenz RGD in RGE im EL1 unterbunden.¹⁰⁷ Diese Mutation erhöht zusätzlich den EC₅₀-Wert für die UTP-induzierte Calciumfreisetzung um das 1000fache. Für die oben beschriebene Chloridsekretion auf Epithelien ist eine apikale Expression des P2Y₂-Rezeptors nötig. In Madin-Darby Kaninchen-Nieren-Zellen wird das apikale Targeting über die Aminosäuren Arg⁹⁵, Gly⁹⁶, Asp⁹⁷ (RGD Konsensussequenz) und zusätzlich Leu¹⁰⁸ im EL1 vermittelt.⁹⁰ Für die Agonist-induzierte Internalisierung des P2Y₂-Rezeptors ist hauptsächlich der C-Terminus und der intrazellulären Loop 3 (IL3) verantwortlich. Bei den beteiligten Aminosäuren Ser²⁴³, Thr³⁴⁴ und Ser³⁵⁶ handelt es sich um Phosphorylierungsstellen des Rezeptors.^{97,155} Der C-Terminus des Rezeptors enthält zudem zwei Src-homologe SH3-Bindungsdomänen, die zu der oben beschriebenen Interaktion mit Src führen. Mutationen dieser prolinreichen Sequenzen PXXP führen zur Unterdrückung der Kollokalisierung des P2Y₂-Rezeptors mit Src.¹⁰⁸

Vor kurzer Zeit wurde von Jacobson, Ivanov *et al.* ein Modell für den P2Y₂-Rezeptor erstellt.^{143,156} Dieses postuliert eine Struktur des Rezeptors, die in Analogie zum Rinder-Rhodopsin konstruiert wurde. Eine Bindungstasche für Agonisten und Antagonisten im oberen Teil der transmembranären Strukturen wird auf Grund von Docking-Studien vorgeschlagen. Die Position der Bindungsstelle für ATP und UTP ähnelt der Bindungstasche, die für den P2Y₁-Rezeptor postuliert wird.^{151,157}

2.1.7 Prinzip der retroviralen Transfektion von P2-Rezeptoren

Bei der Transfektion einer Zelllinie wird Fremd-DNA ins Genom der Zellen eingebracht. Diese kann dann abgelesen werden, und mittels der zelleigenen Translationsmechanismen wird ein zellfremdes Protein von der Zelle exprimiert. Die DNA wird meist als Konstrukt in einem Vektor eingebracht, der zusätzlich einen Promotor und ggf. ein Resistenzgen für ein bestimmtes Antibiotikum enthält. So können neben transienten Transfektionen, bei denen die Zellen kurz nach der Transfektion vollständig verwertet werden, mittels Selektion auch stabile Zelllinien generiert werden. Nachteil herkömmlicher Transfektionsmethoden, wie Lipofektion oder Calciumphosphat-Präzipitation eines Standardvektors, ist, dass oft die Fremd-DNA nicht oder nur unzureichend ins Genom eingebaut wird. So kommt es häufig schon nach wenigen Passagen zum Verlust des rekombinant exprimierten Proteins in einer stabilen Zelllinie.

Dieses Problem kann durch die retrovirale Transfektion umgangen werden.¹⁵⁸ Das Prinzip dieser Methode wird in Abbildung 2-6 näher erläutert. Es wird eine so genannte **Verpackungszelllinie** verwendet, die bereits die genetischen Informationen für alle retroviralen Gene (gag, env, pol) enthält. In dieser Arbeit wurden die von murinen Fibroblasten (NIH-3T3-Zellen) abgeleiteten amphotropen Zelllinien **PA317**¹⁵⁹ und **GP+envAM12**¹⁶⁰ verwendet. Den Verpackungszellen fehlt das Verpackungssignal, um die von der Wirtszelle produzierte mRNA der viralen Proteine als Erbinformation in die Viruspartikel einzubringen. Daher produzieren sie leere, nicht infektiöse Virushüllen. Die Viren der Zelllinien PA317 und GP+envAM12 sind vom Moloney Murine Leukämievirus (**MuLV**) abgeleitet. Des Weiteren wird ein Vektor benötigt, der neben den üblichen Eigenschaften ein **Verpackungssignal psi Ψ** für die Verpackung der RNA in Viruspartikel und die sogenannten long terminal repeats (LTR) enthält. Ein geeigneter Vektor ist z.B. **pLXSN** (Abb. 2-6), der Elemente des MuLV und des murinen Sarcomavirus enthält.¹⁶¹ In diesen Vektor wird hinter psi die für das gewünschte Protein codierende Erbinformation hineinkloniert.

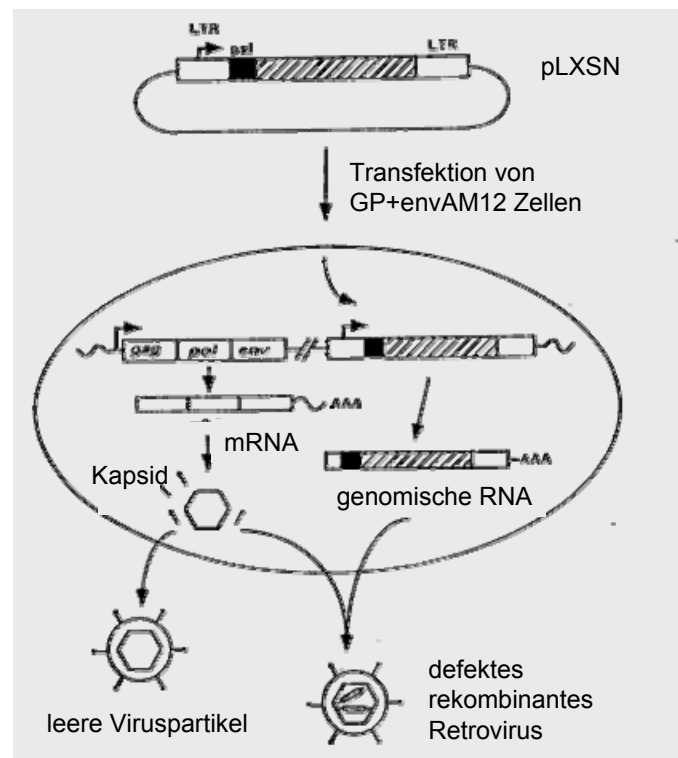


Abb. 2-6: Prinzip der retroviralen Transfektion.¹⁶²

Transfiziert man die Verpackungszellen transient mit einem retroviralen Vektor-Konstrukt, wird die RNA, die für das gewünschte Protein codiert, in die von den Wirtszellen produzierten Virionen verpackt. Da dem Virus jedoch die Information für seine eigenen Proteine nach wie vor fehlt, ist es zwar infektiös aber replikationsdefekt. Die so erzeugten Viren sind in der Lage, die Zielzellen zu **infizieren**. Das von der reversen Transkriptase umgeschriebene Provirus für das gewünschte Protein (in dieser Arbeit für einen P2Y-Rezeptor) kann nun mittels viraler Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert werden. Ein Ausschleusen der DNA/RNA ist so nicht mehr möglich.

Um die Infektionseffizienz der Viren zu erhöhen, kann eine **Pseudotypisierung** mit dem G-Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (**VSV-G**) erfolgen.¹⁶³ Dieses Protein wird bei der Einführung der DNA in die Verpackungszellen kotransfiziert. Das VSV-G wird in die Virushülle integriert und führt dazu, dass die Retroviren nicht nur an bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zielzelle sondern an beliebige anionische Phospholipide binden können und anschließend in die Zelle vermehrt eingeschleust werden.

2.1.8 Prinzip der intrazellulären Calciummessungen

Funktionelle Studien an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können verwendet werden, um ihre Aktivierung näher zu beschreiben. Sie eignen sich auch zum Screening auf potentielle Rezeptor-Liganden sowie zur Ligandcharakterisierung. Da der P2Y₂-Rezeptor, wie oben beschrieben, nach Aktivierung unter Anderem zur Erhöhung intrazellulärer Calciumspiegel führt, wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem **fluorimetrischen** Assay Calciummessungen durchgeführt (Abb. 2-7).^{164,165}

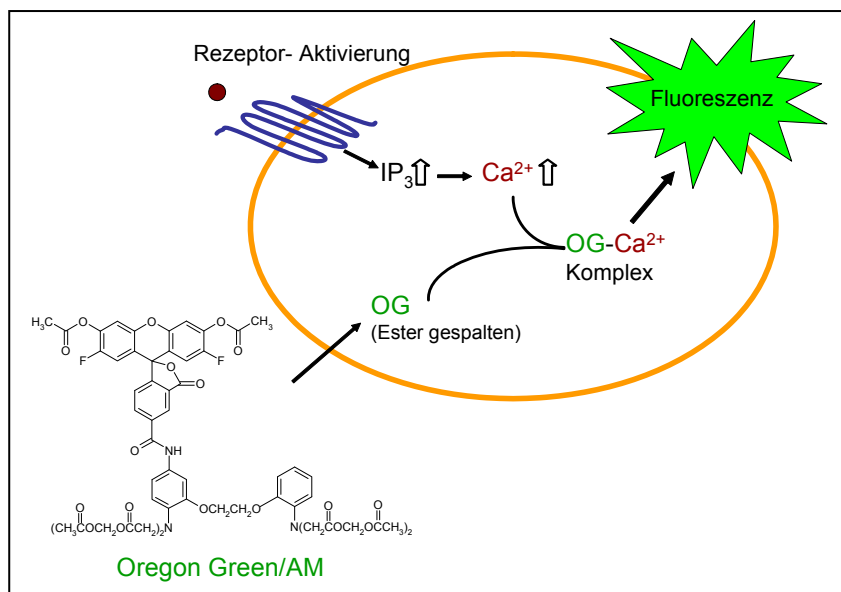


Abb. 2-7: Prinzip der intrazellulären Calciummessung am Beispiel von Oregon Green (OG). Nach GPCR-Aktivierung und Signalübertragung via Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) bildet das intrazellulär freigesetzte Calcium einen fluoreszierenden Komplex mit OG.

Das Prinzip der Messungen beruht darauf, dass Zellen mit dem Ester eines calciumsensitiven, membrangängigen Farbstoffs (z.B. Oregon Green BAPTA1/AM oder Fura-2/AM) beladen werden können. In der Zelle werden die Ester hydrolysiert, und der Farbstoff liegt unter physiologischen Bedingungen geladen vor (deprotonierte freie Säure). Daher kann die Substanz die Zelle nicht durch Diffusion verlassen, sondern ist im Cytosol „gefangen“ (Ion-Trap). Nach Rezeptor-Aktivierung und der Freisetzung von **Calcium** aus dem Endoplasmatischen Retikulum bilden sich Farbstoff-Calcium-Komplexe. Durch die Komplexbildung ändert sich das Fluoreszenzverhalten

des Farbstoffs konzentrationsabhängig, was mittels Fluorimeter gemessen werden kann. Eine Bestimmung an einzelnen Zellen ist möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch Messungen an Zellsuspensionen im 96-Well-Format vorgenommen.

2.2 Auswahl der Mutationen im humanen P2Y₂-Rezeptor

Um die Agonist- und Antagonist-Bindungsstelle des P2Y₂-Rezeptors näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zielgerichtet Mutationen in den Rezeptor eingeführt. Es wurde für andere GPCRs gezeigt, dass die transmembranären Helices 3, 6 und 7 sowie der extrazelluläre Loop 2 besonders häufig an der Ligandbindung beteiligt sind.⁹¹ Weitere Helices können eine Rolle bei der Rezeptoraktivierung spielen. In den genannten Bereichen sind oft konservierte Aminosäuren besonders wichtig für die Rezeptorbindung und –aktivierung. Alle in dieser Arbeit in den humanen P2Y₂-Rezeptor eingeführten Mutationen sind einem Snake-like-plot in Abb. 2-8 dargestellt. Der Plot wurde mit dem Programm Rbde erstellt.

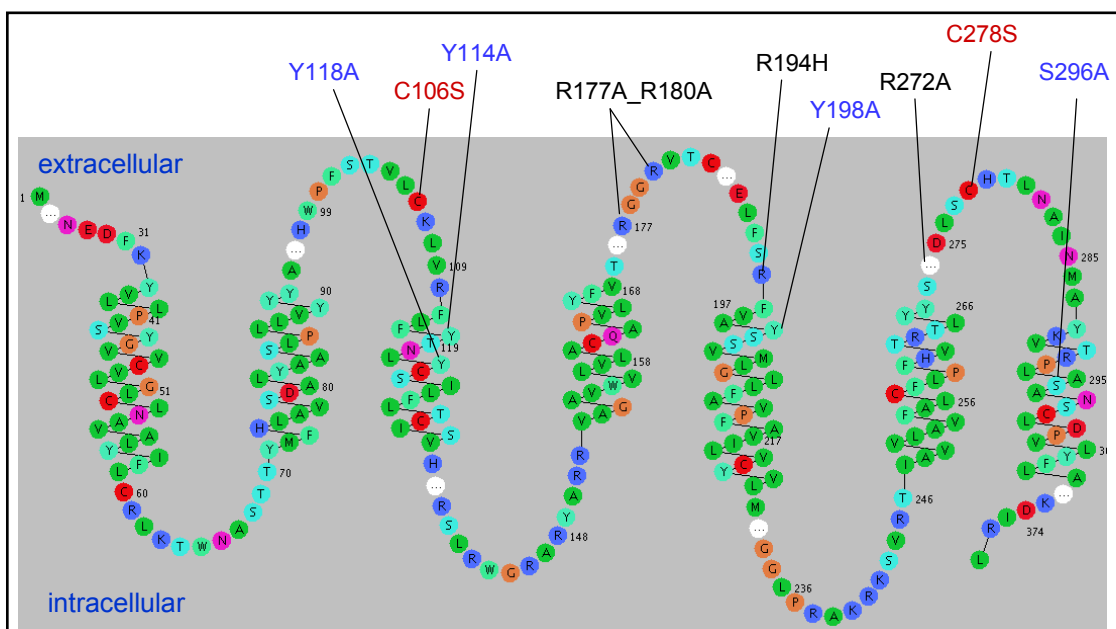


Abb. 2-8: Snake-like-plot des humanen P2Y₂-Rezeptors. Mutanten in den EL sind in schwarz, Mutanten in den TM in blau gekennzeichnet. Die Cystein-Mutanten, die die Ausbildung einer Disulfidbrücke im Rezeptor verhindern, sind rot dargestellt.

2.2.1 P2Y₂-Rezeptor-Alignment

Mit dem Programm **ClustalW** wurde ein Alignment der P2Y-Rezeptoren durchgeführt. Hierzu wurden jeweils die einzelnen Domänen der Rezeptoren verglichen. Für die Mutagenese wurden basische Aminosäuren aus den extrazellulären Loops, die potentiell Interaktionen mit den Phosphatresten der Nukleotide eingehen könnten, sowie weitere konservierte Aminosäuren gewählt. Im unten Gezeigten Bild (Abb. 2-9) sind die Alignments der extrazellulären Loops und transmembranären Helices dargestellt. Alle in dieser Arbeit mutierten Aminosäuren sind gekennzeichnet. Auf Grund des Alignments wurden die folgenden Mutation ausgewählt: **R177A_R180A, R272A**. Zwei weitere Mutationen wurden basierend auf der Arbeit von Erb et al. als Kontrolle ausgewählt (**R265A, K298R**).¹⁴⁸

TM3

```

sp|Q9BPV8|P2Y13_HUMAN  FSSVIFYETMYVGIVLLGLIA---- 21(97-117)
sp|Q9H244|P2Y12_HUMAN -TSVIFYFTMYLSISFLGLIT-I-- 21(100-120)
sp|Q15391|P2Y14_HUMAN -SAVLFYVNMYVSIVFFGLIS-F-- 21(97-117)
sp|P51582|P2Y4_HUMAN  ---FLFYNLYCSVLFLTCIS-V-- 19(113-131)
sp|P41231|P2Y2_HUMAN  ---FLFYTNLYCSILFLTCIS-V-- 19(111-129)
sp|Q15077|P2Y6_HUMAN  -VRFLFYANLHGSILFLTCIS-F-- 21(102-122)
sp|P47900|P2Y1_HUMAN  -QRFIFHVNLYGSILFLTCIS-A-- 21(127-147)
sp|Q96G91|P2Y11_HUMAN ---VIFLTCISLN-RYLGIVHPFFA 21(117-137)
      .:*      :      :      :

```

TM5

```

sp|Q15077|P2Y6_HUMAN  ---ALTVIGFLLPFAALLACYCLL- 21(195-215)
sp|P47900|P2Y1_HUMAN  ---MCTTVAMFCVPLVLILGCYG--- 20(219-238)
sp|P51582|P2Y4_HUMAN  YVHFSSAVMGLLFGVPCLVTLVCYGL-- 26(197-222)
sp|P41231|P2Y2_HUMAN  FVAYSSVMLGLLFAVPFAVILVCYVL-- 26(195-220)
sp|Q96G91|P2Y11_HUMAN ---LVLAGLGCLPLLLTLAAYGA-- 21(207-227)
sp|Q15391|P2Y14_HUMAN ---YIFVAIFWIVFLLLLIVFYTAI- 21(189-209)
sp|Q9H244|P2Y12_HUMAN ---YICQVIFWINFLIVIVCYTLI- 21(192-212)
sp|Q9BPV8|P2Y13_HUMAN ---ICQFIFWTVFILMLVFYVVIA 21(191-211)
      :      *

```

TM7

```

sp|Q15391|P2Y14_HUMAN  ----FTLLLSAANVCLDPIIFFLC---- 21(279-299)
sp|Q9H244|P2Y12_HUMAN  ----STLWLTSLNACLDPFIFFLC---- 21(282-302)
sp|Q9BPV8|P2Y13_HUMAN  ----TTLFLAATNICMDPLIIFLC---- 21(280-300)
sp|P51582|P2Y4_HUMAN  --YKVTRPLASANSCLDPVLYLLT---- 22(288-309)
sp|P41231|P2Y2_HUMAN  --YKVTRPLASANSCLDPVLYFLA---- 22(288-309)
sp|Q15077|P2Y6_HUMAN  AAYKGTRPFASANSVLDPILFYF---- 23(281-303)
sp|P47900|P2Y1_HUMAN  ATYQVTRGLASLNSCVDPILYFLAG---- 25(304-328)
sp|Q96G91|P2Y11_HUMAN  -----LMPLAFCVHPLLYMAAVPSLG 21(309-329)
      :      .      :      .:*      .:

```

EL2

P2Y6_HUMAN	-----AATG----IQRNRTV-CYDLSPPALATHYMPYGM	29 (166-194)
P2Y1_HUMAN	-----YSGTG----VRKNKTTITCYDTTSDDEYLRSYFIYS-	30 (189-218)
P2Y4_HUMAN	-----TT----SNKGITVLCHDTRPEEFDH-----	22 (175-196)
P2Y2_HUMAN	-----TT----SARGGRVTCCHDTSAPELFSR-----	22 (173-194)
P2Y13_HUMAN	-----NKE----ATPSSVKKCASLKGPLGLKWHQMVNN	29 (162-190)
P2Y12_HUMAN	-----NRQ----PRDKNVKKCSFLKSEFGLVWHEIVN-	28 (164-191)
P2Y14_HUMAN	-----NQS----VREMTQIKCIELKSELGRKWHKASN-	28 (161-188)
P2Y11_HUMAN	SHLKR PQQGAGNCSVARPEACIKCLGT-ADHGLAAYRAYS-	39 (168-206)

*

EL3

P2Y4_HUMAN	-----LARLLEADCRVLNIVNVV-----	18 (270-287)
P2Y2_HUMAN	-----SFRSLDLSCHTLNAINMA-----	18 (270-287)
P2Y13_HUMAN	ARVPYTHSQITNNKTDCLQNQLFIAKE-----	27 (258-279)
P2Y12_HUMAN	ARIPYTLSQTRDVFDCTAENTLFYVKE-----	27 (255-281)
P2Y14_HUMAN	----YTKSQTEAHYSCQSKEILRYMKE-----	23 (256-278)
P2Y11_HUMAN	MRVLNVDARRRWSTRCPFADIAQATAALELGPYVGYQVMRG	42 (267-308)
P2Y6_HUMAN	TKTAYLAVRSTPGVPCTVLEAFA-----	23 (258-280)
P2Y1_HUMAN	-----ARLDFQTPAMCAFNDRVY-----	18 (286-303)

*

Abb. 2-9: Alignment der P2Y-Rezeptoren. Alle P2Y-Rezeptor-Subtypen wurden mit dem Programm ClustalW abgeglichen. Die später charakterisierten Mutanten des P2Y₂-Rezeptors sind durch schwarzzrandige Rechtecke gekennzeichnet (**TM3**: Y114A, Y118A, **TM5**: Y198A, **TM7**: S296A, **EL2**: R177A_R180A, R177A, R180A, R194H, **EL3**: R272A).

2.2.2 Mutationen auf Grund eines computergenerierten Modells

2.2.2.1 Disulfidbrücken

Aus dem im Arbeitskreis Prof. Höltje erzeugten Rezeptor-Modell geht hervor, dass der humane P2Y₂-Rezeptor **zwei Disulfidbrücken** enthält (Abb. 1-10 A). Diese befinden sich im äußeren Bereich des Rezeptors zwischen den Aminosäuren Cys²⁵ und Cys²⁷⁸ sowie zwischen Cys¹⁰⁶ und Cys¹⁸³. Aus den Disulfidbrücken wurde jeweils eine Aminosäure in das homologe Serin mutiert: **C106S**, **C278S**. So konnten die Auswirkungen der Disulfidbrücken, nicht jedoch der Aminosäure Cystein an sich, auf die Rezeptoraktivierung untersucht werden.

2.2.2.2 Aminosäuren, die an der Bindungsstelle liegen

Auf Grund einer Dockingstudie mit ATP und UTP sollten im späteren Verlauf der Arbeit zusätzlich die folgenden Mutationen erstellt werden: **Y114A**, **Y118A**, **R194A**, **Y198A**, **S296A**, **H184A**. Die potentielle Bindungsstelle liegt, wie wegen der phylogenetischen Einordnung des P2Y₂-Rezeptors und der Verwandtschaft zu Peptidrezeptoren zu erwarten ist, eher im äußeren Bereich des Rezeptors (Abb. 2-10 B).^{88,91} Die zu mutierenden Aminosäuren liegen sehr nah an der potentiellen Bindungsstelle für ATP und UTP, und Interaktionen mit den Agonisten sind zu erwarten (Abb. 2-10 C).

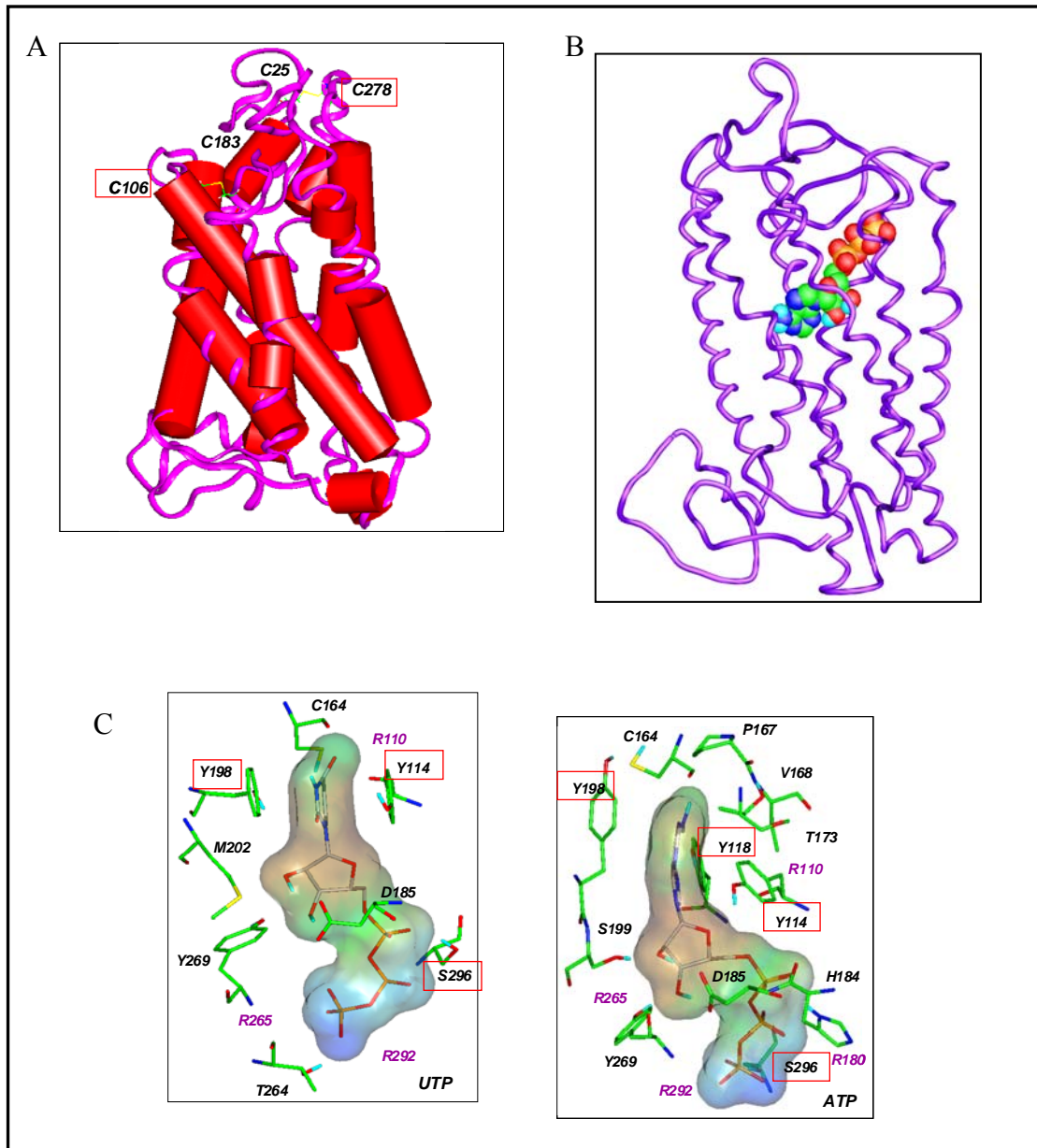


Abb. 2-10: Computermodell des humanen P2Y₂-Rezeptors. (Ko et al., unpublizierte Daten)¹⁶⁶ Eingeführte Mutationen sind durch rote Rechtecke markiert. Bereits bekannte Mutationen sind in violett gekennzeichnet.¹⁴⁸ **A:** Disulfidbrücken Cys²⁵-Cys²⁷⁸ und Cys¹⁰⁶-Cys¹⁸³. **B:** Bindungsstelle für ATP im humanen P2Y₂-Rezeptor. **C:** Bindungsstellen für ATP und UTP. Dargestellt sind die einzelnen Aminosäuren, die potentiell an der Ligandbindung beteiligt sind.

2.3 Mutagenese des humanen P2Y₂-Rezeptors

Der P2Y₂-Rezeptor, der in den Vektor pcDNA3.1 hineinkloniert war und an seinem C-Terminus ein V5-Tag trug, wurde von Prof. Dr. von Kügelgen (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Einige P2Y₂-Mutanten wurden in diesem Vektor erstellt (R177A_R180A, R272A, K289A, R265A). Da im Verlauf der Arbeit das Expressionssystem gewechselt wurde, wurden spätere Mutanten im Vektor pLXSN erstellt und die ersten Mutanten wurden umkloniert.

2.3.1 Mutagenese-PCR und Detektion von mutierten Monoklonen

Nach der Mutagenese-PCR wurde an Hand eines Agarose-Gels detektiert, ob sich neben den entstehenden Nebenprodukten eine Bande der richtigen Länge, etwa 7055 bp, gebildet hatte (Abb. 2-10 A). Bei der Optimierung der PCR zeigte sich, dass eine erhöhte Magnesiumkonzentration von 6-8 mM, eine erhöhte Primer-Konzentration von 1,5 pmol/μl und ein DMSO-Zusatz von 2,5% in den meisten Fällen zu einer ausreichenden Produktausbeute führte.

Waren Banden vorhanden, wurde in *E. coli* transformiert, und es erfolgte eine Rekombination des Plasmids in den Bakterien. Es wurden einzelne Monoklone selektiert, und die Vektor-DNA wurde aufgereinigt.

In einem Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym wurde auf positive, mutierte Klone getestet. Hier ist beispielhaft die Detektion der positiven P2Y₂-Rezeptor-Mutanten Y114A und S296A dargestellt (Abb. 2-10 B). Für die Mutanten **C106S, Y114A, Y118A, R177A_R180A, R177A, R180A, Y198A, C278S, R272A** und **S296A** wurden positive Klone detektiert. Die Mutanten R177A_R180A und R194H wurden im Arbeitskreis Prof. Dr. von Kügelgen (Universität Bonn) erzeugt. Die beiden Einzelmutanten im EL2, R177A und R180A, wurden auf Grund der später beobachteten, durch die Doppelmutante R177A_R180A ausgelösten Effekte von Andreas Spinrath (Arbeitskreis Prof. Dr. Kostenis, Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) generiert und charakterisiert. Die angestrebten Mutanten R194A, H184A, K298A und R265A konnten nicht erzeugt werden. Diese Mutationen wurden nicht weiter verfolgt.

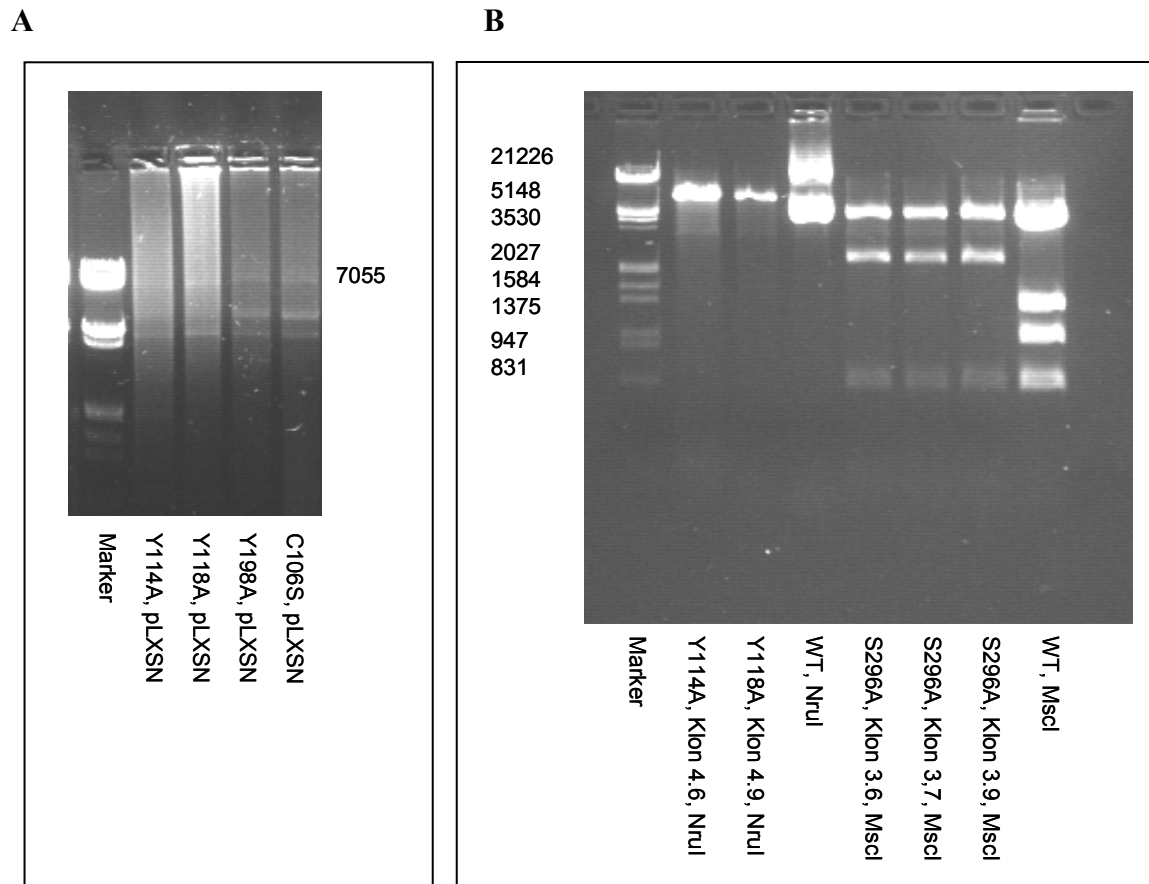


Abb. 2-11: Mutagenese-PCR und Detektion von mutierten Monoklonen. **A:** Bei der Mutagenese-PCR entstanden PCR-Produkte verschiedener Länge. War ein Produkt der erwarteten Länge von 7055 bp detektierbar, wie hier bei den Mutanten Y114A, Y118A, Y198A und C106S gezeigt, wurde die DNA zur Transformation von *E. coli* verwendet. **B:** Die einzelnen Klone wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Mutation überprüft. Hier als Beispiel die positiven Klone der P2Y₂-Rezeptor-Mutanten Y114A und S296A. Y114A unterschied sich in den Schnittstellen von MruI deutlich vom Wildtyp, der keine Schnittstelle für das entsprechende Enzym aufweist. Die Mutante S296A hatte drei Schnittstellen für das Enzym MscI, der Wildtyp P2Y₂-Rezeptor vier.

2.3.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur endgültigen Verifizierung der P2Y₂-Rezeptor Mutanten wurde zunächst mittels PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern und Gelelektrophorese durchgeführt. Dies erfolgte für die in den Vektor pcDNA3.1 klonierten Mutanten R177A_R180A und R272A sowie den Wildtyp P2Y₂-Rezeptor. Spätere Sequenzierungen wurden von der Firma gatc-biotech (Konstanz) durchgeführt.

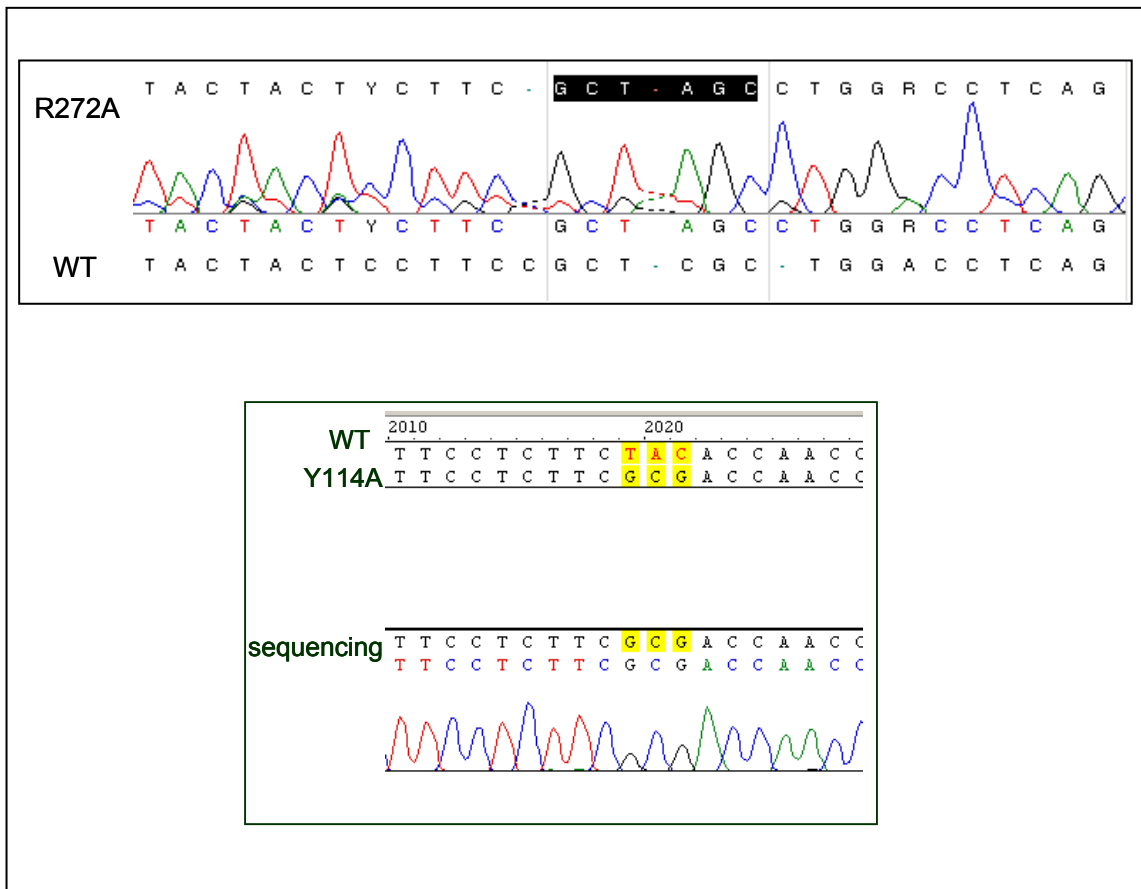


Abb. 2-12: Sequenzierung des humanen P2Y₂-Rezeptors und der eingeführten Mutationen R272A und Y114A.

In Abb. 2-12 ist das Sequenzierungschromatogramm an der Stelle der in den P2Y₂-Rezeptor eingeführten Mutationen R272A und Y114A dargestellt. Im Fall von R272A wurden die Basen CGC durch GCT ersetzt. Zusätzlich wurde eine stille Mutation (TCG in AGC) eingeführt. Beide Sequenzen codieren für Serin, jedoch veränderte diese Mutation die Anzahl der Schnittstellen für die Restriktionsendonuclease NheI. Bei der Mutante Y114A wurden die Basen TAC gegen GCG ausgetauscht.

Durch die Sequenzierungen stellte sich heraus, dass wegen eines Lesefehlers der Polymerase eine weitere Mutation entstanden war: R194H. Diese Mutante wurde in die folgenden Untersuchungen einbezogen.

2.4 Zusammenfassung und Diskussion

Auf Grund des Alignments des P2Y₂-Rezeptors mit anderen P2-Rezeptoren sowie unter Berücksichtigung bereits bekannter Bindemotive in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden Primer für die Einführung spezifischer Mutationen in den P2Y₂-Rezeptor entworfen. In Anlehnung an ein Rezeptormodell konnten weitere Mutanten für denselben Rezeptor generiert werden. Hierbei wurden auch potentielle Disulfidbrücken einbezogen. Auf DNA-Ebene wurden diese Mutationen mittels Mutagenese-PCR in den im Vektor pcDNA3.1 oder pLXSN vorliegenden Rezeptor eingeführt. Nach Rekombination in *E. coli* konnten die Plasmide aufgereinigt und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert werden. Die folgenden Mutanten des P2Y₂-Rezeptors wurden hergestellt: C106S, Y114A, Y118A, R177A_R180A, R177A, R180A, Y198A, R272A, C278S, S296A. Durch einen Lesefehler der Polymerase entstand zudem die Mutante R194H. Alle Mutanten wurden in die Variante I des humanen P2Y₂-Rezeptors eingeführt, die sich von Variante II und III durch die Base 933 unterscheidet (Vari. I: C, Vari. II, III: G). Die in dieser Arbeit verwendete Rezeptor-DNA enthält eine stille Mutation in Position 513 der Sequenz (C → T), die bereits in der von Prof. von Kügelgen erhaltenen DNA vorlag, aber die Proteinsequenz nicht beeinflusst.

Es war nicht möglich, die Mutationen R265A, K289A, R194A und H184A in den Rezeptor einzuführen. Dies könnte durch starke Sekundärstrukturausbildung der Vektor-DNA bedingt sein, durch die es dazu kommen könnte, dass die Polymerase nicht den vollständigen Vektor ablesen kann.

2.5 Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1

1321N1-Astrozytomzellen zeigen keine Eigenexpression von P2-Rezeptoren und können nicht durch Nukleotide stimuliert werden.^{167,168} Sie werden daher standardmäßig zur Expression von Nukleotidrezeptoren verwendet. Da die Zellen endogene, G_q-gekoppelte muscarinische M3-Rezeptoren tragen, konnte in den folgenden Experimenten der M3-Rezeptor-Agonist Carbachol als interne Kontrolle verwendet werden.²¹ 1321N1-Astrozytomzellen wurden mit Konstrukten des P2Y₂-Rezeptors und der Mutanten R177A_R180A, R194H und R272A mittels **Lipofektion** transfiziert. Alle Rezeptoren trugen ein V5-Epitop an ihrem C-Terminus. 48 Stunden nach der Transfektion wurde mit G418 selektiert, und es wuchsen stabil transfizierte Zellen heran.

2.5.1 Selektion von Monoklonen der mit pcDNA3.1 transfizierten Zellen

Die stabilen, mit G418 selektierten Zelllinien wurden in 175 cm² Petrischalen im Verhältnis 1:3.000, 1:30.000 und 1:300.000 ausgesät. Nach etwa einer Woche waren die Zellen der kleineren Splittverhältnisse bereits zu dicht bewachsen, aber die 1:300.000 gesplitteten Zellen hatten einzelne, runde Kolonien ausgebildet. Diese wurden mittels Trypsin-befeuchteter Filter abgelöst und zunächst in 48-Well-Platten überführt. Etwa zwei Drittel der Kolonien wuchsen an und konnten in 25 cm² Zellkulturflaschen gesplittet werden, um sie später auf ihre Expression zu untersuchen. Es wurden jeweils etwa 20 Monoklone zur weiteren Verwendung in Kultur gehalten und als Backup in flüssigem N₂ verwahrt.

2.5.2 Untersuchung der Expressionshöhe der Monoklone mittels Immunfluoreszenz

Die monoklonalen, mit dem P2Y₂-Rezeptor oder den Mutanten R177A_R180A, R194H und R272A transfizierten Zelllinien wurden in 48-Well-Platten ausgesät und nach Fixierung mit Methanol und Behandlung mit Triton[®] X-100 mit einem Fluorescein-Isothiocyanat-(FITC-) gekoppelten Anti-V5-Antikörper inkubiert. Eine Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm. Es war nicht möglich, auf diesem Weg eine signifikant höhere Fluoreszenz für transfizierte gegenüber nicht-transfizierten Zellen zu messen. Daher wurden die Messungen nicht weiter verfolgt.

2.5.3 Intrazelluläre Calciummessungen an mit pcDNA3.1 stabil transfizierten Zelllinien

Der Einfluss der Mutanten auf die Aktivierbarkeit des P2Y₂-Rezeptors wurde mittels intrazellulärer Calciummessungen durchgeführt. Diese fanden unter Verwendung des calciumsensitiven Farbstoffs Oregon Green BAPTA1/AM statt. Untersucht wurde die Freisetzung von Calcium aus dem ER durch P2Y₂-Rezeptor-Stimulation und nachfolgende Aktivierung der PLC.

2.5.3.1 Untersuchungen an monoklonalen Zelllinien

Die monoklonalen Zelllinien, die den P2Y₂-Rezeptor oder eine Mutante dieses Rezeptors rekombinant exprimierten, wurden einzeln auf die durch UTP hervorgerufene Ausschüttung von intrazellulärem Calcium untersucht. Viele der Monoklone zeigten zwar schnelles Wachstum unter G418-Zusatz im Medium, konnten aber dennoch nicht durch den P2Y₂-Rezeptor Agonisten UTP stimuliert werden. Für den Wildtyp und die Mutante R177A_R180A gelang es, eine bzw. zwei Zelllinien zu detektieren, die eine relativ hohe Calciumantwort zeigten. Für die Mutanten R194H und R272A war dies nicht der Fall. Daher wurden für diese Mutanten Untersuchungen an den gemischten Kulturen durchgeführt.

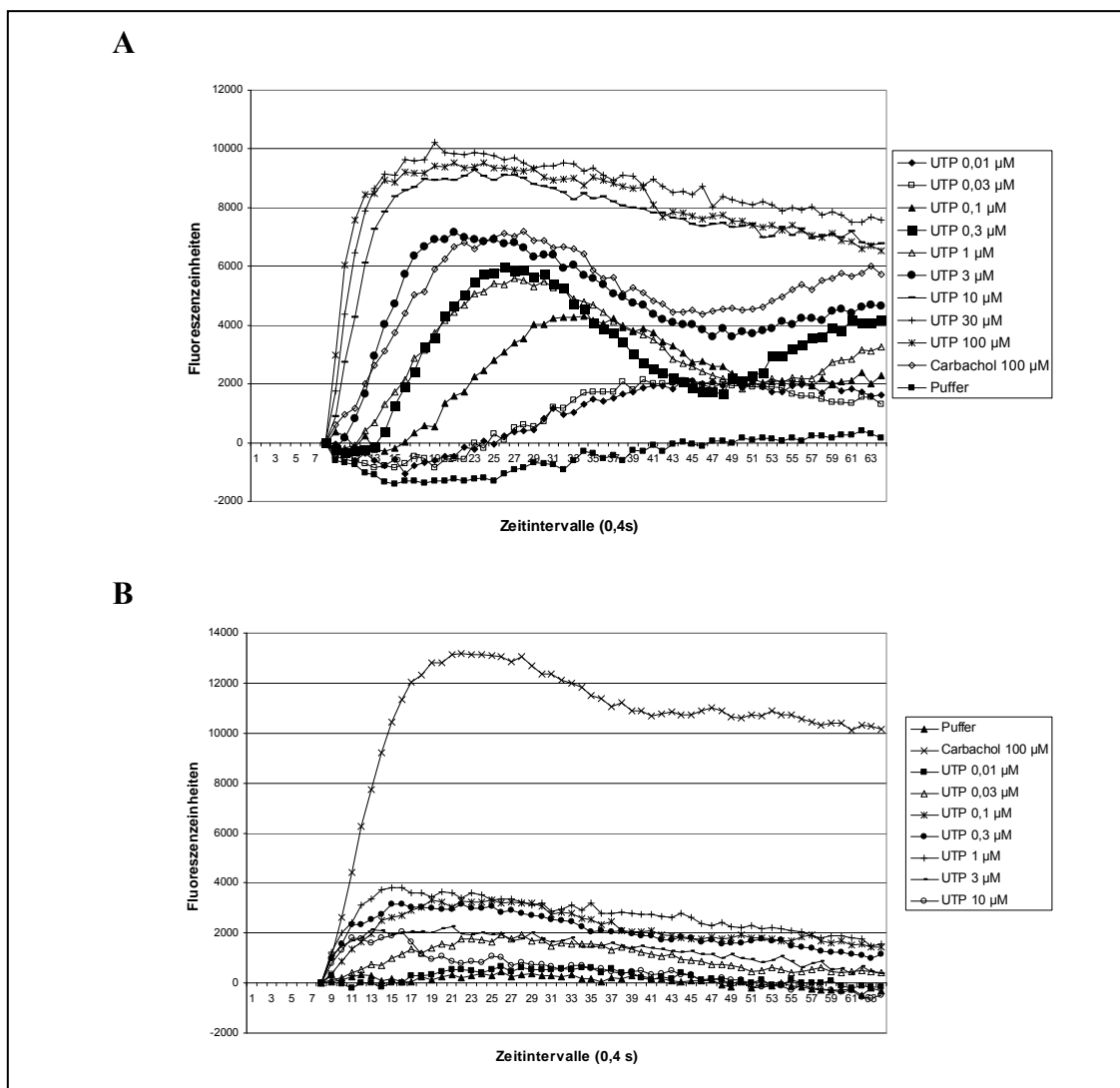


Abb. 2-13: Zeitabhängige, intrazelluläre Calciumanstiege nach Injektion von UTP. **A:** Der WT-P2Y₂-Rezeptor war nach Transfektion mit dem Vektor pcDNA 3.1 anfänglich gut anregbar. Injektion von UTP zu den Zellen führte zu konzentrationsabhängigen intrazellulären Calciumanstiegen. Die Kurvenverläufe ähnelten denen der M3-Rezeptor-Stimulierung durch 100 μ M Carbachol. **B:** Die Injektion verschiedener UTP-Konzentrationen zu Passage 5 der Mutante R194H führte nur noch zu sehr geringen intrazellulären Calciumanstiegen von bis zu 4.000 Fluoreszenzeinheiten. Andere durch pcDNA3.1 transfizierte Zelllinien verhielten sich ähnlich (Einzelmessungen aus mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten).

2.5.3.2 Intrazelluläre Calciummessungen nach Injektion verschiedener Nukleotide

Es wurden die Agonisten UTP und ATP sowie die Agonisten anderer P2-Rezeptoren UDP, ADP und UDP-Glucose auf ihre Aktivität am Wildtyp-P2Y₂-Rezeptors und den Mutanten R177A_R180A, R194H und R272A untersucht. Hierzu wurden intrazelluläre Calciummessungen verwendet. Vor allem bei den Mischkulturen, aber auch bei den monoklonalen Zelllinien konnte nach UTP-Injektion schon nach 3-5 Passagen keine Calciumantwort mehr detektiert werden (Abb. 2-13). Auf Grund der geringen Calciumantworten und demzufolge auch extrem geringen Rezeptor-Expressionsraten wurde im Verlauf der Arbeit ein retrovirales Transfektionssystem verwendet, das zu stabileren und höheren P2Y₂-Rezeptor-Expressionen führte. Die Charakterisierung der Mutanten konnte in den mit pcDNA3.1 transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen nicht abgeschlossen werden.

2.6 Zusammenfassung und Diskussion

1321N1-Astrozytomzellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1 durch Lipofektion transfiziert. Es konnten stabile Zelllinien generiert werden, die den Wildtyp-P2Y₂-Rezeptor sowie die Mutanten R177A_R180A, R194H und R272A rekombinant exprimierten. Anfänglich waren die Zellen gut durch die Standard-Agonisten UTP und ATP anregbar, und $[Ca^{2+}]_i$ wurde fluorimetrisch gemessen. Trotz stetigen Wachstums und ausgeprägter Antibiotikaresistenz der Zellen ging die Expressionsrate der Rezeptoren nach nur wenigen Passagen stark zurück, so dass keine intrazellulären Calciumanstiege nach Agonist-Injektion mehr messbar waren. Die Charakterisierung der Mutanten konnte daher in dem vorliegenden Zellsystem nicht abgeschlossen werden. Möglicherweise wurde die DNA, die für die P2-Rezeptoren codierte, wieder ausgeschleust oder nicht in ausreichendem Maß abgelesen. Eine Detektion der Expression mittels FITC-gekoppeltem Antikörper war nicht möglich, da die Empfindlichkeit des Fluorimeters für diesen Assay nicht ausreichend war. Eine Messung an einem Fluoreszenzmikroskop oder ein anderer Detektionsweg wäre vermutlich besser geeignet.

2.7 Klonierung von P2Y₂-Rezeptorkonstrukten

Der Wildtyp P2Y₂-Rezeptor sowie die bereits im Vektor pcDNA3.1 erzeugten Mutanten R177A_R180A, R272A und R194H wurden einer retroviralen Transfektion zugänglich gemacht, in dem sie in den Vektor **pLXSN** hinein kloniert wurden. Die Klonierung erfolgte hinter die bereits im Vektor vorliegende Sequenz für ein Hämagglutinin-Tag (**HA-Tag**) (Abb. 2-14). Dieses wurde später am N-Terminus des Rezeptors als Fusionsprotein mit dem P2Y₂-Rezeptor exprimiert. Von Sromek *et al.* und Yoshioka *et al.* wurde zuvor gezeigt, dass ein N-terminaler HA-tag keine Auswirkungen auf die pharmakologischen Eigenschaften von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hat.^{96,169}

Es wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonucleasen MluI und XhoI verwendet, die über PCR in die Sequenz für den P2Y₂-Rezeptor eingeführt wurden. Das ursprüngliche Konstrukt enthielt den P2Y₁₂-Rezeptor im Vektor pLXSN. Dieser wurde durch Verdau mit den Enzymen MluI und XhoI entfernt, und der Vektor wurde aus dem Gel aufgereinigt. Das ebenfalls verdaute PCR-Produkt des P2Y₂-Rezeptors wurde durch Ligation eingeführt. Die Umklonierung der Mutante R194H gelang erst nach der Klonierung der DNA in einen TOPO-Vektor und nachfolgende Restriktion und Ligation in den Vektor pLXSN. Das entstandene Konstrukt wurde mittels Colony-PCR und Sequenzierung überprüft. Die Durchführung der Klonierung und der Colony-PCR wird in Kapitel 6.4.5 und 6.4.11 beschrieben.

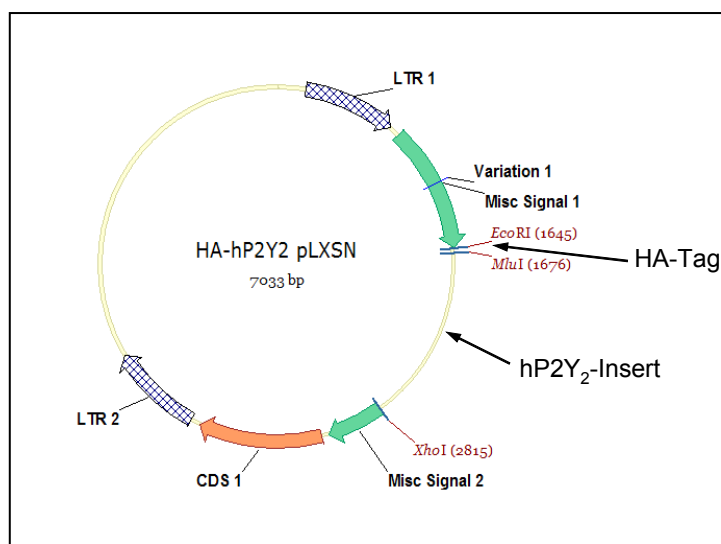


Abb. 2-14: Vektorkarte pLXSN. Das HA-Tag wurde durch die Enzyme EcoRI und MluI hineinkloniert, das Insert enthielt die Sequenz des humanen P2Y₂-Rezeptors und wurde über die Schnittstellen für MluI und XhoI in den Vektor ligiert.

2.8 Retrovirale Transfektion

Durch die Verwendung eines retroviralen Transfektionssystems sollten stabile, hoch exprimierende Zelllinien, die den P2Y₂-Rezeptor und die erzeugten Mutanten dieses Rezeptors rekombinant exprimieren, erzeugt werden. Im Labor von T. Kendall Harden, Ph.D. (Medical School, University of North Carolina, Chapel Hill) wurden unter Verwendung des Vektors pLXSN und der Verpackungszelllinie PA317 mit dem VSV-G-Protein pseudotypisierte MuLV, die die Information für den Wildtyp-Rezeptor und die Mutanten R177A_R180A sowie R272A trugen, erzeugt (2.1.7). Nach der Infektion von 1321N1-Astrozytomzellen wurden mittels G418 stabile Zelllinien selektiert. Da die Arbeit mit der Verpackungszelllinie PA317 in Deutschland auf Grund gentechnischer Vorschriften nicht möglich war, wurden hier GP+envAM12-Zellen verwendet.

2.8.1 Optimierung der retroviralen Transfektion

Die Verpackungszelllinie **GP+envAM12** war schon unter Kulturbedingungen deutlich empfindlicher als PA317-Zellen. Es war nicht möglich, ein höheres Splittverhältnis als 1:8 zu wählen, und die Teilungsrate war deutlich langsamer. Die bei PA317 verwendete Transfektion mittels **Calciumphosphat-Präzipitation** war zwar möglich, führte jedoch dazu, dass die Zellen zu etwa 50% abstarben. Dem entsprechend erschien der Virustiter im Überstand der Zellkultur nach Transfektion eher gering zu sein, was sich in einer geringeren Stimulierbarkeit der stabil mit dem P2Y₂-Rezeptor infizierten 1321N1-Zellen zeigte. Verbesserungen in der Technik der Calciumphosphat-Präzipitation, die eine Verkürzung der Inkubation mit der präzipitierten DNA von 24 h auf 12 h und Erhöhung der **Zellzahl** der GP+envAM12-Zellen von $1 \cdot 10^6$ auf $1,5 \cdot 10^6$ beinhaltete, führten zu erhöhter Rezeptordichte auf den Zielzellen. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl sowie das Tropfen des DNA-Präzipitats direkt auf die Zellen führte zu einem verschlechterten Ergebnis.

Zu einem deutlich erhöhten Virustiter führte die **Lipofektion** der GP+envAM12-Zellen. Auch bei diesem Verfahren wurde ein Kostrukt für das VSV-G-Protein kotransfiziert. Die **DNA-Menge** wurde variiert, wobei für eine 25 cm² Flasche im Allgemeinen 10 µg DNA ausreichend waren. Bei einer geringen Expressionsrate in den 1321N1-Astrozytomzellen wurde auf 15 µg DNA erhöht, was teilweise zu einem erhöhten Virustiter und somit zu einer erhöhten Rezeptor-Expression führte. Auch für die Lipofektion wurde die Zellzahl der GP+envAM12-Zellen unter verbesserten Ergebnissen auf $1,5 \cdot 10^6$ Zellen erhöht.

2.8.2 Retrovirale Transfektion des P2Y₂-Rezeptors

Unter optimierten Bedingungen wurden der P2Y₂-Rezeptor sowie die Mutanten dieses Rezeptors C106S, Y114A, Y118A, R177A, R180A, Y198A, R272A, C278S und S296A stabil mittels retroviraler Transfektion in 1321N1-Astrozytomzellen exprimiert. Die Expression der Doppelmutante R177A_R180A wurde ausschließlich mit in den USA hergestellten Viren aus PA317-Zellen durchgeführt. Der Wildtyp und die Mutante R272A wurden zusätzlich zu der Transfektion von GP+envAM12-Zellen auch unter Verwendung von PA317-Zellen exprimiert. Wurden **mehrere Transfektionen** durchgeführt, wurden diese in aufsteigender Reihenfolge mit **T1, T2, T3** usw. benannt.

2.9 Expression und Funktionalität von Rezeptormutanten

Um die P2Y₂-Mutanten zu charakterisieren und ihr Verhalten mit dem des Wildtyp-Rezeptors vergleichen zu können, wurde die Expressionsrate der einzelnen Rezeptoren auf 1321N1-Zellen überprüft. Die Expressionsraten sollten möglichst ähnlich sein, um Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Da es möglich ist, dass Mutanten auf Grund ihrer veränderten Sekundär- und Tertiärstruktur nicht in die Zellmembran gelangen können, wurde die Expression nicht aus dem Zelllysate sondern auf der Zelloberfläche ganzer Zellen bestimmt. Hierzu wurde ein **Zelloberflächen-ELISA** (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) verwendet (6.5).¹⁷⁰ In diesem Assay werden ganze Zellen zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der an das extrazellulär befindliche **HA-Tag** des P2Y₂-Rezeptors bindet. In einem zweiten Schritt bindet ein Horseradish-Peroxidase-(HRP-) gekoppelter Sekundärantikörper an den primären Antikörper. Die HRP kann 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (**ABTS**), ein Substrat im Zellüberstand, umsetzen, das später UV-photometrisch vermessen wird. Das Ausmaß der Umsetzung ist abhängig von der Dichte der Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

2.9.1 Etablierung des Zelloberflächen-ELISAs

Um die Expressionsrate der mutierten P2Y₂-Rezeptoren zu bestimmen, wurden die folgenden Parameter in den Versuchsbedingungen variiert:

Antikörper

Es wurden zunächst ein Anti-HA-Antikörper der Firma Sigma und ein Goat-Anti-Mouse-Antikörper der Firma Jackson verwendet. Da mit diesen Antikörpern keine spezifische Substratumsetzung erreicht werden konnte, wurde auf einen Anti-HA-Antikörper der Firma Covance und einen Goat-Anti-Mouse-Antikörper von Sigma umgestellt.

Absaugen des Zellüberstands

Der Zellüberstand wurde zunächst mit einer Membranpumpe abgesaugt. Da der Sog zu groß war, wurde auf eine besser regulierbare Wasserstrahlpumpe umgestellt. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden nur zwei bis maximal drei Reihen an Wells einer 24-Well-Platte gleichzeitig von Zellüberstand befreit und erneut überschichtet.

Blockieren vor der Antikörper-Inkubation

Es wurden verschiedene Lösungen zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen verwendet: 0,1% BSA, 1% BSA, 2% BSA, 3% BSA, 10% FCS und 20% FCS. Alle Lösungen wurden in PBS hergestellt. Zusätzlich wurden Versuche ohne Blockieren vor einer oder beiden Antikörper-Inkubationen durchgeführt. Der Hintergrund war bei hoher Substratumsetzung bei Verwendung einer 1%igen BSA-Lösung vor beiden Antikörper-Inkubationen am geringsten.

Antikörperkonzentration und Inkubationsmedium

Der primäre Antikörper wurde in den Verdünnungen 1:1.000, 1:2.500 und 1:5.000 verwendet. Der sekundäre Antikörper wurde in den Verdünnungen 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000 und 1:10.000 eingesetzt. Eine Konzentration von 1:1.000 für den Anti-HA-Antikörper und 1:2.500 für den Goat-Anti-Mouse-Antikörper erwies sich als besonders gut geeignet.

Entsprechende Konzentrationen an Proteinen zum Blockieren der unspezifischen Bindung des Antikörpers wurden auch im Inkubationsmedium getestet. Auch hier erwies sich 1% BSA als geeignet.

Anzahl der Spülschritte

Die Anzahl und Länge der Spülschritte nach den einzelnen Inkubationen mit Antikörper wurde variiert. Als besonders gut geeignet erwies sich eine Anzahl von drei Spülschritten nach dem 1. Antikörper und vier Spülschritten nach dem 2. Antikörper. Die Länge der Spülschritte war entscheidend. Der Puffer PBS musste in jedem Spülschritt mindestens 10 min auf den Zellen verbleiben, um eine hohe spezifische Umsetzung des Substrats mit wenig Hintergrund zu erreichen.

Fixieren der Zellen

Experimente mit und ohne Fixieren der Zellen wurden durchgeführt. Ein Abreißen der Zellen wurde durch Fixieren mit 4% Paraformaldehyd (PFA) verringert. Da es keine Unterschiede im Resultat ergab, wurden die Zellen erst nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper fixiert, um eine Bindung des Antikörpers an sich im Inneren der Zelle befindende Rezeptoren auszuschließen.

2.9.2 Expressionsraten der einzelnen P2Y₂-Rezeptormutanten

Mit dem optimierten Zelloberflächen-ELISA wurden die Expressionsraten der einzelnen Mutanten bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Expression des P2Y₂-Rezeptors bezogen, und nicht transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen wurden als 0%-Referenz verwendet. Da die Expressionsraten der einzelnen Mutanten nicht immer im gleichen Bereich lagen, wurden drei Wildtyp-Zelllinien verwendet, denen jeweils **ähnlich hoch exprimierte Mutanten** zugeordnet wurden (Abb. 2-15). WT T4 zeigte per Definition 100% Expression, WT T3 im Vergleich dazu nur 52%. Der ersten Gruppe wurden die Mutanten R177A_R180A (99%), R177A (121%), R180A (82%), R272A (154%) und Y114A (121%) zugeordnet. Zur Gruppe der Zelllinien mit geringerer Rezeptordichte gehörten R194H (67%), C278S (48%), Y118A (40%), Y198A (52%) und S296A (39%). Die Zelllinie WT T1, die die geringste Expressionsrate aufwies (14%), wurde lediglich für Untersuchungen zur Reduktion der Disulfidbrücken (s. 2.8.1) verwendet. Die Mutante C106S konnte nicht in 1321N1-Zellen exprimiert werden.

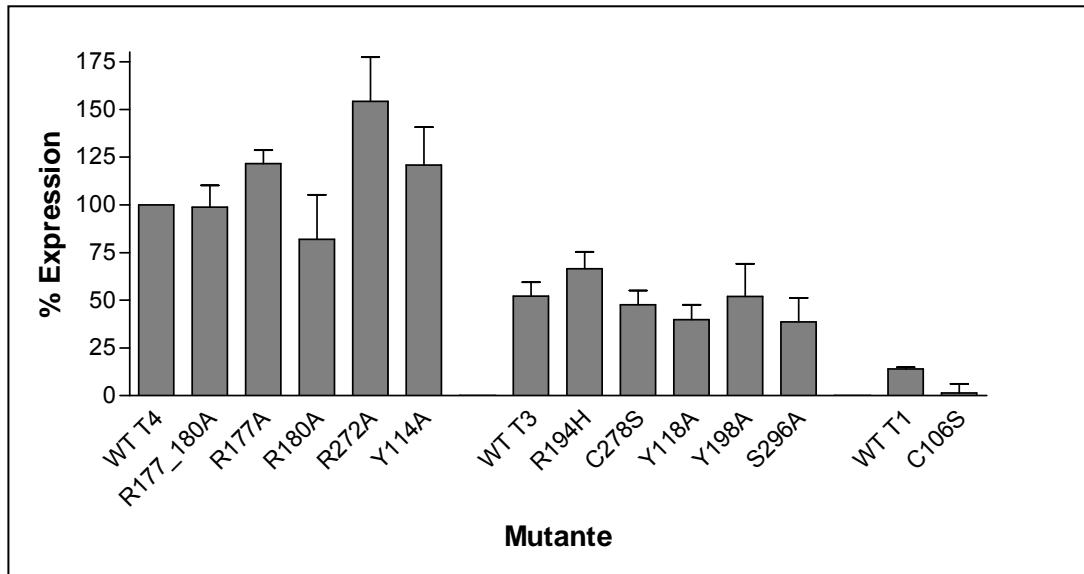


Abb. 2-15: Expressionsraten der P2Y₂-Rezeptor-Mutanten bezogen auf die Zelllinie WT T4. Die Expressionsraten wurden mittels Zelloberflächen-ELISA und Messung der Absorption des umgesetzten Substrats, ABTS, ermittelt. Die Mutanten-exprimierenden Zelllinien wurden jeweils mit entsprechend ihrer Rezeptordichte ähnlich hoch exprimierenden WT-Zelllinien verglichen (n = 3-8).

2.9.3 Reinheit von UTP

Von Dr. Jamshed Iqbal durchgeführte Kapillarelektrophorese-Messungen ergaben, dass das kommerziell erworbene ATP der Firma Sigma 100% Reinheit aufwies. Das bei der Firma Applichem erworbene UTP enthielt jedoch neben 91,5% UTP 7,5% UDP und 1% UMP als Verunreinigung. Diese Unreinheiten wurden in die Berechnung der im Folgenden angegebenen EC₅₀-Werte entsprechend einbezogen. UDP und UMP stören nicht, da sie keine Affinität zu P2Y₂-Rezeptoren besitzen.

2.9.4 Anregbarkeit der Zellen in Abhängigkeit von der Expressionsrate

Die rekombinant in 1321N1-Astrozytomzellen exprimierte humanen Wildtyp-P2Y₂-Rezeptoren waren funktionell. Die Zellen zeigten nach Stimulation durch UTP und andere Agonisten konzentrationsabhängig intrazelluläre Calciumanstiege (Abb. 2-16). Nach dem Beladen der Zellen mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green BAPTA1/AM wurde der Agonist zur Zellsuspension injiziert, und die Fluoreszenz wurde für 20 s in Intervallabständen von 0,4 s gemessen.

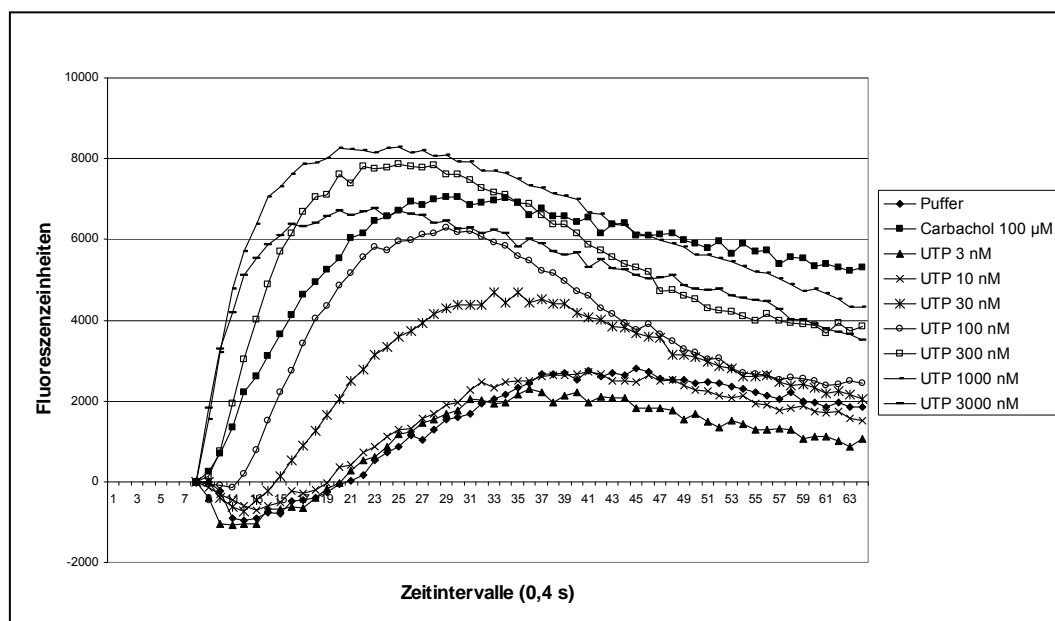


Abb. 2-16: P2Y₂-Rezeptor Aktivierung. Nach Injektion von UTP zu 1321N1-Astrozytomzellen, die retroviral stabil mit dem humanen P2Y₂-Rezeptor transfiziert worden waren (WT T3), kam es zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären Calciumausschüttung.

Die Dosis-Wirkungskurven waren abhängig von der Anzahl der exprimierten P2Y₂-Rezeptoren (Abb. 2-17). Es wurden EC₅₀-Werte von 781 nM für den WT T1 (14% Expression), 80,4 nM für den WT T3 (52% Expression) und 59,0 nM für den WT T4 (100%) Expression bestimmt.

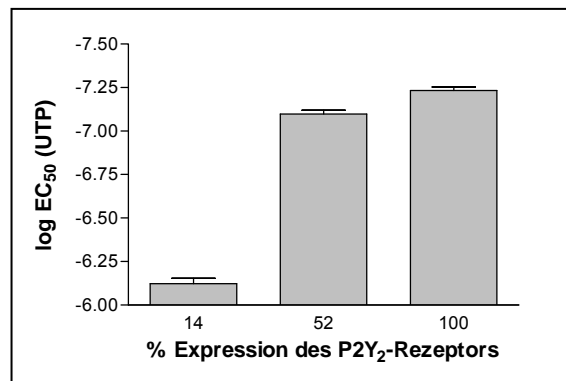


Abb. 2-17: log EC₅₀-Werte ± SEM der P2Y₂-Wildtyp-Zelllinien mit unterschiedlichen Expressionsraten. Die Werte wurden durch [Ca²⁺]_i-Messungen ermittelt (n = 3-4).

2.10 Zusammenfassung und Diskussion

Ein Zelloberflächen-ELISA zur Detektion von Expressionsraten HA-markierten P2Y₂-Rezeptoren auf 1321N1-Astrozytomzellen konnte etabliert werden. Die Expressionsraten der in diesen Zellen rekombinant exprimierten mutierten Rezeptoren waren z.T. unterschiedlich, so dass die einzelnen Zelllinien jeweils Wildtyp-Zelllinien zugeordnet wurden, die ähnliche Expressionsraten aufwiesen. Die Mutante C106S konnte nicht in 1321N1-Zellen exprimiert werden. Die unterschiedlichen Expressionsraten könnten durch unterschiedlich stark veränderte Sekundär- und Tertiärstrukturen in den Rezeptormutanten bedingt sein. Proteine, die in der Membran lokalisiert sind, tragen in der Regel ein Signal, das zum Transport vom Syntheseort, dem rauen ER, an die richtige Position in der Zelle führt. Schon im ER und im Golgi-Aparat werden die Proteine richtig gefaltet und in die Membran integriert. Um stabil in der Membran zu verbleiben, benötigen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nach außen hydrophobe Strukturen, die α -Helices, und hydrophile Anteile, die intra- und extrazellulären Schleifen. Bereits im ER werden durch die Protein-Disulfid-Isomerase Disulfidbrücken ausgebildet, die diese Strukturen stabilisieren.¹⁰³ Das Fehlen der Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys¹⁰⁶ und Cys¹⁸³ des P2Y₂-Rezeptors verändert dessen Struktur vermutlich soweit, dass dieser nicht mehr stabil in die Zellmembran integriert werden kann.

Die in 1321N1-Astrozytomzellen rekombinant exprimierte P2Y₂-Rezeptoren waren durch UTP konzentrationsabhängig stimulierbar. Intrazelluläre Calciumanstiege konnten beobachtet werden. Schon eine Injektion von Puffer zu den Zellen führte zu schwachen Reaktionen. Dies ist dadurch zu begründen, dass die Zellen auf die Injektion der jeweiligen Substanz mit Nukleotidausschüttung (ATP) reagieren.¹⁰¹ Bei hoher Rezeptordichte ist diese Nukleotidfreisetzung ausreichend für eine leichte Eigenstimulation.

Die EC₅₀-Werte der Wildtyp-Zelllinien lagen für Expressionsraten von 100% und 52% in einem ähnlichen Bereich (59,0 nM; 80,4 nM). Erst bei erheblich geringeren Expressionen (14%) war eine deutliche Erhöhung des EC₅₀-Werts auf 781 nM zu beobachten. Für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde bereits gezeigt, dass die Expressionsrate des Rezeptors oder des G-Proteins starken Einfluss auf die Zellantwort haben kann. Nach Zugabe eines Liganden (L) zu Membranen, die GPCRs und G-Proteine enthalten, sind vier Zustände des Rezeptors (R) und seines gebundenen G-Proteins (G) möglich, bei denen der Rezeptor im aktiven Zustand R* und im inaktiven Zustand R vorliegen kann: RG, R*G, LRG und LR*G. Der aktive Rezeptor R* kann G-Proteine aktivieren und so einen Effekt auslösen. Agonisten verschieben durch ihre Bindung mehr Rezeptoren in den aktiven Zustand, als das unter normalen Gleichgewichtsbedingungen der Fall wäre. Durch Erhöhung der Anzahl der Rezeptoren und/oder der G-Proteine verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den vier Zuständen, so dass die Anzahl von R*G und LR*G deutlich erhöht wird. Daher wird das System sensitiver gegenüber zugegebenen Agonisten.¹⁷¹ Die geringen Unterschiede zwischen den EC₅₀-Werten der hoch-exprimierenden P2Y₂-Wildtyp-Zelllinien WT T3 und WT T4 ist möglicherweise dadurch zu begründen, dass bei entsprechend hohen Rezeptordichten die endogen vorhandenen G-Proteine bereits vollständig aktiviert werden und es so zu einem Sättigungseffekt des Austauschs von GDP durch GTP kommt. Eine weitere Erhöhung der Rezeptorenzahl kann daher keine weitere Erhöhung der Sensitivität des Systems mehr zur Folge haben. Der EC₅₀-Werte bleibt konstant, so lange keine zusätzlichen G-Proteine rekombinant in das System eingeführt werden.^{172,173}

2.11 Disulfidbrücken im P2Y₂-Rezeptor

Disulfidbrücken sind sehr wichtige Gebilde, die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen und somit auch von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stabilisieren. Sie können aber auch die Funktion von Proteinen kontrollieren, indem sie als so genannte „allosterische Disulfidbrücken“ ihre Konformation verändern.¹⁷⁴ Es ist möglich, dass sie die Ligandbindung und Rezeptoraktivierung beeinflussen. Die Relevanz der beiden Disulfidbrücken des P2Y₂-Rezeptors zwischen Cys¹⁰⁶ und Cys¹⁸³ sowie zwischen Cys²⁵ und Cys²⁷⁸ (Abb. 2-10) wurde in dieser Arbeit durch chemische Reduktion der Disulfidbrücken und durch Mutagenese untersucht.

2.11.1 Chemische Reduktion von Disulfidbrücken

Um die Disulfidbrücken des P2Y₂-Rezeptors auf der Zelloberfläche von 1321N1-Astrozytomzellen chemisch zu reduzieren, wurde **Dithiothreitol (DTT)** in den Konzentrationen 1 mM und 10 mM für 15 min bei Raumtemperatur mit den Zellen WT T1 inkubiert (s. 6.6.7). DTT ist nicht zytotoxisch und wird, wie in der Literatur beschrieben, standardmäßig zu diesem Zweck eingesetzt.^{24,175} Anschließend wurde [Ca²⁺]_i nach Stimulation des P2Y₂-Rezeptors durch UTP und ATP gemessen. Auch hier wurde als Referenz die Stimulation der endogen auf 1321N1-Zellen exprimierten muscarinischen M3-Rezeptoren durch 100 µM Carbachol verwendet. Die Calciumanstiege für den M3-Rezeptor wurden nach Behandlung mit 10 mM DTT um 21% reduziert. Dies entspricht der bereits beschriebenen mäßigen Verminderung der Bindung an den M3-Rezeptor durch DTT-Reduktion.¹⁷⁵ Die Aktivierung des humanen P2Y₂-Rezeptors wurde wesentlich stärker beeinflusst. Es wurde nach Vorinkubation mit 10 mM DTT eine signifikante Verringerung der UTP-induzierten Calciumanstiege um **80%** bzw. **74%** (1 µM bzw. 10 µM UTP) festgestellt. Die ATP-induzierten Calciumanstiege sanken um **91%** bzw. **81%** (1 µM bzw. 10 µM ATP) (Abb. 2-18).

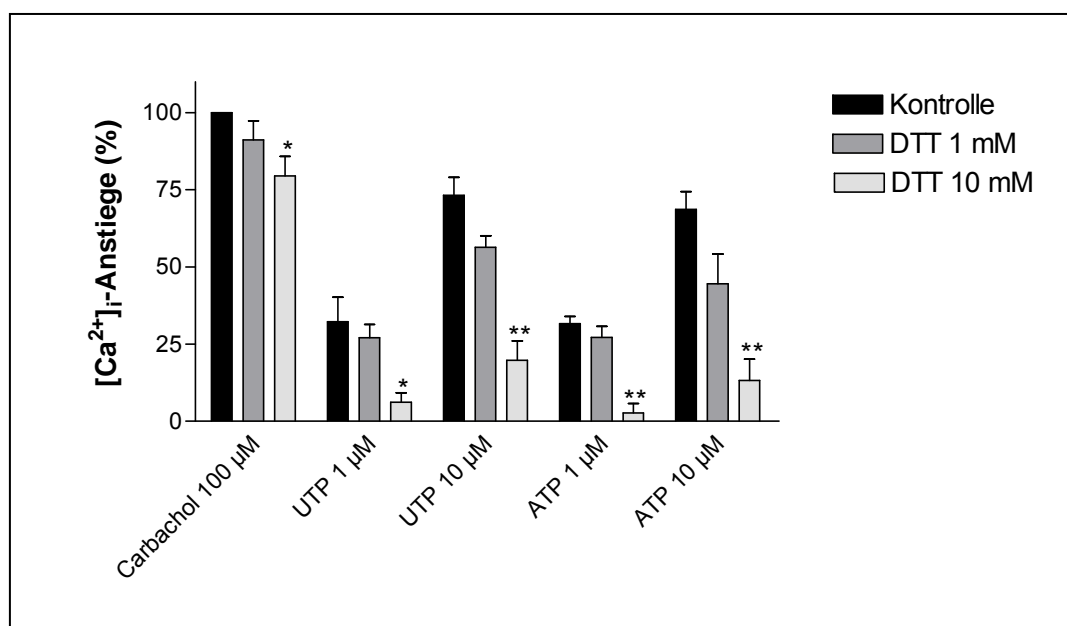


Abb. 2-18: Reduktion von Disulfidbrücken durch DTT. Den P2Y₂-Rezeptor exprimierende 1321N1-Astrozytomzellen wurden mit DTT vorinkubiert, und Agonist-induzierte intrazelluläre Calciumanstiege wurden gemessen. Ein geringer Rückgang der Aktivierbarkeit des Rezeptors wurde für 1 mM DTT beobachtet. Inkubation mit 10 mM DTT reduzierte die Aktivierbarkeit des muscarinischen M3-Rezeptors durch Carbachol um $20,5 \pm 11,0\%$ und die Aktivierbarkeit des P2Y₂-Rezeptors durch UTP sank nach Vorinkubation mit 10 mM DTT um $80 \pm 15\%$ (1 µM UTP) bzw. $74 \pm 5\%$ (10 µM UTP). Die ATP-induzierten Calciumanstiege wurden um $91 \pm 17\%$ (1 µM ATP) bzw. $81 \pm 6\%$ (10 µM ATP) gesenkt (n = 3). * p<0,05, ** p<0,01

2.11.2 Charakterisierung der Cysteinmutanten

Wie unter 2.3 beschrieben, wurde aus jeder postulierten Disulfidbrücke des P2Y₂-Rezeptors ein Cystein in Serin mutiert (**C106S** und **C278S**). Diese retroviral in 1321N1-Astrozytomzellen transfizierten Mutanten wurden auf ihre Aktivierbarkeit durch die nativen Agonisten ATP und UTP sowie die Dinukleotide Ap₄A und Ip₄U untersucht (Abb. 2-19 A). Der Standardantagonist Reactive Blue-2 (RB2) und das Anthrachinonderivat SW K16 wurden zusätzlich getestet (Abb. 2-19 B). Als Testsystem wurden intrazelluläre Calciummessungen verwendet.

Da die P2Y₂-Rezeptor-Mutante C106S nicht in der Zellmembran nachgewiesen werden konnte (s. 2.7.2), wurden auch keine Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet.

Die Mutante C278S war durch die Agonisten voll stimulierbar. Der EC₅₀-Wert war gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor (WT T3) signifikant erhöht, was auf einen Affinitätsverlust für die Nukleotide und Dinukleotide hindeutet (Abb. 2-19). Für UTP wurde der EC₅₀ von **80,4 nM** auf **2090 nM** und für ATP von **95,8 nM** auf **1000 nM** erhöht. Da bei der Untersuchung der Dinukleotide für Konzentrationen von bis zu 300 µM kein Plateau erreicht wurde, konnten keine EC₅₀-Werte bestimmt werden. Unter der Annahme, dass die Efficacy, wie bei den Nukleotiden beobachtet, gleich bleibt, wurden die EC₅₀-Werte durch Extrapolation abgeschätzt. Hierzu wurde als maximaler Effekt die Efficacy, die auch beim Wildtyp-Rezeptor erreicht wurde, verwendet und jeweils auf die Stimulation durch 100 µM Carbachol bezogen. Es ergab sich für Ap₄A ein EC₅₀-Werte von 80 µM und für Ip₄U ein EC₅₀-Wert von 560 µM.

Tab. 2-2: EC₅₀/IC₅₀-Werte am WT T3 und an der Mutante C278S. Für signifikant verschobene Dosis-Wirkungs-Kurven wurde der Faktor der Rechtsverschiebung oder Linksverschiebung berechnet. Hoch-exprimierende Mutanten wurden mit WT T4, mittelhoch-exprimierende Mutanten mit WT T3 verglichen (n = 3-4).

Substanz	WT T3		C278S		Faktor der Verschiebung ^b
	EC ₅₀ /IC ₅₀ [µM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]	EC ₅₀ /IC ₅₀ [µM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]	
UTP	0,0804 ± 0,0064	100 ± 13	2,09 ± 0,32**	86 ± 9	25
ATP	0,0958 ± 0,0145	92 ± 6	1,00 ± 0,10***	97 ± 6	10
Ap ₄ A	0,145 ± 0,023	68 ± 8	ca. 81 ^c	72 ± 7	560
Ip ₄ U	0,112 ± 0,017	60 ± 5 ^d	ca. 270 ^c	36 ± 3 ^d	2400
RB2	1,62 ± 0,27		1,05 ± 0,22		-
SW K16	21,9 ± 3,9		3,44 ± 0,61*		0,2

^a im Vergleich zu 100 µM Carbachol (100%)

^b EC₅₀/IC₅₀ Mutante geteilt durch EC₅₀/IC₅₀ Wildtyp

^c Werte durch Extrapolation abgeschätzt

^d bei 300 µM; es wurde kein Plateau erreicht

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

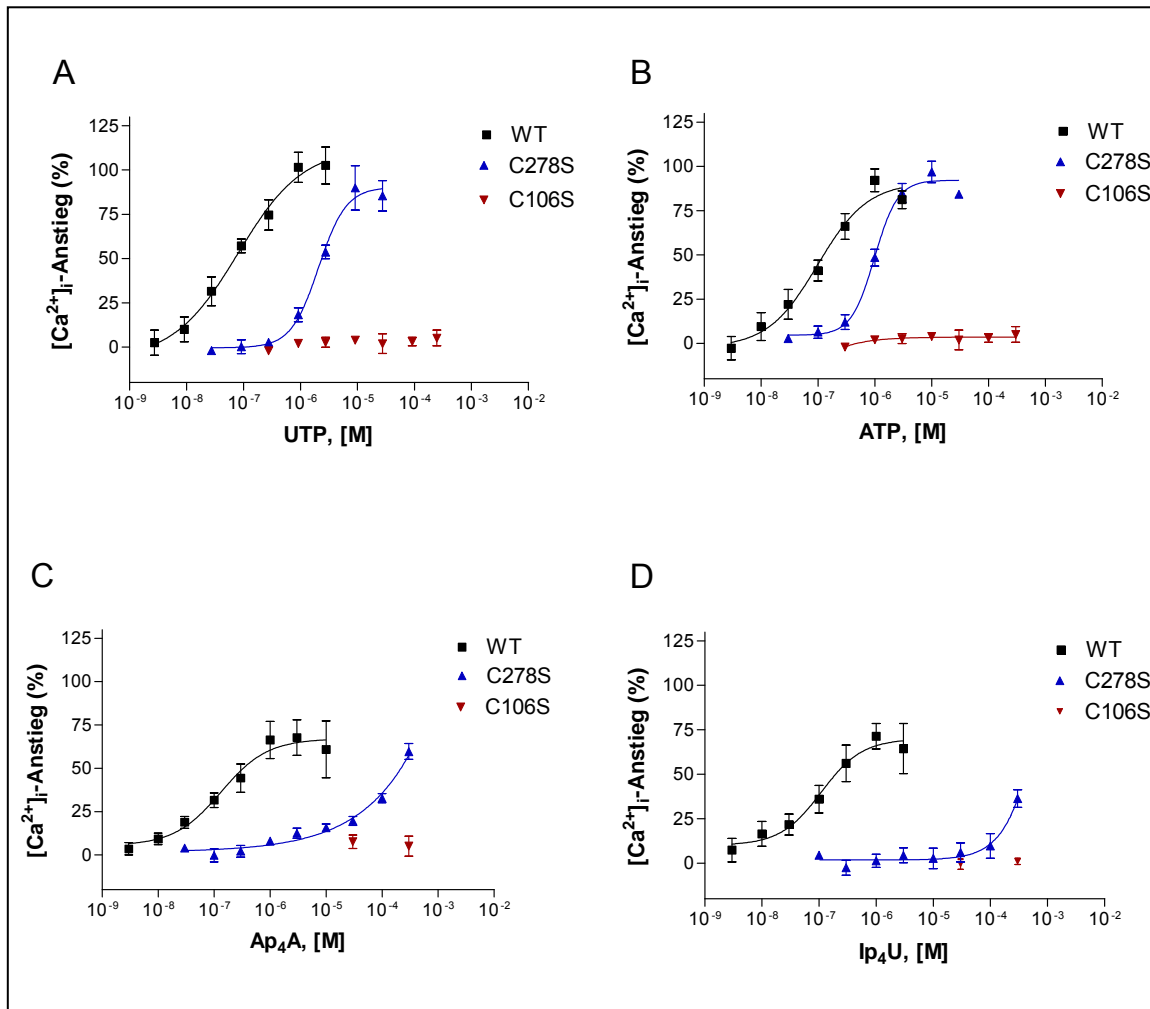


Abb. 2-19: Charakterisierung der Cystein-Mutanten C278S und C106S. 1321N1-Zellen, die mit den Mutanten C106S und C278S transfiziert waren, wurden auf ihre intrazelluläre Calciumantwort nach Injektion von Nukleotiden und Dinukleotiden untersucht. Da C106S keine Expression zeigte, wurden keine $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beobachtet. Die für die Mutante C278S detektierten Dosis-Wirkungs-Kurven waren nach rechts verschoben, wobei der Rechtsshift für UTP und Ip₄U größer war als für ATP und Ap₄A. Der Shift für die Dinukleotide war insgesamt größer als der für die Mononukleotide. **A:** Injektion von UTP (n = 3). **B:** Injektion von ATP (n = 3-4). **C:** Injektion von Ap₄A (n = 3-4). **D:** Injektion von Ip₄U (n = 3-4).

Zur Testung der Antagonisten wurden 1321N1-Astrozytomzellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimierten, mit RB2 oder SW K16 vorinkubiert. Anschließend wurden die mit Oregon Green BAPTA1/AM beladenen Zellen mit UTP stimuliert. Um vergleichbare IC₅₀-Werte zu erhalten, wurden die Zellen jeweils mit einer UTP-Konzentration angeregt, die etwa 80-90% der maximal möglichen Calciumfreisetzung hervorrief.

Bei der Testung der Antagonisten zeigte sich eine signifikante Linksverschiebung der Kurve von **SW K16** (IC₅₀ (WT T3) = 21,9 μM, IC₅₀ (C278S) = 3,44 μM; 6-fache Erniedrigung). Die **RB2**-Kurve blieb hingegen unverändert (IC₅₀ (WT T3) = 1,62 μM, IC₅₀ (C278S) = 1,05 μM). Die Ergebnisse sind zusammengefasst mit den Resultaten der Charakterisierung aller Mutanten in den Tabellen 2-3, 2-4 und 2-5 dargestellt.

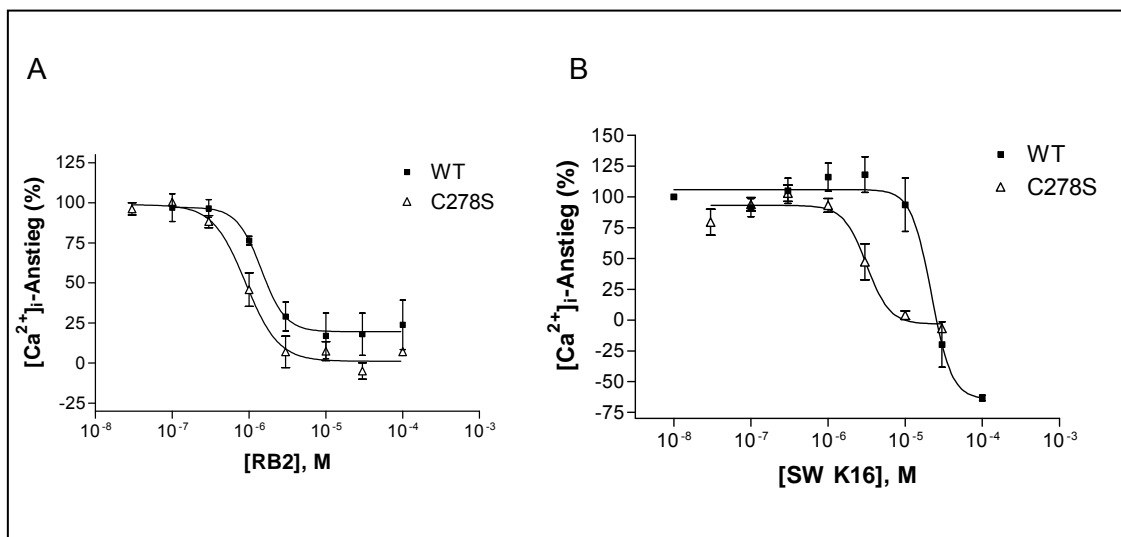


Abb. 2-19: Charakterisierung der Cystein-Mutante C278S. 1321N1-Zellen, die mit dem P2Y₂-Rezeptor (WT T3) oder der Mutante C278S transfiziert waren, wurden nach Vorinkubation mit den Antagonisten RB2 und SW K16 auf ihre Calciumantwort nach UTP-Injektion untersucht. **A:** RB2 (n = 3). **B:** SW K16 (n = 3-4). Die Dosis-Wirkungs-Kurve für SW K16 war signifikant nach links verschoben, RB2 hatte keinen signifikant unterschiedlichen IC₅₀-Wert.

2.12 Zusammenfassung und Diskussion

Disulfidbrücken sind essentiell für die Aktivierung von P2Y₂-Rezeptoren. Durch chemische Reduktion der Disulfidbrücken im Rezeptor wurde die durch UTP und ATP induzierte intrazelluläre Calciunausschüttung für ATP um 80%, für UTP um 90% gehemmt, der Rezeptor konnte also kaum mehr aktiviert werden. Der muscarinische M3-Rezeptor reagierte hingegen nur mit einer 20%igen Hemmung, was durch die Lage der Disulfidbrücken dieses GPCRs begründet sein könnte. Sie befinden sich weiter im Inneren des Proteins und sind daher vermutlich sterisch besser abgeschirmt. Durch die Mutation der Cysteine im M3-Rezeptor wurde der Transport in die Zytoplasmamembran gestört und die Aktivität von Agonisten inhibiert.¹⁷⁶

Der Einfluss der Disulfidbrücken Cys²⁵-Cys²⁷⁸ und Cys¹⁰⁶-Cys¹⁸³ sollte durch je eine mutierte Cystein-Einheit untersucht werden (C106S, C278S). Da die Mutante C106S nicht exprimiert werden konnte, wurden keine [Ca²⁺]_i-Anstiege beobachtet. Es ist anzunehmen, dass die Expression auf Grund der stark beeinflussten Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins nicht möglich war (s. Kapitel 1-10). Daher war für die mögliche Mutation C183S auch keine höhere Expressionsdichte in der Zytoplasmamembran zu erwarten. Durch die in den P2Y₂-Rezeptor eingeführte Mutation C278S kam es zur Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Nukleotiden (UTP, ATP) und Dinukleotiden (Ap₄A, Ip₄U). Der Einfluss der fehlenden Disulfidbrücke auf Dinukleotide war größer als auf Mononukleotide. Zudem konnte ein größerer Effekt auf die Pyrimidin-Nukleotide im Vergleich zu den Purin-Nukleotiden festgestellt werden. Die Efficacy war für die Mononukleotide an C278S nicht reduziert. Daher war anzunehmen, dass dies auch bei den Dinukleotiden nicht der Fall sein würde. Aufgrund dessen wurde die EC₅₀-Werte für Ap₄A und Ip₄U mit den annehmenden Maximalwerten abgeschätzt.

Die Affinität der Agonisten wurde durch das Fehlen der Disulfidbrücke reduziert, was sich in erhöhten EC₅₀-Werten zeigt. Durch die Modifikation der Bindungsstelle kam es zudem zu einer erhöhten Affinität für das Anthrachinonderivat SW K16, nicht jedoch für RB2, was darauf hindeutet, dass RB2 sich nicht vollständig in die Bindungsstelle einfügt und durch andere, eventuell in extrazellulären Bereichen liegende Interaktionen mit dem P2Y₂-Rezeptor die Bindungsstelle blockiert. Die ebenfalls größeren Dinukleotide waren hingegen stark beeinflusst. Da sie sich aber laut des von Geun-Yung Ko erstellten Modells leichter in die Bindungstasche vordringen können als RB2, sind die beiden Moleküle nur schwer vergleichbar. Das kleinere SW K16 fügt sich möglicherweise durch Aufweitung der Rezeptorstruktur auf Grund der fehlenden Disulfidbrücke besser in die Bindungstasche ein, als dies beim Wildtyp-Rezeptor der Fall ist.

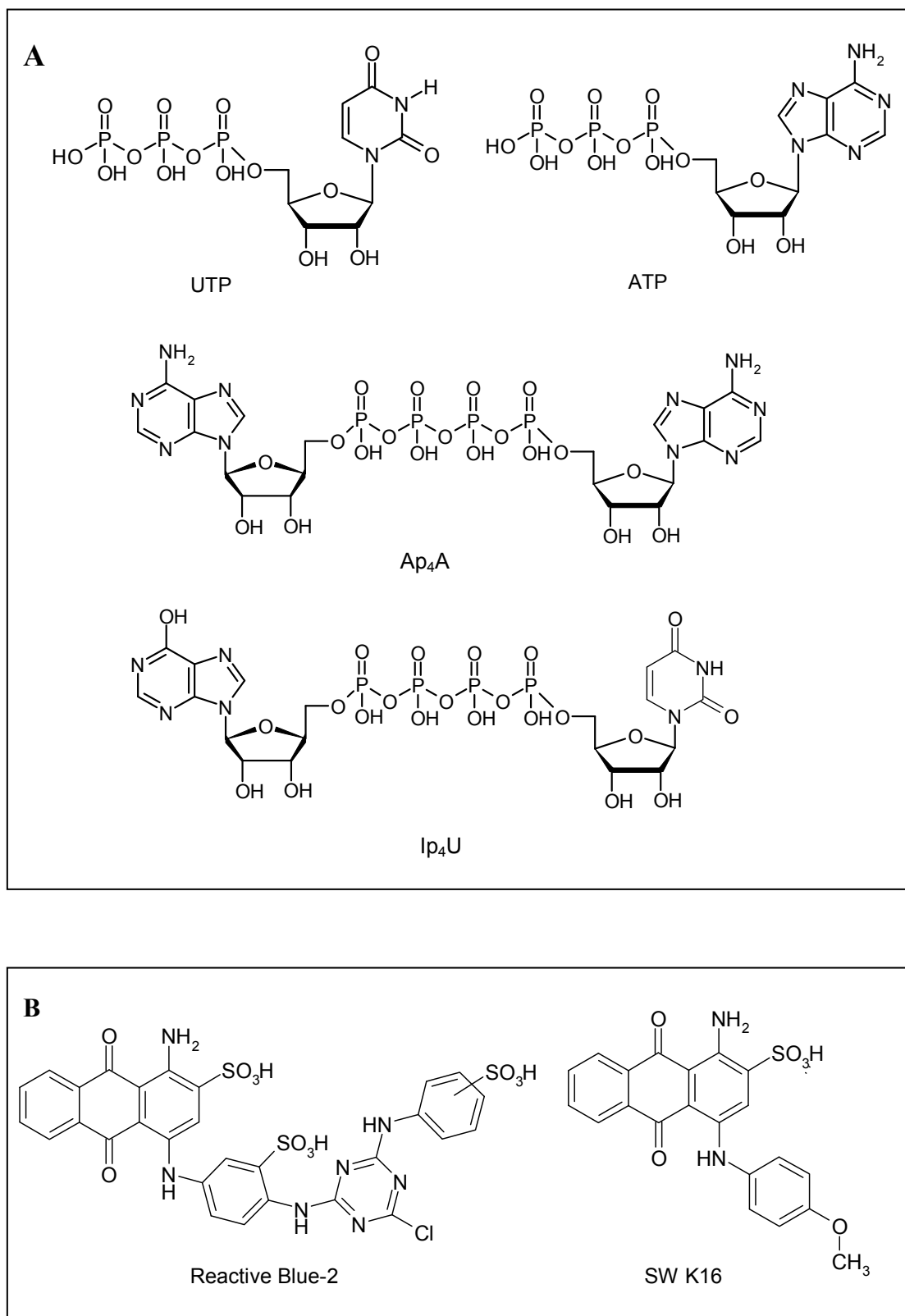


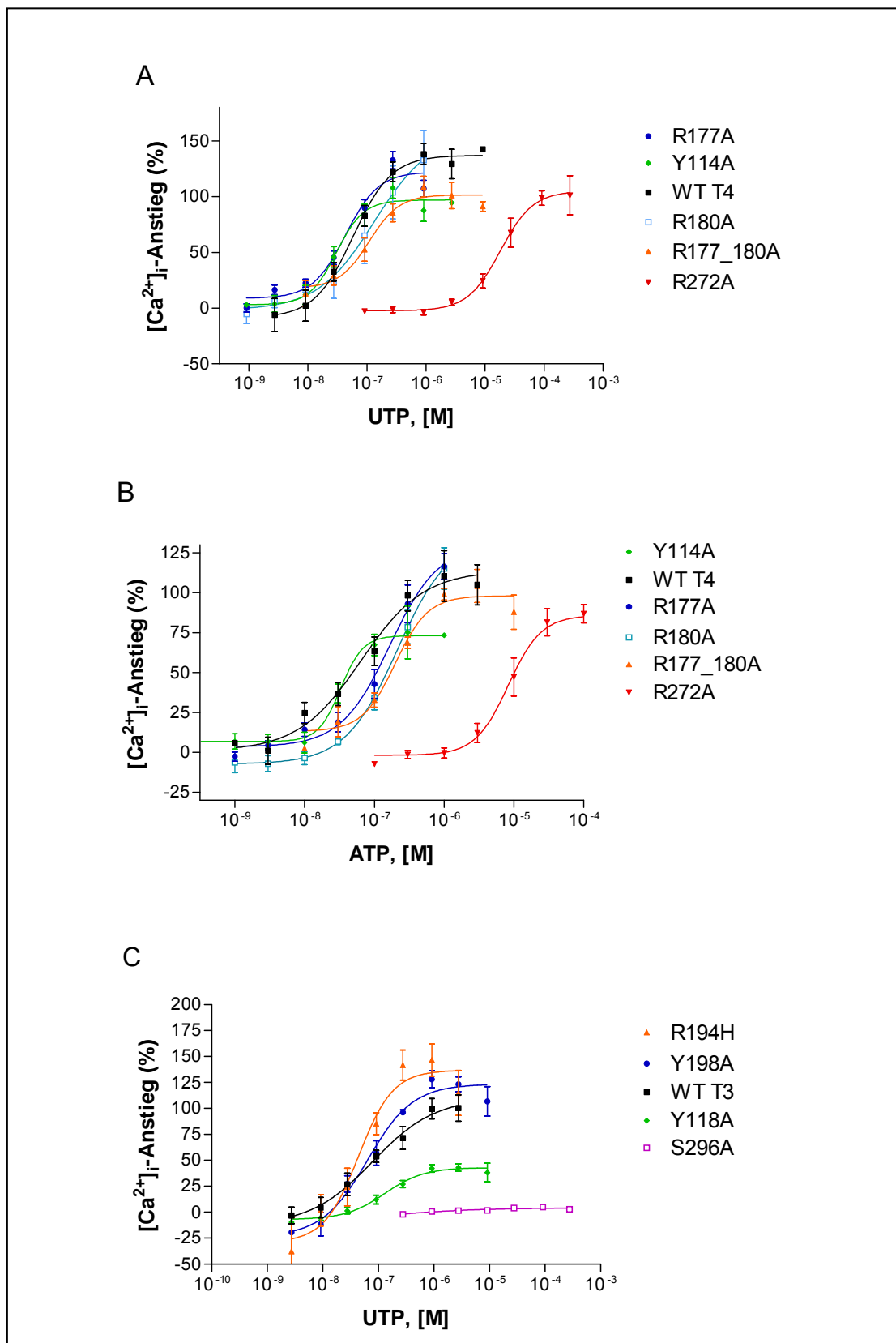
Abb. 2-20: **A:** P2Y₂-Rezeptor Agonisten. UTP, ATP, Ap₄A und Ip₄U. **B:** P2Y₂-Rezeptor Antagonisten: Reactive Blue-2 (RB2) und SW K16.

2.13 Charakterisierung der Rezeptormutanten

Zur Charakterisierung der in den P2Y₂-Rezeptor eingeführten Mutanten (s. 2-3) wurden intrazelluläre Calciummessungen verwendet. Es wurde jeweils die Aktivierung durch die Nukleotide UTP und ATP sowie die Dinukleotide Ap₄A und Ip₄U untersucht (Abb. 2-20). Messparameter war sowohl die **Affinität** der Agonisten (EC₅₀) als auch ihre **Efficacy** am Rezeptor (maximal erreichbare Calciumanstiege). Alle Werte wurden auf die Calciumsignale des endogen exprimierten muscarinischen M3-Rezeptors bezogen, der als interner, gleich bleibender Standard diente. Die so erhaltenen Werte wurden mit der Wildtyp-Zelllinie verglichen, die auf Grund ihrer Expressionsrate der jeweiligen Mutante zugeordnet werden konnte (WT T3: 52% Expression, WT T4: 100% Expression). Falls eine Stimulation des mutierten Rezeptors möglich war, wurde zusätzlich das Verhalten der Antagonisten RB2 und SW K16 getestet. Hierzu wurden die mutierten Rezeptoren jeweils mit einer UTP-Konzentration angeregt, die 80-90% des maximal möglichen Anstiegs bewirkte.

2.13.1 Aktivität der Mononukleotide UTP und ATP

Unter den **hoch exprimierten** Mutanten Y114A, R177A_R180A, R177A, R180A und R272A zeigte **Y114A** nur eine schwache Auswirkung auf die Aktivierung mit ATP. Der EC₅₀-Wert war etwas geringer als am Wildtyp-Rezeptor (**WT T4**). Das Verhalten von UTP war an dieser Mutante nicht verändert. Die Doppelmutante im EL2, **R177A_R180A**, führte zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für UTP und ATP, wobei der Effekt nur für ATP signifikant war. Daher wurden auch die Einzelmutanten R177A und R180A untersucht. Während **R177A** keine Auswirkungen auf die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors durch UTP hatte, war der EC₅₀-Wert für ATP leicht erhöht. **R180A** verhielt sich so wie die Doppelmutante, und hat daher in dieser den größeren Einfluss. Auffällig war die starke Reduktion sowohl der Affinität als auch der Efficacy durch die Mutation **R272A** im EL3. Der EC₅₀-Wert war für UTP 350mal höher, für ATP 185mal höher als der am Wildtyp bestimmte Wert. Die Verschiebung der Kurve gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor ist für alle getesteten Substanzen in Tabelle 2-5 dargestellt.



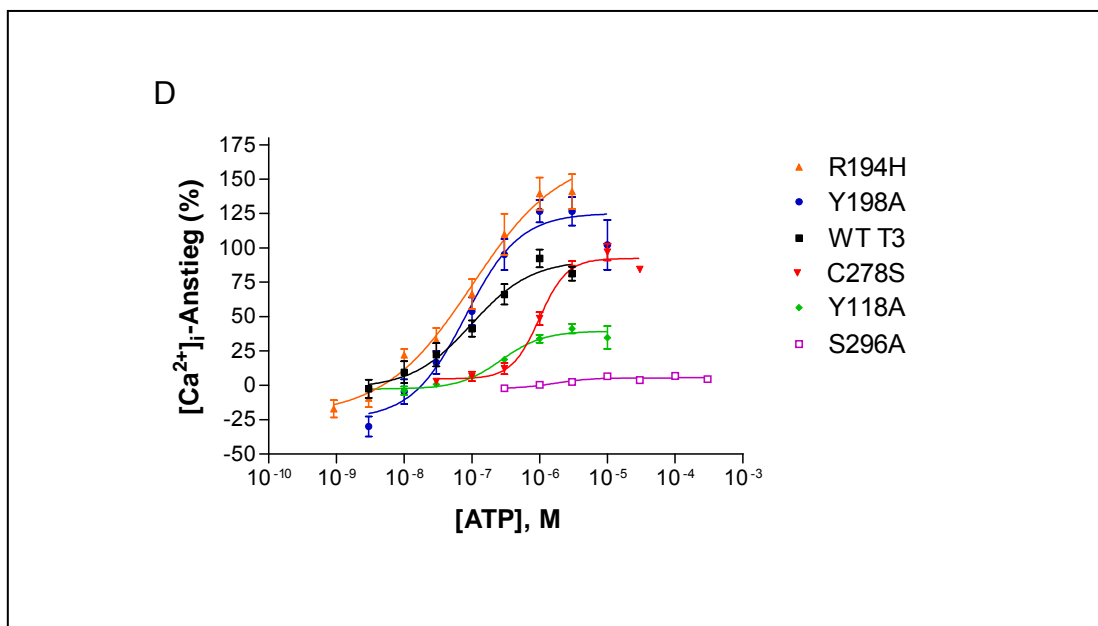


Abb. 2-21: Dosis-Wirkungs-Kurven der Nukleotide UTP und ATP am humanen P2Y₂-Rezeptor und seinen Mutanten. 1321N1-Astrozytomzellen, die die Rezeptoren rekombinant exprimierten, wurden auf ihre intrazelluläre Calciumausschüttung nach Injektion verschiedener Konzentrationen von UTP und ATP getestet. **A:** Injektion verschiedener Konzentrationen von UTP zu hoch exprimierenden Zelllinien; **B:** Injektion verschiedener Konzentrationen von ATP zu hoch exprimierenden Zelllinien; **C:** Injektion verschiedener Konzentrationen von UTP zu Zelllinien mit mittleren Expressionsraten; **D:** Injektion verschiedener Konzentrationen von ATP zu Zelllinien mit mittleren Expressionsraten (n = 3-6).

Die Mutanten mit einer **mittleren Expression**, Y118A, R194H, Y198A, C278S und S296A wurden in Relation zu der Wildtyp-Zelllinie **WT T3** betrachtet. Besonders auffällig war das Verhalten der Mutante **S296A** in der transmembranären Helix 7 (TM7). Die Aminosäure Ser²⁹⁶ ist essentiell für die Aktivierung des humanen P2Y₂-Rezeptors, und eine Mutation an dieser Stelle führte zum völligen Aktivitätsverlust. Die Mutation der Aminosäure **Tyr¹¹⁸** in der TM3 zu Ala führte zu einem geringen Affinitätsverlust für ATP und, für beide Nukleotide, zu einer extremen Reduktion der Efficacy um bis zu 60%. Die Mutante **R194H** hingegen steigerte den maximalen Effekt signifikant von 100% auf etwa 130%. **Y198A** hatte keinen Einfluss auf die Rezeptorfunktionalität. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-3 und Abb. 2-21 zusammengefasst.

Tab. 2-3: Charakterisierung der Agonisten UTP und ATP am humanen P2Y₂-Rezeptor und seinen Mutanten mittels intrazellulärer Calciummessung. Alle Einzelwerte wurden auf den durch 100 µM Carbachol induzierten, M3-Rezeptor vermittelten intrazellulären Calciumanstieg bezogen. Je nach Expressionsrate wurden die Werte mit denen des Wildtyprezeptors in einer hohen (WT T4) oder in einer mittleren Expression (WT T3) verglichen (n = 3-6).

Mutante	UTP		ATP	
	EC ₅₀ [nM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]	EC ₅₀ [nM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]
WT T4	59,0 ± 4,6	138 ± 10	63,1 ± 8,2	110 ± 15
Y114A	37,2 ± 9,0	107 ± 9	30,1 ± 4,8 *	87 ± 14
R177A_R180A	123 ± 40	109 ± 9	239 ± 28 ***	104 ± 10
R177A	50,1 ± 17,7	133 ± 8	183 ± 46 *	117 ± 8
R180A	138 ± 21 *	130 ± 24	237 ± 47 **	115 ± 13
R272A	20.600 ± 5000 *	99 ± 6 *	11.700 ± 4400 *	87 ± 6 *
WT T3	80,4 ± 6,4	100 ± 13	95,8 ± 14,5	92,2 ± 6,4
Y118A	157 ± 49	43 ± 4 **	299 ± 49 **	41 ± 4 **
R194H	121 ± 54	127 ± 33 *	111 ± 85	130 ± 11 *
Y198A	108 ± 38	128 ± 8	120 ± 32	126 ± 8 *
C278S	2090 ± 320 **	86 ± 9	1000 ± 10 ***	97 ± 6
S296A	>>300000	3 ± 1 ***	>> 300000	5 ± 2 ***

^a im Vergleich zu 100 µM Carbachol (100%)

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

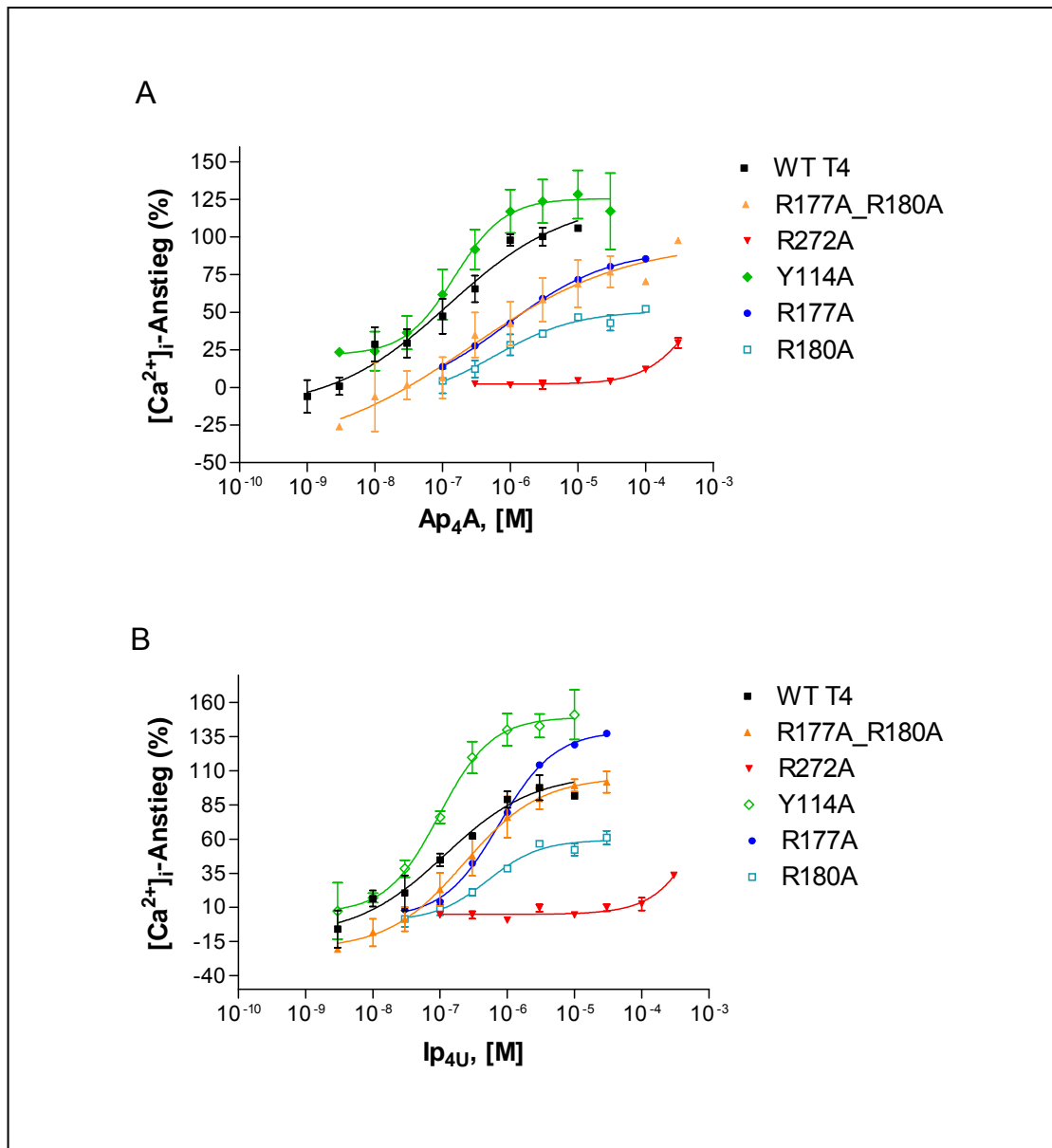
2.13.2 Aktivität der Dinukleotide Ap₄A und Ip₄U

Das Verhalten der Agonisten mit Dinukleotidstruktur wurde an den P2Y₂-Rezeptor Mutanten mittels [Ca²⁺]_i-Messungen untersucht. Ap₄A und Ip₄U zeigten agonistische Aktivität am P2Y₂-Rezeptor. Mit EC₅₀-Werten von 167 nM für Ap₄A und 179 nM für Ip₄U war die Affinität der Dinukleotide geringer als die der Mononukleotide. Zudem wurde im Vergleich zu UTP und ATP ein geringerer maximaler Effekt beobachtet. In Relation zum M3-Rezeptor wurde eine Efficacy von etwa 100% (WT T4) bzw. 70% (WT T3) ermittelt, was darauf hindeutet, dass es sich um partielle Agonisten handelt (Tab. 2-4).

Die Effekte der Mutanten auf die Dinukleotide ähnelten denen, die für UTP und ATP beobachtet wurden (Tab. 2-3). Unter den hoch exprimierten Mutanten zeigte Y114A kaum Auswirkungen auf die Aktivität der Testsubstanzen. Die Mutante **R272A** bewirkte gegenüber dem Wildtyp eine starke Rechtsverschiebung (3500-fach bzw.

4400-fach) der Dosis-Wirkungs-Kurven für Ap₄A und Ip₄U. Der Effekt war stärker als der für ATP und UTP detektierte Rechtsshift. Ein EC₅₀-Wert konnte nicht bestimmt werden, da bis zu einer Konzentration von 300 μM kein Plateau in der Calciumfreisetzung erreicht wurde. Es wurde unter der Annahme, dass die Kurven ein ähnliches Plateau erreichen würden, wie dies beim Wildtyp der Fall ist, ein Wert abgeschätzt. Die Doppelmutante **R177A_R180A** verhielt sich analog zu der durch ATP und UTP beobachteten Calciumfreisetzung, und es war ein höherer Aktivitätsverlust für das Purin-Analoge Ap₄A als für Ip₄U zu beobachten. Bei beiden Dinukleotiden erhöhte sich der EC₅₀-Werte leicht aber nicht signifikant um das 3- bzw. 4-fache für Ap₄A bzw. Ip₄U. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen für die Einzelmutanten R177A und R180A wieder. Die EC₅₀-Werte stiegen für Ap₄A von 167 auf 879 nM, für Ip₄U von 179 auf 754 nM.

Die Mutante **Y118A** (TM3) war durch die Dinukleotide kaum aktivierbar. Wie auch für ATP erhöhte sich der EC₅₀-Wert für Ap₄A von 145 nM auf 345 nM, während Ip₄U in seiner Affinität kaum beeinflusst war. Der maximale Effekt war für beide Substanzen bis zu 5-fach gesenkt. Durch die Mutation **S296A** wurde der P2Y₂-Rezeptor völlig inaktiviert. Während die Mutation der Aminosäure Tyr¹⁹⁸ lediglich eine sehr schwache Erhöhung der Efficacy zur Folge hatte, erhöhte sich diese durch die Mutation **R194H** für Ap₄A um das zweifache. Der Einfluss auf Ip₄U war nicht statistisch signifikant aber dennoch deutlich erkennbar.



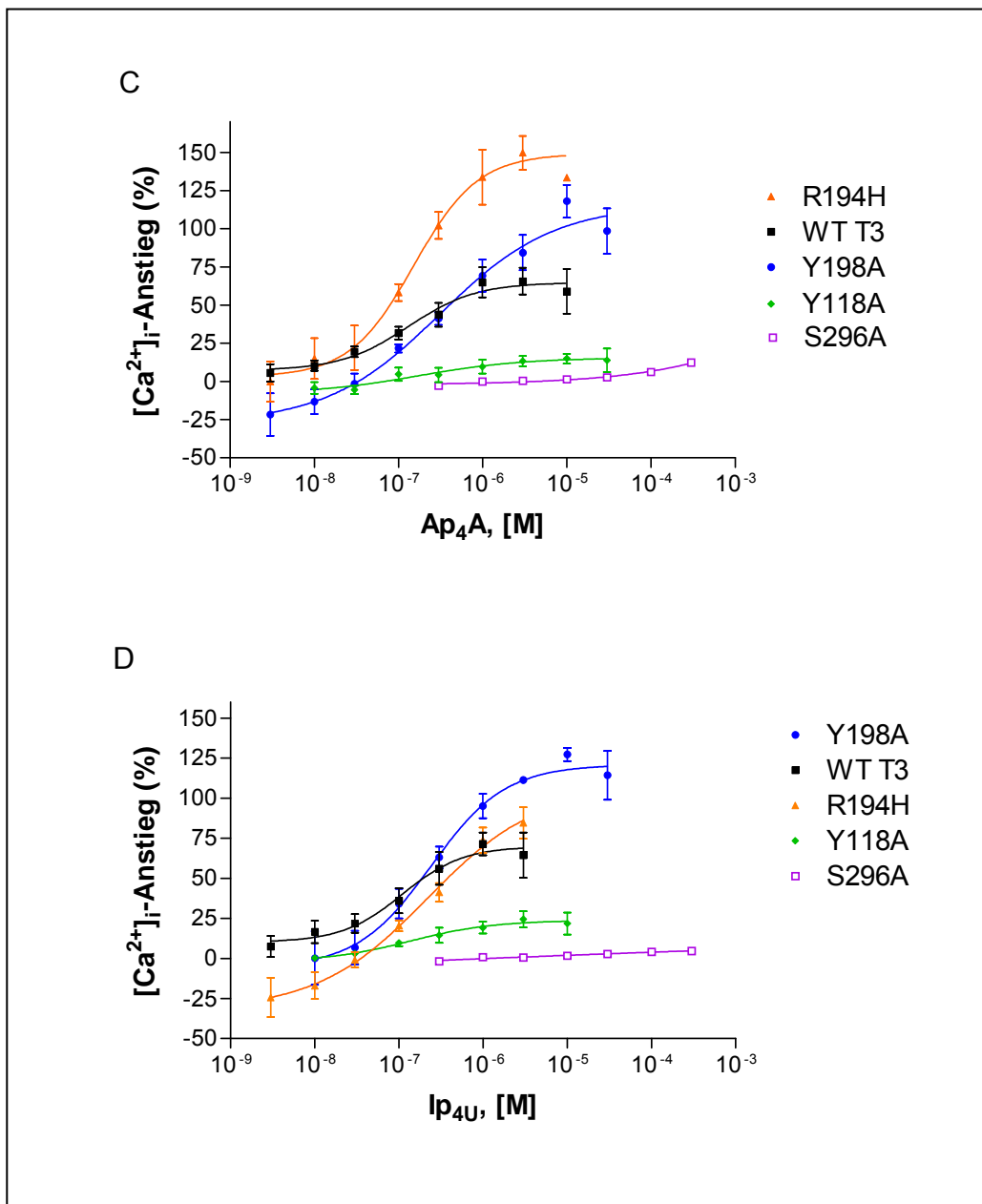


Abb. 2-22: Dosis-Wirkungs-Kurven der Dinukleotide Ap₄A und Ip₄U am humanen P2Y₂-Rezeptor und seinen Mutanten. 1321N1-Astrozytomzellen, die die Rezeptoren rekombinant exprimierten, wurden auf ihre intrazelluläre Calciumausschüttung nach Injektion verschiedener Konzentrationen von Ap₄A und Ip₄U getestet. **A:** Injektion verschiedener Konzentrationen von Ap₄A zu hoch exprimierenden Zelllinien; **B:** Injektion verschiedener Konzentrationen von Ip₄U zu hoch exprimierenden Zelllinien; **C:** Injektion verschiedener Konzentrationen von Ap₄A zu Zelllinien mit mittleren Expressionsraten; **D:** Injektion verschiedener Konzentrationen von Ip₄U zu Zelllinien mit mittleren Expressionsraten (n = 3-6).

Tab. 2-4: Charakterisierung der Agonisten Ap₄A und Ip₄U am humanen P2Y₂-Rezeptor und seinen Mutanten mittels intrazellulärer Calciummessung. Alle Einzelwerte wurden auf den durch 100 µM Carbachol induzierten, M3-Rezeptor vermittelten intrazellulären Calciumanstieg bezogen. Je nach Expressionsrate wurden die Werte mit denen des Wildtyprezeptors in einer hohen (WT T4) oder in einer mittleren Expression (WT T3) verglichen (n = 3-6).

Mutante	Ap ₄ A		Ip ₄ U	
	EC ₅₀ [nM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]	EC ₅₀ [nM ± SEM]	Efficacy ^a [% ± SEM]
WT T4	167 ± 60	100 ± 6	179 ± 55	98 ± 9
Y114A	170 ± 42	128 ± 16	94,5 ± 6,5	142 ± 8 *
R177A_R180A	665 ± 420	98 ± 5	398 ± 213	101 ± 7
R177A	879 ^b	86 ^b	754 ^b	137 ^b
R180A	710 ± 169 ^c	52 ± 1 ^c	538 ± 97 ^c	61 ± 5 ^c
R272A	ca. 740.000^d	30 ± 3 ^d	ca. 620.000^d	33 ± 1 ^d
WT T3	145 ± 23	68 ± 8	112 ± 17	72 ± 7
Y118A	345 ± 44 **	15 ± 3 **	145 ± 47	25 ± 5 **
R194H	185 ± 9	149 ± 11 **	216 ± 56	85 ± 10
Y198A	335 ± 216	117 ± 11 *	231 ± 45	127 ± 4 *
C278S	ca. 81.000^c	60 ± 5 ^c	ca. 270.000^c	36 ± 3 ^c
S296A	>> 300.000	12 ± 1 ***	>> 300.000	5 ± 2 ***

^a im Vergleich zu 100 µM Carbachol (100%)

^b n = 1

^c n = 2

^d Werte durch Extrapolation abgeschätzt

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

2.13.3 Aktivität der Antagonisten Reactive Blue-2 und SW K16

Die beiden am humanen P2Y₂-Rezeptor getesteten Antagonisten RB2 und SW K16 (Abb. 2-20) konnten die UTP-induzierten intrazellulären Calciumanstiege konzentrationsabhängig inhibieren. Alle Kurven wurden erstellt, indem unterschiedliche Konzentrationen der Antagonisten mit den Zellen vorinkubiert wurden. UTP wurde in einer Konzentration injiziert, die 80-90% des maximal möglichen Effekts auslöste. Die so erhaltenen Kurven waren vergleichbar.

Für RB2 wurde ein IC₅₀-Wert von 1,62 µM (WT T3) bzw. 1,85 µM (WT T4) bestimmt. Diese Werte stimmen gut mit Literaturwerten überein.¹⁴⁷ SW K16 zeigte IC₅₀-Werte von 21,9 (WT T3) bzw. 21,7 (WT T4) µM. Alle IC₅₀-Werte sind in Tab. 2-4 zusammengefasst. Die negativen Werte der prozentualen Calciumanstiege bei hohen Antagonistkonzentrationen sind darauf zurück zu führen, dass auch die Erhöhung der [Ca²⁺]_i inhibiert wird, die lediglich durch Injektion von Puffer und die damit verbundene Ausschüttung von ATP durch die Zellen ausgelöst wird.

Die Bindung von **Reactive Blue-2** wurde durch die Mutation Y114A völlig verhindert (Abb. 2-23). Die Mutation basischer Aminosäuren im EL2 beeinflusste den IC₅₀-Wert nur bei Einführung der Doppelmutante **R177A_R180A** in den P2Y₂-Rezeptor. Dies scheint ein synergistischer Effekt zu sein. Der IC₅₀-Wert wurde auf 18,6 µM erhöht. Die Einzelmutanten R177A und R180A veränderten den IC₅₀-Wert nicht. Dennoch hatten diese Mutationen Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von RB2, die sich darin bemerkbar machten, dass der agonistische Effekt von UTP **nicht vollständig inhibiert** werden konnte. Die Kurven erreichten eine Sättigung bei etwa 50% des Maximaleffekts. Die Mutation der Aminosäure Tyr¹⁹⁸ zu Ala führte zu einer Steigerung des IC₅₀-Werts um das 6-fache. Alle weiteren in den P2Y₂-Rezeptor eingeführten Mutationen hatten keine Auswirkungen auf das antagonistische Verhalten von RB2. Für die Mutanten R272A und S296A konnten auf Grund ihrer schlechten Aktivierbarkeit keine Dosis-Wirkungs-Kurven für die Antagonisten aufgenommen werden.

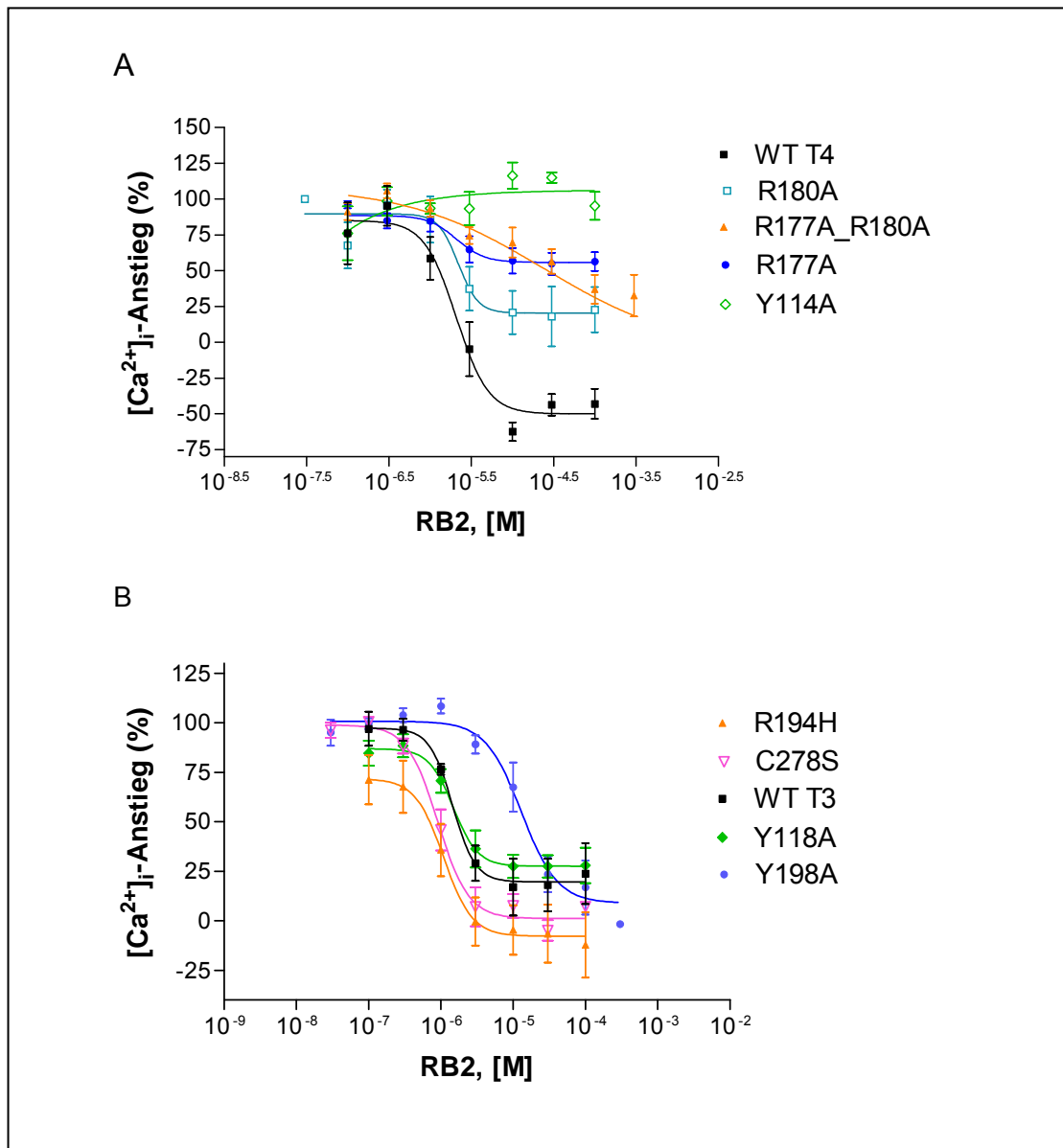


Abb. 2-23: Antagonismustestung für Reactive Blue-2 (RB2) am humanen P2Y₂-Rezeptor mittels intrazellulärer Calciummessungen. **A:** Hoch exprimierte Mutanten. IC₅₀-Werte waren für R177A und R180A nicht signifikant verschieden, aber eine 100%ige Hemmung war nicht möglich. Die Kurve für R177A_R180A war signifikant nach rechts verschoben. An der Y114A-Mutante zeigte RB2 keine Inhibition. **B:** Mittelhoch exprimierte Mutanten. Die Kurve für Y198A war signifikant nach rechts verschoben (n = 3-6).

Die in den P2Y₂-Rezeptor eingeführten Einzelmutationen hatten keine Auswirkungen auf den IC₅₀-Wert des Anthrachinonderivats **SW K16** (Abb. 2-24). Dies deutet darauf hin, dass SW K16 in der Bindungsstelle nicht mit denselben Interaktionspartnern Wechselwirkungen eingeht, wie das bei den Agonisten der Fall ist. Die Steigerung des IC₅₀-Werts von SW K16 durch die Zerstörung der Disulfidbrücke zwischen Cys²⁵ und Cys²⁷⁸ wird unter 2.12 diskutiert.

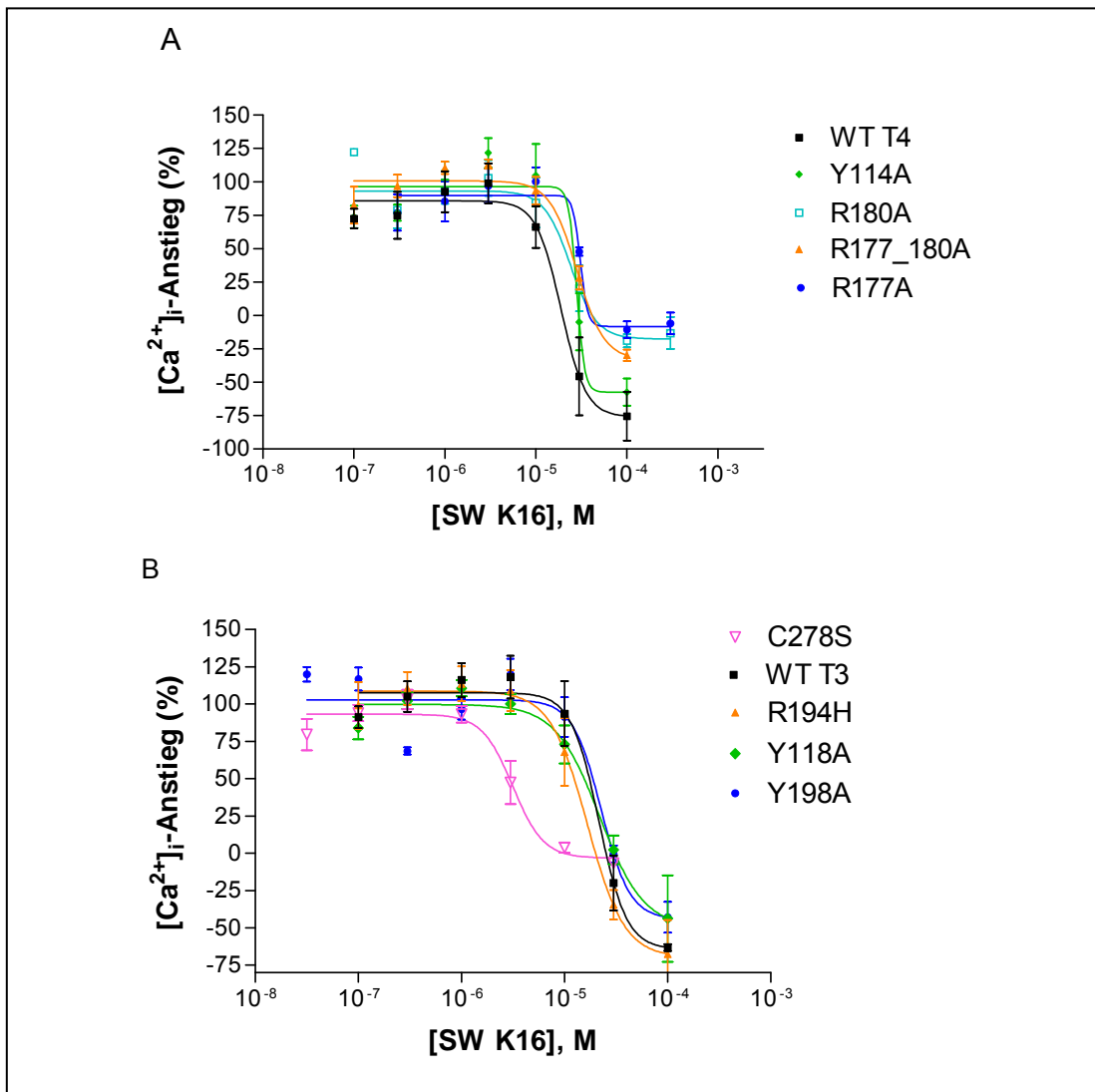


Abb. 2-24: Antagonismustestung am humanen P2Y₂-Rezeptor mittels intrazellulärer Calciummessungen. SW K16 konnte die UTP-induzierten Calciumanstiege an allen Mutanten inhibieren. **A:** Hoch exprimierte Mutanten. IC₅₀-Werte waren nicht signifikant verschieden (n = 3-6). **B:** Mittelhoch exprimierte Mutanten. Die Kurve für C278S war signifikant nach links verschoben (n = 3-6).

Tab. 2-5: Charakterisierung der Antagonisten Reactive Blue-2 und SW K16 am humanen P2Y₂-Rezeptor und seinen Mutanten mittels intrazellulärer Calciummessung. Alle Einzelwerte wurden auf den durch UTP vermittelten intrazellulären Calciumanstieg bezogen, der durch eine UTP-Konzentration erhalten wurde, die 80-90% des maximalen Effekts auslöste. Je nach Expressionsrate wurden die Werte mit denen des Wildtyprezeptors in einer hohen (WT T4) oder in einer mittleren Expression (WT T3) verglichen (n = 3-6).

Mutante	RB2	SW K16
	IC ₅₀ [µM ± SEM]	IC ₅₀ [µM ± SEM]
WT T4	1,85 ± 0,39	21,7 ± 5,2
Y114A	>> 100	24,6 ± 3,9
R177A_R180A	18,6 ± 6,2 * ^a	26,5 ± 3,3
R177A	3,36 ± 1,24 ^a	30,8 ± 0,7
R180A	2,1 ± 0,34 ^a	23,4 ± 3,5
R272A	n.d. ^b	n.d. ^b
WT T3	1,62 ± 0,27	21,9 ± 3,9
Y118A	1,57 ± 0,29	22,4 ± 6,3
R194H	1,00 ± 0,23	17,6 ± 3,7
Y198A	9,30 ± 2,28 *	21,1 ± 2,9
C278S	1,05 ± 0,22	3,44 ± 0,61 *
S296A	n.d. ^b	n.d. ^b

^a Die Fluoreszenzwerte gingen nicht auf 0% zurück.

^b nicht untersucht

* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

Tab. 2-6: Verschiebung der EC₅₀- und IC₅₀-Werte gegenüber dem Wildtyp-P2Y₂-Rezeptor. Für signifikant verschobene Dosis-Wirkungs-Kurven wurde der Faktor der Rechtsverschiebung oder Linksverschiebung berechnet. Hoch-exprimierende Mutanten wurden mit WT T4, mittelhoch-exprimierende Mutanten mit WT T3 verglichen.

Mutante	UTP Verschiebung [-fach]	ATP Verschiebung [-fach]	Ap₄A Verschiebung [-fach]	Ip₄U Verschiebung [-fach]	RB2 Verschiebung [-fach]	SWK16 Verschiebung [-fach]
Y114A	-	0,5	-	-	> 55	-
R177A_	-	4	-	-	10	-
R180A	-	3	5 ^c	4 ^c	-	-
R177A	2	4	4 ^d	3 ^d	-	-
R180A	350	185	4400 ^a	3500 ^b	n.d. ^b	n.d. ^b
Y118A	-	3	2	-	-	-
R194H	-	-	-	-	-	-
Y198A	-	-	-	-	6	-
S296A	n.d. ^b	n.d.	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b	n.d. ^b

^a Werte durch Extrapolation abgeschätzt

^b nicht bestimmbar, da kein EC₅₀-/IC₅₀-Wert messbar war

^c n = 1

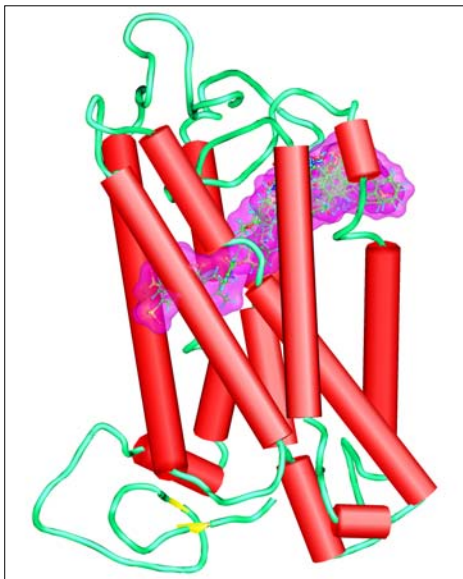
^d n = 2

2.14 Rezeptor-Modell in Homologie zum Rinder-Rhodopsin

Ein Modell des humanen P2Y₂-Rezeptors wurde von Geun-Yung Ko, Arbeitskreis Prof. Dr. Höltje, Universität Düsseldorf, erstellt. Basierend auf Vorschlägen aus einem ersten Modell wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Rezeptormutanten entwickelt (Abb. 2-10 und 2-24). Die Ergebnisse der Mutagenesestudien und der Substanztestungen, die im Arbeitskreis Prof. Dr. Müller durchgeführt wurden, dienen und dienen zur Optimierung des P2Y₂-Modells.

Rinder-Rhodopsin ist der einzige bisher kristallisierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor. Computergenerierte Modelle werden standardmäßig in Homologie zu der Struktur des Rhodopsins hergestellt.^{177,178}

A



B

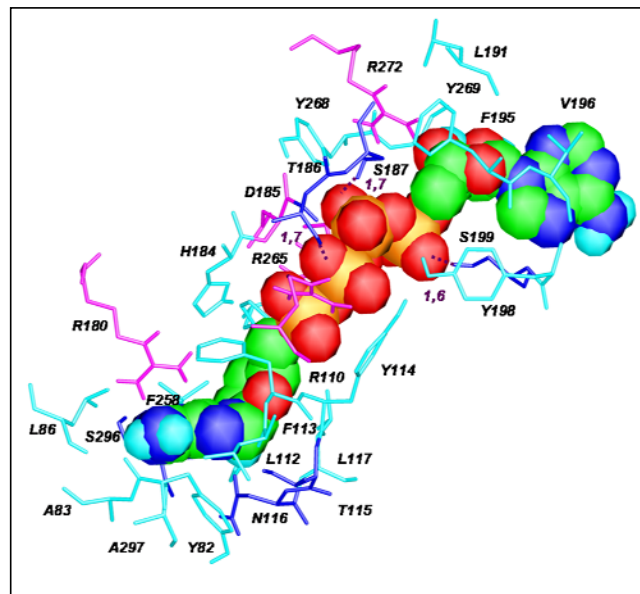


Abb. 2-24: Modell des humanen P2Y₂-Rezeptors. **A:** Docking der Antagonisten mit Anthrachinon-Grundgerüst. **B:** Bindungstasche von Ap₄A.

2.15 Zusammenfassung und Diskussion

Der humane P2Y₂-Rezeptor ist eine viel versprechende Arzneistoffzielstruktur für diverse Krankheitsbilder wie Mukoviszidose, Atherosklerose und neurodegenerative Erkrankungen.^{107,116,121,133,179} Bisher sind nur wenige, zumeist nicht selektive und wenig potente Liganden für den Rezeptor bekannt, deren metabolische Stabilität oft gering ist. Um seine Funktionen im Körper besser zu charakterisieren und potentielle Arzneistoffe zu entwickeln, sind neue, potente und selektive Agonisten und Antagonisten nötig.

In dieser Arbeit wurden **zielgerichtet Mutationen** in den humanen P2Y₂-Rezeptor eingeführt. Durch ihre Charakterisierung mittels P2Y₂-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten können die an der Bindung und Rezeptor-Aktivierung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden, und es ergibt sich ein genaues Bild der Bindungstasche.

Drei geladene Aminosäuren (His²⁶², Arg²⁶⁵ und Arg²⁹²) in den äußeren Teilen der transmembranären Bereiche des humanen P2Y₂-Rezeptors waren bereits bekannt und sind an der Rezeptoraktivierung beteiligt. Sie interagieren mit den Phosphatresten der Nukleotide.¹⁴⁸ Es konnten weitere Mutationen in die TM3, TM5 und TM7 eingeführt werden: Y114A, Y118A, Y198A und S296A. In den extrazellulären Loops 2 und 3 wurden basische Aminosäuren zielgerichtet mutiert: R177A, R180A, R177A_R180A, R194H und R272A. Die Mutanten wurden auf Grund eines Alignments mit anderen P2Y-Rezeptor-Subtypen und eines von Geun-Yung Ko (Universität Düsseldorf) erstellten, computergenerierten Modells des Rezeptors ausgewählt. Zusätzlich wurden zwei Mutationen erzeugt, bei denen Cysteine aus Disulfidbrücken des P2Y₂-Rezeptors durch Serine ersetzt sind (C106S und C278S).

Der Wildtyp-Rezeptor und einige Mutanten wurden mittels Lipofektion eines Konstrukts im Vektor pcDNA3.1 in 1321N1-Astrozytomzellen transfiziert und mit G418 wurden stabile Zelllinien selektiert. Es stellte sich heraus, dass die Transfektion mit einem Standardvektor keine geeignete Methode zur stabilen Expression in 1321N1-Astrozytomzellen ist, da schon nach wenigen Passagen keine Aktivierbarkeit der Rezeptoren durch die Nukleotide UTP und ATP mehr nachweisbar war. Das **retrovirale Transfektionssystem** unter der Verwendung des Vektors pLXSN und der Verpackungszelllinie GP+envAM12 wurde für die stabile Transfektion von 1321N1-Astrozytomzellen etabliert. Die auf diesem Weg infizierten Zellen tragen den P2Y₂-Rezeptor, der N-terminal mit einem HA-Tag versehen ist, stabil für etwa 45 Passagen. In höheren Passagen geht die Expressionsrate langsam zurück.

Ein Zelloberflächen-ELISA konnte so optimiert werden, dass die **Expressionsraten** der auf 1321N1-Zellen exprimierten Rezeptoren erfasst werden können. Da die Expressionsraten der einzelnen Mutanten nicht vergleichbar waren, wurden sie in zwei Gruppen mit ähnlicher Expression aufgeteilt und jeweils einer entsprechenden Wildtyp-Zelllinie zugeordnet: WT T4 100% Expression, WT T3 52% Expression. Zur ersten

Gruppe gehören die Mutanten Y114A, R177A, R180A, R177A_R180A und R272A, zur mittelhoch exprimierten Gruppe die Mutanten Y118A, R194H, Y198A, C278S und S296A. Die Mutante C106S konnte nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Durch die fehlende Disulfidbrücke ist die Rezeptorstruktur möglicherweise zu instabil, um eine geeignete Faltung für den Transport in die Cytoplasmamembran zu erreichen.

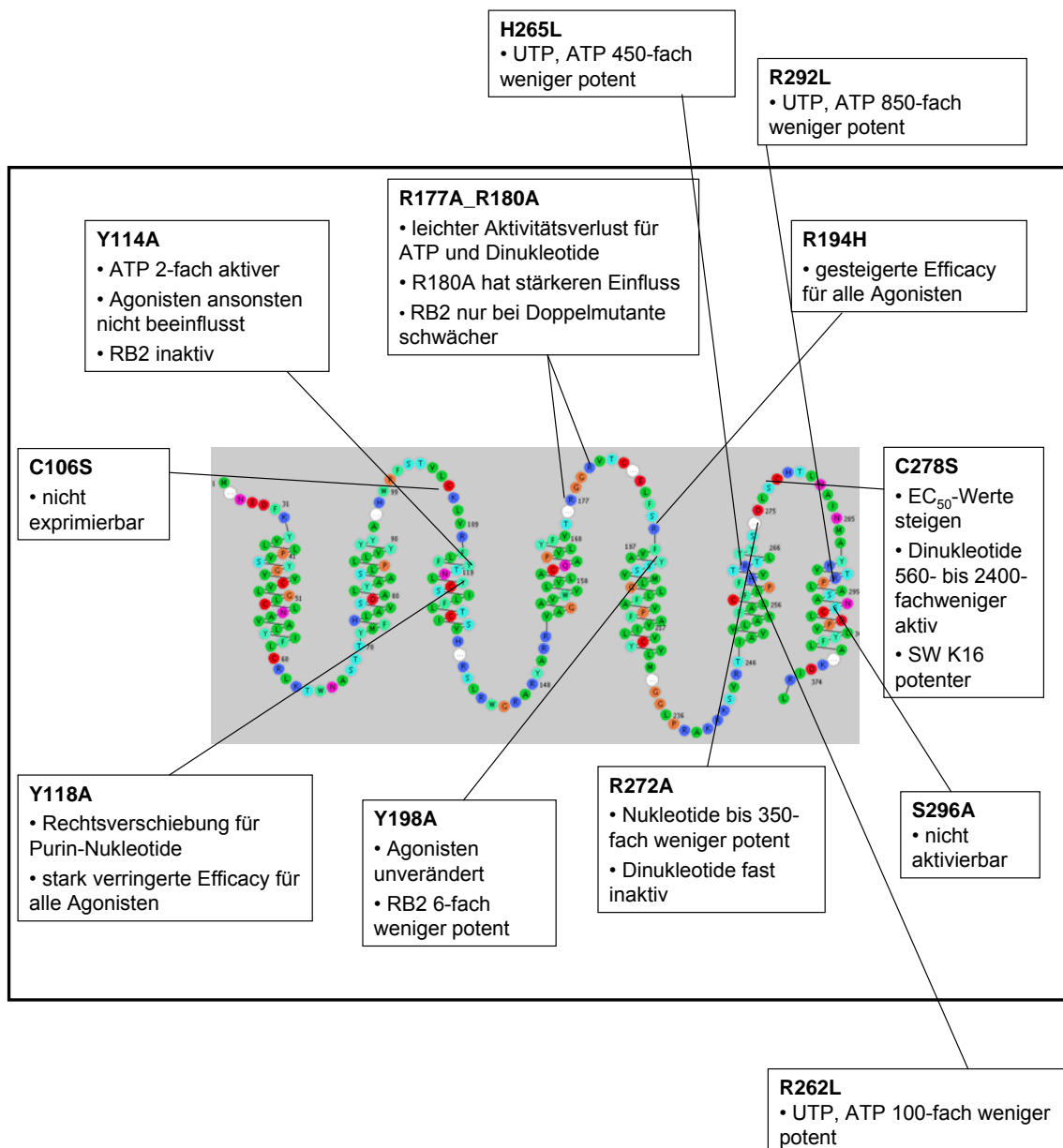


Abb. 2-25: Snake-like-plot des humanen P2Y₂-Rezeptors. Die eingeführten Mutationen sind gekennzeichnet und ihre Effekte werden beschrieben. Außerhalb des Rahmens sind bereits bekannte Daten dargestellt.¹⁴⁸

Disulfidbrücken, C278S, C106S

Durch chemische Reduktion konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken essentiell für die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors ist. Die Aktivierbarkeit durch die Nukleotide UTP und ATP nahm um etwa 80% (UTP) bzw. 90% (ATP) ab, während der muscarinische M3-Rezeptor unter den selben Bedingungen nur eine 20%ige Reduktion der Aktivierbarkeit durch seinen Agonisten Carbachol erfuhr. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem vom Arbeitskreis Höltje generierten Modell des Rezeptors, in dem sich 2 Disulfidbrücken zwischen Cys²⁵ und Cys²⁷⁸ und zwischen Cys¹⁰⁶ und Cys¹⁸³ in den äußeren Bereichen des Proteins befinden. Diese Disulfidbrücken finden sich auch im von Ivanov *et al.* publizierten Modell des P2Y₂-Rezeptors wieder.¹⁴³ Die Disulfidbrücken des M3-Rezeptors waren weniger von der Reduktion betroffen, da sie sich weiter im Inneren des Proteins befinden und daher schlechter zugänglich sind. Eine Hemmung des Bindeverhaltens an diesem Rezeptor durch DTT-Inkubation wurde bereits zuvor gezeigt war ähnlich moderat.¹⁷⁵ Die Untersuchung der exprimierbaren Mutante C278S ergab, dass die mittels intrazellulärer Calciummessungen ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven gegenüber dem Wildtyp signifikant nach rechts verschoben werden. Die fehlende Disulfidbrücke hatte jedoch keinen Einfluss auf die maximale Stimulierbarkeit des P2Y₂-Rezeptors. Die untersuchten Antagonisten verhielten sich unterschiedlich. Durch die aufgeweitete Struktur des Rezeptors kann das kleine Anthrachinonderivat SW K16 leichter an seine tiefer gelegene Bindungsstelle gelangen und zeigt eine stärkere Bindung, so dass sich der IC₅₀-Wert gegenüber dem Wildtyp verringerte (3,44 vs. 21,9 µM). Auf den voluminöseren Antagonisten Reactive Blue-2 (RB2) hatte die Mutation C278S jedoch keinen Einfluss.

Y114A

Die Mutante Y114A in der TM3 verhielt sich unterschiedlich gegenüber diversen Liganden. Tyr¹¹⁴ hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Agonistbindung und verstärkt sie sogar leicht. Der Antagonist RB2 war hingegen an dieser Mutante völlig inaktiv. Die Aktivität von SW K16 wurde nicht beeinflusst.

Y118A

In der TM3 wurde die Mutante Y118A eingeführt. Sie führte zu einer starken Beeinträchtigung der Efficacy der Nukleotide und Dinukleotide am P2Y₂-Rezeptor. Die Auswirkungen auf die Affinität waren gering und wirkten sich auf ATP und Ap₄A stärker aus als auf die Pyrimidin-Nukleotide UTP und Ip₄U. Tyr¹¹⁸ ist essentiell für die Aktivierung des Rezeptors.

Zusammen mit Tyr¹¹⁴ liegt auch Tyr¹¹⁸ laut dem von Ko und Höltje erstellten Modell an der Bindungstasche und interagieren hauptsächlich mit den Phosphatresten und schwächer auch mit der Base und, wobei sich hier die Entfernung vom Agonisten bemerkbar machen könnte. Während die Phosphatreste von UTP direkt mit Tyr¹¹⁴ und Tyr¹¹⁸ interagieren, liegt bei Ap₄A und ATP ein Wasser-Molekül dazwischen. Auch ist eine Übertragung der Bindungseigenschaften von einer auf die andere aromatische Aminosäure möglich, welche ein so genanntes „aromatisches Cluster“ bilden könnten. Eine Optimierung des Modells in der Position Tyr¹¹⁴ wäre ratsam. Die analogen Mutationen H132A und Y136A im P2Y₁-Rezeptor führen zu einer geringen Verschlechterung der Aktivierbarkeit, scheinen jedoch einen weniger starken Einfluss zu haben, als die entsprechenden Mutanten am P2Y₂-Rezeptor.

Y198A

Die Aminosäure Tyr¹⁹⁸ in der TM4 hat keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung. Sie befindet sich etwas weiter von der Agonist-Bindungsstelle entfernt. Laut Modell könnte Tyr¹⁹⁸ den γ -Phosphatrest fixieren, was allerdings durch die experimentellen Ergebnisse nicht bestätigt werden konnte. Tyr¹⁹⁸ interagiert jedoch mit dem größeren Antagonisten RB2. Die Mutation Y198A führte hier zu einer signifikanten Erhöhung des IC₅₀-Werts von 1,6 auf 9,3 μ M.

S296A

Die essentielle Aminosäure Ser²⁹⁶ in der TM7 bildet laut Rezeptormodell von Ko Wasserstoffbrücken mit N-Atomen der Base aus. Ihre Mutation zu Ala²⁹⁶ führte zur völligen Inaktivierung des Rezeptors. Auch in dem Modell von Ivanov *et al.* ist Ser²⁹⁶ unten in der Nukleotid-Bindungstasche zu finden. Das analoge Ser³¹⁴ hat die selbe Bedeutung für den P2Y₁-Rezeptor.¹⁵⁰ Hinzu kommt, dass Ser²⁹⁶ von großer Bedeutung für die Stabilität der Helix 7 ist, da es stabile Wasserstoffbrücken mit Pro²⁹³ in derselben Helix eingehen kann.

R177A_R180A, R177A, R180A

Der extrazelluläre Loop 2 (**EL2**) wurde bereits beim eng verwandten P2Y₄-Rezeptor als Teilstruktur mit Ligandenerkennungs-Funktion beschrieben.⁹⁰ Geladene Aminosäuren in diesem Loop spielen auch im Bindungsverhalten des P2Y₁-Rezeptors eine Rolle.¹⁵³ Die Mutanten der basischen Aminosäuren **Arg¹⁷⁷**, **Arg¹⁸⁰** und **Arg¹⁹⁴** im P2Y₂-Rezeptor zeigten Effekte auf die Nukleotid-vermittelte Ausschüttung intrazellulären Calciums. Durch die Mutationen R177A_R180A wurden die in R180A wieder zu findenden Rechtsverschiebungen der Agonistkurven verursacht. Arg¹⁸⁰ ist direkt an der Ligandbindung beteiligt. Hierbei ist die Purinbase ATP stärker betroffen als UTP.

R177A hat einen ähnlichen aber schwächer ausgeprägten Einfluss. Der EL2 wird laut Modell von Ko in die Bindungstasche eingestülpt, so dass die Aminosäuren dort mit den Phosphatresten interagieren können. Arg¹⁷⁷ interagiert auf Grund der größeren Entfernung zum Nukleotid schwächer. Diese Aminosäure ist nach außen gerichtet und fixiert so den N-Terminus und den EL1 in einer Art „Sandwich“. Es wäre möglich, dass der Einfluss der Mutation R177A durch Konformationsänderungen zu Stande kommt. Denkbar ist auch, dass der EL2 zusammen mit dem EL3 analog zum von Moro *et al.* erstellten Modell für den P2Y₁-Rezeptor eine Meta-Bindungsstelle ausbildet.¹⁵⁴ Ivanov *et al.*¹⁴³ postulieren für die o.g. Aminosäuren elektrostatische Interaktionen, die Disulfidbrücken-ähnlichen Charakter haben sollen. Es wäre auch möglich, dass die Auswirkungen auf die Ligandbindung durch das Aufbrechen dieser Interaktionen zu Stande kommen. Dies könnte für die schwächeren Effekte von Arg¹⁷⁷ der Fall zu sein, erscheint jedoch eine unwahrscheinliche Erklärung für die starke Beeinflussung des antagonistischen Verhaltens von RB2. Die Substanz hatte an den Mutanten des EL2 zwar nur einen geringfügig höheren IC₅₀-Wert, führte jedoch nicht mehr zur vollen Hemmung des durch UTP induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs. Reactive Blue-2 müsste laut Rezeptormodell durch die starken Interaktionen der drei negativen Sulfatgruppen einen deutlich geringeren IC₅₀-Wert zeigen, als es in Realität der Fall ist. Die eher unscharfen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Substanz nicht vollständig in die Bindungstasche hinein transportiert sondern auf Grund von starken elektrostatischen Wechselwirkungen unspezifisch an äußeren Teilen des Rezeptors und in den oberen Bereichen der Bindungstasche haftet. Hieran sind je nach zufällig eingenommener Binde-Position die Aminosäuren Arg¹⁷⁷, Arg¹⁸⁰ und Tyr¹¹⁴ beteiligt. RB2 scheint also multiple Bindungsmodi zu haben. Auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass der EL2 eine entscheidende Rolle für die Ligandbindung und Rezeptoraktivierung spielt. Mutagenese-Studien des Complement Faktor 5a-(C5a-) Rezeptors, des muscarinischen M3-Rezeptors und des V2 Vasopressin-Rezeptors weisen darauf hin, dass der EL2 elementare Aufgaben in der Liganderkennung besitzt.¹⁸⁰⁻¹⁸²

R194H

Die am Ende der Helix 5 und am Anfang des EL2 nah an der Eintrittsstelle zur Bindungstasche befindliche Mutation R194H führte zu einer Erhöhung der maximalen Calciumantwort durch Nukleotide und Dinukleotide. Im Modell von Ko *et al.* scheint Arg¹⁹⁴ den gesamten Eingangsbereich (TM4, TM5, EL2) zu stabilisieren. Auch ergibt sich eine „Sandwich-Struktur“ mit den oben beschriebenen Aminosäuren Tyr¹¹⁴ und Tyr¹¹⁸. Das kleinere Histidin könnte zu einer erhöhten Flexibilität im Eintrittsbereich und somit zu einer erleichterten Aufnahme der Liganden und Weiterleitung des Signals führen.

R272A

Die Mutation **R272A** im EL3 des humanen P2Y₂-Rezeptors führte zu einer starken Erhöhung der EC₅₀-Werte für die Agonisten des Rezeptors (12-20 µM versus 60 nM), wobei die Auswirkungen auf die Dinukleotide größer waren. Arg²⁷² befindet sich laut Modell von Ko und Höltje an der Eintrittsstelle zur Bindungstasche und ist für den ersten Kontakt und das Einführen des Liganden in die richtige Position verantwortlich. In dem Modell von Ivanov *et al.* ist die Aminosäure nicht aufgeführt.¹⁴³

Die Aktivierung aller G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wird durch das Modell eines molekularen Schalters („toggle switch“) beschrieben.¹⁸³ Die transmembranären Helices sechs und sieben bewegen sich während der Aktivierung durch einen Liganden im unteren Bereich auf einander zu und entfernen sich im äußeren Bereich von einander.¹⁸⁴ Dies wird durch die Bindung eines Agonisten induziert, wobei für alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse A eine Bindungstasche im äußeren Teil der transmembranären Helices postuliert wird. Eine solche eher außen gelagerte Bindungstasche konnte durch Mutagenese auch für den P2Y₂-Rezeptor bestätigt werden. Der Aktivierungsmechanismus über den molekularen Schalter kann generell durch die Bindung von Agonisten in sehr unterschiedlichen Bindungstaschen ausgelöst werden. Eine Homologie, wie sie zwischen den Bindungstaschen des P2Y₂-Rezeptors und anderen P2Y-Rezeptoren besteht, könnte ebenfalls zwischen den Bindungsstellen aller G-Protein-gekoppelten Rezeptoren existieren. Aus vielen Beobachtungen geht hervor, dass die Transmembranären Helices 3, 5, 6 und 7 sowie der Extrazelluläre Loop 2 oft an der Ligandbindung beteiligt sind.¹⁸⁵ Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auch für den P2Y₂-Rezeptor bestätigt. Andererseits liegen die Bindungstaschen für peptidische Agonisten oft weiter außen im Rezeptor. Es ist also auch möglich, dass von unterschiedlichen Stellen des Proteins durch einen Liganden die aktive Form des Rezeptors stabilisiert werden kann. Um ein allgemeingültiges Modell zu erstellen, sind mehr ausführliche Untersuchungen an verschiedenen Rezeptoren nötig.

Insgesamt bestätigen die Untersuchungen an den mutierten P2Y₂-Rezeptoren, dass sich die Bindungstasche für die Nukleotide, Dinukleotide und die vom Anthrachinon abgeleiteten Antagonisten in den äußeren Teilen der transmembranen Domänen befinden. Während die Nukleotide und kleinen Anthrachinon-Antagonisten vollständig in die Bindungstasche passen, scheinen kleine Anteile der größeren Moleküle heraus zu ragen. Die negativ geladenen Anteile der Liganden liegen unten in der Bindungstasche und interagieren mit positiv geladenen Aminosäuren. Die Daten zeigen zumeist eine gute Übereinstimmung mit dem von Ivanov *et al.*¹⁴³ und dem von Geun-Yung Ko generierten Modell. Letzteres kann in einigen Bereichen noch an die biologischen Daten angepasst werden. Aus diesem optimierten Modell werden sich Vorschläge für neue, potente Agonisten und Antagonisten am humanen P2Y₂-Rezeptor ergeben. Sollten sich selektive Antagonisten finden, können diese und auch die bereits entwickelten

selektiven Agonisten an von Qi *et al.* erstellten Chimären des P2Y₂/P2Y₄-Rezeptors getestet werden. So kann die Bindungsstelle noch näher charakterisiert werden,⁹⁰ und es könnten auch Einblicke in die Strukturmerkmale, die für die Ligandunterscheidung zwischen den beiden nahe verwandten Rezeptoren verantwortlich sind, gewonnen werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Informationen über Aktivierung und das Bindungsverhalten des P2Y₂-Rezeptors dienen neben der Entwicklung von neuen, selektiven Liganden auch dem generellen Verständnis der Aktivierungsmechanismen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und können in computergenerierte Modelle eingebracht werden, um diese weiter der Realität anzunähern.

3 Suche nach neuen P2Y-Rezeptor-Antagonisten

3.1 Einleitung

Zurzeit sind erst wenige Antagonisten für P2Y-Rezeptoren bekannt.^{84,186} Potente und selektive Liganden werden dringend als pharmakologische Werkzeuge und potentielle Arzneistoffe für diverse Krankheitsbilder benötigt. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Testung von potentiellen Antagonisten für die G_q-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆.

Am humanen **P2Y₁-Rezeptor** wird PPADS (IC₅₀ = 89 μM) als Standardantagonist verwendet. Suramin und Reactive Blue-2 sind inaktiv (Abb. 3-1).^{146,187,188} MRS2179 und MRS2500 sind mit K_i-Werten von 84 nM und 0,8 nM potente, selektive Antagonisten am P2Y₁-Rezeptor, die auch als Radioliganden eingesetzt werden können.^{189,190}

Für den humanen **P2Y₂-Rezeptor** (hP2Y₂) werden standardmäßig RB2 (IC₅₀ = 1,9 μM (s. 2.9)) und Suramin (IC₅₀ = 48 μM) als Antagonisten eingesetzt, während PPADS an diesem Rezeptor inaktiv ist (Abb. 3-1).^{147,191,192} Auch Flavonoide und Biflavonoide hemmen den Mäuse-P2Y₂-Rezeptor in niedrigen mikromolaren Konzentrationen.^{165,193} Viele Anthrachinonderivate zeigen am murinen P2Y₂-Rezeptor (mP2Y₂) inhibitorische Aktivität in Konzentrationen zwischen 5 und 30 μM.¹⁹³ Es konnte auch gezeigt werden, dass AR-C118925 mit einem IC₅₀-Wert von ca. 1 μM (hP2Y₂) antagonistisch wirkt (Abb. 3-1).¹⁹⁴

Der durch UTP aktivierbare humane **P2Y₄-Rezeptor** ist dem P2Y₂-Rezeptor strukturell sehr ähnlich, weshalb die Entwicklung selektiver Liganden mit besonders großen Schwierigkeiten verbunden ist. RB2 zeigt hier einen IC₅₀-Wert von 59,3 μM, Suramin und PPADS sind inaktiv.^{84,188}

RB2 hat auch am humanen **P2Y₆-Rezeptor** antagonistische Aktivität (IC₅₀ = 4,3 μM).¹⁸⁸ Suramin und PPADS sind nahezu inaktiv.⁹¹ Das Arylisothiocyanat-Derivat MRS2578 stellt mit einem IC₅₀-Wert von 37 nM einen gegenüber P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₁₁ selektiven P2Y₆-Antagonisten dar (Abb. 3-1).¹⁹⁵ Allerdings ist die Verbindung sehr reaktiv und instabil.

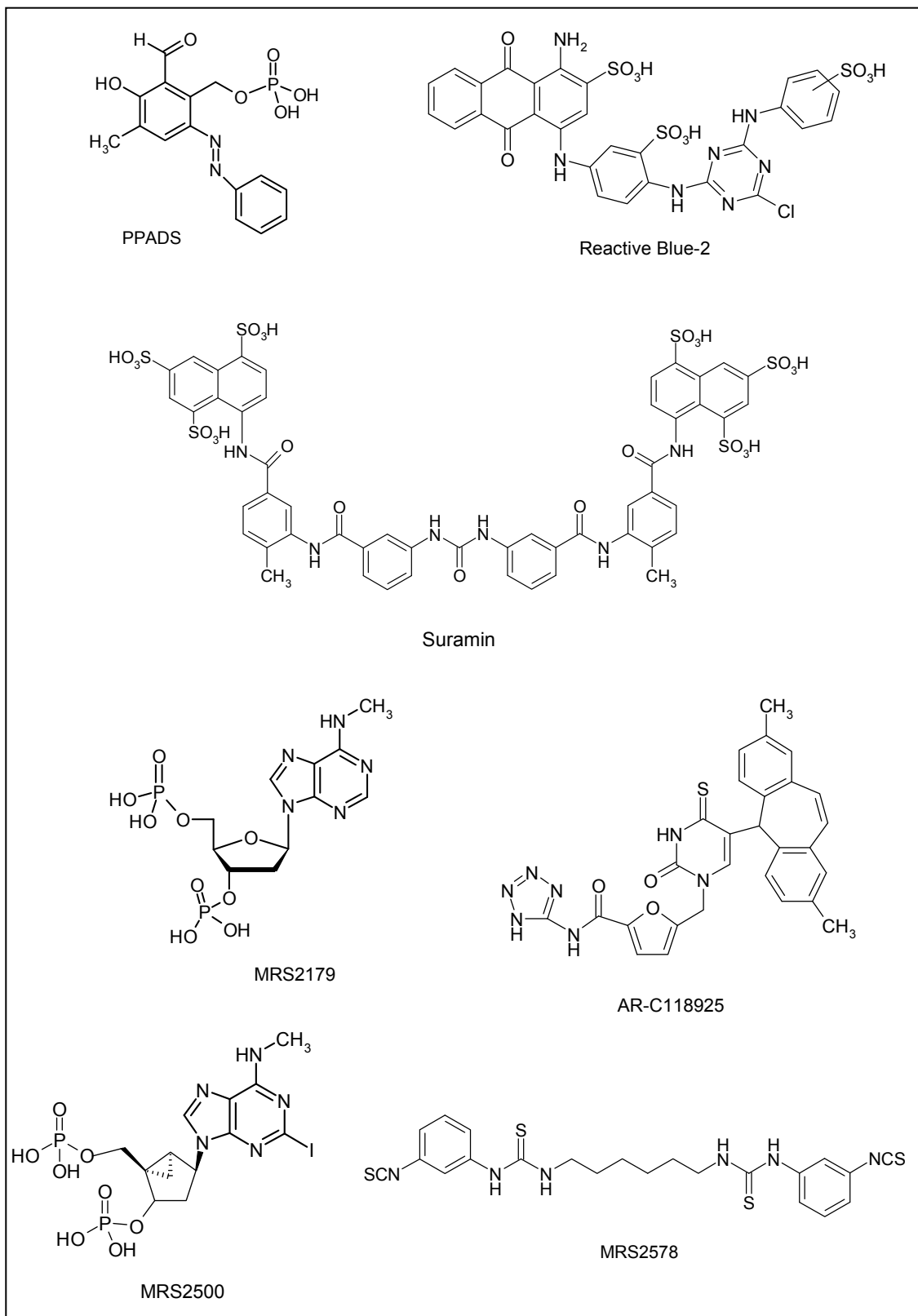


Abb. 3-1: Strukturen bekannter P2Y-Rezeptor-Antagonisten: PPADS, Reactive Blue-2 (RB2), Suramin, AR-C118925, MRS2179, MRS2500 und MRS2578.

Die meisten der bisher bekannten Antagonisten für P2Y-Rezeptoren weisen entscheidende pharmakologische oder physikochemische Nachteile auf. Sie sind oft wenig selektiv und haben eine geringe Potenz. Viele der Strukturen haben ein hohes Molekulargewicht und polyanionischen Charakter, was die Bioverfügbarkeit der Substanzen stark einschränkt. Ein erleichtertes Screening mittels Radioligand-Bindungsstudien ist bisher nur für den P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor möglich.^{189,190,196} Daher werden zur Testung neuer Liganden intrazelluläre Calciummessungen oder Bestimmungen der Signalmoleküle cAMP bzw. IP₃ eingesetzt.^{142,165,197-199}

3.2 Testung von potentiellen Antagonisten

Zur Testung potentieller Antagonisten wurden 1321N1-Astrozytomzellen verwendet, die retroviral mit dem tP2Y₁ (turkey P2Y₁)-, hP2Y₂ (humanen P2Y₂)-, hP2Y₄ (humanen P2Y₄)- und rP2Y₆ (Ratten-P2Y₆)-Rezeptor transfiziert waren. Die Transfektion mit dem hP2Y₂-Rezeptor wurde in Kapitel 1 beschrieben, die anderen Zelllinien stammen aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. Gary Weisman, University of Missouri-Columbia, USA. Einige Untersuchungen wurden an NG108-15-Zellen, einer Hybridzelllinie aus Maus-Neuroblastom und Ratten-Gliom, durchgeführt. Diese Zellen exprimieren endogen den Mäuse-P2Y₂-Rezeptor.⁹³ Die Substanzen wurden, soweit dies die Löslichkeit zuließ, in Konzentrationen von 1, 10 und 100 µM getestet. Kam es zu einer Inhibition, wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit verschiedenen Konzentrationen des Agonisten erstellt. Die Testungen am Mäuse-P2Y₂-Rezeptor (mP2Y₂) wurden teilweise von Geun-Yung Ko im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.²⁰⁰ Die Substanzen wurden von Dr. Stefanie Weyler und Younis Baqi im Rahmen ihrer Doktorarbeiten synthetisiert.

3.2.1 Testung von Anthrachinonderivaten

Verschiedene Anthrachinonderivate wurden auf ihre antagonistische Aktivität untersucht (Abb. 3-2). Einzelne Substanzen mit Anthrachinon-Grundgerüst wurden später auch am humanen P2Y₂-Rezeptor getestet.

Alle untersuchten Derivate, bei denen es sich um Sulfonsäureester oder Sulfonsäureamide handelt, waren in Testkonzentrationen von 1 µM, oder, wenn die Löslichkeit dies erlaubte, in den Testkonzentrationen von 10 µM und 100 µM an den untersuchten Rezeptoren inaktiv.

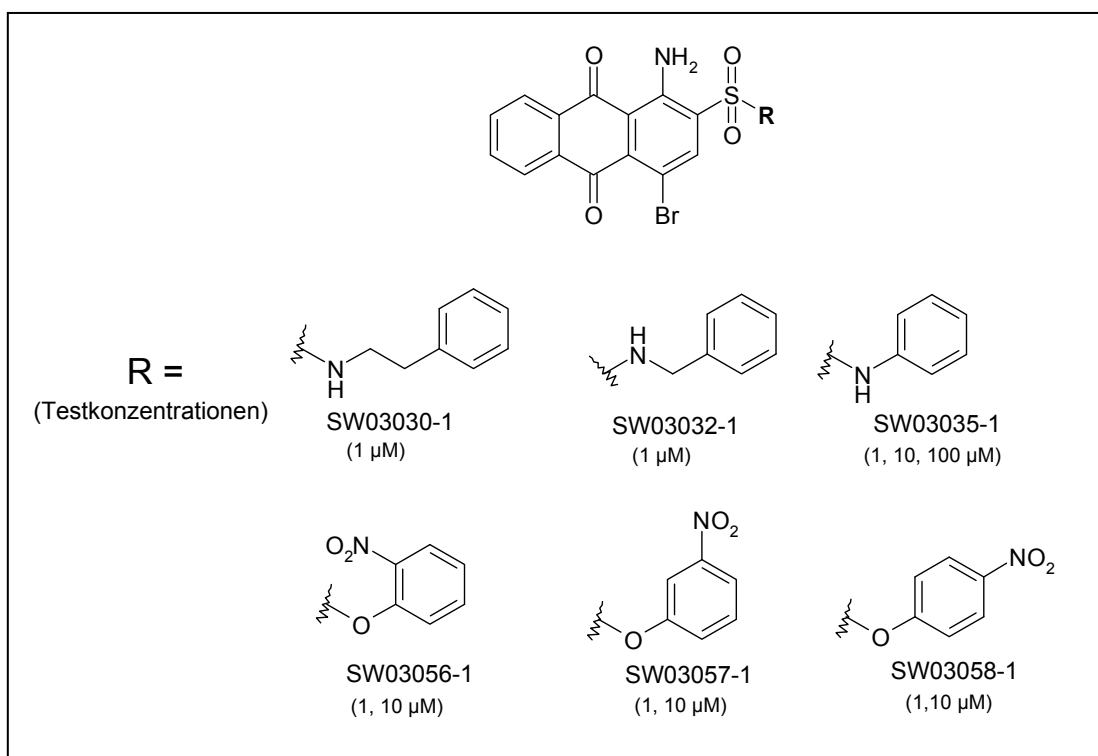


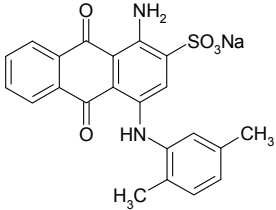
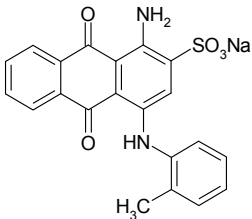
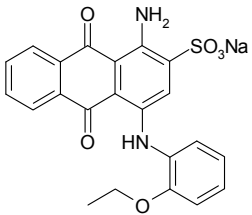
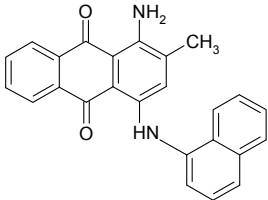
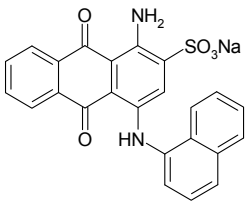
Abb. 3-2: Anthrachinon-Derivate, die am tP2Y₁-, mP2Y₂, hP2Y₄- und rP2Y₆-Rezeptor getestet wurden. Gemessen wurde die Inhibition der intrazellulären Ca²⁺-Anstiege nach Injektion der jeweiligen Agonisten ADP 1 µM (tP2Y₁), UTP 3 µM (mP2Y₂), UTP 3 µM (hP2Y₄) und UDP 3 µM (rP2Y₆) (n = 3). Die Antagonisten wurden in den folgenden Höchstkonzentrationen vorgelegt: SW03030-1: 1 µM, SW03032-1: 1 µM, SW03035-1: 100 µM, SW03056-1: 10 µM, SW03057-1: 10 µM, SW03058-1: 10 µM.

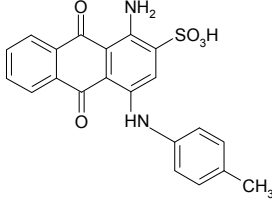
Einzelne, ausgewählte Substanzen wurden am humanen P2Y₂-Rezeptor getestet (Tab. 3-2). Diese Anthrachinonderivate enthielten eine freie Sulfonsäure-Gruppe und hatten im Rahmen früherer Untersuchungen (Dissertation von Dr. Marko Kaulich)¹⁹³ bereits antagonistische Aktivität am murinen P2Y₂-Rezeptor gezeigt. Eine vollständige Übersicht der Testung aller Substanzen an verschiedenen P2Y-Rezeptorsubtypen wird in der Dissertation von Anja Scheiff dargestellt werden. Beispielhaft sind in Abb. 3-2 Dosis-Wirkungs-Kurven für SW K20 und SW K24 am humanen P2Y₂-Rezeptor dargestellt.

Im Gegensatz zu den Sulfonsäureamiden und -estern zeigten viele der Anthrachinonderivate mit freien Sulfonsäuregruppen antagonistische Aktivität an P2Y₂-Rezeptoren. Die IC₅₀-Werte für die Substanzen SW K9, SW K16, SW K20, SW K22 und SW K24 lagen im niedrigen mikromolaren Bereich. Es waren nur geringe Aktivitätsunterschiede zwischen humanen und Mäuse-Rezeptoren zu erkennen. Lediglich SW K19, ein meta-Chlorphenyl-substituiertes Derivat, war inaktiv. Die Verbindung SW 117 zeigte ebenfalls kein antagonistisches Verhalten, enthielt aber auch keine negative Ladung in Position 2 des Anthrachinongerüsts.

Tab. 3-2: IC₅₀-Werte verschiedener Anthrachinon-Derivate am Mäuse- und humanen P2Y₂-Rezeptor. Gemessen wurde die Inhibition der UTP-vermittelten intrazellulären Ca²⁺-Anstige (n = 3-4).

Verbindung	Strukturformel	mP2Y ₂ ^a	hP2Y ₂ ^b
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c
SW K9		20.0 ± 7.0	4.51 ± 0.09
SW K16		17.0 ± 1.0	16.0 ± 3.6
SW K19		> 100 (7 ± 2)	> 30 (33 ± 4)
SW K20		14.0 ± 9.0	7.95 ± 1.05

Verbindung	Strukturformel	mP2Y ₂ ^a	hP2Y ₂ ^b
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c
SW K22		n.d. ^d	23.7 ± 9.6
SW K24		10.0 ± 2.0	11.9 ± 2.4
SW K26		17.0 ± 4.0	15.0 ± 5.6
SW 117		>>10	>>30
SW 126		10.7 ± 1	6.67 ± 0.32

Verbindung	Strukturformel	mP2Y ₂ ^a	hP2Y ₂ ^b
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^c
SW K13		27.0 ± 5.0	24.9 ± 8.19

^a UTP-Konzentration: 3 μM (EC₅₀ UTP = 3,03 ± 0,93 μM).

^b UTP-Konzentration: 1 μM (EC₅₀ UTP = 0,781 ± 0,113 μM).

^c bei der angegebenen Testkonzentration

^d nicht untersucht

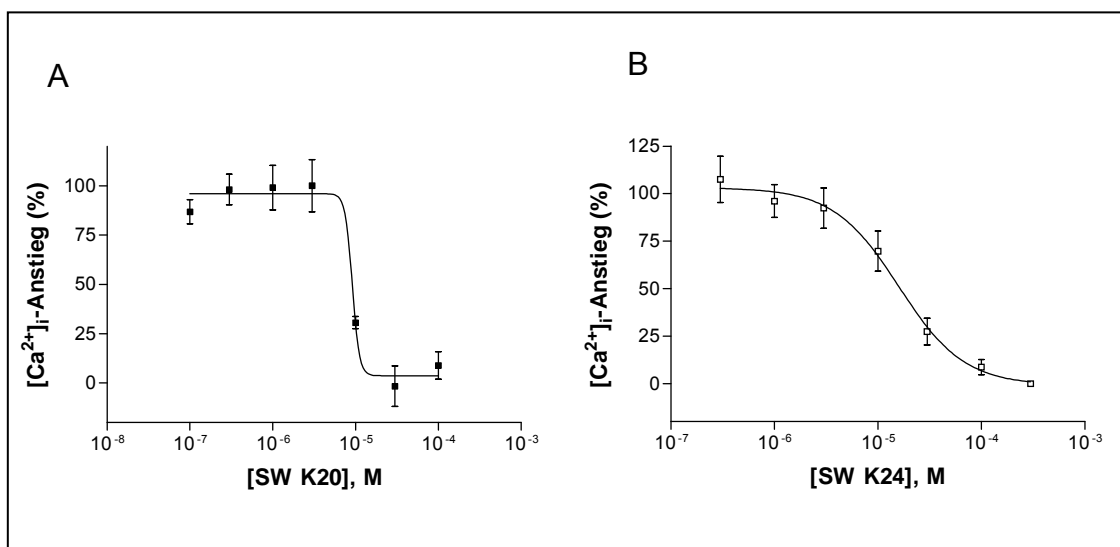
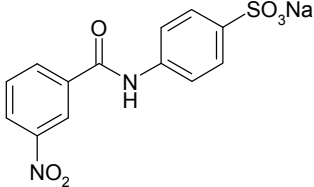
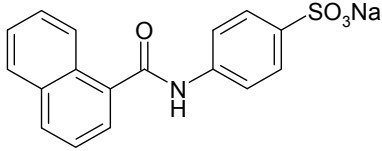


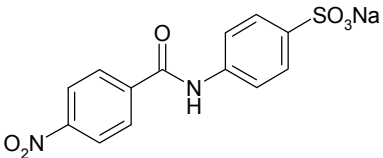
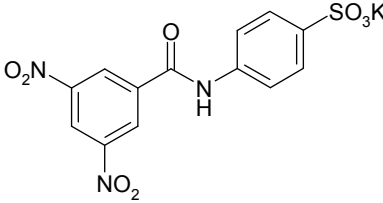
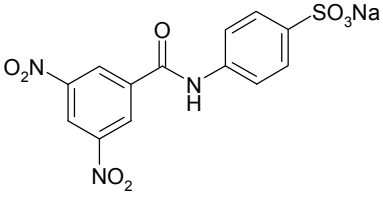
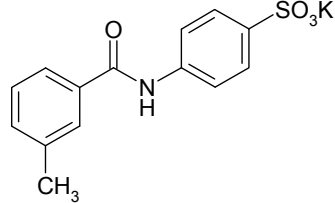
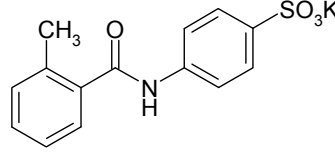
Abb. 3-2: Antagonismus von SW K20 (A; IC₅₀ = 7.95 ± 1.05) und SW K24 (B; IC₅₀ = 11.9 ± 2.4) am hP2Y₂-Rezeptor. Es wurden mit dem Rezeptor transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen als Testsystem verwendet und intrazelluläre Cacliumanstiege nach Injektion von 1 μM UTP gemessen (n = 3).

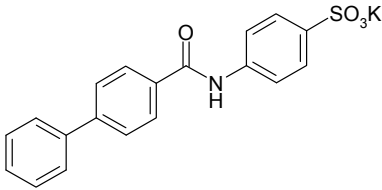
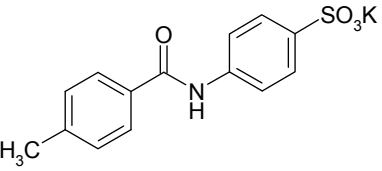
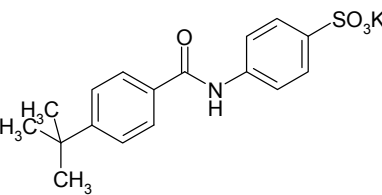
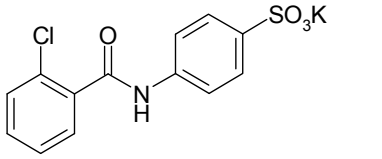
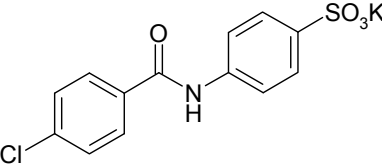
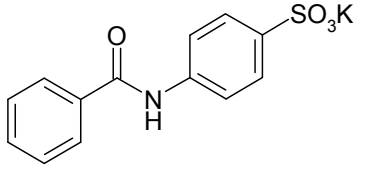
3.2.2 Testung von Sulfanilsäureamiden und p-Aminobenzoensäureamiden

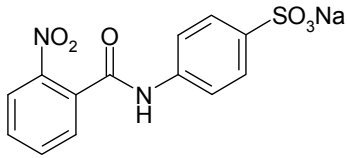
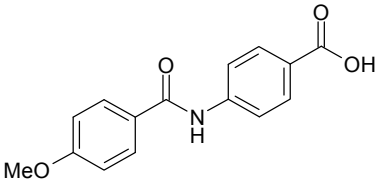
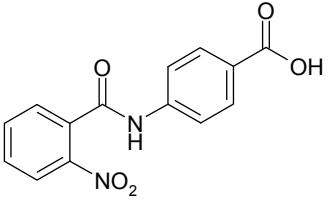
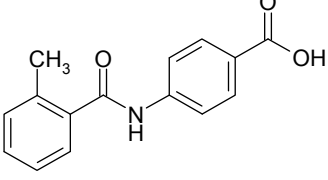
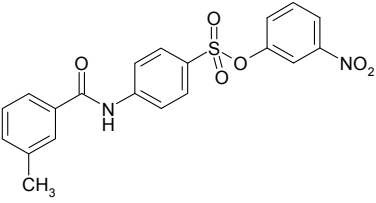
Es wurden Sulfanilsäureamide und p-Aminobenzoensäureamide mit diversen Substituenten sowie analoge Substanzen auf ihr antagonistisches Verhalten am tP2Y₁-, mP2Y₂-, hP2Y₄- und rP2Y₆-Rezeptor getestet. Auch hier wurden, wenn möglich, die Konzentrationen 1 μM, 10 μM und 100 μM vorgelegt, mit transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen vorinkubiert, und anschließend wurde die Agonist-induzierte intrazelluläre Calciumfreisetzung vermessen. Für den mP2Y₂-Rezeptor wurden NG108-15-Zellen verwendet, wobei das Screening zum Teil von Geun-Yung Ko durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

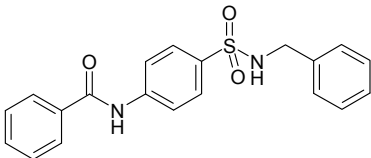
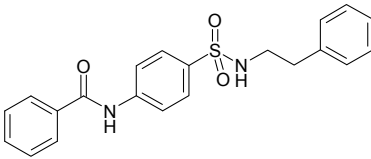
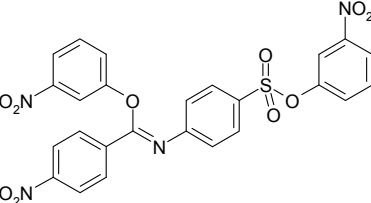
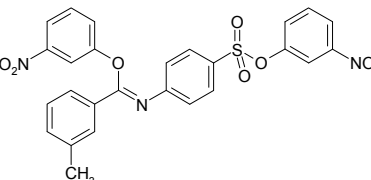
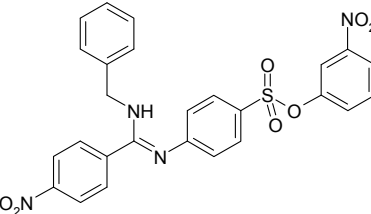
Tab. 3-3: IC₅₀-Werte verschiedener Verbindungen am tP2Y₁-, mP2Y₂, hP2Y₄- und rP2Y₆-Rezeptor. Gemessen wurde die Inhibition der intrazellulären Ca²⁺-Anstige nach Injektion der jeweiligen Agonisten (n = 3).

Verbindung	Strukturformel	tP2Y ₁ ^a	mP2Y ₂ ^b	hP2Y ₄ ^c	rP2Y ₆ ^d
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e
SW03062-1 Edukt		> 100 (-7 ± 9)	> 100	> 100 (20 ± 17)	> 100 (20 ± 3)
SW03064-1		> 100 (11 ± 13)	> 100	> 100 (4 ± 8)	> 100 (11 ± 9)

Verbindung	Strukturformel	tP2Y ₁ ^a	mP2Y ₂ ^b	hP2Y ₄ ^c	rP2Y ₆ ^d
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e
SW03066-1		> 100 (-15 ± 9)	> 100	> 100 (7 ± 10)	> 100 (12 ± 8)
SW0367-1		> 100 (-3 ± 10)	> 100 (-6 ± 9)	> 100 (-13 ± 10)	> 100 (-2 ± 9)
SW03068-1		> 100 (10 ± 2)	> 100	> 100 (29 ± 23)	> 100 (6 ± 2)
SW03081-1		> 100 (16 ± 16)	> 100	> 100 (30 ± 18)	> 100 (8 ± 4)
SW03085-1		> 100 (6 ± 11)	> 100	> 100 (-6 ± 12)	> 100 (0 ± 5)

Verbindung	Strukturformel	tP2Y ₁ ^a	mP2Y ₂ ^b	hP2Y ₄ ^c	rP2Y ₆ ^d
		IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [μM] (% Inhibition) ^e
SW03087-1		n.d.	> 100	n.d.	n.d.
SW Rob2-1		> 100 (15 ± 9)	> 100	> 100 (-15 ± 11)	> 100 (-13 ± 15)
SW Rob2-2		> 100 (15 ± 6)	> 100	> 100 (16 ± 32)	> 100 (1 ± 10)
SW Rob2-3		> 100 (15 ± 11)	> 100 (-8 ± 12)	> 100 (-8 ± 6)	> 100 (5 ± 4)
SW Rob2-4		> 100 (-5 ± 4)	> 100 (9 ± 6)	> 100 (13 ± 6)	> 100 (-13 ± 20)
SW Rob2-6		> 100 (4 ± 19)	> 100	> 100 (23 ± 22)	> 100 (8 ± 10)

Verbindung	Strukturformel	tP2Y ₁ ^a	mP2Y ₂ ^b	hP2Y ₄ ^c	rP2Y ₆ ^d
		IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e
SW Rob2-16		> 100 (-2 ± 2)	> 100	>100 (-8 ± 9)	> 100 (-1 ± 11)
SW Rob3-6a		> 100 (4 ± 9)	> 10 (9 ± 5)	n.d. ^f	> 100 (19 ± 10)
SW Rob3-16		> 100 (13 ± 3)	n.d. ^f	n.d. ^f	> 100 (-2 ± 8)
SW03101-1		> 100 (13 ± 6)	n.d. ^f	> 100 (-7 ± 14)	> 100 (26 ± 15)
SW0402-1		> 10 (7 ± 8)	2,83 ± 0,64	> 10 (27 ± 9)	6,19 ± 0,59

Verbindung	Strukturformel	tP2Y ₁ ^a	mP2Y ₂ ^b	hP2Y ₄ ^c	rP2Y ₆ ^d
		IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e	IC ₅₀ ± SEM [µM] (% Inhibition) ^e
SW03052-1		> 100 (12 ± 6)	> 100	> 100 (-5 ± 3)	> 100 (26 ± 7)
SW03075-1		> 100 (11 ± 7)	> 100	> 100 (30 ± 22)	> 100 (-1 ± 15)
SW03060-2		> 10 (8 ± 4)	> 10 (7 ± 6)	> 10 (-4 ± 12)	> 10 (6 ± 9)
SW0401-1		> 10 (4 ± 2)	> 10	> 10 (32 ± 16)	> 10 (33 ± 8)
SW03059-1		> 10 (43 ± 27)	> 10	> 10 (9 ± 15)	> 10 (0 ± 8)

^a ADP-Konzentration: 1 µM^b UTP-Konzentration: 3 µM^c UTP-Konzentration: 3 µM^d UDP-Konzentration: 3 µM^e bei der angegebenen Konzentration^f nicht untersucht

Die meisten der getesteten Verbindungen zeigten keine inhibitorische Aktivität an den P2Y-Rezeptorsubtypen P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆. Im Gegensatz zu den Anthrachinonderivaten hatten hier die Substanzen mit freier Sulfonsäure-Gruppe keine inhibitorische Aktivität an den Nukleotidrezeptoren. Auch eine freie Carbonsäure (Rob3-16, Rob3-6a und SW03101-1) führte nicht zu potenteren Substanzen.

Nur der Sulfonsäureester **SW0402-1** zeigte antagonistische Aktivität am mP2Y₂- und rP2Y₆-Rezeptor (Abb. 3-3). Der IC₅₀-Wert am mP2Y₂-Rezeptor betrug 2,83 μM. Am rP2Y₆-Rezeptor wurde ein IC₅₀-Wert von 6,19 μM bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 10 μM war SW0402-1 hingegen inaktiv am tP2Y₁- und hP2Y₄-Rezeptor.

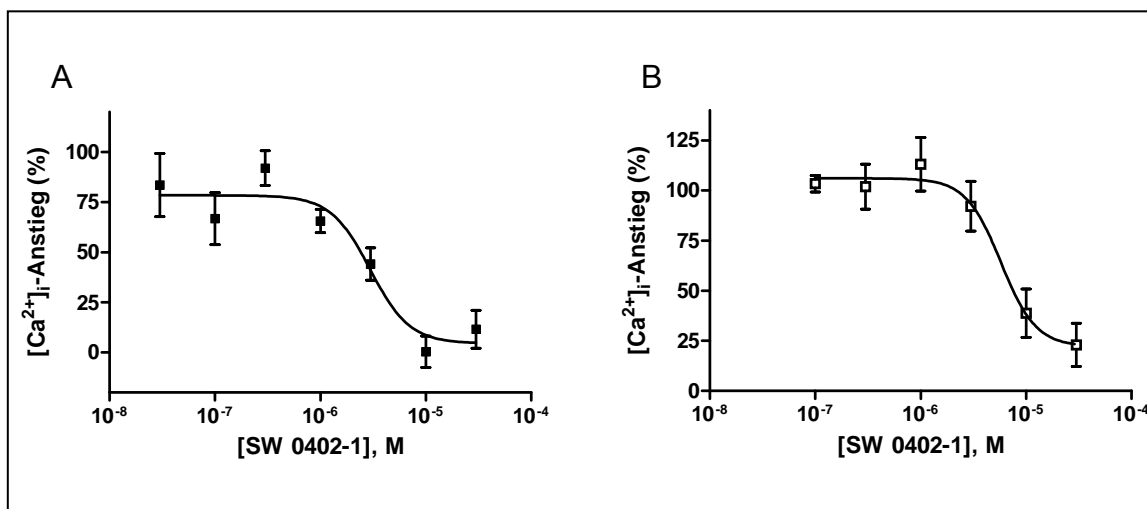


Abb. 3-3: Antagonismus von SW 0402-1 am **A:** mP2Y₂-Rezeptor und **B:** rP2Y₆-Rezeptor (n = 3-4).

3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Mittels eines fluoreszenzbasierten Calciumassays wurden an 1321N1-Astrozytomzellen, die mit dem tP2Y₁, hP2Y₂, hP2Y₄ oder hP2Y₆-Rezeptor transfiziert waren, sowie an NG108-15-Zellen, die den mP2Y₂-Rezeptor nativ exprimieren, verschiedene Substanzen auf ihre antagonistische Aktivität untersucht. Es wurde eine Serie von Anthrachinonderivaten und eine Serie von Sulfanilsäureamiden sowie deren Homologe getestet. Die getesteten Strukturen besitzen eine geringere Molmasse und sind weniger anionisch geladen als die bekannten Standardantagonisten RB2, PPADS und Suramin.^{23,84} Erst in den letzten Jahren sind die ersten selektiven Antagonisten für den P2Y₁-Rezeptor (MRS2179, MRS2500) und den P2Y₆-Rezeptor (MRS2578) entwickelt worden.^{189,190,195}

Die getesteten **Anthrachinon-Derivate** mit einer freien Sulfonsäuregruppe waren fast alle am humanen und murinen P2Y₂-Rezeptor antagonistisch aktiv. Die IC₅₀-Werte lagen für die Rezeptoren beider Spezies im niedrigen mikromolaren Bereich, wobei einige Substanzen am humanen Rezeptor geringfügig höhere Aktivitäten aufwiesen. Der Phenylamin-Rest in Position vier des Anthrachinons wurde gut toleriert. Substituenten in ortho- und para-Position des Phenylrests hatten wenig Einfluss auf die Aktivität, während ein Chlor-Substituent in meta-Position (SW K19) zum Verlust der Hemmung des P2Y₂-Rezeptors führte. Unter den getesteten Anthrachinonderivaten waren hingegen alle Verbindungen, die eine veresterte Sulfonsäuregruppe oder einen Methylrest in Position zwei des Anthrachinon-Grundgerüsts trugen, inaktiv. Auch eine Methylgruppe in derselben Position führte zu Aktivitätsverlust (SW 117). Eine freie Sulfonsäure oder zumindest eine freie negative Ladung scheint essentiell für das antagonistische Verhalten von Anthrachinonen am P2Y₂-Rezeptor und vermutlich auch an anderen P2Y-Rezeptorsubtypen zu sein.

Der Austausch des Anthrachinongerüsts gegen eine Amidstruktur führte an den P2Y-Rezeptorsubtypen P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆ zum völligen Aktivitätsverlust. Substanzen mit verschiedenen Substituenten am Phenylrest waren nicht antagonistisch. Ebenso führte der Austausch der Sulfonsäuregruppe gegen eine freie Carbonsäure nicht zu erhöhten antagonistischen Aktivitäten.

SW0402-1, ein Sulfonsäureester, war die einzige antagonistisch wirksame Verbindung unter den getesteten Amiden. Mit IC₅₀-Werten von 2,83 µM am mP2Y₂-Rezeptor und 6,19 µM am rP2Y₆-Rezeptor war die Substanz ein moderat potenter Antagonist. An den anderen Subtypen, tP2Y₁ und hP2Y₄, zeigte sich bis zu einer Konzentration von 10 µM kein antagonistisches Verhalten. Somit weist SW0402-1 zumindest eine leichte Selektivität gegenüber diesen Rezeptoren auf.

Es wäre möglich, dass die antagonistische Aktivität von SW0402-1 auf eine Reaktion des Sulfonsäureesters mit Aminosäuren des Rezeptors zurückzuführen ist. Da gezeigt werden konnte, dass gerade meta-Nitrophenylsulfonsäureester sehr hohe Stabilität

aufweisen, ist dies aber eher unwahrscheinlich.²⁰¹ Daher ist anzunehmen, dass es sich bei SW0402-1 um einen nicht-kovalent bindenden Antagonisten an P2Y-Rezeptoren handelt.

Im Gegensatz zu den Anthrachinonen, scheint für die Amide eine Veresterung der Sulfonsäure essentiell zu sein. Die Substitution des Phenylsulfonsäureesters mit einer Nitro-Gruppe in meta-Position oder ein Rest in meta-Position des Carbonsäure-Amids scheinen ebenfalls Voraussetzungen für die Bindung an den P2Y₂- und P2Y₆-Rezeptor zu sein, da die Substanz SW03052-1 sich als inaktiv herausgestellt hat. Wurde das Amid gegen ein Amidin (SW03059-1) oder eine Iminsäure (SW03060-2, SW0401-1) ausgetauscht, verloren die Substanzen ihre Aktivität an den P2Y-Rezeptoren. Um umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehungen für die veresterten Sulfanilsäureamide aufstellen zu können, müssten weitere Verbindungen getestet werden.

Sowohl die Anthrachinone als auch das Sulfanilsäureamid SW0402-1 stellen vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung von P2Y₂-Rezeptor-Antagonisten dar. Ausgehend von diesen Leitstrukturen sollten sich Antagonisten mit niedriger Molmasse und ohne stark sauren Charakter entwickeln lassen. Solche Eigenschaften sind eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz als Arzneistoff („Druggability“).

4 Ammonium-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in 1321N1-Astrozytomzellen

4.1 Einleitung

4.1.1 Verwendung von Ammoniumsalzen in Proteinlösungen

Ammoniumsalze werden standardmäßig verwendet, um Proteine aufzureinigen, so dass Enzymlösungen oft sehr hohe Konzentrationen an Ammonium enthalten.^{202,203} Kommerziell erhältlichen Lösungen von Hexokinase und Phosphokinase enthalten 3,2 M Ammoniumsulfat. Hexokinase wird z.B. verwendet, um ATP/UTP, das häufig als Verunreinigung in ADP/UDP-Lösungen vorliegt, in ADP/UDP umzuwandeln.¹⁰¹ So können Experimente an P2Y-Rezeptoren mit reinen Dinukleotiden durchgeführt werden.

4.1.2 Ammonium-Toxizität und Hepatische Encephalopathie

Durch hohe Konzentrationen von Ammonium im Blut kann es zu starken Nervenschädigungen aber auch zum Reye-Syndrom oder zu epileptischen Anfällen kommen.^{204,205} In der **Hepatischen Encephalopathie** (HE), einer Erkrankung, bei der es durch eine Schädigung der Leber zu einem verminderten Abbau von Ammonium zu Harnstoff und Glutamat kommt, können im Gehirn NH_4^+ -Spiegel von 2-5 mM erreicht werden.^{206,207} Es werden verschiedene Symptome bei HE-Patienten beobachtet. Bei einer akuten Leberschädigung kommt es zu Hirnschwellungen, bei chronischen Erkrankungen werden Verwirrheitszustände, Gedächtnisverlust, abnorme Wahrnehmungen, Koma und Tod beschrieben.²⁰⁸ Die Hauptursache für diese Symptome sind Schädigungen von Astrozyten, während Neuronen normalerweise nicht betroffen sind.²⁰⁶ Schon kurze Zeit nachdem die Astrozyten toxischen Ammoniumkonzentrationen ausgesetzt werden, kommt es zu erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen und zu gesteigerten extrazellulären Glutamat-Konzentrationen.^{86,209} Langzeiteffekte von hohen Ammonium-Blutspiegeln sind durch eine veränderte Morphologie der Astrozyten gekennzeichnet, die anschwellen und

vermehrt reaktive Sauerstoffspezies bilden.²¹⁰ Zudem werden so genannte Alzheimer-Typ II-Astrozyten ausgebildet, die stark angeschwollen sind, einen großen blassen Zellkern und dunkle Kernkörperchen haben.²¹¹ Die Behandlung der HE beruht hauptsächlich darauf, die Aufnahme von Ammonium, das im Darm durch Bakterien gebildet wird, zu reduzieren. Hierzu werden Lactulose und nicht absorbierbare Antibiotika wie Neomycin verwendet.²¹² Außerdem wird die Bildung von Ammonium durch Inhibition des Harnstoff-Zyklus mittels Aspartat, Zink oder Natriumbenzoat verhindert.⁸⁵

Zur Untersuchung der HE wurden bisher Primärkulturen von Nager-Astrozyten als Modellsystem verwendet.^{205,209,213,214} Nach der Behandlung mit Ammoniumsalzen zeigen diese Zellen verschiedene Effekte auf molekularer Ebene. Der intrazelluläre pH-Wert wird stark alkalisch und später sauer.²¹⁵ Die Expression einiger Proteine wie z.B. des Benzodiazepin-Rezeptors und der Glutamat-Transporter GLT-1 und GLAST wird herunterreguliert.²¹⁶ Durch NH_4^+ wird die Aufnahme von GABA in Astrozyten gehemmt sowie die GABA-Freisetzung erhöht. Durch Öffnung von Kalium-Kanälen kommt es zudem zur Depolarisation von Astrozyten.^{213,217,218} Von Rose *et al.* wurde gezeigt, dass die Ammonium-induzierte Alkalisierung der Zellen zu einer **intrazellulären Calciausschüttung** und erhöhter Glutamat-Freisetzung sowie verringerter Wiederaufnahme von Glutamat in primäre Astrozyten führt.^{86,209} Durch die gesteigerte $[Ca^{2+}]_i$ kommt es in der Zelle zu einem Kollaps des Membranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran, was zu einer gesteigerten Permeabilität der Mitochondrien für einige Ionen führt.^{214,219} Die Veränderungen des intrazellulären pH-Werts und der $[Ca^{2+}]_i$ konnten auch in anderen Zelllinien, wie glatten Muskelzellen, beobachtet werden, in denen es durch einen gesteigerten pH_i zu Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum kommt.²²⁰ In Knorpelzellen dagegen verursacht NH_4^+ die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern.²²¹

Auf welchem Weg Ammonium ins Zellinnere gelangen kann, und wie es zu dem nachfolgend gesteigerten pH_i kommt, wurde bisher nicht geklärt. Ammonium ist eine schwache Base (pK_a 9,25 bei 25°C; 9,15 bei 37°C) und liegt daher bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 zu 98% in der protonierten Form vor.^{222,223} Die freie Base (NH_3) ist lipophil genug, um durch die Zytoplasmamembran zu penetrieren.^{224,225} Das Molekül kann dann intrazellulär ein Proton aufnehmen, was die initiale Erhöhung des pH_i erklären würde, die nach einigen Sekunden in eine pH-Erniedrigung umschlägt.^{87,226}

4.1.3 Ammonium Transporter: nicht-erythroides Rhesus-Glycoprotein B/C

Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass das humane nicht-erythroide Glycoprotein B (**RhBG**) und das humane nicht-erythroide Glycoprotein C (**RhCG**) sowie ihre aus anderen Säugetieren stammenden Homologen Rhbg/Rhcg fähig sind, Ammonium über die Zellmembran zu transportieren. Sie gehören zur **Amt/MEP/Rh Familie** von Ammoniumtransportern und bilden eine Pore aus 11 (Bakterien) bzw. 12 (Säuger) transmembranären Helices. Der N- und C-Terminus befinden sich in der Zelle (Abb. 4-1 A).²²⁷⁻²³⁰ Die Verwandten bakteriellen Ammonium-Kanäle AmtB wurden aus *Aquifex aeolicus* und *Escherichia coli* isoliert und nachfolgend kristallisiert. Da diese Kanäle Ammonium vermutlich in Form von NH_3 und nicht NH_4^+ transportieren, führen sie zu einer intrazellulären Alkalisierung (Abb. 4-1 B).^{231,232} Nach anderen Untersuchungen wird behauptet, dass Ammonium in Form von NH_4^+ durch die Ammoniumkanäle transportiert wird.²³³

Während das eng verwandte humane Rhesus-Glycoprotein A (RhAG) ausschließlich auf roten Blutkörperchen vorkommt, werden RhBG und RhCG auch in anderen Geweben exprimiert, in denen Ammoniumtransport stattfindet.^{234,235} Die Expression von RhBG konnte in der Leber, den Nieren, dem Magen, dem Darm und der Haut nachgewiesen werden. mRNA, die für RhCG codiert, wurde in Hoden, Nieren, Leber, Magen, Darm und Nervensystem gefunden. RhBG und RhCG sind am Ammoniumtransport in der Niere beteiligt und spielen eine Rolle bei der Erhaltung des Säure-Base-Gleichgewichts und bei einigen Funktionen des Gastrointestinal-Trakts.^{87,236,237}

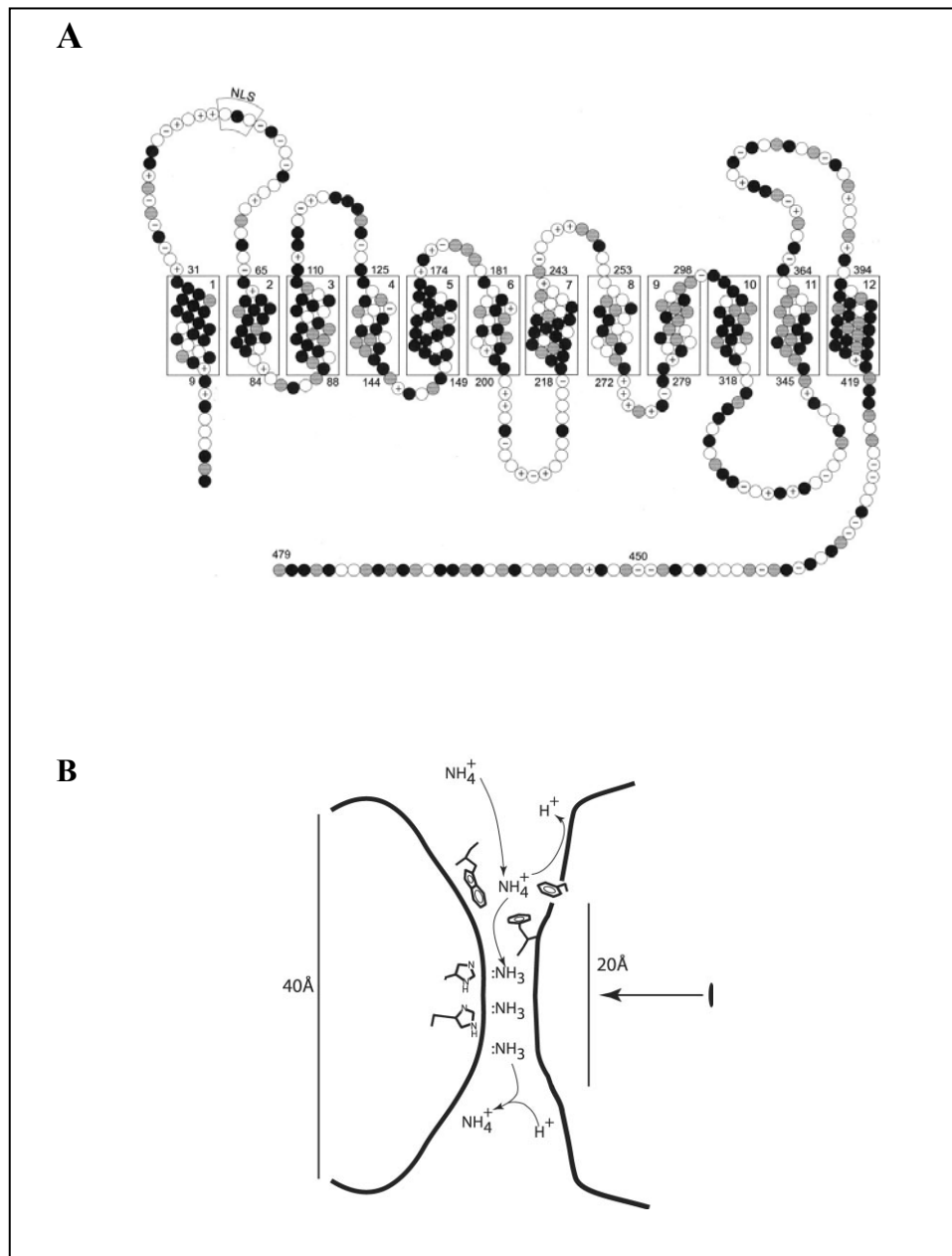


Abb. 4-1: Struktur der Amt/MEP/Rh Ammonium-Transporter **A:** Mögliche Struktur von RhCG/Rhcg. Das Protein besteht aus 479 AS, die 12 transmembranäre Domänen ausbilden. Schwarze Kreise stellen hydrophobe Aminosäuren dar (Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp), graue Kreise stehen für Gly, Ala und Pro, weiße für polare Aminosäuren (Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, Tyr). Die positiv geladenen Aminosäuren (Lys, Arg, His) sind mit einem +, die negativ geladenen (Asp, Glu) mit einem – gekennzeichnet.²²⁷ **B:** Transportmechanismus der Ammonium-Kanäle. NH_4^+ wird beim Eintritt in den Kanal deprotoniert und beim Austritt ins Zellinnere wieder protoniert.²³¹

4.2 Calciummobilisierung durch Hexokinase-Lösung

Dr. Marko Kaulich hatte in seiner Arbeit festgestellt, dass **1321N1-Astrozytomzellen** auf die Injektion von Hexokinase-Lösung hin mit intrazellulären Calciumanstiegen reagieren. Dieser Effekt konnte nicht in der neuronalen Zelllinie **NG108-15** (Hybridoma-Zelllinie aus Maus-Neuroblastom \times Ratten-Gliom) beobachtet werden.^{238,239} NG108-15-Zellen werden standardmäßig als Modelle für neuronale Zellen verwendet. Die Ursachen des Hexokinase-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs wurden in dieser Arbeit näher untersucht.

4.2.1 Intrazelluläre Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen

Durch Injektion von Hexokinase-Lösung kam es in 1321N1-Astrozytomzellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green BAPTA1/AM (OG) (s. 6.6) beladen waren, zu konzentrationsabhängigen intrazellulären Calciumanstiegen, bei denen ein EC_{50} -Wert von $3,44 \pm 0,37$ U/ml erreicht wurde (Abb. 4-2).

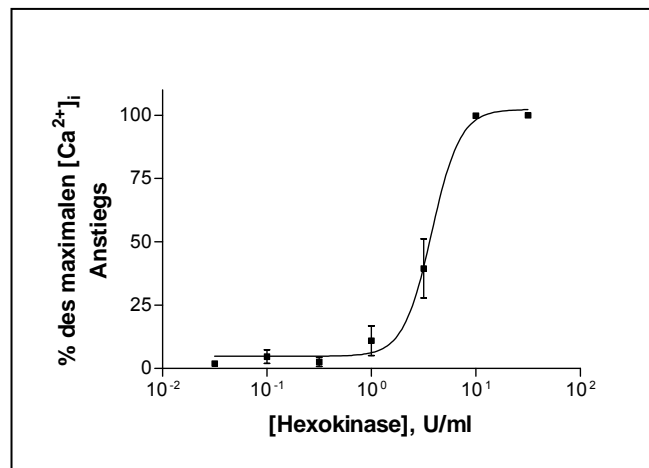


Abb. 4-2: Hexokinase-induzierte intrazelluläre Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen. Die Zellen wurden mit dem calciumsensitiven Farbstoff Oregon Green BAPTA1/AM beladen, und es wurden verschiedene Konzentrationen einer Hexokinase-Lösung injiziert. $EC_{50} = 3,44 \pm 0,37$ U/ml ($n = 3$).

Es wurden weitere Enzymlösungen untersucht, die zu ähnlichen Ergebnissen führten. Hierzu gehörten Hexokinase-Lösungen anderer Firmen sowie Lösungen von Phosphokinase und HSVI-Kinase. Da das Protein Hexokinase keine direkten Auswirkungen auf Astrozytomzellen haben sollte, erschien es wahrscheinlich, dass die Calciumanstiege durch eine Verunreinigung in der Hexokinase hervorgerufen wurden. Die Zellen tragen die folgenden, endogen exprimierten Rezeptoren, die zu intrazellulären Calciumanstiegen führen könnten: G-Protein-gekoppelter Histamin H_1 -Rezeptor und muscarinischer M3-Rezeptor.^{21,22,240,241} Zudem wurden auf den Astrozyten der Ratte und der humanen Astrozytom-Zelllinie MOGGCCM Glutamat-Rezeptoren detektiert, die auch auf den 1321N1-Zellen vorkommen könnten. Hierzu gehören NMDA- (N-methyl-D-aspartat) Rezeptoren, Kainat-Rezeptoren und AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat) Rezeptoren, die Ionenkanäle darstellen.^{66,242,243}

In einem Vorversuch wurden im Vergleich Injektionen verschiedener Substanzen (Histamin, Glutamat, Glycin, Acetylcholin) zu 1321N1-Astrozytomzellen vorgenommen. Histamin, und Acetylcholin führten in Konzentrationen von 1, 10 und 100 μ M zu konzentrationsabhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen. Natriumglutamat induzierte in einer Konzentration von 1 mM ebenfalls eine leichte intrazelluläre Calciummobilisierung. Die Kurvenverläufe schienen sich jedoch von den durch Hexokinase induzierten Verläufen zu unterscheiden (Abb. 4-3). Die Injektion von Glycin hatte keinen Calciumanstieg zur Folge.

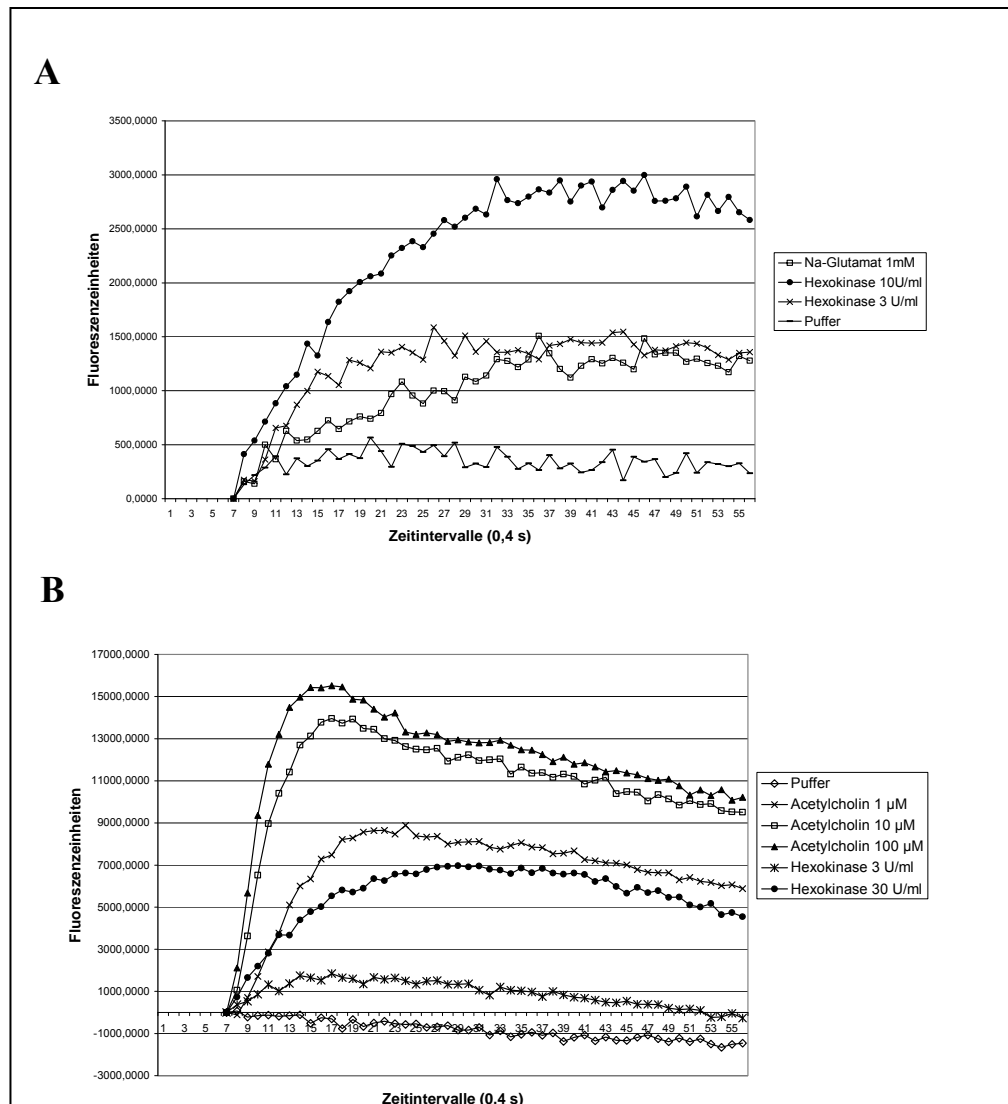


Abb. 4-3: Hexokinase, Glutamat und Acetylcholin induzieren $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in 1321N1 Astrozytomzellen. Die Zellen wurden mit OG beladen, und verschiedene Konzentrationen von Hexokinase-Lösung, Natriumglutamat und Acetylcholin wurden zu der Zellsuspension injiziert. **A:** Fluoreszenzanstiege, die durch Natriumglutamat bzw. Hexokinase ausgelöst wurden. **B:** Fluoreszenzanstiege, die durch Acetylcholin bzw. Glutamat ausgelöst werden (n = 1-2).

1321N1-Zellen wurden mit jeweils 3 μ M und 100 μ M des AMPA-/Kainat-Rezeptor Antagonisten CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion) und dem allosterischen AMPA-Rezeptor Antagonisten GYKI 52466 (1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine Hydrochlorid) vorinkubiert (Abb. 4-4). Die Hexokinase-vermittelten intrazellulären Calciumanstiege wurden hierdurch nicht inhibiert.

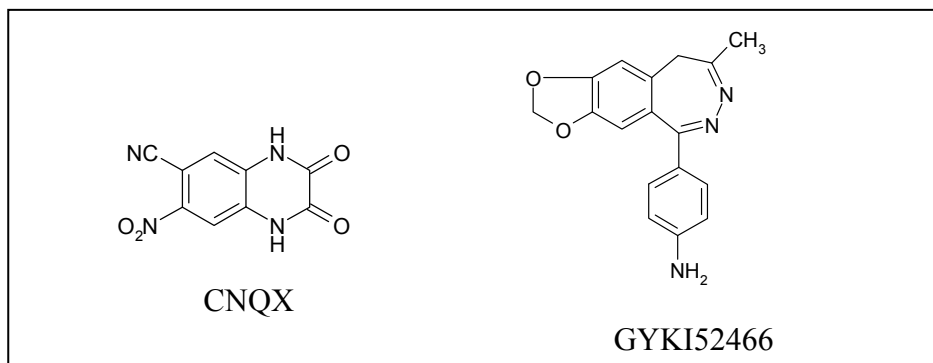


Abb. 4-4: CNQX, GYKI 52466

4.2.2 Auftrennung der Hexokinase-Lösung mittels Millipore-Centricon® Filtern und SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Mittels Millipore-Centricon® Filter Devices können Proteinlösungen nach ihrer Größe fraktioniert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt kann das auf der Membran des Filters verbleibende Protein in Puffer aufkonzentriert werden, die durchgeflossene Substanz wird weiter verwendet. Zur Auftrennung der Hexokinase-Lösung wurden Filter für die Proteingrößen 10 kDa und 3 kDa verwendet. Hieraus ergaben sich drei zu testende Fraktionen: >10 kDa, 3-10 kDa und <3 kDa. Die Hexokinase hat eine Molmasse von 50 kDa und sollte somit in der Fraktion >10 kDa verbleiben.^{244,245}

Wie sich nach SDS-PAGE-Gelelektrophorese herausstellte, verlief die Abtrennung der Hexokinase vollständig (Abb. 4-5). In den Spuren 1 und 2 (Hexokinase und Fraktion >10 kDa) wurde Hexokinase mit einer erwarteten Größe von 50 kDa detektiert. Keine Banden traten in den kleineren Fraktionen (Spuren 3 und 4) auf. Es waren auch keine kleineren Proteineinheiten oder peptidische Verunreinigungen auf dem Gel zu erkennen. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbung und mit der empfindlicheren Silberfärbung behandelt (s. 6.7).

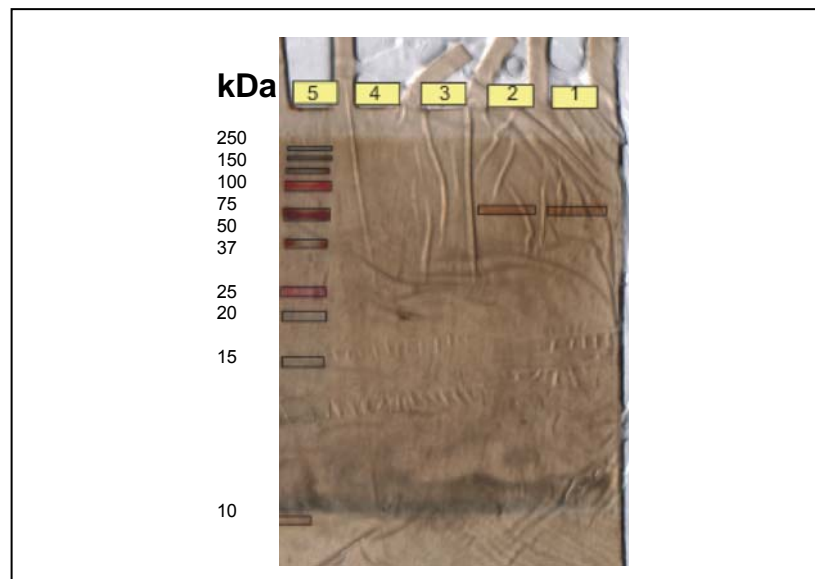


Abb. 4-5: Auftrennung der fraktionierten Hexokinase-Lösung mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese. Das Gel wurde mit Silber-Färbung behandelt. 1. Hexokinase, 2. Fraktion >10 kDa, 3. Fraktion 3-10 kDa, 4. Fraktion <3 kDa. In den Spuren 1 und 2 ist Hexokinase mit Banden der Größe 50 kDa zu erkennen.

4.2.3 $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung durch die Fraktionen der Hexokinase-Lösung

Die drei Fraktionen der Hexokinase-Lösung wurden auf ihr Potential untersucht, in 1321N1-Astrozytomzellen $[Ca^{2+}]_i$ Anstiege zu verursachen. In fluorimetrischen Calciummessungen kam es nach Injektion der Fraktion <3 kDa zu starken, konzentrationsabhängigen Anstiegen. In der Fraktion 3 - 10 kDa waren nur sehr schwache Anstiege zu erkennen, die vermutlich dadurch zustande kamen, dass nicht alle Ca^{2+} -Anstiege-induzierenden Substanzen entfernt worden waren. In der Fraktion >10 kDa waren keine Anstiege zu beobachten, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem Ca^{2+} -induzierenden Agens um ein kleines Molekül handelt.

4.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung der aktiven Centricon®-Fraktion

Durch eine Untersuchung der kleinsten Fraktion der Hexokinase-Lösung mit einem Massenspektrometer sollte untersucht werden, ob sich eine niedermolekulare Verunreinigung in der Fraktion <3 kDa befindet, und welche Struktur sie haben könnte. Die Untersuchung wurde von Frank Umbach durchgeführt, der keine Verunreinigungen in der Lösung detektieren konnte.

4.3 Zusammenfassung und Diskussion

In 1321N1-Astrozytomzellen, nicht jedoch in NG108-15-Zellen wurden intrazelluläre Calciumanstiege durch die Injektion von Enzymlösungen zu den Zellen ausgelöst. Diese wurden mittels fluorimetrischer Calciummessungen im 96-well Format untersucht. Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ war konzentrationsabhängig und sättigbar und zeigte für Hexokinase-Lösung einen EC_{50} -Wert von 3,44 U/ml.

Auf Grund der Vermutung, dass es sich bei der Ca^{2+} -Anstiege-induzierenden Substanz um eine Verunreinigung in den untersuchten Enzymlösungen handelte, wurden verschiedene Agonisten für unterschiedliche Rezeptoren, die durch ihre Aktivierung zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führen, untersucht. Acetylcholin, Histamin und Glutamat führten zu intrazellulären Calciumanstiegen in 1321N1-Zellen, der Verlauf und das Ausmaß der erhaltenen Fluoreszenz-Zeit-Kurven schien sich jedoch von dem Charakter der Hexokinase-Kurven zu unterscheiden. Glycin zeigte keine Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in den Zellen. Um eine Beteiligung des AMPA- oder Kainat-Rezeptors auszuschließen, wurden Calciummessungen in Anwesenheit der AMPA/Kainat Antagonisten CNQX und GYKI 52466 durchgeführt. Diese hatten jedoch keine inhibitorische Wirkung auf die Hexokinase-induzierten Ca^{2+} -Anstiege.

Auch viele peptidische Liganden können zu intrazellulären Calciumantworten führen. Diese kann z.B. über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Bradykinin oder Endothelin vermittelt werden.^{246,247} Eine Auftrennung der Hexokinase-Lösung in 3 Fraktionen (>10 kDa, 3-10 kDa, <3 kDa) und anschließende Analyse mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese zeigte, dass keine detektierbaren Mengen peptidischer Verunreinigungen in der Enzymlösung vorlagen. Da die Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ hauptsächlich durch die kleinste Fraktion ausgelöst wurden, handelt es sich bei der gesuchten Substanz vermutlich um eine niedermolekulare Verunreinigung der Lösung. Diese war jedoch nicht in einer massenspektrometrischen Analyse der Fraktion detektierbar.

4.4 Ammonium-induzierte intrazelluläre Calciumanstiege

4.4.1 Effekte von Ammoniumsulfat auf 1321N1-Astrozytomzellen

In 1321N1-Astrozytomzellen hatte die Injektion von **Ammoniumsulfat**, das in hohen Konzentrationen im Puffer der o. g. Enzyme vorkommt, starke Auswirkungen auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Mit dem Farbstoff Oregon Green BAPTA1/AM beladene Zellen zeigten konzentrationsabhängig und zeitlich begrenzt erhöhte Ca^{2+} -Spiegel, bei denen ein EC_{50} -Wert von $3,19 \pm 0,53$ mM ermittelt wurde (Abb. 4-6, 4-7 A). Ein maximaler, gesättigter Effekt wurde ab Konzentrationen von 30 mM erreicht.

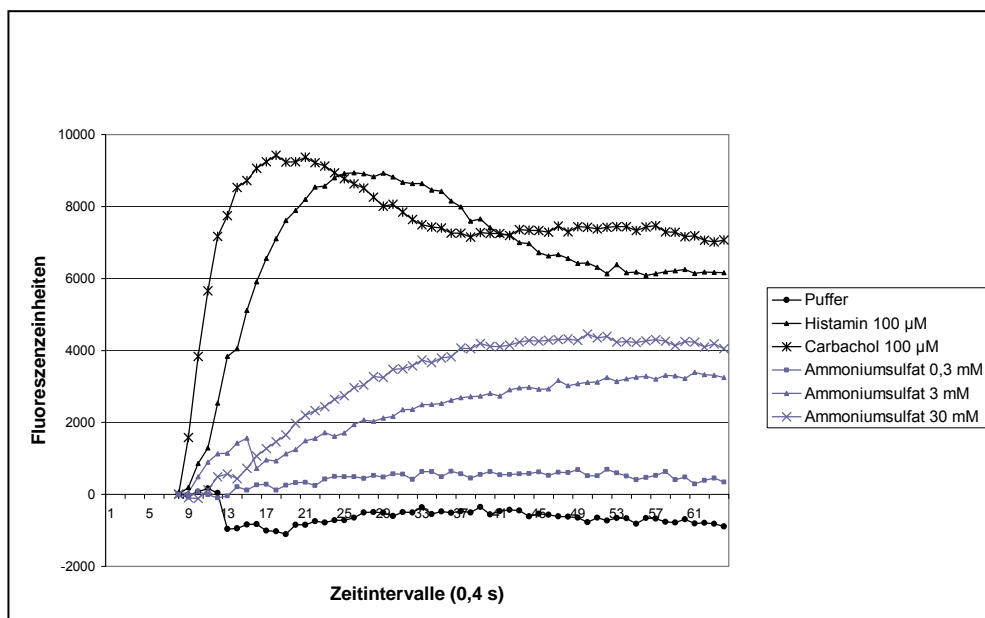


Abb. 4-6: 1321N1-Astrozytomzellen wurden mit Oregon Green BAPTA1/AM beladen und verschiedene Substanzen wurden in die Zellsuspension injiziert. Die Fluoreszenz wurde für 65 Intervalle à 0,4 s gemessen. Durch Ammonium induzierte Calciumanstiege waren konzentrationsabhängig aber deutlich geringer als die durch die GPCR-Agonisten Carbachol und Histamin ausgelösten Anstiege (n = 3-5).

Die entsprechenden Konzentrationen an Natriumsulfat hatten keinen Effekt an 1321N1-Astrozytomzellen. Wie oben beschrieben, hatte die Injektion von Ammoniumsulfat bzw. Hexokinase-Lösung zu NG108-15-Zellen keine Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$.

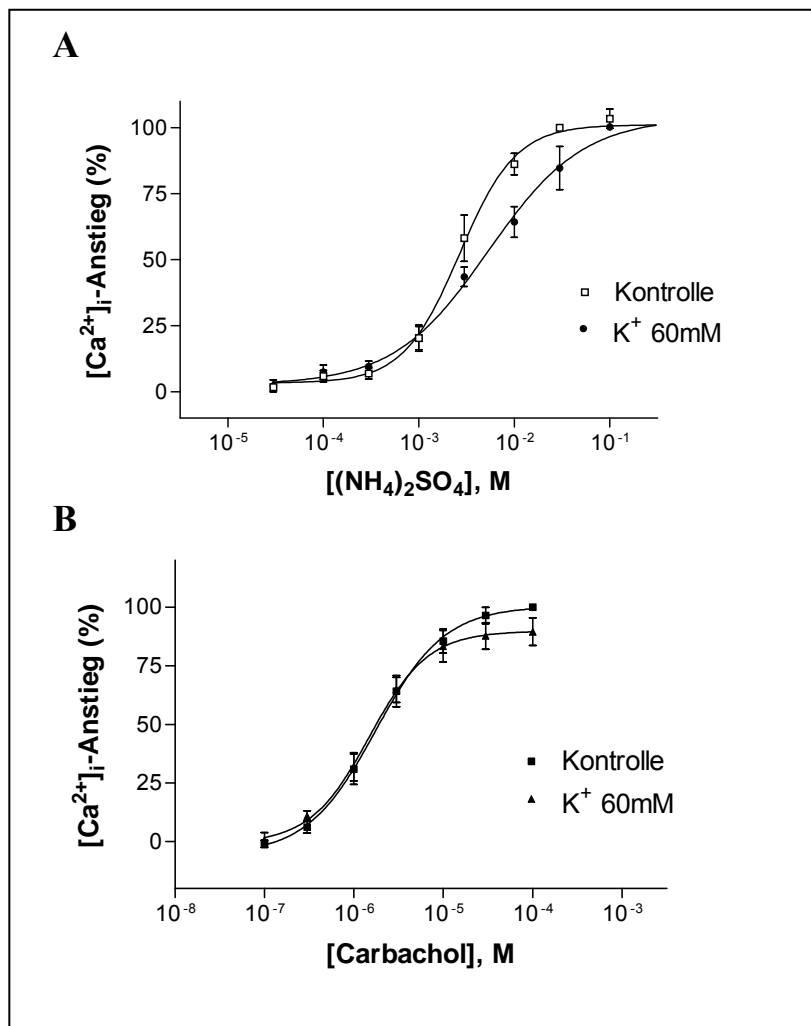


Abb. 4-7: Auswirkungen von Kaliumchlorid auf die Ammonium-induzierte Calciumfreisetzung in 1321N1-Astrozytomzellen. **A:** Die Ammonium-induzierte Calciumfreisetzung wurde in Gegenwart und in Abwesenheit von 60 mM Kaliumchlorid vermessen. In Abwesenheit von KCl wurde ein EC_{50} -Wert von $3,19 \pm 0,53$ mM ermittelt ($n = 5$). Nach einer Vorinkubation der Zellen mit KCl war der EC_{50} -Wert signifikant auf $5,61 \pm 0,93$ mM erhöht ($n = 3$, $p < 0,05$, ungepaarter t-Test). Die Hill-Steigung der Kurve wurde durch KCl verringert (1,48 vs. 0,88). 100% entspricht dem maximalen Effekt, der durch 30 mM Ammoniumsulfat (60 mM NH_4^+) hervorgerufen wurde. **B:** Der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg, der durch Carbachol ausgelöst wird, wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von 60 mM KCl vermessen. Der EC_{50} -Wert ohne Kalium betrug $1,97 \pm 0,51$ μ M, in Anwesenheit von K^+ $1,58 \pm 0,39$ μ M ($n = 4$), der Unterschied war nicht signifikant.

4.4.2 Zeitlicher Kurvenverlauf und Ausmaß der Ca^{2+} -Freisetzung

Als Vergleich wurden die durch die G_q -gekoppelten Histamin H_1 - und Muscarin M_3 -Rezeptoren ausgelösten intrazellulären Calciumanstiege betrachtet. Diese Rezeptoren werden endogen von 1321N1-Zellen exprimiert.^{22,240} Die Stimulation der Zellen mit dem M_3 -Rezeptor-Agonisten Carbachol und dem H_1 -Rezeptor-Agonisten Histamin führten zu ähnlichen Calciumantworten, die bei etwa $100 \mu M$ maximal waren (Abb. 4-6). Der maximale durch Ammonium ausgelöste Effekt war deutlich geringer. Zudem waren die Effekte von Histamin und Carbachol im untersuchten Zeitraum von 24 Sekunden nicht wieder abgesunken sondern erreichten nach 14 Sekunden ein Plateau, das auf Calcium-induzierten Calciumeinstrom zurück zu führen ist. Der durch Ammonium ausgelöste Ca^{2+} -Anstieg erreichte nach etwa 30 s wieder den Ausgangszustand.

Im Vergleich zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei denen ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal schon nach sehr kurzer Zeit beobachtet wird, ruft Ammonium einen deutlich langsameren Effekt hervor (Abb. 4-8). Nach der Injektion von Carbachol ($100 \mu M$) vergingen 7,6 s, bis maximale Calciumspiegel erreicht waren. Bei einer Histamin-Injektion ($100 \mu M$) waren es 9,0 s. Ammoniumsulfat hingegen führte erst nach 12,1 s (3 mM) bzw. 12,7 s (30 mM) zu maximalen Effekten.

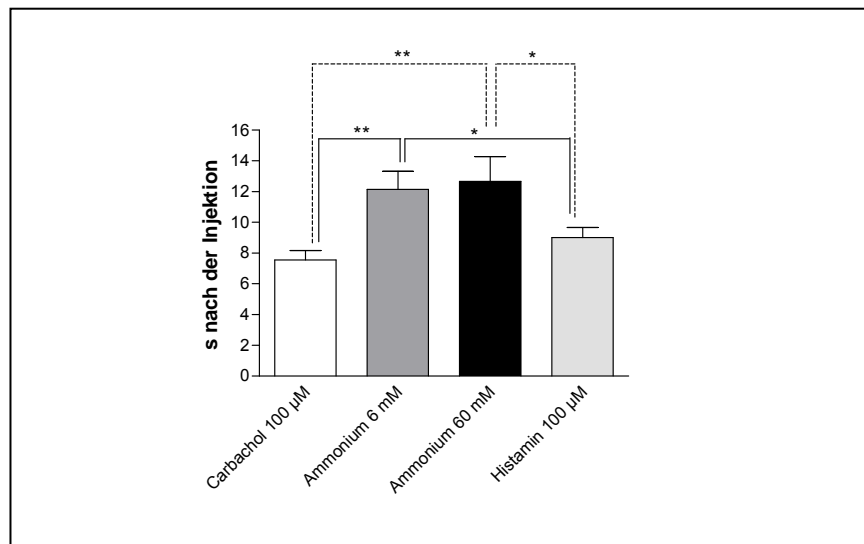


Abb. 4-8: Zeitintervall bis zum Erreichen maximaler Calciumeffekte. Nach Injektion von $100 \mu M$ Carbachol zu 1321-Astrozytomzellen wurden nach $7,6 \pm 0,6$ s ($n = 9$) maximale Calciumspiegel erreicht. Nach der Injektion von $100 \mu M$ Histamin betrug das Intervall $9,0 \pm 0,6$ s ($n = 15$). Ammoniumsulfat verursachte signifikant langsamer auftretende Ca^{2+} -Anstiege, die ihr Maximum für 6 mM Ammonium (3 mM Ammoniumsulfat) nach $12,1 \pm 1,2$ s ($n = 6$) und für 60 mM Ammonium (30 mM Ammoniumsulfat) nach $12,7 \pm 1,7$ s ($n = 6$) erreichten. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ungepaarter t-Test)

4.5 Inhibition durch Kalium-Ionen

Der Mechanismus, über den Ammonium in die Zelle gelangt, ist nicht klar. Es wäre möglich, dass Ammonium die Kanäle anderer Ionen mit benutzt. Der Radius von Ammonium- und Kalium-Ionen ist sehr ähnlich, was vor allem für die hydratisierte Form der Ionen zutrifft. Daher besteht die Möglichkeit, dass NH_4^+ und K^+ über den selben Transporter in die Zelle gelangen.²¹⁵ Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden 1321N1-Zellen mit 60 mM KCl vorinkubiert, welches ggf. kompetitiv den Eintritt von Ammonium in die Zelle hemmen kann. Der Effekt von Ammonium wurde durch K^+ nicht verhindert, jedoch kam es zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von Ammoniumsulfat (Abb. 4-7 A). Der EC_{50} -Werte wurde durch KCl von 3,19 mM auf 5,61 mM erhöht. Die Hill-Steigung der Kurve verringerte sich von 1,48 auf 0,88. Der M3-Rezeptor-Agonist Carbachol zeigte im Vergleich keine beeinflusste Dosis-Wirkungskurve in Anwesenheit von 60 mM KCl (Abb. 4-7 B).

4.6 Effekte anderer Ammoniumsalze

Andere Ammoniumsalze (Ammoniumcarbonat, -acetat, -chlorid) sowie Trimethylammoniumchlorid und Tetramethylammoniumchlorid wurden auf ihre Fähigkeit, intrazelluläre Ca^{2+} -Anstiege in 1321N1-Astrozytomzellen hervorzurufen, untersucht. Alle Salze wurden in drei verschiedenen Ammoniumkonzentrationen getestet: 0,6 mM, 6 mM und 60 mM. Der extrazelluläre pH-Wert, der im Experiment in der Zellumgebung vorlag, wurde durch Lösen der entsprechenden Konzentrationen in Krebs-Hepes-Puffer (eingestellter pH-Wert: 7,4) untersucht (Tab. 4-1). Die pH-Werte unterschieden sich abhängig vom pK_a -Wert der konjugierten Säure und dem pK_b -Wert des Anions. Ammoniumsulfat, -chlorid und -acetat veränderten den pH-Wert selbst in hohen Konzentrationen kaum. Ammoniumcarbonat hingegen steigerte den pH-Wert in Konzentrationen von 6mM Ammonium auf 7,61, in Konzentrationen von 60 mM auf 8,53. Die methylierten Ammoniumderivate führten lediglich in hohen Konzentrationen (60 mM) zu leicht erniedrigten pH-Werten von 7,11 für Trimethylammoniumchlorid und 7,18 für Tetramethylammoniumchlorid.

Tab. 4-1: Extrazelluläre pH-Werte nach Injektion verschiedener Ammoniumsalze zu 1321N1-Astrozytomzellen, die in Krebs-Hepes-Puffer (pH = 7,4) suspendiert waren.

Ammoniumsalz	pH \pm SEM (n=3-6)			pK _a Wert der konjugierten Säure ^a
	0,6 mM	6 mM	60 mM	
Ammoniumsulfat	n.s. ^b	n.s.	n.s.	< 0
Ammoniumcarbonat	n.s.	7,61 \pm 0.01	8,53 \pm 0.01	6,35
Ammoniumacetat	n.s.	n.s.	n.s.	4,75
Ammoniumchlorid	n.s.	n.s.	n.s.	< 0
Trimethylammonium- chlorid	n.s.	n.s.	7,11 \pm 0.03	< 0
Tetramethylammonium- chlorid	n.s.	n.s.	7,18 \pm 0.04	< 0

^a Werte bei Raumtemperatur. Der pK_b von NH₃ beträgt 4,75, der pK_b von Trimethylammin 4,26.

^b nicht signifikant unterschiedlich gegenüber Puffer.

Der durch Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid und Ammoniumcarbonat ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war sehr ähnlich und wurde nicht durch den extrazellulären pH-Wert beeinflusst (Abb. 4-9). Ammoniumacetat zeigte in Konzentrationen von 0,6 mM und 6 mM ähnliche Effekte, war aber in hohen Konzentrationen (60 mM) wenig aktiv und induzierte nur etwa 25% des Effekts der anderen Ammoniumsalze. Tetramethylammoniumchlorid hatte nahezu keine Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$ in 1321N1-Astrozytomzellen.

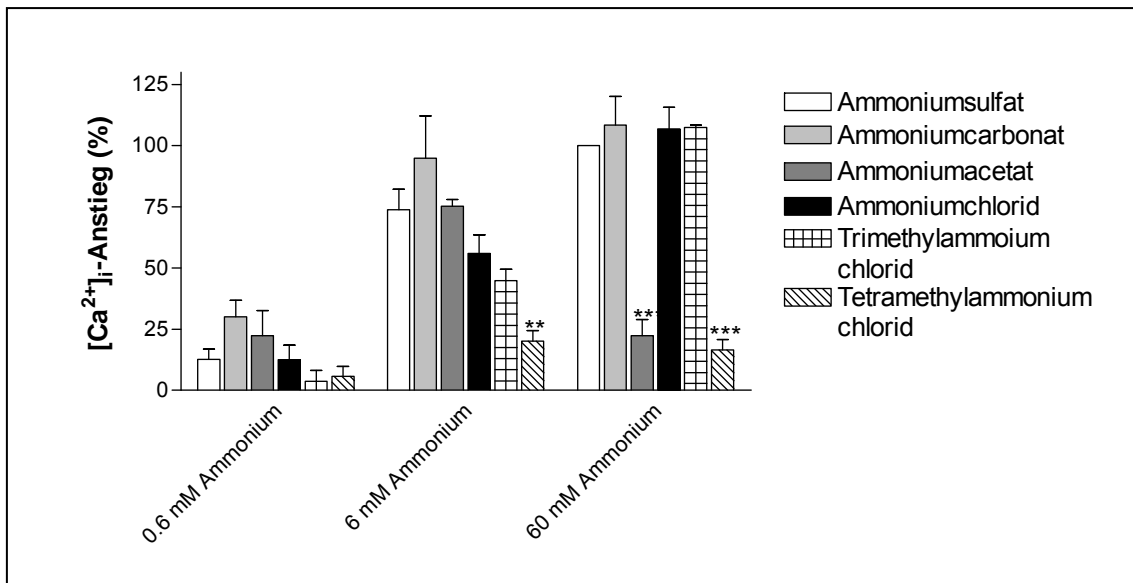


Abb. 4-9: Effekte verschiedener Ammoniumsalze auf die intrazelluläre Calciumausschüttung in 1321N1-Astrozytomzellen. Die Salze wurden jeweils in den Konzentrationen, die 0,6 mM, 6 mM und 60 mM Ammonium entsprechen, zu den Zellen gegeben. Der durch Ammoniumsulfat 30 mM ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg entspricht 100%. Die Salze verhielten sich ähnlich. Ammoniumacetat löste in hohen Konzentrationen signifikant geringere Calciumanstiege aus, Tetramethylammoniumchlorid war kaum aktiv ($n = 3-5$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ungepaarter t-Test).

4.7 Inhibition durch Natriumacetat

Da hohe Konzentrationen von Ammoniumacetat zu einer verringerten Mobilisierung von Calcium-Ionen führten, wurde überprüft, ob Acetat generell inhibitorisch auf die Ammonium-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wirkt (Abb. 4-10 A). Durch die Vorinkubation von 1321N1-Astrozytomzellen mit 60 mM Natriumacetat wurden die intrazellulären Calciumanstiege signifikant um 21% bzw. 38% (6 mM Ammonium bzw. 60 mM Ammonium) gehemmt. Natriumacetat hatte dagegen keine inhibitorische Wirkung auf die intrazelluläre Freisetzung aus dem ER, die durch 100 μ M Histamin induziert wurde.

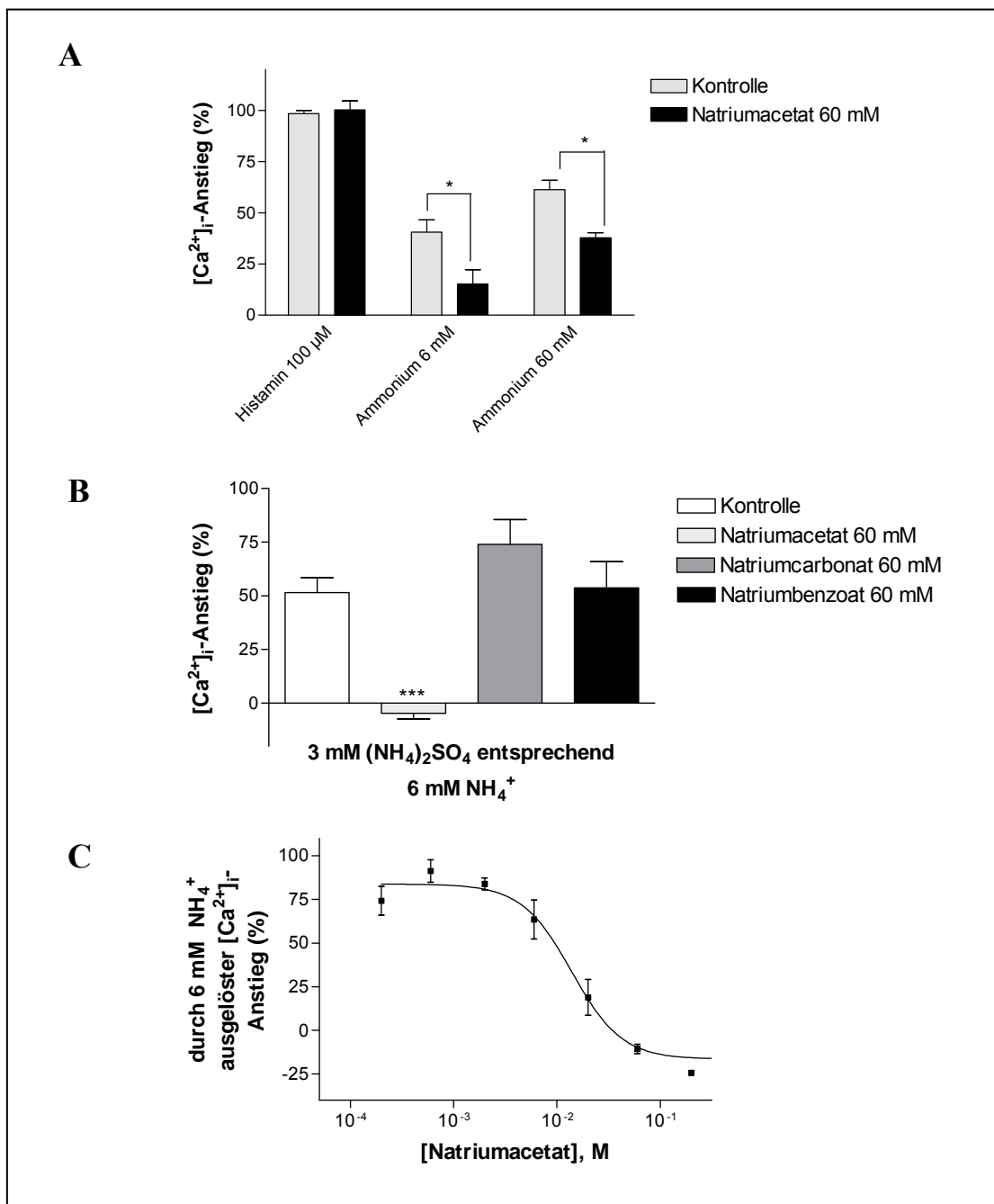


Abb. 4-10: Effekte von Acetat auf die durch Ammonium und Histamin ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege **A:** Nach der Vorinkubation von 1321N1-Astrozytomzellen mit 60 mM Natriumacetat wurden 100 µM Histamin oder 6 mM / 60 mM Ammonium zu der Zellsuspension injiziert. Der Histamin-Effekt wurde nicht inhibiert, der Ammonium-Effekt wurde gehemmt. (n = 4; * p<0,05) Der durch 100 µM Histamin ausgelöste Effekt wurde gleich 100%-Wert gesetzt. **B:** Die gleichzeitige Applikation von Acetat und Ammonium führte zu einer stärkeren Hemmung des Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$. Natriumcarbonat und Natriumbenzoat hatten keine inhibitorische Wirkung (n = 3-5; *** p<0,001). **C:** Dosisabhängige Hemmung der durch 6 mM Ammonium ausgelösten intrazellulären Ca^{2+} -Anstiege durch Natriumacetat; $IC_{50} = 16,5 \pm 2,9$ mM (n = 5).

Durch die vorherige Mischung und gleichzeitige Applikation von Natriumacetat und Ammoniumsulfat wurde ein größerer hemmender Effekt erzielt. 6 mM Ammonium war in Gegenwart von 60 mM Natriumacetat völlig inaktiv. Es wurden weiterhin die sauren Salze Natriumbenzoat und Natriumcarbonat untersucht, die keine Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung durch Ammonium hatten (Abb. 4-10 B).

Bei gleichzeitiger Injektion von 6 mM Ammonium (3 mM Ammoniumsulfat) mit verschiedenen Acetatkonzentrationen wurde eine dosisabhängige Hemmung der intrazellulären Calciumanstiege beobachtet, bei der ein IC_{50} -Wert von 16,5 mM Natriumacetat bestimmt wurde (Abb. 4-10 C).

4.8 Mechanismus der Calciumfreisetzung in 1321N1-Astrozytomzellen

Um den Mechanismus der durch Ammonium ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege näher zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob das Calcium durch Kanäle aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol einströmt oder intrazellulär freigesetzt wird, was einen Calciumeinstrom zur Folge haben kann. Zu diesem Zweck wurden Calciummessungen an 1321N1-Astrozytomzellen in calciumfreiem Puffer, der 100 μ M EGTA enthielt, durchgeführt. In diesem Puffer führte die Injektion von Ammoniumsulfat zu einer intrazellulärer Calciumfreisetzung (Abb. 4-11 A, B). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Calciumkurven in Ca^{2+} -haltigem und Ca^{2+} -freiem Puffer festgestellt. Zum Vergleich wurden die Auswirkungen von calciumfreiem Puffer auf die Freisetzung von Ca^{2+} durch IP_3 -Rezeptoren mittels Histamin-Injektion untersucht.

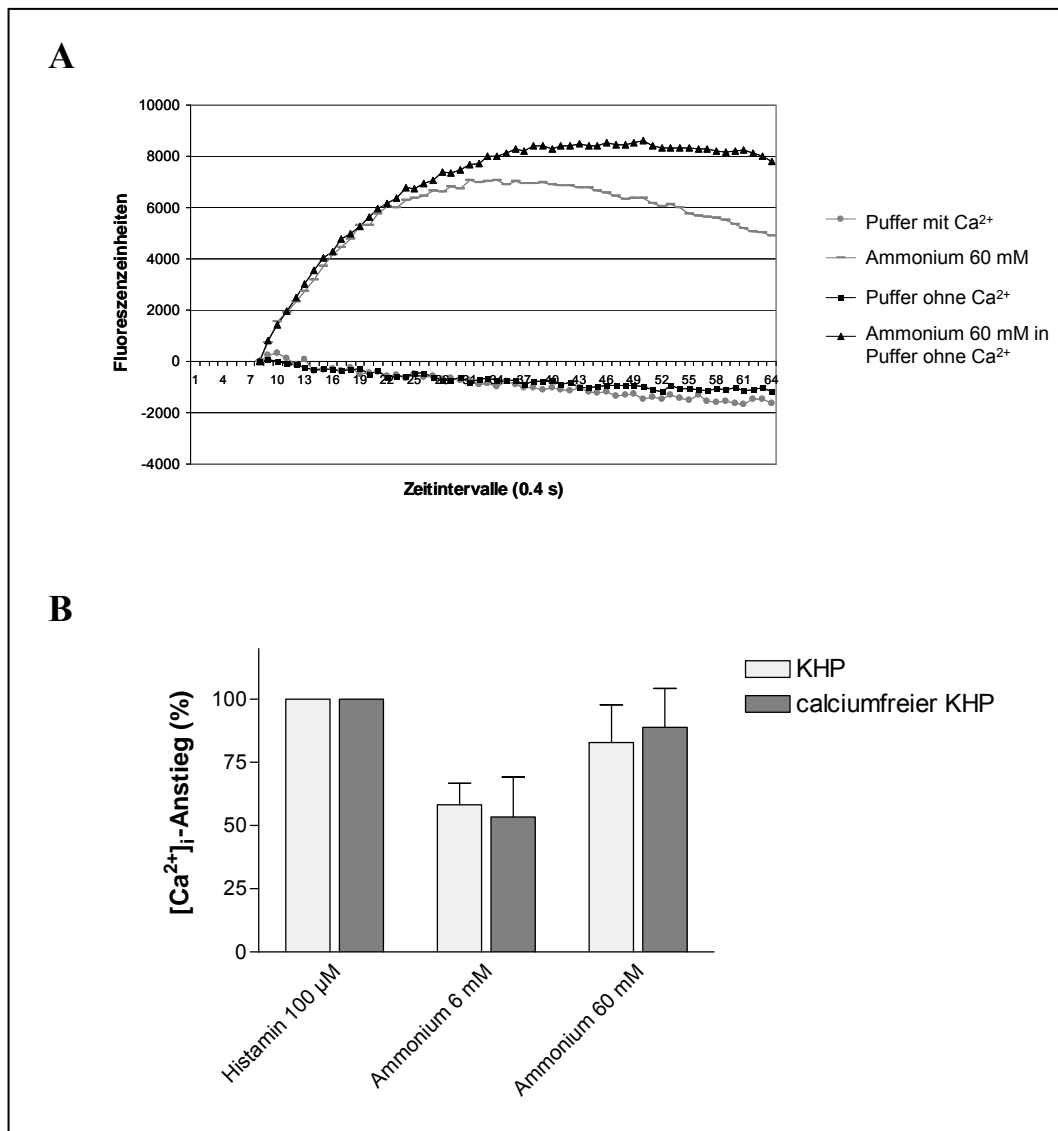


Abb. 4-11: In Anwesenheit und Abwesenheit von Ca^{2+} verursachen Ammonium und Histamin Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen **A:** Beispiel für intrazelluläre Calciumanstiege durch 60 mM Ammonium (30 mM Ammoniumsulfat) in Krebs-Hepes-Puffer (KHP) und calciumfreiem Krebs-Hepes-Puffer mit 100 μ M EGTA. **B:** Calciumanstiege in calciumhaltigem und calciumfreiem KHP durch Histamin 100 μ M, Ammonium 6 mM und Ammonium 60 mM sind nicht signifikant unterschiedlich. Der Effekt von 100 μ M Histamin wurde gleich 100% gesetzt (n = 4).

Um festzustellen, ob Calcium aus demselben Speicher (ER) oder aus einem anderen Zellorganell freigesetzt wird, als dies bei der Stimulation mit Histamin der Fall ist, wurden zu einer Konzentration von Ammonium, die maximale Effekte auslöst (60 mM) Histamin oder Carbachol zugegeben. Es konnte kein additiver Effekt festgestellt werden. Die Calciumfreisetzung wurde durch die GPCR-Agonisten sogar gegenüber der maximal erreichbaren Mobilisierung durch Histamin oder Carbachol gesenkt. Abbildung 4-12 zeigt exemplarisch Kurvenverläufe für Histamin. Carbachol zeigte ähnliche Effekte.

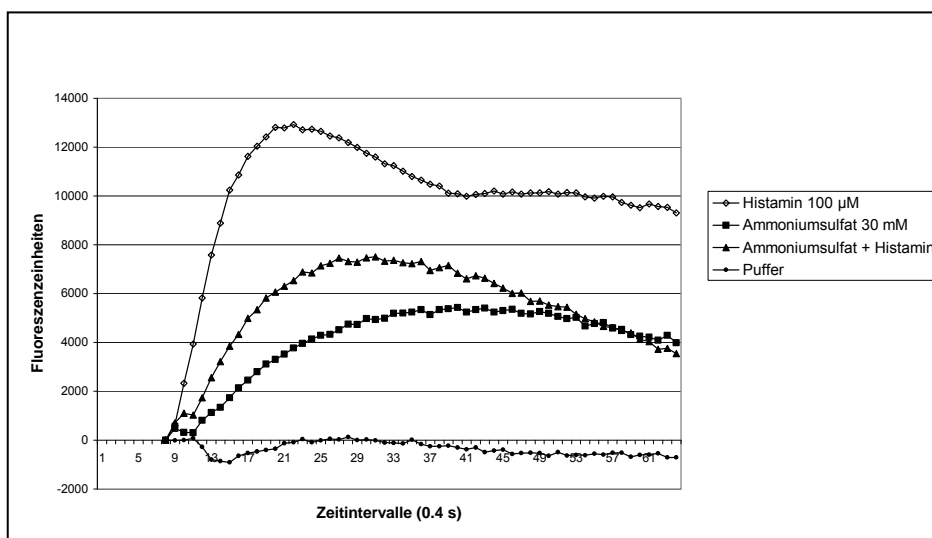


Abb. 4-12: Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen nach Injektion von 100 µM Histamin, 30 mM Ammoniumsulfat (60 mM Ammonium) und einer Mischung aus 100 µM Histamin und 30 mM Ammoniumsulfat. Ammoniumsulfat-Zugabe verringerte die Anstiege von Histamin (Eines von vier unabhängigen Experimenten).

4.9 Detektion der Ammoniumtransporter RhBG/RhCG und Rhbg/Rhcg auf mRNA-Ebene

Es wäre möglich, dass Ammonium nicht allein über passive Diffusion sondern durch die Ammoniumtransporter RhBG und RhCG in die Zellen gelangt. Die Expression dieser Transporter wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR überprüft (s. 6.4.16). Nach Extraktion von mRNA aus 1321N1-Astrozytomzellen, NG108-15-Zellen, HEK 293-Zellen und einer Mäuseniere wurde diese durch reverse Transkription in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Da die Transporter in der Niere hoch exprimiert werden, sollte die Mäuseniere als Positivkontrolle dienen. Über HEK 293-Zellen lagen keine Informationen vor. Eine PCR mit genspezifischen Primern für RhBG, RhCG und humanem β -Actin wurde mit den cDNAs von 1321N1-Astrozytomzellen und HEK 293-Zellen durchgeführt. Mit den cDNAs der NG108-15 Zellen und der Mäuseniere wurde jeweils eine PCR zur Detektion von Rhbg, Rhcg und murinem sowie Ratten- β -Actin vorgenommen.

In 1321N1-Astrozytomzellen und HEK 293-Zellen wurde lediglich mRNA für die Positivkontrolle, β -Actin, detektiert. Die Ammoniumtransporter werden in diesen Zellen nicht exprimiert. In der Mäuseniere konnten die Transporter Rhbg und Rhcg gefunden werden und so wurde die PCR entsprechend optimiert (Annealingtemperatur, DMSO-Anteil). In NG108-15-Zellen wurde lediglich murines, nicht jedoch Ratten- β -Actin exprimiert (Abb. 4-13). Auf mRNA-Ebene konnten beide Transporter, Rhbg und Rhcg, mit entsprechenden Banden der Länge 277 bp und 250 bp detektiert werden. Die Expression von Rhbg erschien deutlich höher.

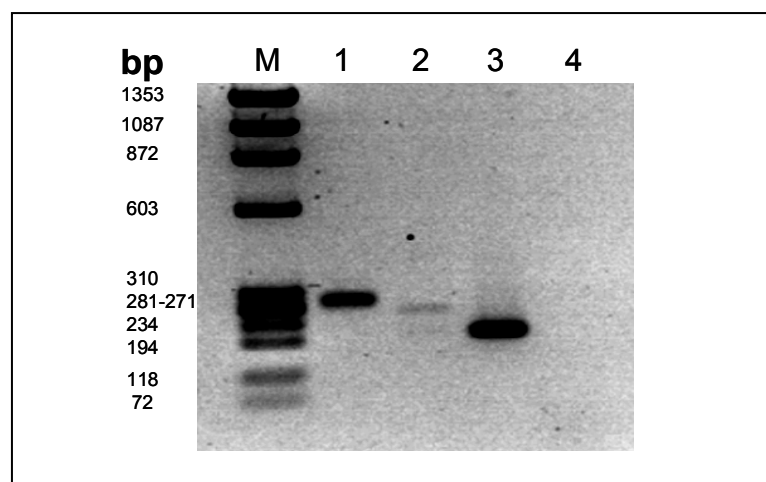


Abb. 4-13: RT-PCR mit genspezifischen Primern für Rhbg, Rhcg und murines β -Actin. mRNA wurde aus NG108-15-Zellen isoliert. M: DNA Längenstandard, 1: Rhbg, 2: Rhcg, 3: β -Actin, 4: Negativkontrolle (PCR für β -Actin mit mRNA als Templat). Fragmente der erwarteten Länge für Rhbg (277 bp), Rhcg (250 bp) und β -Actin (190 bp) wurden detektiert.

4.10 Zusammenfassung und Diskussion

Von den hohen Blutspiegeln an Ammonium, die bei dem Krankheitsbild der **Hepatischen Enzephalopathie** (HE) auftreten, sind vor allem Astrozyten negativ betroffen.^{207,208,211,217} Astrozyten können Ammonium verstoffwechseln, in dem sie über die Glutamin-Synthetase Glutamat in Glutamin umwandeln.^{206,248}

Bei der HE liegen im Hirn Ammoniumkonzentrationen von 2-5 mM vor.²⁰⁷ Diese führen in primären Astrozyten aus der Maus oder der Ratte zu transienten intrazellulären Calciumanstiegen.²⁰⁹ In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Ammonium auch in 1321N1 Astrozytomzellen zu ähnlichen Effekten kommt, bei denen sich ein EC_{50} -Wert von **3,19 mM Ammoniumsulfat** (6,38 mM Ammonium) ergibt, der in einem pathophysiologisch relevanten Bereich liegt. Maximale Effekte wurden bei einer Ammoniumkonzentration von 30 mM erreicht. Wie auch in primären Astrozyten kam es in den humanen Astrozytomzellen zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. Dies wurde an Hand von Messungen in calciumfreiem Puffer belegt, die durch Ammonium zu entsprechenden Effekten führte wie die durch den GPCR-Agonisten Histamin ausgelöste $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung (s. 1.8). Die in 1321N1-Astrozytomzellen beobachteten intrazellulären Calciumanstiege ähnelten denen in primären Astrozyten sowohl in ihrer Art als auch in ihrem Ausmaß.²⁰⁹ Dort wurde ein Effekt bei 5 mM Ammonium, nicht jedoch bei 1 mM Ammonium beobachtet. Die 1321N1-Astrozytomzellen scheinen also geringfügig sensitiver zu sein. Daher könnten diese ein geeignetes erstes **humanes Modell** zur Untersuchung der HE darstellen. Neben dem humanen Ursprung haben sie den Vorteil, dass es sich bei 1321N1-Zellen um eine leicht zu handhabende permanente Zelllinie handelt, die Tierversuche ersetzen könnte. Um diesen Modellorganismus weiter zu etablieren, sollte er auf die Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression untersucht werden, die in primären Kulturen von Maus- oder Rattenastrozyten beobachtet worden sind.^{85,216,249-251}

Zur weiteren Charakterisierung der Ammonium-induzierten Calciumfreisetzung wurde diese mit der IP_3 -vermittelten Calciummobilisierung durch Histamin und Carbachol in 1321N1-Zellen verglichen.^{241,252} Die Zielproteine der beiden Substanzen, der muscarinische M3-Rezeptor und der Histamin H_1 -Rezeptor werden endogen von den Zellen exprimiert. Neben der Tatsache, dass Ammonium in deutlich geringerem Ausmaß zu $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen führte, wurde auch das Maximum der Anstiege erst einige Sekunden später erreicht (s. 1.4). Dies spricht dafür, dass die Calciumfreisetzung nicht über denselben Mechanismus verläuft, wie das bei G_q -gekoppelten Rezeptoren der Fall ist. In Teilen könnte die Zeitverzögerung aber auch durch die Tatsache, dass Ammonium erst in die Zelle gelangen muss, bevor es einen Effekt auslösen kann, bedingt sein. Die durch Ammonium und Carbachol oder Histamin ausgelöste Ca^{2+} -Freisetzung war nicht additiv, sondern die gleichzeitige Applikation führte sogar zu einer Abnahme des PLC-gekoppelten Signals (s. 4.8). Das Signal, dass durch Ammonium ausgelöst wurde, wurde in Anwesenheit von GPCR-Agonisten geringfügig

erhöht. Zudem konnte in primären Astrozyten bereits gezeigt werden, dass durch Ammonium Calcium aus Thapsigargin-sensitiven Speichern freigesetzt wird.²⁰⁹ Es ist daher möglich, dass Ammonium das Calcium in Astrozytomzellen ebenfalls aus IP_3 -sensitiven Speichern freisetzt, vermutlich jedoch durch einen anderen Mechanismus als dies bei G_q -gekoppelten Rezeptoren der Fall ist. Eventuell ist der negative Einfluss von NH_4^+ auf die Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit für die Toxizität der Substanz verantwortlich.

Der Mechanismus, über den Ammonium in die Zelle gelangt, konnte bisher nicht geklärt werden. Drei Möglichkeiten sind denkbar: Passiver Transport von NH_3 über die Zellmembran, Aufnahme über Ionenkanäle wie z.B. Kanäle für K^+ oder Transport mittels spezieller Ammoniumtransporter. Da Ammonium und K^+ ähnliche Ionenradien besitzen, wurde eine Inhibition des Ammoniumeffekts in 1321N1 Astrozytomzellen durch 60 mM KCl untersucht. Die Calciumanstiege konnten so nicht verhindert werden, es trat jedoch eine leichte Rechtsverschiebung (1,8-fach) der Dosis-Wirkungskurve auf, was bei GPCR-vermittelten Ca^{2+} -Anstiegen nicht der Fall war (s. 1.5). Daher sind Kaliumkanäle an der Aufnahme von Ammonium beteiligt. Sie stellen jedoch nicht den Haupt-Aufnahmeweg für NH_4^+/NH_3 in die Zelle dar.

Ammonium kann passiv in die Zellen eindringen, was durch die Änderungen des intrazellulären pH-Werts nach Ammoniumapplikation gezeigt werden konnte.^{215,253} Es wäre dennoch denkbar, dass der durch Ammonium ausgelöste intrazelluläre Calciumanstieg über einen extrazellulären Angriffspunkt für das Ion vermittelt wird. NH_3 ist eine schwache Base, die unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) zu 98% in der protonierten Form vorliegt. Die deprotonierte Form kann passiv über die Zytoplasmamembran diffundieren. In dieser Arbeit wurden zwei Ammonium-Derivate untersucht, von denen eines (Trimethylammoniumchlorid) ähnlich wie Ammonium selbst deprotonierbar ist. Das andere (Tetramethylammoniumchlorid) ist permanent geladen und kann daher nicht passiv ins Zellinnere gelangen. Während Trimethylammoniumchlorid sich in Bezug auf die Calciumfreisetzung in Konzentrationen von 6 mM und 60 mM ähnlich wie Ammonium selbst verhielt, wurde durch Tetramethylammoniumchlorid kaum ein Effekt ausgelöst (s. 4.6). Daher scheint die neutrale Form, Ammoniak bzw. Trimethylamin, für die Calciummobilisierung verantwortlich zu sein. NH_3 und $(CH_3)_3N$ könnten wie oben beschrieben, passiv in die Zelle gelangen oder aktiv ins Zytoplasma transportiert werden.

Der aktive Transport könnte durch die Ammoniumtransporter der Rhesus-Glycoproteine (**RhBG** und **RhCG**) bewerkstelligt werden. Diese sind eng mit dem ausschließlich auf Erythrozyten vorkommenden RhAG (Rhesus blood group-associated glycoprotein) verwandt. RhBG wird hauptsächlich in Niere und Leber exprimiert, RhCG kommt in vielen Geweben vor.^{227,229,237} Die homologen Proteine aus Säugetieren werden Rhag, Rhbg und Rhcg genannt. Während der bakterielle Ammoniumtransporter AmtB NH_3 in die Zelle befördert,²³¹ ist noch nicht klar, ob die Rh-Proteine NH_3

transportieren oder NH_4^+ gegen H^+ austauschen. Die humanen Transporter RhBG und RhCG konnten von uns mittels genspezifischer Primer in einer RT-PCR auf mRNA-Ebene nicht in 1321N1-Astrozytomzellen nachgewiesen werden (s. 4.9). Die neuronale Zelllinie NG108-15 dagegen zeigte hohe Expression der mRNA für Rhbg und in geringerem Ausmaß auch Expression des Transporters Rhcg. NG108-15-Zellen werden standardmäßig als Modell für neuronale Zellen verwendet. Da es sich um eine Krebszelllinie handelt, und da Rhbg bisher kaum in Nagerhirnen nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob dieses Expressionsmuster auch in humanen primären Neuronen und Astrozyten gefunden wird. Auch ein Nachweis von Rhbg und Rhcg auf Proteinebene wäre sinnvoll. Sollte sich die Expression der Ammoniumtransporter RhBG und RhCG auf Neuronen, nicht jedoch auf Astrozyten bestätigen, liegt die Annahme nahe, dass diese Proteine mit für die unterschiedlichen Funktionen der Hirnzellen verantwortlich sind. Ammonium wird im Hirn ausschließlich von Astrozyten verstoffwechselt, in denen es durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt wird.²⁰⁶ Ammonium kann in Form von Ammoniak in die Zelle diffundieren und sich dort ansammeln. Da Neuronen die Substanz nicht abbauen können, scheinen sie einen anderen Schutzmechanismus gegenüber Ammonium zu besitzen, bei dem es sich möglicherweise um aktiven Transport aus der Zelle heraus handeln könnte. Aktiver Transport könnte auch erklären, warum Ammonium keine Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$ in NG108-15-Zellen hat, während 1321N1-Astrozytomzellen, die keine Ammoniumtransporter exprimieren, stark auf NH_4^+ reagieren. Es wäre möglich, dass der Ammoniumtransport in Neuronen gegensätzlich zu der von AMT Transportern durchgeführten Akkumulation von Ammonium als Stickstoffquelle in Pflanzen verläuft.²⁵⁴ Für RhAG wurde kürzlich gezeigt, dass dieses Protein zu einem NH_3/NH_4^+ -Ausstrom aus Hefezellen führen kann.²⁵⁵ Daher könnte die Expression von Ammoniumtransportern in Neuronen auch zum Herauspumpen des Toxins aus der Zelle dienen, während sich unter pathologischen Bedingungen in Astrozyten toxische Konzentrationen von Ammonium ansammeln können. Rhbg Knock-out-Mäuse zeigen keinen veränderten Phänotyp, aber die Untersuchungen beschränkten sich bisher eher auf periphere Bereiche, insbesondere die Niere.²⁵⁶

Bisherige Untersuchungen bringen die durch Ammonium induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ mit intrazellulärer Alkalisierung in Verbindung. Diese kann durch die Aufnahme von NH_3 erklärt werden, das zu etwa 2% im extrazellulären Puffer vorliegt und nach Penetration in die Zelle zu NH_4^+ protoniert werden kann.^{220,257} In dieser Arbeit wurden verschiedene Ammoniumsalze untersucht: 1. Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat, Salze von starken Säuren und 2. Ammoniumacetat und Ammoniumcarbonat, Salze schwacher Säuren, die in die Zelle penetrieren können (s. 4.6). Daher können die schwachen Säuren, Kohlensäure und Essigsäure, den pH_i senken.²⁵³ Alle Ammoniumsalze hatten ähnliche Effekte in Konzentrationen von 0,6 mM und 6 mM Ammonium. In einer Konzentration von 60 mM zeigte Ammoniumacetat deutlich geringere Auswirkungen auf die $[Ca^{2+}]_i$. **Acetat** war in der Lage die durch Ammonium

induzierte Calciumfreisetzung konzentrationsabhängig zu hemmen, wobei ein IC_{50} -Wert von 16,5 mM (vs. 6 mM Ammonium) festgestellt wurde. Andere Säuren, die in die Zelle aufgenommen werden können hatten dagegen keine Auswirkungen.

Daher kann die intrazelluläre Ansäuerung nicht der Grund für die inhibitorische Wirkung von Acetat zu sein. Es scheint sich eher um einen spezifischen Effekt zu handeln, dessen Mechanismus noch nicht geklärt ist. Acetat könnte in der Behandlung von HE eingesetzt werden, da seine Toxizität als eher gering einzustufen ist.²⁵⁸

Gegen die Annahme, dass der pH-Wert der Auslöser für die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung in Astrozyten ist, spricht auch, dass durch extrazelluläre pH-Änderungen in Form von verschiedenen Ammoniumsalzen keine unterschiedlichen Effekte in Bezug auf die Calciummobilisierung beobachtet wurden. Dennoch kann der extrazelluläre pH großen Einfluss auf den pH_i haben. Es liegt daher nahe, dass Ammonium über einen spezifischen Mechanismus auf die Calciumfreisetzung wirkt.

1321N1-Astrozytomzellen werden oft zur Expression verschiedener Rezeptoren, vor allem der P2-Nukleotidrezeptoren verwendet. Die Aktivierung einiger G-Protein-gekoppelter P2Y-Rezeptoren und der P2X-Rezeptoren, die Ligand gesteuerte Ionenkanäle darstellen, führt zu $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen. In vielen Experimenten wird Hexokinase eingesetzt, um UTP, das als Verunreinigung in UDP-Lösungen vorliegen kann, enzymatisch in UDP umzusetzen.¹⁰¹ Da dieses Enzym, wie oben beschrieben, meist in einem Ammoniumsulfat-haltigen Puffer vorliegt, können Experimente stark durch den Effekt von Ammonium auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in 1321N1-Astrozytomzellen beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der P2Y₂-Rezeptor wird durch die physiologischen Nukleotide ATP und UTP aktiviert und löst eine Signalübertragung über die Phospholipase C_β und Inositol-1,4,5-trisphosphat aus, die schließlich zu intrazellulären Calciumanstiegen führt. Er spielt eine wichtige Rolle bei bestimmten pathophysiologischen Prozessen wie der Befeuchtung von Epithelien, Atherosklerose, Zellproliferation und neurodegenerativen Erkrankungen. Daher sind der P2Y₂-Rezeptor sowie auch andere Subtypen der P2Y-Rezeptor-Familie viel versprechende Arzneistoff-Targets. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Bindungstasche des humanen P2Y₂-Rezeptors mittels zielgerichteter Mutagenese. Für diesen Rezeptor sowie für andere P2Y-Nukleotid-Rezeptoren besteht ein Mangel an selektiven, potenten und metabolisch stabilen Liganden. Die hier beschriebenen Untersuchungen der Aktivierungseigenschaften des P2Y₂-Rezeptors, sowie die Testung potentieller Liganden sollte die Grundlage für eine gezielte Entwicklung neuer, selektiver Agonisten und Antagonisten bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Messung intrazellulärer Calciumsignale zur funktionellen Charakterisierung des P2Y₂-Rezeptors sowie seiner Mutanten, exprimiert in 1321N1-Astrozytomzellen, und potentieller P2Y-Rezeptor-Antagonisten genutzt.

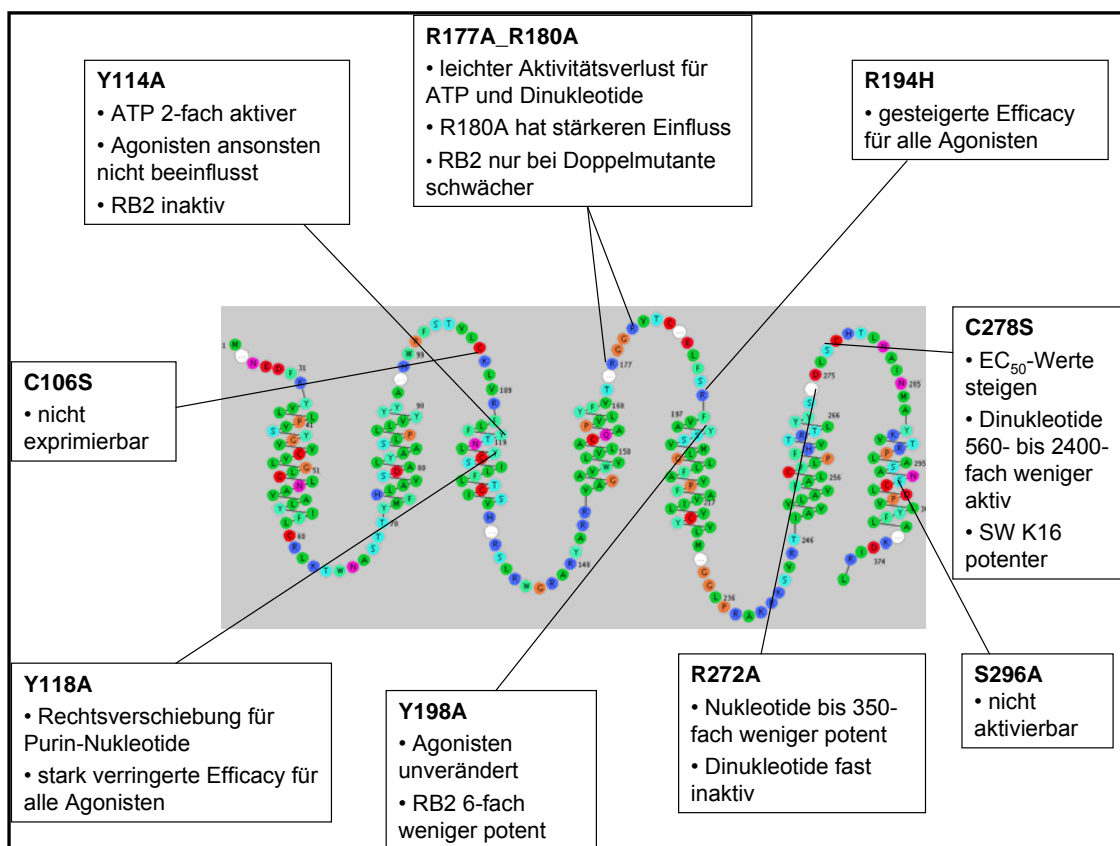
In einem weiteren Teilprojekt wurden die Ammonium-vermittelten intrazellulären Calciumanstiege in 1321N1-Astrozytomzellen und ihr Entstehungsmechanismus untersucht. Die humane Zelllinie 1321N1 wurde als Modell für Untersuchungen zur Hepatischen Encephalopathie eingesetzt, einem Krankheitsbild bei dem es durch hohe Ammonium-Blutspiegel zu toxischen Effekten in Astrozyten kommt.

Die wichtigsten Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

- Bisher waren lediglich drei Aminosäuren bekannt, die nachgewiesenermaßen an der Ligandbindung und Rezeptoraktivierung des P2Y₂-Rezeptors beteiligt sind: Die positiv geladenen Aminosäuren His²⁶², Arg²⁶⁵ und Arg²⁹².

In der vorliegenden Arbeit wurde der humane P2Y₂-Rezeptor in 1321N1-Astrozytomzellen funktionell exprimiert. Zu diesem Zweck konnte ein retrovirales Transfektionssystem für die Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren etabliert werden. Die Aktivierbarkeit der Rezeptoren wurde durch intrazelluläre Calciummessungen mit einem fluorimetrischen Assay im 96-Well-

Format untersucht. Für die getesteten Agonisten UTP und ATP wurden je nach Expressionsrate EC_{50} -Werte von 69-80 nM (UTP) bzw. 63-96 nM (ATP) gemessen. Die Dinukleotide Ap_4A und Ip_4U zeigten EC_{50} -Werte von 145-167 nM (Ap_4A) bzw. 112-179 nM (Ip_4U) und erreichten nur 70% der intrinsischen Aktivität (Efficacy) der Mononukleotide. Zur Bestimmung der Expressionsraten der Rezeptoren wurde ein Zelloberflächen-ELISA entwickelt, bei dem monoklonale Antikörper gegen das N-terminale HA-Tag des Rezeptors zur Detektion dienten.



Durch die chemische Reduktion von Disulfidbrücken mittels Dithiothreitol (DTT) wurde gezeigt, dass diese essentiell für die Aktivierbarkeit des P2Y₂-Rezeptors sind. Während die Aktivierbarkeit des Rezeptors nach Vorinkubation mit 10 mM DTT um etwa 80% (UTP) bzw. 90% (ATP) abnahm, wurde die durch den endogen auf den Zellen exprimierte M3-Rezeptor hervorgerufene Calciumausschüttung nur um 20% reduziert. Dies ist durch die exponiertere Position der Disulfidbrücken im P2Y₂-Rezeptor zu begründen. Um zu untersuchen, welche der beiden Disulfidbrücken von Bedeutung ist, oder ob beide wichtige Funktionen haben, wurde in den

beiden Disulfidbrücken des Rezeptors, die sich zwischen den Aminosäuren Cys²⁵ und Cys²⁷⁸ sowie zwischen Cys¹⁰⁶ und Cys¹⁸³ befinden, jeweils ein Cystein durch ein Serin homolog ersetzt. Die Mutante C106S war vermutlich auf Grund ihrer verringerten Stabilität nicht exprimierbar. An der untersuchten P2Y₂-Rezeptor-Mutante C278S zeigten die untersuchten Agonisten UTP und ATP sowie die Dinukleotide Ap₄A und IP₄U eine verringerte Affinität, wobei der EC₅₀-Wert für die Nukleotide um den Faktor 25 (UTP) bzw. 10 (ATP) erhöht wurde. Die EC₅₀-Werte der Dinukleotide waren um das 560-fache (Ap₄A) bzw. das 2400-fache (Ip₄U) nach rechts verschoben. Unter den getesteten Antagonisten, den Anthrachinonderivaten Reactive Blue-2 (RB2) und SW K16 war das kleine SW K16 potenter als am Wildtyp-Rezeptor. RB2 zeigte kein signifikant unterschiedliches Verhalten.

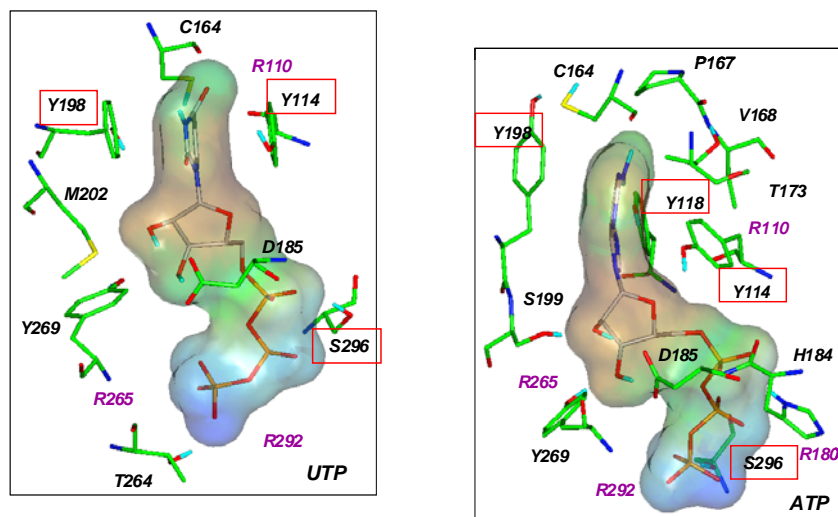
Folgende Mutationen wurden in die transmembranären Helices des P2Y₂-Rezeptors eingeführt: Y114A, Y118A (TM3), Y198A (TM5), S296A (TM7). Des Weiteren wurden Mutationen basischer Aminosäuren in den extrazellulären Schleifen des P2Y₂-Rezeptors durchgeführt: R177A_R180A, R177A, R180A, R194H (EL2) und R272A (EL3).

- Die Aminosäuren Tyr¹¹⁸ und Ser²⁹⁶ sind essentiell für die Rezeptoraktivierung und bilden direkte Wechselwirkungen mit den Rezeptor-Liganden aus. S296A führte zum völligen Aktivitätsverlust des P2Y₂-Rezeptors. Y118A besitzt einen starken Einfluss auf die Aktivierbarkeit durch Agonisten und ist hauptsächlich an den Interaktionen des Rezeptors mit den Purinnukleotiden beteiligt. Die Mutante Y114A beeinflusste hingegen die Aktivität der Agonisten nur wenig, jedoch war der Antagonist RB2 an dieser Rezeptor-Mutante völlig inaktiv. Ebenfalls zu einem, wenn auch schwächeren, Aktivitätsverlust von RB2 führte die Mutation der Aminosäure Tyr¹⁹⁸. Diese hatte allerdings keine Auswirkungen auf die Aktivierung des Rezeptors durch Nukleotide oder Dinukleotide.
- Die Effekte der Mutationen basischer Aminosäuren im EL2 werden hauptsächlich durch Arg¹⁸⁰ und in geringerem Ausmaß auch durch Arg¹⁷⁷ bestimmt. Letzteres liegt weiter von der Bindestelle entfernt. Die Doppelmutante R177A_R180A sowie die zugehörigen Einzelmутanten führen zu einer Aktivitätsminderung von ATP und Dinukleotiden, UTP war wenig betroffen. Dies weist darauf hin, dass die basischen Aminosäuren im EL2 an der Unterscheidung zwischen den einzelnen Agonisten beteiligt sind und somit wichtige Funktionen für die Selektivität von Liganden haben könnten. RB2 zeigte eine leichte

Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, wobei jedoch keine vollständige Hemmung des UTP-Effekts mehr erreicht werden konnte.

- R194H im selben Loop führte wahrscheinlich durch höhere Flexibilität der Rezeptorstruktur zu einer gesteigerten intrinsischen Aktivität (Efficacy) der Agonisten am P2Y₂-Rezeptor. Der EL2 ist vermutlich durch Interaktionen von basischen Aminosäuren mit Phosphatresten der Agonisten und negativen Gruppen der Antagonisten an der Ligandbindung beteiligt.

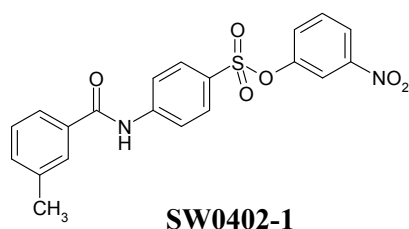
Insgesamt wurden für die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors essentielle und einflussreiche Aminosäuren identifiziert. Die biologischen Daten stehen zumeist in guter Übereinstimmung mit einem in Kooperation entwickelten Rezeptor-Modell. Hier dargestellt sind die potentiellen Bindungstaschen von UTP und ATP im P2Y₂-Rezeptor.



Die Aktivierung aller G-Protein-gekoppelten Rezeptoren scheint zunächst auf Grund ihrer sehr diversen Agonisten und unterschiedlich strukturierten Bindungstaschen nicht auf dem gleichen Weg möglich zu sein. Dennoch unterliegen diese Rezeptoren ähnlichen Konformationsänderungen, die zur Aktivierung der G-Proteine führen. Die Erkenntnisse über die Funktion einzelner Aminosäuren im P2Y₂-Rezeptor werden zum einen für die Entwicklung neuer Liganden und potentieller Arzneistoffe genutzt, dienen zum Anderen aber auch dem generellen Verständnis des Aufbaus und der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bisher ist nur die

Kristallstruktur eines Vertreters, des Rinder-Rhodopsins, bekannt. Die hierauf beruhenden computergenerierten Modelle können durch das Einbringen von biologischen Daten, wie sie in der vorliegenden Arbeit entstanden sind, der Realität angenähert werden. In einem allgemeinen Modell wird der Aktivierungsmechanismus für alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als molekularer Schalter („toggle switch“) beschrieben, in dem sich der aktive Zustand durch Bewegungen der Helices sechs und sieben einstellt. Für alle Rezeptoren der Klasse A wird postuliert, dass sich die Bindungstasche für Agonisten in den äußeren Teilen der transmembranären Helices befindet, was in der vorliegenden Arbeit auch für den P2Y₂-Rezeptor bestätigt werden konnte. Der aktive Zustand der Rezeptoren wird durch die Bindung von Agonisten in diesem Bereich stabilisiert. Auch wenn sich die Bindungstaschen der einzelnen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stark unterscheiden, besteht möglicherweise nicht nur eine Homologie zwischen den Bindungsstellen des P2Y₂-Rezeptors und anderen, bereits untersuchten P2Y-Rezeptor-Subtypen, sondern auch zwischen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Um generelle Aussagen machen zu können, sind weitere Struktur- und Aktivitäts-Untersuchungen an unterschiedlichen Rezeptoren erforderlich.

- Die Testung kleiner Bibliotheken von Anthrachinonderivaten, Sulfanilsäureamiden und p-Aminobenzoensäureamiden an den G_q-gekoppelten tP2Y₁-, hP2Y₂, mP2Y₂, hP2Y₄ und rP2Y₆-Rezeptoren führte zu einem Einblick in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der P2Y-Rezeptoren. Die bisher bekannten Antagonisten sind zumeist unselektiv, wenig potent und durch ihre negative Ladung schlecht bioverfügbar. Aus einer Serie von Anthrachinonderivaten wurden Antagonisten mit IC₅₀-Werten im niedrigen mikromolaren Bereich identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine freie Sulfonsäuregruppe oder zumindest eine negative Ladung in Position zwei des Anthrachinongerüsts für die Potenz der Verbindungen essentiell ist.



Die Verbindung SW0402-1, ein Benzoessäureamid mit veresterter p-Sulfonsäure-Gruppe ist am mP2Y₂- (IC₅₀ = 2,83 μM) und hP2Y₆- (IC₅₀ = 6,19 μM) Rezeptor antagonistisch aktiv. Es besteht eine Selektivität gegenüber dem tP2Y₁- und dem rP2Y₄-Rezeptor. Derivate mit freier Sulfonsäuregruppe sind inaktiv; bereits Veränderungen der Substituenten sowie ein Austausch des Amids gegen ein Amidin werden nicht toleriert. Die Anthrachinonderivate und die Verbindung SW0402-1 können als Leitstrukturen für die Entwicklung potenter, selektiver P2Y-Rezeptor-Antagonisten dienen.

- Hohe Konzentrationen von Ammonium im Blut führen zu neurotoxischen Effekten, wie dies zum Beispiel in der Hepatischen Encephalopathie der Fall ist. Von den toxischen Auswirkungen der Ammonium-Ionen sind hauptsächlich Astrozyten nicht jedoch Neuronen betroffen. Bisherige Untersuchungen wurden in primären Astrozyten aus Nagern durchgeführt. Es konnte bis dato nicht geklärt werden, durch welche Mechanismen es zu der Toxizität und den damit verbundenen Anstiegen intrazellulärer Calciumspiegel kommt. Die humane Astrozytomzelllinie 1321N1 und die neuronale Hybridomzelllinie NG108-15 wurden in der vorliegenden Arbeit als Modellsysteme verwendet. Durch hohe Konzentrationen verschiedener Ammoniumsalze wurden in 1321N1-Astrozytomzellen (EC₅₀ = 6,38 mM), nicht jedoch in NG108-15-Zellen, transiente intrazelluläre Calciumanstiege ausgelöst. Die Calcium-Ionen wurden hierbei aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Da permanent geladene Ammoniumverbindungen keine [Ca²⁺]_i-Anstiege auslösten, wird die Calciumfreisetzung durch intrazelluläre Effekte des Ammoniums, das in der neutralen Form (NH₃) über die Zellmembran diffundieren kann, induziert. Ammonium-Ionen reduzierten die durch G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren (H₁, M3-Rezeptor) ausgelösten Calciumanstiege. Acetat konnte in hohen Konzentrationen die Ammonium-induzierten Ca²⁺-Anstiege hemmen (IC₅₀ = 16,5 mM gegenüber einer Stimulation mit 6 mM NH₄⁺). Daher könnte die Gabe von hohen Dosen an Natriumacetat eine mögliche Therapie für die Hepatische Encephalopathie sein.

Die Expression der Ammoniumtransporter RhBG/Rhbg und RhCG/Rhcg wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Beide Transporter werden in NG108-15-Zellen exprimiert. In 1321N1-Astrozytomzellen konnte keine mRNA für die Ammoniumtransporter nachgewiesen werden. Es erscheint daher möglich, dass Rhbg und Rhcg Ammonium aus den neuronalen Zellen heraus transportieren und diese so vor den toxischen Ammoniumeffekten schützen.

Die in ihrem Mechanismus noch unbekanntem Ammonium-induzierten Calciumanstiege in Astrozyten konnten in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden. 1321N1-Astrozytomzellen wurden als leicht handhabbares, erstes humanes Modellsystem für die Untersuchung der Hepatischen Enzephalopathie etabliert.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Materialien

6.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius CP225D
Autoklav	Varioklav [®] Dampfsterilisator, H+P
Bakterienschüttler	Innova 4200 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA
Brutschränke	Jouan IG 650 Heraeus HERAcell [®] 240
Elektrophorese-Kammer, horizontal	Schütt Labortechnik
Elektrophorese-Kammer, vertikal	BioRad, Mini Protean II [™]
Fluorimeter	Fluostar Galaxy [®] , bmg Labtech Novostar [®] , bmg Labtech
Fotodokumentationssystem	Geldoc, BioRad
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Laminar-Airflow-Werkbänke	NUNC [®] Safe flow 1.2 NUNC [®] BIOFLOW
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
Mikrotiterplatten	Optiplate 96-F, PerkinElmer; Greiner
Multipette	Eppendorf Multipette Plus
pH-Meter	WTW pH Elektrode SenTix 41 WTW pH 197
Photometer	Beckman DU [®] 530
Pipetten	Eppendorf research (0,5-10 µl, 10-100 µl,

	20-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)
Pipettenspitzen	Greiner Plastibrand [®] , Brand
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttelwasserbad	GFL [®] 1083
Sequencer	LICOR Gene READIR 4200, MWG Biotech
Software	GraphPad Prism [®] , Version 3.0 bzw. 4.0, San Diego, CA, USA Isis [™] /Draw 2.4 Vector NTI [™] Advance 10, Invitrogen Microsoft Excel
Spannungsgerät (Elektrophorese)	Power Pac [®] 3000, BioRad
Thermocycler	Px2 Thermal Cycler, Thermo Scientific
Tischzentrifugen	Beckman Allegra [®] 2IR
Ultraschallbad	Bandelin SONOREX RK 52H
Vortex	IKA Labortechnik MS1, Minishaker
Waage	Scaltec SBC42
Zentrifuge	Beckman Avanti [™] , J-20XP Beckman Avanti [™] , J-20I

6.1.2 Kommerziell bezogene Chemikalien

Acrylamid	Acros, 164859000
Ammoniumperoxodisulfat	Acros, 401165000
Amentoflavon	Roth, 5255.1
Ammoniumacetat	ZVE, Uni Bonn
Ammoniumcarbonat	ZVE, Uni Bonn
Ammoniumformiat	Roth, 5093.1

Bromphenolblau	Acros, 4031401000
BSA	Sigma , A7906
Cadmiumchlorid	Acros, 296330050
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma, C3306
CNQX	Sigma, C-127
Coffein	ZVE, Uni Bonn
DMSO	Acros Organics, A015959701; AppliChem, A3608
DMSO, steril	AppliChem, A3672
DPCPX	Sigma, C101
DTT	AppliChem, A1101,0005
EDTA	Sigma, E-5134
EGTA	Sigma, E-0396
Ethanol p.a.	Merck, 100983
GDP	AppliChem, A3767,0025
Glucose	Sigma, 67021
Glycerol	Acros, 158920010
Glycin	Riedel de Haen, 33226
GTP	AppliChem, A1803
GYKI 52466 HCl	Sigma, G-119
HEPES	Sigma, H-3375
Hexokinase	Sigma, H-5625 Roche, 92949724
Kämpferol	Roth, 7503
KH ₂ PO ₄	Sigma, P-9791
Lithiumchlorid	Sigma, L-9650
Magnesiumchlorid	Fluka Biochemika, 63068; Sigma, M-8266
Mercaptoethanol	Sigma, M 6250
Methylenbisacrylamid	Acros, 164790250

Natriumacetat	ZVE, Uni Bonn
Natriumbenzoat	Roth, 8548.1
Natriumcarbonat	Sigma, S7795
Natriumchlorid	Sigma, P-9541
Natriumformiat	Merck, A574643
Natriumhydroxid, 0,1N	Merck, 109959
Na ₂ HPO ₄	Sigma, S-3264
Natriumsulfat	ZVE, Uni Bonn
Natriumsulfid	ZVE, Uni Bonn
Nicotinamid	AppliChem, A0959,0100
Oregon Green [®] 488 BAPTA-1, AM	Molecular Probes, O6807
Pluronic [®] F-127	Molecular Probes, P6867
Precision Plus Protein Standard	BioRad, 161-0374
Protein Assay Kit	Sigma Diagnostics [®] , P-5656
Salzsäure 37%	AppliChem, A0659
SCH 202676 HBr	Tocris, 1400
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Acros, 419531000
5-Sulfosalicylsäure	Acros, 424511000
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Acros, 420580500
Tris (TRIZMA [®] Base)	Sigma, T223271
Tetramethylammoniumchlorid	Roth, 4747.1
Trimethylammonium-HCl	Sigma, T72761

6.1.3 Nicht-kommerziell bezogene Chemikalien

SW-Substanzen	Verbindungen von Dr. Sefanie Weyler, AK Müller
Reactive Blue-2	Aufgereinigt von Younis Baqi, AK Müller
pLXSN mit HA Tag	AK Robert A. Nicholas, Chapel Hill, USA

6.1.4 Chemikalien und Materialien für die Molekularbiologie

2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma, A3219
Ampicillin-Na-Salz	AppliChem, A0839-017
Anti-HA.11 monoklonaler Antikörper	Covance, MMS-101P
Anti-HA monoklonaler Antikörper, Klon HA-7	Sigma, H9658-2ml
Anti-V5-Antikörper	Invitrogen, R960-25
Agarose	Roth, 2207.2
CaCl ₂	AppliChem, A4689
DNA Exitus	AppliChem, A6441
DEPC	AppliChem, A0881
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP, 10mM)	Invitrogen, 18427-013
Ethidiumbromid	AppliChem, A1152
Goat-anti-Mouse Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper (IGg, Fc-spezifisch)	Sigma, A2554
Goat-anti-Mouse HRP-gekoppelter Antikörper (IGg)	Jackson ImmunoResearch, 115-035-003
Glycerol	Sigma, G5516

Hepes	AppliChem, A3724
Hefeextrakt	AppliChem, A3732
IRD800 markierte Primer	MWG Biotech, Ebersberg
Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution)	Fermentas, R0611
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker	Fermentas, SM0191
LB-Agar	Invitrogen, 22700-041
LipofectAMINE™ 2000	Invitrogen, 11668-027
2-Mercaptoethanol	AppliChem, A1108
NaH ₂ PO ₄	AppliChem, A4732
Na ₂ HPO ₄	Sigma, S-3264
Natriumacetat	Fluka, 71183
Oligotex® Direct mRNA mini Kit	Qiagen, 72022
Paraformaldehyd	AppliChem
Polybrene	Aldrich, 107689
One Shot® Top 10 Chem. kompetente <i>E.coli</i>	Invitrogen, C4040-10
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, 10966-018
Primer	Synthese durch MWG-Biotech AG
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, 27106
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, 28704
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, 28106
QIAshredder®	Qiagen, 79656
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, 12145
S.N.A.P™ MidiPrep Kit	Invitrogen, K1910-01
Restriktionsenzyme: AfeI, BsaXI, BsgI, BspMI, EagI, DpnI, KasI, MluI, MscI, NheI, NruI, SfeI, XhoI	New England Biolabs
RNAse (Ribonuklease A)	Sigma, R-4875
RNAse Exitus	AppliChem

Sequagel Complete Buffer	National Diagnostics, EC-841
Sequagel XR acrylamide solution	National Diagnostics, EC-842
Sequi ThermExcel II DNA-sequencing Kit LC	Epicentre Technologies, SE9101LC
Subcloning Efficiency DH5 α Chemically competent cells	Invitrogen, 18265-017
10 x TAE-Puffer	Invitrogen, 15558-026
Thermoscript TM RT-PCR System	Invitrogen, 11146-032
Trypton	AppliChem, A1553
VENT DNA-Polymerase	New England BioLabs, M0254S

6.1.5 Zellkulturbedarf und Nährmedien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, 41966-029; Cambrex, BE12-604F
DMEM-F12 Medium	Cambrex, BE12-719F
Einmalspritzen, steril	Braun
Falcon Tubes	Greiner bio-one, 188271; Sarstedt, 62.547.254
Fötales Kälberserum	Sigma, F-0804
G418	Calbiochem, 34510
GlutaMax TM (100x)	Gibco, 35050-038
Gewebekulturflaschen, steril	Greiner bio-one; Sarstedt
Haemocytometer	Neubauer improved bright-line, Marienfeld
HAT-Supplement (50x)	Gibco, 2160-017
Hygromycin B	Calbiochem, 40052
Hypoxanthin	AppliChem, A0700,0005
Kryovials, steril	Greiner bio-one; Sarstedt

LB Agar	Sigma, L2897
LB Medium	AppliChem, A0954
Mycophenolsäure	Appllichem, A38010100
NG108-15-Zellen	AK Dr. Brüss, Pharmakologisches Institut, Universität Bonn
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Cambrex, DE17-602E
Rotilabo [®] -Spritzenfilter, steril, 0.22µm	Roth, P644.1
Serologische Einmalpipetten, steril	Sarstedt, costar [®] Stripette
Trypsin/EDTA	PAN [™] , P10-023100; Gibco, 25300-054; Cambrex, BE17-161E
Ultraglutamin	Cambrex, BE17-605E/U1
Xanthin	Sigma, X-7375

6.1.6 Kultivierte Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Spezies</u>	<u>Organ</u>
1321N1 Astrozytom	Human	Hirn
Jurkat T	Human	T-Lymphozyten
NG108-15	Maus/Ratte	Gehirn
BHK	Hamster	Niere
HAhP2Y ₂ 1321N1 Astrozytom	Human	Hirn
HEK 293	Human	Niere
GP+envAM12	Maus	Embryo-Fibroblasten
PA317	Maus	Embryo-Fibroblasten

6.2 Puffer und Lösungen

6.2.1 Lösungen für die Zellbiologie und Zellkultur

Phosphate Buffered Saline (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ in Wasser. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf 7,2 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert.

10 mg/ml Hypoxanthin

Hypoxanthin wird in etwa 80% der benötigten Wassermenge suspendiert und es wird 1 N NaOH zugetropft, bis die Substanz gelöst ist. Es wird mit Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Die Lösung wird bei -20°C gelagert.

10 mg/ml Xanthin

Xanthin wird in etwa 80% der benötigten Wassermenge suspendiert und es wird 1 N NaOH zugetropft, bis die Substanz gelöst ist. Es wird mit Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Die Lösung wird bei -20°C gelagert.

10 mg/ml Mycophenolsäure

Mycophenolsäure wird in etwa 80% der benötigten Wassermenge suspendiert und es wird 1 N NaOH zugetropft, bis die Substanz gelöst ist. Es wird mit Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Die Lösung wird bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

50 mg/ml Hygromycin B

Hygromycin B wird in Wasser gelöst, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

HXM Medium

Zu 500 ml DMEM werden 50ml FCS, 5 ml Penicillin G/ Streptomycin Lösung (Endkonzentration 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin), 1% Ultraglutamin, 0,75 ml Hypoxanthin 10 mg/ml, 12,5 ml Xanthin 10 mg/ml, 1,25 ml Mycophenolsäure 10 mg/ml und 2 ml Hygromycin B 50 mg/ml gegeben. Bei Bedarf wird der pH-Wert mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure erneut auf 7-8 eingestellt und steril filtriert.

50 mg/ml G418

Geneticin wird in einer Menge in Wasser gelöst, die 50 mg/ml aktiver Substanz entspricht und je nach Charge unterschiedlich sein kann. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

PBS mit 1% BSA

Die entsprechende Menge BSA wird kurz vor dem Gebrauch unter Rühren in PBS gelöst.

1 M Hepes, pH 7,0

Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure, $M_r = 238,3$) wird in Wasser gelöst und der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert.

Lösung zur Verdünnung von Antikörpern

In 20 ml DMEM werden 200 µl Hepes 1 M, pH 7,0, 200 mg BSA, und 50 µl CaCl_2 1 M gelöst. Die Lösung wird kurz vor dem Experiment hergestellt und auf Eis gelagert.

4% Paraformaldehyd (PFA) Lösung

20 g PFA werden mit 400 ml Wasser unter Rühren auf 60°C erhitzt. Es wird 1 N NaOH Lösung zugetropft, bis die Substanz sich löst. Nach Zugabe von 50 ml 10fach PBS wird auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird einige Stunden stehen gelassen, falls sich Reste abgesetzt haben, wird abdekantiert, und Aliquots werden bei -20°C gelagert.

6.2.2 Lösungen für intrazelluläre Calciummessungen

Krebs-Hepes-Puffer (KHP)

NaCl 118,6 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, NaHCO_3 4,2 mM, D-glucose 11,7 mM, HEPES (freie Säure) 10 mM, CaCl_2 1,3 mM and MgSO_4 1,2 mM in Wasser. Es wird ein 5-fach Puffer hergestellt und bei -20°C gelagert. MgSO_4 und CaCl_2 werden auf Grund des geringen Löslichkeitsprodukts erst bei Verdünnung zum 1-fach Puffer zugegeben. Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Calciumfreier Krebs-HEPES-Puffer

Es werden in o.g. Krebs-HEPES-Puffer Calciumionen durch Magnesiumionen ersetzt. Zudem werden 100 μM EGTA zum Puffer gegeben. Der pH-Wert wird erneut auf 7,4 eingestellt.

Oregon Green-Stammlösung

50 μg des Fluoreszenzfarbstoffs Oregon Green 488 BAPTA-1/AM ($M_r = 1258,07$ g/mol) werden unter Lichtausschluss in 39,7 μl DMSO gelöst (entsprechend einer Konzentration von 1 mM). Die Stammlösung wird in Eppendorf-Vials zu 3 μl aliquotiert und bis zur Verwendung im Fluorimeter-Assay unter Lichtausschluss bei -20°C gelagert.

Fura-2-Stammlösung

50 μg des calciumsensitiven Farbstoffs Fura-2/AM ($M_r = 1001,86$ g/mol) werden in 49,9 μl DMSO gelöst (entsprechend einer Konzentration von 1 mM). Aliquots à 3 μl werden in Eppendorf-Vials unter Lichtausschluss bei -20°C gelagert.

Pluronic® -F127-Stammlösung

200,0 mg des Detergens Pluronic F-127 werden in 800 μl DMSO gelöst. Die Stammlösung wird bei Raumtemperatur gelagert.

6.2.3 Lösungen für die Molekularbiologie

10 mM EDTA, pH 8,0

EDTA wird in Wasser gelöst, und der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wird autoklaviert.

100 mM Tris, pH 7,4

TRIZMA[®] Base wird in deionisiertem Wasser gelöst, und es wird mit konzentrierter Salzsäure ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

TENS

500 mg SDS werden in 70 ml Wasser gelöst. Es werden 10 ml 100 mM Tris, pH 7,4, 10 ml EDTA, pH 8,0 und 10 ml 1 N NaOH zugegeben. Die Lösung wird sterilfiltriert.

DEPC Wasser

100 ml Wasser werden über Nacht mit 10 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) gerührt und anschließend autoklaviert.

Lösungen für die Ca-Phosphat-Präzipitations Methode zur Transfektion

0,5 M HEPES in Wasser. der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf $\text{pH } 7,1 \pm 0,05$ eingestellt, und die Lösung wird steril filtriert

2 M NaCl in Wasser, steril filtriert

2 M CaCl₂ in Wasser, steril filtriert

150 mM Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0 2,01 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ werden in 50 ml Wasser gelöst. 1,04 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ werden in 50 ml Wasser gelöst. Die Natriumdihydrogenphosphat-Lösung wird mit etwa 40 ml der Natriumhydrogenphosphat-Lösung auf einen pH Wert von $7,0 \pm 0,05$ eingestellt und steril filtriert

2fach HBS 1,53 ml Wasser, 0,2 ml 0,5 M HEPES (pH 7,1), 0,25 ml 2 M NaCl und 20 µl 150 mM Natrium-Phosphat-Puffer werden kurz vor der Transfektion frisch angesetzt.

500 mM Natriumbutyrat

Natriumbutyrat wird in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Lagerung bei -20°C .

RNase A-haltiges Wasser

Es wird eine RNase A Stock-Lösung der Konzentration 1 mg/ml in autoklaviertem Wasser hergestellt und bei 99°C für 20 min erhitzt, um eventuelle Verunreinigungen mit DNase zu entfernen. Die Lösung wird bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wird die Lösung im Verhältnis 1:100 mit autoklaviertem Wasser verdünnt.

LB-Medium

Es werden 25 g LB-Pulvermedium in 900 ml demineralisiertem Wasser gelöst, und der pH-Wert der Lösung wird auf mit 1 N NaOH auf 7,5 eingestellt. Nach Auffüllen auf 1 l wird autoklaviert.

SOC-Medium

20,0 g Trypton, 5,0 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml einer 0,25 M KCl-Stammlösung, 5 ml einer 2 M MgCl_2 -Stammlösung und 20 ml einer 1 M Glucose-Stammlösung werden in demineralisiertem Wasser ad 1000 ml gelöst. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium vor der Verwendung autoklaviert.

6.2.4 Lösungen für SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Lösung 1: 22 g Acrylamid, 0,4 g Methylenbisacrylamid, 50 ml Wasser

Lösung 2: 4,55 g TRIZMA[®] Base, 0,1 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 25 ml Wasser. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure auf 8,8 eingestellt.

Lösung 3: 200 mg Bromphenolblau, 100 ml Wasser

Lösung 4: 7,3 g Acrylamid, 0,2 g Methylenbisacrylamid, 25 ml Wasser

Lösung 5: 3 g TRIZMA[®] Base, 0,2 g SDS, 50 ml Wasser. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure auf 6,8 eingestellt.

Lösung 6: 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) in Wasser, wird frisch hergestellt.

- Probenpuffer: 3 g SDS, 8,9 g Glycerol, 1 g TRIZMA[®] Base, 95 ml Wasser. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure auf 6,8 eingestellt, und es werden 5 ml Mercaptoethanol zugegeben.
- Laufpuffer: 1 g SDS, 14,4 g Glycin, 3 g TRIZMA[®] Base, 1000 ml Wasser
- Lösung 7: 0,83 g Coomassie-Brilliant Blau, 150 ml Methanol
- Lösung 8: 38,45 g 2-Hydroxy-5-sulfobenzoesäure-dihydrat, 150 ml Wasser, 30 ml konz. Essigsäure
- Lösung 9: Lösung 7 + 8
- Lösung 10: 50 ml Methanol, 10 ml Eisessig, 50 ml Wasser
- Lösung 11: 30 ml Ethanol, 10 ml Eisessig, 60 ml Wasser
- Lösung 12: 400 mg Natriumacetat, 500 mg Glutaraldehyd, 100 mg Natriumthiosulfat, 30 ml Ethanol, 70 ml Wasser
- Lösung 13: 100 mg Silbernitrat, 25 µl Formaldehyd, 100 µl Wasser
- Lösung 14: 500 mg Natriumcarbonat, 40 µl Formaldehyd, 200 ml Wasser
- Lösung 15: 5 ml Eisessig, 95 ml Wasser
- Lösung 16: 10 ml Glycerol, 90 ml Wasser

6.3 Zellkultur

6.3.1 Medienzusammensetzung

1321N1-Astrozytom	DMEM, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 1 % Ultraglutamin
stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen	DMEM, 10 % FCS, 800 µg/ml G418, 1 % Ultraglutamin
NG108-15	DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 2% HAT
HEK 293	DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Ultraglutamin
BHK	DMEM, 5% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Ultraglutamin
GP+envAM12	<i>HXM-Medium</i> : DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin and 1% Ultraglutamine, 15 µg/ml Hypoxanthin, 250 µg/ml Xanthin, 25 µg/ml Mycophenolsäure, 200 µg/ml Hygromycin B
PA317	DMEM, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Glutamin

6.3.2 Zellzucht

Die eukariotischen Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Sind die adhären wachsenden Zellen ca. 80-90% konfluent, wird das Medium entfernt und die Zellschicht mit ca. 10 ml PBS-Puffer bzw. zusatzfreiem Medium gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch die Zugabe von ca. 4 ml bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA Lösung für eine 175 cm² oder 75 cm² große Flasche nach mehrminütiger Inkubation abgelöst, wozu unter Umständen zusätzlich ein Klopfen gegen die Zellkulturflasche erforderlich ist. Die Reaktion mit Trypsin wird durch die Zugabe von Medium abgestoppt, wobei das Volumen an Medium sich nach dem jeweiligen Splittverhältnis richtet. Die durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren

vereinzelte Zellsuspension wird je nach Vorhaben und Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Zelllinie auf Zellkulturflaschen verteilt, in denen bereits auf 37°C vorgewärmtes Medium vorgelegt wurde. GP+envAM12-Zellen werden maximal im Verhältnis 1:8 gesplittet, NG108-15-Zellen maximal im Verhältnis 1:12. Alle anderen für intrazelluläre Calciummessungen verwendeten Zelllinien können auch in einem Splittverhältnis von bis zu 1:20 auf neue Flaschen aufgeteilt werden. Anschließend werden die Zellen erneut unter oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

6.3.3 Auftauen von Zellen

Ein Backup der entsprechenden Zelllinie wird möglichst schnell aufgetaut und steril in eine Zellkulturflasche, die bereits zuvor mit vorgewärmtem Medium befüllt wurde, überführt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach einigen Stunden im Brutschrank wird das Medium gewechselt und dann alle 2-4 Tage erneuert bzw. die Zellen bei Bedarf gesplittet. Bei transfizierten Zellen und GP+envAM12-Zellen wird das Auftauen in Medium ohne Selektionszusatz vollzogen und am Folgetag gegen Selektionsmedium / HXM-Medium ausgetauscht.

6.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Erstellen von Backups wird die durch Ablösen mit Trypsin entstandene Zellsuspension in Falcon-Tubes überführt und bei 200 g und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in einer Lösung aus 50% DMEM, 40% Fötalem Kälberserum und 10% sterilem DMSO resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wird in Kryovials zu 2 ml aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren. Nach 2 Tagen werden die Backups in den -80°C-Tiefkühlschrank und nach einigen Tagen für eine längere Aufbewahrung in den Stickstofftank überführt.

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose wird in TAE-Puffer suspendiert. Für Fragmentlängen von 500-6000 Basenpaaren (bp) wird eine 1%ige Lösung hergestellt. Für kürzere Fragmente wird eine 1,5-2%ige, für längere eine 0,8%ige Lösung verwendet. Die Suspension wird in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, so dass sich die Agarose löst. Es wird bei Raumtemperatur auf etwa 50-60°C abgekühlt und dann Ethidiumbromidlösung im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Es wird ein Gel gegossen, in dem sich ein Kamm zum Formen von Geltaschen befindet. Nach Erstarren wird der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TAE-Puffer befüllte horizontale Elektrophoresekammer gegeben. Die DNA-Proben werden gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und mit Ladebuffer im Verhältnis 1:10 vermischt. Je nach Taschengröße werden 10 µl bis 25 µl DNA in die Geltaschen gefüllt. Es wird zudem ein DNA-Standard mit entsprechenden DNA-Fragmenten aufgetragen. Um die Schärfe der Banden zu verbessern, erfolgt der Einlauf der DNA in das Gel bei 95 Volt. Es wird dann eine Elektrophorese bei 60 Volt für Mini-Gele bzw. 75 Volt für kleine Gele durchgeführt. Das Gel wird anschließend mit dem Gel-Doc System der Firma BioRad ausgewertet und dokumentiert.

6.4.2 Extraktion von DNA aus dem Agarosegel

Das Agarosegel wird auf eine geeignete Unterlage gelegt, um eine Verunreinigung mit anderen DNA-Fragmenten zu verhindern. Anschließend wird das Gel für möglichst kurze Zeit UV-Licht ausgesetzt, und die gewünschten DNA-Fragmente werden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Tubes überführt. Die Extraktion aus den Gelstücken erfolgt mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Anweisungen des Herstellers.

6.4.3 Gießen von Agarplatten

32 g LB-Agar werden in 1 l demineralisiertem Wasser suspendiert und autoklaviert. Die Lösung wird stehen gelassen, bis eine Temperatur von etwa 50°C erreicht ist. Es wird Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben, und etwa 15-20 ml der Agar-Lösung wird in 10 cm Petrischalen gegossen. Das Gießen erfolgt neben einem Bunsenbrenner, um das Kontaminationsrisiko so gering wie möglich zu halten. Nach dem Erstarren werden die Platten mit der Oberseite nach unten in Palstikfolie bei 4°C gelagert.

6.4.4 Restriktionsverdau

Für den Verdau mit Restriktionsenzymen wird der folgende Ansatz gewählt:

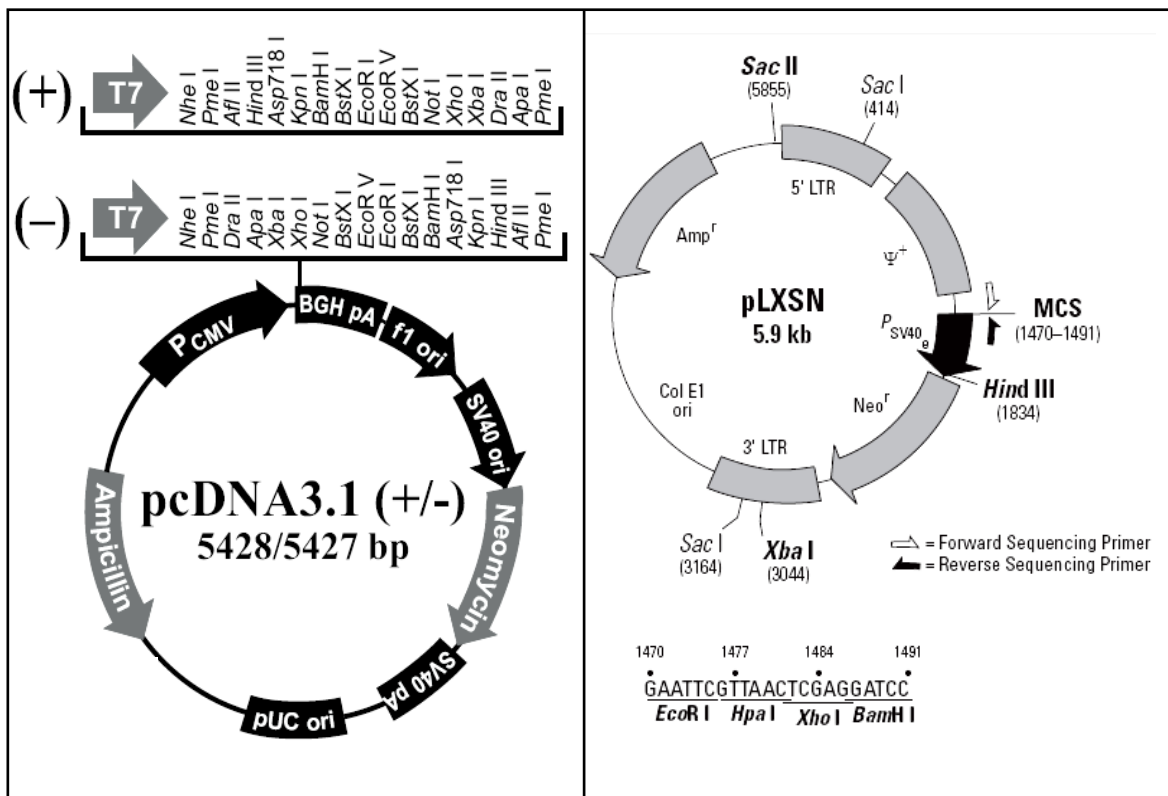
x µl DNA
1 µl jedes Restriktionsenzym
2,5 µl 10-fach Puffer
ggf. BSA / SAM
ad 25 µl Wasser

Je nach Restriktionsendonuclease werden ggf. BSA (100 µg/ml) oder S-Adenosylmethionin (SAM; verschiedene Konzentrationen nach Herstellerangaben) zugesetzt. Der Puffer sollte nach der Deklaration so gewählt werden, dass sich die volle Effizienz des Enzyms ergibt. Im Fall eines Doppelverdau mit 2 Enzymen wird ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme mit möglichst hoher Effizienz schneiden. Die Lösungen werden auf Eis zusammen gegeben und anschließend für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Restriktionsenzyme können bei Bedarf durch eine Inkubation von 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert werden.

6.4.5 Klonierung von Rezeptor-DNA in den Vektor pLXSN

Die DNA der Variante I (Accession-Nummer: NP 788086) des humanen P2Y₂-Rezeptors wurde zunächst im Vektor pcDNA3.1 verwendet und im Verlauf der Arbeit in den retroviralen Expressionsvektor pLXSN umkloniert. Ein Teil der Arbeit wurde im Labor von T. Kendall Harden, Ph.D., Department of Pharmacology, Medical School, University of North Carolina, Chapel Hill, USA durchgeführt.

6.4.5.1 Vektorkarten



6.4.5.2 Primer-Design

Die DNA für den P2Y₂-Rezeptor lag in den Vektor pcDNA3.1 kloniert vor. Die folgenden Primer wurden so designed, dass sich am 5'Ende der Sequenz eine Schnittstelle für MluI und am 3' Ende eine Schnittstelle für XhoI ergab. Es wurden jeweils 3 Basen Überhang gewählt, um das Schneiden des Enzyms zu ermöglichen, des Weiteren wurden zwei Basen (CC) vor der Sequenz eingefügt, um das Leseraster zu erhalten. Hierdurch konnte das PCR-Produkt später in den mit den Enzymen MluI und XhoI geschnittenen Vektor pLXSN kloniert werden. Das Einfügen der DNA erfolgte hier hinter eine bereits enthaltene Sequenz für ein Hämagglutinin-Tag (HA-Tag). Sollte eine Klonierung ohne Tag erfolgen, befindet sich vor dem HA-Tag eine EcoRI-Schnittstelle, und die Primer müssten entsprechend gewählt werden.

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

for: 5'gcgacgcgtccGCAGCAGACCTGGGCCC

rev: 5'gcgctcgagCTACAGCCGAATGTCCTTAGT

6.4.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit der VentR[®]-Polymerase durchgeführt, die über eine Lesekontrolle verfügt. Ein Primer Mix wurde aus 1 µl Primer for, 1 µl Primer rev und 8 µl DEPC Wasser hergestellt, so dass die Primer in einer Konzentration von 10 pmol/µl vorlagen. Es wurde die folgende Reaktions-Zusammensetzung gewählt:

2,5 µl Thermo Pol Puffer
0,75 µl MgSO₄ (100 mM)
0,5 µl VentR[®]-Polymerase
1 µl Templat
1 µl Primer Mix
18,75 µl DEPC Wasser
25 µl

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C wurden 20 Zyklen des folgenden PCR-Protokolls durchgeführt: 1 min bei 94°C, 1 min Primer-Annealing bei 58°C und 1,5 min Extension bei 72°C. Anschließend wurde ein finaler Extensionsschritt von 10 min bei 72°C durchgeführt. Die DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

6.4.5.4 Restriktionsverdau

Das aufgereinigte PCR-Produkt, das den P2Y₂-Rezeptor mit den gewünschten Schnittstellen für MluI und XhoI enthielt, wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen MluI und XhoI auf die Ligation vorbereitet (6.4.4). Ebenso wurde mit dem Vektor pLXSN verfahren. Es wäre für die Enzyme jedoch günstiger, einen längeren Überhang (8-12 bp) zu wählen.

Das verdaute PCR-Produkt sowie der verdaute Vektor werden durch Gelelektrophorese vom Ursprungsvektor (Templat) bzw. dem ursprünglichen Insert getrennt (6.4.1) und mittels Gelextraktion aufgereinigt (6.4.2). Anschließend erfolgt eine Ligation (6.4.6) und Transformation in *Escherichia coli* (6.4.8).

6.4.6 Ligation mittels T4 DNA-Ligase

In der Ligation werden das verdaute Insert und der entsprechend geschnittene Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:4 eingesetzt, was etwa einem Massenverhältnis von P2Y₂ : pLXSN = 1:1 entspricht. Es werden insgesamt 0,1–0,4 µg DNA verwendet.

Ligationsansatz:

- x µl Vektor DNA, geschnitten (0,05-0,2 µg)
- y µl Insert DNA, geschnitten (0,05-0,2µg)
- 2 µl Ligase Puffer
- 1 µl Ligase
- ad 20 µl Wasser

Die Lösungen werden auf Eis zusammen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

6.4.7 Ligation durch die Topoisomerase (TOPO-Cloning)

Für das TOPO-Cloning wird ein 3'-Überhang an der einzufügenden DNA benötigt. Daher wird die PCR mittels Taq-Polymerase durchgeführt, was den Nachteil einer höheren Mutationswahrscheinlichkeit in der DNA-Sequenz hat. Das PCR-Produkt, das die P2Y₂-Sequenz enthält, wird ohne vorherigen Verdau mit dem durch Topoisomerase aktivierten Vektor vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein so gewonnener Vektor kann auch zur weiteren Umklonierung verwendet werden, falls es sich als schwierig herausstellen sollte, mit bestimmten Enzymen ein PCR-Produkt zu schneiden. Dies kann dazu führen, dass die Ligation mit der T4 DNA-Ligase zunächst nicht möglich ist. Das Insert kann dann aus einem Vektor herausgeschnitten werden, der durch TOPO-Cloning entstanden ist.

6.4.8 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Chemisch kompetente *E. coli* (*Escherichia coli*) wurden von der Firma Invitrogen käuflich erworben. Die Bakterien werden auf Eis aufgetaut und in Eppendorf-Gefäßen à 20-50 µl aliquotiert. Sie können so bei -80°C gelagert werden. Zur Transformation wird ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit etwa 50 ng DNA unter vorsichtigem Rühren mit einer Pipettenspitze vermischt. Nach 30minütiger Inkubation wird ein Hitzeschock von 20 s bei 42°C oder 40 s bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Die Bakterien werden anschließend für weitere 5 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 200 µl SOC Medium wird für 1 h bei 37°C und 200 U/min inkubiert. In der Zwischenzeit werden Agar-Platten, die ein geeignetes Resistenz-Antibiotikum enthalten, auf Raumtemperatur erwärmt. Je 20 µl und 200 µl der Bakterien werden gleichmäßig auf einer Agar-Platte ausgestrichen, wobei der verwendete Glas-Spatel kurz zuvor in Ethanol getaucht und abgeflemt wird. Die Platten werden mit der Oberseite nach Unten stehend für etwa 14 h bei 37°C bebrütet.

6.4.9 Selektion von Bakterien-Monoklonen

Die mit Bakterienkolonien bewachsenen Agar-Platten können für einige Wochen mit Parafilm umschlossen bei 4°C gelagert werden. Sollen einzelne Klone isoliert werden, wird mit einer 10 µl Pipettenspitze in eine Kolonie gestochen und in 4 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mehrfach auf und ab pipettiert. Die Flüssigkultur wird für 14 h bei 200 U/min und 37°C inkubiert.

6.4.10 Einfrieren und Auftauen von *Escherichia coli*

Aus einer Bakterienkultur wird 1 ml entnommen und mit einer Endkonzentration von 15% Glycerol vermischt. Der so gewonnene Glycerol-Stock wird bei -80°C gelagert. Zum Auftauen wird mit einer Pipettenspitze in den gefrorenen Stock gestochen und in flüssigem Medium mehrfach auf und ab pipettiert. Anschließend wird wie unter 6.4.9 beschrieben inkubiert.

6.4.11 Colony-PCR

Zur Analyse einer Bakterienkolonie auf erfolgreich aufgenommene und ligierte Konstrukte kann eine so genannte Colony-PCR durchgeführt werden. Hierzu wird ein PCR-Mastermix erstellt, der die gewünschten Primer enthält, um einen Teil oder das gesamte Insert zu amplifizieren. Nach dem Aufteilen des PCR-Ansatzes auf verschiedene PCR-Gefäße wird jeweils in eine Bakterienkolonie gestochen und 3 mal in einem PCR-Ansatz auf und ab pipettiert und später mit der selben Spitze in einem Gefäß mit 1 ml Medium auf und ab pipettiert. Die PCR wird mit 25 Zyklen des entsprechenden Temperaturprogramms durchgeführt, wobei ein initialer Schritt von 3 min bei 95°C ausreichend ist, um die DNA aus den Bakterien freizusetzen. Das Produkt wird mittels Gelelektrophorese analysiert (6.4.1). Zeitgleich werden die *E. coli* bei 37°C und 200 U/min kultiviert.

6.4.12 Aufreinigung von DNA aus *Escherichia coli*

6.4.12.1 Mini-Präparationen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit

Die Aufreinigung wird nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

6.4.12.2 Mini-Präparation mit TENS

4 ml *E. coli* Kultur werden 5 min bei 10.000 U/min in Eppendorf-Tubes zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Pellet wird in 300 µl TENS resuspendiert, wobei die Bakterien vereinigt werden. Nach mehrmaligem Umschütteln und Vortexen werden 150 µl 3 M Natriumacetatlösung zugegeben und mehrmals umgeschüttelt. Der entstandene Niederschlag aus genomischer DNA und Zellfragmenten wird für 10 min bei 13.000 U/min pelletiert, und der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Die Vektor-DNA wird durch Zugabe von 900 µl eiskalten Ethanol ausgefällt und 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der entstandenen Niederschlag wird mit 1 ml eiskalter 70%iger Ethanolösung gewaschen und erneut 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl RNase haltigem Wasser aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C kann die Probe für einen Verdau oder eine Gelelektrophorese verwendet werden. Die Reinheit der DNA ist nicht ausreichend für eine Transfektion.

6.4.12.3 Midi-Präparation mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit oder dem S.N.A.P™ Midi Prep Kit

Die Aufreinigung wird nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

6.4.13 Konzentrationsbestimmung von DNA-Stocks

Es werden 2 µl DNA-Stock mit 998 µl Wasser vermischt, und die Konzentration wird photometrisch bestimmt, wobei Wasser zur Nullwert-Bestimmung dient. Die Messung der Absorption erfolgt 260 nm.

6.4.14 Sequenzierung

Zunächst wurde die Sequenzierung mittels fluoreszenzmarkierter Primer, Dideoxy-Nucleotiden (ddNTPs) und Gelelektrophorese selbst durchgeführt. Wegen des hohen Arbeitsaufwands wurden im Verlauf dieser Arbeit die Sequenzierungen von der Firma GATC (Konstanz) übernommen.

Die Proben werden mit Hilfe des Sequi Therm EXCEL™ II DNA Sequencing Kits-LC der Firma Epicentre vorbereitet. Es werden Fluoreszenz-markierte (IRD markierte) Primer verwendet, die an die Stellen T7 (for) und BGH (rev) des Vektors pcDNA3.1 binden. Diese Primer werden unter Lichtausschluss für 4-5 Stunden auf Eis aufgetaut.

Für die Sequenzierungs-PCR wird der folgende Mastermix verwendet:

5,8 µl	Wasser
2 µl	gelabelter Primer
1 µl	Template DNA
7,2 µl	Puffer
1 µl	<u>T7 DNA Polymerase</u>
17 µl	

Abhängig von der Qualität bzw. dem Alterungsgrad der Primer muss die Reaktion auf einen größeren oder kleineren Anteil an Primerlösung optimiert werden. Je 3,8 µl des Mastermixes werden mit 1,9 µl eines dNTP Mixes mit einem Anteil von Dideoxy-A,T,G oder C versetzt. Die Ansätze werden mit Öl überschichtet und eine PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	95°C	2 min
30 Zyklen:	95°C	30 s
	50°C	15 s
	70°C	1 min
Abschluss:	3°C	∞

Zu jedem Reaktionsansatz werden 3 µl einer Stopp-Lösung gegeben, und die Reaktionen werden bei 95°C für 5 min denaturiert. Nach einer Zentrifugation werden die Proben bis zum Auftragen auf das Gel unter Lichtausschluss auf Eis gelagert. Eine Lagerung für einige Wochen ist auch bei -20°C möglich.

Für die Herstellung des Polyacrylamid-Gels werden zwei 41 cm lange Glasplatten gründlich gereinigt und, durch einen Spacer getrennt, verschraubt. Es wird eine Lösung

aus 2 ml Monomer, 0,5 ml Sequel Complete Buffer und 20 µl APS (Ammoniumpersulfat) 10% angesetzt, wobei die APS-Lösung bei jedem Experiment frisch herzustellen ist. Zunächst wird ein Vorpfropf von unten zwischen die Platten gegossen. Es wird eine neue Acrylamid-Lösung im selben Mengenverhältnis hergestellt, und dann wird ein 0,25 mm dickes Polyacrylamid-Gel zwischen die Glasplatten gegossen. Vor der Polymerisation wird ein Gelkantenstück eingesetzt. Nach 3 Stunden der Polymerisation wird das Gel so in den Sequenzer eingebaut, dass es sich an der oberen und unteren Kante in Laufpuffer befindet, und es wird ein zweistündiger Vorlauf gestartet. Die vorbereiteten Proben werden à 2 µl zwischen die Platten und die Zacken eines eingesteckten Kamms auf die Gelkante aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 50°C, 1500 Volt und 35 mA durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des Programms VectorNTI, Invitrogen.

Für die Sequenzierung der Firma GATC wurden die folgenden Primer designed und verwendet:

1. Primer, die direkt vor/hinter der kodierenden Sequenz binden:

for: 5'CTTTATCCAGCCCTCACTCC

rev: 5'GAGCCTGGGGACTTCCACACCC

2. Primer, die in etwa 60-100 bp Abstand zur kodierenden Sequenz binden:

for: 5'CCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACC

rev: 5'CCACACCTGGTTGCTGACTA

6.4.15 Mutagenese des P2Y₂-Rezeptors

6.4.15.1 Primer-Design

Zielgerichtete Mutationen wurden nach dem Prinzip der „whole plasmid recombination PCR“ in den P2Y₂-Rezeptor eingeführt.²⁵⁹ Hierzu werden Primer designed, die an komplementären Stellen der Rezeptor-DNA binden und in der Mitte eine Mutation enthalten, die durch eine möglichst geringe Anzahl ausgetauschter Basen entsteht. Sollte durch diese Mutation nicht bereits eine Veränderung in der Anzahl der Schnittstellen eines Restriktionsenzym entstehen, wird eine zusätzliche Schnittstelle durch eine stille Mutation eingeführt. Die Annealing-Temperatur (T_a) für die PCR sollte

etwa 60-62°C betragen, wobei die nicht passenden Basen nicht in die Berechnung eingehen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5-1 aufgelistet.

Abschätzung der Annealing-Temperatur: $T_a = 4 * n(G,C) + 2 * n(A,T)$

Tab. 5-1: Primer für die Mutagenese des P2Y₂-Rezeptors, Annealing-Temperatur Restriktinsenzyme.

Mutante	Primer [1) forward-Primer, 2) reverse-Primer]	T_a	Restriktionsenzym
C106S	1) 5' CACGGTGCTCTCGAAGCTGGTGC 2) 5' GCACCAGCTTCGAGAGCACCGTG	60°C	BcgI
Y114A	1) 5' CGCTTCCTCTTCGCGACCAACC 2) 5' GGTTGGTCGCGAAGAGGAAGCG	58°C	NruI
Y118A	1) 5' CACCAACCTTGCGTGCAGCATCC 2) 5' GGATGCTGCACGCAAGGTTGGTG	60°C	BsgI
R177A	1) 5' CCGGGGGCAGAGTAACCTGCC 2) 5' GGCAGGTTACTCTGCCCCCGG	62°C	KasI
R180A	1) 5' GCGGGGGCGCCGTAACCTGCCAC 2) 5' GTGGCAGGTTACGGCGCCCCCGC	65.5°C	KasI
R177A_ R180A	1) 5' CCACCAGCGCGCCGGGGCGCCG TAACCTGC 2) 5' GCAGGTTACGGCGCCCCCGGCC GCGCTGGTGG	55°C	KasI
H184A	1) 5' CGCGTAACATGCGCCGACACCTC 2) 5' GAGGTGTCGGCGCATGTTACGCG	62°C	BspMI
R194A	1.1) 5' GCTCTTCAGCGCTTTCGTGGCCTAC 2.1) 5' GTAGGCCACGAAAGCGCTGAAGAGC	68°C	AfeI
	1.2) 5' GCTCTTCAGCGCATTCGTGGCC 2.2) 5' GGCCACGAATGCGCTGAAGAGC	60°C	BsmI
Y198A	1) 5' CTTCGTGGCCGCTAGCTCAGTC 2) 5' GACTGAGCTAGCGGCCACGAAG	60°C	NheI

Mutante	Primer [1) forward-Primer, 2) reverse-Primer]	T _a	Restriktionsenzym
R265A	1) 5'CCTGCCATTCCACGTGACCGCCA CCCTCTACTACTCC 2) 5'GGAGTAGTAGAGGGTGGCGGTC ACGTGGAATGGCAGG	55°C	PmlI
R272A	1) 5'CGCACCCCTCTACTACTCCTTCGCTAGC CTGGACCTCAGCTGCCACAC 2) 5'GTGTGGCAGCTGAGGTCCAGGCT AGCGAAGGA GTAGTAGAGGGTGCG	55°C	NheI
C278S	1) 5'CCTCAGCTCCCACACCCTC 2) 5'GAGGGTGTGGGAGCTGAGG	58°C	BsaXI
K298R	1) 5'CATGGCCTACAGGGTTACCCGGCCG 2) 5'CGGCCGGGTAACCCTGTAGCCATG	55°C	SfcI
S296A	1) 5'CGCTGGCCGCTGCTAACAGTTG 2) 5'CAACTGTTAGCAGCGGCCAGCG	60°C	MscI

6.4.15.2 Mutagenese-PCR

Die PCR wurde mit dem bereits in den Vektor hineinklonierten Wildtyp des P2Y₂-Rezeptors durchgeführt. Die Magnesiumkonzentration musste optimiert werden, in den meisten Fällen stellte sich jedoch eine Konzentration von 6 mM Mg²⁺ als geeignet heraus.

Für die Extension wird ein längerer Schritt benötigt, da das Produkt über 7000 bp lang ist. Des Weiteren wird DMSO zum Aufbrechen von Sekundärstrukturen eingesetzt. Die Primerkonzentration wird erhöht, da die Primer komplementär sind. Das folgende Pipettierschema ist in den meisten Fällen geeignet:

Primer Mix:

1,5 µl Primer for (100 pmol/µl)

1,5 µl Primer rev (100 pmol/µl)

7 µl DEPC Wasser

PCR-Ansatz:

2,5 µl Thermo Pol Puffer
1 µl MgSO₄ (100 mM)
2 µl dNTP
0,5 µl Vent Polymerase
0,5 µl DMSO
0,5 µl Templat
2 µl Primer Mix
16,5 µl DEPC Wasser
20 µl

Die PCR wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	94°C	3 min
30 Zyklen:	94°C	1 min
	T _a	1 min
	72°C	13 min
1 Zyklus	72°C	15 min
Abschluss:	4°C	∞

Das erhaltene Produkt wird mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (6.4.1) und mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

6.4.15.3 Restriktionsverdau

Das aufgereinigte Produkt der Mutagenese-PCR wird mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut (6.4.4), welches anschließend für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert wird. Dieses Enzym schneidet nach methylierten Adenin-Einheiten in der DNA. Da diese nur in *E. coli* gebildet werden, wird lediglich das Templat, nicht jedoch das PCR-Produkt geschnitten.

6.4.15.4 Transformation und Analyse von Monoklonen

Das verdaute PCR-Produkt, das die Mutation enthalten soll, wird in *E. coli* transformiert (6.4.8). In den Bakterien kommt es zur Religation des offenkettigen Konstrukts. Nach Selektion von Monoklonen (6.4.9) wird ein Restriktionsverdau (6.4.4) der aufgereinigten DNA zur Kontrolle auf das Vorhandensein der Mutation und somit der veränderten Anzahl an Schnittstellen durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird der entsprechende Klon sequenziert (6.4.13).

6.4.16 RT –PCR

Zur Analyse der Expression der Ammonium-Transporter RhBG/Rhbg und RhCG/Rhcg auf RNA-Ebene wurde aus einigen Zelllinien mRNA isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt.

6.4.16.1 mRNA Isolation und reverse Transkription

Zellen (1321N1-Astrozytom, NG108-15, HEK 293) werden in 75 cm² großen Flaschen kultiviert, bis sie etwa 80-90% Konfluenz erreicht haben. Die Zellen werden mit Trypsin abgelöst, und zwei Drittel der Zellen werden abzentrifugiert (5 min, 4°C, 200 g). Für alle weiteren Arbeiten werden RNase freie Materialien verwendet. Es wird das Oligotex[®] Direct mRNA Mini Kit eingesetzt. Die Zellen werden mit dem vom Hersteller gelieferten Lyse-Puffer lysiert und mit QIAshredder[®] homogenisiert. Nach dem Prinzip der Bindung des Poly-A-Schwanzes der mRNA an die Oligotex[®] Partikel wird die mRNA nach Anweisung des Herstellers (Protocol for Isolation of Poly A⁺ mRNA from Animal Cells) gereinigt und isoliert und bei -80°C gelagert.

Die Reverse Transkription erfolgt mit dem ThermoScript[™] RT-PCR System (Invitrogen) unter Verwendung von Oligo(dT) für die reverse Transkription. Zunächst wird die isolierte mRNA im folgenden Ansatz für 5 min bei 65°C denaturiert.

1 µl Oligo (dT)
2,5 µl RNA
2 µl dNTP
6,5 µl Wasser
12 µl

Für die reverse Transkription werden 4 µl cDNA Synthese Puffer, 1 µl DTT, 1 µl RNase out, 1 µl Wasser und 1 µl Thermoscript zugegeben und zunächst für 50 min bei 50°C und anschließend für 5 min bei 85°C inkubiert. Die restliche RNA wird durch Zugabe von RNase H und 20minütige Inkubation bei 37°C zerstört.

6.4.16.2 Primer-Design

Genspezifische Primer für die humanen Ammoniumtransporter RhBG (AY139093) und RhCG (BC030965) sowie ihre nicht-humanen Homologen Rhbg (Maus: AY254685, Ratte: AY129072) und Rhcg (Maus: AY254686, Ratte: AY129073) und für das als Positivkontrolle verwendete β-Aktin (human: BT019932, Maus: NMACTBR2, Ratte: BC063166) werden so gewählt, dass die entstehenden PCR-Produkte in einem Längenbereich von 190-250 bp liegen. Da die Sequenzhomologie zwischen dem Ratten- und dem Maus-Kanal sehr hoch ist, können dieselben Primer für beide Transporter verwendet werden, da maximal eine nicht passende Base enthalten war.

Tab. 5-2: Primer für die RT-PCR der Ammonium-Kanäle RhBG/Rhbg und RhCG/Rhcg

Gen	Primer	Annealing Temperatur
	[1) forward-Primer, 2) reverse-Primer]	
RhBG	1) 5'GGGGGCCGTGCTCATCTCCTT 2) 5'GCCG'CTGGCGGTGCTTGCTCTT	61,5°C
RhCG	1) 5'GCACCGAGCCGCCATCAACACCTA 2) 5'GATGCCGCAGACGAAGCCGATGAT	59,5°C
humanes β-Aktin	1) 5'GGCCTCGCTGTCCACCTTCC 2) 5'TGTCACCTTCACCGTTCCAGTTTTT	56°C
murines + ratten Rhbg	1) 5'TGGTGGGGACAGCAAGTGAGATGAT 2) 5'CTGCGCTGACCCTTGGCTATGAGT	60,1°C
murines + ratten Rhcg	1) 5'CGGGCAGTTCTAGGCAAGGTCAG 2) 5'CATGGCGAAAAGTCCGAGTGGTA	57,5°C
murines β-Aktin	1) 5'CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 2) 5'TGGCGTGAGGGAGAGCATAGC	57°C
ratten β-Aktin	1) 5'CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT 1) 5'AGGTCCCGGCCAGCCAGGTC	54,5°C

6.4.16.3 PCR

Die PCR wird mit der Taq DNA Polymerase und genspezifischen Primern nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

	94°C	3 min
35 Zyklen	94°C	45 s
	T _a	30 s
	72°C	45 s
1 Zyklus	72°C	10 min
	4°C	∞

6.4.17 Transfektionsmethoden

6.4.17.1 Lipofektion

Die zu transfizierenden Zellen werden am Tag vor der Transfektion in 6-Well Platten oder 25 cm² Flaschen so ausgesät, dass sie am Folgetag zu 80% konfluent sind. Die Anzahl der Zellen kann sich bei einzelnen Zelllinien unterscheiden. 2 Stunden vor der Transfektion wird das Medium gegen antibiotikafreies Medium ausgetauscht, wobei die restliche Zusammensetzung nicht verändert wird (2 ml für 6-Well-Platten, 6,25 ml für 25 cm² Flaschen).

Die Transfektion wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei zunächst DNA mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in DMEM vermischt wird und dann die eigentliche Lipofektion der Zellen erfolgt. Die DNA-Menge kann zur Optimierung um etwa 50% erhöht werden, wobei das Verhältnis von DNA zu Lipofectamine 2000 nicht geändert werden sollte. Nach etwa 14 Stunden wird das Lipofektionsreagenz von den Zellen entfernt und durch Standardmedium ersetzt.

6.4.17.2 Calciumphosphat-Präzipitations-Methode

Die zu transfizierenden Zellen werden am Tag vor der Transfektion in 25 cm² Flaschen so ausgesät, dass sie am Folgetag zu 70-80% konfluent sind. 2 Stunden vor der Transfektion wird das Medium durch 4 ml frisches Medium ersetzt.

2fach HBS wird frisch hergestellt. In sterilen Polystyren-Röhrchen werden 32 µg des Vektor-Konstrukts mit autoklaviertem Wasser auf ein Volumen von 175 µl gebracht. es werden 25 µl 2 M CaCl₂ Lösung zugesetzt. Zu 200 µl 2fach HBS werden 200 µl

CaCl₂/DNA Lösung zugetropft. Mit einer Pipette werden 10mal Luftblasen durch die Lösung gedrückt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wird die Lösung auf und ab pipettiert und dann tropfenweise in den Zellüberstand gegeben. Nach Umschwenken werden die Zellen über Nacht bei 37°C bebrütet, und am nächsten Tag wird der Überstand gegen 3 ml neues Medium ausgetauscht.

6.4.18 Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie

48 h nach der Transfektion mit dem Vektor pcDNA3.1 oder der Infektion durch Retroviren werden die Zellen gesplittet, und dem Medium wird Geneticin (G418) in der Konzentration 800 µg/ml zugesetzt. Da die transfizierten Zellen ein Resistenzgen für dieses Antibiotikum erhalten haben, sterben in den nächsten Tagen die nicht transfizierten Zellen ab. In dieser Zeit wird das Medium alle 48 Stunden gewechselt.

6.4.19 Selektion einer stabil transfizierten, monoklonalen Zelllinie

Die transfizierten, mit G418 selektierten Zellen werden in großen Splittverhältnissen (1:3000 – 1:300.000) in Petrischalen ausgesät. Sie wachsen bei einem ausreichenden Splittverhältnis in Kolonien. Die Kolonien werden gekennzeichnet, und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Anschließend werden kleine, runde, sterile Filter mit Trypsin getränkt und auf einzelne Kolonien gelegt. Nach 5 min werden die Filter in mit Medium befüllte Wells einer 24-Well-Platte gelegt und einzeln weiter gezüchtet. Die so gewonnenen Monoklonen können auf Ihre Expressionsrate oder Ihre Aktivierbarkeit untersucht werden.

6.4.20 Retrovirale Transfektion und Infektion

Für die retrovirale Übertragung von DNA in eine Zelllinie wird zunächst eine Verpackungszelllinie (GP+envAM12²⁶⁰ oder PA317²⁶¹) wie unter 6.4.17 beschrieben transfiziert. Zu diesem Zweck werden am Tag vor der Transfektion $1,5 \cdot 10^6$ GP+envAM12-Zellen oder $1 \cdot 10^6$ PA317-Zellen in 25 cm² Flaschen ausgesät. Für GP+envAM12-Zellen wird Lipofektion, für PA317-Zellen Calciumphosphat-Präzipitation verwendet. Zur Pseudotypisierung werden für eine 25 cm² Flasche 62,5% Rezeptor-DNA und 37,5% VSV-G-DNA, die jeweils in dem Vektor pLXSN vorliegt, verwendet.¹⁶³

Nach dem Entfernen der DNA aus dem Überstand werden die Zellen mit 3 ml neuem Medium versorgt, zu dem 30 µl 500 mM Natriumbutyrat-Lösung gegeben werden. Es folgt eine Inkubation von 48 h bei 32°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Überstand, in dem sich die Retroviren befinden, wird abgenommen und durch einen 45 µm Filter filtriert. Das Virus sollte nicht zu lange bei Raumtemperatur gelagert werden, da es sehr temperaturempfindlich ist. Daher ist schnelles Arbeiten nötig, und es werden maximal 4 Virus-Proben gleichzeitig filtriert. Eine Lagerung bei -80°C ist möglich, verringert jedoch in Infektionseffizienz.

Einen Tag vor dem Ernten der Viren werden $5 \cdot 10^5$ zu infizierende 1321N1-Astrozytomzellen in 25 cm² Flaschen ausgesät. Am nächsten Tag wird der Überstand von den Zellen entfernt, und 2 ml des filtrierten Virus werden mit 4 µl Polybren-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer 2,5stündigen Inkubation bei 37°C wird das Virus entfernt und durch Standardmedium ersetzt. Nach 48 Stunden können die Zellen in eine 175 cm² Flasche überführt und mit Selektionsmedium (800 µg/ml G418) versetzt werden (6.4.18).

6.5 Zelloberflächen ELISA

Am Tag vor dem Assay werden 150.000 Zellen je Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Testung wird in Duplikaten durchgeführt. Die Zellen werden direkt neben dem Brutschrank unter möglichst geringer Erschütterung auf Eis gestellt und erst nach Abkühlen transportiert, um eine möglichst geringe Autostimulation der Rezeptoren und somit eine möglichst geringe Rezeptor-Internalisierung zu verursachen. Alle Schritte außer der Antikörper-Inkubation werden auf Eis mit kalten Lösungen durchgeführt. Es werden jeweils die Überstände von zwei bis maximal drei Reihen gleichzeitig abgesaugt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Hierzu wird eine Wasserstrahlpumpe so eingestellt, dass der Sog und somit der Zellverlust möglichst

gering gehalten werden kann. Die Antikörper werden im folgenden Puffer gelöst: DMEM, 1% BSA, 10 μ M Hepes, pH 7,0, 1 μ M CaCl_2 .

Die Zellen werden mit 500 μ l PBS gespült und 5 min mit 500 μ l PBS/1% BSA geblockt. Es wird mit 300 μ l einer 1:1000 Verdünnung anti-HA.11-Antikörper (Covance) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach dreimaligem Spülen mit 500 μ l PBS (je 10 min) wurden die Zellen mit 500 μ l 4% PFA in PBS für 5 min fixiert. Es wird erneut für 10 min mit 500 μ l PBS gespült und 10 min mit 500 μ l PBS/1% BSA geblockt. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper (Goat anti-Mouse, Sigma) wird in einer Verdünnung von 1:2500 für 1 Stunde bei RT auf die Zellen gegeben und überschüssiger Antikörper durch viermaliges Spülen mit kaltem PBS (je 10 min) entfernt. 300 μ l des auf Raumtemperatur vorgewärmten ABTS werden für 35-50 min mit den Zellen inkubiert. 170 μ l des Substrats wird in eine 96-Well-Platte überführt, und die Absorption wird bei 405 nm vermessen. Als Referenzwert wurden 170 μ l nicht umgesetzten ABTSs verwendet.

Einstellungen am Fluostar Galaxy[®]

Messparameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	leer
Emissionswellenlänge	405 nm
Anzahl der Blitze	100
Gain	80%, variabel
Messzyklen	2
Positionsverzögerung	0,5 s

6.6 Fluorimetrische Calciummessungen

6.6.1 Einstellungen am Fluostar Galaxy®

Messparameter	Oregon Green BAPTA1	Fura-2
Anregungswellenlänge	485 nm, Bandbreite 25 nm	320 nm, Bandbreite 25 nm
Emissionswellenlänge	520 nm, Bandbreite 20 nm	520 nm, Bandbreite 20 nm
Anzahl der Blitze (Validierung)	10 (20)	10 (20)
Gain	variabel	variabel
Intervallanzahl (Validierung)	65 (1)	65 (1)
Intervallzeit	0,4 s	0,4 s
Injektionszeitpunkt	1,6 s	1,6 s
Injektionsgeschwindigkeit	310 µl/s	310 µl/s
Positionsverzögerung	0,5 s	0,5 s
Temperatur	28°C	28°C
Zellzahl/ Well	ca. 150.000	ca. 150.000

6.6.2 Einstellungen am Novostar®

Messparameter	Oregon Green BAPTA1	Fura-2
Anregungswellenlänge	485 nm, Bandbreite 25 nm	320 nm, Bandbreite 25 nm
Emissionswellenlänge	520 nm, Bandbreite 20 nm	520 nm, Bandbreite 20 nm
Anzahl der Blitze (Validierung)	10 (20)	10 (20)
Gain	variabel	variabel
Zeitfenster 1 (2)	0-4s (11,6-35,6 s)	0-4s (11,6-35,6 s)
Intervallanzahl (Validierung)	60 (1)	60 (1)
Intervallzeit	0,4 s	0,4 s
Injektionszeitpunkt	11,6 s	11,6 s
Injektionsgeschwindigkeit	65 µl/s	65 µl/s
Positionsverzögerung	0,2 s	0,2 s
Temperatur	28°C	28°C
Zellzahl/ Well	ca. 150.000	ca. 150.000
Spülschritte nach jeder Injektion	2	2
Spülsystem-Lösung	Wasser	Wasser

6.6.3 Messung der intrazellulären Calciumfreisetzung im Fluostar Galaxy®

Die Messungen werden durchgeführt, wie zuvor beschrieben.^{164,165} Zellen aus zwei 175 cm² Zellkulturflaschen, die zwischen 80% und 100% konfluent sind, werden mit Trypsin abgelöst. Nach 45minütiger Inkubation im Brutschrank wird bei 200 g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Die Zellen werden in 994µl Krebs-HEPES-Puffer (KHP) resuspendiert und nach Zugabe von 3 µl Oregon Green BAPTA-1/AM (OG)-Stammlösung und 3 µl Pluronic® F127-Stammlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und 10 U/min unter Lichtausschluss in einem Eppendorf-Vial

inkubiert. Dann wird zweimal mit 1 ml KHP gespült und nach Zentrifugation (12 s, 2700 U/min) eine Suspension der mit OG beladenen Zellen in 20 ml KHP hergestellt. Die Zellen werden unter ständigem Aufschütteln auf eine 96-Well-Platte verteilt. Hierfür werden für eine Agonismus-Testung 180 µl der Suspension, für eine Antagonismus-Testung 160 µl Zellsuspension und 20 µl Testlösung in jedes Well gegeben und für 20 Minuten bei 28°C im Fluorimeter zum gleichmäßigen Absinken ruhig stehen gelassen. Um eventuelle Unregelmäßigkeiten in der Zellverteilung oder Eigenfluoreszenz bzw. Absorption der zu testenden Substanzen feststellen zu können, wird zunächst der benötigte Gain (Lichtverstärkung) eingestellt. Ein Wert von 28.000 bis 30.000 Fluoreszenzeinheiten Grundfluoreszenz wird hierbei als Sollwert vorausgesetzt. Anschließend wird die Platte vor der eigentlichen Messung, ohne eine Injektion vorzunehmen, mit nur einem Intervall vermessen (vereinfacht Validierung genannt). Nach dem Spülen der Pumpe des Fluorimeters mit zunächst 4,5 ml KHP und dann jeweils 1,5 ml der Testlösung in aufsteigender Konzentration werden 20 µl derselben Lösung in ein bestimmtes Well injiziert. Anhand der Fluoreszenzintensität wird der Anstieg intrazellulärer Calciumkonzentrationen in der Zelle während der folgenden 24 Sekunden (60 Messpunkte) beobachtet. Im Anschluss an jede Testung wird das Pumpensystem mit Wasser und Ethanol gespült.

6.6.4 Versuchsdurchführung zur Messung der intrazellulären Calciumfreisetzung im Novostar[®]

Die Vorbereitung der Zellen für die Messung im Novostar[®] verläuft analog zur Messung im Fluostar Galaxy[®]. Der Gain wird hier auf eine Grundfluoreszenz von etwa 42.000 Fluoreszenzeinheiten eingestellt. Während die mit dem calciumsensitiven Farbstoff beladenen Zellen ggf. mit dem zu testenden Antagonisten in der Mikrotiterplatte bei 28°C inkubieren, werden je 35 µl der 10fach konzentrierten Agonist-Lösung in eine zweite 96-Well-Mikrotiterplatte mit V-Boden pipettiert. Mittels Injektor werden im Laufe der Messung jeweils 20 µl aus einem Well der Reagenzplatte in ein Well der Messplatte injiziert und anschließend wird die Fluoreszenzintensität in diesem Well für 60 Intervalle à 0,4 s vermessen. Als Spüllösung wird Wasser verwendet. Vor und nach an jeden Versuch wird das Pumpensystem mit 3,5 ml Wasser und am Ende zusätzlich mit 3,5 ml Ethanol gespült.

6.6.5 Auswertung der Calciummessungen

Die Auswertung wird zunächst mit dem Programm Excel[®] durchgeführt. Die initial nach der Injektion gemessenen Fluoreszenz-Werte, die durch ein Aufwirbeln der Zellen höher bzw. tiefer als der Anfangswert sind, werden jeweils als Null-Wert verwendet und daher von jedem weiteren Messwert abgezogen. Um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu generieren, wird jeweils der Mittelwert eines Messintervalls verwendet und im Programm GraphPad Prism[®] über die Konzentration der injizierten oder vorgelegten Substanz aufgetragen. Durch Mittelwert-Bildung der vier einzelnen Messwerte und sigmoiden Fit entsteht eine Kurve, aus der der IC₅₀- oder EC₅₀-Wert abgelesen werden kann. Es werden jeweils drei bis sechs unabhängige Experimente durchgeführt, aus denen letztlich eine gemittelte Kurve gebildet wird.

6.6.6 Intrazelluläre Calciummessungen in calciumfreiem Puffer

Die Zellen werden wie oben beschrieben (6.6.3, 6.6.4) vorbereitet. Die Spülschritte werden dann mit calciumfreiem KHP durchgeführt, und die Inkubation der Zellen in der Mikrotiterplatte wird auf 5 min verkürzt. Die Messung erfolgt entsprechend der Messprotokolle (6.6.3, 6.6.4) in calciumhaltigem Puffer.

6.6.7 Chemische Reduktion von Disulfid-Brücken

Es wird eine frisch hergestellte Lösung von 1 mM oder 10 mM Dithiothreitol (DTT) in Krebs-Hepes-Puffer hergestellt. Die Zellen werden wie unter 6.6.3/6.6.4 beschrieben mit dem calciumsensitiven Farbstoff beladen und dann 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml der entsprechenden DTT-Lösung inkubiert.²⁴ Die Zellsuspension wird mit Krebs-Hepes-Puffer verdünnt und auf eine 96-Well-Platte verteilt. Nach 20minütiger Inkubation bei 28°C wird die Calciummessung analog zur oben beschriebenen Methode durchgeführt.

6.7 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

6.7.1 Anfertigung des Gels und Elektrophorese

Für das Trenngel werden 5,2 ml Lösung 1, 3,6 ml Lösung 2, 6,1 ml demineralisiertes Wasser und 0,3 ml Lösung 3 mit 36 μ l TEMED und 50 μ l Lösung 6 versetzt. Zwei Glasplatten werden in den Gießstand eingespannt und unmittelbar nach der Herstellung bis 3 cm unterhalb der Oberkante mit der Lösung für das Trenngel befüllt. Es wird mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach Beendigung der Polymerisation wird das Wasser entfernt. Für das Sammelgel wird eine Mischung aus 1,2 ml Lösung 1, 1,6 ml Lösung 5, und 3,8 ml demineralisiertem Wasser mit 14 μ l TEMED und 20 μ l Lösung 6 versetzt. Das Trenngel wird mit dieser Lösung bis zur Glaskante überschichtet, und es wird ein Kamm in die Lösung gedrückt.

Nach Beendigung der Polymerisation wird das Gel in die Gelkammer eingespannt, und die entsprechenden Reservoirs werden mit Laufpuffer befüllt. Die Proben werden nach Angaben des Herstellers mit Ladepuffer versetzt und ggf. kurz auf 99°C erhitzt. Nach Befüllen der Kammtaschen mit den Proben wird die Elektrophorese bei 25 mA durchgeführt, bis die bromphenolblau-Färbung des Ladepuffers das untere Ende des Gels erreicht hat (etwa 1 h).

6.7.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wird für 15 min mit der Färbelösung (Lösung 9) behandelt und dann für mindestens 60 min in Lösung 10 entfärbt. Eine Lagerung ist für einige Tage in Lösung 10 möglich.

6.7.3 Silber-Färbung

Für die sensitivere Silberfärbung wird das Gel zunächst in Lösung 11 für 10 min fixiert und dann für weitere 10 min in Lösung 12 inkubiert (Crosslinking). Nach einem 20minütigen Spülschritt in Wasser wird für 10 min in Silbernitrat-Lösung (13) gefärbt und so lange in Lösung 14 entwickelt, bis sich die Banden zeigen. Durch fünfminütige Inkubation in Lösung 15 wird die Reaktion gestoppt. Nach Waschen in Wasser (5 min) wird das Gel für 5 min mit Lösung 16 behandelt.

7 Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AC	Adenylatecyclase
Akt	Proteinkinase B
BHK	Baby Hamster Kidney
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaBp1	Calcium Bindeprotein 1
cADPR	cyclische ADP-Ribose
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CICR	calcium-induced calcium release
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CREB	cyclic AMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor-receptor
EGF	endothelial growth factor
EL	Extrazellulärer Loop

ELISA	Enzyme-Linked Immonosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
for	forward
G418	Geneticin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GLAST	Glutamat Transporter
GLT	Glutamat Transporter
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GYKI 52466 HCl	1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin Hydrochlorid
h	human
H ₁ -Rezeptor	Histamin H ₁ -Rezeptor
HA	Hämagglutinin
HE	Hepatische Encephalopathie
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Horeradish-Peroxidase
IL	Intrazellulärer Loop
INS	Inspire Substanz
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	kilo Dalton
LB	lysogeny broth
m	Maus
M3-Rezeptor	Muscarin M3-Rezeptor
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger RNA
NAADP	Nicotinadenendinukleotidphosphat

NAD	Nicotinadenindinukleotid
NCX	Na ⁺ -/Ca ²⁺ -Antiporter
NF-AT	nuclear factor of activated T-cells
NFκB	nuclear factor κB
NGF	neuronal growth factor
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
OG	Oregon Green BAPTA1/AM
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor-Rezeptor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
r	Ratte
RB2	Reactive Blue-2
rev	reverse
RhAG	Rhesus-Glycoprotein A
RhBG	humanes nicht-erythroides Rhesus-Glykoprotein B
Rhbg	nicht-huamenes nicht-erythroides Rhesus-Glykoprotein B
RhCG	huamenes nicht-erythroides Rhesus-Glykoprotein C
Rhcg	nicht-huamenes nicht-erythroides Rhesus-Glykoprotein C
ROC	Receptor-operated channel
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
Ry	Ryanodin
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SAM	S-Adenosylmethionin

SCaMPER	sphingolipid Ca ²⁺ release-mediating protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Sarkoendoplasmatisches Retikulum-ATPase
SFK	Src family kinase
SMOC	second messenger-operated calcium channel
SOC	store-operated channel
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Stim1	stromal interacting molecule 1
SW	Stefanie Weyler
t	turkey
TAE	Tris-Acetat-Essigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranäre Helix
TrkA	Tyrosin-Rezeptor Kinase A
TRPC	transient receptor-potential-channel
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VOC	voltage-operated channel
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

1. Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. *Anatomie Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. 5th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 1999.
2. Bootman, M. D.; Collins, T. J.; Peppiatt, C. M.; Prothero, L. S.; MacKenzie, L.; De Smet, P.; Travers, M.; Tovey, S. C.; Seo, J. T.; Berridge, M. J.; Ciccolini, F.; Lipp, P. Calcium signalling-an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 3-10.
3. Montero, M.; Alonso, M. T.; Carnicero, E.; Cuchillo-Ibanez, I.; Albillos, A.; Garcia, A. G.; Garcia-Sancho, J.; Alvarez, J. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 57-61.
4. Rizzuto, R.; Bernardi, P.; Pozzan, T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* **2000**, *529 Pt 1*, 37-47.
5. Hajnoczky, G.; Csordas, G.; Das, S.; Garcia-Perez, C.; Saotome, M.; Sinha Roy, S.; Yi, M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium* **2006**, *40*, 553-560.
6. Toth, A.; Kedei, N.; Szabo, T.; Wang, Y.; Blumberg, P. M. Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 777-782.
7. Bootman, M. D.; Lipp, P.; Berridge, M. J. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2213-2222.
8. Cancela, J. M.; Van Coppenolle, F.; Galione, A.; Tepikin, A. V.; Petersen, O. H. Transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers. *EMBO J.* **2002**, *21*, 909-919.
9. Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517-529.
10. Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11-21.
11. da Silva, C. P.; Guse, A. H. Intracellular Ca^{2+} release mechanisms: multiple pathways having multiple functions within the same cell type? *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1498*, 122-133.
12. Dolmetsch, R. E.; Xu, K.; Lewis, R. S. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **1998**, *392*, 933-936.
13. Burgoyne, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca^{2+} signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 182-193.
14. Yamasaki, M.; Churchill, G. C.; Galione, A. Calcium signalling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP). *FEBS J.* **2005**, *272*, 4598-4606.
15. Young, K. W.; Nahorski, S. R. Sphingosine 1-phosphate: a Ca^{2+} release mediator in the balance. *Cell Calcium* **2002**, *32*, 335-341.
16. Guse, A. H. Second messenger function and the structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *FEBS J.* **2005**, *272*, 4590-4597.
17. Lee, H. C.; Aarhus, R.; Graeff, R. M. Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9060-9066.

18. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen*. 8th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh: Stuttgart, 2001.
19. Putney, J. W., Jr. Formation and actions of calcium-mobilizing messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate. *Am. J. Physiol.* **1987**, *252*, G149-157.
20. Rebecchi, M. J.; Pentylala, S. N. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1291-1335.
21. McDonough, P. M.; Eubanks, J. H.; Brown, J. H. Desensitization and recovery of muscarinic and histaminergic Ca²⁺ mobilization in 1321N1 astrocytoma cells. *Biochem. J.* **1988**, *249*, 135-141.
22. Nakahata, N.; Harden, T. K. Regulation of inositol trisphosphate accumulation by muscarinic cholinergic and H₁-histamine receptors on human astrocytoma cells. Differential induction of desensitization by agonists. *Biochem. J.* **1987**, *241*, 337-344.
23. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J.-M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281-341.
24. Heering, J. N.; Hines, J.; Fluharty, S. J.; Yee, D. K. Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin II type 2 receptor. *Biochemistry (Mosc.)*. **2001**, *40*, 8369-8377.
25. Wing, M. R.; Bourdon, D. M.; Harden, T. K. PLC- ϵ : A Shared Effector Protein in Ras-, Rho-, and G α β γ -Mediated Signaling. *Mol. Interv.* **2003**, *3*, 273-280.
26. Buchsbaum, R. J. Rho activation at a glance. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 1149-1152.
27. Schmidt, M.; Evellin, S.; Weernink, P. A.; von Dorp, F.; Rehmann, H.; Lomasney, J. W.; Jakobs, K. H. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 1020-1024.
28. Mitin, N.; Rossman, K. L.; Der, C. J. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, R563-574.
29. Malcuit, C.; Kurokawa, M.; Fissore, R. A. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *206*, 565-573.
30. Foskett, J. K.; White, C.; Cheung, K.-H.; Mak, D.-O. D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 593-658.
31. Yoshida, Y.; Imai, S. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* **1997**, *74*, 125-137.
32. Huang, K. P. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 425-432.
33. Taylor, C. W.; Laude, A. J. IP₃ receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* **2002**, *32*, 321-334.
34. Bezprozvanny, I.; Watras, J.; Ehrlich, B. E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* **1991**, *351*, 751-754.
35. Verkhatsky, A.; Shmigol, A. Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium* **1996**, *19*, 1-14.
36. Gallant, E. M.; Hart, J.; Eager, K.; Curtis, S.; Dulhunty, A. F. Caffeine sensitivity of native RyR channels from normal and malignant hyperthermic pigs: effects of a DHPR II-III loop peptide. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C821-830.

37. Barbara, J. G. IP₃-dependent calcium-induced calcium release mediates bidirectional calcium waves in neurones: functional implications for synaptic plasticity. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1600*, 12-18.
38. Endo, M. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *592*, 275-285.
39. Lee, H. C. A unified mechanism of enzymatic synthesis of two calcium messengers: cyclic ADP-ribose and NAADP. *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 785-793.
40. Lee, H. C. Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 317-345.
41. Higashida, H.; Hashii, M.; Yokoyama, S.; Hoshi, N.; Chen, X. L.; Egorova, A.; Noda, M.; Zhang, J. S. Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 283-296.
42. Zhang, G.; Teggatz, E. G.; Zhang, A. Y.; Koeberl, M. J.; Yi, F.; Chen, L.; Li, P. L. Cyclic ADP ribose-mediated Ca²⁺ signaling in mediating endothelial nitric oxide production in bovine coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *290*, H1172-1181.
43. Fellner, S. K.; Arendshorst, W. J. Angiotensin II Ca²⁺ signaling in rat afferent arterioles: stimulation of cyclic ADP ribose and IP₃ pathways. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**, *288*, F785-791.
44. Franco, L.; Zocchi, E.; Usai, C.; Guida, L.; Bruzzone, S.; Costa, A.; De Flora, A. Paracrine roles of NAD⁺ and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21642-21648.
45. Guse, A. H. Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 847-855.
46. Bruzzone, S.; Kunerth, S.; Zocchi, E.; De Flora, A.; Guse, A. H. Spatio-temporal propagation of Ca²⁺ signals by cyclic ADP-ribose in 3T3 cells stimulated via purinergic P_{2Y} receptors. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 837-845.
47. Partida-Sanchez, S.; Cockayne, D. A.; Monard, S.; Jacobson, E. L.; Oppenheimer, N.; Garvy, B.; Kusser, K.; Goodrich, S.; Howard, M.; Harmsen, A.; Randall, T. D.; Lund, F. E. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1209-1216.
48. Guse, A. H.; da Silva, C. P.; Berg, I.; Skapenko, A. L.; Weber, K.; Heyer, P.; Hohenegger, M.; Ashamu, G. A.; Schulze-Koops, H.; Potter, B. V.; Mayr, G. W. Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature* **1999**, *398*, 70-73.
49. Galione, A.; Patel, S.; Churchill, G. C. NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs. *Biol. Cell.* **2000**, *92*, 197-204.
50. Aarhus, R.; Graeff, R. M.; Dickey, D. M.; Walseth, T. F.; Lee, H. C. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30327-30333.
51. Genazzani, A. A.; Mezna, M.; Dickey, D. M.; Michelangeli, F.; Walseth, T. F.; Galione, A. Pharmacological properties of the Ca²⁺-release mechanism sensitive to NAADP in the sea urchin egg. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *121*, 1489-1495.
52. Galione, A.; Ruas, M. NAADP receptors. *Cell Calcium* **2005**, *38*, 273-280.
53. Churchill, G. C.; Okada, Y.; Thomas, J. M.; Genazzani, A. A.; Patel, S.; Galione, A. NAADP mobilizes Ca⁽²⁺⁾ from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* **2002**, *111*, 703-708.

54. Langhorst, M. F.; Schwarzmann, N.; Guse, A. H. Ca^{2+} release via ryanodine receptors and Ca^{2+} entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca^{2+} signaling in T-lymphocytes. *Cell. Signal.* **2004**, *16*, 1283-1289.
55. Galione, A.; Churchill, G. C. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* **2002**, *32*, 343-354.
56. Berg, I.; Potter, B. V.; Mayr, G. W.; Guse, A. H. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) is an essential regulator of T-lymphocyte Ca^{2+} -signaling. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 581-588.
57. Billington, R. A.; Genazzani, A. A. PPADS is a reversible competitive antagonist of the NAADP receptor. *Cell Calcium* **2007**, *41*, 505-511.
58. Cavalli, A. L.; O'Brien, N. W.; Barlow, S. B.; Betto, R.; Glembotski, C. C.; Palade, P. T.; Sabbadini, R. A. Expression and functional characterization of SCA₁MPER: a sphingolipid-modulated calcium channel of cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *284*, C780-790.
59. Schnurbus, R.; De Pietri Tonelli, D.; Grohovaz, F.; Zacchetti, D. Re-evaluation of primary structure, topology, and localization of scamper, a putative Ca^{2+} channel activated by sphingosylphosphocholine. *Biochem. J.* **2002**, *362*, 183-189.
60. Meyer Zu Heringdorf, D. Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 937-948.
61. Rapizzi, E.; Donati, C.; Cencetti, F.; Pinton, P.; Rizzuto, R.; Bruni, P. Sphingosine 1-phosphate receptors modulate intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *353*, 268-274.
62. Giussani, P.; Ferraretto, A.; Gravaghi, C.; Bassi, R.; Tettamanti, G.; Riboni, L.; Viani, P. Sphingosine-1-phosphate and calcium signaling in cerebellar astrocytes and differentiated granule cells. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 27-37.
63. Cao, Y.-Q. Voltage-gated calcium channels and pain. *Pain* **2006**, *126*, 5-9.
64. Cao, Y.-Q.; Tsien, R. W. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutations on neuronal P/Q-type Ca^{2+} channel activity and inhibitory synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 2590-2595.
65. Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**.
66. Hu, B.; Sun, S. G.; Tong, E. T. NMDA and AMPA receptors mediate intracellular calcium increase in rat cortical astrocytes. *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 714-720.
67. Rogers, M.; Colquhoun, L. M.; Patrick, J. W.; Dani, J. A. Calcium flux through predominantly independent purinergic ATP and nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurophysiol.* **1997**, *77*, 1407-1417.
68. Vazquez, G.; Wedel, B. J.; Aziz, O.; Trebak, M.; Putney, J. W., Jr. The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1742*, 21-36.
69. Soboloff, J.; Spassova, M.; Hewavitharana, T.; He, L. P.; Luncsford, P.; Xu, W.; Venkatachalam, K.; van Rossum, D.; Patterson, R. L.; Gill, D. L. TRPC channels: integrators of multiple cellular signals. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2007**, 575-591.
70. Putney, J. W., Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **1986**, *7*, 1-12.
71. Dutta, D. Mechanism of store-operated calcium entry. *J. Biosci.* **2000**, *25*, 397-404.
72. Chakrabarti, R.; Chakrabarti, R. Calcium signaling in non-excitable cells: Ca^{2+} release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca^{2+} entry channels. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 1503-1516.
73. Ramsey, I. S.; Delling, M.; Clapham, D. E. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68*, 619-647.

74. Gudermann, T.; Hofmann, T.; Mederos y Schnitzler, M.; Dietrich, A. Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found. Symp.* **2004**, *258*, 103-118; discussion 118-122, 155-109, 263-106.
75. Ambudkar, I. S.; Ong, H. L.; Liu, X.; Bandyopadhyay, B.; Cheng, K. T. TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium In Press, Corrected Proof*.
76. Putney, J. W., Jr. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 381-382.
77. Berridge, M. J.; Bootman, M. D.; Lipp, P. Calcium-a life and death signal. *Nature* **1998**, *395*, 645-648.
78. Li, M. X.; Gagne, S. M.; Tsuda, S.; Kay, C. M.; Smillie, L. B.; Sykes, B. D. Calcium binding to the regulatory N-domain of skeletal muscle troponin C occurs in a stepwise manner. *Biochemistry (Mosc)*. **1995**, *34*, 8330-8340.
79. Chin, D.; Means, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 322-328.
80. Spitzer, N. C. Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation. *Trends Neurosci.* **1994**, *17*, 115-118.
81. Li, W.; Llopis, J.; Whitney, M.; Zlokarnik, G.; Tsien, R. Y. Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* **1998**, *392*, 936-941.
82. Knowles, M. R.; Clarke, L. L.; Boucher, R. C. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 533-538.
83. Leipziger, J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2003**, *284*, F419-432.
84. Brunschweiler, A.; Muller, C. E. P2 receptors activated by uracil nucleotides-an update. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 289-312.
85. Mas, A. Hepatic encephalopathy: from pathophysiology to treatment. *Digestion* **2006**, *73 Suppl 1*, 86-93.
86. Rose, C. Effect of ammonia on astrocytic glutamate uptake/release mechanisms. *J. Neurochem.* **2006**, *97 Suppl 1*, 11-15.
87. Planelles, G. Ammonium homeostasis and human Rhesus glycoproteins. *Nephron Physiol.* **2007**, *105*, p11-17.
88. Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L. G.; Schioth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256-1272.
89. Lazarowski, E. R.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 785-795.
90. Qi, A. D.; Wolff, S. C.; Nicholas, R. A. The apical targeting signal of the P2Y₂ receptor is located in its first extracellular loop. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29169-29175.
91. von Kugelgen, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 415-432.
92. Erb, L.; Lustig, K. D.; Sullivan, D. M.; Turner, J. T.; Weisman, G. A. Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 10449-10453.

93. Lustig, K. D.; Shiau, A. K.; Brake, A. J.; Julius, D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5113-5117.
94. Janssens, R.; Painsavoine, P.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Human P2Y₂ receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 709-716.
95. Otero, M.; Garrad, R. C.; Velazquez, B.; Hernandez-Perez, M. G.; Camden, J. M.; Erb, L.; Clarke, L. L.; Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. Mechanisms of agonist-dependent and -independent desensitization of a recombinant P2Y₂ nucleotide receptor. *Mol. Cell. Biochem.* **2000**, *205*, 115-123.
96. Sromek, S. M.; Harden, T. K. Agonist-induced internalization of the P2Y₂ receptor. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 485-494.
97. Flores, R. V.; Hernandez-Perez, M. G.; Aquino, E.; Garrad, R. C.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y₂ nucleotide receptor. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *280*, 35-45.
98. Suzuki, T.; Namba, K.; Tsuga, H.; Nakata, H. Regulation of pharmacology by hetero-oligomerization between A₁ adenosine receptor and P2Y₂ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 559-565.
99. Bush, C. F.; Jones, S. V.; Lyle, A. N.; Minneman, K. P.; Ressler, K. J.; Hall, R. A. Specificity of olfactory receptor interactions with other G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **2007**.
100. Kotevic, I.; Kirschner, K. M.; Porzig, H.; Baltensperger, K. Constitutive interaction of the P2Y₂ receptor with the hematopoietic cell-specific G protein G(α16) and evidence for receptor oligomers. *Cell. Signal.* **2005**, *17*, 869-880.
101. Nicholas, R. A.; Watt, W. C.; Lazarowski, E. R.; Li, Q.; Harden, K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 224-229.
102. Sabala, P.; Czajkowski, R.; Przybyłek, K.; Kalita, K.; Kaczmarek, L.; Baranska, J. Two subtypes of G protein-coupled nucleotide receptors, P2Y₁ and P2Y₂ are involved in calcium signalling in glioma C6 cells. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 393-402.
103. Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J. *Molecular biology of the cell*. 4th ed.; Taylor & Francis: New York, 2002.
104. Weisman, G. A.; Wang, M.; Kong, Q.; Chorna, N. E.; Neary, J. T.; Sun, G. Y.; Gonzalez, F. A.; Seye, C. I.; Erb, L. Molecular determinants of P2Y₂ nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol. Neurobiol.* **2005**, *31*, 169-183.
105. Gonzalez, F. A.; Weisman, G. A.; Erb, L.; Seye, C. I.; Sun, G. Y.; Velazquez, B.; Hernandez-Perez, M.; Chorna, N. E. Mechanisms for inhibition of P2 receptors signaling in neural cells. *Mol. Neurobiol.* **2005**, *31*, 65-79.
106. Parr, C. E.; Sullivan, D. M.; Paradiso, A. M.; Lazarowski, E. R.; Burch, L. H.; Olsen, J. C.; Erb, L.; Weisman, G. A.; Boucher, R. C.; Turner, J. T. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 13067.
107. Bagchi, S.; Liao, Z.; Gonzalez, F. A.; Chorna, N. E.; Seye, C. I.; Weisman, G. A.; Erb, L. The P2Y₂ nucleotide receptor interacts with αvβ3 integrins to activate G_o and induce cell migration. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39050-39057.
108. Liu, J.; Liao, Z.; Camden, J.; Griffin, K. D.; Garrad, R. C.; Santiago-Perez, L. I.; Gonzalez, F. A.; Seye, C. I.; Weisman, G. A.; Erb, L. Src homology 3 binding sites in

- the P2Y₂ nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8212-8218.
109. Seye, C. I.; Yu, N.; Gonzalez, F. A.; Erb, L.; Weisman, G. A. The P2Y₂ nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35679-35686.
 110. Seye, C. I.; Yu, N.; Jain, R.; Kong, Q.; Minor, T.; Newton, J.; Erb, L.; Gonzalez, F. A.; Weisman, G. A. The P2Y₂ nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24960-24965.
 111. Camden, J. M.; Schrader, A. M.; Camden, R. E.; Gonzalez, F. A.; Erb, L.; Seye, C. I.; Weisman, G. A. P2Y₂ nucleotide receptors enhance alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18696-18702.
 112. Arthur, D. B.; Akassoglou, K.; Insel, P. A. P2Y₂ receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 19138-19143.
 113. Santiago-Perez, L. I.; Flores, R. V.; Santos-Berrios, C.; Chorna, N. E.; Krugh, B.; Garrad, R. C.; Erb, L.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. P2Y₂ nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *J. Cell. Physiol.* **2001**, *187*, 196-208.
 114. Muscella, A.; Elia, M. G.; Greco, S.; Storelli, C.; Marsigliante, S. Activation of P2Y₂ receptor induces c-FOS protein through a pathway involving mitogen-activated protein kinases and phosphoinositide 3-kinases in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **2003**, *195*, 234-240.
 115. Arthur, D. B.; Georgi, S.; Akassoglou, K.; Insel, P. A. Inhibition of apoptosis by P2Y₂ receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 3798-3804.
 116. Arthur, D. B.; Akassoglou, K.; Insel, P. A. P2Y₂ and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 678-682.
 117. Burnstock, G. Purinergic signalling. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147 Suppl 1*, S172-181.
 118. Weisman, G. A.; Garrad, R. C.; Erb, L. J.; Otero, M.; Gonzalez, F. A.; Clarke, L. L. Structure and function of P2Y₂ nucleotide receptors in cystic fibrosis (CF) epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *431*, 417-424.
 119. Cressman, V. L.; Lazarowski, E.; Homolya, L.; Boucher, R. C.; Koller, B. H.; Grubb, B. R. Effect of loss of P2Y₂ receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26461-26468.
 120. Dubyak, G. R. Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 773-776.
 121. Deterding, R.; Retsch-Bogart, G.; Milgram, L.; Gibson, R.; Daines, C.; Zeitlin, P. L.; Milla, C.; Marshall, B.; Lavange, L.; Engels, J.; Mathews, D.; Gorden, J.; Schaberg, A.; Williams, J.; Ramsey, B. Safety and tolerability of denufosol tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y₂ receptor agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **2005**, *39*, 339-348.
 122. Nichols, K. K.; Yerxa, B.; Kellerman, D. J. Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 47-54.
 123. Wang, L.; Jacobsen, S. E.; Bengtsson, A.; Erlinge, D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34⁺ stem and progenitor cells. *BMC Immunol.* **2004**, *5*, 16.

124. Koshiba, M.; Apasov, S.; Sverdlov, V.; Chen, P.; Erb, L.; Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Sitkovsky, M. V. Transient up-regulation of P2Y₂ nucleotide receptor mRNA expression is an immediate early gene response in activated thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 831-836.
125. Chen, Y.; Corriden, R.; Inoue, Y.; Yip, L.; Hashiguchi, N.; Zinkernagel, A.; Nizet, V.; Insel, P. A.; Junger, W. G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y₂ and A₃ receptors. *Science* **2006**, *314*, 1792-1795.
126. Guns, P. J.; Van Assche, T.; Franssen, P.; Robaye, B.; Boeynaems, J. M.; Bult, H. Endothelium-dependent relaxation evoked by ATP and UTP in the aorta of P2Y₂-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 569-574.
127. Buvinic, S.; Briones, R.; Huidobro-Toro, J. P. P2Y₁ and P2Y₂ receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 847-856.
128. Buvinic, S.; Poblete, M. I.; Donoso, M. V.; Delpiano, A. M.; Briones, R.; Miranda, R.; Huidobro-Toro, J. P. P2Y₁ and P2Y₂ receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation. *J. Physiol.* **2006**, *573*, 427-443.
129. Yoon, M. J.; Lee, H. J.; Kim, J. H.; Kim, D. K. Extracellular ATP induces apoptotic signaling in human monocyte leukemic cells, HL-60 and F-36P. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 1032-1041.
130. Maaser, K.; Hopfner, M.; Kap, H.; Sutter, A. P.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Extracellular nucleotides inhibit growth of human oesophageal cancer cells via P2Y₂-receptors. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 636-644.
131. Hopfner, M.; Maaser, K.; Barthel, B.; von Lampe, B.; Hanski, C.; Riecken, E. O.; Zeitz, M.; Scherubl, H. Growth inhibition and apoptosis induced by P2Y₂ receptors in human colorectal carcinoma cells: involvement of intracellular calcium and cyclic adenosine monophosphate. *Int. J. Colorectal Dis.* **2001**, *16*, 154-166.
132. Katur, A. C.; Koshimizu, T.; Tomic, M.; Schultze-Mosgau, A.; Ortmann, O.; Stojilkovic, S. S. Expression and responsiveness of P2Y₂ receptors in human endometrial cancer cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 4085-4091.
133. Seye, C. I.; Kong, Q.; Erb, L.; Garrad, R. C.; Krugh, B.; Wang, M.; Turner, J. T.; Sturek, M.; Gonzalez, F. A.; Weisman, G. A. Functional P2Y₂ nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* **2002**, *106*, 2720-2726.
134. Coutinho-Silva, R.; Stahl, L.; Cheung, K. K.; de Campos, N. E.; de Oliveira Souza, C.; Ojcius, D. M.; Burnstock, G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *288*, G1024-1035.
135. Carini, R.; Alchera, E.; De Cesaris, M. G.; Splendore, R.; Piranda, D.; Baldanzi, G.; Albano, E. Purinergic P2Y₂ receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J. Hepatol.* **2006**, *45*, 236-245.
136. Pines, A.; Bivi, N.; Vascotto, C.; Romanello, M.; D'Ambrosio, C.; Scaloni, A.; Damante, G.; Morisi, R.; Filetti, S.; Ferretti, E.; Quadrifoglio, F.; Tell, G. Nucleotide receptors stimulation by extracellular ATP controls Hsp90 expression through APE1/Ref-1 in thyroid cancer cells: a novel tumorigenic pathway. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *209*, 44-55.
137. Franke, H.; Krugel, U.; Illes, P. P2 receptors and neuronal injury. *Pflugers Arch.* **2006**, *452*, 622-644.

138. Chorna, N. E.; Santiago-Perez, L. I.; Erb, L.; Seye, C. I.; Neary, J. T.; Sun, G. Y.; Weisman, G. A.; Gonzalez, F. A. P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells. *J. Neurochem.* **2004**, *91*, 119-132.
139. Hoebertz, A.; Mahendran, S.; Burnstock, G.; Arnett, T. R. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y₂ receptor in bone remodeling. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *86*, 413-419.
140. Kim, H. S.; Ravi, R. G.; Marquez, V. E.; Maddileti, S.; Wihlborg, A. K.; Erlinge, D.; Malmisjo, M.; Boyer, J. L.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. Methanocarba modification of uracil and adenine nucleotides: high potency of Northern ring conformation at P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₁₁ but not P2Y₆ receptors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 208-218.
141. Lazarowski, E. R.; Watt, W. C.; Stutts, M. J.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 1619-1627.
142. El-Tayeb, A.; Qi, A.; Muller, C. E. Synthesis and structure-activity relationships of uracil nucleotide derivatives and analogues as agonists at human P2Y₂, P2Y₄, and P2Y₆ receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7076-7087.
143. Ivanov, A. A.; Ko, H.; Cosyn, L.; Maddileti, S.; Besada, P.; Fricks, I.; Costanzi, S.; Harden, T. K.; Calenbergh, S. V.; Jacobson, K. A. Molecular Modeling of the Human P2Y₂ Receptor and Design of a Selective Agonist, 2'-Amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-Triphosphate. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1166-1176.
144. Lazarowski, E. R.; Watt, W. C.; Stutts, M. J.; Brown, H. A.; Boucher, R. C.; Harden, T. K. Enzymatic synthesis of UTP gamma S, a potent hydrolysis resistant agonist of P2U-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *117*, 203-209.
145. Shaver, S. R.; Rideout, J. L.; Pendergast, W.; Douglass, J. G.; Brown, E. G.; Boyer, J. L.; Patel, R. I.; Redick, C. C.; Jones, A. C.; Picher, M.; Yerxa, B. R. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal.* **2005**, *1*, 183-191.
146. Charlton, S. J.; Brown, C. A.; Weisman, G. A.; Turner, J. T.; Erb, L.; Boarder, M. R. PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118*, 704-710.
147. Brown, J.; Brown, C. A. Evaluation of reactive blue 2 derivatives as selective antagonists for P2Y receptors. *Vascul. Pharmacol.* **2002**, *39*, 309-315.
148. Erb, L.; Garrad, R.; Wang, Y.; Quinn, T.; Turner, J. T.; Weisman, G. A. Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4185-4188.
149. Herold, C. L.; Qi, A. D.; Harden, T. K.; Nicholas, R. A. Agonist versus antagonist action of ATP at the P2Y₄ receptor is determined by the second extracellular loop. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11456-11464.
150. Jiang, Q.; Guo, D.; Lee, B. X.; Van Rhee, A. M.; Kim, Y. C.; Nicholas, R. A.; Schachter, J. B.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 499-507.
151. Moro, S.; Guo, D.; Camaioni, E.; Boyer, J. L.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. Human P2Y₁ receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1456-1466.
152. Jacobson, K. A.; Costanzi, S.; Ohno, M.; Joshi, B. V.; Besada, P.; Xu, B.; Tchilibon, S. Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 805-819.

153. Hoffmann, C.; Moro, S.; Nicholas, R. A.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y₁ receptor in surface expression and activation processes. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14639-14647.
154. Moro, S.; Hoffmann, C.; Jacobson, K. A. Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y₁ receptor. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38*, 3498-3507.
155. Garrad, R. C.; Otero, M. A.; Erb, L.; Theiss, P. M.; Clarke, L. L.; Gonzalez, F. A.; Turner, J. T.; Weisman, G. A. Structural basis of agonist-induced desensitization and sequestration of the P2Y₂ nucleotide receptor. Consequences of truncation of the C terminus. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29437-29444.
156. Jacobson, K. A.; Costanzi, S.; Ivanov, A. A.; Tchilibon, S.; Besada, P.; Gao, Z. G.; Maddileti, S.; Harden, T. K. Structure activity and molecular modeling analyses of ribose- and base-modified uridine 5'-triphosphate analogues at the human P2Y₂ and P2Y₄ receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 540-549.
157. Costanzi, S.; Mamedova, L.; Gao, Z. G.; Jacobson, K. A. Architecture of P2Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5393-5404.
158. Cormstock, K.; Watson, N.; JC, O. *Design of Retroviral Expression vectors*. Humana Press: Totowa, NJ, 1997; Vol. 62, p 207-222.
159. Miller, A. D.; Buttimore, C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 2895-2902.
160. Markowitz, D.; Goff, S.; Bank, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* **1988**, *167*, 400-406.
161. Miller, A. D.; Rosman, G. J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **1989**, *7*, 980-982, 984-986, 989-990.
162. *Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit*; 1996.
163. Emi, N.; Friedmann, T.; Yee, J. K. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **1991**, *65*, 1202-1207.
164. Kassack, M. U.; Hofgen, B.; Lehmann, J.; Eckstein, N.; Quillan, J. M.; Sadee, W. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J. Biomol. Screen.* **2002**, *7*, 233-246.
165. Kaulich, M.; Streicher, F.; Mayer, R.; Müller, I.; Müller, C. E. Flavonoids - novel lead compounds for the development of P2Y₂ receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* **2003**, *59*, 72-81.
166. Ko, G. Y.; Hillmann, P.; Höltje, H. D. Molecular Modeling of the human P2Y₂ receptor. **2007** unpublished work
167. Filtz, T. M.; Li, Q.; Boyer, J. L.; Nicholas, R. A.; Harden, T. K. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46*, 8-14.
168. Communi, D.; Piroton, S.; Parmentier, M.; Boeynaems, J. M. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30849-30852.
169. Yoshioka, K.; Saitoh, O.; Nakata, H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 7617-7622.
170. Trejo, J.; Coughlin, S. R. The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2216-2224.

171. Kinzer-Ursem, T. L.; Linderman, J. J. Both ligand- and cell-specific parameters control ligand agonism in a kinetic model of G protein-coupled receptor signaling. *PLoS Comput. Biol.* **2007**, *3*, e6.
172. Kenakin, T. Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 456-464.
173. Zhong, H.; Wade, S. M.; Woolf, P. J.; Linderman, J. J.; Traynor, J. R.; Neubig, R. R. A spatial focusing model for G protein signals. Regulator of G protein signaling (RGS) protein-mediated kinetic scaffolding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7278-7284.
174. Schmidt, B.; Ho, L.; Hogg, P. J. Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry (Mosc)*. **2006**, *45*, 7429-7433.
175. Fonseca, M. I.; Lunt, G. G.; Aguilar, J. S. Inhibition of muscarinic cholinergic receptors by disulfide reducing agents and arsenicals : Differential effect on locust and rat. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41*, 735-742.
176. Cook, J. V.; McGregor, A.; Lee, T.; Milligan, G.; Eidne, K. A. A disulfide bonding interaction role for cysteines in the extracellular domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology* **1996**, *137*, 2851-2858.
177. Ivanov, A. A.; Costanzi, S.; Jacobson, K. A. Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modeling. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 417-426.
178. Van Rhee, A. M.; Fischer, B.; Van Galen, P. J.; Jacobson, K. A. Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des. Discov.* **1995**, *13*, 133-154.
179. Meshki, J.; Tuluc, F.; Bredeteau, O.; Ding, Z.; Kunapuli, S. P. Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y₂ receptor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C264-271.
180. Klco, J. M.; Wiegand, C. B.; Narzinski, K.; Baranski, T. J. Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 320-326.
181. Scarselli, M.; Li, B.; Kim, S. K.; Wess, J. Multiple residues in the second extracellular loop are critical for m3 muscarinic acetylcholine receptor activation. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 7385-7396.
182. Cotte, N.; Balestre, M. N.; Phalipou, S.; Hibert, M.; Manning, M.; Barberis, C.; Mouillac, B. Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29462-29468.
183. Schwartz, T. W.; Frimurer, T. M.; Holst, B.; Rosenkilde, M. M.; Elling, C. E. MOLECULAR MECHANISM OF 7TM RECEPTOR ACTIVATION-A GLOBAL TOGGLE SWITCH MODEL. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 481-519.
184. Gether, U.; Lin, S.; Ghanouni, P.; Ballesteros, J. A.; Weinstein, H.; Kobilka, B. K. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *EMBO J.* **1997**, *16*, 6737-6747.
185. Ballesteros, J. A.; Shi, L.; Javitch, J. A. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 1-19.
186. Jacobson, K. A.; Costanzi, S.; Joshi, B. V.; Besada, P.; Shin, D. H.; Ko, H.; Ivanov, A. A.; Mamedova, L. Agonists and antagonists for P2 receptors. *Novartis Found. Symp.* **2006**, *276*, 58-68; discussion 68-72, 107-112, 275-181.
187. Brown, C.; Tanna, B.; Boarder, M. R. PPADS: an antagonist at endothelial P2Y-purinoceptors but not P2U-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* **1995**, *116*, 2413-2416.

188. Atzler, K. J. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als Arzneistoff-Targets: In-vitro Charakterisierung neuer Liganden und Untersuchung der Wirkstoff-Rezeptor-Interaktionen. Doktorarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2006**.
189. Waldo, G. L.; Corbitt, J.; Boyer, J. L.; Ravi, G.; Kim, H. S.; Ji, X. D.; Lacy, J.; Jacobson, K. A.; Harden, T. K. Quantitation of the P2Y₁ receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1249-1257.
190. Houston, D.; Ohno, M.; Nicholas, R. A.; Jacobson, K. A.; Harden, T. K. [³²P]2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate ([³²P]MRS2500), a novel radioligand for quantification of native P2Y₁ receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 459-467.
191. Jacobson, K. A.; Jarvis, M. F.; Williams, M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4057-4093.
192. Tuluc, F.; Bultmann, R.; Glanzel, M.; Frahm, A. W.; Starke, K. P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1998**, *357*, 111-120.
193. Kaulich, M. P2Y₂-Rezeptoren und weitere pyrimidinerge P2Y-Rezeptorsubtypen: Funktionelle Charakterisierung, Klonierung und Suche nach selektiven Liganden. Doktorarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2003**.
194. Kemp, P. A.; Sugar, R. A.; Jackson, A. D. Nucleotide-mediated mucin secretion from differentiated human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *31*, 446-455.
195. Mamedova, L. K.; Joshi, B. V.; Gao, Z. G.; von Kugelgen, I.; Jacobson, K. A. Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y₆ nucleotide receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1763-1770.
196. El-Tayeb, A.; Griessmeier, K. J.; Muller, C. E. Synthesis and preliminary evaluation of [³H]PSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y₁₂ receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5450-5452.
197. Knoblauch, B. H. A.; Muller, C. E.; Jarlebark, L.; Lawoko, G.; Kottke, T.; Wikstrom, M. A.; Heilbronn, E. 5-Substituted UTP derivatives as P2Y₂ receptor agonists. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 809-824.
198. Nishi, H.; Hori, S.; Niitsu, A.; Kawamura, M. Adenosine 5'-(gamma-thio) triphosphate (ATPgammaS) stimulates both P2Y receptors linked to inositol phosphates production and cAMP accumulation in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1181-1190.
199. Nahum, V.; Tulapurkar, M.; Levesque, S. A.; Sevigny, J.; Reiser, G.; Fischer, B. Diadenosine and diuridine poly(borano)phosphate analogues: synthesis, chemical and enzymatic stability, and activity at P2Y₁ and P2Y₂ receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1980-1990.
200. Ko, G.-Y. Funktionelle Testung neuer P2Y₂-Rezeptor-Liganden. Diplomarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, **2004**.
201. Yan, L.; Muller, C. E. Preparation, properties, reactions, and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: toward the development of sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1031-1043.
202. Dennison, C.; Lovrien, R. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Protein Expr. Purif.* **1997**, *11*, 149-161.
203. Wang, W.; Liu, Q. J.; Cui, H. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. *Electrophoresis* **2007**.
204. Huttenlocher, P. R.; Schwartz, A. D.; Klatskin, G. Reye's syndrome: ammonia intoxication as a possible factor in the encephalopathy. *Pediatrics* **1969**, *43*, 443-454.

205. Haghghat, N.; McCandless, D. W.; Geraminegad, P. Responses in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. *Neurochem. Res.* **2000**, *25*, 277-284.
206. Felipo, V.; Butterworth, R. F. Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* **2002**, *67*, 259-279.
207. Butterworth, R. F. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia. *Metab. Brain Dis.* **2002**, *17*, 221-227.
208. Shawcross, D.; Jalan, R. The pathophysiologic basis of hepatic encephalopathy: central role for ammonia and inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2295-2304.
209. Rose, C.; Kresse, W.; Kettenmann, H. Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20937-20944.
210. Jayakumar, A. R.; Panickar, K. S.; Murthy Ch, R.; Norenberg, M. D. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4774-4784.
211. Hazell, A. S.; Butterworth, R. F. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, *222*, 99-112.
212. Heidelbaugh, J. J.; Sherbondy, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am. Fam. Physician* **2006**, *74*, 767-776.
213. Allert, N.; Koller, H.; Siebler, M. Ammonia-induced depolarization of cultured rat cortical astrocytes. *Brain Res.* **1998**, *782*, 261-270.
214. Bai, G.; Rama Rao, K. V.; Murthy, C. R.; Panickar, K. S.; Jayakumar, A. R.; Norenberg, M. D. Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 981-991.
215. Nagaraja, T. N.; Brookes, N. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol* **1998**, *274*, C883-891.
216. Ducis, I.; Norenberg, L. O.; Norenberg, M. D. Effect of ammonium chloride on the astrocyte benzodiazepine receptor. *Brain Res.* **1989**, *493*, 362-365.
217. Norenberg, M. D. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **1998**, *13*, 319-335.
218. Bender, A. S.; Norenberg, M. D. Effect of ammonia on GABA uptake and release in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* **2000**, *36*, 389-395.
219. Rama Rao, K. V.; Jayakumar, A. R.; Norenberg, M. D. Role of oxidative stress in the ammonia-induced mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* **2005**, *47*, 31-38.
220. Eto, W.; Hirano, K.; Hirano, M.; Nishimura, J.; Kanaide, H. Intracellular alkalinization induces Ca²⁺ influx via non-voltage-operated Ca²⁺ channels in rat aortic smooth muscle cells. *Cell Calcium* **2003**, *34*, 477-484.
221. Browning, J. A.; Wilkins, R. J. The effect of intracellular alkalinisation on intracellular Ca⁽²⁺⁾ homeostasis in a human chondrocyte cell line. *Pflugers Arch.* **2002**, *444*, 744-751.
222. Bromberg, P. A.; Robin, E. D.; Forkner, C. E., Jr. The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH₄ plus minus NH₃ system. *J. Clin. Invest.* **1960**, *39*, 332-341.
223. Wiberg, N. *Holleman-Wiberg Lehrbuch der Anorganischen Chemie (textbook of inorganic chemistry)*. Walter de Gruyter: Berlin, New York, 1985.

224. Labotka, R. J.; Lundberg, P.; Kuchel, P. W. Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ^{14}N and ^{15}N saturation transfer NMR spectroscopy. *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, C686-699.
225. Lin, Y.; Cao, Z.; Mo, Y. Molecular dynamics simulations on the Escherichia coli ammonia channel protein AmtB: mechanism of ammonia/ammonium transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10876-10884.
226. Goralski, K. B.; Bose, R.; Sitar, D. S. NH_4^+ modulates renal tubule amantadine transport independently of intracellular pH changes. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *541*, 87-94.
227. Liu, Z.; Chen, Y.; Mo, R.; Hui, C.; Cheng, J. F.; Mohandas, N.; Huang, C. H. Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25641-25651.
228. Liu, Z.; Peng, J.; Mo, R.; Hui, C.; Huang, C. H. Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 1424-1433.
229. Nakhoul, N. L.; Hamm, L. L. Non-erythroid Rh glycoproteins: a putative new family of mammalian ammonium transporters. *Pflugers Arch.* **2004**, *447*, 807-812.
230. Huang, C. H.; Liu, P. Z. New insights into the Rh superfamily of genes and proteins in erythroid cells and nonerythroid tissues. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2001**, *27*, 90-101.
231. Khademi, S.; O'Connell, J., 3rd; Remis, J.; Robles-Colmenares, Y.; Miercke, L. J.; Stroud, R. M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **2004**, *305*, 1587-1594.
232. Winkler, F. K. Amt/MEP/Rh proteins conduct ammonia. *Pflugers Arch.* **2006**, *451*, 701-707.
233. Mak, D. O.; Dang, B.; Weiner, I. D.; Foskett, J. K.; Westhoff, C. M. Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins RhBG and RhCG. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2006**, *290*, F297-305.
234. Weiner, I. D.; Verlander, J. W. Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein. *Acta Physiol. Scand.* **2003**, *179*, 331-338.
235. Westhoff, C. M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion (Paris)*. **2004**, *44*, 1663-1673.
236. Weiner, I. D. The Rh gene family and renal ammonium transport. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2004**, *13*, 533-540.
237. Handlogten, M. E.; Hong, S. P.; Zhang, L.; Vander, A. W.; Steinbaum, M. L.; Campbell-Thompson, M.; Weiner, I. D. Expression of the ammonia transporter proteins Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein in the intestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2005**, *288*, G1036-1047.
238. Hamprecht, B. Cell culture as models for studying neural functions. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1984**, *8*, 481-486.
239. Higashida, H.; Yokoyama, S.; Hoshi, N.; Myojo, Y.; Kawamura, T.; Ito, Y.; Hashii, M.; Sagara, J.; Furuya, K. Phosphoinositides and synaptic function in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **1991**, *98*, 129-137.
240. Tang, X.; Batty, I. H.; Downes, C. P. Muscarinic receptors mediate phospholipase C-dependent activation of protein kinase B via Ca^{2+} , ErbB3, and phosphoinositide 3-kinase in 1321N1 astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 338-344.
241. Ohuchi, Y.; Yanai, K.; Sakurai, E.; Fukui, H.; Yanagisawa, T.; Watanabe, T. Histamine-induced calcium mobilization in single cultured cells expressing histamine

- H₁ receptors: a relationship between its sensitivity and the density of H₁ receptors. *Int. J. Mol. Med.* **1998**, *1*, 355-360.
242. Rzeski, W.; Turski, L.; Ikonomidou, C. Glutamate antagonists limit tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 6372-6377.
243. Haak, L. L.; Heller, H. C.; van den Pol, A. N. Metabotropic Glutamate Receptor Activation Modulates Kainate and Serotonin Calcium Response in Astrocytes. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 1825-1837.
244. Kuser, P. R.; Krauchenco, S.; Antunes, O. A.; Polikarpov, I. The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20814-20821.
245. Arora, K. K.; Shenbagamurthi, P.; Fanciulli, M.; Pedersen, P. L. Glucose phosphorylation. Interaction of a 50-amino acid peptide of yeast hexokinase with trinitrophenyl ATP. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5324-5328.
246. Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Masaki, T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 103-108.
247. Imanishi, T.; Matsushima, K.; Kawaguchi, A.; Wada, T.; Yoshida, S.; Ichida, S. Enhancement of serotonin- and bradykinin-evoked calcium ion dynamics in differentiated NG108-15 cells. *Neurosci. Lett.* **2006**, *405*, 1-4.
248. Norenberg, M. D.; Martinez-Hernandez, A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* **1979**, *161*, 303-310.
249. Cavanagh, J. B.; Kyu, M. H. Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. Neurol. Sci.* **1971**, *12*, 63-75.
250. Gregorios, J. B.; Mozes, L. W.; Norenberg, L. O.; Norenberg, M. D. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. I. Light microscopic studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1985**, *44*, 397-403.
251. Gregorios, J. B.; Mozes, L. W.; Norenberg, M. D. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1985**, *44*, 404-414.
252. Orellana, S. A.; Solski, P. A.; Brown, J. H. Phorbol ester inhibits phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in cultured astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5236-5239.
253. Nitschke, R.; Benning, N.; Ricken, S.; Leipziger, J.; Fischer, K. G.; Greger, R. Effect of intracellular pH on agonist-induced [Ca²⁺]_i transients in HT29 cells. *Pflugers Arch.* **1997**, *434*, 466-474.
254. Mayer, M.; Schaaf, G.; Mouro, I.; Lopez, C.; Colin, Y.; Neumann, P.; Cartron, J.-P.; Ludewig, U. Different Transport Mechanisms in Plant and Human AMT/Rh-type Ammonium Transporters. *J. Gen. Physiol.* **2006**, *127*, 133-144.
255. Marini, A. M.; Matassi, G.; Raynal, V.; Andre, B.; Cartron, J. P.; Cherif-Zahar, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 341-344.
256. Chambrey, R.; Goossens, D.; Bourgeois, S.; Picard, N.; Bloch-Faure, M.; Leviel, F.; Geoffroy, V.; Cambillau, M.; Colin, Y.; Paillard, M.; Houillier, P.; Cartron, J. P.; Eladari, D. Genetic ablation of RhbG in the mouse does not impair renal ammonium excretion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**, *289*, F1281-1290.
257. Rao, K. V.; Panickar, K. S.; Jayakumar, A. R.; Norenberg, M. D. Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 1311-1318.
258. Nakatani, T. Overview of the effects of Ringer's acetate solution and a new concept: renal ketogenesis during hepatic inflow occlusion. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2001**, *23*, 519-528.

259. Reikofski, J.; Tao, B. Y. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Adv.* **1992**, *10*, 535-547.
260. Markowitz, D.; Goff, S.; Bank, A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **1988**, *62*, 1120-1124.
261. Seppen, J.; Barry, S.; Lam, G. M.; Ramesh, N.; Osborne, W. R. Retroviral preparations derived from PA317 packaging cells contain inhibitors that copurify with viral particles and are devoid of viral vector RNA. *Hum. Gene Ther.* **2000**, *11*, 771-775.

Publikationsverzeichnis

Publikation

Petra Hillmann, Kristina Söhl, Christa E. Müller. Ammonium induced calcium mobilization in humane 1321N1 astrocytoma cells. *submitted*

Posterpräsentationen

Petra Hillmann, Geun-Yung Ko, Ivar von Kügelgen, Hans-Dieter Höltje, Christa E. Müller. Functional analysis of single amino acid residues in the human P2Y₂ receptor. *GRK 804 Symposium 2006, Bonn*

Petra Hillmann, Geun-Yung Ko, Ivar von Kügelgen, Hans-Dieter Höltje, Christa E. Müller. Functional analysis of single amino acid residues in the human P2Y₂ receptor. *3rd Summer School Medicinal Chemistry 2006, Regensburg*

Geun-Yung Ko, **Petra Hillmann**, Christa E. Müller, Hans-Dieter Höltje. Homology modelling and investigation of the putative binding site of the human P2Y₂ receptor. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2006, Nürnberg*

Petra Hillmann, Ivar von Kügelgen, Geun-Yung Ko, Hans-Dieter Höltje, Christa E. Müller. Functional analysis of single amino acid residues in the human P2Y₂ receptor. *8th international symposium on adenosine and adenine nucleotides 2006, Ferrara, Italien*

Petra Hillmann, Stefanie Weyler, Marko Kaulich, Geun-Yung Ko, Christa E. Müller. Anthraquinone derivatives as P2Y₂ receptor antagonist, *Purines 2004, Chapel Hill, NC, USA*