

Molekularpharmakologische Analyse einer Variante des humanen P2Y₁₁-Rezeptors

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Elena Elisa Bringmann

aus Bonn

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ivar von Kügelgen
2. Gutachter: PD Andreas Bilkei-Gorzo

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.12.2022

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Für Dieter und Rudolf

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	11
1.1	Überblick über P2Y-Rezeptoren	11
1.2	P2Y ₁₁ -Rezeptor	12
1.2.1	Struktur	12
1.2.2	Pharmakologie	15
1.2.3	Agonist NF546	17
1.2.4	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung	18
1.3	Fluoreszierende Fusionsproteine in der Forschung	19
1.3.1	Fluoreszenzproteine als Expressionsnachweis	19
1.3.2	Methoden zur Untersuchung von Protein-Interaktionen	20
1.3.3	Bedeutung für GPCR	21
1.4	Luciferase-Reportergen-Assay	22
1.4.1	pNFAT-luc	23
1.4.2	pCRE-/ pSRE-/ pAP-1-luc	23
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	25
2.	Material und Methoden	26
2.1	Materialien	26
2.2	Methoden	28
2.2.1	Amplifikation der Rezeptorgensequenz mittels Polymerasekettenreaktion	28
2.2.2	Ligation und Transformation	29
2.2.3	DNA-Minipräparation	30
2.2.4	Zellkultur	31
2.2.5	Expression des Rezeptor-Konstrukts	32
2.2.6	Expressionsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskop	32
2.2.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
2.2.8	Reportergen-Assay	34
2.2.9	Statistik	35

3.	Ergebnisse	36
3.1	Expression des rekombinanten SSF1_P2Y ₁₁ -YFP-Rezeptors	36
3.2	Optimierung der Inkubationszeit	40
3.3	Pharmakologische Charakterisierung des rekombinanten SSF1_P2Y ₁₁ -YFP-Rezeptors mit Luciferase-Reporter-Gen-Assays	42
3.3.1	Vergleich nicht-transfizierter und transfizierter Astrozytomzellen	42
3.3.2	Aktivierung verschiedener Signaltransduktionsmechanismen	45
3.3.3	Vergleich verschiedener Agonisten	47
3.3.4	Testung von NF546 bei kürzerer Inkubationszeit	50
4.	Diskussion	52
4.1	Expressionsnachweis des Fusionsproteins in humanen Zellen	52
4.2	Funktion des Fusionsproteins als Rezeptor	53
4.3	Kopplung an G-Proteine und Signaltransduktion	54
4.4	Wirksamkeit verschiedener Liganden am Rezeptor	55
4.5	Methodenkritik	57
4.6	Ausblick	58
5.	Zusammenfassung	61
6.	Anhang	63
6.1	Material und Geräte	63
6.2	Vektorkarten und Enhancer-Elemente	65
7.	Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

2MeSATP	2-Methylthio-ATP
A3P5PS	Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ADP β S	Adenosin-5'-0-2-thiodiphosphat
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP α S	Adenosin-5'-a-thiomonophosphat
AP-1	activator protein 1
ARC67085	2-Propylthio- β δ -dichloromethylen-ATP
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP γ S	Adenosin 5'-3-thiotriphosphat
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz-Energieübertragung
BzATP	2'(3)-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	Adenosin-3', 5'-cyclomonophosphat
CCD	charge coupled device
cDNA	komplementäre DNA
CFP	cyan fluorescent protein
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO	chinese hamster ovary-cell
Cl	Chlor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRE	cAMP response element
CREB-P	cAMP response element binding protein

DAG	Diacylglycerin
DC	dendritische Zellen
DLR	dual luciferase reporter assay
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EB	Elutions-Puffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Extrazellulär-Loop
ERK	extracellulare signal-regulated kinase
FBS	fetales bovines Serum
Flp	Flippase
FRET	Fluoreszenz-Energieübertragung
G-CSF	Granulozytenkolonie stimulierender Faktor
GFP	green fluorescent protein
G _i	inhibierendes G-Protein
Glu	Glutamat
GlutaMAX	Aminosäuren-Ergänzungstoff
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G _q	aktivierendes G-Protein
G _s	stimulierendes G-Protein
HBSS	hanks balanced salt solution
HCl	Chlorwasserstoff
HL	humane promyelotische Leukämiezellen
IFN- γ	Interferon- γ
IL2	Intrazellulär-Loop 2
IL-8	Interleukin-8
IP ₃	Inositoltriphosphat

LB	lysogeny broth, Nährmedium
Leu	Leucin
Luc	Luciferase
Lys	Lysin
MAP	mitogen activated protein
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NF157	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino(4-fluoro-3,1-phenyl)carbonylimino))bis-1,3,5-naphthalen-trisulfonsäure
NF340	4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methyl-phenyl)carbonylimino))bis(naphthalen-2,6-disulfonsäure)
NF546	4,4'-Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino 3,1-(4-methyl-phenyl)carbonylimino))bis(1,3-xylene-alpha,alpha'-diphosphonsäure
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
Ø	Durchmesser
OptiMEM	minimal essential medium
P62	SQSTM1, Sequestosom 1, Autophagieadapterprotein
PB	Phosphat-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Polyethylen-Puffer
pH	pH-Wert = Protonenaktivitätsexponent
Phe	Phenylalanin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
pOG	Flp-Rekombinase Expressionsvektor
Pro	Prolin
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma, Proteinkinase

RET	Resonanzenergietransfer
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
S.O.C.	super optimal broth with catabolite repression
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SRE	serum response element
SSF	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSF1	RNA-Bindungsprotein
SSLR	single secreted luciferase reporter assay
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	transcription factor (Transkriptionsfaktor)
TM/TD	Transmembrandomäne
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphat-Glucose
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Val	Valin
YFP	yellow fluorescent protein

1. Einleitung

1.1 Überblick über P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Nukleotid-Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen (von Kügelgen und Hoffmann, 2016). Es existieren acht humane Subtypen: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ (Jacobson et al., 2015, 2020; von Kügelgen, 2021). Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Aminosäuresequenz als auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften voneinander (von Kügelgen und Hoffmann, 2016). Sie kommen in verschiedenen Zellarten vor, wobei fast alle menschlichen Zellen P2Y-Rezeptoren exprimieren (von Kügelgen und Hoffmann, 2016; von Kügelgen, 2021). Es gibt Hinweise, dass P2Y-Rezeptoren wichtige Vermittler bei Krankheitsbildern wie Diabetes mellitus, Osteoporose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sein können (Erlinge, 2011). Ihre mögliche Beteiligung an Krankheits- und Heilungsprozessen und ihr ubiquitäres Vorkommen im menschlichen Körper macht sie pharmakologisch sehr interessant. Andere Rezeptoren dieses Nummerierungssystems (P2Y₃, P2Y₅, P2Y₇₋₁₀) sind keine funktionalen Säugetier-Nukleotidrezeptoren und daher nicht mit aufgelistet (Jacobson et al., 2012).

Zur Einteilung der P2Y-Rezeptoren in Subtypen lassen sich G_i-gekoppelte (P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) Rezeptoren, die die intrazelluläre Adenylatcyclase hemmen und G_q-gekoppelte (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁) Rezeptoren, die die intrazelluläre Phospholipase C (PLC) aktivieren, unterscheiden (Jacobson et al., 2012, 2020). Ein besonderer Fall ist der P2Y₁₁-Rezeptor, der zusätzlich zur G_q-Kopplung G_s-gekoppelt eine Stimulierung der Adenylatcyclase vermitteln kann (von Kügelgen, 2006). Alle Subtypen haben die Eigenschaft durch Dinukleotide, Dinukleosid-Triphosphate bzw. Dinukleosid-Tetraphosphate, Nukleosid-Polyphosphat-Zucker oder Mononukleotide aktiviert zu werden (Jacobson et al., 2015). Unterschiede zeigen sich allerdings in ihrer Affinität zu verschiedenen physiologischen Agonisten mit folgender Zuordnung zu den humanen Subtypen (potentester Agonist aufgeführt): ATP (P2Y₂ und P2Y₁₁), ADP (P2Y₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃), UTP (P2Y₂ und P2Y₄), UDP (P2Y₆ und P2Y₁₄) und UDPG (P2Y₁₄), wobei in höheren Konzentrationen Überschneidungen möglich sind (Jacobson et al., 2015, 2020). Nukleotid-ähnliche Antagonisten und Partialagonisten sind für einige

Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₂) ebenfalls bekannt (Jacobson et al., 2015). Die als Rezeptorliganden fungierenden Nukleotide sind ubiquitär im Körper vorhanden, ihre extrazelluläre Konzentration kann je nach Körperzustand jedoch stark variieren. Ihre Freisetzung wird bspw. durch Hypoxie, Ischämie, mechanischen Stress oder Verletzung beeinflusst (Jacobson et al., 2012). Abgebaut werden sie durch extrazelluläre Nukleotidasen (Robson et al., 2006).

1.2 P2Y₁₁-Rezeptor

1.2.1 Struktur

Der P2Y₁₁-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Nukleotid-Rezeptor aus der Familie der P2Y-Rezeptoren (Jacobson et al., 2015). Der DNA-Strang wird von 1113 Basenpaaren kodiert und von einem Intron unterbrochen (Communi et al., 1997, 2001). Der P2Y₁₁-Rezeptor ist der einzige P2Y-Rezeptor, dessen Gensequenz ein Intron enthält (vgl. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5032>). Wie bereits für die P2Y-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ bewiesen (Zhang et al., 2014, 2015), wird auch für den P2Y₁₁-Rezeptor vermutet, dass er sieben Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus, einem intrazellulären C-Terminus, sowie jeweils drei intrazellulären und extrazellulären Aminosäure-Schleifen aufweist (von Kugelgen und Hoffmann, 2016). Abbildung 1 stellt die vermutete zweidimensionale Rezeptorstruktur dar. Die vermutete Nukleotidbindungstasche des P2Y₁₁-Rezeptors wird wahrscheinlich durch drei positiv geladene Aminosäuren (Arg106, Arg268, Arg307; in Abbildung 1 gelb markiert) gebildet, die mutmaßlich die Phosphatbindung des Agonisten ATP vermitteln (Ecke et al., 2008). Besonders die Aminosäuren Arg106 und Arg307 seien entscheidend für die Rezeptoraktivierung (Ecke et al., 2008). Zur Ligandenerkennung sei zudem die zweite extrazelluläre Schleife (EL2) mit einem Glutamat (Glu 186; in Abbildung 1 grün markiert) von Bedeutung (Ecke et al., 2008).

Das Rezeptorprotein zeigt Ähnlichkeit mit dem P2Y₁-Rezeptor. Die Aminosäuresequenz des P2Y₁₁-Rezeptors ist zu 33 % mit der des P2Y₁-Rezeptors identisch, die zweite und dritte Extrazellulär-Schleife ist jedoch wesentlich länger als die der anderen P2Y-Subtypen (Communi et al., 1997).

Vermutete zweidimensionale Aminosäurestruktur des humanen P2Y₁₁-Rezeptors

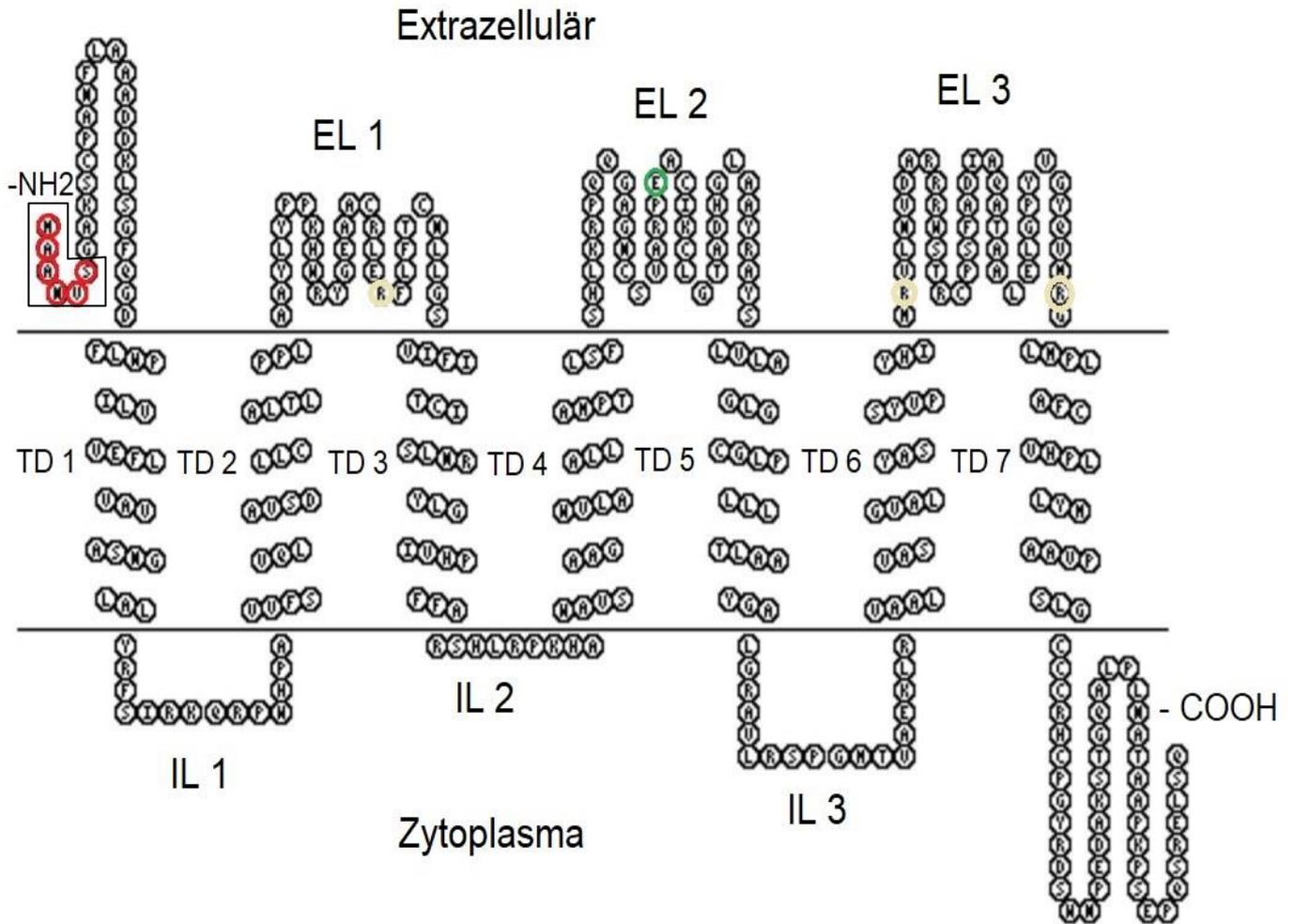


Abb. 1 – Die Abbildung zeigt die vermutete zweidimensionale Aminosäurestruktur des humanen P2Y₁₁-Rezeptors. TD (Transmembrandomäne), EL (extrazelluläre Schleife), IL (intrazelluläre Schleife), NH₂ (N-Terminus), COOH (C-Terminus), R(gelb): Aminosäuren Arg106/268/307, E(grün): Aminosäure Glu186, MAANVS(rot): Initiale Aminosäuresequenz des nicht-chimären P2Y₁₁-Rezeptors. Quelle: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96G91>

Abbildung 1 zeigt die Aminosäuresequenz der 371 Aminosäuren und die vermutete zweidimensionale Struktur des P2Y₁₁-Rezeptors in der Zellmembran. Sie wird charakterisiert durch einen extrazellulären N-Terminus (NH₂), 7 Transmembrandomänen (TD), die durch drei intrazelluläre (IL) und drei extrazelluläre (EL) Aminosäureschleifen verbunden werden, sowie einen intrazellulären C-Terminus (COOH). Die ersten sechs Aminosäuren zu Beginn der Sequenz am N-Terminus (durch das Rechteck markiert) definieren den nicht-chimären P2Y₁₁-Rezeptor mit den

Aminosäuren: Methionin, Alanin, Alanin, Asparagin, Valin, Serin (**MAANVSGAK**; in Abbildung 1 rot markiert) (Communi et al., 2001). Bei dem chimären SSF1-P2Y₁₁-Rezeptor besteht dieser Anfang aus den drei Aminosäuren Methionin, Asparaginsäure und Arginin (**MDRGAK**) (Communi et al., 2001). Das Schema wurde mit Hilfe einer publizierten Aminosäuresequenz (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q96G91>) und der Internetseite <http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO> (TOPO2 Transmembrane Protein Display Page) gezeichnet.

Eine pharmakologische Besonderheit ist, dass im Vergleich zu anderen P2Y-Rezeptoren eine chimäre Variante des P2Y₁₁-Rezeptors existiert, die durch intergenetisches Spleißen entsteht (Communi et al., 2001). Dies ist äußerst selten für Rezeptoren in Säugetierzellen (Communi et al., 2001). Die Fusions-cDNA entsteht aus Teilen des Exons des Kernproteins *Saccharomyces Cerevisiae* (SSF1) und aus Teilen des P2Y₁₁-Exons (Communi et al., 2001). Das SSF1 ist ein in Hefen identifiziertes Kernprotein (Communi et al., 2001). Die Gene des P2Y₁₁-Rezeptors und des SSF1-Proteins liegen benachbart auf dem humanen Chromosom 19 (Communi et al., 2001). Der Rezeptor SSF1_P2Y₁₁ entsteht durch intergenes Spleißen, wobei eine genomische Sequenz zwischen dem ersten Drittel des letzten Exons des SSF1-Gens und dem zweiten Exon des P2Y₁₁-Gens entfernt wird (Communi et al., 2001). Dieser Vorgang ist regulierbar und findet in Abwesenheit einer Consensus-Spleißdonorstelle, Rest 426 des SSF1-Proteins, statt (Communi et al., 2001). Der genaue Mechanismus der Spleiß-Regulation ist allerdings noch nicht bekannt. Die Studie von Communi et al. (2001) hat die Exons dieser beiden Rezeptoren sequenzanalysieren können. Vergleicht man die Aminosäuresequenz beider Rezeptorvarianten, unterscheiden sie sich in den oben genannten Aminosäuren am N-Terminus (Abbildung 1). Versuche zeigten, dass trotz gleicher Menge an nachgewiesener Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) für das Protein SSF1_P2Y₁₁ und für das Protein P2Y₁₁ in transfizierten Hamsterovarialzellen (CHO-K1-Zellen) das Protein SSF1_P2Y₁₁ weniger stark exprimiert wird (Communi et al., 2001). Dies lässt vermuten, dass die entsprechende mRNA für das Protein SSF1_P2Y₁₁ im Vergleich zur mRNA für das Protein P2Y₁₁ instabiler ist oder dass nicht jede transkribierte mRNA zu einem Protein translatiert wird (Communi et al., 2001). Die Transkripte beider Gene führen zu einer 5,6-kb-RNA (Communi et al., 2001).

1.2.2 Pharmakologie

Pharmakologisch ist besonders, dass der humane P2Y₁₁-Rezeptor an das G_q-Protein und an das G_s-Protein koppelt und somit sowohl den intrazellulären Phosphoinositol-Calcium- als auch den Adenosin-3',5'-cyclomonophosphat (cAMP) -Signalweg beeinflussen kann (Communi et al., 1999) (Abbildung 2). Die Potenz verschiedener Agonisten ist für beide Signalwege ähnlich und lautet mit absteigender Reihenfolge: ARC67085 > ATP_γS ≈ BzATP > ATP > ADPβS > 2MeSATP (Communi et al., 1999, 2001; Jacobson et al., 2020). Für physiologisch vorkommende Nukleotide wird die Reihenfolge mit: ATP > ADP >> AMP = Adenosin beschrieben (van der Weyden et al., 2000b). UTP und UDP zeigen am P2Y₁₁-Rezeptor keine agonistische Aktivität (Communi et al., 1997; van der Weyden et al., 2000a). Partialagonistisch wirken ADPβS, AMPαS und A3P5PS, die in höheren Konzentrationen die ATP-Antwort hemmen können (Communi et al., 1999). Als Antagonisten sind nicht-selektiv Suramin und Reaktiv-Blau 2 sowie die Suraminanaloga NF157 und NF340 bekannt (Communi et al., 1999).

Es wurden die oben bereits erwähnten Varianten des Rezeptors in der bisherigen Literatur beschrieben. Das Fusionstranskriptionsprodukt SSF1_P2Y₁₁ weist einige Unterschiede zum P2Y₁₁-Rezeptor auf (Communi et al., 2001). Die Aktivierung des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors erzeugte in CHO-K1-Zellen eine cAMP-Antwort auf extrazelluläres ATP, signifikant und qualitativ gleichwertig mit der Aktivierung des P2Y₁₁-Rezeptors. Allerdings war in den untersuchten Zellen sowohl der basale cAMP-Spiegel als auch die maximale intrazelluläre Akkumulation von cAMP geringer (Communi et al., 2001). Es zeigte sich, dass die Adeninnukleotid-Substrate ATP_γS und Benzoyl-ATP, die bei P2Y₁₁-Rezeptor als Agonisten wirkten, ebenfalls den SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor aktivierten (Communi et al., 1999). ADP, UTP und UDP zeigten keine Wirkung (Communi et al., 2001). Das Spleißen zwischen den Genen führt zu einer zusätzlichen potentiellen ATP-Bindungsstelle im SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor (Communi et al., 2001). Dies scheint jedoch keine wesentliche Auswirkung auf die Nukleotid-Affinität des Rezeptors zu haben (Communi et al., 2001). Von pharmakologischem Interesse ist außerdem die Internalisierung eines Rezeptors und somit seine mögliche Desensibilisierung gegenüber einem Agonisten. Der P2Y₁₁-Rezeptor allein ist nicht zur Internalisierung fähig (Ecke et al., 2008). Kommt es aber Agonisten-induziert zu einer Oligomerbildung

mit dem P2Y₁-Rezeptor, wird eine Internalisierung des Rezeptors möglich (Ecke et al., 2008).

Intrazelluläre Signalwege des P2Y₁₁-Rezeptors

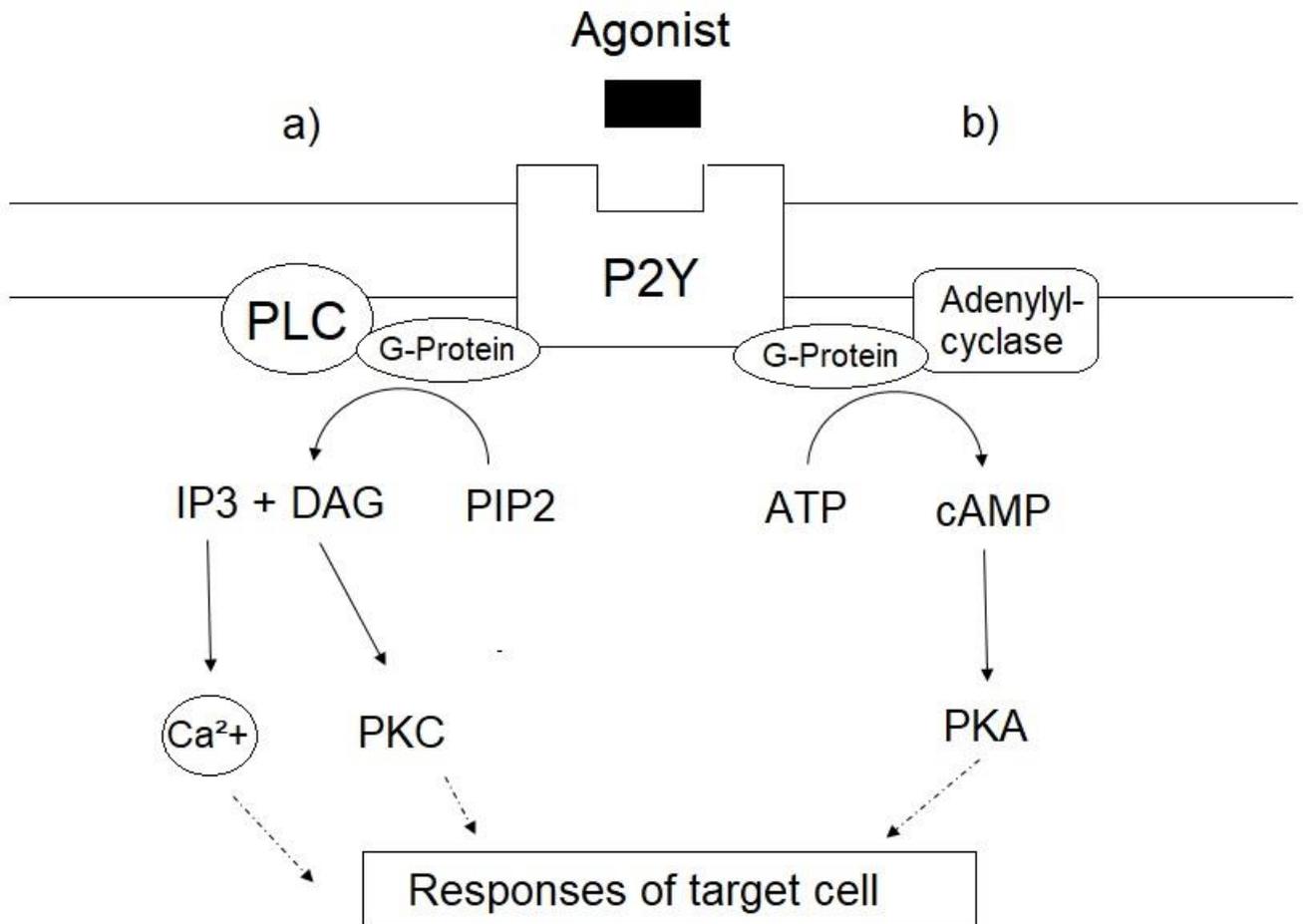
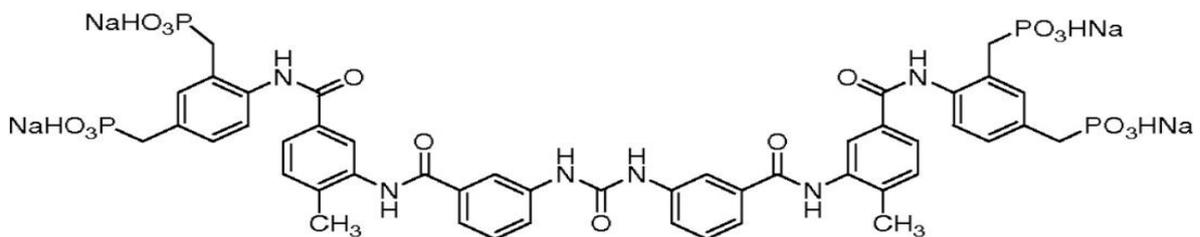


Abb. 2 - Gezeigt werden die beiden über den P2Y₁₁-Rezeptor aktivierten intrazellulären Signalwege. (a) Ein Agonist aktiviert über den Rezeptor ein G_q-Protein und dieses wiederum die membrangebundene Phospholipase C, die intrazellulär PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu DAG (Diacylglycerin) und IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) spaltet, wodurch Ca²⁺ (Calcium) freigesetzt und die Proteinkinase C aktiviert wird. (b) Ein Agonist aktiviert über den Rezeptor ein G_s-Protein und dieses wiederum die membrangebundene Adenylatcyclase, die intrazellulär ATP (Adenosintriphosphat) zu cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) spaltet, wodurch die Proteinkinase A aktiviert wird. Beide Wege aktivieren oder hemmen in den Zielzellen je nach Zellart unterschiedliche Mechanismen und fungieren so als Signaltransduktionsmechanismen. (Das Schema wurde mit PowerPoint erstellt, modifiziert nach: van der Weyden, 2000c)

1.2.3 Agonist NF546

NF546 wird als ein nicht-nukleotidischer P2Y₁₁-Rezeptor-Agonist mit relativer Selektivität am P2Y₁₁-Rezeptor beschrieben (Meis et al., 2010; Jacobson et al., 2020). Er aktiviert in geringerem Ausmaß ebenfalls P2Y₂-, P2Y₆- und P2Y₁₂-Rezeptoren (Meis et al., 2010). Die Potenz von NF546 am P2Y₁₁-Rezeptor ist niedriger als bei anderen Agonisten (Meis et al., 2010). Er ist 2,5-fach weniger wirksam als der physiologische Agonist ATP und 10-fach weniger als ATP_γS (Meis et al., 2010). Die Bindungsstelle von NF546 am P2Y₁₁-Rezeptor ist die Gleiche wie für ATP_γS (Meis et al., 2010). An getesteten P2X-Rezeptoren (P2X₁, P2X₂, P2X₃) hat NF546 keine Wirkung (Meis et al., 2010). Kompetitiver Antagonist von NF546 ist das Suraminanalogon NF340 (Meis et al., 2010). NF546 fehlt im Gegensatz zu seinem Analogon NF157, einem P2Y₁₁-Antagonisten, eine Naphthalinsulfonsäuregruppe, stattdessen hat NF546 eine Benzylphosphonsäuregruppe (Meis et al., 2010) (Abbildung 3). Aufgrund seiner benzylichen Phosphonsäurestruktur kann er nicht durch Nukleotidasen hydrolysiert werden (Meis et al., 2010). NF546 führt in von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen zu Thrombospondin-1-Sekretion und Hemmung der Lipopolysaccharid-stimulierten Interleukin-12-Freisetzung sowie zur Interleukin-8-Freisetzung (Meis et al., 2010). NF546 aktiviert sowohl rekombinante P2Y₁₁-Rezeptoren, die in 1321N1-Astrozytomzellen exprimiert sind, als auch native P2Y₁₁-Rezeptoren in von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (Meis et al., 2010). NF546 wird daher als Agonist mit Präferenz am P2Y₁₁ beschrieben (Meis et al., 2010).



NF546

Abb. 3 - Strukturformel des P2Y₁₁-Agonisten NF546 (4,4'-Caronylbis(imino-3,1-phenylen-caronylimino-3,1-(4-methyl-phenylen)carbonylimino))bis(1,3-xylene-alpha, alpha'- diphosphonsäure) (Modifiziert nach Meis et al., 2010).

1.2.4 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung

Der P2Y₁₁-Rezeptor ist auf vielen menschlichen Zellen vorhanden. Es gibt zahlreiche Hypothesen über dessen Beteiligung an wichtigen physiologischen Prozessen und Krankheitsbildern. Daraus ergeben sich wiederum viele Möglichkeiten, diese pharmakologisch über den Rezeptor zu beeinflussen. Der P2Y₁₁-Rezeptor ist daher ein interessanter Angriffspunkt für neue Pharmaka. ATP fungiert unter anderem als Verletzungs- und Ischämieindikator, da ATP nach Zellzerstörung in großen Mengen freigesetzt wird (Chadet et al., 2015). Über die Bindung an Rezeptoren, wie beispielsweise dem P2Y₁₁-Rezeptor, werden so viele Zellreaktionen ausgelöst (Chadet et al., 2015). Immunsuppressiv wirkt der P2Y₁₁-Rezeptor in dendritischen Zellen, indem er deren Reifung und die Hemmung der Interleukin-12- und Interleukin-10-Produktion vermittelt (Chadet et al., 2015). Der P2Y₁₁-Rezeptor wird zudem in menschlichen leukämischen Zelllinien HL-60 (Monozyten- und Granulozyten- Vorstufen) sowie in NB4 (Zellen einer akuten Promyelozyten-Leukämie) exprimiert und erhöht nach ATP-Stimulation die intrazelluläre Konzentration von cAMP (van der Weyden et al., 2000a). Somit ist er beispielsweise an der Differenzierung der HL-60-Zellen beteiligt (Conigrave et al., 2000). Die Transkriptionsrate der intrazellulären P2Y₁₁-Transkriptionsprodukte kann wesentlich durch Retinsäure, Dimethylsulfoxid oder den Granulozytenkoloniestimulierenden Faktor (G-CSF) gesteigert werden, die alle bei der Granulozyten-Differenzierung freigesetzt werden (Communi et al., 1997). So hat der P2Y₁₁-Rezeptor möglicherweise Einfluss auf die Granulopoese (Communi et al., 1997). Es wurde außerdem gezeigt, dass Neutrophile den P2Y₁₁-Rezeptor exprimieren und eine Rezeptorhemmung die Verzögerung der Neutrophilen-Apoptose aufheben kann (Vaughan et al., 2007). Obwohl der P2Y₁₁-Rezeptor auch auf der Membran von Erythrozyten-Leukämie-Zellen K562 und Monozyten-Leukämie-Zellen U937 vorhanden ist, wird hier durch den Agonisten ATP keine cAMP-Erhöhung erreicht (van der Weyden et al., 2000a). Die mRNA des P2Y₁₁-Rezeptors wurde außerdem in Zellen des humanen Gehirns, der Niere, des Hodens, des Muskels, der Plazenta, des Dünndarms, der Makrophagen, der Milz, der Leber sowie auf Epithelien detektiert (van der Weyden et al., 2000b; Jacobson et al., 2020). Durch ATP aktiviert, induziert der P2Y₁₁-Rezeptor über cAMP einen intrazellulären Signalweg, der das Protein cAMP response element binding

protein (CREB) phosphoryliert und so den Renin-Promoter stimulieren kann (van der Weyden et al., 2000b). Zudem führt der P2Y₁₁-Rezeptor, aktiviert durch Interferon- γ (IFN- γ), zur Produktion des Entzündungsmediators Interleukin-6 (IL-6) in Keratinozyten und trägt so zu Entzündungsreaktionen der Haut bei (Nagakura et al., 2014). Nach UV-A Strahlung wird über ATP ebenfalls die Interleukin-6 Produktion erhöht, was durch die Antagonisierung am P2Y₁₁-Rezeptor gehemmt werden kann (Kawano et al., 2015). In Epithelzellen des Pankreas wird der cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-Chlorid-Kanal P2Y₁₁-vermittelt über cAMP aktiviert (Nguyen et al., 2001). Der Rezeptor ist somit an dessen exokriner Funktion beteiligt (Nguyen et al., 2001). Experimente ergaben, dass sich Kardiofibroblasten durch den P2Y₁₁-Rezeptor beeinflussen lassen, was eine Rolle beim Myokardinfarkt spielen könnte (Cortal et al., 2015). P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten dämpfen die intrazelluläre Calcium-Antwort und fördern das, durch UTP induzierte, Wachstum der Kardiofibroblasten, wohingegen P2Y₁₁-Rezeptor-Agonisten die Proliferation hemmen (Cortal et al., 2015). Der P2Y₁₁-Rezeptor ist auch auf Hinterwurzelganglien und dem Nervus ischiadicus zu finden (Barragán-Iglesias et al., 2015). Tier-Experimente lassen darauf schließen, dass der P2Y₁₁-Rezeptor für die Formalin-induzierte Vermittlung des Schmerzes von Bedeutung ist (Barragán-Iglesias et al., 2015). In spinalen Mikroglia und Astrozyten spielt der P2Y₁₁-Rezeptor ebenfalls eine Rolle (Barragán-Iglesias et al., 2014). Die Verletzung eines Nervs führt zur Hochregulierung des P2Y₁₁-Rezeptor und P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten reduzieren die taktile Allodynie (Barragán-Iglesias et al., 2014).

1.3 Fluoreszierende Fusionsproteine in der Forschung

1.3.1 Fluoreszenzproteine als Expressionsnachweis

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und hat die Eigenschaft, unter ultraviolettem oder blauem Licht grünes Licht zu emittieren (Shimomura et al., 1962). Diese Eigenschaft behält das Protein bei, wenn es in lebenden eukaryontischen Zellen exprimiert wird, wodurch es für Versuche *in vitro* und *in vivo* genutzt werden kann (Chalfie et al., 1994; Inoué und Tsijū, 1994). Wenn das GFP-Gen als Reportergen mit einem Rezeptorgen fusioniert wird, können transfizierte

Zellen durch Fluoreszenz detektiert werden (Chalfie et al., 1994). Andere Varianten des GFPs sind das gelb fluoreszierende Protein (YFP) und das cyan fluoreszierende Protein (CFP) (Heim und Tsien, 1996). Für die Fluoreszenz von GFP und seiner Varianten YFP und CFP ist keine Substratzugabe notwendig, was eine *in situ* Beobachtung möglich macht (Andersen et al., 1998). Per Fluoreszenz-Mikroskop lassen sich Zellen mit fluoreszierenden Proteinen einfach nachweisen, so dass sich diese Methode als Expressionsnachweis von Proteinen bewährt hat (Combs und Shroff, 2017).

1.3.2 Methoden zur Untersuchung von Protein-Interaktionen

Durch die Messung der Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) lassen sich Wechselwirkungen zwischen Proteinen untersuchen (Dinant et al., 2008). FRET ist eine Energieübertragung zwischen zwei Molekülen, dem sogenannten angeregten Donor und einem nahegelegenen Akzeptor (Sun et al., 2011). Diese hängt von der Distanz der beiden Moleküle ab und ist auf etwa 1-10 nm beschränkt (Sun et al., 2011). Wichtig für das Fluoreszenzprotein-Paar ist außerdem die Überschneidung des Donoremmissionsspektrums mit dem Akzeptorabsorptionsspektrum sowie eine günstige Dipol-Orientierung (Sun et al., 2011). Zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen muss man die zu untersuchenden Proteine mit einem Fluoreszenzträger, einem sogenannten Fluorophor, markieren, der dann entweder als Akzeptor oder Donor fungiert (Dinant et al., 2008). In der Forschung häufig verwendete Fluoreszenzproteine sind GFP und YFP (Dinant et al., 2008). Sie bilden durch ihre Spektrum-Qualitäten ein wirksames Akzeptor-Donor-Paar, können aber auch in anderen Kombinationen verwendet werden (Dinant et al., 2008). Die FRET-Messung zwischen zwei Rezeptoren kann das Vorhandensein eines Rezeptorkomplexes in transfizierten Zellen nachweisen, wenn die Rezeptoren mit Fluoreszenzproteinen markiert wurden, da es nach Dimerbildung zu einer FRET zwischen beiden kommt (Ciruela et al., 2010). Somit können beispielsweise Rezeptor-Oligomerisierungen nachgewiesen werden (Ciruela et al., 2010). Um die FRET zu ermitteln hat sich die Durchflusszytometrie als sensibles Verfahren herausgestellt (He et al., 2003). Klassische Resonanz-Energieübertragung (RET) -Techniken zur Proteininteraktionsuntersuchung sind nicht nur die FRET, sondern auch die Bioluminescence-RET-Untersuchung (BRET) (Ciruela

et al., 2010). BRET beschreibt ebenfalls die Energieübertragung zwischen einem Donor und einem Akzeptor-Fluoreszenzprotein (Deriziotis et al., 2014). Als Donor-Akzeptor-Paare werden hier aber das Biolumineszenz-Enzym Luciferase als Donor und Akzeptor-Proteine wie YFP, GFP oder CFP verwendet (Dimri et al., 2016). Um die Wechselwirkung zweier Proteine zu messen, wird ein Protein mit Luciferase, das andere mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert (Deriziotis et al., 2014). Das Prinzip dieser Zellexperimente besteht in der intrazellulären Expression beider Fusionsproteine und der anschließenden Zugabe eines Luciferase-Substrats (Ciruela et al., 2010). Luciferase-Photonen können bei Protein-Protein-Interaktion Fluoreszenz induzieren, die dann beispielsweise mit einem Mikroplattenluminometer gemessen werden kann (Kato und Jones, 2010).

1.3.3 Bedeutung für GPCR

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren werden mittels unterschiedlicher physiologischer, biochemischer und pharmakologischer Ansätze untersucht, wobei unter anderem radioaktive Methoden sowie FRET und BRET zum Einsatz kommen (Ciruela et al., 2014). Vor allem Letztere haben zu großen Fortschritten in der Charakterisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und der Identifizierung ihrer Signalkaskaden geführt (Ciruela et al., 2014). Durch die Herstellung verschiedenster fluoreszierender Substrate ist es möglich geworden, ihre Interaktion mit einem GPCR zu erforschen (Stoddart et al., 2015). BRET bietet zum Beispiel die Möglichkeit, Rezeptor-Liganden-Interaktionen zeitlich synchron in lebenden Zellen zu messen (Stoddart et al., 2015). Auch können per YFP-Kopplung an Rezeptoruntereinheiten der GPCR Aussagen über deren Aktivität und Funktion gemacht sowie multimere Proteinkomplexe erkannt werden (Ciruela et al., 2010). Die Nutzung der Fluoreszenzproteine ist außerdem für den Expressionsnachweis von Rezeptoren in Zellen von großer Bedeutung. Zellen, die mit YFP-GPCR kotransfiziert wurden, können unter einem Fluoreszenzmikroskop erkannt werden. Für folgende Versuche ist damit gewährleistet, dass sie den zu untersuchenden GPCR exprimieren. Fusionsproteine aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Fluoreszenzproteinen, wie YFP, CFP und GFP spielen somit für die Forschung eine entscheidende Rolle. Mit ihrer Hilfe können Agonisten und Antagonisten untersucht,

aber auch Struktureigenschaften analysiert und die Expression von Proteinen nachgewiesen werden.

1.4 Luciferase-Reportergen-Assay

Das Luciferase-Assay ist ein Biolumineszenz-basiertes Reportergen-Assay, das zur Identifikation von Genexpression in transfizierten Zellen und aktivierter Signaltransduktionsmechanismen verwendet werden kann (Dressler et al., 2014; Yun und Dasgupta, 2014). Dafür wird durch Transfektion der Zelle mit dem Luciferase-Plasmid eine bestimmte Promotorsequenz mit dem Luciferasegen gekoppelt (Barriscale et al., 2014). Das Enzym Luciferase katalysiert mit Hilfe des Kofaktors ATP die oxidative Decarboxylierung des Substrates Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Lichtemission erzeugt wird (Yun und Dasgupta, 2014) (Abbildung 4). Kommerziell erhältliche Reaktionsgemische enthalten alle für diese Reaktion notwendigen Substrate, sowie einen Lysepuffer, um die intrazelluläre Luciferase freizusetzen. Nach Zugabe der Assaylösung zu den transfizierten Zellen kann per Messung der Lichtemission durch ein Luminometer indirekt auf die Luciferase-Aktivität und somit auf die Aktivierung des Promotorgens geschlossen werden (Yun und Dasgupta, 2014). Das Assay kann somit zum Nachweis der Aktivierung von Proteinen, insbesondere von Rezeptoren, dienen.

Luciferase-Reaktion

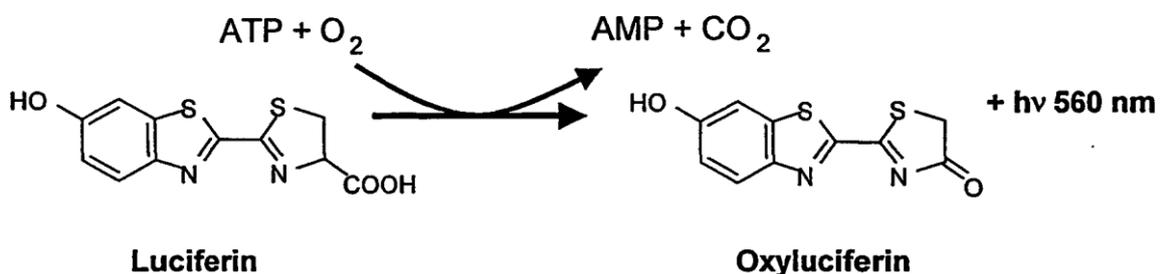


Abb. 4 – Die Luciferase katalysiert die Monooxygenierung des Luciferins zu Oxyluciferin in Anwesenheit von ATP und molekularem Sauerstoff. Bei dieser Reaktion entsteht unter anderem Licht der Wellenlänge 560 nm. (Modifiziert nach: [http:// patentimages. storage. googleapis. com/ EP1339853B1/ imgb 0002. png](http://patentimages.storage.googleapis.com/EP1339853B1/imgb0002.png))

1.4.1 pNFAT-luc

Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) ist ein Transkriptionsfaktor und fungiert unter anderem als Calcium-Sensor (Qin et al., 2014). Die Nutzung des NFAT-Signalweges ist eine Möglichkeit, per Luciferase-Assay Signaltransduktionswege zu erforschen (Abbildung 5). Erhöht sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch bspw. den Phospholipase-C Weg, aktiviert Calcineurin NFAT und dieser im Zellkern wiederum nachgeschaltete Zielgene (Qin et al., 2014). Das Calciumsignal wird so direkt mit der Genexpression verknüpft (Qin et al., 2014). Unter Verwendung des Plasmids pNFAT-luc, das das Luciferase-Gen, kontrolliert durch den NFAT-Promotor, enthält, wird so bspw. durch NFAT die Transkription der Luciferase aktiviert. Nach Zugabe des Substrates Luciferin katalysiert die Luciferase Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Licht frei wird (Yun und Dasgupta, 2014). Dieses Licht kann als Maß des intrazellulären Calciumanstiegs gemessen werden. So gibt die Lichtmessung nach Luciferinzugabe indirekt Rückschlüsse auf den intrazellulären Calciumanstieg und den aktivierten Signaltransduktionsweg, der zur Luciferase-Expression geführt hat. Nützlich ist dies besonders für die Erforschung von Signalwegen und Agonistenaffinitäten der GPCRs, die per G_q -Protein intrazellulär an den PLC-Weg und somit an die Calcium-NFAT-Luciferase-Signalkaskade gekoppelt sind (van der Weyden, 2000c).

1.4.2 pCRE- /pSRE-/ pAP-1-luc

Weitere Signaltransduktionswege können mit Hilfe der Reporterassays untersucht werden (Abbildung 5). cAMP response element (CRE) fungiert als Signalweg, welches durch den cAMP-Weg über das G_s -Protein, die Proteinkinase A und den Transkriptionsfaktor CREB-P aktiviert werden kann (Dressler et al., 2014). Serum response element (SRE) ist ein Signalweg, das durch das Protein $p62^{TCF}$ aktiviert wird (Shaw et al., 1989). $p62^{TCF}$ ist Endpunkt des Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalwegs (Shaw et al., 1989), der wiederum über das G_i -Protein aktiviert wird (Howe und Marshall, 1993). Activator protein 1 (AP-1) ist ein Signalweg, das über eine Signalkaskade per G_i -Protein und extracellular signal-regulated kinases (ERKs) aktiviert wird (Hedin et al., 1999).

Mit Nutzung der Plasmide pCRE-/ pSRE-/ pAP-1-luc kann so durch pCRE, pSRE bzw. pAP-1 ebenfalls die Expression des Luciferase-Gens aktiviert werden. Analog zum pNFAT-luc kann bei diesen Signalwegen nach Zugabe des Substrates Luciferin per Lichtmessung auf den Signaltransduktionsweg geschlossen werden.

Signaltransduktionswege und Luciferase-Reporter-Gen-Vektoren

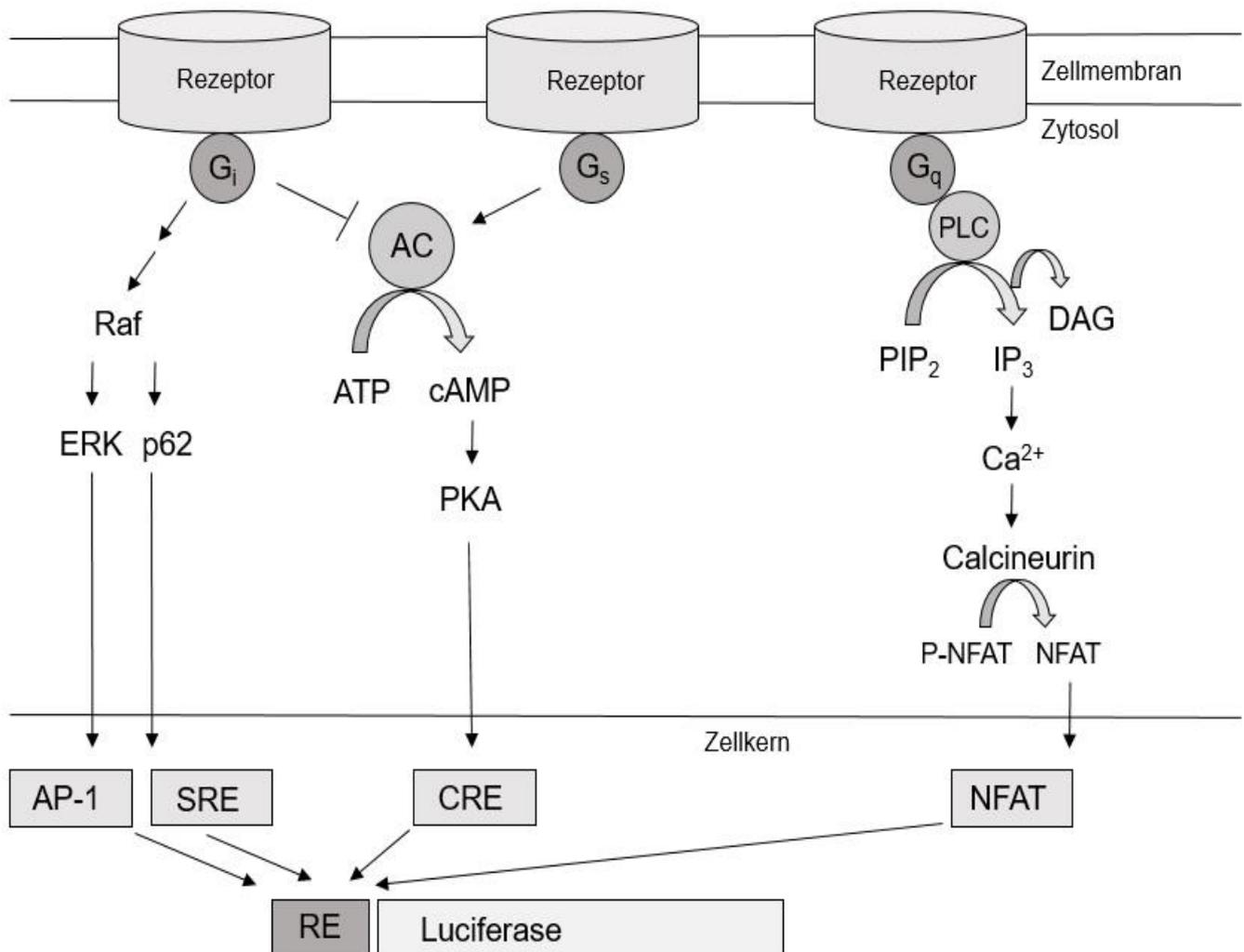


Abb. 5 – Die Grafik zeigt verschiedene Signaltransduktionswege, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Rezeptor) angeschaltet werden können und wie diese über die Vektoren CRE (cAMP response element)-luc, NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-luc, SRE (serum response element)-luc und AP-1 (activator protein)-luc die Reportergene (RE) und somit das gekoppelte Luciferase-Gen (Luciferase) im Zellkern aktivieren. Das Schema wurde mit PowerPoint erstellt, modifiziert nach: „Schematic diagram of GPCR signaling pathways.“ by Promega Corporation, Hedin et al. 1999, Shaw et al. 1989, Cheng et al 2010.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung und molekularpharmakologische Charakterisierung eines rekombinanten Fusionsproteins, bestehend aus Teilen des SSF1-Exons und Teilen des P2Y₁₁-Exons, der an das YFP-Protein gekoppelt und in einer humanen Astrozytom-Zelllinie exprimiert wird. Dabei sollten folgende Detailfragen geklärt werden:

1. Wird das neue Fusionskonstrukt SSF1_P2Y₁₁_YFP in humanen Zellen rekombinant exprimiert?
2. Funktioniert das Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁_YFP als Rezeptor?
3. An welche Signaltransduktion ist das Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁_YFP gekoppelt?
4. Welche Liganden wirken am Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁_YFP als Agonisten?
5. Gibt es Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften im Vergleich zu publizierten Daten von Versuchen mit dem P2Y₁₁-Rezeptor?

Die Klärung dieser Fragen soll zum besseren Verständnis der Funktion der Rezeptorvariante SSF1_P2Y₁₁ beitragen. Für die molekularpharmakologische Charakterisierung wurden die Fluoreszenz-Mikroskopie und verschiedene Reporter-Gen-Assays angewendet.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien und Substanzen	Referenz
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen
10X BlueJuice Gel Loading Buffer	Invitrogen
Adenosintriphosphat-Dinatriumsalzhydrat	Sigma
Agar	Invitrogen
Agarose Broad Range	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Serva
Blasticidin S HCl - Pulver	Gibco
BrightGlo™ Luciferase Assay System	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DMEM (1X), GlutaMAX™	Gibco
DNase-freies destilliertes Wasser	Gibco
EDTA	ROTH
Ethanol	Fischer
Ethidiumbromid	Invitrogen
FBS: fetales Kälberserum	Gibco
FCS: fetales Kälberserum	Gibco
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	Gibco
Hygromycin	Invitrogen
LB Broth	Gibco
Lipofectamin™ 2000 Reagent	Invitrogen
OneShot Top10 E.Coli	Invitrogen
OptiMEM® – Reduced Serum Medium	Gibco
S.O.C. – Nährmedium	Invitrogen
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	Gibco BRL

Primer	Sequenz	Referenz
FP_rev	5' – GGC CAT CAC ACT GCC TAG AAA - 3'	MWG- BiotechAG
hP2Y ₁₁ _fo2	5' – GAC ATG GAT CGA GGT GCC AAG TCC TGC CCT GCC AAC - 3'	Biomers.net
hP2Y ₁₁ _for	5' – CAC CAT GGA TCG AGG TGC CAA GTC - 3'	MWG- BiotechAG
hP2Y ₁₁ _rev	5' – TTG GCT CAG CTC ACG GGA CTG - 3'	MWG- BiotechAG

Agonisten	Referenz
ATP	Sigma
ATP _γ S	Sigma und Tocris
NF546	TOCRIS bioscience

Plasmide	Resistenz	Referenz
pNFAT-luc	Ampicillin	Stratagene, Amsterdam
pCRE-luc	Ampicillin	Stratagene, Amsterdam
pAP-1-luc	Ampicillin	Stratagene, Amsterdam
pSRE-luc	Ampicillin	Stratagene, Amsterdam

Vektoren	Referenz
pcDNA3-hP2Y ₁₁ Template	cDNA Resource Center, Bloomsberg University, Bloomsberg, PA USA
pcDNA5	pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO, Invitrogen
pcDNA6	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO, Invitrogen

Enzyme	Referenz
0,05 % Trypsin-EDTA (0,2 g/l EDTA)	Gibco
PCR SuperMix High Fidelity	Invitrogen
PCR-Enzym-Mix: Accu Prime Pfx Supermix	Invitrogen
Restriktionsenzym Dpn 1	Invitrogen

Kits	Referenz
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen

Bakterienstämme

E.Coli (One Shot TOP10 E.Coli), Invitrogen
--

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation der Rezeptorgensequenz mittels Polymerasekettenreaktion

Die Gensequenz der SSF1-Variante des humanen P2Y₁₁-Rezeptors wurde unter Nutzung von oligomeren Primern mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Template wurde ein kommerziell erhältlicher pcDNA3-Vektor mit der Sequenz des humanen Rezeptors [cDNA Resource Center, Bloomsberg, PA USA] verwendet. Für die PCR-Reaktion nutzte ich 2 µl [10 µM] Primer (fo_2 + rev), 1 µl Template (cDNA3) und 22 µl Enzym-Puffer-Mix (Accu Prime Pfx SuperMix) für den SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor bzw. 2 µl [10 µM] Primer (fo_2 + FP_rev), 1 µl Template (Miniprep-Template vom 17.11.: cDNA3) und 22 µl Enzym-Puffer-Mix (PCR SuperMix High Fidelity) für das Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁_YFP.

Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet:

- 5 Minuten 95 °C zum vollständigen Aufbrechen der DNA-Stränge
- 38 folgende Zyklen von 30 Sekunden 95 °C
- 30 Sekunden Primer-spezifische Annealing-Temperatur
- 80 Sekunden 70 °C Elongations-Temperatur
- 10 Minuten 70 °C zur vollständigen Elongation

Für die Amplifikation der DNA des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors wurde eine Annealing-Temperatur von 63,8 °C eingesetzt. Für die Amplifikation der DNA des Fusionsproteins SSF1_P2Y₁₁_YFP wurde die Annealing-Temperatur 62,8 °C gewählt.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese visualisiert. Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Nachweisverfahren für DNA-Fragmente, die diese nach Anlegen einer elektrischen Spannung der Größe der Moleküle nach auftrennt. Das PCR-Produkt, versetzt mit einem TRIS-Acetat-EDTA-Ladepuffer [10X Blue Juice Gel Loading Buffer], wurde in die Taschen eines zuvor gegossenen 0,9 %-igen Agarosegels gegeben. Als fluoreszierender DNA-Interkalationsfarbstoff wurde Ethidiumbromid (0,05 µg/ml) verwendet. Die Größe der DNA-Stränge konnte nach Anlegen einer Spannung von 75 Volt über 60 - 90 Minuten mit Hilfe einer 100 bp Kontroll-Leiter, die als Vergleich im Gel mitlief, ermittelt werden. Dokumentiert wurden die DNA-Banden im UV-Transilluminator mit Hilfe einer CCD-Kamera und der Quantity One[®] 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories).

2.2.2 Ligation und Transformation

Nach erfolgreicher PCR habe ich das Genprodukt in einen Expressionsvektor ligiert. Als Vektor für Astrozytomzellen nutzte ich den pcDNA-6-Vektor. Zusätzlich sollte das Rezeptorgen an die YFP-Gen-Sequenz gekoppelt werden. Der von mir für Astrozytomzellen verwendete pcDNA6-Vektor enthält eine YFP-Gen-Sequenz, so dass nach Ligation der DNA des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors eine für das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Protein kodierende Sequenz in diesem Vektor entstand. Die Linker-Sequenz des pcDNA-6-Vektors zwischen C-terminalen Ende des Rezeptorproteins und Beginn der

YFP-Sequenz lautet wie folgt: Lys-Gly-Glu-Phe-Asp-Pro-Ala-Phe-Leu-Tyr-Lys-Val-Val-Asp-Ala-Val-Asn.

Zum Verdau des Templates gab ich 0,5 µl Dpn1-Lösung zum PCR-Produkt-Eppendorfgefäß hinzu. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei 37 °C und anschließend für 20 Minuten bei 80 °C in der PCR-Maschine erwärmt. Für die Ligation pipettierte ich bei Raumtemperatur 3 µl dieser Lösung in ein neues PCR-Eppendorfgefäß und gab 0,75 µl Salzlösung sowie 0,75 µl TOPO-Vektor (pcDNA6) hinzu. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur. 2 µl dieser Lösung gab ich zu auf Eis aufgetauten Bakterien (One Shot TOP10 E. coli). Hier verwendete ich kompetente E. colis, die freie DNA im umgebenden Medium aufnehmen konnten. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, folgte zur Porenbildung und Induktion der Plasmidaufnahme ein Hitzeschock im Wasserbad für 30 Sekunden bei 42 °C und erneute Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Als Nährmedium gab ich 250 µl raumtemperiertes S.O.C. Medium hinzu und verschloss das Röhrchen. Es wurde nun für eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm in den Wärmeschüttler gestellt. Diese Bakterien-Suspension wurde auf vorgewärmte selektive, das heißt 100 µg/ml Ampicillin beinhaltende, LB-Platten aufgetragen und über Nacht (12-18 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Bis zur Auswahl der Bakterienklone wurden die Platten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.2.3 DNA-Minipräparation

Zur Klon-Selektion entnahm ich einzelne Kolonien aus den zuvor kultivierten Agarplatten und überführte sie in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin. Diese Röhrchen wurden nicht luftdicht verschlossen, um die Sauerstoffzufuhr zu gewähren und über Nacht (12-14 Stunden) in einem Wärmeschüttler bei 37 °C kultiviert. Die Isolierung der DNA aus E. colis erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (250) nach Angaben des Herstellers. Jeweils 1,8 ml der über Nacht kultivierten Suspension wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen für 3 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Resuspension wurden 250 µl P1-Puffer mit TRIS-Cl-Lösung (50 mM, pH 8) und EDTA (10 mM), zur Lyse 250 µl P2-Puffer mit NaOH-Lösung (200 mM) und SDS (1 %) für exakt 5 Minuten sowie zur Neutralisation 350 µl N3-Puffer hinzugegeben. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 14.100 rpm wurde im nächsten Schritt die freigesetzte

Plasmid-DNA im Überstand an die Oberfläche einer 250 QIAprep 2.0 Spin Säule gebunden. Zwischen zweimaliger Zentrifugation über 60 Sekunden und Verwerfen des Überstandes gab ich 500 µl PB-Puffer zur Entfernung von Verunreinigungen hinzu. Das Salz wurde anschließend durch 750 µl PE-Puffer entfernt. Nach zweimaliger Zentrifugation über 60 Sekunden und Verwerfen des Überstandes gab ich 50 µl Elutionspuffer mit TRIS-CI-Lösung (10 mM, pH 8,5) hinzu und nach 1 Minute Inkubationszeit wurde für 60 Sekunden erneut zentrifugiert. Die isolierten Plasmide wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Bei erfolgreicher Isolation wurden die Ansätze zur Sequenzierungs-Firma GATC in Köln geschickt, um einen richtig orientierten mutationsfreien Genabschnitt zu garantieren.

2.2.4 Zellkultur

Alle humanen Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Greiner, Solingen) in einem Brutschrank bei 37 °C und einen CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Als Kulturmedium für 1321N1-Astrozytomzellen [ECACC Cell Lines, Salisbury UK] verwendete ich Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (1X) + GlutaMAX. Dieses enthielt 4,5 g/l Glucose und Pyruvat und wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) als Supplement gemischt, das Serumproteine, Wachstumsfaktoren und Hormone beinhaltet. Das Arbeiten mit den Zellkulturen wurde an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Um die Zellkulturen zu teilen und in neue Flaschen zu überführen, spülte ich die Zellen mit DMEM und löste anschließend mit Trypsin als Protease und EDTA als Ca²⁺-Komplexbildner ihr adhärentes Wachstum sowie ihre Zellkontakte. Ein Beenden der Enzymaktivität wurde nach ca. 3 – 5 Minuten durch die Zugabe von DMEM Medium + FBS erreicht. Daraufhin pipettierte ich je nach gewünschter neuer Konfluenz verschiedene Mengen der entstandenen Zell-Suspension in neue Zellkulturflaschen und füllte mit DMEM Medium + FBS 10 % als Nährmedium auf 10 ml auf. Phenolrot diente als pH-Indikator. Spätestens alle drei Tage führte ich mikroskopische Kontrollen der Zelldichte durch. Bei Kulturen mit einer initialen Zelldichte von 10 % war meist eine Zellkulturteilung nach vier bis fünf Tagen notwendig.

2.2.5 Expression des Rezeptor-Konstrukts

Mit dem Ziel, dass Zellen meinen zuvor hergestellten Genabschnitt aufnehmen und den gewünschten Rezeptor exprimieren, wurde eine Transfektion durchgeführt. Nach einem Zellkultur-Mediumwechsel konnte das Plasmid mit der gewünschten DNA in die Zellen transfiziert werden. Dazu nutzte ich das Prinzip der Lipofektion. Eine Lösung mit 10 µg Plasmid-DNA und 500 µl minimal essential medium (OptiMEM) sowie 25 µl Lipofectamin und 500 µl OptiMEM wurden jeweils gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden beide Mischungen zusammengegeben und erneut für 20 Minuten inkubiert. Danach gab ich diese gleichmäßig auf ca. 70 %-ige konfluente Zellkulturen aus Astrozytomzellen mit dem Nährmedium DMEM + FBS 10 % ohne Antibiotikum. Es folgte eine Inkubation für zwei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach zwei Tagen wurde die Zellkultur geteilt und als Selektionsantibiotikum Blasticidin [5 µg/ml] hinzugegeben.

2.2.6 Expressionsanalyse mittels Fluoreszenzmikroskop

Zur Expressionsanalyse nahm ich per Laserscanning-Mikroskop Fluoreszenzbilder von Zellkulturen auf. Ich verglich die Fluoreszenzbilder von nicht-transfizierten Astrozytomzellen mit Astrozytomzellen, die nach Transfektion mit dem pcDNA6-Vektor die YFP-Gensequenz enthielten sowie mit Astrozytomzellen, die mit dem rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor transfiziert wurden. Ich gab je ein autoklaviertes Glasplättchen (25 mm Ø) in eine 6-Well-Platte, pipettierte je 50 µl der Zellsuspension mittig auf diese Glasplättchen und stellte sie bei 37 °C und CO₂ 5 % kurze Zeit in den Brutschrank. Nach Anhaften der Suspension gab ich jeweils 2 ml DMEM + FBS 10 % für die nicht-transfizierten Astrozytomzellen bzw. DMEM + FBS 10 % + Blasticidin [5 µg/ml] für die transfizierten Astrozytomzellen hinzu. Die Zellen auf der 6-Well-Platte wurden anschließend für eine bestimmte Zeit im Brutschrank bei 37 °C und CO₂ 5 % kultiviert. Nach 24 – 48 Stunden und nach 96 Stunden nahm ich Bilder mit Hilfe des Laserscanning-Mikroskops auf. Dafür nahm ich ein Plättchen aus der Platte, platzierte es in einen speziellen Plastikring und drehte den Verschluss fest zu. Das Plättchen spülte ich anschließend vorsichtig mit 1 ml hanks balanced salt solution (HBSS) -Puffer,

entfernte diesen wieder und gab erneut 1 ml Puffer dazu. Ich prüfte, ob der Ring dicht verschlossen ist. Die Unterseite des Plättchens wurde mit 100 %-igen Ethanol gereinigt und mit einem Öltropfen auf dem 63x Objektiv des Laserscanning-Mikroskops platziert.

Die Bilderaufnahme erfolgte bei Belichtung mit einem Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Ich verwendete folgende Einstellungen: Laser-Diode 488 nm, Channel Mode, Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Scan Mode Frame, Channel EYFP, Pixel Dwell 7.39 μ s, Scan Zeit 1 min 16 sec, 16 Bit Auflösung. Die Bilder wurden per Zen 2012 Software ausgewertet. Für jedes Foto wurden Zellen und der Hintergrund manuell markiert.

2.2.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um einzelne Zellkulturen zu sichern, wurden diese in speziellen Gefäßen (Kryogefäßen) bei -196 °C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden die Zellkulturen mit Hilfe der Trypsin-EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche gelöst, die Lösung anschließend entfernt und die Zellen in 1,8 ml Kulturmedium aufgenommen. Jeweils 50 % dieser Lösung wurden in ein Kryogefäß mit gleichem Volumen (0,9 ml) Gefriersuspension überführt. Diese wurde zuvor aus dem Kulturmedium DMEM + 10 % FBS mit 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. DMSO in der Endkonzentration 10 % verhinderte eine Eiskristallbildung, die die Zellen zerstören könnte. Die Kryogefäße wurden zunächst im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert und anschließend in die Gasphase eines Tanks mit flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die in Kryogefäßen gelagerten Zellen vorsichtig bei Raumtemperatur erwärmt und anschließend in Kulturflaschen mit vorgewärmten Kulturmedien (DMEM + 10 % FBS) ohne Antibiotikum im Brutschrank kultiviert. Es folgten regelmäßige Medienwechsel nach Bedarf, wobei nach meist zwei bis drei Tagen das Selektionsantibiotikum zugesetzt wurde. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums konnten die Zellkulturen wie gewohnt geteilt und in neue Kulturflaschen überführt werden.

2.2.8 Reporter-gen-Assay

Für funktionelle Versuche am SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor führte ich Luciferase-Reporter-gen-Assays durch. Ich verwendete die Reporter-genvektoren pNFAT-luc, pCRE-luc, pAP-1-luc und pSRE-luc. Nach Inkubation mit einem Rezeptor-Agonisten und anschließender Zugabe des Luciferase-Substrates Luciferin sowie weiteren Reaktionsbestandteilen, ließ sich daraufhin per Mikroplatten-Reader „FLUOstar Omega“ die Photonenfreisetzung und so indirekt die Aktivität der Agonisten am SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor messen. Als Agonisten verwendete ich ATP, ATP γ S und NF546.

Für diese Versuche wurden die Reporter-gene pNFAT-luc, pCRE-luc, pAP-1-luc und pSRE-luc transient in die Zellen eingebracht. Ich stellte an Tag 1 Zellkulturen mit 70 %-iger Konfluenz in DMEM + FBS 10 % ohne Antibiotikum her. Nach Transfektion mit 10 μ g des jeweiligen Reporter-gen-Plasmids an Tag 2 inkubierten die Zellen für 18 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. An Tag 3 löste ich die Zellkulturen mit Trypsin ab und verteilte sie, gelöst in 12 ml Nährmedium, in eine 24-Well-Platte so dass ein Well je 500 μ l Zellsuspension enthielt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank folgte an Tag 4 das Reporter-gen-Assay. Die Flüssigkeit in der 24-Well-Platte wurde entfernt, die Vertiefungen mit raumtemperiertem HBSS gespült und anschließend mit 900 μ l HBSS aufgefüllt. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden 100 μ l Agonisten-Lösung bzw. 100 μ l HBSS für die Negativkontrolle dazugegeben. Bei der Agonisten-Lösung erreichte man durch Verdünnungsreihen verschiedene Konzentrationen. Es folgte eine für Rezeptor und Zellreihe optimale Inkubationszeit, die zuvor in mehreren Versuchen mit dem Plasmid pNFAT-luc und dem Agonisten ATP optimiert wurde. Nach Ende der Inkubationsphase wurde das Medium verworfen und in jede Vertiefung 50 μ l HBSS und 50 μ l Puffermix hinzugegeben. Der Puffermix enthielt Luciferin als Luciferase-Substrat, ATP als Luciferase-Kofaktor und ein Lysemittel, das die Luciferase aus den Zellen freisetzte. Nach zwei Minuten Wartezeit wurde die Suspension per Pipette vermischt. Dann wurden je 80 μ l in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte umpipettiert. Die Lumineszenz wurde mit einem Plattenluminometer der Firma Fluostar in drei Durchläufen gemessen. Der Mittelwert der Messzyklen zwei und drei wurden für die weitere Analyse verwendet.

Ich benutzte folgendes Messschema des Mikroplatten-Readers unter der Einstellung: Lumineszenz ATP, Methode: Lumineszenz, Plattenmodus, Mikroplatte Greiner 96 F-Bottom, Top Optic, Positionierungsverzögerung 0,5 s. Die Startmesszeit betrug 0 s, die Intervallzeitmessung 9 s und eine Zykluszeit 246 s. Dargestellt wurden die Daten per „MARS Data Analysis Software“. Für die Auswertung wurde aus den vier Mittelwerten der Messwerte (RLU; relative light units) einer Versuchsplatte erneut der Mittelwert gebildet und dieser in ein prozentuales Verhältnis zum Mittelwert der HBSS-Kontrolle derselben Platte gesetzt.

2.2.9 Statistik

Die experimentell ermittelten Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) von n Experimenten dargestellt. Zur Auswertung der Daten wurde die Software Prism (Graphpad, La Jolla CA, USA) verwendet. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Bonferroni Post-Test auf Signifikanz geprüft. Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden per t-Test analysiert. Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Expression des rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptors

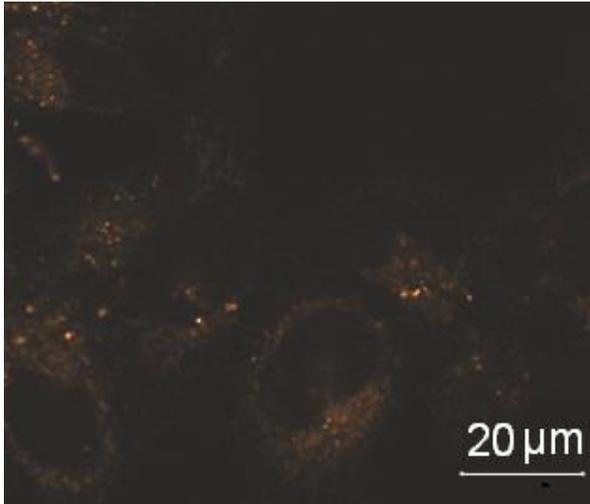


Abb. 6 - Fluoreszenzbild von nicht-transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen per Laserscanning Mikroskop (n = 24 Zellen wurden untersucht).

Größenmaßstab: 20 µm

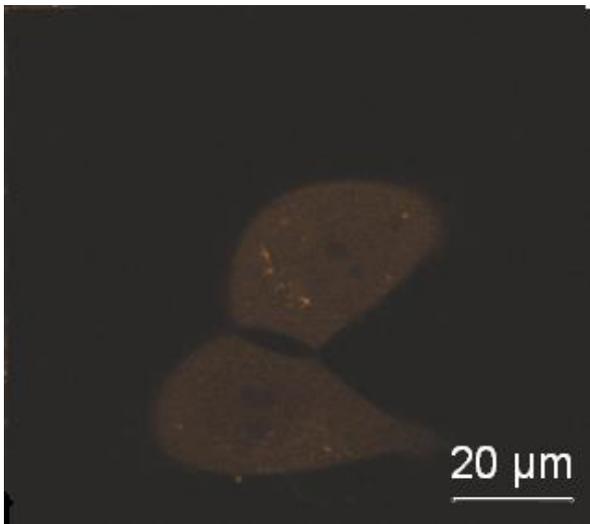


Abb. 7 - Fluoreszenzbild von transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen_YFP per Laserscanning Mikroskop (n = 15 Zellen wurden untersucht). Die Astrozytomzellen wurden mit dem pcDNA6-Vektor mit der YFP-Gensequenz stabil transfiziert. YFP (yellow fluorescent protein).

Größenmaßstab: 20 µm

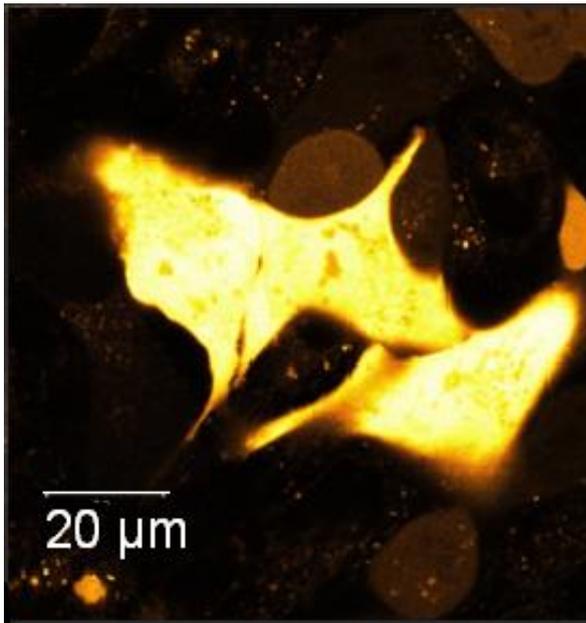


Abb. 8 - Fluoreszenzbild von transfizierten 1321N1_Astrozytomzellen_SSF1_P2Y₁₁_YFP (n = 54 Zellen wurden untersucht). Die Astrozytomzellen wurden mit der Geninformation für das Fusionsprotein, bestehend aus humanem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor und YFP am C-Terminus transfiziert. SSF1 (Kernprotein *Saccharomyces Cerevisiae*), YFP (yellow fluorescent protein).

Größenmaßstab 20: μm

In den Abbildungen 6 - 8 sind Ausschnitte aus Fluoreszenzbildern von Astrozytomzellen dargestellt. In Abbildung 6 sind nicht-transfizierte Astrozytomzellen, in Abbildung 7 mit dem Fluoreszenzprotein YFP transfizierte Astrozytomzellen und in Abbildung 8 mit der Gensequenz für das Fusionsprotein, bestehend aus dem Rezeptor SSF1_P2Y₁₁ und YFP am C-Terminus, transfizierte Astrozytomzellen per Laserscanning-Mikroskop abgebildet, die nach Inkubationszeit der jeweiligen Zellsuspension unterschiedliche visuelle Fluoreszenzstärken zeigen. In den Abbildungen 6 und 7 sieht man nur eine geringe Fluoreszenz. Nicht-transfizierte Astrozytomzellen und Astrozytomzellen, die nur mit der YFP-Sequenz transfiziert wurden, fluoreszieren demnach kaum. Die Astrozytomzellen in Abbildung 8, die mit der Gensequenz für den humanen SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor transfiziert sind und dieser wiederum an das YFP gekoppelt ist, zeigen eine deutliche visuelle Fluoreszenz. Das emittierte Licht wurde per Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen und die Inkubationszeit betrug zwischen 24 - 96 Stunden.

Rezeptor-Expressionsnachweis mittels RLU-Messung

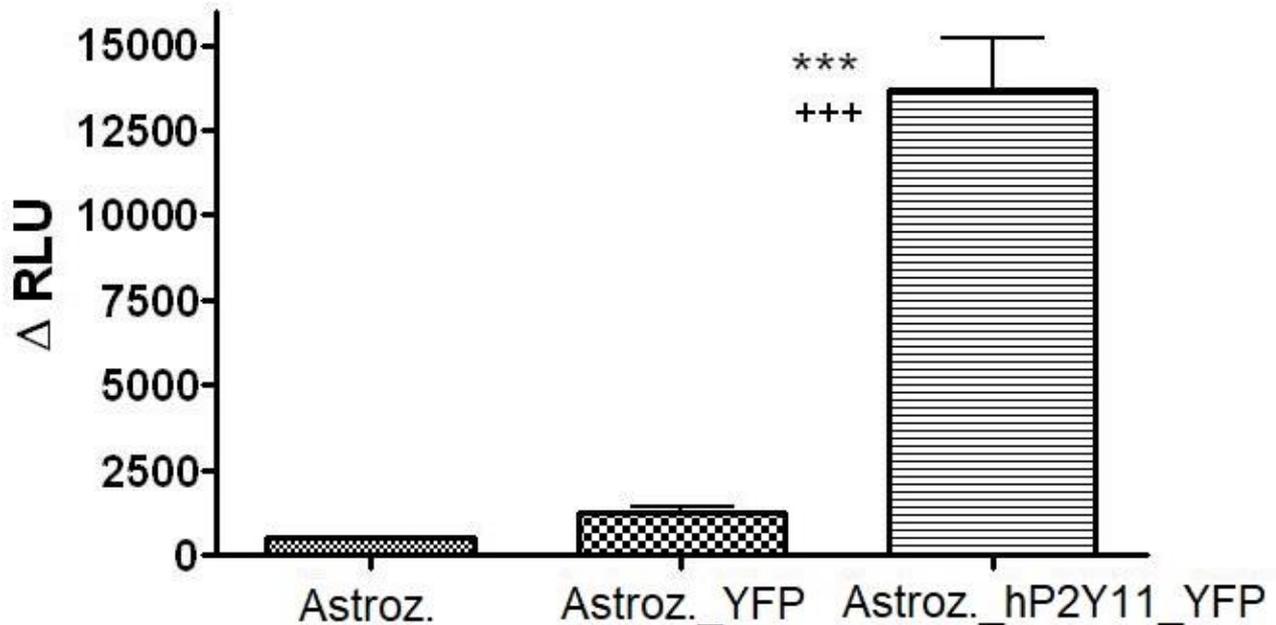


Abb. 9 – Das Diagramm zeigt Unterschiede in RLU-Werten in einem ausgewerteten Areal gegen den Hintergrund (= Δ RLU) in nicht-transfizierten Astrozytomzellen (Astroz.), in mit dem pcDNA6-Vektor mit YFP-transfizierten Astrozytomzellen (Astroz._YFP) und in mit dem rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor transfizierten Astrozytomzellen (Astroz._hP2Y₁₁_YFP) im Vergleich (n = 57 Astrozytomzellen, n = 48 Astrozytomzellen_YFP und n = 59 Astrozytomzellen_SSF1_P2Y₁₁_YFP). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. *** p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber der nicht-transfizierten Astrozytomzellen. +++ p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber den mit der YFP-kodierenden DNA transfizierten Astrozytomzellen. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. RLU (relative lights units), YFP (yellow fluorescent protein), SEM (Standardfehler des Mittelwertes).

Ergänzend zum visuellen Expressionsnachweis in Abbildung 6 – 8 sind in Abbildung 9 die gemessenen Δ RLU-Werte für die jeweiligen Zellen quantitativ dargestellt und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die Expressionsanalyse ergibt signifikant höhere Δ RLU-Werte für die Astrozytomzellen mit dem Fusionskonstrukt P2Y₁₁_YFP gegenüber nicht-transfizierten und gegenüber mit alleiniger YFP-kodierender DNA transfizierten Astrozytomzellen. Der Unterschied zwischen Astrozytomzellen mit der YFP-kodierenden DNA und nicht-transfizierten Astrozytomzellen ist nicht signifikant.

Expressionsnachweis nach dem Auftauen

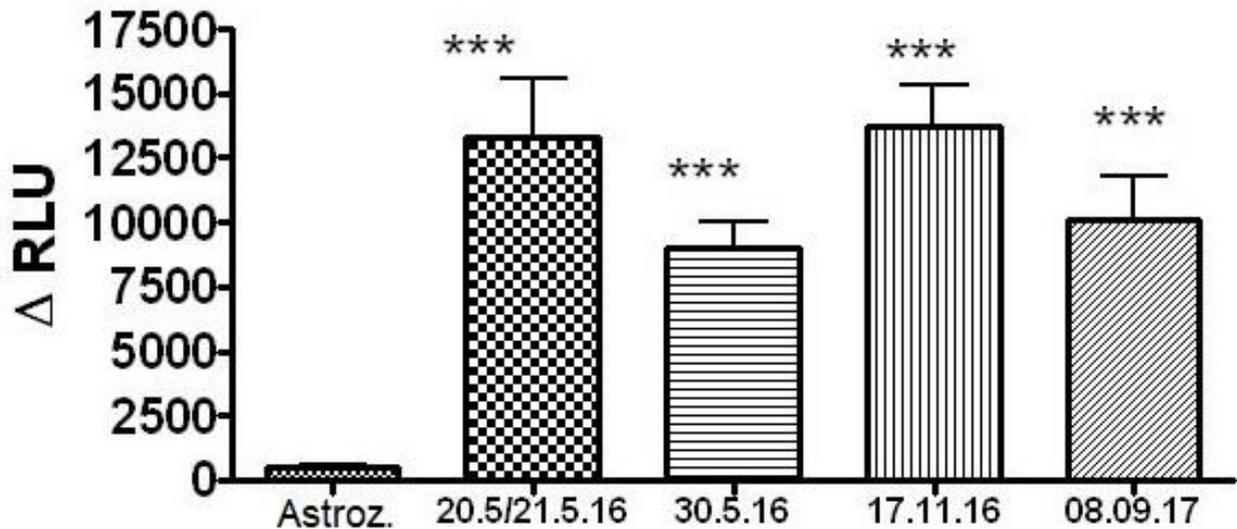


Abb. 10 - Das Diagramm zeigt Δ RLU-Werte bei mit der Geninformation für den SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor transfizierten Astrozytomzellen, die nach Wegfrieren mit 10 % DMSO neu aufgetaut wurden (je n = 20). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Sie werden im Vergleich zu den Δ RLU-Werten nicht-transfizierter Astrozytomzellen (Astroz.) (n=57) gesetzt. *** p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber den nicht-transfizierten Astrozytomzellen. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Abbildung 9, DMSO (Dimethylsulfoxid).

In Abbildung 10 werden die Δ RLU-Werte aller neu aufgetauten Zellchargen am jeweiligen Datum im Verhältnis zu nicht-transfizierten Astrozytomzellen dargestellt. Es zeigt sich bei jeder neu aufgetauten Charge ein signifikanter Unterschied der Δ RLU-Werte im Vergleich zu den nicht-transfizierten Astrozytomzellen, so dass eine erfolgreiche Rezeptorexpression der aufgetauten Zellcharge gewährleistet werden konnte. Zwischen den Werten aus den unterschiedlichen Auftautagen bestand kein signifikanter Unterschied.

3.2 Optimierung der Inkubationszeit

Mittels Luciferase-Assay wurden Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten mit dem Agonisten ATP und dem Plasmid pNFAT-luc in mit dem rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor transfizierten Astrozytomzellen durchgeführt. Die Inkubationszeit mit einem hohen und robusten Anstieg der RLU-Werten wurde ermittelt. Diese ergab sich für 9 Stunden (Tabellen 1, 2, 3).

RLU-Mittelwerte unter den Inkubationszeiten 7,5 und 9 Stunden

Tab. 1 – Luciferase-Assay mit dem Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor, dem Reportergen pNFAT-luc und dem Agonisten ATP mit den Konzentrationen 10 µM und 100 µM und der HBSS-Kontrolle (-). Die RLU-Werte sind als Mittelwerte ± SEM von n = 4 dargestellt. Die rechte Spalte zeigt den jeweils minimalen bzw. maximalen prozentualen Anstieg der RLU-Werte der jeweiligen Konzentrationen in Bezug auf die HBSS-Kontrolle. + p < 0,05; +++ p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (HBSS). Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. RLU (relative lights units), HBSS (hanks balances salt solution), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), NFAT (nuclear factor of activated T-cells), YFP (yellow fluorescent protein), SSF1 (Kernprotein *Saccharomyces Cerevisiae*),.

ATP-Konzentration	Inkubation	RLU-Mittelwert ± SEM	Minimaler und maximaler Prozentualer Anstieg zur Kontrolle	
-	7,5 h	117 ± 26		
10 µM	7,5 h	312 ± 60	176 % - 409 %	+
100 µM	7,5 h	220 ± 35	129 % - 280 %	
-	9 h	45 ± 2		
10 µM	9 h	337 ± 37	638 % - 870 %	+++
100 µM	9 h	257 ± 56	428 % - 728 %	+++

Tabelle 1 zeigt, dass die RLU-Werte unter Zugabe von 10 µM sowie 100 µM ATP im Vergleich zur Kontrolle nach 9 Stunden Inkubationszeit zwar nicht signifikant höher als nach 7,5 Stunden sind, der prozentuale Anstieg nach 9 Stunden Inkubation aber deutlich höher ist.

RLU-Mittelwerte unter den Inkubationszeiten 9 und 10 Stunden

Tab. 2 – Luciferase-Assay mit dem Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor, dem Reporter gen pNFAT-luc und dem Agonisten ATP mit den Konzentrationen 10 µM und 100 µM und der HBSS-Kontrolle (-). Die RLU-Werte sind als Mittelwerte ± SEM bei n = 7 dargestellt. Die rechte Spalte zeigt den jeweils minimalen bzw. maximalen prozentualen Anstieg der RLU-Werte der jeweiligen Konzentrationen in Bezug auf die HBSS-Kontrolle. + p < 0,05; ++ p < 0,01; +++ p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (HBSS). Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1.

ATP-Konzentration	Inkubation	RLU-Mittelwert ± SEM	Minimaler und maximaler Prozentualer Anstieg zur Kontrolle	
-	9 h	493 ± 28		
5 µM	9 h	716 ± 45	129 % - 164 %	++
10 µM	9 h	751 ± 53	134 % - 173 %	++
50 µM	9 h	765 ± 46	138 % - 174 %	+++
100 µM	9 h	659 ± 50	119 % - 152 %	
-	10 h	498 ± 41		
5 µM	10 h	756 ± 58	129 % - 178 %	++
10 µM	10 h	804 ± 45	141 % - 186 %	+++
50 µM	10 h	777 ± 54	134 % - 182 %	++
100 µM	10 h	710 ± 52	122 % - 167 %	+

Die Tabellen 2 und 3 zeigen, dass der prozentuale Anstieg der RLU-Werte im Vergleich zur Kontrolle nach 10 Stunden bzw. 11 Stunden Inkubationszeit nicht signifikant höher ist als nach 9 Stunden.

RLU-Mittelwerte unter den Inkubationszeiten 9 und 11 Stunden

Tab. 3 – Luciferase-Assay mit dem Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor, dem Reporter gen pNFAT-luc und dem Agonisten ATP mit den Konzentrationen 10 µM und 100 µM und der HBSS-Kontrolle (-). Die RLU-Werte sind als Mittelwerte ± SEM bei n = 4 dargestellt. Die rechte Spalte zeigt den jeweils minimalen bzw. maximalen prozentualen Anstieg der RLU-Werte der jeweiligen Konzentrationen in Bezug auf die HBSS-Kontrolle. + p < 0,05; +++ p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (HBSS). Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1.

ATP-Konzentration	Inkubation	RLU-Mittelwert ± SEM	Minimaler und maximaler Prozentualer Anstieg zur Kontrolle	
-	9 h	443 ± 24		
10 µM	9 h	719 ± 18	150 % – 176 %	+++
100 µM	9 h	576 ± 52	112 % – 150 %	+
-	11 h	358 ± 30		
10 µM	11 h	574 ± 68	130 % – 196 %	+
100 µM	11 h	549 ± 46	130 % – 181 %	+

3.3 Pharmakologische Charakterisierung des rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptors mit Luciferase-Reporter-Gen-Assays

3.3.1 Vergleich nicht-transfizierter und transfizierter Astrozytomzellen

Es wurden Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit Astrozytomzellen durchgeführt, die mit dem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-Fusionsprotein transfiziert waren, wobei dieses wiederum intrazellulär an das Fluoreszenz-Protein YFP gekoppelt war. Vergleichend wurden Versuche mit nicht-transfizierten Astrozytomzellen durchgeführt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der RLU-Werte in den Basalwerten und im Anstieg nach ATP-Zugabe bei Astrozytomzellen, die das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein exprimierten, im Vergleich zu nicht-transfizierten Astrozytomzellen (Abbildung 11,12).

pNFAT-luc-Versuche

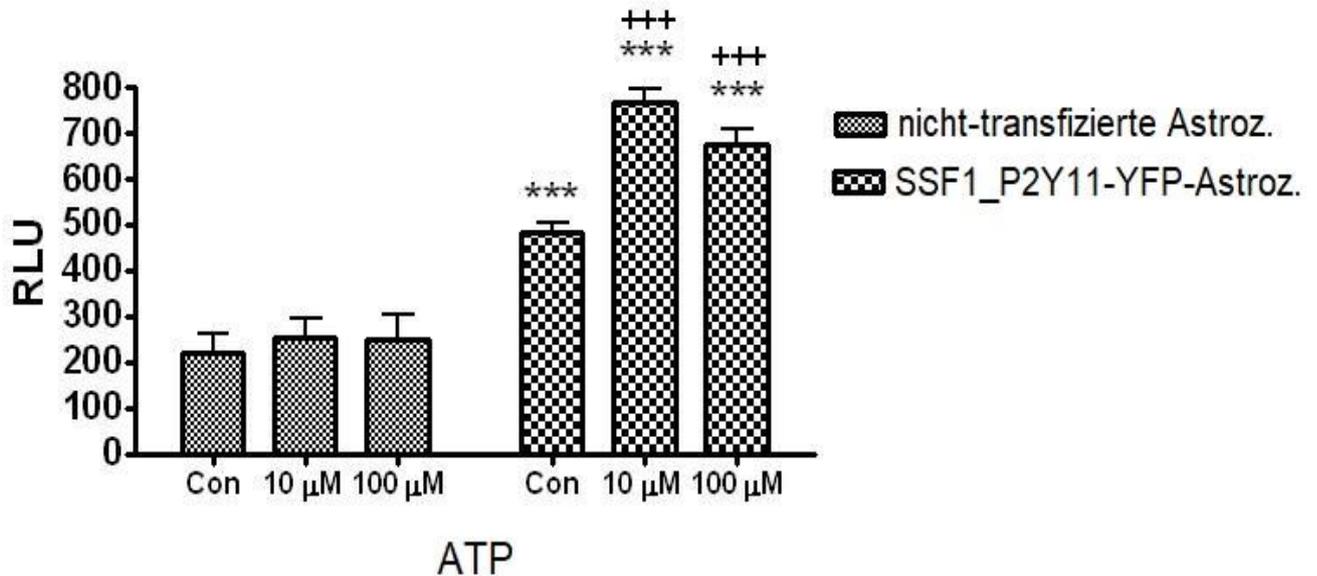


Abb. 11 – Das Diagramm zeigt die RLU-Werte als Mittelwerte \pm SEM bei $n = 10$ für nicht-transfizierte Astrozytomzellen und $n = 15$ für mit der Geninformation für das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein transfizierte Astrozytomzellen bei 9 Stunden Inkubationszeit, mit dem Plasmid pNFAT-luc und für den Agonisten ATP bei verschiedenen Konzentrationen. *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der nicht-transfizierten Astrozytomzellen. +++ $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Con). Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays unter Verwendung des Plasmids pNFAT-luc dargestellt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Agonisten ATP sowie der Kontrolllösung wurden die RLU gemessen und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Es zeigen sich signifikant höhere RLU-Werte für die transfizierten Zellen nach ATP-Zugabe in jeder ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen.

pCRE-luc-Versuche

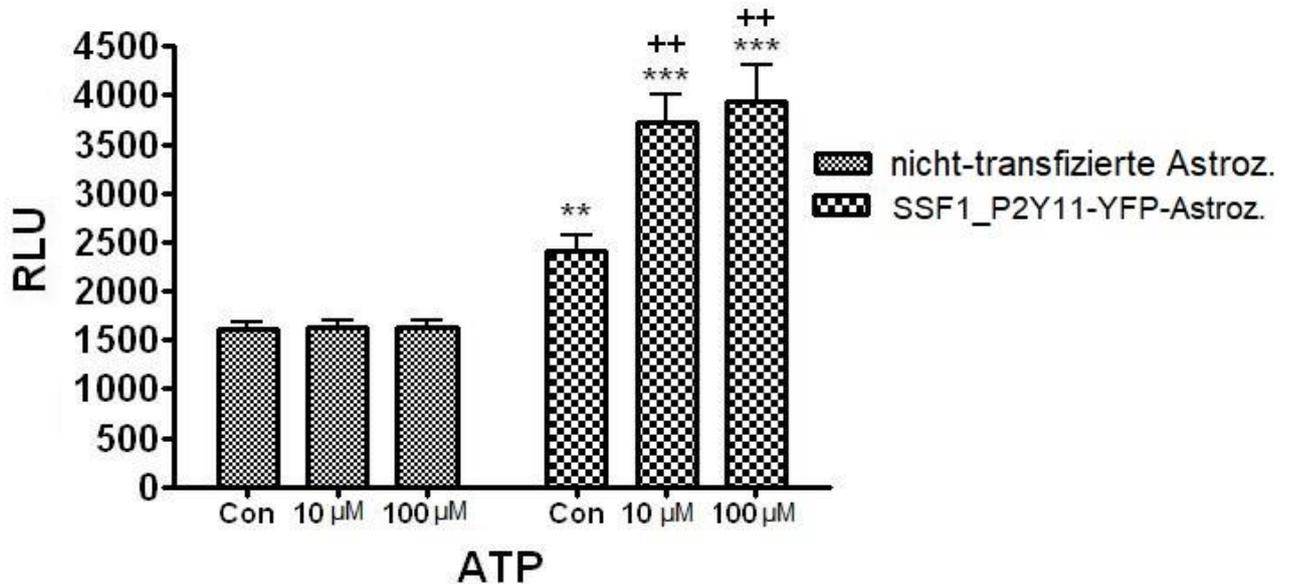


Abb. 12 – Das Diagramm zeigt die RLU-Werte als Mittelwerte \pm SEM für nicht-transfizierte Astrozytomzellen und für mit der Geninformation für das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein transfizierte Astrozytomzellen bei 9 Stunden Inkubationszeit mit dem Plasmid pCRE-luc und für den Agonisten ATP bei verschiedenen Konzentrationen, mit je $n = 16$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der nicht-transfizierten Astrozytomzellen. ++ $p < 0,01$ signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Con). Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1, CRE (cAMP response element).

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays unter Verwendung des Plasmids pCRE-luc dargestellt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Agonisten ATP sowie der Kontrolllösung wurden die RLU gemessen und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Auch hier zeigen sich signifikant höhere RLU-Werte in den Basalwerten und im Anstieg nach ATP-Zugabe für die transfizierten Zellen in jeder ATP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen.

3.3.2 Aktivierung verschiedener Signaltransduktionsmechanismen

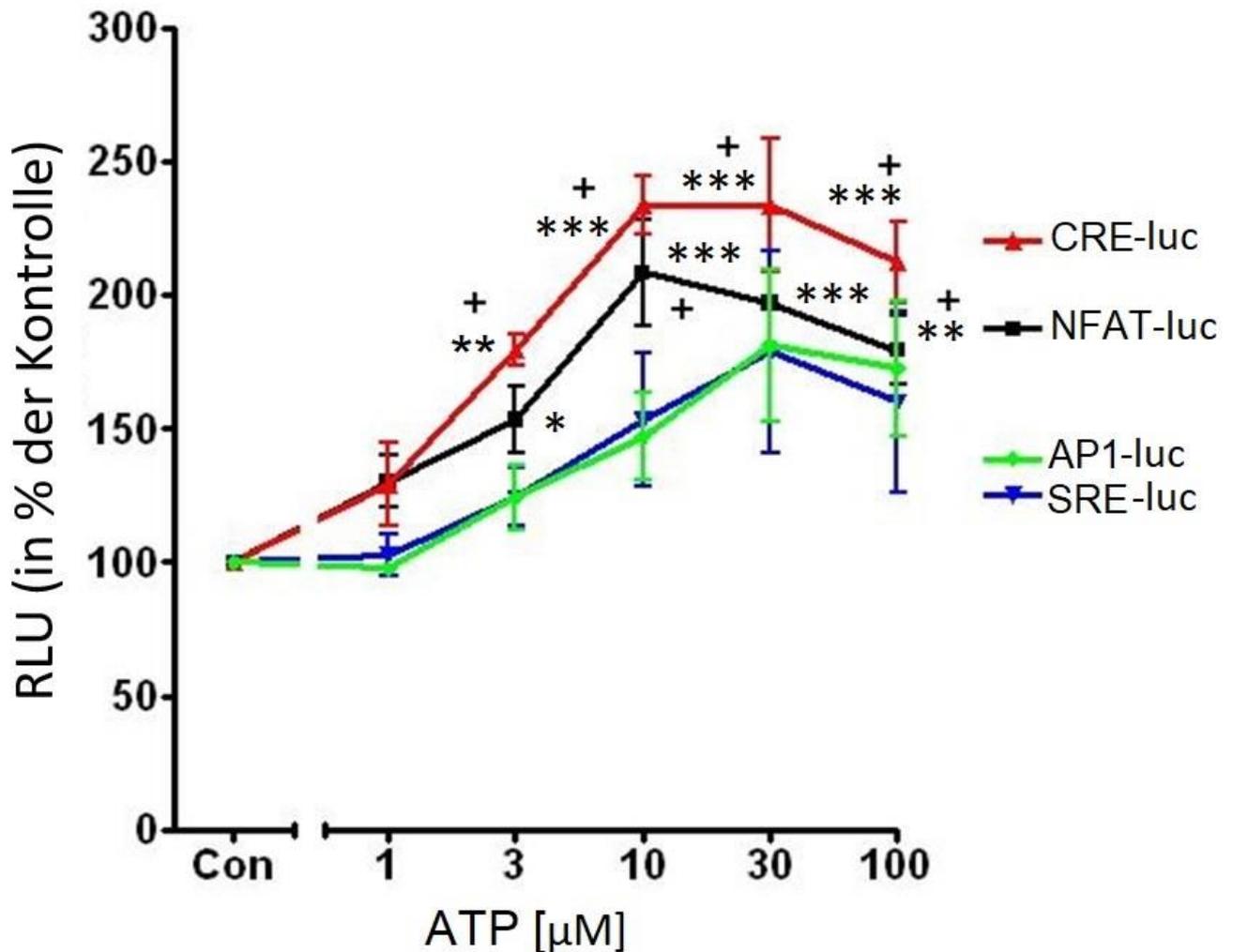


Abb. 13 – Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Messwerte in Abhängigkeit zur zugegebenen ATP-Konzentration bei vier verschiedenen Plasmiden im Luciferase-Assay mit dem rekombinanten Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor. Es zeigen sich signifikant höhere RLU-Messwerte mit den Plasmiden pCRE-luc und pNFAT-luc als mit dem Plasmid pAP-1-luc. Die Mittelwerte \pm SEM sind als % der jeweiligen Kontrolle (Con) angegeben, mit je $n = 4$ für pCRE, pSRE, pAP-1 und $n = 10$ für pNFAT. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle. + $p < 0,05$ signifikanter Unterschied gegenüber Versuchen mit dem Plasmid pAP-1-luc bei gleicher Konzentration. Gegenüber pSRE-luc ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1, CRE (cAMP response element), SRE (serum response element), AP-1 (activator protein).

Um die Kopplung an Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurden Versuche an Astrozytomzellen, die mit dem SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein transfiziert waren, mit verschiedenen Reportergenplasmiden als Vektoren durchgeführt (Abbildung 13). Die Zugabe des Agonisten ATP verursacht in Versuchen mit den Plasmiden pNFAT-luc und pCRE-luc signifikant höhere RLU-Werte im Vergleich zur Zugabe von HBSS (Kontrolle, Con). Für Konzentrationen von 3 – 100 µM ATP in Versuchen mit pCRE-luc und für Konzentrationen von 10 µM und 100 µM ATP in Versuchen mit pNFAT-luc sind die gemessenen RLU-Werte signifikant höher als in Versuchen mit dem Plasmid pAP-1-luc. Das RLU-Maximum wird in Versuchen mit dem pNFAT-luc für ATP-Konzentrationen von 10 µM und in Versuchen mit dem pCRE-luc für ATP-Konzentrationen von 10 µM sowie 30 µM erreicht. Im pCRE-luc-Assay werden insgesamt höhere Maximalwerte erreicht, jedoch ohne signifikanten Unterschied zum pNFAT-Assay, und die halbmaximale Konzentration EC₅₀ für ATP liegt bei ca. 2,8 µM. Im pNFAT-Assay liegt die EC₅₀ für ATP bei ca. 3 µM. Es zeigten sich keine signifikanten Anstiege der RLU-Messwerte nach ATP-Zugabe in den pAP1-luc- und pSRE-luc-Assays.

3.3.3 Vergleich verschiedener Agonisten

pNFAT-luc-Versuche

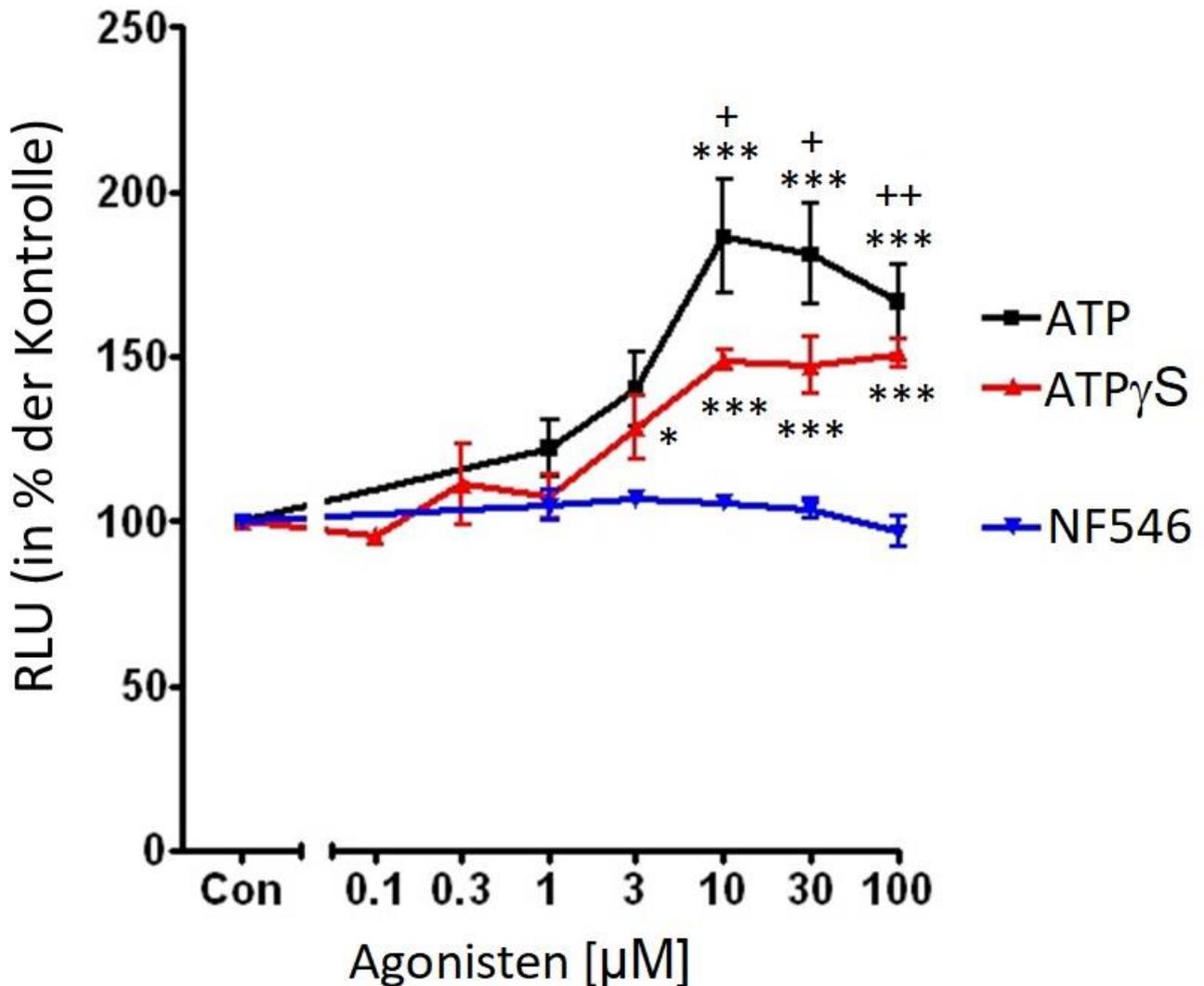


Abb. 14 – Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm SEM der RLU-Messwerte in Abhängigkeit zur Agonisten-Konzentration unter Verwendung des Plasmids pNFAT-luc im Luciferase-Assay mit dem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein. Vergleichend erzielt ATP signifikant höhere Werte als NF546. Die Mittelwerte \pm SEM sind als % der jeweiligen Kontrolle (Con) angegeben, die als 100 % festgelegt wurde, mit je n = 4 für ATP γ S und NF546, sowie n = 14 für ATP.* p < 0,05; *** p < 0,001 signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle. + p < 0,05; ++ p < 0,01 signifikanter Unterschied gegenüber des Agonisten NF546 bei gleicher Konzentration. Gegenüber ATP γ S ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1.

pCRE-luc-Versuche

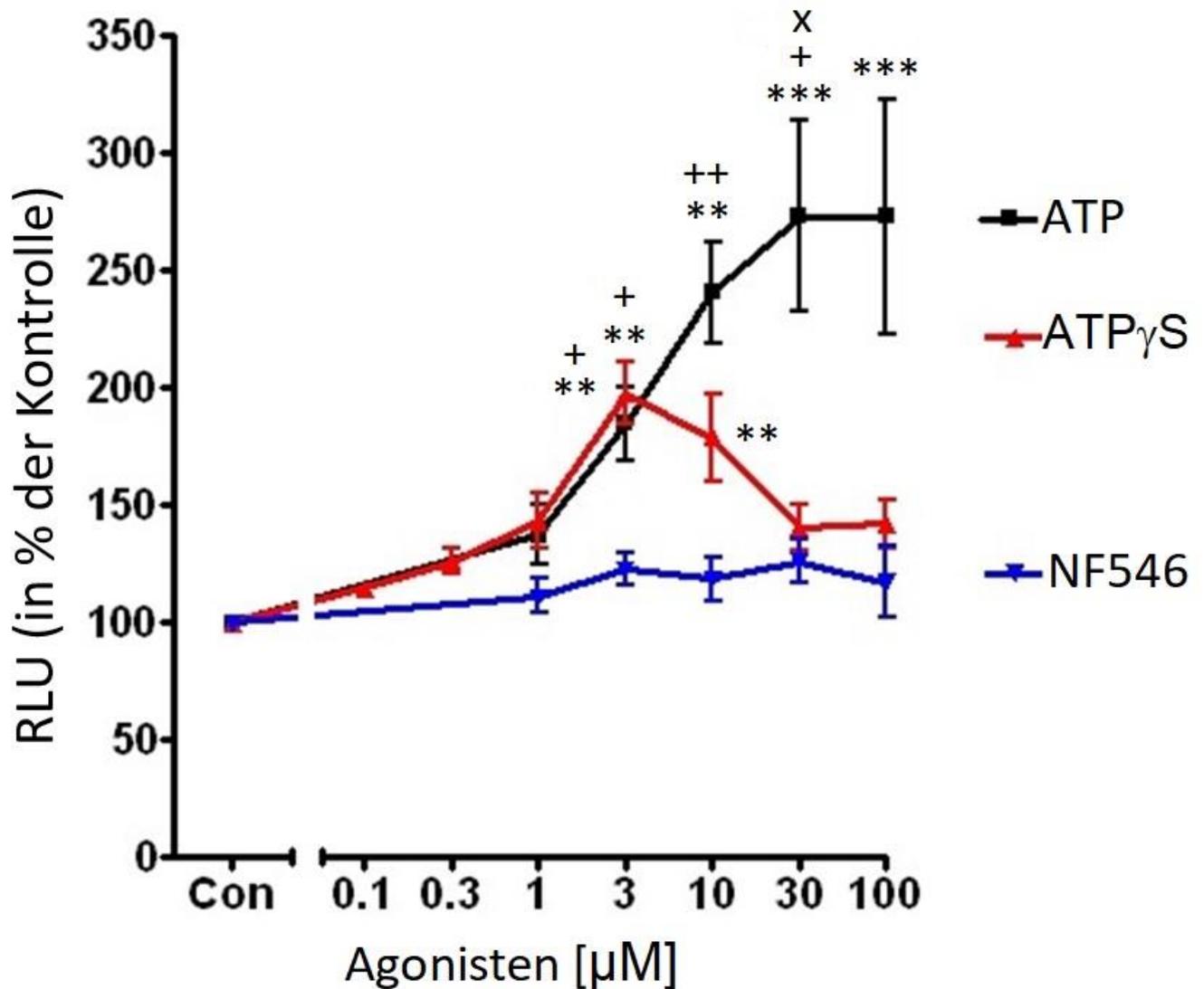


Abb. 15 – Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm SEM der RLU-Messwerte in Abhängigkeit zur Agonisten-Konzentration unter Verwendung des Plasmids pCRE-luc im Luciferase-Assay mit dem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein. Vergleichend erzielt ATP signifikant höhere Werte als NF546. Die Mittelwerte \pm SEM sind als % der jeweiligen Kontrolle (Con) angegeben, die als 100 % festgelegt wurde, mit $n = 4$ für ATP γ S und NF546, sowie $n = 8$ für ATP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle. + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ signifikanter Unterschied gegenüber des Agonisten NF546 bzw. x $p < 0,05$ gegenüber ATP γ S bei gleicher Konzentration. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1, CRE (cAMP response element).

Es wurden Versuche mit Astrozytomzellen durchgeführt, die mit der Geninformation für das SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein transfiziert waren. Als Reportergene wurden pNFAT-luc (Abbildung 14) und pCRE-luc (Abbildung 15) benutzt. Es wurden jeweils drei verschiedene Agonisten ATP, ATP_γS und NF546 getestet und die RLU-Messwerte verglichen.

Bei Versuchen mit dem Plasmid pNFAT-luc (Abbildung 14) steigen die RLU-Werte bei steigender Agonisten-Konzentration und erreichen für ATP und ATP_γS ein RLU-Wert-Maximum bei einer Konzentration von 10 μM. Es zeigt sich demnach eine halbmaximale Konzentration EC₅₀ von ca. 3 μM sowohl für ATP als auch für ATP_γS. Für ATP werden insgesamt die höchsten RLU-Werte erzielt, bei Konzentrationen ab 10 μM sogar signifikant gegenüber NF546.

Bei Versuchen mit dem Plasmid pCRE-luc (Abbildung 15) steigen die RLU-Werte bei steigender Agonisten-Konzentration und erreichen für ATP ein RLU-Wert-Maximum bei Konzentrationen von 30 μM, für ATP_γS bei 3 μM. Die halbmaximale Konzentration EC₅₀ liegt demnach für ATP bei ca. 3 μM, für ATP_γS bei ca. 1 μM. Bei ATP bleiben die RLU-Werte nach Erreichen des Maximums vergleichbar signifikant hoch. Für ATP werden insgesamt die höchsten RLU-Werte erzielt, bei Konzentrationen von 3 – 100 μM signifikant gegenüber NF546 und bei einer Konzentration von 30 μM signifikant gegenüber ATP_γS.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Liganden ATP und ATP_γS zu einer signifikanten Erhöhung der RLU-Werte führen. Die RLU-Werte für NF546 zeigen sowohl bei Versuchen mit pNFAT-luc als auch bei Versuchen mit pCRE-luc keinen statistisch signifikanten Anstieg in Abhängigkeit der Agonisten-Konzentration.

3.3.4 Testung von NF546 bei kürzerer Inkubationszeit

Da der Agonist NF546 bei der Inkubationszeit von 9 Stunden keine signifikante Aktivität zeigte, wurden auch Versuche bei einer kürzeren Inkubationszeit von 4 Stunden durchgeführt. Es wurden transfizierte Astrozytomzellen und das Plasmid pCRE-luc verwendet (Abbildung 16).

p-CRE-luc-Versuche

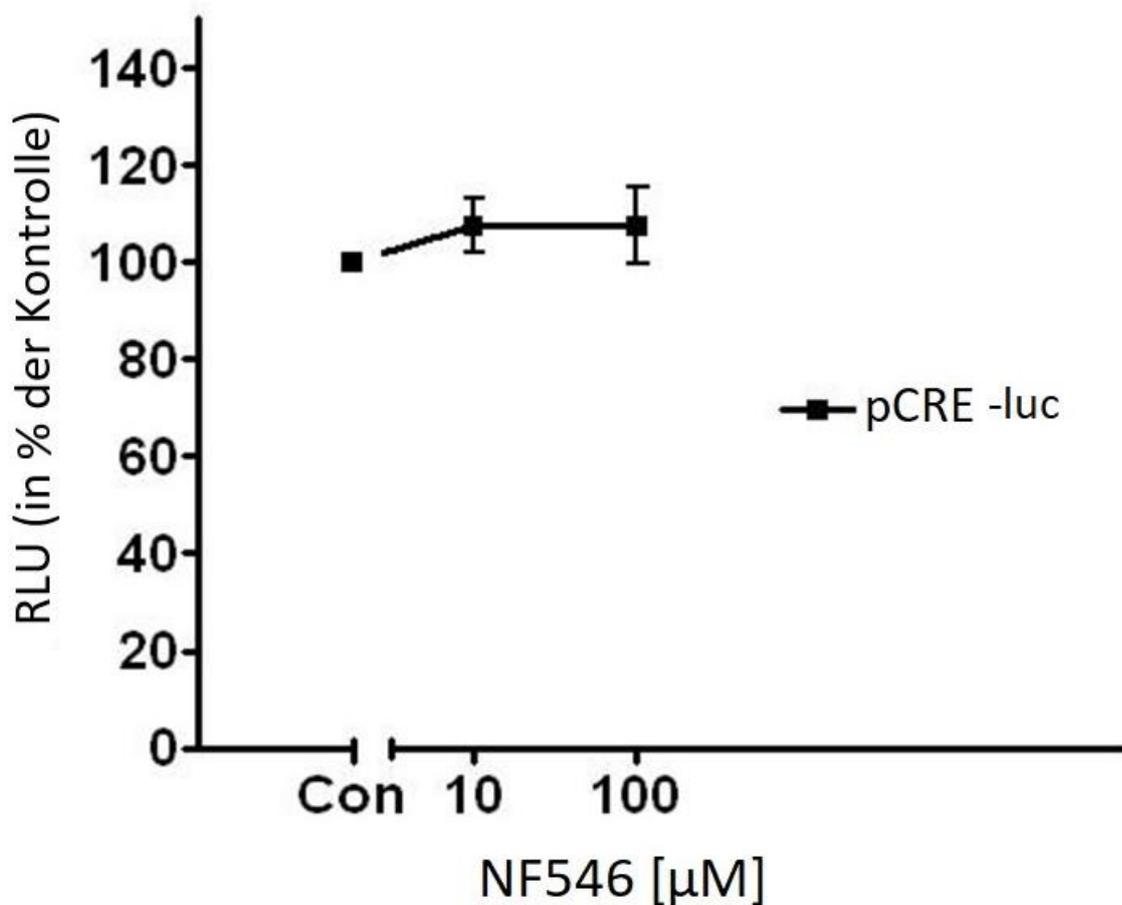


Abb. 16 – Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Messwerte in Abhängigkeit zur Agonisten-Konzentration unter Verwendung des Plasmids pCRE-luc und des Agonisten NF546 bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden im Luciferase-Assay mit dem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein. Es zeigt sich keine signifikante Steigerung der RLU-Aktivität. Die Mittelwerte \pm SEM sind als % der jeweiligen Kontrolle (Con) angegeben, die als 100 % festgelegt wurde, mit je n = 10. Statistische Analyse: ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test. S. Legende zu Tabelle 1, CRE (cAMP response element).

Im Vergleich zur Kontrolle mit Zugabe von HBSS sind die RLU-Werte sowohl nach Zugabe von 10 μM als auch nach Zugabe von 100 μM des Liganden NF546 nicht signifikant höher (Abbildung 16). In Versuchen mit 10 μM NF546 wurden RLU-Mittelwerte \pm SEM mit 8984 ± 496 und unter Konzentrationen von 100 μM NF546 RLU-Mittelwerte \pm SEM mit 8130 ± 532 gemessen. Daraus ergibt sich kein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Es zeigt sich also auch bei dieser Inkubationszeit im Luciferase-Assay kein signifikanter RLU-Anstieg durch den Liganden NF546.

4. Diskussion

Der humane P2Y₁₁-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie. Besonders interessant, aber noch wenig untersucht, ist seine Splicing-Variante: das Protein SSF1_P2Y₁₁. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein Konstrukt, bestehend aus der Splicing-Variante des Rezeptorproteins und dem fluoreszierenden Protein YFP, molekularbiologisch herzustellen und dieses Konstrukt in Zellen zu exprimieren, um so Expression und Funktion des Rezeptors, die mit ihm gekoppelten intrazellulären Signalwege sowie seine pharmakologischen Eigenschaften zu untersuchen.

4.1 Expressionsnachweis des Fusionsproteins in humanen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein rekombinant in humanen Zellen exprimiert wird. Studien von Dreisig und Kornum hatten viele der bisherigen Forschungsmethoden in Studien am P2Y₁₁-Rezeptor kritisiert (Dreisig und Kornum, 2016). Unter anderem könne durch die Verwendung unspezifischer Primer nicht in allen bisherigen Studien sicher garantiert werden, ob der P2Y₁₁-Rezeptor oder die Rezeptorvariante SSF1_P2Y₁₁ amplifiziert worden sind (Dreisig und Kornum, 2016). Auch die Verwendung von nicht murinen Spezies sei von Bedeutung, da vermutet wird, dass Mäuse kein orthologes P2Y₁₁-Rezeptorgen besitzen (Dreisig und Kornum, 2016). Die Abwesenheit des Rezeptors in Nagetieren hat die Untersuchung seiner Eigenschaften und Funktionen erschwert (Kennedy, 2017). Das analoge Protein in Kaninchen weist lediglich 70 % identische Aminosäuren auf (Kennedy, 2017).

Die Gensequenz des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors wurde in dieser Arbeit unter Nutzung, mit für die Gensequenz des humanen SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors spezifischer Primer, mittels PCR amplifiziert. So konnte gewährleistet werden, dass sich die folgenden Versuchsergebnisse auf den SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor bezogen. Nach Ligation, Transformation, Minipräparation und Gelelektrophorese bestätigte die Sequenzierungs-Firma GATC in Köln den richtig orientierten mutationsfreien Genabschnitt.

Dreisig und Kornum kritisierten auch viele der bisherigen Methoden zum Expressionsnachweis des P2Y₁₁-Rezeptors (Dreisig und Kornum, 2016). So wären Antikörper nicht spezifisch genug für den P2Y₁₁-Rezeptor, da sie sowohl andere P2Y-Rezeptoren markieren als auch oftmals auf den C-Terminus des Rezeptors abzielen, der bei beiden Rezeptorvarianten identische Strukturen aufweist und so nicht zwischen P2Y₁₁-Rezeptor und SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor unterschieden werden kann (Dreisig und Kornum, 2016). Auch die polyklonalen Antikörper #APR-015 und #AB-9590, die in zahlreichen Studien als Expressionsnachweis verwendet wurden, seien nicht spezifisch genug (Dreisig und Kornum, 2016).

Der Expressionsnachweis des SSF1_P2Y₁₁-YFP-Fusionsproteins in 1321N1-Astrozytomzellen erfolgte in dieser Arbeit mittels Laserscanning-Mikroskop. Die Expressionsanalyse der Fluoreszenzbilder ergab signifikant höhere Δ RLU-Werte für die Astrozytomzellen mit dem rekombinanten Fusionskonstrukt SSF1_P2Y₁₁_YFP im Vergleich zu den Kontrollen. Folglich kann auf eine rekombinante Expression des Fusionsproteins geschlossen werden. Diese Beobachtungen lassen sich mit den Ergebnissen von Communi und Mitarbeitern vergleichen, die festgestellt hatten, dass 1321N1-Astrozytomzellen und CHO-K1-Zellen den P2Y₁₁-Rezeptor stabil exprimieren können (Communi et al., 1997, 1999, 2001). Communi und Mitarbeiter wiesen auch per Westernblot und cAMP-Assay die Rezeptorexpression nach (Communi et al., 2001). Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Rezeptorexpression nicht membranbetont ist, wie eine Arbeitsgruppe dies beispielsweise für das Fusionskonstrukt hP2Y₁₂-CFP zeigte (Straßburger und von Kügelgen, 2005). Der Grund für diesen Unterschied ist nicht bekannt.

4.2 Funktion des Fusionsproteins als Rezeptor

Es bestätigt sich die Funktion des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsproteins als Rezeptor. Communi und Mitarbeiter zeigten bereits zuvor, dass der SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor eine intrazelluläre cAMP Produktion nach Stimulation mit extrazellulären ATP erzeugen kann (Communi et al., 2001). In den Reporteragen-Assays dieser Arbeit konnten nach Zugabe von potentiellen Liganden in verschiedenen Konzentrationen, signifikante Signale (Δ RLU) gegenüber den Kontrollen gemessen werden. Ein

entsprechender Wirkmechanismus wurde ebenfalls von Communi und Mitarbeitern gezeigt (Communi et al., 1999, 2001).

4.3 Kopplung an G-Proteine und Signaltransduktion

In dieser Arbeit konnte mittels Reporter-Gen-Versuchen wahrscheinlich gemacht werden, dass das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein die Signaltransduktionswege G_s-gekoppelt über die Proteinkinase A sowie G_q-gekoppelt über Calcium und die Proteinkinase C vermittelt. In pNFAT-luc- und pCRE-luc- gesteuerten Reporter-Gen-Assays führten Liganden in transfizierten Zellen zu signifikanten Signalen. Dies bestätigt die Ergebnisse vorheriger Studien zum SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor (Communi et al., 2001). Unter Verwendung der Reporter-Gene pAP-1-luc und pSRE-luc zeigte sich dagegen keine signifikante Reaktion in transfizierten Zellen im Luciferase-Assay.

Nach bisherigem Stand wird die SRE-Aktivierung über einen G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt (Park et al., 2002) und auch die AP-1-Aktivierung ist unter anderem mit dem G_i-Protein-Signalweg verknüpft (Oyesanya et al., 2010). Es lässt sich schlussfolgern, dass das SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor-YFP-Fusionsprotein nicht an G_i-Proteine koppelt. Dies entspricht den Kenntnissen über die Kopplung des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors an G-Proteine (Communi et al., 1999, 2001). Es wird berichtet, dass der P2Y₁₁-Rezeptor effizienter an G_q-Proteine als an G_s-Proteine koppelt (Kennedy, 2017).

In den Versuchen dieser Arbeit ergaben sowohl die pNFAT-luc- als auch die pCRE-luc-gesteuerten Luciferase-Assays nach Stimulation durch ATP signifikant hohe Δ RLU-Messwerte im Vergleich zur Kontrolle. Im direkten Vergleich war der prozentuale Anstieg der RLU-Messwerte unter Verwendung von pCRE-luc etwas höher als unter Verwendung von pNFAT-luc. Es wurden schon unter geringeren ATP-Konzentrationen signifikant höhere Messwerte für pCRE-luc erreicht. Die halbmaximalen Konzentrationen EC₅₀ von ATP mit ca. 2,8 μ M im pCRE-luc und ca. 3 μ M im pNFAT-luc waren jedoch nahezu identisch. Da das G_q-Protein über eine Calcium-Erhöhung das Promotorgen pNFAT aktiviert und das G_s-Protein über eine cAMP-Erhöhung das Promotorgen pCRE, ließe sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die zuvor geltende unterschiedliche Effizienz der G-Protein-Kopplung nicht bestätigen. Dazu ist bekannt, dass die Proteinkinase C bzw. die Mobilisierung von Calcium per G_q-Protein auch ohne G_s-

Protein in gewissem Maße die Adenylatcyclase in 1321N1-Astrozytomzellen aktivieren (Qi et al., 2001) und so auch G_s -Protein-unabhängig zu einer cAMP-Erhöhung bzw. zu ihrer Potenzierung führen kann (Sunahara et al., 1996). Dies könnte eine Erklärung für verschiedene Agonistenpotenzen am Rezeptor sein, wenn verschiedene Liganden an beiden Signalwegen geprüft werden. Der direkte Rückschluss von intrazellulären Signalen durch Promotorgene auf die Aktivierung eines G-Proteins allein sollte also noch einmal kritisch hinterfragt werden. Zudem könnte das am C-Terminus fusionierte YFP die G-Protein-Kopplung beeinflusst haben.

4.4 Wirksamkeit verschiedener Liganden am Rezeptor

Der nicht-chimäre P2Y₁₁-Rezeptor ist schon in mehreren Studien erforscht worden. Es mangelte bisher jedoch an näheren Aussagen zur chimären Variante SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor, insbesondere zur Potenz verschiedener Agonisten am Rezeptor.

Die untersuchte Affinität der Liganden am rekombinanten Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor in 1321N1-Astrozytomzellen lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit in folgender Reihenfolge beschreiben: unter Nutzung des Plasmids pNFAT-luc: ATP (EC₅₀ 3 µM) = ATP_γS (EC₅₀ 3 µM) als Agonisten am Rezeptor, wobei ATP insgesamt höhere Maxima erreichte, und unter Verwendung des Plasmids pCRE-luc: ATP_γS (EC₅₀ 1 µM) > ATP (EC₅₀ 3 µM) als Agonisten am Rezeptor, wobei ATP hier ebenfalls höhere Maxima erreichte. Die hohen Maximalwerte bestätigen die Wirkung von ATP als Vollagonisten (Communi et al., 2001). Die Ergebnisse zur Agonistenaktivität in Versuchen mit dem Plasmid pCRE-luc sind mit den aktuellen Kenntnissen über den SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor vereinbar (Communi et al., 1999, 2001). Die Ergebnisse im pNFAT-luc stehen allerdings im Widerspruch zur bisherigen Forschung am chimären sowie am nicht-chimären P2Y₁₁-Rezeptor, dessen Agonistenaffinitäten jeweils mit ATP_γS > ATP benannt wurden (Communi et al., 1999, 2001).

Es wurde berichtet, dass das transgene Spleißen der Rezeptorgene zu einer zusätzlichen ATP-Bindungsstelle beim SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor im Vergleich zum P2Y₁₁-Rezeptor führt (Communi et al., 2001). Nach bisherigem Stand hat diese keinen wesentlichen Einfluss auf die Nukleotidaffinität (Communi et al., 2001). Möglicherweise hat die zusätzliche Bindungsstelle aber doch Bedeutung für die Affinität zu bestimmten

Liganden am SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein. Dies könnte der Grund für die zumindest gleichwertige Signalwirkung von ATP im Gegensatz zu ATP_γS beim SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein in pNFAT-luc-Versuchen in dieser Arbeit sein.

Communi und Mitarbeiter kritisierten selbst, dass sie Versuche an Zellen vornahmen, die den Rezeptor überexprimierten (Communi et al., 2001). Da laut ihren Ergebnissen nicht alle Transkripte in Proteine übersetzt werden (Communi et al., 2001), ist fraglich, ob die Versuchsergebnisse überhaupt auf andere Zellreihen und vor allem auf Zellen im lebenden Organismus übertragbar sind.

Im Gegensatz zu ATP und ATP_γS führte NF546 in meinen Versuchen zu keinem signifikanten Signal und ist demnach nicht als Agonist wirksam. Weder unter einer Inkubationszeit von 9 Stunden noch von 4 Stunden konnte ein signifikanter Signalanstieg im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Im Vergleich zum nicht-chimären P2Y₁₁-Rezeptor, für den der Ligand NF546 als selektiver Nicht-Nukleotid-Agonist mit hoher Affinität beschrieben wurde (Meis et al., 2010; Jacobson et al., 2020), war dies mit dem rekombinanten Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor in den Versuchen dieser Arbeit nicht der Fall gewesen. NF546 ist in bisherigen Studien auch für putative murine P2Y₁₁-Rezeptoren verwendet worden (Barragán-Iglesias et al., 2015). Da jedoch vermutet wird, dass Mäuse gar kein echtes Ortholog zum menschlichen P2Y₁₁-Rezeptor besitzen, ist anzunehmen, dass NF546 auch andere Zellsignalmechanismen aufweisen kann (Dreisig und Kornum, 2016). Dies ließe wiederum die Überlegung zu, ob NF546 in menschlichen Zellen zusätzliche Wirkungen hat, die nicht durch den P2Y₁₁-Rezeptor vermittelt werden (Dreisig und Kornum, 2016). Da sich die, an der Bindung von NF546 beteiligten Aminosäurereste, weitestgehend mit der Bindung von ATP ähneln, besteht die Möglichkeit, dass NF546 an andere ATP-Bindungsrezeptoren bindet (Meis et al., 2010). Es stellt sich die Frage, ob NF546 vielleicht gar kein spezifischer Agonist für den P2Y₁₁-Rezeptor ist und ob es hier tatsächlich einen Unterschied in der Agonistenaffinität für den P2Y₁₁-Rezeptor und das SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein gibt.

Insgesamt muss allerdings berücksichtigt werden, dass verschiedene Methodenansätze den direkten Vergleich verschiedener Studien erschweren können. Auch spielt die

Rezeptordichte auf den zu untersuchenden Zellen, die maßgeblich von Zellreihe und genutztem Vektor abhängt (Palmer et al., 1998), eine große Rolle für die Auswertung von Agonistenaffinitäten. Unterschiedlich hohe Expressionslevel in den zu untersuchenden Zellen könnten eine Erklärung für unterschiedlich hoch gemessene Affinitäten des NF546 sein.

4.5 Methodenkritik

Alle Versuche wurden mit dem Anspruch auf möglichst exaktes Arbeiten und Einhalten gleicher Bedingungen beim Wiederholen von vergleichenden Versuchen durchgeführt. Trotzdem gibt es bei der Durchführung des Luciferase-Assays zahlreiche Variable, die unvermeidbar von Versuch zu Versuch zu Messfehlern und Ungenauigkeiten führen können. Diesen wurde durch möglichst hohe Fallzahlen (n) versucht entgegen zu wirken.

Zu Untersuchungen am rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor musste ein Zellsystem gefunden werden, das es möglich macht, die Funktion des Rezeptors in Bezug auf die getesteten Agonisten analysieren zu können, ohne dass unspezifische Zellantworten die Ergebnisse verfälschen. 1321N1-Astrozytomzellen eignen sich, da sie keine endogenen P2Y-Rezeptoren exprimieren (Filtz et al., 1994). Der pcDNA6-Vektor hat sich als gut funktionierender Vektor etabliert und kodiert, in der von mir verwendeten Form, außerdem für das Protein YFP, das sich zur Expressionsanalyse nutzen lässt. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Communi und Mitarbeitern in Bezug auf die Agonisten-Affinität muss darauf geachtet werden, dass unterschiedliche Versuchsmodelle verwendet wurden. Communi und seine Mitarbeiter forschten an CHO-K1-Zellen und mit pEFIN3-Plasmiden. Hierdurch wird der direkte Vergleich beider Arbeiten erschwert.

Die Verwendung für das Fusionsprotein spezifischer Primer garantierte die Amplifikation der Rezeptorvariante (Dreisig und Kornum, 2016). Per Laserscanning-Mikroskop konnte die Rezeptorexpression belegt werden. Beides wurde von Kritikern bisheriger Forschungsmethoden als geeignetes Mittel vorgeschlagen (Dreisig und Kornum, 2016). Da die Wirksamkeit von Agonisten bekanntlich vom Level der Rezeptorexpression abhängt (Palmer et al., 1998) ist es wichtig, dass unterschiedliche Signalwege in der

gleichen Zellart untersucht werden, um die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können. Unterschiedlich hohe Rezeptordichten, die von Zellreihe und Vektor abhängen, können sonst falsche Agonistenaffinitäten suggerieren. Dies könnte die fehlende Wirksamkeit von NF546 in meinen, im Vergleich zu vorherigen, Versuchen erklären.

Zudem könnte die Kopplung des rekombinanten SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors an YFP dessen Eigenschaften verändern. Zambon und Mitarbeiter schreiben allerdings, dass C-terminal GFP-markierte humane P2Y₁₁-Rezeptoren ähnliche Signaleigenschaften wie die jeweiligen nicht markierten Rezeptoren aufweisen (Zambon et al., 2001).

Zur Analyse von Signaltransduktionsweg und Agonistenaffinität wurden in dieser Arbeit Reporteragen-Assays verwendet. Diese sind sensitiv und bieten den Vorteil einer einfachen und schnellen Durchführung. Nachteilig ist die relative Instabilität der Genprodukte (Cheng et al., 2010). Dieser wirkt man mit möglichst kurzen Inkubationszeiten entgegen. Bisherige Versuche mit pCRE- und pSRE-luc am P2Y₁₂-Rezeptor wurden beispielsweise mit einer Inkubationszeit von 3,5 Stunden bzw. 4 Stunden durchgeführt (Hoffmann et al., 2008). Durch mehrere Optimierungsversuche wurde versucht, eine Inkubationszeit zu finden, die für die Konstellation aus Zellreihe und Rezeptor maximale Messwerte zeigte, die sich für 9 Stunden ergab. Trotzdem kann ein frühzeitiger Nukleotidabbau während der Inkubationszeit die Messergebnisse beeinflussen. Zu beachten ist dies besonders beim Vergleichen von ATP mit ATP_γS, da ATP_γS im Gegensatz zu ATP stabiler ist und langsamer von Nukleotidasen abgebaut wird (Marteau et al., 2004).

4.6 Ausblick

Es lässt sich zusammenfassen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, insbesondere der P2Y₁₁-Rezeptor sowie seine Variante SSF1_P2Y₁₁, einen interessanten Angriffspunkt für neue Pharmaka darstellen. Ihr verbreitetes Vorkommen auf menschlichen Zellen und ihre Funktion als Vermittler von Signaltransduktionen macht sie für die medizinische Forschung interessant. Könnten Krankheiten, wie bspw. Leukämie, Neutropenie, exokrine Pankreasfunktionsstörung, Herzinfarkt oder auch Schmerzempfindungen sowie Entzündungsreaktionen durch spezifische Medikamente am Rezeptor gesteuert werden, wäre dies ein neuer Meilenstein in der Pharmakologie.

Diese Promotionsarbeit soll einen ersten Ansatz darstellen, die Splicing-Variante des P2Y₁₁-Rezeptors näher zu charakterisieren und ein Ausgangspunkt für weitere Forschung sein.

Obwohl sich humane Zellen sehr gut für die durchgeführten Versuche eignen und sich 1321N1-Astrozytomzellen als Zellreihe bewährt haben, wäre es interessant, ähnliche Versuche in CHO-Zellen durchzuführen, da viele bisherige Erkenntnisse auf Versuchen an CHO-Zellen basieren und sich daher besser vergleichen ließen. CHO-Zellen exprimieren zwar endogene P2Y-Rezeptoren, darunter den P2Y₁-Rezeptor, doch zeigen einige Versuche, dass bestimmte Agonisten, in nicht-transfizierten Zellen, keinen Einfluss auf das cAMP-Level oder die CRE- bzw. SRE-abhängige Luciferase-Aktivität haben (Hoffmann et al., 2008). Dieses Fehlen entsprechender endogener Rezeptoren müsste für jeden Agonisten vor etwaigen Versuchen ausgeschlossen werden, um die CHO-Zellen als mögliche Expressions-Zelllinie zu beweisen.

Um das Fluoreszenzprotein YFP als Störfaktor sicher auszuschließen, könnten zudem vergleichende Versuche mit dem an YFP gekoppelten Wildtyp-Rezeptor, sowie an der Splicing-Variante SSF1_P2Y₁₁ ohne YFP, vorgenommen werden.

Des Weiteren ließen sich die durchgeführten Luciferase-Assays dieser Arbeit durch andere Versuchsmethoden erweitern. In weiteren Versuchen könnten die cAMP- und Ca²⁺-Konzentrationen intrazellulär nach ATP-Stimulation direkt gemessen werden.

Vor allem das Fehlen der Wirksamkeit von NF546 legt Unterschiede zwischen den beiden Splicing-Varianten des Rezeptors nahe. Da außerdem noch offen ist, unter welchen Bedingungen und mit welchen Vorteilen die Expression des SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors hoch- bzw. runterreguliert wird, ist das Verständnis dieses Mechanismus von großem Interesse. Spannend wäre demnach, inwieweit eine Desensibilisierung bzw. Internalisierung des Rezeptors stattfindet. Rezeptordesensibilisierung kann durch Entkopplung vom G-Protein, Internalisierung membranständiger Rezeptoren oder verminderter Synthese bzw. vermehrter lysosomaler Degradation stattfinden (Butcher et al., 2012). β -Arrestin konnte als wichtiges Adapterprotein im Internalisierungsprozess von GPCR identifiziert werden. In seiner aktiven Form kann es mit Endozytose-Proteinen interagieren (Lin et al., 1999). β -Arrestin entkoppelt GPCR von G-Proteinen, markiert GPCR für clathrin-assoziierte Endozytose oder koppelt GPCR an G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege (Shenov und Lefkowitz, 2003). Weitere Studien

am β -Arrestin-Weg könnten eine mögliche Desensibilisierung des aktivierten SSF1_P2Y₁₁-Rezeptors zeigen.

Es steht also im allgemeinen medizinischen und vor allem immunpharmakologischen Interesse, den P2Y₁₁-Rezeptor sowie seine Splicing-Variante, den SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor, weiter zu charakterisieren, spezifische Liganden zu entwickeln, die exakte Signaltransduktion und seine Desensibilisierung zu verstehen. Zahlreiche Krankheitsbilder könnten in Zukunft beeinflusst, in bis jetzt un- oder nur schwer behandelbare Krankheitsprozesse könnte eingegriffen und damit verbundene enorme Kosten für das Gesundheitssystem eingespart werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Dissertation habe ich mich mit der molekularpharmakologischen Analyse einer Variante des G-Protein-gekoppelten P2Y₁₁-Rezeptors, dem SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor, befasst. SSF1 ist ein Kernprotein, dessen Gene benachbart zu den Genen des P2Y₁₁-Rezeptors auf dem humanen Chromosom 19 liegen. Der Rezeptor SSF1_P2Y₁₁ entsteht durch intergenes Spleißen beider Exons. Zur Analyse wurden 1321N1-Astrozytomzellen mit der Geninformation für das rekombinante Fusionsprotein SSF1_P2Y₁₁_YFP transfiziert und mittels Methoden, wie Laserscanning-Mikroskopie und Promotorgen-gesteuerte Luciferase-Assays, analysiert. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression, Rezeptorfunktion, Signaltransduktion und Aktivierbarkeit des Fusionsproteins zu untersuchen.

Mittels Laserscanning-Mikroskopie wurde die Expression des SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsproteins nachgewiesen. Zellkulturen mit dem Fusionskonstrukt zeigten signifikant erhöhte Messwerte gegenüber den Kontrollzellen. Zudem konnten Reporter-gen-Assays die vermutete Funktion des Fusionsproteins als Rezeptor bestätigen. Als Vektoren wurden hierfür die Plasmide CRE (cAMP response element), NFAT (nuclear factor of activated T-cells), SRE (serum response element) und AP-1 (activator protein) verwendet. pCRE-luc- und pNFAT-luc-gesteuerte Luciferase-Assays führten zu signifikant erhöhten Messwerten nach ATP- und ATP_γS -Gabe im Vergleich zu Kontrolllösungen und bestätigten die Kopplung an G_q- und G_s-Signalwege. Eine etwa gleiche halbmaximale Konzentration EC₅₀ für ATP im pCRE-luc- (EC₅₀ 2,8 μM) sowie im pNFAT-luc-Versuch (EC₅₀ 3 μM) weist auf eine vergleichbar effiziente Kopplung des SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsproteins an G_s- oder G_q-Proteine hin. In Versuchen mit den Plasmiden pSRE-luc und pAP1-luc konnte keine signifikante Erhöhung der Messwerte ausgelöst werden, was eine Kopplung des Rezeptors an den G_i-Signalweg unwahrscheinlich macht. Ergänzend wurden verschiedene Liganden auf ihre Wirksamkeit am Fusionsprotein-Rezeptor untersucht. Sowohl ATP als auch ATP_γS wirkten am SSF1_P2Y₁₁-YFP-Rezeptor-Fusionsprotein als Agonisten mit signifikant höheren Messwerten im Vergleich zur Kontrolle. Die Potenz der Substanzen am Rezeptor ist unter Verwendung des Plasmids pNFAT-luc als gleichwertig zu beschreiben (je EC₅₀ 3 μM), unter Verwendung des Plasmid pCRE-luc weist ATP_γS eine

höhere Potenz (EC_{50} 1 μ M) als ATP (EC_{50} 3 μ M) am Rezeptor auf, wobei ATP konzentrationsabhängig signifikant höhere Maximalwerte gegenüber der Kontrolle (30 μ M und 100 μ M), dem Liganden NF546 (10 μ M und 30 μ M) oder ATP γ S (30 μ M) erzielte. ATP wirkt als Vollagonist. Die getestete Substanz NF546 hatte im Gegensatz zu Literaturdaten zum P2Y₁₁-Rezeptor keine agonistische Wirkung.

Der P2Y₁₁-Rezeptor sowie der SSF1_P2Y₁₁-Rezeptor sind von großen pathophysiologischen Interesse, da sie ubiquitär auf menschlichen Zellen vorhanden und an zahlreichen Krankheitsbildern beteiligt sind. Die in dieser Promotionsarbeit erarbeiteten Daten führen zu einem besseren Verständnis über die Signaltransduktionsmechanismen des Rezeptors und könnten es in Zukunft pharmakotherapeutisch ermöglichen, in diese einzugreifen.

6. Anhang

6.1 Material und Geräte

Material und Geräte	Referenz
24-Well-Platten	Greiner bio-one
6-Well-Platten	Greiner bio-one
96-Well-Platten	Greiner bio-one
Autoklaviergerät	Thermo Scientific
Elektrophorese	Consort EV202 – Electrophoresis Power Supply
Feinwaage	Sartorius
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Glasplättchen Ø 25mm	Thermo Scientific
Laserscanning Mikroskop LSM	Zeiss, LSM700, Laserdiode: 488, verwendetes Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27
Mikroplatten-Reader, FLUOstar Omega	BMG Labtech
PCR – Thermozykler	Biometra – Personal Thermocycler
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments – HERA safe
UV-Transilluminator	BioRad Laboratories GmbH
Wärmeschüttler	Edmund Bühler GmbH
Wasserbad	Julabo – Paratherm U 4 electronic
Zellkultur-Brutschrank	Thermo Scientific – HERACELL 150i
Zellkulturflasche	Greiner bio-one
Zellkultur-Mikroskop	Zeiss, Modell: ID 03, Inversmikroskop, verwendetes Objektiv: 10x
Zentrifuge	Eppendorf - miniSpin plus

Software	Referenz
Graph Pad Prism 4	Graph Pad
Office 2007 (Word, Excel)	Microsoft
Quantity One	Bio Rad
ZEN	Zeiss

6.2 Vektorkarten und Enhancer-Elemente

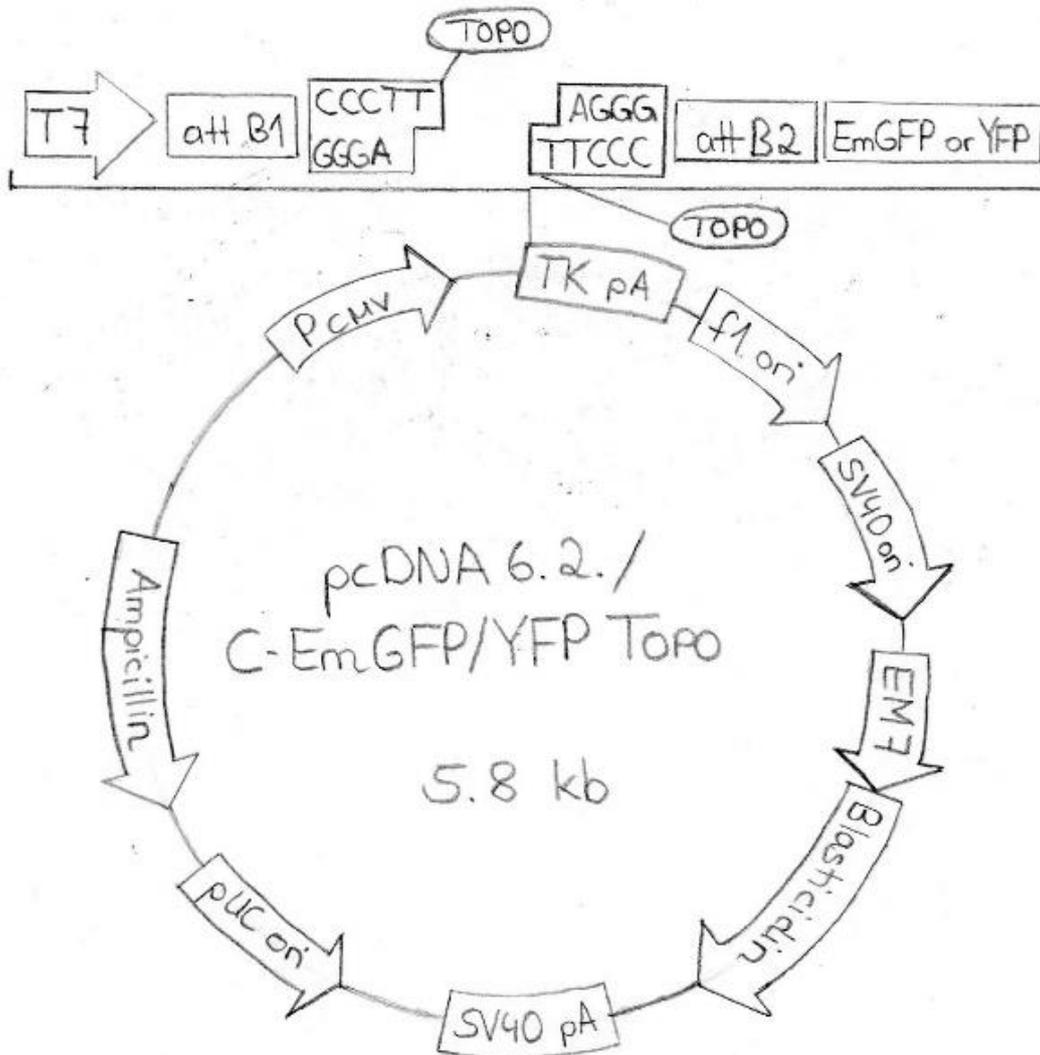


Abb. 17 - Vektorkarte des Plasmids pcDNA6, modifiziert nach Abbildung in der Herstellerinformation: <https://tools.thermofisher.com>

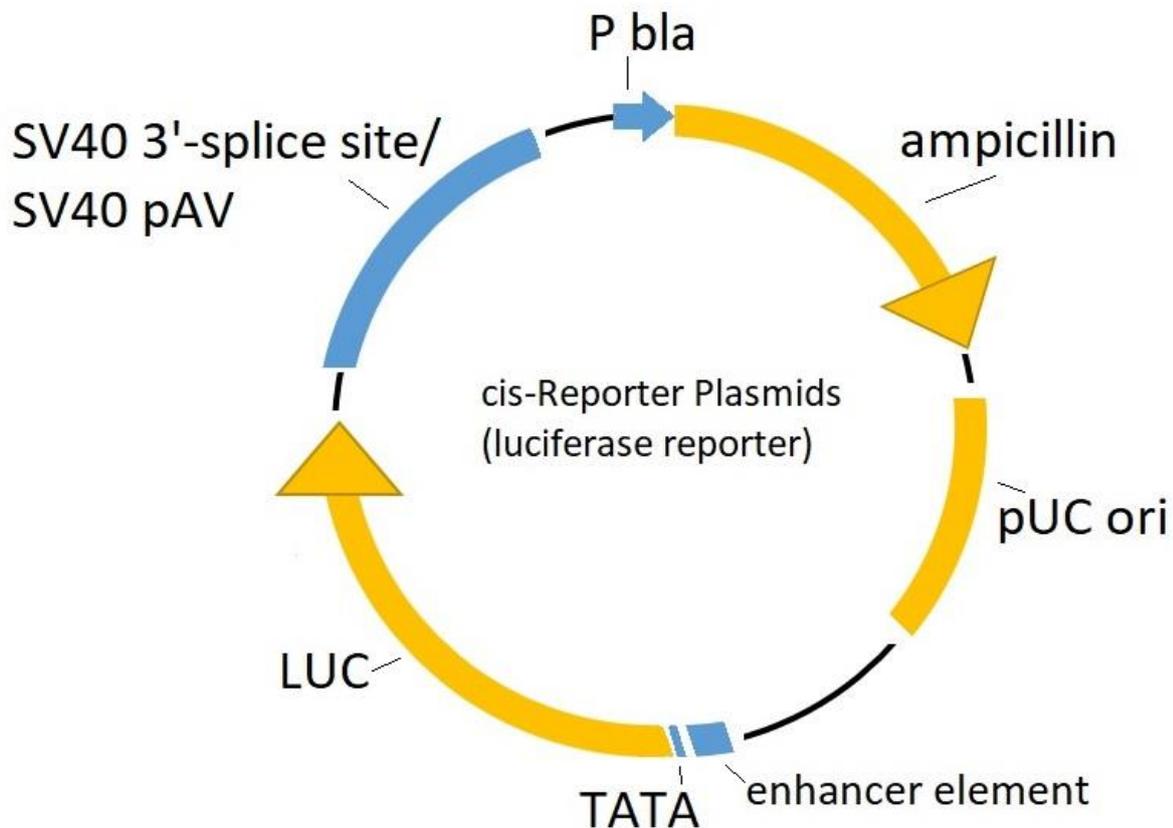


Abb. 18 - Vektorkarte des cis-Reporter-Plasmids (Luciferase) (erstellt mit Paint, modifiziert nach der Abbildung: „PathDetect in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems“ von Agilent Technologies Stratagene Products Division.). LUC (Luciferase), P bla (Penicillin-Promotor), ori (origin of replication), TATA (TATA-Box, Promotor)

Enhancer-Elemente

Tab. 4 – Dargestellt sind die cis-Reporter-Plasmide mit ihrer zugehörigen Aminosäuresequenz. (<https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/219073.pdf>, Agilent Technologies Stratagene Products Division, 2010: PathDetect in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems.) Es wurden Plasmide der Firma Stratagene verwendet.

cis-Reporter-Plasmid	Sequenz
pNFAT-luc	(GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT) ₄
pCRE-luc	(AGCCTGACGTCAGAG) ₄
pAP1-luc	(TGACTAA) ₇
pSRE-luc	(AGGATGTCCATATTAGGACATCT) ₅

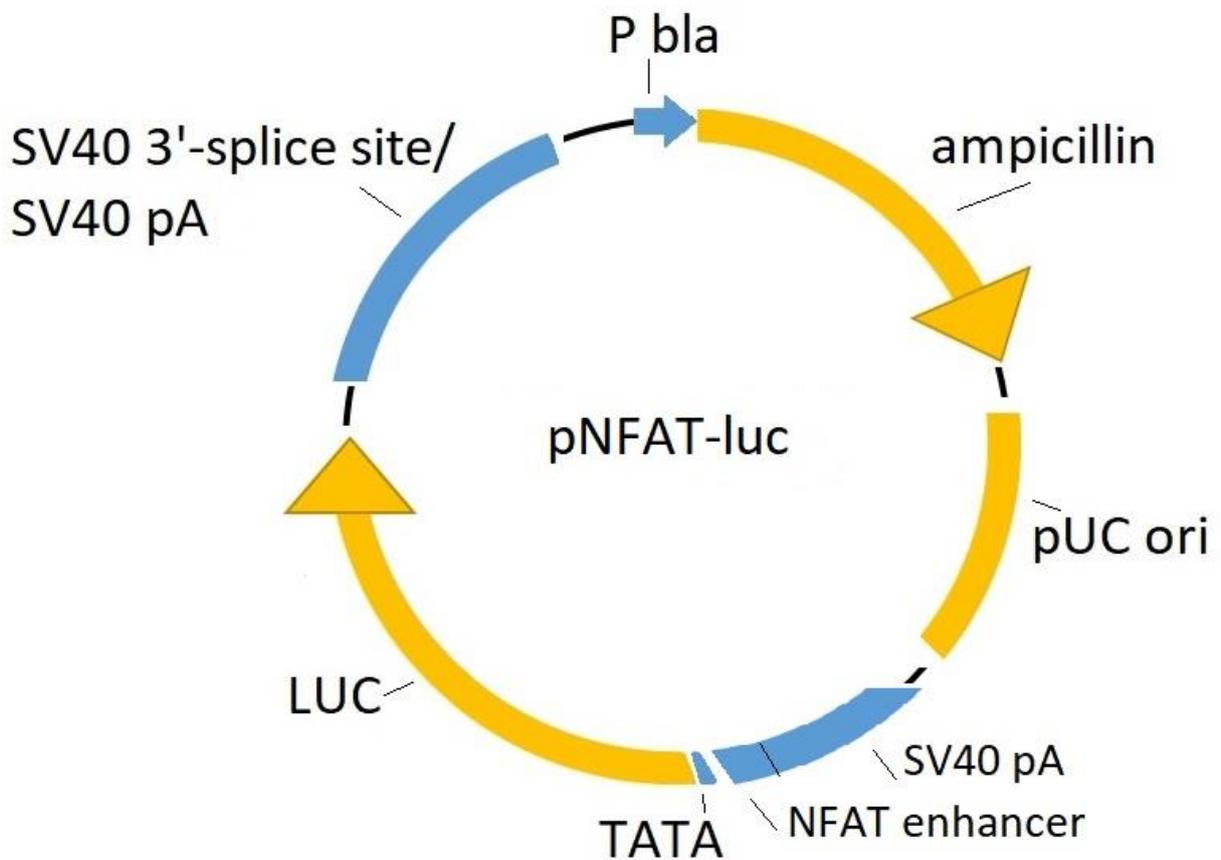


Abb. 19 - Vektorkarte des Plasmids pNFAT-luc (erstellt mit Paint, modifiziert nach der Abbildung: pNFAT-luc vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Quelle: <https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=9326&dsrid=529&id=572>). S. Legende zu Abbildung 18.

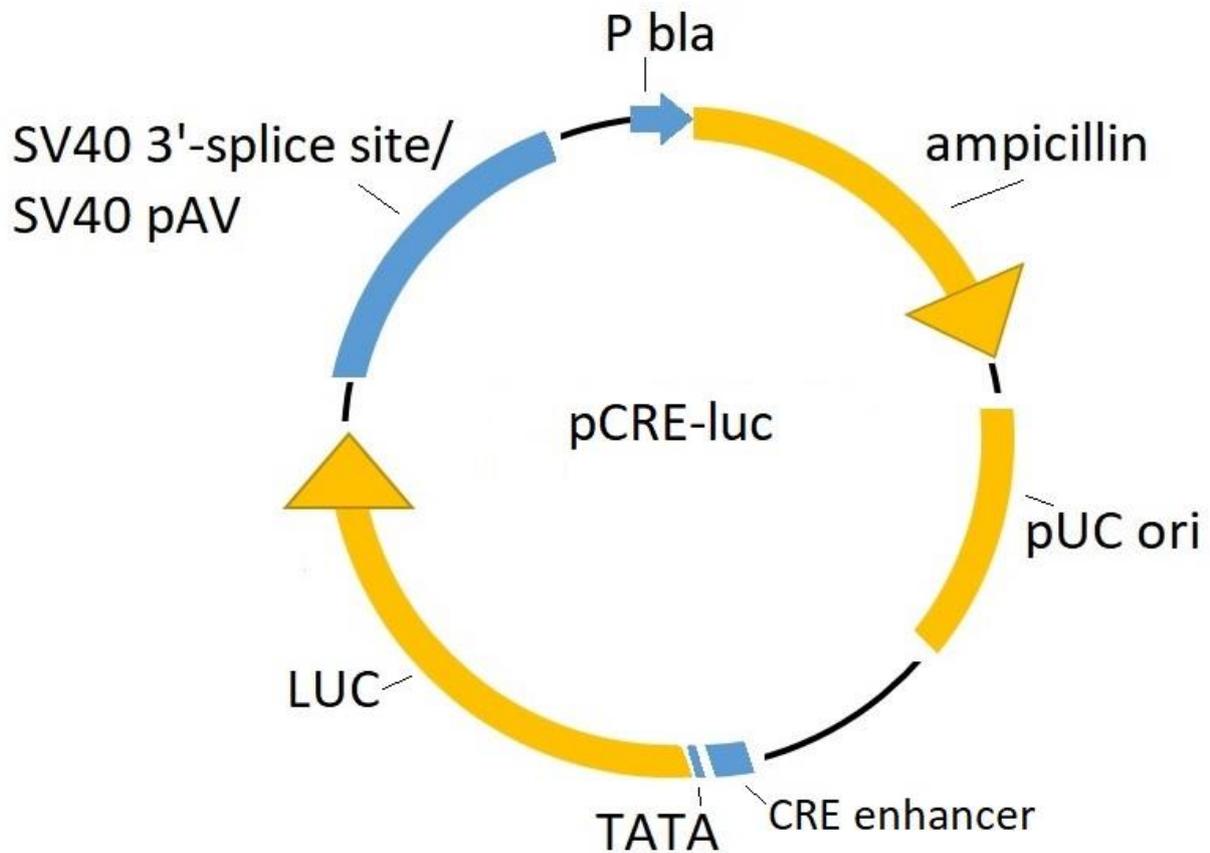


Abb. 20 - Vektorkarte des Plasmids pCRE-luc (erstellt mit Paint, modifiziert nach der Abbildung: pCRE-luc vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Quelle: <https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=1878&dsrid=354&id=2549696>). S. Legende zu Abbildung 18.

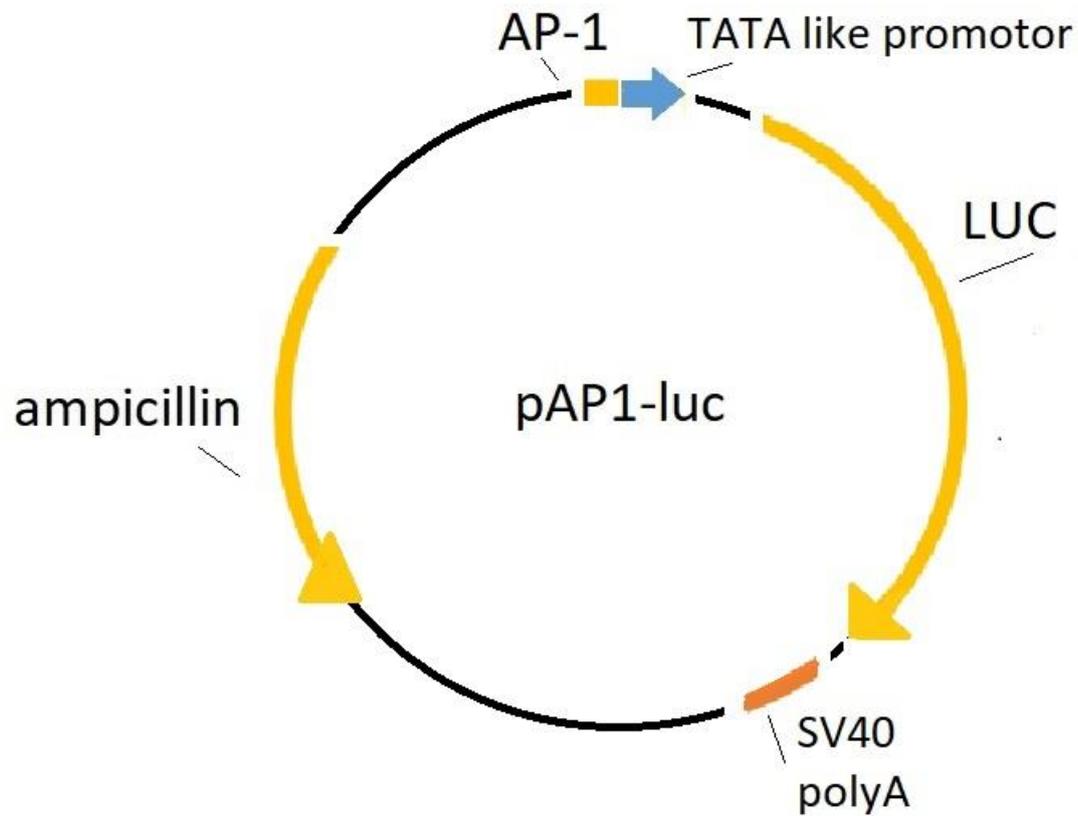


Abb. 21 - Vektorkarte des Plasmids pAP1-luc (erstellt mit Paint, modifiziert nach der Abbildung: pAP1-luc vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Quelle: https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf;jsessionid=RcMFGlMYFi8LQ63S6n7aTrJG_jq6O7X_5eIDeFTW.subs208?dswid=7012&dsrid=165&id=311). S. Legende zu Abbildung 18.

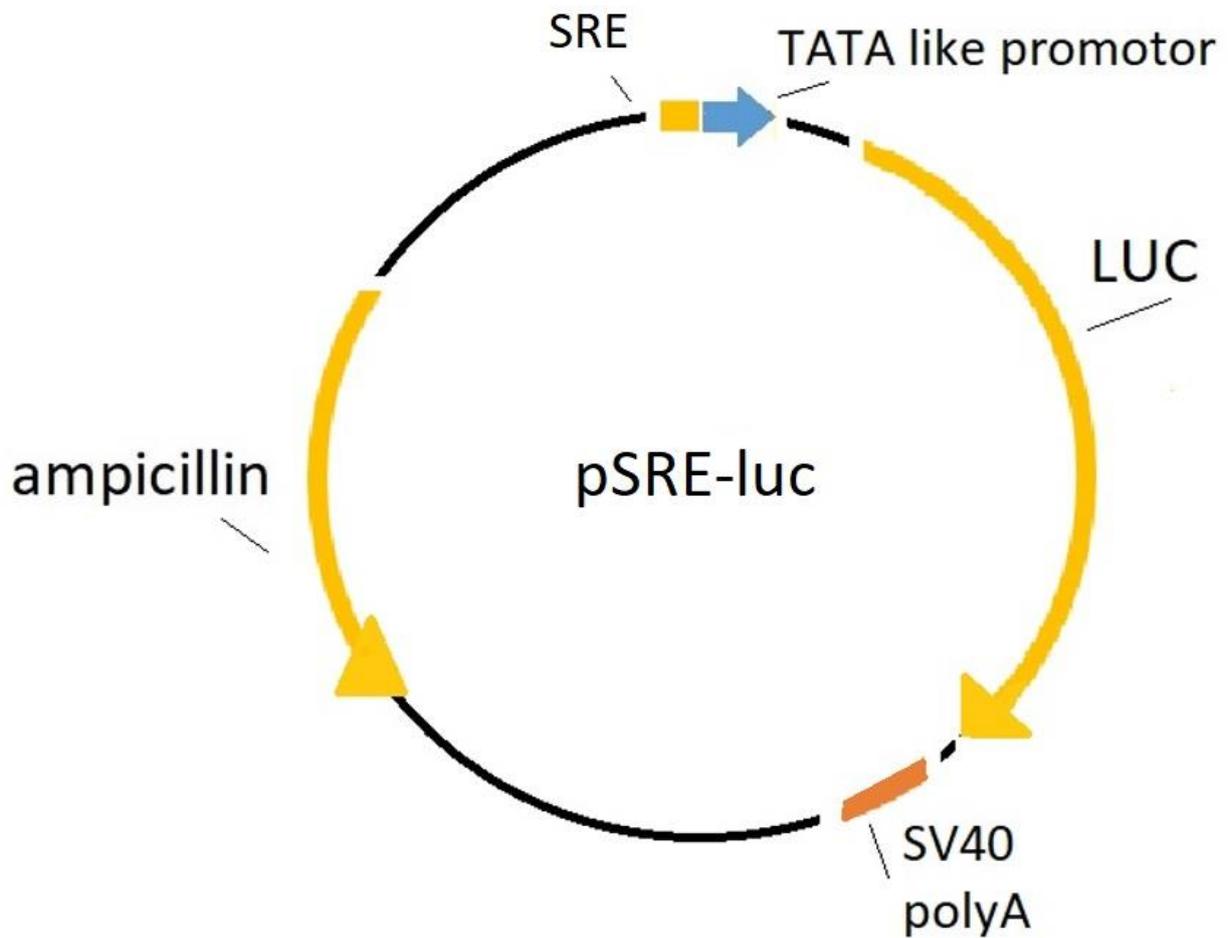


Abb. 22 - Vektorkarte des Plasmids pSRE-luc (erstellt mit Paint, modifiziert nach der Abbildung: pSRE-luc vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Quelle: <https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=9326&dsrid=971&id=336>). S. Legende zu Abbildung 18.

7. Literaturverzeichnis

Agilent Technologies Stratagene Products Division, 2010: PathDetect in Vivo Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems. <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/219073.pdf> (Zugriffsdatum: 21.08.2021)

Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjorn SP, Givskov M, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:2240-2246

Barragán-Iglesias P, Mendoza-Garcés L, Pineda-Farias JB, Solano-Olivares V, Rodríguez-Silverio J, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V, Rocha-González HI. Participation of peripheral P2Y₁, P2Y₆ and P2Y₁₁ receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 128:23-32

Barragán-Iglesias P, Pineda-Farias JB, Cervantes-Durán C, Bravo-Hernández M, Rocha-González HI, Murbartián J, Granados-Soto V. Role of spinal P2Y₆ and P2Y₁₁ receptors in neuropathic pain in rats: possible involvement of glial cells. *Mol Pain* 2014; 10:29

Barriscale KA, O'Sullivan SA, McCarthy TV. A single secreted luciferase-based gene reporter assay. *Anal Biochem* 2014; 453:44-49

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2022: p-AP1-Luc. https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf;jsessionid=RcMFgIMYFi8LQ63S6n7aTrJG_jq6O7X_5eIDeFTW.subs208?dswid=7012&dsrid=165&id=311 (Zugriffsdatum 31.01.2022)

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2022: p-CRE-Luc. <https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=1878&dsrid=354&id=2549696> (Zugriffsdatum 31.01.2022)

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2022: p-NFAT-Luc.
<https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=9326&dsrid=529&id=572>
(Zugriffsdatum 31.01.2022)

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2022: p-SRE-Luc.
<https://zag.bvl.bund.de/vektoren/detail.jsf?dswid=9326&dsrid=971&id=336>
(Zugriffsdatum 31.01.2022)

Butcher AJ, Kong KC, Prihandoko R, Tobin AB. Physiological role of G-protein coupled receptor phosphorylation. *Handb Ecp Pharmacol* 2012;79-94

Certal M, Vinhas A, Pinheiro AR, Ferreirinha F, Barros-Barbosa AR, Silva I, Costa MA, Correia-de-Sá P. Calcium signaling and the novel anti-proliferative effect of the UTP-sensitive P2Y₁₁ receptor in rat cardiac myofibroblasts. *Cell Calcium* 2015; 58:518-533

Chadet S, Ivanes F, Benoist L, Salmon-Gandonnière C, Guibon R, Velge-Roussel F, Babuty D, Baron C, Roger S, Angoulvant D. Hypoxia/Reoxygenation Inhibits P2Y₁₁ Receptor Expression and Its Immunosuppressive Activity in Human Dendritic Cells. *J Immunol* 2015; 195:651-660

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Sciences* 1994; 263:802-805

Cheng Z, Garvin D, Paguio A, Stecha P, Wood K, Fan F. Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* 2010; 4:84-91

Ciruela F, Vallano A, Cuffí ML, Carbonell L, Sánchez S, Arnau JM, Tasca C, Fernández-Dueñas V, Gómez-Soler M. Deciphering G protein-coupled receptor biology with fluorescence-based methods. *Curr Pharm Biotechnol* 2014; 15:962-970

Ciruela F, Vilardaga JP, Fernández-Dueñas V. Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol* 2010; 28:407-415

Combs CA, Shroff H. Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. *Curr Protoc Neurosci* 2017; 79:2.1.1-2.1.25

Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1997; 272:31969-31973.

Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 128:1199-1206

Communi D, Suarez-Huerta N, Dussossoy D, Savi P, Boeynaems JM. Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y₁₁ and SSF1 genes. *J Biol Chem* 2001; 276:16561-16566

Conigrave AD, van der Weyden L, Holt L, Jiang L, Wilson P, Christopherson RI, Morris MB. Extracellular ATP-dependent suppression of proliferation and induction of differentiation of human HL-60 leukemia cells by distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1585-1591

Deriziotis P, Graham SA, Estruch SB, Fisher SE. Investigating protein-protein interactions in live cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Vis Exp* 2014; 26

Dimri S, Basu S, De A. Use of BRET to Study Protein-Protein Interactions In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol* 2016; 1443:57-78

Dinant C, van Royen ME, Vermeulen W, Houtsmuller AB. Fluorescence resonance energy transfer of GFP and YFP by spectral imaging and quantitative acceptor photobleaching. *J Microsc* 2008; 231:97-104

Dreisig K, Kornum BR. A critical look at the function of the P2Y₁₁ receptor. *Purinergic Signal* 2016; 12:427-437

Dressler H, Economides K, Favara S, Wu NN, Pang Z, Polites HG. The CRE luciferase transgenic mouse model for detecting ligand activation of GPCRs. *J Biomol Screen* 2014; 19:232-241

Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G. Hetero-oligomerization of the P2Y₁₁ receptor with the P2Y₁ receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y₁₁ receptor. *Biochem J* 2008; 409:107-116

Erlinge D. P2Y receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 2011; 61:417-43

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

Googlepatens, 2000: Luciferin. <http://patentimages.storage.googleapis.com/EP1339853B1/imgb0002.png> (Zugriffsdatum: 17.07.2016)

He L, Bradrick TD, Karpova TS, Wu X, Fox MH, Fischer R, McNally JG, Knutson JR, Grammer AC, Lipsky PE. Flow cytometric measurement of fluorescence (Förster) resonance energy transfer from cyan fluorescent protein to yellow fluorescent protein using single-laser excitation at 458 nm. *Cytometry A* 2003; 53:39-54

Hedin KE, Bell MP, Huntoon CJ, Karnitz LM, McKean DJ. Gi proteins use a novel beta gamma- and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *J Biol. Chem.* 1999; 274:19992-20001

Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 1996; 6:178-182

Hoffmann K, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y₁₂-receptor. *Biochem Pharmacol* 2008; 76:1201-1213

Howe LR, Marshall CJ. Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1. *J Biol. Chem.* 1993; 268:20717-20720

Inoué S, Tsuji FI. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 1994; 341:277-280

Jacobsen KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, von Kügelgen I, Li B, Miras-Protugal MT, Novak I, Schöneberg T, Perez-Sen R, Thor D, Wu B, Yang Z, Müller CE. Update of P₂Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 2413-2433

Jacobson KA, Jayasekara MP, Costanzi S. Molecular Structure of P₂Y Receptors: Mutagenesis, Modeling, and Chemical Probes. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2012; 12:1

Jacobson KA, Paoletta S, Katritch V, Wu BL, Gao ZG, Zhao Q, Stevens RC, Kieselev E. Nucleotides Acting at P₂Y Receptors: Connecting Structure and Function. *Mol Pharmacol* 2015; 88:220-230

Kato N, Jones J. The split luciferase complementation assay. *Methods Mol Biol* 2010; 655:359-376

Kawano A, Kadomatsu R, Ono M, Kojima S, Tsukimoto M, Sakamoto H. Autocrine Regulation of UVA-Induced IL-6 Production via Release of ATP and Activation of P₂Y Receptors. *PLoS One* 2015; 10(6):e0127919

Kennedy C. P₂Y₁₁ Receptors: Properties, Distribution and Functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 1051:107-122

Lin FT, Miller WE, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 1999; 273:15971-15974

Marteau F, Communi D, Boeynaems J, Suarez Gonzalez N. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *JLB Journal of leukocyte biology* 2004; 76(4):796-803

Meis S, Hamacher A, Hongwiset D, Marzian C, Wiese M, Eckstein N, Royer H, Communi D, Boeynaems J, Hausmann R, Schmalzing G, Kassack M. NF546 [4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylene-carbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene)-carbonylimino))-bis(1,3-xylene- α,α' -diphosphonic Acid) Tetrasodium Salt] Is a Non-Nucleotide P2Y₁₁ Agonist and Stimulates Release of Interleukin-8 from Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332:238-247

Nagakura C, Negishi Y, Tsukimoto M, Itou S, Kondo T, Takeda K, Kojima S. Involvement of P2Y₁₁ receptor in silica nanoparticles 30-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Toxicology* 2014; 322:61-68

Nguyen TD, Meichle S, Kim US, Wong T, Moody MW. P2Y(11), a purinergic receptor acting via cAMP, mediates secretion by pancreatic duct epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G795-804

Oyesanya RA, Greenbaum S, Dang D, Lee Z, Mukherjee A, Wu J, Dent P, Fang X. Differential requirement of the epidermal growth factor receptor for G protein-mediated activation of transcription factors by lysophosphatidic acid. *Mol Cancer* 2010; 9:8

Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y₁ receptor. *Mol Pharmacol* 1998; 54:1118-1123

Park HJ, Begley U, Kong D, Yu H, Yin L, Hillgartner FB, Osborne TF, Galper JB. Role of sterol regulatory element binding proteins in the regulation of Galpha(i2) expression in cultured atrial cells. *Circ. Res.* 2002; 91:32-37

Qi AD, Kennedy C, Harden TK, Nicholas RA. Differential coupling of the human P2Y(11) receptor to the phospholipase C and adenylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 2001; 132(1): 318-326

Qin JJ, Nag S, Wang W, Zhou J, Zhang WD, Wang H, Zhang R. NFAT as cancer target: mission possible? *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846:297-311

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2:409-430

Shaw PE, Schröter H, Nordheim A. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human *c-fos* promoter. *Cell* 1989; 56:563-572

Shenov SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 2003; 375:503-515

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962; 59:223-39

Sigma-Aldrich Co. LLC, 2017: Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/lucassyro?lang=de®ion=DE&gclid=EAlalQobChMIp8_Wk5iR1gIV5wrTCh30zgDHEAAYAAEgJ4c_D_BwE
(Zugriffsdatum 06.09.2017)

Stoddart LA, Johnstone EKM, Wheal AJ, Goulding J, Robers MB, Machleidt T, Wood KV, Hill SJ, Pflieger KDG. Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. *Nat Methods* 2015; 12:661-663

Straßburger J, von Kügelgen I. Analysis of the expression and function of the human P2Y₁₂ receptor tagged with fluorescent-proteins in non-neuronal and neuronal cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2005; 33

Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, Periasamy A. FRET microscopy in 2010: the legacy of Theodor Förster on the 100th anniversary of his birth. *Chemphyschem* 2011; 12:462-474

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996; 36:461-480

Uni Prot (Zusammenarbeit zwischen dem Europäischen Institut für Bioinformatik (EMBL-EBI), dem Schweizerischen Institut für Bioinformatik (SIB) und der Proteininformationsressource (PIR)), 27.05.2002: UniProtKB – Q96G91 (P2Y₁₁_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96G91> (Zugriffdatum: 21.07.2016)

Van der Weyden L, Adams DJ, Luttrell BM, Conigrave AD, Morris MB. Pharmacological characterisation of the P2Y₁₁ receptor in stably transfected haematological cell lines. *Mol Cell Biochem* 2000a; 213:75-81

Van Der Weyden L, Adams DJ, Morris BJ. Capacity for purinergic control of renin promoter via P2Y(11) receptor and cAMP pathways. *Hypertension* 2000b; 36:1093-1098

Van der Weyden L, Conigrave AD, Morris MB. Signal transduction and white cell maturation via extracellular ATP and the P2Y₁₁ receptor. *Immunol Cell Biol* 2000c; 78:369-374

Vaughan KR, Stockes L, Prince LR, Marriott HM, Meis S, Kassack MU, Bingle CD, Sabroe I, Surprenant A, Whyte MKB. Inhibition of Neutrophil Apoptosis by ATP Is Mediated by the P₂Y₁₁ Receptor. *J Immunol* 2007; 179:8544-8553

Von Kügelgen I, Hoffman K. Pharmacology and structure of P₂Y receptors. *Neuropharmacology* 2016; 104:50-61

Von Kügelgen I. Molecular pharmacology of P₂Y receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 2021; 187: 114361

Von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P₂Y-receptor subtypes, *Pharmacol Ther* 2006; 110:415-432

Yun C, Dasgupta R. Luciferase reporter assay in *Drosophila* and mammalian tissue culture cells. *Curr Protoc Chem Biol.* 2014; 6:7-23

Zambon AC, Brunton LL, Barrett KE, Hughes RJ, Torres B, Insel PA. Cloning, expression, signaling mechanism, and membrane targeting of P₂Y(11) receptors in Madin Darby canine kidney cells. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 26-35

Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, Crane S, Wang J, Paoletta S, Yi C, Ma L, Zhang W, Han GW, Liu H, Cherezov V, Katritch V, Jiang H, Stevens RC, Jacobsen KA, Zhao Q, Wu B. Two disparate ligand binding sites in the human P₂Y₁ receptor. *Nature* 2015; 520(7547): 317-321

Zhang K, Zhang J, Gao ZG, Zhang D, Zhu L, Han GW, Moss SM, Paoletta S, Kiselev E, Lu W, Fenalti G, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobsen KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q. Structure of the human P₂Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 2014; 509(7498): 115-118