

Untersuchung der Steuerung der Expression des humanen P2Y₁₂-Rezeptors mittels Mutagenese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Judith Leyens

aus Siegburg

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ivar Constantin von Kügelgen
2. Gutachter: Prof. Dr. Jens Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 28.12.2023

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	10
1.1 P2Y-Rezeptoren	11
1.2 Aufbau und Struktur des P2Y ₁₂ -Rezeptors und bedeutsame Aminosäuren	13
1.3 Physiologie des G _i -gekoppelten P2Y ₁₂ -Rezeptors	14
1.4 Desensitivierung und Recycling des P2Y ₁₂ -Rezeptors	24
1.5 Bekannte klinisch relevante P2Y ₁₂ -Rezeptormutationen	27
1.6 Auswahl der untersuchten Mutationen	31
1.7 Zielsetzung	33
2 Material und Methoden	35
2.1 Molekularbiologie	35
2.1.1 PCR	35
2.1.2 Mutagene PCR	35
2.1.3 DNA-Nachweisverfahren: Agarose-Gelelektrophorese	35
2.1.4 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach PCR	36
2.1.5 Auswertung	36
2.1.6 Isolation von DNA aus Agarosegel	36
2.1.7 Klonierung	37
2.1.8 Transformation an E. coli	37
2.1.9 Amplifikation von E. coli	38
2.1.10 Plasmidpräparation	38
2.1.11 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach Plasmidpräparation	38

2.1.12 Einsatz von Restriktionsenzymen	38
2.2 Zellkultur	39
2.2.1 Kultur von CHO-Zellen	39
2.2.2 Vereinzeln von CHO-Zellen	39
2.2.3 Kryokonservierung	40
2.2.4 Transfektion	40
2.2.5 Transfektion mit Invitrogen™ Lipofectamin™ 2000 Transfection Reagent	40
2.2.6 Transfektion nach FlpIn-System	41
2.3 Fluoreszenzmikroskopie	41
2.3.1 Vorbereitung zur Mikroskopie	42
2.3.2 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie	42
2.3.3 Statistische Auswertung	43
3 Ergebnisse	44
3.1 Molekularbiologie	44
3.1.1 Mutagene PCR	44
3.1.2 DNA-Nachweisverfahren – Agarose-Gelelektrophorese	44
3.1.3 Klonierung und Plasmidpräparation	45
3.2 Zellkultur	46
3.2.1 Transfektion	46
3.3 Fluoreszenzmikroskopie – Abbildungen	47
3.4 Fluoreszenzmikroskopie – Statistische Auswertung	59
3.4.1 CFP	59
3.4.2 GFP	68

3.4.3 YFP	74
4. Diskussion	86
4.1 Molekularbiologie	86
4.2 Laserscanningmikroskopie	87
4.3 Vergleich der Rezeptorvarianten	88
4.4 Fazit	91
5. Zusammenfassung	93
6. Literaturverzeichnis	95
7. Anhang	105
8. Abbildungsverzeichnis	116
9. Tabellenverzeichnis	119
10. Danksagung	120
11. Lebenslauf	121

Abkürzungsverzeichnis

2MeSADP/ATP	2-Methyl-Thio-ADP/ATP
[³ H]PSB-0413	[³ H]2-Propylthioadenosin-5'-Adenylsäure
5Br-UTP	5-Bromo-UTP
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
ADPβS	Adenosin-5'-O-(2-Thiodiphosphat)
ANOVA	„Analysis of Variance“ = einfaktorielle Varianzanalyse
AP ₃ A	Diadenosintriphosphat
AP ₄ A	Diadenosintetraphosphat
ARC67085	5'-O-[[[Dichlor(phosphono)methyl](hydroxy)phosphoryl]-oxy](hydroxy)phosphoryl]-2-(propylsulfanyl)adenosin
ARF6	ADP-Ribosylierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
ATPγS	Adenosin 5'-(3-Thiotriphosphat)
AZD1283	Ethyl 6-(4-((Benzylsulphonyl)carbamoyl)piperidin-1-yl)-5-Cyano-2-Methylnicotinat
BzATP	3'-O-(4-Benzoyl)Benzoyl-ATP
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	Chemokine ligand
CCP	Clathrin-coated pit (deutsch: clathrin-umhüllte Vertiefung)
CFP/ECFP	Cyan Fluoreszierendes Protein/ enhanced CFP
CHO	Chinesische Hamster-Ovarialzellen
DAG	Diacylglycerin
DGK	Diacylglycerolkinase
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Extracellular Loop (deutsch: extrazelluläre Schleife)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
G _i /G _s /G _q	inhibierendes/stimulierendes/Phospholipase C-aktivierendes G-Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein
GIT	Gastrointestinaltrakt
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes-Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hP2Y	Humaner purinergisch signalisierender Rezeptor
INS37217	2'-Desoxycytidin(5')Tetraphospho(5')Uridin (=Denufosol)
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
K ⁺	Kalium
kb	Kilobasen
LSM	Laserscanningmikroskop
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
MRS2179	N ⁶ -Methyladenosin-3',5'-Bisphosphat
MRS2210	6-(2'-Chloro-Phenylazo)-Pyridoxal-α(5)-Phosphat
MRS2279	2-Chloro-N ⁶ -methyl-(N)-methanocarpa-2'-Deoxyadenosin- 3',5'-Bisphosphat
MRS2365	(N)-Methanocarpa-2MeSADP
MRS2500	2-Iodo-N ⁶ -Methyl-(N)-Methanocarpa-2'-Deoxyadenosin- 3',5'-Bisphosphat
MRS2578	N,N'-1,4-Butanediylbis(N'-(3-Isothiocyanatophenyl)Thiourea)
MRS2690	Diphosphorsäure-1-α-D-Glucopyranosylester- 2-[(4'-Methylthio)Uridin-5''-yl]-Ester

MRS2693	5-Iodo-UDP
MRS2698	2'-Amino-2-Thio-UTP
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NAADP ⁺	Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat
NF023	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylen-carbonylimino))bis-(1,3,5-naphthalen-Trisulfonsäure)
NF340	4,4'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methyl-phenylene)-Carbonylimino))bis(naphthalen-2,6-Disulfonsäure)
NF546	4,4'-(Carbonylbis(lmino-3,1-Phenylen-Carbonylimino-3,1-(4-methyl-Phenylen)-Carbonylimino))-bis(1,3-Xylen- α,α' -Diphosphorsäure)
Nm23-H1	= Nukleosiddisphosphatkinase A
P2Y ₁₂ – D121N	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Aspartat121 gegen Asparagin
P2Y ₁₂ – His187Gln	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Histidin187 gegen Glutamin
P2Y ₁₂ – P341A	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Prolin341 gegen Alanin
P2Y ₁₂ – Phe79Ala	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Phenylalanin 79 gegen Alanin
P2Y ₁₂ – R122C	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Arginin122 gegen Cystein
P2Y ₁₂ – R122H	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Arginin122 gegen Histidin
PAR	Protease activated Receptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	Postsynaptic density 95kDa protein/Drosophila discs large protein/zonula occludens-1 protein
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPADS	Pyridoxal-5'-Phosphat-6-Azophenyl-2,4-Disulfonat
PP _i	Diphosphat
PSB0474	3-Phenacyl-UDP-Dinatriumsalz
PSB416	1-Amino-4-(4-Methoxyanilino)-9,10-Dioxoanthracene-

	2-Sulfonsäure
RLU	Relative Luminometer Units
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
rpm	„Revolutions per minute“ (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
SEM	Standard error of mean (deutsch: Standardfehler des Mittelwertes)
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TM	Transmembrandomäne
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UTP γ S	Uridin-5'-O-(3- Thiotriphosphat)
V207A	P2Y ₁₂ -Rezeptor mit Austausch Valin207 gegen Alanin
V/mV	Volt/Millivolt
YFP	Yellow (deutsch: gelb) fluoreszierendes Protein

1 Einleitung

Der hP2Y₁₂-Rezeptor gehört zur Familie der humanen purinergisch signalisierenden (hP2Y)- Rezeptoren . Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind eine der bedeutendsten Proteingruppen des menschlichen Organismus und wichtigsten Angriffspunkte moderner Pharmakologie. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vereinen charakteristische Gemeinsamkeiten; sie bestehen aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazelluläre Ligandenbindung löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die, je nach G-Protein, in einer Stimulation der Phospholipase C (G_q) mit Rekrutierung der second messenger Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃), oder alternativ Stimulation der Adenylatcyclase (G_s) mit Erhöhung des intrazellulären second messengers cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), oder zur Inhibierung der Adenylatcyclase (G_i) mit Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels resultiert (Hilger et al., 2018; Voet und Voet, 2004). P2Y-Rezeptoren werden durch die extrazelluläre Ligandenbindung eines Nukleotids definiert (von Kügelgen, 2019).

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist ein G_i-Rezeptor mit dem physiologischen endogenen Agonisten Adenosindiphosphat (ADP). Ursprünglich vereinfacht nach seinem Substrat P2Y_{ADP} benannt, wurde der Rezeptor erst im Jahr 2001 molekular identifiziert (Hollopeter et al., 2001), obwohl bereits seit den 1990er Jahren mit Ticlopidin und Clopidogrel Arzneimittel zugelassen sind, die, wie man heute weiß, antagonistisch am P2Y₁₂-Rezeptor wirken. Gleichzeitig wurde auch die erste krankheitsverursachende Mutation bei einem bereits 1995 beschriebenen Patienten (Nurden et al., 1995) mit milder Blutungsneigung aufgeklärt, und damit der Grundstein für folgende Mutagenese-, Expressions- und Funktionsstudien am P2Y₁₂-Rezeptor gelegt.

Die Technik der Kristallstrukturanalyse hat es seit Beginn des neuen Jahrtausends ermöglicht, verschiedene G-Proteine mit und ohne Ligandenbindung und ihre damit einhergehende Konformationsänderung darzustellen. Dies ermöglicht die Identifizierung funktionell essentieller Strukturen der Rezeptoren, und somit die Entwicklung neuer pharmakologisch wirksamer Substrate. Erst vor wenigen Jahren gelang schließlich die

Identifizierung der Kristallstruktur des P2Y₁₂-Rezeptors in Bindung mit 2MeSADP, einem hochpotenten Agonisten; 2MeSATP, einem partiellen Agonisten, sowie dem nicht-nukleotidischen, hochpotenten Antagonisten AZD1283 (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b). Hierdurch konnten, verglichen mit den zuvor bestehenden zwei- und dreidimensionalen Modellen des Rezeptors, bereits bestehende Vermutungen über die Rolle einzelner Aminosäuren und Rezeptordomänen teilweise bestätigt, sowie zusätzlich neue Erkenntnisse gewonnen werden.

Durch seine kritische Rolle bei der Thrombozytenaggregation, und dem eindrucksvollen klinischen, wie auch wirtschaftlichen Erfolg der P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten, hat der P2Y₁₂-Rezeptor nach wie vor eine große Relevanz in Forschung und klinischem Alltag. Das Wissen um die funktionelle Rolle einzelner Aminosäuren und ihrer Beteiligung in der Rezeptorkonformation und Ligandenbindung ist daher essentiell, um weitere Pharmazeutika zu entwickeln, und interindividuelle Unterschiede der Wirkung an Patienten nachvollziehen zu können. Durch Mutagenesestudien konnten in der Vergangenheit bereits einige funktionell relevante Positionen und Aminosäuren des P2Y₁₂-Rezeptors lokalisiert werden (Jacobson et al., 2020a, 2015b). Zusätzlich liefert die Identifikation von Patienten mit P2Y₁₂-Rezeptormutationen wertvolle Hinweise zur Rolle einzelner relevanter Regionen des Rezeptors.

1.1 P2Y-Rezeptoren

Bislang wurden acht P2Y-Rezeptoren in Säugetieren identifiziert: P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} (siehe Tabelle 1). Alle P2Y-Rezeptoren gehören zur größten Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der Familie der Rhodopsin-ähnlichen Gruppe A (Fredriksson et al., 2003). Weiterhin können die P2Y-Rezeptoren nach ihrem jeweiligen Agonisten in vier Subgruppen unterteilt werden: die Gruppe der durch Adeninnukleotide (P2Y_{1,11,12,13}), Pyrimidinnukleotide (P2Y_{4,6}), ATP/UTP-aktivierte (P2Y₂), und UDP-Glukosederivate-aktivierte P2Y-Rezeptoren (P2Y₁₄). Die Rezeptoren unterscheiden sich teilweise stark in ihren Aminosäuresequenzen und können phylogenetisch in mindestens zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden (P2Y_{1,2,4,6,11} und P2Y₁₂₋₁₄). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte P2Y₁₂-Rezeptor ist hoch konserviert und entwickelte sich vermutlich bereits vor über 450 Millionen Jahren in Wirbeltieren (Schöneberg et al., 2007).

Der physiologische Hauptagonist des P2Y₁₂-Rezeptors ist das Purinnukleotid ADP. Es wurden viele Substanzen verschiedener chemischer Klassen mit mehr oder weniger starker antagonistischer Wirkung am P2Y₁₂-Rezeptor entdeckt, unter anderem Harnstoff, Sulfonamide, Anthrachinone, und Dinukleotide (Paoletta et al., 2015). Eine gekürzte Übersicht bietet Tabelle 1. Es gibt außerdem mehrere klinisch eingesetzte P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten, die sich in ihrem Wirkmechanismus hinsichtlich der Form des Antagonismus (kompetitiv/nicht-kompetitiv), des Metabolismus (direkt/indirekt), und der Dauer der Wirkung (reversibel/irreversibel) unterscheiden.

Das P2Y₁₂-Gen befindet sich auf Chromosom 3q21-3q25. Es beinhaltet 47 kb, drei Exons, und keine Introns. Der kodierende Rezeptor besteht aus 342 Aminosäuren. Es sind verschiedene genetische Polymorphismen bekannt, deren Rolle teilweise weiterhin kontrovers diskutiert wird. Eine Reihe bekannter Polymorphismen wurden als sogenannte H1- und H2-Haplotypen definiert (Fontana et al., 2003a). Der H1-Haplotyp, der in etwa 86% vorliegt, gilt als der Major-Haplotyp. Er wird charakterisiert durch das Vorhandensein der Basen Cytosin (C) auf Position 139, Thymin (T) auf Position 744, das Fehlen des inserierten Nukleotids Adenin (A) auf Position 801, sowie dem Vorhandensein eines Guanin (G) auf Position 52 im Exon 2. Der H2-Haplotyp, der nur in etwa 14% vorkommt und daher den Minor-Haplotyp darstellt, wird charakterisiert durch ein T auf Position 139, ein C auf Position 744 das Vorhandensein eines inserierten A auf Position 801 (i-ins801A), sowie einem T auf Position 52 des Exon 2. Die klinische Relevanz des H2-Haplotypen wurde bereits kurz nach seiner Beschreibung kontrovers diskutiert. Fontana et al. (Fontana et al., 2003a) konnten eine verstärkte maximale Thrombozytenaggregation bei Stimulation mit ADP bei Probanden mit H2-Haplotyp feststellen. Als Begründung für diese Ergebnisse wurde erwogen, dass einer der Polymorphismen möglicherweise eine verstärkte Transkription, und damit eine erhöhte Anzahl exprimierter Rezeptoren an der Zellmembran bewirkt. Als mögliche klinische Auswirkung wurde eine potenzielle Thromboseneigung vermutet, sowie in einer Folgestudie ein erhöhtes Vorkommen von Atherosklerose beschrieben (Fontana et al., 2003b). Eine Metastudie von Priyadharsini et al. (Priyadharsini et al., 2017) verdeutlichte die nach wie vor kontroverse Diskussion über den Zusammenhang des H2-Haplotypen mit dem Vorhandensein einer Atherosklerose oder koronarer Herzerkrankung.

1.2 Aufbau und Struktur des P2Y₁₂-Rezeptors und bedeutsame Aminosäuren

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist ein Gi-Protein-gekoppelter Rezeptor und besteht aus sieben Transmembrandomänen. Der N-Terminus des Rezeptors liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Durch extrazelluläre Bindung des Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung, die die intrazelluläre Bindung eines heterotrimeren G-Proteins ermöglicht, worüber weitere Signalkaskaden aktiviert werden. Das intrazellulär gebundene heterotrimere G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α , β , γ). Die G α -Untereinheit bindet GDP und GTP. Die extrazelluläre Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt zum Austausch des im Ruhezustand gebundenen GDP zu GTP, was zur Dissoziation der G α -Untereinheit von der G $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Der so entstandene G α -GTP-Komplex vermittelt weitere intrazelluläre Signaltransduktionswege, zum Beispiel die Hemmung der Adenylatzyklase. Zusätzlich kann auch der verbliebene G $\beta\gamma$ -Komplex eigenständig weitere Signalwege aktivieren, unter anderem die Phospholipase C, Isoformen der Adenylatzyklase, sowie verschiedene Ionenkanäle. GTP hydrolysiert langsam durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G α -Untereinheit zu GDP und P_i, wird so inaktiviert und bildet erneut einen Komplex mit der G $\beta\gamma$ -Untereinheit (Rassow et al., 2012; Voet und Voet, 2004).

Der P2Y₁₂-Rezeptor kann sowohl als Monomer, als auch als Dimer, Trimer, oder Oligomer vorliegen (Savi et al., 2006). Zhang et al. konnten im Jahr 2014 die Röntgenkristallstruktur des P2Y₁₂-Rezeptors in Agonisten- (2MeSADP) sowie in Antagonisten- gebundener Form aufdecken (Zhang et al., 2014a; Zhang et al., 2014b). Hierdurch konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, die den P2Y₁₂-Rezeptor von anderen verwandten G-Protein-Rezeptoren und insbesondere P2Y-Rezeptoren unterscheiden. Eine Besonderheit des P2Y₁₂-Rezeptors betrifft die Ausbildung der in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vom Typ A hochkonservierten Disulfidbrücken (vergleiche Abbildung 1) zwischen dem N-Terminus und extracellular loop (EL; deutsch: extrazelluläre Schleife) 3, sowie zwischen Transmembrandomäne (TM) 3 und EL2 (Ding, 2003; Hoffmann et al., 1999). Die erstgenannte ist sowohl in Bindung mit einem Agonisten als auch mit einem Antagonisten sichtbar, die letztgenannte hingegen ist lediglich in Bindung eines Agonisten ausgebildet. Bei Bindung des Antagonisten hingegen ändert sich die Rezeptorkonformation, und entgegen aller Erwartungen wird diese Disulfidbrücke nicht länger ausgebildet. Ein weiteres besonderes Merkmal im Vergleich zu anderen G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren der Klasse A ist die auffallend gerade Ausrichtung der TM5 bei Bindung eines Antagonisten. Die Ligandenbindungsstellen selbst, sowohl des Agonisten als auch des Antagonisten bestehen aus einer Bifurkation mit zwei Bindungstaschen: die erste Tasche wird von TM₃₋₇, die zweite von TM_{1-3,7} gebildet. Die Rezeptorkonformation ändert sich insgesamt deutlich, je nachdem, ob ein Agonist oder Antagonist gebunden wird. Der größte Unterschied wird in TM6 und TM7 beobachtet, die sich nach Bindung eines Agonisten verformen und so die Bindungsstelle verschließen (Paoletta et al., 2015). Diese Beobachtungen bestätigten die bereits zuvor durch Mutagenesestudien vermutete Relevanz von polaren Resten und basischen Aminosäuren in TM6 und TM7 als wesentliche Bindungsstelle der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotidliganden (Hoffmann et al., 2008). Durch Mutagenesestudien wurde die Relevanz und Funktion weiterer Aminosäuren untersucht, eine Übersicht bieten Abbildung 1 und Tabelle 2.

1.3 Physiologie des G_i-gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptors

Im Folgenden sollen zunächst die Funktionen und Signalwege des P2Y₁₂-Rezeptors unter physiologischen Normalbedingungen demonstriert werden, um anschließend den Effekt verschiedener Mutationen beurteilen zu können.

Der P2Y₁₂ Rezeptor ist ein wesentlicher Akteur bei der Thrombozytenaggregation. Er handelt dabei nicht alleine, sondern symbiotisch mit dem P2Y₁-Rezeptor; vereinfacht ausgedrückt initiiert P2Y₁, ein G_q-Rezeptor, die Formveränderung der Thrombozyten, und P2Y₁₂, ein G_i-Rezeptor, hält diese aufrecht (Hardy, 2004; Leon et al., 2003). Beide Rezeptoren reagieren unter anderem auf ADP als endogenen Agonisten (Zhao et al., 2022). Der P2Y₁-Rezeptor stimuliert u.a. die Phospholipase C, p160Rho-Kinase, und Src-Kinase (Hardy et al., 2005). Durch Stimulation der Phospholipase C, wird die Hydrolyse von PIP₂ in DAG und IP₃ katalysiert. IP₃ bindet an Calciumkanäle des endoplasmatischen Retikulums, und erhöht die zytosolische Calciumkonzentration. DAG aktiviert die zytosolische Proteinkinase C, die als Serin-/Threoninkinase verschiedene Prozesse der Zelle über Phosphorylierung reguliert. Da Calcium ebenfalls ein Stimulans der PKC ist, wird sowohl über IP₃ als auch DAG eine Aktivierung der PKC verursacht (Paredes-Gamero et al., 2006).

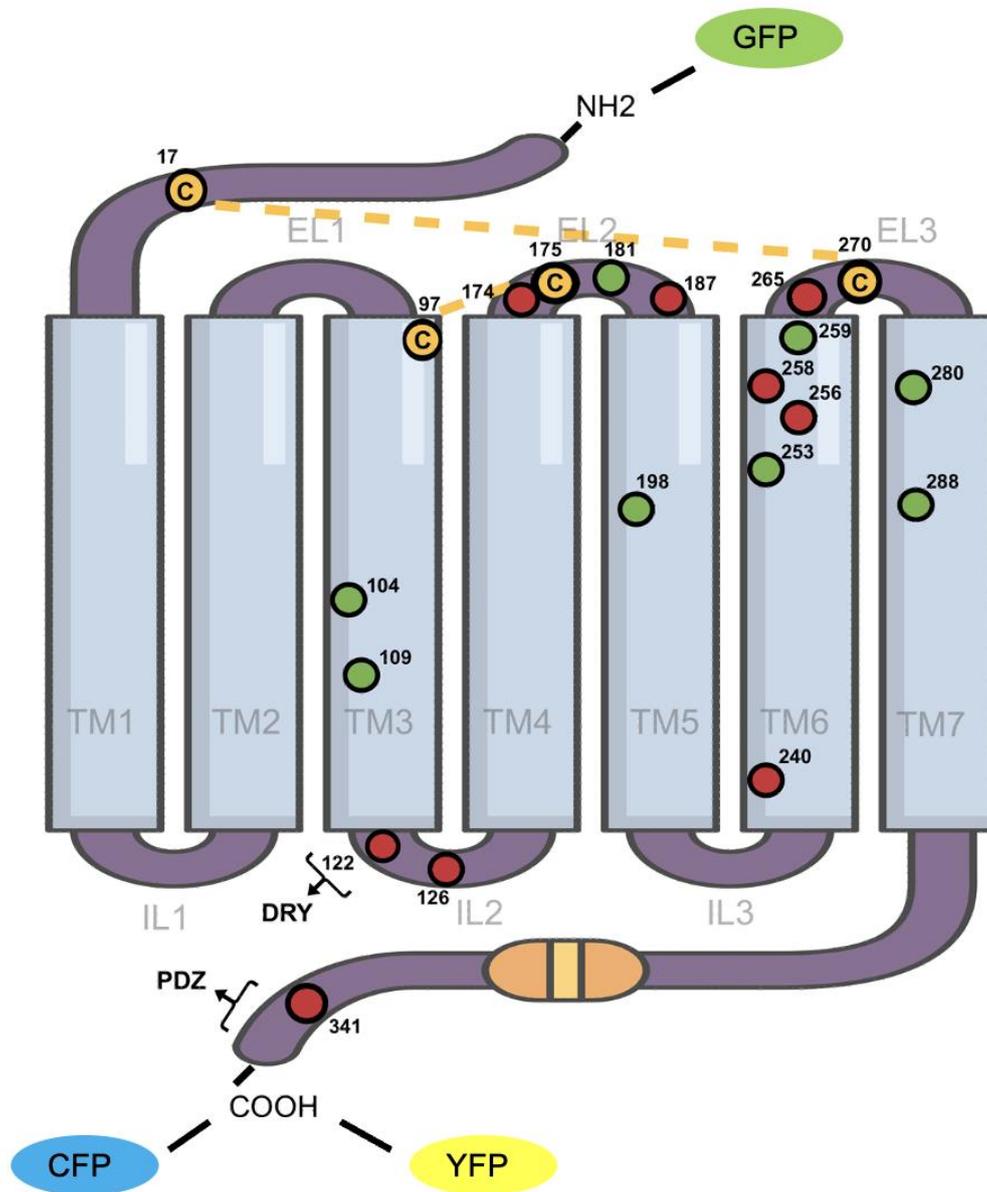


Abb. 1: Sekundärstruktur des P2Y₁₂-Rezeptors mit typischem Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

Gelb dargestellt sind Disulfidbrücken zwischen Cystein-Aminosäuren; Rot dargestellt sind die Positionen der in 1.5. beschriebenen bekannten klinischen Mutationen; Grün dargestellt sind die Positionen der in 1.2 sowie Tabelle 2 beschriebenen bisherigen durch Mutagenesestudien untersuchte Aminosäuren.

Tab. 1: Übersicht über die bislang identifizierten, humanen purinergisch signalisierenden (hP2Y)-Rezeptoren, modifiziert nach (Abbraccio et al., 2006; von Kügelgen, 2006; von Kügelgen und Harden, 2011).

Kursiv dargestellt sind die für den jeweiligen Rezeptor selektiven Liganden, **fett** dargestellt sind die physiologisch wirksamen Liganden.

Rezeptor	Signaltransduktion	Agonist (Auswahl)	Antagonist (Auswahl)	Distribution (Auswahl)
hP2Y₁	G _q	<i>MRS2365</i> >2MeSADP> ADP =ADPβS=2MeSATP= ATPγS>ATP	Adenosin-3',5'- Bisphosphat, <i>MRS2179</i> , Suramin, PPADS, Reactive Blue 2, NF023, <i>MRS2210</i> , <i>MRS2279</i> , <i>MRS2500</i>	weit verbreitet; u.a. Gehirn, Prostata, Plazenta, Thrombozyten, glatte Muskulatur, Endothel
hP2Y₂	G _q	UTP > <i>MRS2698</i> ≥ATP> <i>INS37217</i> >Ap4A>ATPγS	Suramin, Reactive Blue 2, PSB416	weit verbreitet; u.a. Lunge, Herz, Skelettmuskel, Milz, Niere, Knochenmark, Lymphozyten, Makrophagen
hP2Y₄	G _q , N-Typ Ca ²⁺ - Kanal, M-Typ K ⁺ - Kanal	UTP >UTPγS	ATP, PPADS, Reactive Blue 2	GIT, Gehirn, Hypophyse; Knochenmark, Monozyten, Lymphozyten, Leber
hP2Y₆	G _q	<i>MRS2693</i> > <i>PSB0474</i> > UDP = 5Br-UTP>UTP>>ATP	Reactive Blue 2, PPADS, Suramin, <i>MRS2578</i>	weit verbreitet; Plazenta, Thymus, Milz, Niere, Gefäßmuskulatur, Lunge, GIT, Knochen, Fett, Gehirn
hP2Y₁₁	G _q > G _s	ATPγS=BzATP> <i>NF546</i> > <i>ARC67085</i> > ATP ; NAD ⁺ , NAADP ⁺	ADP, Suramin, <i>NF340</i>	Milz, Leber, GIT, Gehirn, Hypophyse, B- Lymphozyten, Dendritische Zellen

Rezeptor	Signaltransduktion	Agonist (Auswahl)	Antagonist (Auswahl)	Distribution (Auswahl)
hP2Y ₁₂	G _i	2MeSADP> ADP >ATP, 2MeSATP	Suramin, Reactive Blue 2, <i>PSB0739</i> , ATP, AZD1283; Clopidogrel, Prasugrel, Ticlopidin, Cangrelor, Ticagrelor	Megakaryozyten, Thrombozyten, Mikroglia
hP2Y ₁₃	G _i	ADP =2MeSADP>ADPβS, AP ₃ A, ATP, 2MeSATP	Suramin, Reactive Blue 2, PPADS, Cangrelor	Milz, Knochenmark, Leukozyten, Gehirn, Leber, Pankreas, Herz
hP2Y ₁₄	G _i	α,β-Methylen-2-Thio- UDP>MRS2690> UDP > UDP-Glucose	(UDP)	weit verbreitet; Plazenta, Milz, Knochenmark, Thymus, GIT, Fett, Gehirn, Gliazellen, Lymphozyten, Neutrophile, Megakaryozyten

Tab. 2: Übersicht der bei bisherigen Mutagenesestudien am P2Y₁₂-Rezeptor untersuchten Aminosäuren.

Untersuchte Aminosäure	Ergebnisse	Quelle
Phe104 (TM3)	Substitution mit der ungeladenen Aminosäure Serin führt zur fünffach erhöhten Bindungsaffinität für ADP; möglicherweise ähnelt die Bindungsstelle so der des P2Y ₁ -Rezeptors	(Mao et al., 2010)
Tyr109 (TM3)	Substitution mit der ungeladenen Aminosäure Serin reduziert Rezeptorfunktion um 80%.	(Mao et al., 2010)
Glu181 (EL2)	Substitution mit einer hydrophoben Aminosäure reduziert Rezeptorfunktion; Substitution mit hydrophiler Aminosäure ohne wesentliche Änderung; Hydrophile Aminosäure an Position 181 ebnet vermutlich Weg des Liganden in korrekte Bindungsstelle.	(Ignatovica et al., 2012)
Phe198 (TM5)	Substitution mit der ungeladenen Aminosäure Prolin reduziert die Rezeptorfunktion um 45%.	(Mao et al., 2010)
His253 (TM6)	Substitution mit der ungeladenen Aminosäure Serin reduziert die Affinität zu ADP, aber insgesamt gute Rezeptorfunktion.	(Hoffmann et al., 2008; Mao et al., 2010)
Arg256 (TM6)	Substitution mit Threonin ohne Effekt, Substitution mit Glutamin mit leicht reduzierter Funktion. Substitution mit Lysin, Alanin und Asparaginsäure reduziert Funktion. Arg256 ist essentiell zur Identifikation des Agonisten und Interaktion mit den negativ geladenen Nukleotiden.	(Hoffmann et al., 2008; Ignatovica et al., 2012; Mao et al., 2010)
Arg265 (EL3)	Substitution mit neutraler Aminosäure führt zur Funktionseinschränkung, mit saurer Aminosäure zu starker Funktionseinschränkung, Substitution mit strukturell ähnlicher Aminosäure Lysin ähnliche Funktion. Wichtig für Interaktion mit negativ geladenen Nukleotiden bzw. Stabilisation der notwendigen Konformationsänderung für Antagonistenbindung.	(Hoffmann et al., 2008; Ignatovica et al., 2012; Mao et al., 2010)

Untersuchte Aminosäure	Ergebnisse	Quelle
Tyr259 (TM6)	Bei Substitution mit Alanin oder Aspartat kompletter Funktionsverlust.	(Hoffmann et al., 2008)
Lys280 (TM7)	Bei Substitution kompletter Funktionsverlust.	(Hoffmann et al., 2008; Ignatovica et al., 2012)
Ser288 (TM7)	Substitution mit der ungeladenen Aminosäure Prolin führt zur fünffach erhöhten Bindungsaffinität für ADP, möglicherweise ähnelt die Bindungsstelle so der des P2Y ₁ -Rezeptors	(Mao et al., 2010)

P2Y₁₂ ist im Gegensatz zu P2Y₁ ein G_i-gekoppelter Rezeptor. Dieser bewirkt neben einer Inhibition der Adenylatcyclase auch eine Stimulation der PI3-Kinase. Durch Inhibition der Adenylatcyclase sinkt cAMP, was wiederum den zytosolischen Calciumspiegel ebenfalls erhöht. Auch die Aktivierung der PI3-Kinase bewirkt einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. Weiterhin bewirkt P2Y₁₂ eine Aktivierung von Rap1b, was ein Regulator von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist, welches eine wesentliche Funktion bei der Thrombozytenaggregation ausübt, sowie von Rho A und Rho-Kinase, welche bei der Formänderung von Thrombozyten beteiligt ist (Hardy et al., 2005). Zusammenfassend sind also sowohl der G_q-gekoppelte P2Y₁-Rezeptor als auch der G_i-gekoppelte P2Y₁₂-Rezeptor an der Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels beteiligt. Hardy et al. (Hardy et al. 2004) konnten zeigen, dass innerhalb dieser komplexen Signalwege eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Rezeptoren, primär über eine negative Rückkopplung und Beeinflussung des Calciumspiegels, stattfindet. Die von P2Y₁ aktivierte Src-Kinase inhibiert die von P2Y₁₂ aktivierte PI3-Kinase, sodass hierüber der Calciuminflux teilweise kontrolliert werden kann. Eine solche Regulation ist vermutlich essentiell, um die wichtige Balance zwischen Hämostase und Thrombolyse stets den aktuellen physiologischen Gegebenheiten anpassen zu können.

Guidetti et al. (Guidetti et al., 2008) beschreiben einen weiteren Signalweg, der ebenfalls eine gegenseitige Beeinflussung und Regulation von P2Y₁ und P2Y₁₂ ermöglicht. Die PKC besteht aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. DAG (über P2Y₁) bindet an die regulatorische Untereinheit und bewirkt eine teilweise Aktivierung, zur vollständigen Aktivierung wird allerdings zusätzlich Calcium benötigt. Der P2Y₁₂-Rezeptor greift in die Regulation der PKC über Inhibition der Adenylatcyclase und darauffolgender Inhibition der DGK ein. Die DGK phosphoryliert DAG, wodurch es metabolisiert und inaktiviert wird, und so nicht mehr an die PKC binden und diese aktivieren kann.

Soulet et al. (Soulet et al., 2004) konnten zwei unabhängige, intrazelluläre Signalwege nachweisen, welche beide durch den im klinischen Alltag wichtigen Antagonisten Clopidogrel inhibiert wurden. Einerseits führt die Aktivierung von P2Y₁₂ zu einer G_i-Protein-abhängigen Zellproliferation unter Beteiligung von PI3- und MAP-Kinase, andererseits wird die Konformation des aktinhaltigen Zytoskeletts und damit die Form der Zelle G_i-Protein-unabhängig über die Aktivierung von RhoA und Rho-Kinase beeinflusst.

Letztgenannter Signalweg ist vermutlich nicht alleine in der Lage direkt die Form der Zelle zu ändern, sondern wirkt symbiotisch mit dem P2Y₁-Rezeptor und potenziert dessen Wirkung (Hardy et al., 2005).

Eine weitere wesentliche Rolle für die korrekte Funktion des P2Y₁₂-Rezeptors konnte für die N-terminale Glykosylierung nachgewiesen werden. Die Glykosylierung übt keinen direkten Einfluss auf die Ligandenbindung oder Oberflächenexpression des Rezeptors aus, scheint aber eine wichtige Funktion für die Signaltransduktion zu erfüllen (Zhong et al., 2004).

Dem P2Y₁₂-Rezeptor kommt durch sein Vorkommen auf Thrombozyten eine wesentliche Rolle in der Hämostase zu. Clopidogrel war der erste entwickelte P2Y₁₂-Rezeptorantagonist. Es revolutionierte die Therapie des Postmyokardinfarkts, die duale Plättchenaggregation mit Acetylsalicylsäure und einem P2Y₁₂-Antagonisten ist seit fast zwei Jahrzehnten der Goldstandard der Therapie. Clopidogrel gehörte daher viele Jahre lang regelmäßig zu den meistverkauften Arzneimitteln weltweit. Seit dem Auslaufen des Patents im Jahr 2011 sind verschiedene Generika auf dem Markt erhältlich.

Clopidogrel ist ein nicht-kompetitiver, irreversibler P2Y₁₂-Antagonist und bewirkt durch Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors eine Verzögerung der ersten Thrombusformation. Außerdem wird kein einzelner, größerer, stabiler Thrombus mehr gebildet, sondern bevorzugt mehrere kleine, instabile Thromben. Insgesamt wird die Thrombozytenaggregation irreversibel vermindert, die Wirkung hält jeweils für die Lebensdauer eines Thrombozyten an, die etwa sieben bis zehn Tagen beträgt. Diese wesentlichen Effekte werden erreicht, obwohl Clopidogrel wahrscheinlich nur eine maximale Blockade von 40-50% aller P2Y₁₂-Rezeptoren auf Thrombozyten erreicht (André et al., 2003). Darüber hinaus ist das Ansprechen auf die Therapie patientenindividuell sehr unterschiedlich (Serebruany et al., 2005), und die korrekte Dosierung so erschwert. Mehrere Faktoren wurden für diese Beobachtung als mögliche Ursache in Erwägung gezogen. Zum einen handelt es sich bei Clopidogrel um eine Pro-Drug, die erst nach intestinaler Absorption und hepatischer Metabolisierung über CYP-Enzyme in ihre aktiven Metaboliten überführt wird. Daher sind sowohl gastrointestinale (Darmpassagezeit, Status der gastrointestinalen Mukosa etc.), als auch hepatische Faktoren (Metabolisierung, Wechselwirkung mit anderen Arzneimitteln mit Beeinflussung

der CYP-Enzyme etc.) beteiligt, die nur schwierig einzuschätzen und anzupassen sind, bevor das Medikament in seine aktive Form überführt wird (Lau et al., 2004). Weiterhin werden verschiedene genetische Polymorphismen als mögliche Ursache der Variabilität diskutiert, z.B. der bereits erwähnte H2-Haplotyp (Fontana et al., 2003a), die Polymorphismen C34T und G52T (Cui et al., 2017), oder T744C (Zoheir et al., 2013). Bislang konnte kein Zusammenhang zwischen der Effektivität von Clopidogrel und der epigenetischen Methylierung verschiedener Rezeptorregionen (Su et al., 2014), oder zwischen P2Y₁₂-Haplotyp und CYP3A5 Genotyp (Smith et al., 2006) hergestellt werden. Schließlich werden auch exogene Faktoren, zum Beispiel Rauchen bzw. Nikotinaufnahme (Shanker et al., 2006), die die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors selbst beeinflussen, als mögliche Ursache für das unterschiedliche Ansprechen auf Clopidogrel diskutiert.

Aus Gründen der Praktikabilität und Patientensicherheit wurde daher nach weiteren P2Y₁₂-Antagonisten gesucht. Diese neuen P2Y₁₂-Antagonisten können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: orale (Prasugrel, Ticagrelor) und intravenöse (Cangrelor, Elinogrel) Applikation, irreversibler (Prasugrel) und reversibler (Ticagrelor, Cangrelor, Elinogrel) Wirkmechanismus, sowie Pro-Drugs (Prasugrel) oder direkter Wirkung (Ticagrelor, Cangrelor, Elinogrel). In großen Teilen der westlichen Welt wurde Clopidogrel mittlerweile durch diese neueren Arzneien als Mittel der Wahl abgelöst. In einer vergleichenden Metaanalyse konnte die orale Einnahme von Prasugrel und Ticagrelor das Risiko ischämischer Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, insbesondere eines ST-Strecken-Hebungsinfarkt, verglichen mit Clopidogrel häufiger verhindern. Von den intravenösen Wirkstoffen konnte nur für Cangrelor eine Risikoreduktion gezeigt werden. Lediglich unter Prasugrel gab es allerdings auch ein höheres Risiko für Blutungen bei der Thrombolyse nach einem Herzinfarkt (Tang et al., 2014).

Neben seinem Vorkommen auf Thrombozyten ist der P2Y₁₂-Rezeptor ebenfalls im Endothel enthalten und an der Vasokonstriktion beteiligt (Wihlborg et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Raucher und Nichtraucher unterschiedlich von einer Therapie mit Clopidogrel profitieren (Reed et al., 2017). Nikotin konnte in verschiedenen Zellreihen (Koronarendothel, Umbilikalvenenendothel, glatte Muskulatur der Aorta, Megakaryoblasten) über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren die Expression von P2Y₁₂

induzieren. Diese P2Y₁₂-Überinduktion ist eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen Rauchen und Thromboserisiko (Shanker et al., 2006). P2Y₁₂ ist vermutlich außerdem durch Aktivierung proinflammatorischer Zytokine in glatter Gefäßmuskulatur an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt (Satonaka et al., 2015).

Der P2Y₁₂-Rezeptor wird innerhalb des zentralen Nervensystems vor allem auf Mikroglia exprimiert, die im zentrale Nervensystem als Erstversorger geschädigter Zellen und Hirnareale fungieren (Sasaki et al., 2003). Die Migration der Mikroglia geschieht vermutlich durch die Freisetzung von Nucleotiden, u.a. ADP durch geschädigte Hirnzellen, die an P2Y₁₂ binden (Moore et al., 2015). Tozaki-Saitoh et al. konnten nachweisen, dass mikrogliale P2Y₁₂-Rezeptoren ihrerseits eine direkte Inflammation durch CCL3-Induktion auslösen und somit eine proinflammatorische, neurotoxische Rolle spielen (Tozaki-Saitoh et al., 2017). Im Tiermodell konnte in P2Y₁₂-knock-out Mäusen bei neuronaler Ischämie eine geringere Migration von Mikroglia sowie eine Reduktion des neuronalen Zelluntergangs aufgewiesen werden. Vermutlich kann daher eine frühzeitige Blockade der Mikrogliazellfunktion durch einen P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten bei einer akuten neuronalen Ischämie neuroprotektiv wirken (Webster et al., 2013). Polymorphismen am P2Y₁₂-Rezeptor sind zudem möglicherweise mit der Entstehung einer Epilepsie assoziiert (Wang et al., 2023).

Dem P2Y₁₂-Rezeptor konnte weiterhin eine Rolle bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz nachgewiesen werden. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bei einseitigem Nervenschaden im Rückenmark mikrogliale P2Y₁₂-mRNA dreifach vermehrt nachweisbar war im Vergleich zur gesunden Gegenseite. Die Applikation eines P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten konnte Symptome einer taktilen Allodynie verringern (Tozaki-Saitoh et al., 2008). Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine intrathekale P2Y₁₂-Blockade neuropathischen Schmerz lindern und die Zytokinproduktion nach Verletzung inhibieren konnte (Horváth et al., 2014). Da P2Y₁₂-Rezeptoren u. a. auch in Neuronen von Ganglien des Nervus Trigemini nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung bei einer Trigeminalneuralgie möglich (Kawaguchi et al., 2015).

Eine Beteiligung von P2Y₁₂-Rezeptoren an inflammatorischen Reaktionen konnte zusätzlich bei Asthma bronchiale und Sepsis gezeigt werden. In einer Studie konnte Clopidogrel die eosinophile Inflammation beim Asthma bronchiale vermindern und bietet so möglicherweise neue Therapieoptionen (Suh et al., 2016). Die Applikation von P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten konnte die Ausbildung thrombotisch-leukozytischer Thromben verhindern, und auch eine direkte Reduktion proinflammatorischer Zytokine, u.a. TNF α , IL-6, CCL2, sowie bei Verwendung von Ticagrelor sogar einen direkten Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 bewirken (Thomas et al., 2015; Tsai et al., 2015). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass P2Y₁₂-knock-out-Mäuse teilweise vor einem Sepsis-induzierten akuten Lungenschaden geschützt waren. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bereits durch P2Y₁₂-Antagonistengabe gezeigt werden. Hieraus ergibt sich ebenfalls ein potenzieller neuer Therapieansatz der Sepsis (Liverani et al., 2016).

Der P2Y₁₂-Rezeptor scheint darüber hinaus an Tumorstadium und Metastasierung beteiligt zu sein (Gebremeskel et al., 2015). Neuere Untersuchungen konnten P2Y₁₂ außerdem im proximalen Tubulus und den Sammelrohren der Niere lokalisieren, wo die ADH-Ausschüttung mitreguliert wird, sodass eine Anwendung in der Nephrologie, beispielsweise im Rahmen eines Diabetes insipidus denkbar ist (Zhang et al., 2015).

1.4 Desensitivierung und Recycling des P2Y₁₂-Rezeptors

Nach Aktivierung eines G-Proteins werden diese in der Regel zügig endozytiert; entweder um möglichst schnell recycelt und an die Zellmembran zurückbefördert zu werden, um erneut als freier Rezeptor aktiviert werden zu können, oder um in Vesikeln innerhalb der Zelle zum Zielort weitertransportiert zu werden zur Auslösung weiterer Signaltransduktionen oder schließlich zum Abbau.

Nach Bindung des Agonisten werden die Rezeptoren clathrin- und dynaminvermittelt endozytiert (Mundell et al., 2008, 2006). Es kommt hierbei zu einer Ausstülpung innerhalb der Zellmembran, die so selbst zum Vesikel wird. Clathrin sitzt verdichtet an bestimmten Stellen der Membran, sogenannten CCPs. Innerhalb dieser CCPs werden Vesikel geformt, die dann als zytosolisches Transportmedium des endozytierten Rezeptors fungieren. Dieser Prozess der Rezeptorinternalisierung wird weiterhin über ARF6 und Nm23-H1 reguliert, die jeweils mit Clathrin bzw. Dynamamin interagieren (Kanamarlapudi et al., 2012).

ARF6 ist in diesem Prozess ein essentieller Faktor, da bei Blockade von ARF6 die Internalisierung vollständig gestört ist.

Lange war unklar, wie der weitere Weg nach der Rezeptorinternalisierung festgelegt wird, und man ging davon aus, dass dieser vermutlich sowohl rezeptor-, als auch zelltypabhängig ist. Mundell et al. (Mundell et al., 2006) konnten zeigen, dass unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch unterschiedliche CCPs endozytiert werden, und schlugen auf dieser Grundlage eine Klassifikation vor: CCP-1 für P2Y₁₂ und β -Adrenorezeptoren, CCP-2 für P2Y₁. Basierend auf den Beobachtungen, dass P2Y₁ sich nach der Rezeptorinternalisierung häufig in den Lysosomen zum Abbau wiederfand, der P2Y₁₂-Rezeptor hingegen rasch an die Zellmembran zurückbefördert wurde, wurde schließlich die Hypothese aufgestellt, dass bereits bei der Endozytose der Sortiermechanismus beginnt, und die Formierung der unterschiedlichen CCPs den weiteren Transportweg beeinflusst.

Es ist bekannt, dass Thrombozyten nach längerer Einwirkung von ADP einen Gewöhnungseffekt zeigen und nicht mehr fest aggregieren. Lange Zeit ging man davon aus, dass dieser Funktionsverlust vorrangig auf die Desensitivierung des P2Y₁-Rezeptors zurückzuführen ist (Baurand, 2004), dies konnte aber schließlich widerlegt werden. Hardy et al. (Hardy et al. 2005) untersuchten die Rolle der P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren bei der Desensitivierung und konnten feststellen, dass beide Rezeptoren desensitivieren, wenn auch auf unterschiedliche Art und Weise; während der Prozess bei P2Y₁ vor allem PKC-abhängig ist, wird er bei P2Y₁₂ hingegen primär über verschiedene GRK-Kinasen (vor allem GRK2- und GRK6) vermittelt, und ist PKC-unabhängig.

Eine länger andauernde Desensitivierung kann durch einen Mangel an Thrombozytenaggregation bzw. instabiler Thrombenbildung zu einem Blutungsrisiko führen. Aus diesem Grund ist die zügige Resensitivierung des Rezeptors in vivo sehr wichtig. Hierfür muss die Internalisierung des Rezeptors, zellinterne Dephosphorylierung, und der Rücktransport an die Zellmembran möglichst schnell und korrekt ausgeführt werden (Mundell et al., 2008).

Die Thrombozytenaktivierung erfolgt auch durch Thrombin über PAR1 und PAR4. Aktivierte Thrombozyten schütten ADP aus, welches agonistisch sowohl an P2Y₁ als auch

P2Y₁₂ bindet. PAR4 bildet gemeinsam mit dem P2Y₁₂-Rezeptor ein Dimer an der Zellmembran, der wiederum β -Arrestin rekrutiert und Akt aktiviert und somit zur Thrombenstabilisierung beiträgt. Mundell et al. (Mundell et al., 2008) beschreiben, dass die korrekte Internalisierung des Rezeptors abhängig von Arrestin ist, und hier spezifisch für den P2Y₁₂-Rezeptor primär Arrestin-2 und -3 relevant sind. Arrestin ist ein Protein, welches normalerweise im Zytosol vorliegt und mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagiert. Bei Agonistenbindung wird Arrestin rasch in die unmittelbare Umgebung des P2Y₁₂-Rezeptors an die Zellmembran befördert. Zur Bindung von β -Arrestin ist eine GRK-abhängige Phosphorylierung des P2Y₁₂-Rezeptors notwendig. Das Heterodimer aus PAR4 und P2Y₁₂ bewirkt die Kolokalisation von β -Arrestin und Akt zu intrazellulären Vesikeln. Akt ist ein wichtiger Mediator in der Integrin-Aktivierung von Thrombozyten, wobei Integrine wiederum bedeutende Zellbestandteile sind, die an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind und so eine außerordentliche Relevanz für die Thrombenstabilisierung haben (Khan et al., 2014; Smith et al., 2017). Die Akt-Aktivierung durch Phosphorylierung kann sowohl ADP-abhängig über P2Y₁₂ mittels PI3-Kinase, als auch, wie durch Versuche in P2Y₁₂-knock-out Mäusen bestätigt, über PAR-4 und Arrestin-2 erfolgen (Li et al., 2011; O'Brien et al., 2012). In vivo herrscht vermutlich zur maximalen Phosphorylierung und Aktivierung ein Synergismus zwischen beiden Wegen.

Durch Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren am C-Terminus des P2Y₁₂-Rezeptors zur Bindung mit Arrestin relevant sind (Nisar et al., 2011). Sowohl bei Deletion eines großen Teiles des C-Terminus (del321_342), als auch des PDZ-Bindemotivs (delPDZ), als auch dem Ersatz einer einzigen Aminosäure innerhalb des PDZ-Motivs (P341A) konnte keine Koexpression von Arrestin-2 und P2Y₁₂ an der Zellmembran nachgewiesen werden. Untersuchungen an Arrestin-2 und -3 knock-out Mäusen zeigten hingegen eine ungestörte Rezeptorfunktion und ließen vermuten, dass diesen Proteinen vermutlich nur eine geringe Rolle im Rezeptorkreislauf zugesprochen werden kann (Cunningham et al., 2013a). Neben der Arrestin-abhängigen Internalisierung gibt es auch die Möglichkeit der clathrin- und dynamin-abhängigen Rezeptorinternalisierung (Mundell et al., 2006). Hier wiederum zeigte sich die Funktion der oben genannten Mutationen gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor uneingeschränkt möglich. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die PDZ-Bindungsdomäne essentiell für

die Arrestin-abhängige Internalisierung, aber nicht für die clathrin- und dynamin-abhängige Rezeptor-Internalisierung ist.

Neuere Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Ort der Phosphorylierung am C-Terminus von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren unterschiedliche Funktionen und Transportwege definiert, und somit bereits hierdurch der weitere intrazelluläre Ablauf festgelegt werden kann (Sente et al., 2018). Sind nur die distalen Anteile des C-Terminus phosphoryliert, bindet Arrestin zwar und kann Prozesse wie Rezeptorendozytose und weitere Signalaktivierung vermitteln, zur vollständigen Konformationsänderung von Arrestin und damit einhergehender Desensitivierung des Rezeptors ist allerdings die zusätzliche Phosphorylierung proximaler Anteile des C-Terminus nahe Helix 8 notwendig.

1.5 Bekannte klinisch relevante P2Y₁₂-Rezeptormutationen

Rezeptormutationen lassen sich im Hinblick auf ihre Auswirkung einteilen in Änderungen der Quantität, also einer eingeschränkten Rezeptorexpression bei uneingeschränkter Funktion der einzelnen Rezeptoren; oder der Qualität, also eingeschränkter Funktion bei insgesamt normaler Rezeptoranzahl. Eine Übersicht über die Lokalisation der im Folgenden beschriebenen Mutationen bietet Abbildung 1.

Gleichzeitig mit der Identifikation des P2Y₁₂-Rezeptors durch Hollopeter et al. (Hollopeter et al., 2001) im Jahr 2001 konnte auch der erste Patient mit einer Mutation in diesem Rezeptor, der bereits erstmals 1995 beschrieben wurde (Nurden et al., 1995), identifiziert werden. Der 61-jährige Patient litt an einer lebenslangen, milde verstärkten Blutungsneigung, mit Nachweis einer verlängerten Blutungszeit (>20 Minuten) und eingeschränkter Thrombozytenaggregation. In vitro Untersuchungen zeigten eine reduzierte ADP-Bindungskapazität, sowie eine Dysfunktion der G_i-Kopplung mit fehlender Senkung des cAMP-Spiegels. Genetische Untersuchungen erbrachten den Nachweis eines mutierten Allels und eines Wildtyp-Allels, wobei es ausschließlich zur Transkription des mutierten Allels kam. Die Mutante zeigte eine Deletion von zwei Basen (TTGATT) in der kodierenden Region der Aminosäure 240, die nahe des N-Terminus der TM6 liegt. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters, die zu einer vorzeitigen Initiierung eines Stoppcodons nach weiteren 28 Aminosäuren und somit inkompletter Rezeptorausbildung führt.

2003 wurde ein weiterer erwachsener Patient mit einer Hämatom- und Blutungsneigung sowie verlängerter Blutungszeit (>30 Minuten) identifiziert (Cattaneo et al., 2003). Die Form der Thrombozyten war normal, die Applikation von ADP bewirkte jedoch nur eine kurze und reversible Aggregation. Bei hohen Dosen ADP war eine Restfunktion nachweisbar. Die Anzahl und Affinität von 2MeSADP-Bindungsstellen, einem weiteren sehr potenten P2Y₁₂-Agonisten, waren normwertig. Die Expression des Rezeptors war vergleichbar zum Wildtyp. Genetische Untersuchungen erbrachten den Nachweis einer Compound-Heterozygotie. Beide Allele zeigten eine Mutation einer einzelnen Base; G→A mit Ersatz von Arginin zu Glutamin auf Position 256 (Arg256Gln) in TM6 auf dem einen Allel, und C→T mit Ersatz von Arginin zu Tryptophan auf Position 265 (Arg265Trp) in EL3. Beide Mutationen führen zu einer Dysfunktion des Rezeptors.

Als erste nicht-europäische Patientin mit einer P2Y₁₂-Mutation wurde 2005 eine 67-jährige Patientin mit lebenslanger Hämatomneigung ohne Transfusionsbedarf aus Japan beschrieben (Shiraga et al., 2005). Es bestand eine verlängerte Blutungszeit (>15 Minuten) und eingeschränkte Thrombozytenaggregation bei normaler Thrombozytenzahl und Gerinnungsparametern. Genetisch lag eine homozygote Mutation (ATG→AGG) innerhalb des Initiierungscodons der Translation vor, in Expressionsstudien konnte daher auch keine Rezeptorausbildung nachgewiesen werden.

Eine weitere Mutation wurde 2007 erstmals durch eine niederländische Gruppe beschrieben (Remijn et al., 2007). Der 38-jährige Patient litt lebenslang unter einer Hämatom- und Blutungsneigung, sowie ausgeprägter spontaner Epistaxis und posttraumatischem Blutverlust. Die Blutungszeit war leicht verlängert, darüber hinaus bestanden keine laborchemischen Auffälligkeiten. In vitro Untersuchungen zeigten eine fehlende Thrombozytenaggregation bei niedrigen Dosen ADP, bei höheren Dosen konnte lediglich eine rasche und reversible Aggregation festgestellt werden. Genetisch konnte eine heterozygote Mutation mit Ersatz von Prolin zu Threonin auf Position 258 (TM6) identifiziert werden. Da es sich hier um eine zur Ligandenbindung wichtige Position des Rezeptors handelt, und sich durch Ersatz der hydrophoben Aminosäure Prolin mit der hydrophilen Aminosäure Threonin die Polarität an dieser Stelle ändert, ist die Bindung des Liganden vermutlich eingeschränkt. Zwei Patienten mit der gleichen Mutation, in jeweils

einer nicht verwandten Frau und einem Mann, mit vergleichbarer klinischer Symptomatik, konnten 2015 identifiziert werden (Jones et al., 2015).

Im Rahmen einer Untersuchung von Patienten, die ursprünglich mit von-Willebrand-Syndrom Typ I diagnostiziert wurden, wurde eine Patientin mit einer heterozygoten Substitution eines A→G und daraus resultierendem Ersatz von Lysin auf Position 174 mit Glutamat (Lys174Glu) identifiziert (Daly et al., 2009). Die gleiche Mutation konnte in mehreren Verwandten dieser Patientin identifiziert werden. Die Expression des mutierten Rezeptors war vergleichbar zur Wildtyp-Variante. Nach Applikation von ADP kam es zu einer reduzierten und reversiblen Thrombozytenaggregation, in höheren Dosen konnte eine fast normale Aggregation beobachtet werden. Durch die Mutation kommt es zu einem partiellen Funktionsverlust. Die betroffene Aminosäure Lysin 174 befindet sich in der EL2 in direkter Nachbarschaft eines Cystein auf Position 175, dem eine wichtige Rolle in der Rezeptorkonformation durch Ausbildung von Disulfidbrücken und der Agonisten-Bindungsstelle zugesprochen wird. Lys174 ist vermutlich selbst nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt, sondern gibt der Bindungstasche Stabilität durch Ionenbindungen, oder spielt eine Rolle für den Weg des Liganden zur Rezeptorbindungsstelle.

Fontana et al. konnten 2009 (Fontana et al., 2009) den genetischen Defekt einer bereits zuvor im Jahr 2000 (Cattaneo et al., 2000), vor Entdeckung des P2Y₁₂-Rezeptors, beschriebenen italienischen Familie mit Blutungsneigung und verlängerter Blutungszeit bei normalen Koagulationsparametern aufdecken. Die stark betroffenen Schwestern der Familie zeigten beide eine Haploinsuffizienz des P2Y₁₂-Gens. Durch Deletion einer einzelnen Base (378delC) kurz nach Kodierungsbeginn der 3. TM kam es zu einer Verschiebung des Leserasters (Thr126 frame shift 34x) und vorzeitiger Initiierung eines Stoppkodons mit unvollständiger Bildung des P2Y₁₂-Rezeptors. Thrombozyten mit dieser Mutation zeigten eine quantitative Verminderung der 2MeSADP-Bindungsstellen, eine verminderte cAMP-Senkung, sowie eine abnorme Thrombozytenaggregation. Ein Sohn mit milderer Thrombozytendysfunktion, war ebenfalls haploinsuffizient, trug aber das nicht-mutierte Allel des Vaters.

Bei einer Patientin mit lebenslanger Blutungsneigung und Spontanblutungen konnte 2014 eine Mutation (R122C) im DRY-Motiv identifiziert werden. Dieses ist hochkonserviert und

spielt vermutlich eine Rolle bei der Konformationsänderung des Rezeptors, sowie der Interaktion zwischen verschiedenen G-Protein-Rezeptoren und dem intrazellulären Rezeptortransport (Patel et al., 2014). Die Thrombozytenzahl und Koagulationsparameter waren normwertig. Die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation war vermindert. Die Expression des mutierten Rezeptors an der Zellmembran war reduziert, stattdessen fand sich eine ausgeprägte Agonisten-unabhängige Internalisation und zellinterne Akkumulation. Im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor, der zytosolisch vor allem an Transferrin gebunden, einem frühen endosomalen Recycling Marker, vorlag, war die Mutante vor allem an lysotracker blue, einem lysosomalen Marker gebunden. Der mutierte Rezeptor wird daher scheinbar vermehrt dem lysosomalen Abbau zugeführt. Die Anzahl der Ligandenbindungsstellen am mutierten Rezeptor war zwar ebenfalls reduziert, funktionell war aber die Fähigkeit Liganden zu binden und hiermit eine Restaktivität der Bindung an den G-Protein Rezeptor erhalten, allerdings wurde nach Agonistenbindung keine Signaltransduktion ausgelöst. 2015 konnte bei einer weiteren Patientin mit einer bekannten verlängerten Blutungszeit eine Mutation derselben Aminosäure, aber Substitution gegen Histidin (R122H) identifiziert werden (Jones et al., 2015). In diesem Fall wurde ebenfalls die Formveränderung der Thrombozyten als normal mit reversibler Aggregation beschrieben. Obwohl außerdem die cAMP-Senkung reduziert und damit die Rezeptorfunktion qualitativ beeinträchtigt war, wurde im Gegensatz zu R122C eine fast normale quantitative Expression des mutierten Rezeptors an der Zellmembran beobachtet. Im Rahmen der gleichen Studie wurde eine weitere Variante gefunden, V207A, die in vivo beim männlichen Indexpatienten asymptomatisch verlief. In vitro hingegen zeigte sich eine reduzierte Aggregationsfähigkeit (Jones et al., 2015). Die Expression des Rezeptors war unbeeinträchtigt, die cAMP-Senkung allerdings leicht vermindert, verglichen mit R122H war aber eine höhergradige Restfunktion beim V207A-Konstrukt erhalten. V207 befindet sich direkt neben einem Cystein auf Position 208 in TM5, die wie bereits beschrieben, zur Ausbildung von Disulfidbrücken und für die Rezeptorintegrität vermutlich eine essentielle Rolle spielt. Kürzlich wurde ein weiterer Patient mit einer Mutation (D121N) innerhalb des DRY-Motivs ohne klinische Blutungsneigung beschrieben (Dangelmaier et al., 2022).

Eine weitere homozygote Mutation, die die Ligandenbindung unterbindet, wurde 2015 beschrieben (Lecchi et al., 2015). In zwei Brüdern mittleren Alters deutsch-türkischer

Herkunft wurde die homozygote Mutation der Base 847 T→A, die in einer His187Gln-Substitution resultiert, nachgewiesen. Beide litten unter einer lebenslang erhöhten Blutungsneigung bei normaler Thrombozytenzahl und normalen Koagulationsparametern. Die ADP-induzierte Aggregation von Thrombozyten war verringert, reversibel und instabil. Obwohl die Quantität der Ligandenbindungsstellen normal war, war die Affinität von ^3H JPSB-0413, einem selektiven P2Y₁₂-Antagonisten, sowie von ADP und 2MeSADP vermindert. His187 in TM5 ist wesentlich sowohl für die Bindung eines Agonisten als auch eines nukleotidischen Antagonisten und bewirkt eine Konformationsänderung nach der Bindung. Die Autoren vermuten, dass bei homozygoter Mutation die Rezeptorfunktion vollständig unterbunden ist.

1.6 Auswahl der untersuchten Mutationen

Für die korrekte Funktion des P2Y₁₂-Rezeptors ist dessen Internalisierung und Recycling zum zügigen Rücktransport an die Zelloberfläche notwendig, um einer überschießenden Desensitivierung entgegenzuwirken. Nisar et al. demonstrierten für vier Aminosäuren am distalen C-Terminus eine Schlüsselrolle hierfür (Nisar et al., 2011). Bei diesen vier Aminosäuren, ETPM (Glutaminsäure, Threonin, Prolin, Methionin), handelt es sich um ein sogenanntes PDZ-Bindungsmotiv (Postsynaptic density 95kDa protein/Drosophila discs large protein/zonula occludens-1 protein). Bei PDZ-Domänen handelt es sich um spezifische Proteinregionen des C-Terminus, die in verschiedenen Varianten vorkommen (Typ I, II, oder III), und eine Schlüsselrolle unter anderem mit Signalkomplexen, Rezeptortransport, und teilweise Regulation der Endozytose und Recycling einiger G-Protein-gekoppelter Rezeptoren spielen (Marchese et al., 2008). Im Zellmodell konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Fehlen des kompletten PDZ-Motivs als auch bei alleinigem Fehlen bzw. Ersatz des Prolins durch Alanin (P341A) der Prozess der Rezeptorinternalisierung und Rücktransportes gestört und somit die Rezeptorfunktion insgesamt beeinträchtigt ist. Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass eine Mutation an kritischen Stellen des C-Terminus zu einem Funktionsverlust des Rezeptors zu einer Blutungsneigung führen könnte. Diese konnte durch die Identifizierung eines Patienten, der zuvor inkorrekt die Diagnose eines von Willebrand-Syndroms erhalten hatte, bestätigt werden. Bei der Sequenzierung des P2Y₁₂-Gens wurde eine heterozygote Mutation im PDZ (P341A) nachgewiesen. Auch bei der Mutter konnte eine heterozygote P341A-Mutation nachgewiesen werden, was zu einer verminderten P2Y₁₂-

Expression an der Zelloberfläche bei unveränderter absoluter Anzahl der P2Y₁₂-Rezeptoren verglichen mit gesunden Kontrollen führte. In dieser Studie wurden durch zielgerichtete Mutagenese Rezeptoren hergestellt, um die Relevanz der einzelnen Abschnitte des C-Terminus genauer untersuchen zu können; Mutanten mit Deletion des kompletten C-Terminus (K303stop), dem Großteil des C-Terminus (T320stop = del321_342), dem PDZ-Bindungsmotiv (E339stop = delPDZ), sowie Nachbildung der beschriebenen Mutation mit alleinigem Ersatz des Prolins innerhalb des PDZ-Bindungsmotiv durch Alanin (P341A). Bis auf die Mutante ohne C-Terminus (K303stop) konnte für alle Varianten eine Expression an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die exprimierten Mutanten del321_342, delPDZ und P341A wurden hinsichtlich Rezeptorqualität weiteren funktionellen Untersuchungen zugeführt, hierbei konnte jeweils eine ähnliche Funktion wie beim Wildtyprezeptor nachgewiesen werden. Die Desensitivierung von delPDZ und del321_342 war jedoch um 50% reduziert, was als Folge einer mangelnden Phosphorylierung angesehen wurde, da diese eine wesentliche Rolle für die Regulation der Rezeptor-Desensitivierung spielt (Mundell et al., 2006). Innerhalb des PDZ-Motivs ist das Threonin auf Position 340 die einzige Aminosäure, die eine Phosphorgruppe binden kann. Die mangelnde Desensitivierung wurde daher primär auf das Fehlen dieser Aminosäure zurückgeführt. Hiermit einhergehend zeigte sich eine ungestörte Desensitivierung und Phosphorylierung der P341A-Mutante, wobei allerdings nach Entfernen des Agonisten ebenfalls ein mangelnder Rücktransport an die Zelloberfläche nachgewiesen wurde, was wiederum auf eine eingeschränkte Interaktion mit Arrestin zurückgeführt wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass nicht nur T340 als phosphorylierbare Aminosäure essentiell, sondern die PDZ-Domäne als gesamte Einheit für die Interaktion mit Arrestin zur Rezeptor-Resensitivierung notwendig ist. Mutanten, denen die PDZ-Domäne fehlte, reagierten normal auf den Agonisten und wurden an der Zellmembran exprimiert, nach Entfernung des Agonisten allerdings wurden sie nicht nach interner Resensitivierung an die Zellmembran zurückbefördert, sondern verblieben in einem intrazellulären Kompartiment. P341A-Rezeptoren wurden zwar unverändert clathrin- und dynaminabhängig internalisiert, aber nur zu einem sehr geringen Anteil recycelt (Cunningham et al., 2013b). Eine wichtige Rolle konnte den kleinen G-Proteinen Rab zugeschrieben werden. Rab5 koppelt bei der Internalisierung an den P2Y₁₂-Rezeptor, bei der P341A-Variante ist dies stark zeitverzögert, wodurch möglicherweise bereits ein

Problem beim frühzeitigen endozytotischen Verwertungskreislauf eintritt. Außerdem kann der Wildtyp-Rezeptor beim Rücktransport an die Zellmembran sowohl an Rab4 als auch an Rab 11 binden. Die Mutante wird allerdings nur noch geringfügig über Rab11, und überhaupt nicht mehr über Rab4 recycelt. Stattdessen verbleibt der mutierte Rezeptor größtenteils im Trans-Golgi-Netzwerk, wo er allerdings auch kaum degradiert wird.

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, durch zielgerichtete Mutagenese die Änderung der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors zu untersuchen. Hierbei wurde ein besonderer Fokus auf den intrazellulär gelegenen C-Terminus und die terminale PDZ-Domäne des Rezeptors gelegt, sowie deren Relevanz für die Regulation der Expression in vitro in Chinesischen Hamster-Ovarial (CHO)-Zellen untersucht. Die Untersuchung dieser Rezeptordomäne wurde in Anlehnung an Nisar et al. (siehe 1.6) und dessen Beschreibung eines Patienten mit einer Mutation innerhalb des PDZ-Motivs gewählt (Nisar et al., 2011). Diese Mutation führte zu einer verminderten Expression des Rezeptors, was auf eine Dysfunktion des intrazellulären Rezeptortransports, insbesondere des Rücktransports an die Zellmembran zurückgeführt wurde. Wir replizierten die durch Nisar et al. beschriebene Mutation P341A in CHO-Zellen, wodurch die Integrität der PDZ-Domäne gestört wird. Zusätzlich entwickelten wir durch zielgerichtete mutagene PCR weitere Rezeptormutanten, in denen entweder die PDZ-Domäne fehlte (delPDZ), verdoppelt wurde (2PDZ), oder ein Großteil des C-Terminus fehlte (del321_324). Um die Expression der verschiedenen Mutanten auswerten und vergleichen zu können, wurden diese an mindestens ein fluoreszierendes Protein (cyan/grün/gelb fluoreszierendes Protein; CFP/GFP/YFP) N-terminal (GFP) oder C-terminal (CFP/YFP). Die Verbindung mit einem fluoreszierenden Protein ermöglicht nach Anregung mit ultraviolettem Licht mit spezifischen Wellenlängen unter einem Fluoreszenzmikroskop die Darstellung und Analyse der Rezeptoren. Alle P2Y₁₂-Rezeptormutanten wurden anschließend in CHO-Zellen transfektiert und exprimiert, um im Anschluss unter dem Laserscanningmikroskop auf ihre quantitative Funktion, d.h. Expression an der Zellmembran mittels Intensität der Fluoreszenz untersucht zu werden. Die Ergebnisse der Expressionsstudien wurden statistisch ausgewertet und verglichen,

sowie im Kontext bisher publizierter Studien diskutiert. Die Arbeit soll Einblicke in die mögliche Regulation der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors durch den C-Terminus, und insbesondere die PDZ-Domäne geben.

2 Material und Methoden

Eine detaillierte Darstellung der genutzten Protokolle und Materialien findet sich im Anhang (siehe 7. Anhang).

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 PCR

Die PCR ist eine grundlegende molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), für deren Beschreibung 1993 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde (Mullis et al., 1986). Obligate Materialien zur Durchführung einer PCR sind ein zu amplifizierendes DNA-Template, zwei Primer, die so gestaltet sind, dass die Basen sich jeweils komplementär ($A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$) zum DNA-Template anlagern und die zu replizierende DNA-Sequenz zwischen sich einlagern, eine thermostabile DNA-Polymerase zur Verknüpfung der Nukleotide, und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs).

In der PCR wird durch Denaturierung, Annealing und Elongation das DNA-Template in einem Thermocycler exponentiell repliziert. Da die zu erwartende Größe des PCR-Produktes bekannt ist, kann der Erfolg der PCR anschließend durch eine Gelelektrophorese kontrolliert werden.

2.1.2 Mutagene PCR

Mit Hilfe der PCR kann durch die Verwendung mutagener Primer eine DNA-Sequenz auch gezielt geändert werden. Die Primer enthalten jeweils eine gewünschte Mutation, die dann nach Annealing an das DNA-Template und anschließender Elongation durch die DNA-Polymerase in folgenden PCR-Zyklen exponentiell repliziert wird, sodass am Ende nur ein Bruchteil des originalen, nicht-mutierten DNA-Templates verbleibt. Durch Zusatz des Restriktionsenzym DpnI wird methylierte DNA, und damit Überreste des DNA-Templates abgebaut.

2.1.3 DNA-Nachweisverfahren: Agarose-Gelelektrophorese

Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, das aus Rotalgen gewonnen wird. Auf Grund seiner stark gelierenden Eigenschaft wird es in der Molekularbiologie zur Auftrennung von Molekülen nach ihrer Größe genutzt. Je nach Konzentration des

Agarosegels ändert sich dessen Festigkeit. Je höher die Konzentration des Gels, desto kleiner sind die entstehenden Poren. Je kleiner die Poren, desto genauer können auch kleinere Fragmente differenziert werden. Zur Herstellung des Gels werden neben Agarose ein Elektrophoresepuffer sowie ein Fluoreszenzfarbstoff (Ethidiumbromid) verwendet, damit die DNA unter UV-Licht sichtbar ist. Durch Einhängen eines Kamms in das noch flüssige Gel entstehen nach Aushärtung in einer Elektrophoresekammer Taschen, in die die DNA zugefügt werden kann. Zusätzlich zu den Eigenschaften der Agarose macht man sich bei der Gelelektrophorese die negative Ladung von DNA durch deren Phosphatreste zu Nutze. Auf Grund der negativen Ladung wandern DNA-Moleküle zur Anode. Nach Anlage eines elektrischen Felds wandern verschiedene Moleküle unterschiedlicher Größe, Ladung und Eigenschaften (z.B. zirkuläre, in sich selbst verschlossene Vektoren) daher unterschiedlich schnell. Mit Hilfe einer DNA-Leiter, die verschiedene DNA-Fragmente bekannter Länge enthält, kann die Größe des zu untersuchenden DNA-Fragmentes bestimmt und verglichen werden.

2.1.4 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach PCR

Nach mutagener PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 1%-igem Gel durchgeführt (siehe Protokoll 7.1.4.).

2.1.5 Auswertung

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Auswertung des Elektrophorese-Gels erfolgt mit Hilfe einer CCD-Kamera und der Software „Quantity One 1-D Analysis[®]“.

2.1.6 Isolation von DNA aus Agarosegel

DNA kann ebenfalls direkt aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dies wurde in einem Fall durchgeführt (GFP_hP2Y₁₂_ECFP), da bei der PCR die Primer vermutlich doppelt gebunden haben. Hierdurch entstanden zwei Produkte in der PCR, eines mit der erwarteten Länge (2647 bp), und ein unerwünschtes Nebenprodukt (ca. 800 bp). Durch die Isolation der DNA direkt aus dem Agarosegel konnte so spezifisch das Produkt mit der gewünschten Länge extrahiert und weiterverarbeitet werden. Hierzu wurde das Stück Agarosegel mit dem korrekten PCR-Produkt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das überschüssige Gel wurde durch verschiedene Puffer langsam aufgelöst und die Flüssigkeit in eine Austauschsäule pipettiert, worin die DNA gebunden wird. In mehreren

Schritten wurde diese nun von überschüssigen Agaroseresten und anderen Nebenprodukten gereinigt, bevor die DNA schließlich durch einen basischen Puffer eluiert und in weiteren Schritten zur Klonierung verwendet wurde.

2.1.7 Klonierung

Vektoren sind eigenständige, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich in Wirtszellen, also zum Beispiel Bakterien, autonom vermehren können. Das PCR-Produkt, soll durch Ligation an einen Klonierungsvektor und anschließender Transformation in *E. coli* vermehrt werden. Durch die Verwendung einer Taq-Polymerase als thermostabile DNA-Polymerase bei der PCR entsteht am 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adeninüberhang. Die hier verwendeten Klonierungsvektoren wiederum besitzen an ihrem 3'-Ende einen einzelnen Thymin-Überhang, sodass das PCR-Produkt nahtlos ligiert werden kann. Die außerdem enthaltene Topoisomerase I bindet an doppelsträngige DNA und spaltet Phosphodiesterbindungen hinter der Sequenz 5'-CCCTT in einen Einzelstrang. Die durch die Spaltung der Phosphodiesterbindung freiwerdende Energie wird zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen DNA-Stranges und dem Tyrosin-274 der Topoisomerase I genutzt. Diese kovalente Bindung wird nun wiederholt durch den 5'-Hydroxylrest des gespaltenen Stranges angegriffen, wodurch sich die kovalente Phosphat-Tyrosinbindung wieder löst. Die Topoisomerase kann sich so also weiter fortbewegen und übernimmt gleichzeitig eine Ligasefunktion.

2.1.8 Transformation *E. coli*

Ziel der Transformation ist es, den Klonierungsvektor mit der enthaltenen humanen purinergisch signalisierenden (hP2Y)₁₂-Rezeptor-DNA in *E. coli* Zellen einzubringen, um dort vermehrt zu werden. Hierzu werden die *E. coli* nach der Zugabe des ligierten Klonierungsvektors einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt, der die Ausbildung von Poren in der Zellwand der Bakterien induziert, um hierdurch das Eintreten des Vektors zu ermöglichen; gleichzeitig darf der Hitzeschock aber nicht zu lang sein, da die Bakterien absterben können. Nach Abkühlung auf Eis, um die Poren wieder zu verschließen, wird ein spezielles Nährmedium zugefügt, dass die Effizienz der Transformation maximieren soll. In diesem Nährmedium werden die Bakterien zunächst inkubiert, bevor sie auf Agarplatten ausgestrichen und über mehrere Stunden inkubiert werden.

2.1.9 Amplifikation von E. coli

Die transformierten und auf Agarplatten gewachsenen E. coli sollen quantitativ vermehrt werden. Hierzu wird eine einzelne E. coli-Kolonie von der Agarplatte aufgenommen und in ein mit ampicillinhaltiger Nährlösung gefülltes Zentrifugenröhrchen beimpft. Die Suspension wird dann bei nicht vollständig verschlossenem Deckel, um aerobes Wachstum zu ermöglichen, in einem horizontalen Wärmeschüttler über Nacht inkubiert. Eine Trübung des Nährmediums bestätigt ein erfolgreiches Bakterienwachstum.

2.1.10 Plasmidpräparation

Ziel der Plasmidpräparation ist die Isolation der durch Ligation und Transformation in E. coli amplifizierten Plasmid-DNA. In einem ersten Schritt werden die Bakterien durch Zentrifugation vom Nährmedium getrennt. Durch Zugabe mehrerer Lösungen (siehe 7.1.11.) wird eine Lyse der Zellmembran induziert, wodurch die Plasmid-DNA frei austreten kann. Nach erneuter Trennung von festen Bakterienbestandteilen und flüssiger Lösung, in der die extrahierte Plasmid-DNA enthalten ist, wird die DNA durch eine spezielle Austauschsäule gebunden. In einem letzten Schritt wird die in der Austauschsäule gebundene, gereinigte Plasmid-DNA durch Zugabe eines basischen, Tris-Chlorid-haltigen Puffers gelöst. Nach Kontrolle der Länge der gewonnenen DNA durch Gelelektrophorese und anschließender Sequenzanalyse auf ungewünschte Mutationen liegt der hP2Y₁₂-Rezeptor nun an plasmid cloning DNA (pcDNA)-Vektor gebunden vor und kann zur Transfektion von Zellkulturen verwendet werden.

2.1.11 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach Plasmidpräparation

Nach mutagener PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 0,8%-igem Gel durchgeführt (siehe Protokoll 7.1.5.), um zu prüfen, ob das Produkt die zu erwartende Länge besitzt, da bei der Ligation das Risiko besteht, dass sich ein Vektor ohne die Aufnahme der DNA wieder „leer“ in sich selbst verschließt. Diese Plasmide sind durch ihre zirkuläre Eigenschaft schneller in der Gelelektrophorese und können so identifiziert werden.

2.1.12 Einsatz von Restriktionsenzymen

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann die DNA an spezifischen Stellen geschnitten werden. Diese Eigenschaft kann man sich auf verschiedene Weise zu Nutze machen, zum Beispiel um ein bereits bestehendes Rezeptorkonstrukt zu verändern (beispielsweise

ein N-terminales GFP zu schneiden, oder zur Umklonierung in einen neuen Vektor). Hierzu wird ein Restriktionsenzym so gewählt, dass es spezifisch an gewünschter Stelle schneidet. Nach anschließender PCR kann eine erneute Ligation und Transformation des neu entstandenen Rezeptorkonstruktes durchgeführt werden.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultur von CHO-Zellen

Alle Arbeiten wurden an CHO-Zellen unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die CHO-Zellen wurden in Nährmedium in einem Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Dem Nährmedium wurden adäquate Antibiotika zur Selektion von transfektierten Vektoren mit Antibiotikaresistenzgenen (z. B. trägt der pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO[®]-Vektor ein Hygromycin-Resistenzgen; der pcDNATM6.2/C-YFP-GW/TOPO[®]-Vektor trägt ein Blastocidin-Resistenzgen) zugesetzt. Unter mikroskopischer Wachstumskontrolle fand alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel statt, alternativ wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80 % etwa alle zwei bis vier Tage vereinzelt.

2.2.2 Vereinzeln von CHO-Zellen

Die Zellkulturflaschen werden dem Brutschrank entnommen, und nach mikroskopischer Kontrolle unter der sterilen Werkbank geöffnet. Das alte Medium wird mit einer Pipette (10 ml) entfernt und die Zellen einmalig mit 10 ml PBS zur Reinigung gespült, welches ebenfalls direkt wieder verworfen wird. Anschließend wird 1 ml einer Trypsin-/EDTA-Lösung zur Lösung der Zellen vom Flaschenboden verwendet. Nach kurzer Inkubation (ca. 2 – 2 ½ Minuten) wird mikroskopisch die Ablösung und Rundung der Zellen kontrolliert. Die Trypsinlösung wird bei waagrecht gehaltener Zellkulturflasche entfernt, um möglichst viel Medium mit möglichst wenig gelösten Zellen zu verwerfen. Im Anschluss wird mit 2 ml Nährmedium mehrfach im starken Strahl der Boden der Zellkulturflasche angespült, um möglichst viele Zellen zu lösen und in die Pipette aufzunehmen. Derweil wird eine neue Zellkulturflasche mit 9,5 ml antibiotikahaltigem Nährmedium befüllt und mit 0,5 ml der gespülten Zellen in die neue Flasche beimpft. Die neue Kultur wird nun im Brutschrank bis zum nächsten Splitting kultiviert.

2.2.3 Kryokonservierung

Die Zellen werden mit antibiotikafreiem Medium vereinzelt (siehe 2.2.2.). Die Trypsin-/EDTA-Lösung wird etwas länger inkubiert (etwa 3 Minuten), um möglichst viele Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Die Spülung erfolgt mit 1 ml antibiotikafreiem Medium, wovon 0,2 ml für eine neue Zellkultur verwendet werden kann. Die übrigen 0,8 ml werden mit 0,8 ml DMSO versetzt und in einem Kryoröhrchen zunächst 60 Minuten lang bei -20 °C tiefgefroren, bevor sie im Anschluss langfristig in einem flüssigen Stickstofftank gelagert werden.

2.2.4 Transfektion

Transfektion bezeichnet den Vorgang des Einbringens von DNA in Zellen. Hierbei wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird das genetische Fremdmaterial nur vorübergehend exprimiert und zum größten Teil wieder abgebaut. Zufällig wird jedoch in einigen Zellen die fremde DNA in das Eigengenom integriert. Wenn die eingebrachte DNA Resistenzgene für bestimmte Antibiotika trägt, können diese Zellen durch Verwendung antibiotikahaltiger Medien selektiert werden, und so aus der transienten Transfektion eine stabile entstehen. Durch Verwendung von CHO Flp-In™-Zellen und einem speziellen Vektor, pOG44, wird der Einbau eines pcDNA5/FRT-Vektors durch die Flp-Rekombinase an bestimmte FRT-Sequenzen vermittelt. Sowohl die genomische DNA der Empfänger-Zelllinie als auch der spendende pOG44-Vektor tragen je eine FRT-Sequenz, sodass hierdurch die Wahrscheinlichkeit des direkten Einbaus in die genomische DNA, und damit das Entstehen einer stabil transfektierten Zelllinie erhöht wird. In beiden Fällen wurde die plasmidische DNA durch Konjugation an Liposomen in die Wirtszelle eingeschleust.

2.2.5 Transfektion mit Invitrogen™ Lipofectamin™ 2000 Transfection Reagent

Am Vortag der Transfektion wurden die CHO-Zellen gesplittet und in kleine Zellkulturflaschen mit 2 ml Medium überführt, sodass diese zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70-90% konfluent sind. Vor Beginn der eigentlichen Transfektion wird das alte Medium abpipettiert und die Zellkulturflaschen mit 2 ml antibiotikafreiem Medium befüllt und wieder im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Derweil wird die Konjugation der in molekularbiologischen Verfahren gewonnenen plasmidischen DNA (siehe 2.1.10.) in Liposomen vollzogen. Hierzu wurde in einem kleinen Falcon 1 µl DNA

(aus Maxiprep) bzw. 10 µl DNA (aus Miniprep) mit jeweils 250 µl Opti-MEM™-Medium vermischt. In einem zweiten Gefäß werden je nach Anzahl der zu transfektierenden plasmidischen DNA jeweils 10 µl Lipofectamin mit je 62,5 µl Opti-MEM™-Medium vermischt. Beide Lösungen werden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lipofectamin-Emulsion (je 72,5 µl) wird nun wellenförmig der DNA-Lösung zugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lipofectamin-DNA-Suspension gleichmäßig in eine vorbereitete, antibiotikumfreie CHO-Zellkultur pipettiert. Die Kultur wird für mindestens 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und zunächst in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Unter täglicher mikroskopischer Kontrolle erfolgte bei einer Konfluenz von 50-70% die Umstellung auf ein Medium mit Selektionsantibiotikum.

2.2.6 Transfektion nach FlpIn-System

Am Vortag der Transfektion wurden die CHO-Zellen gesplittet und in kleine Zellkulturflaschen mit 2 ml Medium überführt, sodass diese zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 70-90% konfluent sind. Vor Beginn der eigentlichen Transfektion wird das alte Medium abpipettiert und die Zellkulturflaschen mit 2 ml antibiotikafreiem Medium befüllt und wieder im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung inkubiert. Für die Konjugation der plasmidischen DNA (siehe 2.1.10.) in Liposomen werden 3 µl plasmidische DNA mit 2,6 µl pOG44-Vektor und 500 µl Opti-MEM™-Medium vermischt. Das Verhältnis pOG-44-plasmidische DNA sollte 9:1 entsprechen. In einem zweiten Gefäß werden 25 µl Lipofectamin mit 500 µl Opti-MEM™-Medium zugefügt. Beide Lösungen werden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die lipidhaltige Suspension zur pOG44-DNA-haltigen Lösung pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lipofectamin-DNA-Suspension gleichmäßig in eine vorbereitete, antibiotikumfreie CHO-Zellkultur pipettiert. Die Kultur wird nun für mindestens 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und ab dem nächsten Mediumwechsel mit Selektionsantibiotikum kultiviert.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden fluoreszierende Stoffe mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt (Exzitation), und geben durch diese Energieaufnahme Licht anderer Wellenlänge ab (Emission). Dies ermöglicht zum Beispiel in der Molekularbiologie durch Markierung mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen die Unterscheidung von

Zellorganellen. Um bei der Mikroskopie den hier untersuchten hP2Y₁₂-Rezeptor erkennen zu können, wurde er mit den fluoreszierenden Proteinen CFP, GFP oder YFP gekoppelt, die ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und gewonnen wurden (Chalfie et al., 1994). So konnte die Lokalisation verschiedener Rezeptorvarianten in der Zellmembran, im Zytoplasma oder in intrazellulären Zellorganellen beobachtet und verglichen werden. Einige Stoffe besitzen außerdem eine schwache Autofluoreszenz, wie zum Beispiel die Aminosäure Tyrosin, die bereits bei der Mikroskopie normaler CHO-Zellen erkennbar ist (Bekard und Dunstan, 2009).

2.3.1 Vorbereitung zur Mikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie werden die zu untersuchenden Zellen auf Glasplatten in 6-Well-Plates ausgesät. Hierzu werden die frisch transfektierten Zellkulturen 25 cm² Zellkulturflaschen mit 2 ml PBS gespült, mit 0,5 ml Trypsin inkubiert, und mit 2,4 ml neuem Medium werden die Zellen vom Flaschenboden wiederholt gelöst. 2 ml der so gewonnenen Zellsuspension werden mit 8 ml neuem Medium zur weiteren Kultur in eine große Zellkulturflasche übertragen und im Brutschrank kultiviert. In die 6-Well-Plates werden je Well 100 µl der suspendierten Zellen pipettiert und mit jeweils 2 ml antibiotikafreiem Medium für 24 Stunden bis zur Mikroskopie inkubiert.

2.3.2 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Die mit Zellen bewachsenen Glasplatten wurden sowohl jeweils an Tag 1 – 3 direkt nach Transfektion als transient exprimierte Kultur, als auch etwa vier Wochen nach Transfektion erneut als stabile Kultur mikroskopiert. Die Messungen erfolgten angepasst an die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei 445 nm (CFP), 488 nm (GFP) und 514 nm (YFP). Es erfolgten sowohl an transfektierten Zellen als auch zum Vergleich an nicht-transfektierten CHO-Zellen jeweils mehrere Messungen der Fluoreszenzintensität an der Zellmembran, intrazellulär, und im Hintergrund (= keine sichtbare fluoreszente Zelle). Die Untersuchung erfolgte an einem Laserscanningmikroskop (ObserverZ.1/LSM700; Zeiss, Jena; Plan-Apochromat-Objektiv, 40x/1.3 Oil DICM27; Zeiss). Die Exzitationswellenlängen waren jeweils 445 nm (CFP), 488 nm (GFP) und 514 nm (YFP). Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Zen Software (Zeiss).

2.3.3 Statistische Auswertung

Mittels ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test (Graphpad Prism software, Graphpad, San Diego) wurde zunächst ermittelt, ob es einen statistisch signifikanten Ort der Expression innerhalb einer Rezeptorvariante gibt. Zudem wurde die transiente und stabile Zelllinie einer Rezeptorvariante miteinander verglichen. Schließlich wurde die membranständige und zytoplasmatische Expression verschiedener Rezeptorvarianten in Relation zum nicht-mutierten, lediglich mit CFP/GFP/YFP markierten Wildtyprezeptor verglichen. Unterschiede wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner $p < 0,05$ betrug.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Mutagene PCR

Durch Verwendung mehrerer hP2Y₁₂-Rezeptorvarianten als Template und Gebrauch verschiedener Primer konnten multiple Mutanten erzeugt werden. Durch Verwendung von Mutanten als Template, die bereits an fluoreszierende Proteine gekoppelt wurden, konnten diese durch verschiedene Primer mutiert werden. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die erstellten hP2Y₁₂-Rezeptormutanten, die in weiterführenden Versuchen Verwendung fanden.

Tab. 3: Übersicht über die durch PCR gewonnenen hP2Y₁₂-Rezeptorvarianten

hP2Y ₁₂ + fluoreszierendes Protein	hP2Y ₁₂ _CFP hP2Y ₁₂ _YFP GFP_hP2Y ₁₂ GFP_hP2Y ₁₂ _CFP hP2Y ₁₂ _YFP
delPDZ-Varianten	hP2Y ₁₂ _delPDZ hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP hP2Y ₁₂ _delPDZ_YFP
del321_342-Varianten	hP2Y ₁₂ _del321_342 hP2Y ₁₂ _del321__342_CFP
P341A-Varianten	hP2Y ₁₂ _P341A GFP_hP2Y ₁₂ _P341A_CFP
2PDZ-Varianten	hP2Y ₁₂ _2PDZ

3.1.2 DNA-Nachweisverfahren – Agarose-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse einer Agarose-Gelelektrophorese nach PCR sowie nach Plasmidpräparation werden in Abbildung 2 bzw. Abbildung 3 demonstriert.

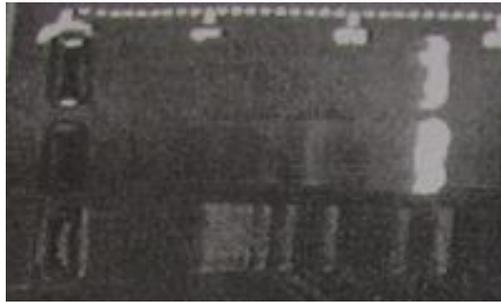


Abb. 2: Gelelektrophorese nach PCR.

Beide PCR-Produkte zeigen die Länge (z.B. 2647 bp bei GFP_hP2Y₁₂_ECFP). In der dritten Zeile/Tasche liegt zur Größenbestimmung eine 1 kb DNA-Leiter vor.

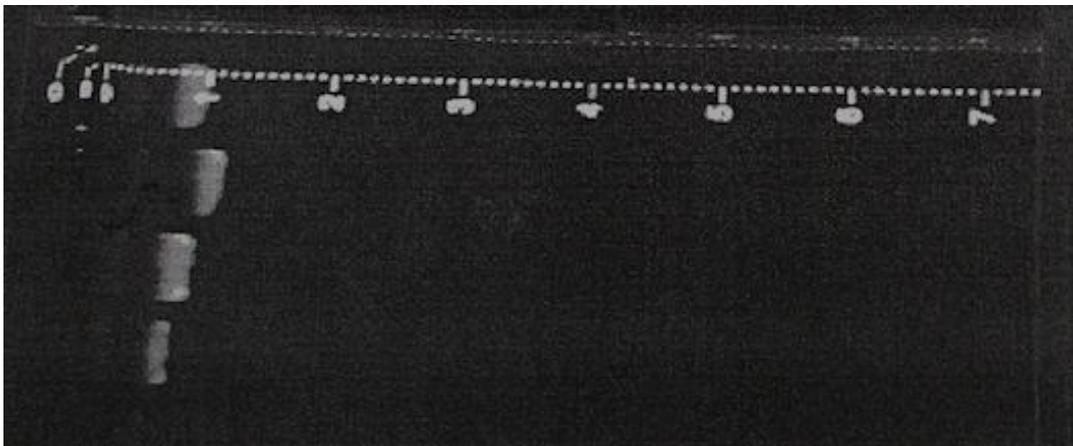


Abb. 3: Gelelektrophorese nach Plasmidpräparation.

Erwartete Konstrukte von oben nach unten: delPDZ, 3 x P341A. Der Größenunterschied des zweiten Produktes von oben im Vergleich zu den restlichen ist deutlich erkennbar, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um einen geschlossenen Vektor.

3.1.3 Klonierung und Plasmidpräparation

Tabelle 4 bietet eine Übersicht über die hP2Y₁₂-Rezeptorvarianten, die an pcDNA-Vektoren kloniert und nach Transformation in *E. coli* durch Plasmidpräparation extrahiert werden konnten.

Tab. 4: Übersicht über die nach Klonierung und Plasmidpräparation gewonnenen hP2Y₁₂-Rezeptorvarianten.

fett = Varianten, in denen in der extern durchgeführten Sequenzanalyse keine zusätzlichen, ungewünschten Mutationen nachgewiesen werden konnten.

pcDNA6.2	hP2Y ₁₂ und fluoreszierendes Protein	GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA6.2 hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2
	delPDZ-Varianten	GFP_hP2Y₁₂_delIPDZ_CFP_pcDNA6.2 hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2
	del321_342-Varianten	GFP_hP2Y₁₂_del321_342_CFP_pcDNA6.2 hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2
	P341A-Varianten	GFP_hP2Y ₁₂ _P341A_CFP_pcDNA6.2 hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2
	2PDZ-Varianten	hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2
pcDNA5	hP2Y ₁₂ und fluoreszierendes Protein	GFP_hP2Y ₁₂ _pcDNA5 GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5 hP2Y₁₂_YFP_pcDNA5 hP2Y ₁₂ _CFP_YFP_pcDNA5
	delPDZ-Varianten	hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA5 GFP_hP2Y ₁₂ _delIPDZ_CFP_pcDNA5 hP2Y ₁₂ _delIPDZ_CFP_pcDNA5
	del321_342-Varianten	hP2Y ₁₂ _del321_342_CFP_pcDNA5

3.2 Zellkultur

3.2.1 Transfektion

Tabelle 5 bietet eine Übersicht über die durch Plasmidpräparation gewonnenen Rezeptorvarianten, welche zur weiteren Untersuchung in CHO-Zellen transfektiert wurden. In der Regel wurde hierbei eine transiente Transfektion mit Lipofectamin (siehe 2.2.5) durchgeführt, zur Methodenfindung wurde in nur einem Fall (*) eine Transfektion nach FlpIn-System (siehe 2.2.6) durchgeführt. Einige Varianten wurden trotz vorhandener Mutation untersucht, da es teilweise nicht gelang Rezeptoren ohne zusätzliche unerwünschte Mutationen zu klonieren (vgl. 4.1).

Tab. 5: Übersicht über die transfektierten Zelllinien, die hinsichtlich ihrer Expression unter dem Laserscanningmikroskop analysiert wurden

pcDNA6.2	hP2Y ₁₂ und fluoreszierendes Protein	hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2 hP2Y ₁₂ _CFP_YFP_pcDNA6.2 GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA6.2 GFP_hP2Y ₁₂ _pcDNA6.2
	delPDZ-Varianten	GFP_hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP_pcDNA6.2 hP2Y ₁₂ _delPDZ_YFP_pcDNA6.2
	del321_342-Varianten	hP2Y ₁₂ _del321_342_YFP_pcDNA6.2
	P341A-Varianten	hP2Y ₁₂ _P341A_YFP_pcDNA6.2
	2PDZ-Varianten	hP2Y ₁₂ _2PDZ_YFP_pcDNA6.2
pcDNA5	hP2Y ₁₂ und fluoreszierendes Protein	hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5 hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2
	delPDZ-Varianten	hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP_pcDNA5 (Phe79Ala) *

3.3 Fluoreszenzmikroskopie – Abbildungen

Im Folgenden (Abbildungen 4 – 18) soll eine Auswahl der durch Laserscanningmikroskopie gewonnenen Abbildungen transienter und stabil exprimierter Rezeptorkonstrukte dargestellt werden.

In den nicht-transfektierten CHO-Kontrollzellen (Abbildung 4) waren, wie zu erwarten, lediglich gering fluoreszierende Punkte zu sehen, die autofluoreszierende Tyrosinreste darstellen (nur im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar), darüber hinaus war kein Signal detektierbar.

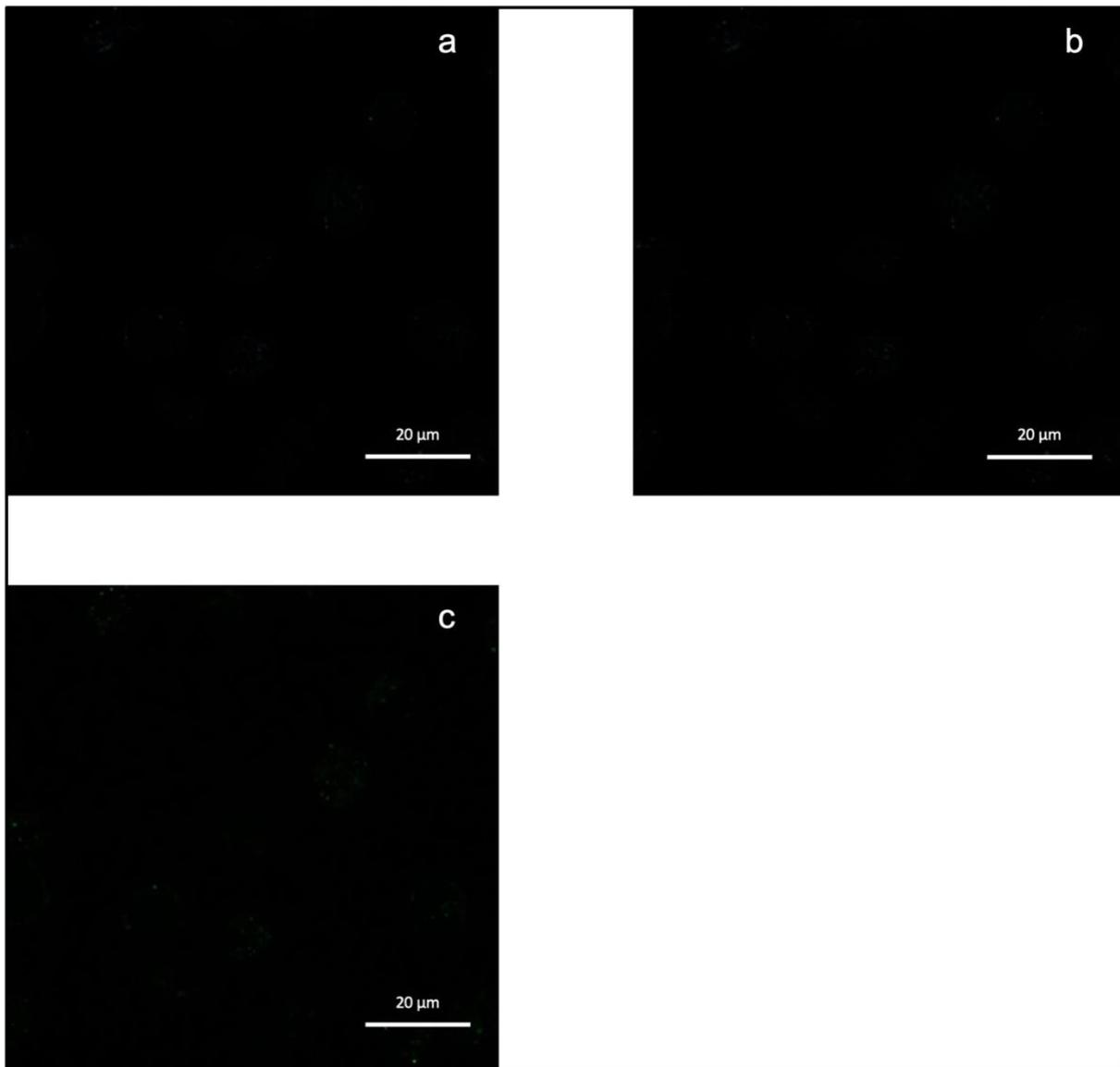


Abb. 4: Laser-Scanning-Mikroskopie der nicht-transfizierten CHO-Kontrollzellen (a-c). Größenmaßstab 20 µm.

Im Folgenden wurden zunächst die C-Terminal mit CFP gekoppelten Rezeptoren analysiert. Die Zelllinie mit dem nicht-mutierten, lediglich durch CFP am C-Terminus gekoppelten Wildtyprezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 (Abbildung 5) zeigte eine deutliche membranständige Expression sowohl der transienten, als auch der stabil exprimierten Zelllinie.

Die Zelllinie mit Deletion der PDZ-Domäne (hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5(Phe79Ala); Abbildung 6) zeigte eine deutliche, überwiegend membranständige Expression des Rezeptors mit teils unterschiedlicher Fluoreszenzintensität.

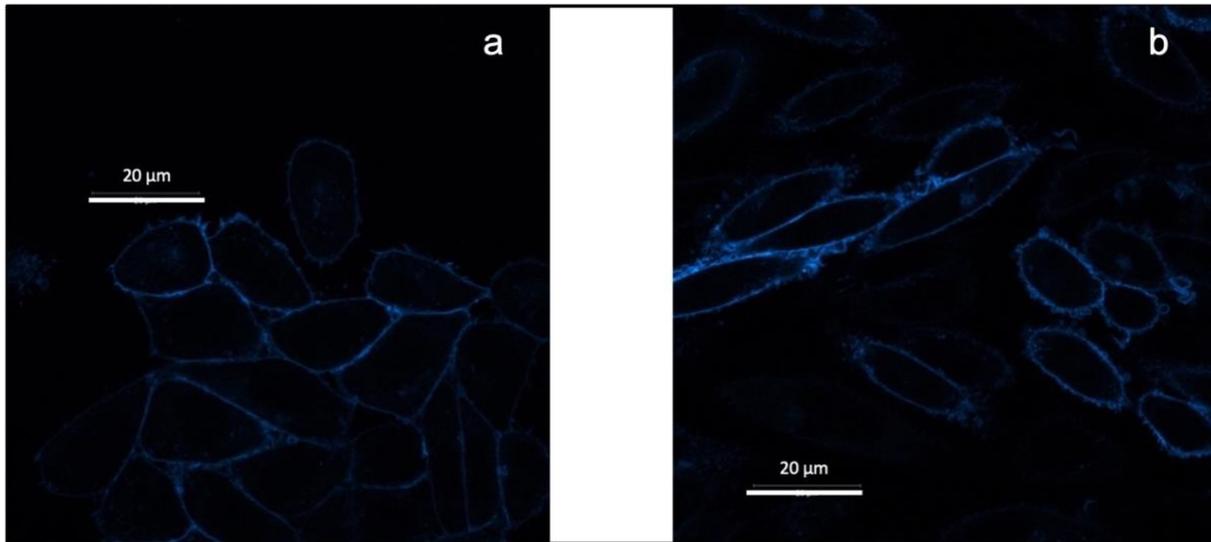


Abb. 5: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) transfizierten Zelllinie hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 (ohne Mutation). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

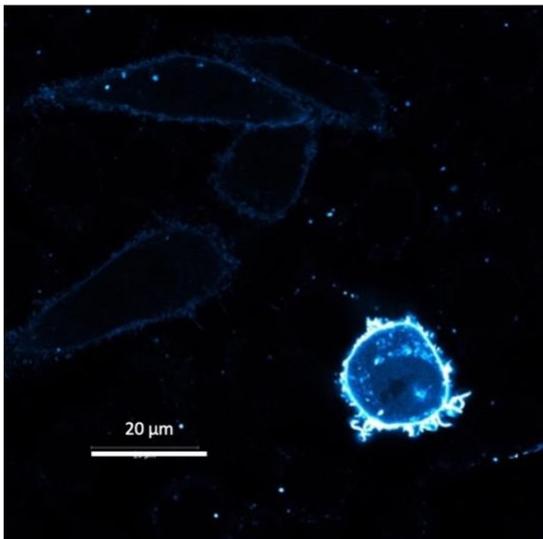


Abb. 6: Laser-Scanning-Mikroskopie der stabil transfizierten Zelllinie hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5(Phe79Ala). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

Bei dem Rezeptorkonstrukt hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 7) wird sowohl der an CFP (a) als auch an YFP gekoppelte Rezeptor (b) exprimiert, hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 bevorzugt membranständig, in manchen Zellen aber auch geringfügig intrazellulär; hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 findet sich ebenfalls sowohl membranständig als auch vermehrt intrazellulär. Teilweise findet eine Kolokalisation in denselben Zellen statt (c).

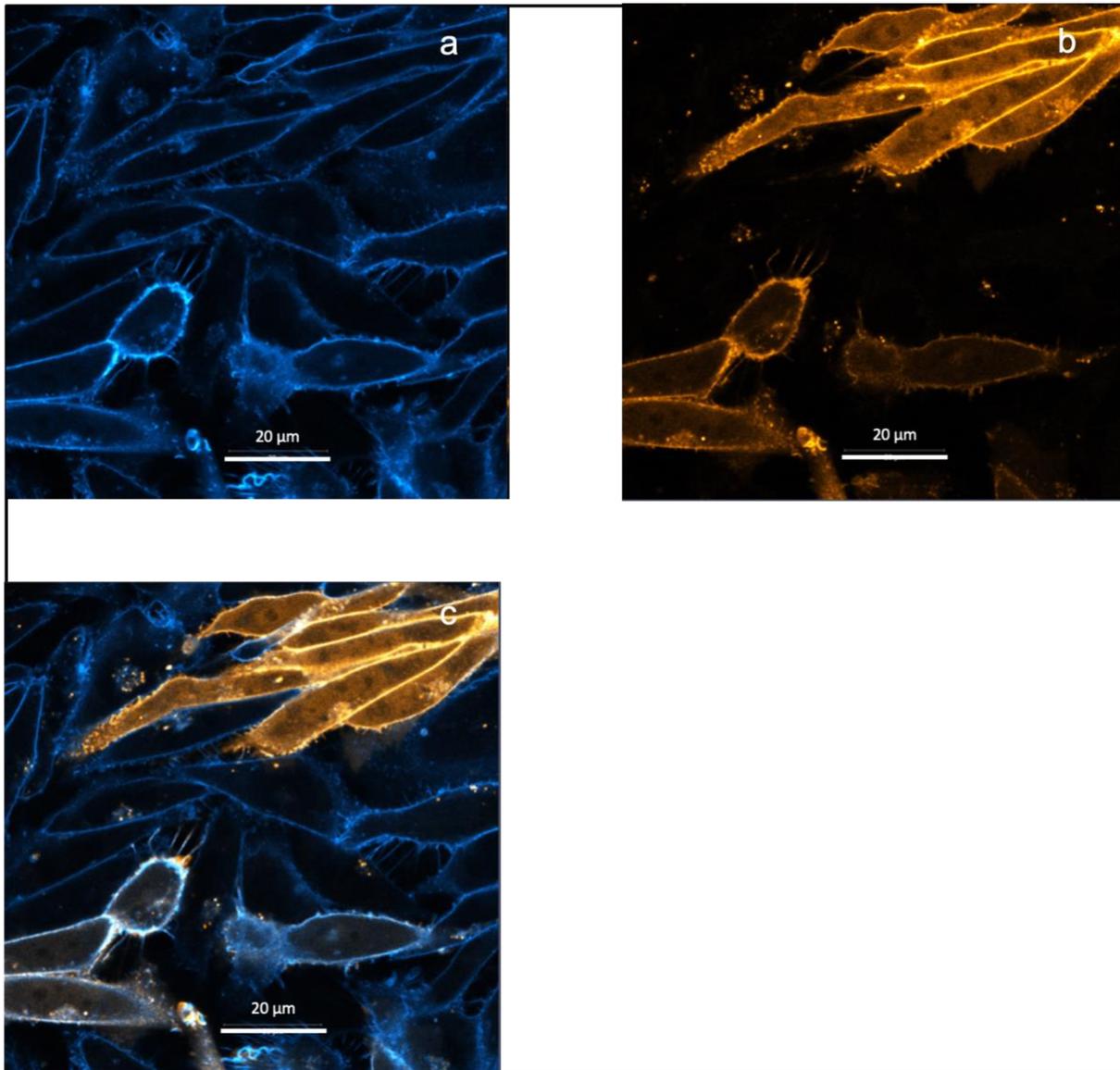


Abb. 7: Laser-Scanning-Mikroskopie der transient (a-c) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

Das Expressionsmuster der N-Terminal gekoppelten Rezeptoren unterschied sich von denen der C-Terminal gekoppelten Rezeptoren (Abbildungen 8 – 11). Beim transient exprimierten Wildtyprezeptor GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6.2 (Abbildung 8), konnte der Rezeptor sowohl durch Expression von GFP (a) als auch von CFP (b) nachgewiesen werden, kolokalisiert (c), gleichwertig membranständig und intrazellulär. In der stabil exprimierten Zelllinie (Abbildung 9) konnte der Rezeptor sowohl durch GFP (a) als auch CFP (b) sehr stark (über-)exprimiert nachgewiesen werden, scheinbar kolokalisiert (c), gleichwertig membranständig und intrazellulär.

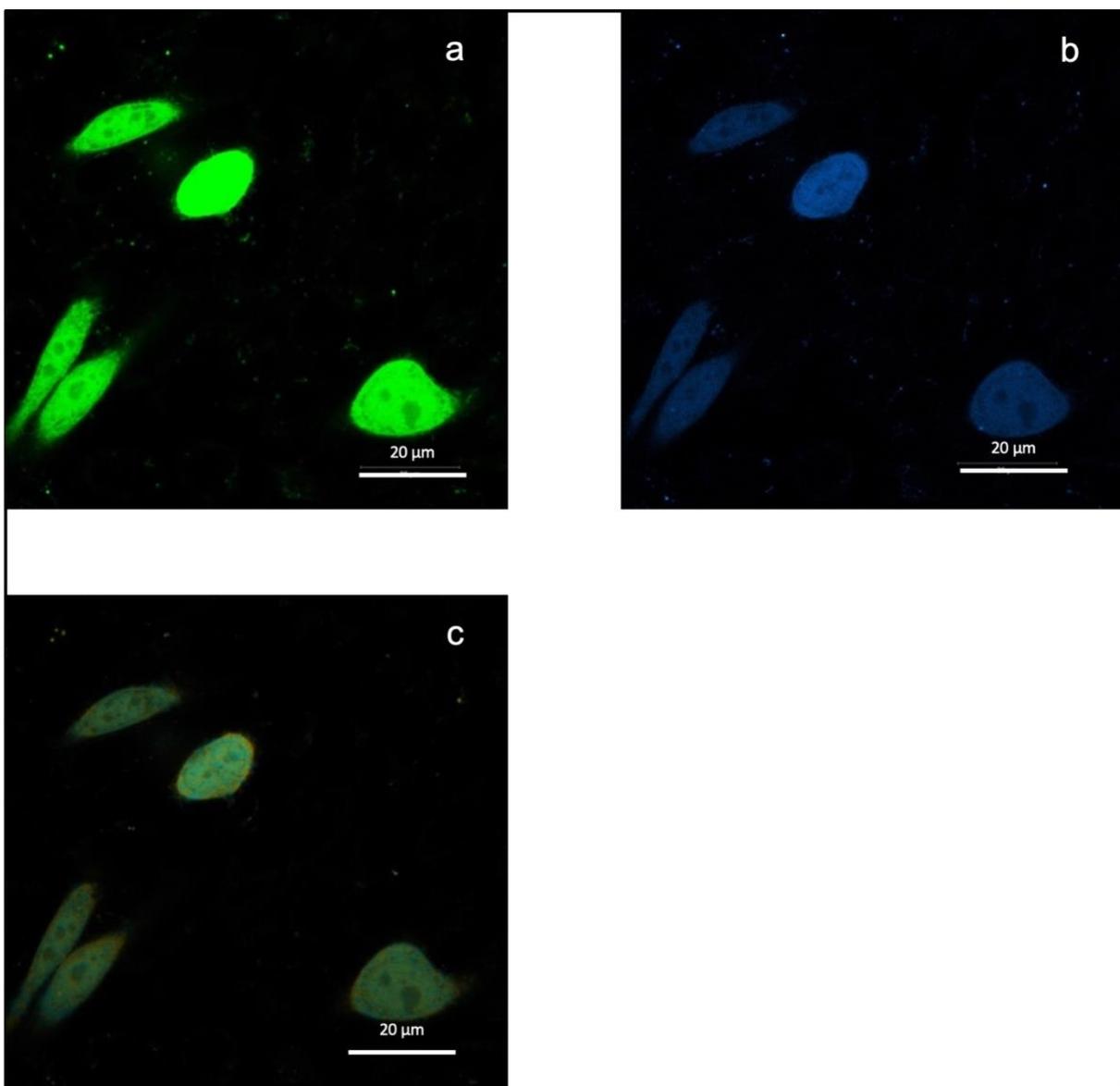


Abb. 8: Laser-Scanning-Mikroskopie der transient transfizierten Zelllinie GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6.2 (a-c). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 μm.

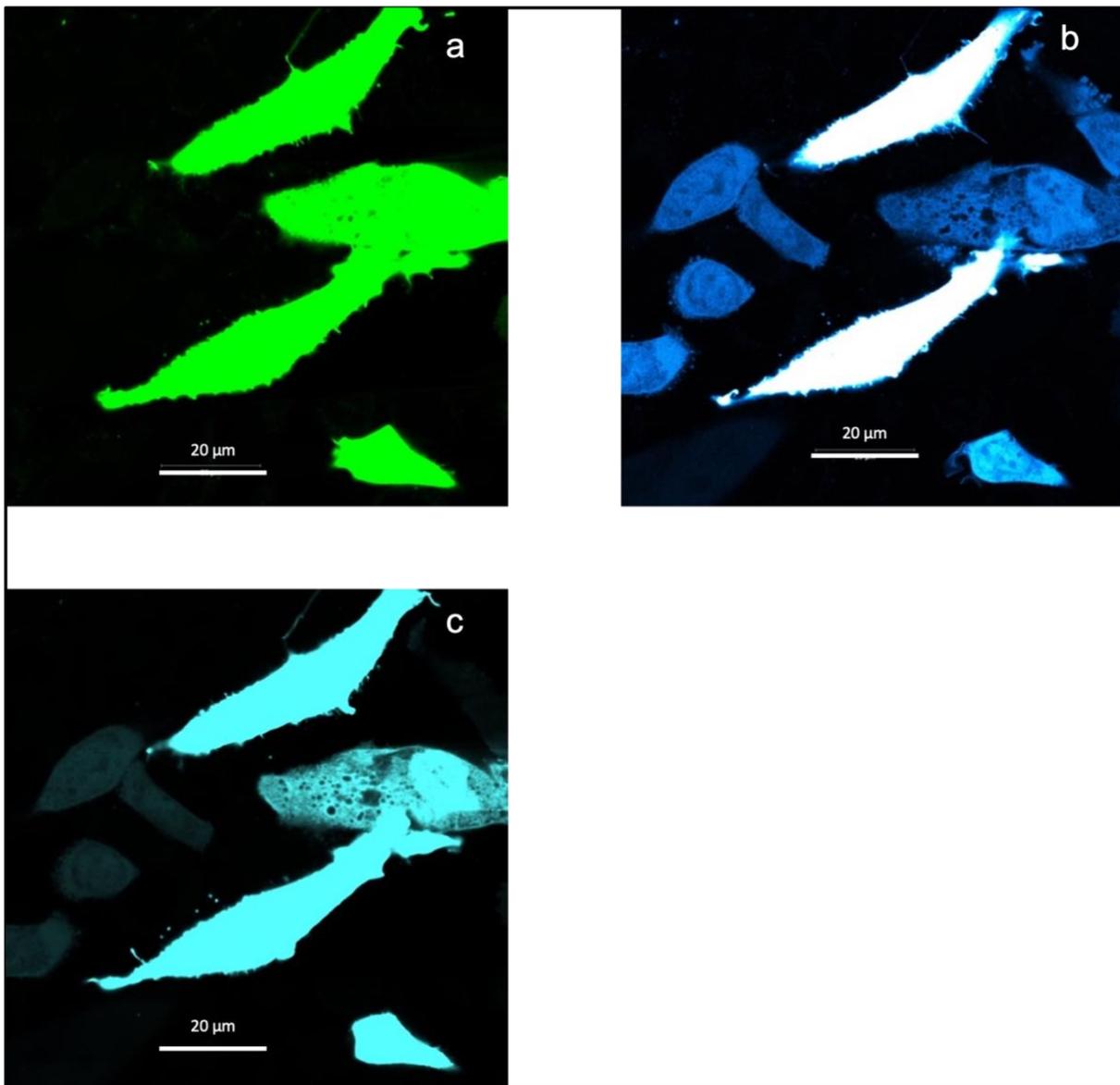


Abb. 9: Laser-Scanning-Mikroskopie der stabil transfizierten Zelllinie GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6.2 (a-c). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

Der Rezeptor GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA6.2 wurde in der transienten Zelllinie (Abbildung 10) sowohl durch Expression von GFP (a) als auch CFP (b) nachgewiesen werden, bevorzugt intrazellulär, scheinbar kolokalisiert (c). GFP scheint etwas stärker exprimiert zu werden als CFP. In der stabilen Zelllinie (Abbildung 11) konnte der Rezeptor durch die insgesamt stärkere (Über-)expression beider Farbstoffe dargestellt werden, GFP (a) mehr als CFP (b). Die Expression erfolgt jeweils bevorzugt intrazellulär, scheinbar kolokalisiert (c). Die Form der Zellen hat sich im Vergleich zur transienten

Zelllinie verändert und wirkt nun rundlich. Der N-Terminal mit GFP gekoppelte Wildtyprezeptor GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6.2 (Abbildung 12) wird überwiegend intrazellulär exprimiert, zudem scheint es zu einer vermehrten Ablagerung in intrazellulären Zellkompartimenten zu kommen. Die Zellen haben insgesamt eine rundliche Form.

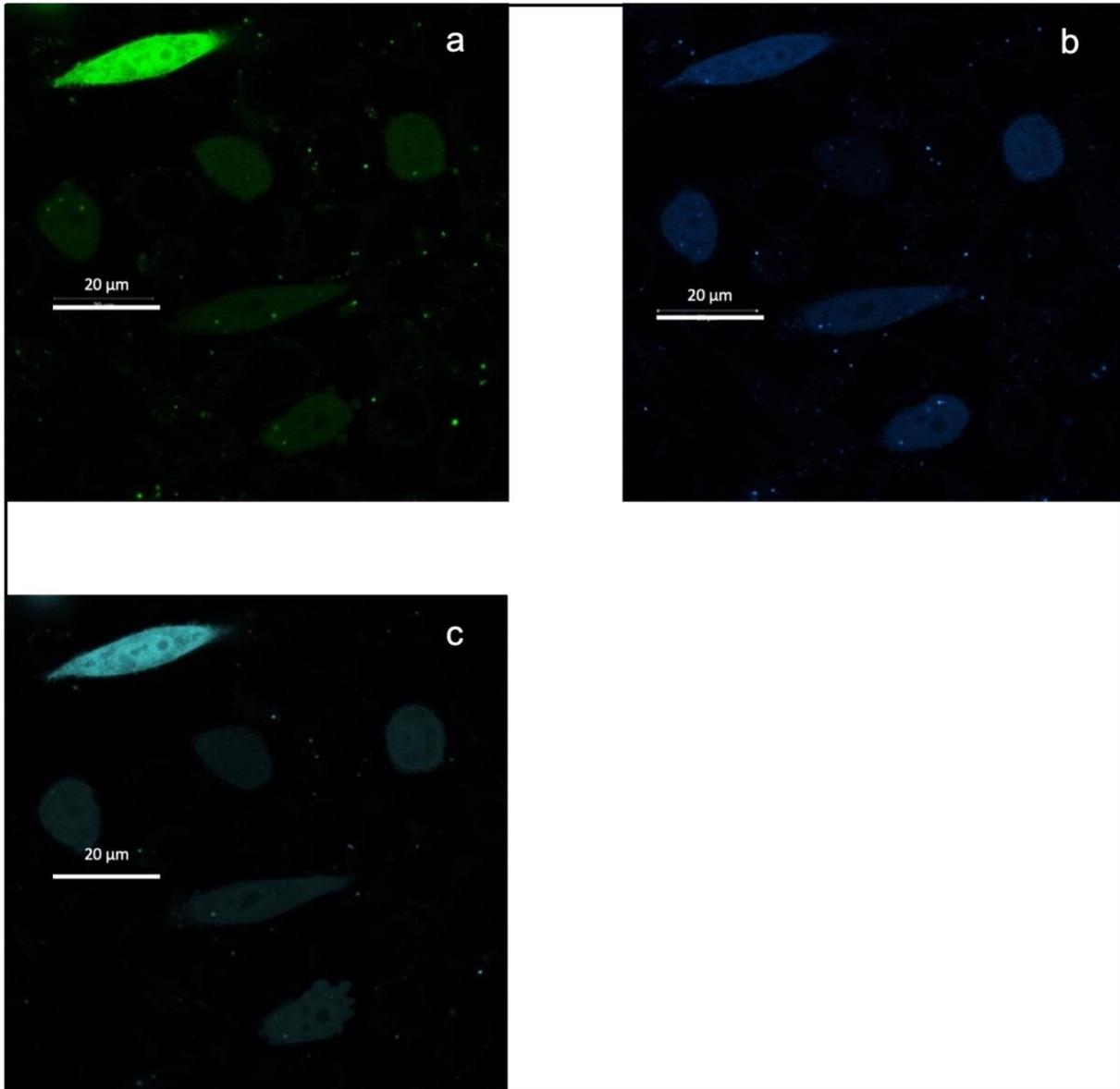


Abb. 10: Laser-Scanning-Mikroskopie der transient transfizierten Zelllinie GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA6.2 (a-c). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

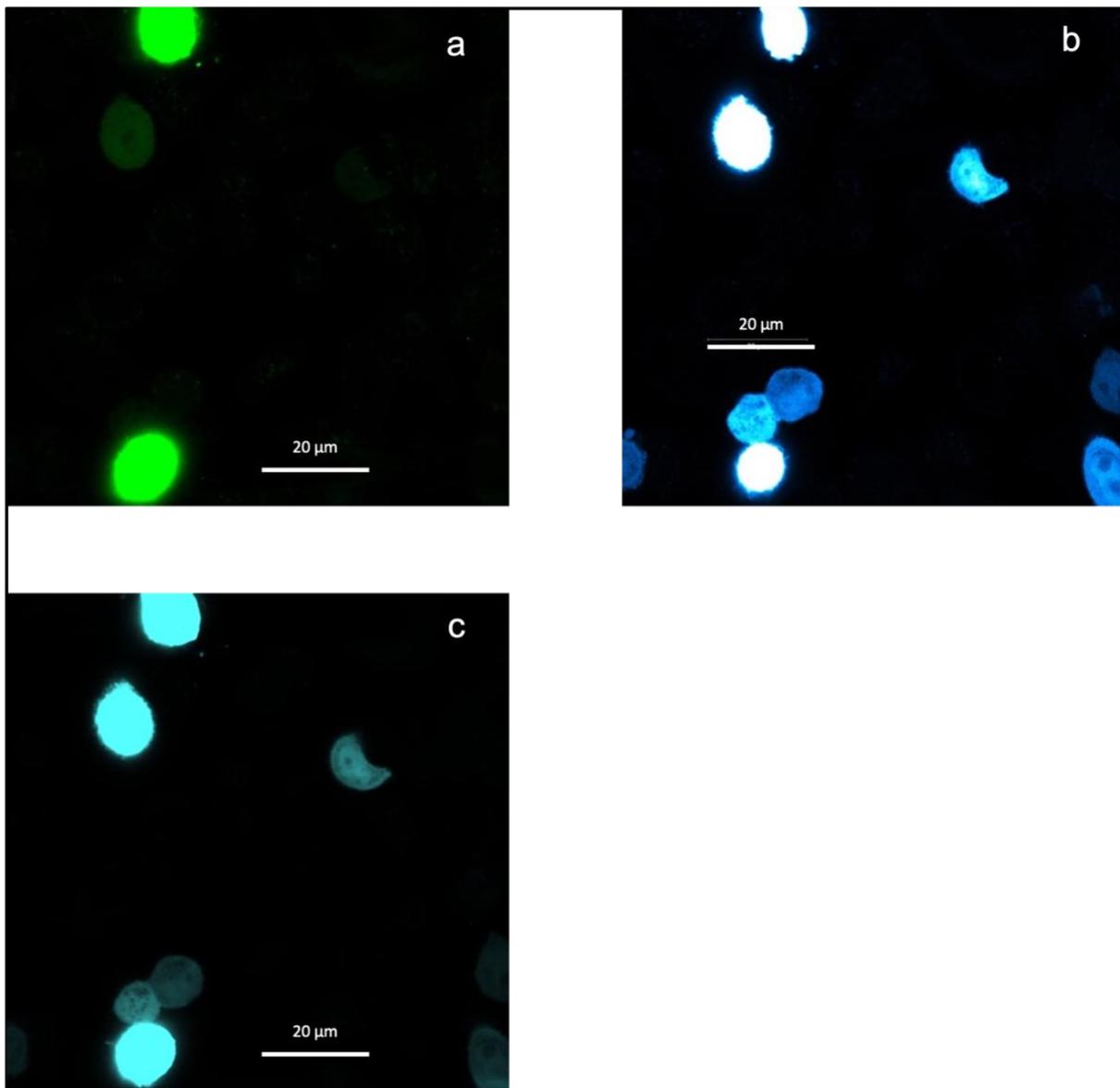


Abb. 11: Laser-Scanning-Mikroskopie der stabil transfizierten Zelllinie GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA6.2 (a-c). Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

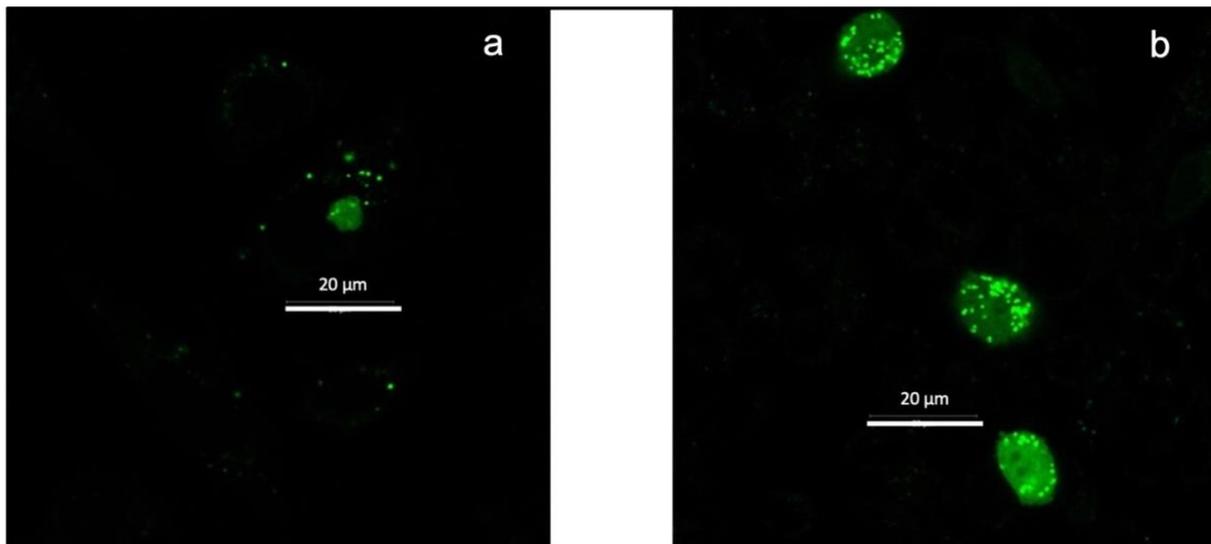


Abb. 12: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) transfizierten Zelllinie GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 μm.

Der transient (a) und stabil (b) exprimierte Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 13) konnte durch beide Farbstoffe nachgewiesen werden, wobei CFP scheinbar bevorzugt membranständig, und YFP intrazellulär nachgewiesen werden kann.

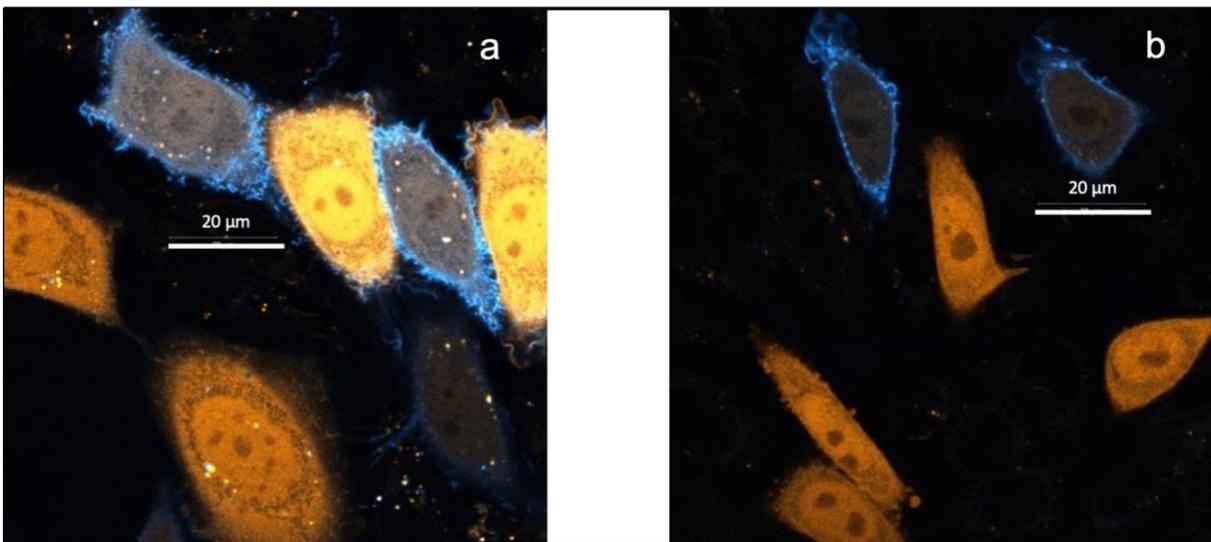


Abb. 13: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 μm.

Der Rezeptor hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 14) wurde in manchen Zellen sowohl transient (a) als auch stabil (b) bevorzugt membranständig, in anderen intrazellulär exprimiert. Auffällig war, dass sich an Tag 2 der Mikroskopie vermehrt Zellen mit intrazellulärer Expression, an Tag 3 vermehrt mit membranständiger Expression fanden.

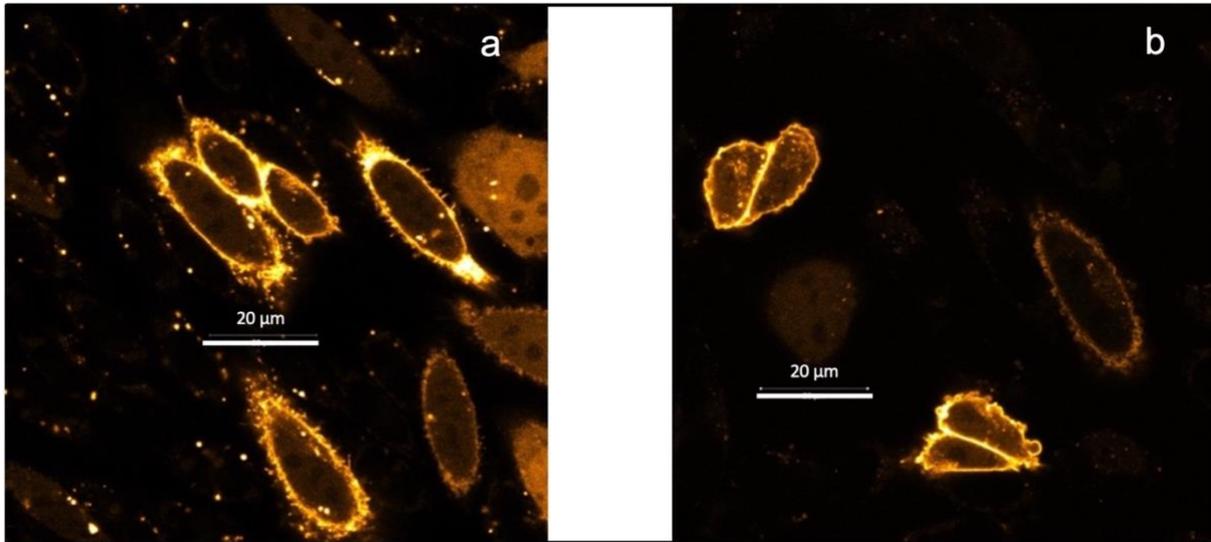


Abb. 14: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 μm.

Der Rezeptor hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 15) wurde sowohl transient (a) als auch stabil (b) zum Teil membranständig und teilweise intrazellulär exprimiert.

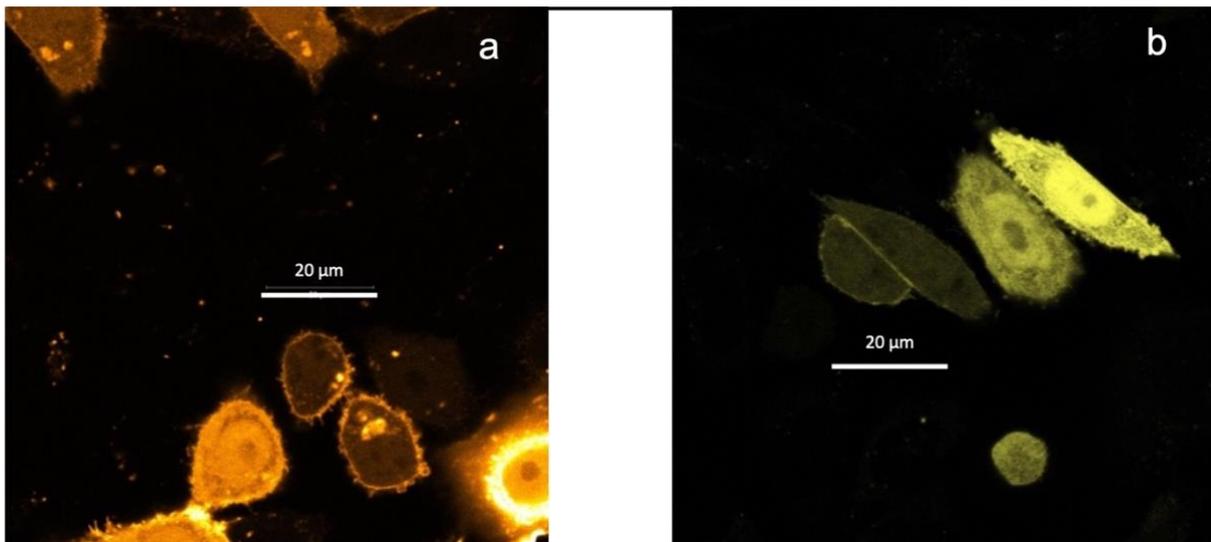


Abb. 15: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

Die Rezeptorvariante hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 16) wurde in der transienten Zelllinie (a) in manchen Zellen teils membranständig, teils intrazellulär exprimiert, wobei die membranständige Expression auch bei Zellen mit intrazellulärer Expression deutlich erkennbar ist. Als stabile Zelllinie (b) wurde der Rezeptor in den meisten Zellen ausschließlich membranständig exprimiert.

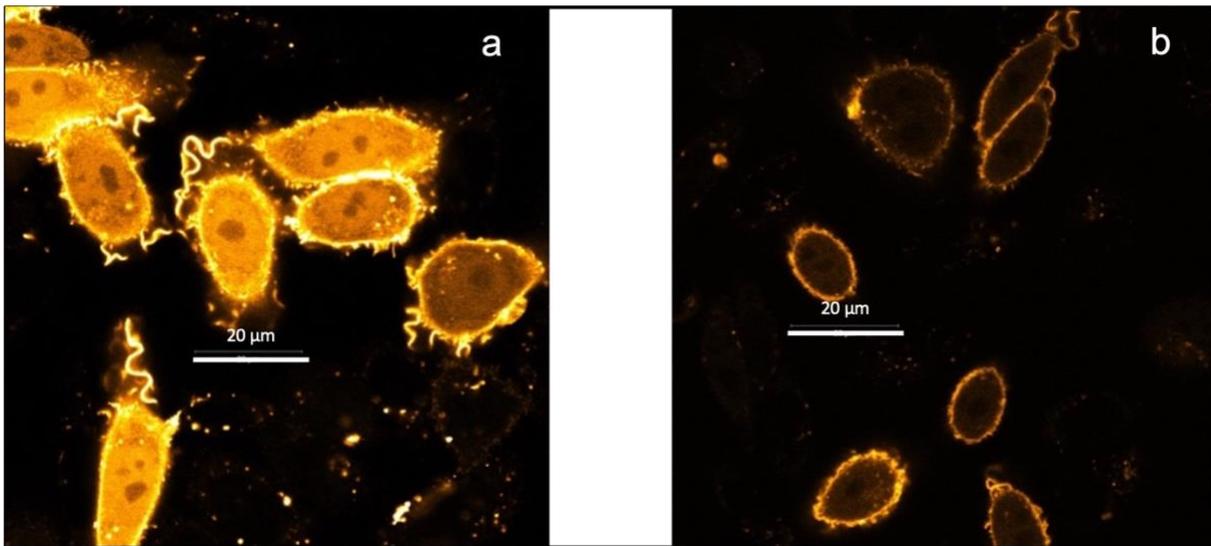


Abb. 16: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

In Zellen mit der Rezeptorvariante mit Dopplung der PDZ-Domäne hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 17) konnte sowohl transient (a) als auch stabil (b) teilweise eine bevorzugt membranständige, als auch teilweise eine diffuse intrazelluläre Expression nachgewiesen werden. Ein ähnliches Expressionsmuster fand sich in Zellen mit der Rezeptorvariante mit Deletion der PDZ-Domäne hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 18) sowohl in transienter (a), als auch in stabiler (b) Zelllinie.

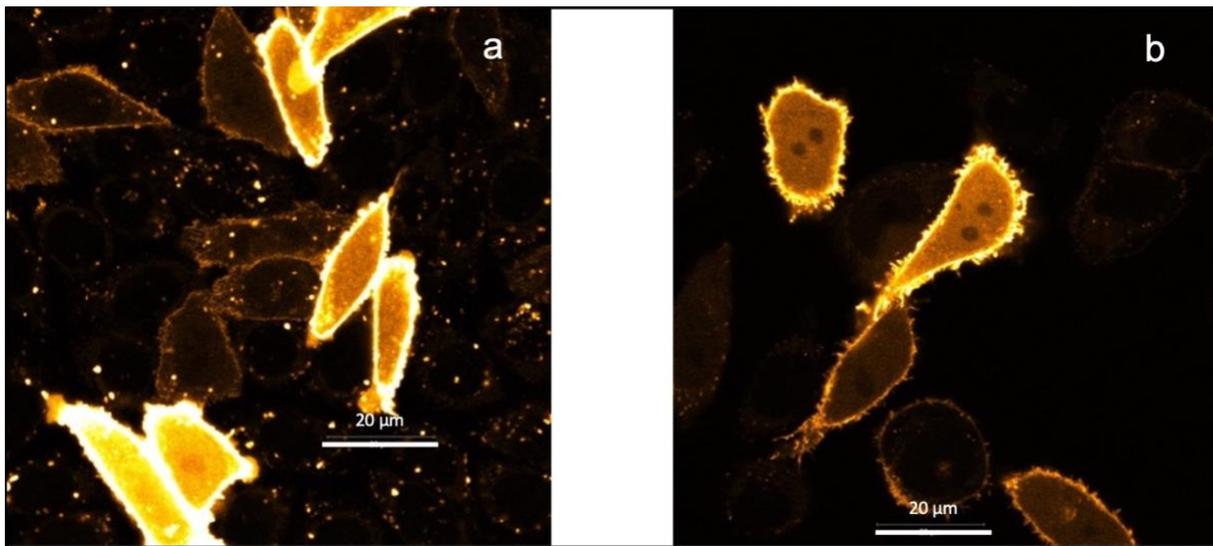


Abb. 17: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

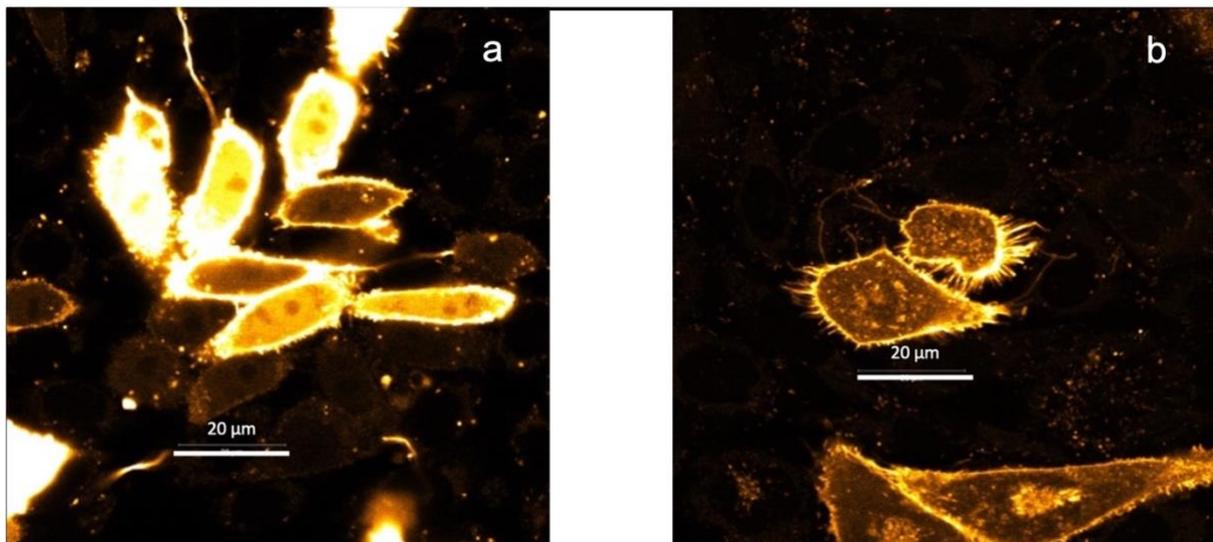


Abb. 18: Laser-Scanning-Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_delPDZ_YFP_pcDNA6.2. Falschfarbendarstellung. Größenmaßstab 20 µm.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie – Statistische Auswertung

3.4.1 CFP

Die Ergebnisse der Auswertung der an CFP gekoppelten Rezeptoren werden in Abbildung 19-24 und Tabelle 6 abgebildet und im Folgenden detailliert erläutert. Für den stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5, hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5, den transient und stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2, sowie den transient exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP konnte eine statistisch signifikante überwiegend membranständige Expression nachgewiesen werden (Tabelle 6). Eine überwiegend membranständige Expression, die jedoch nicht statistisch signifikant war, wurde bei dem transient exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5, sowie dem stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2 beobachtet (Tabelle 6). Bei allen Konstrukten, die zusätzlich am N-Terminus an GFP gekoppelt waren, war keine membranständige Expression mehr vorhanden, sondern eine diffuse zytoplasmatische Expression des Rezeptors (Tabelle 6).

Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden zwischen den transienten und stabil exprimierten Zelllinien eines Rezeptorkonstruktes verglichen, um eine mögliche Änderung im zeitlichen Verlauf zu evaluieren. Der Ort der bevorzugten Expression blieb jeweils unverändert, das Ausmaß der Lichtintensität unterschied sich jedoch in allen Konstrukten zwischen der transient und stabil exprimierten Zelllinie. Beim lediglich mit CFP gekoppelten Wildtyprezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 (Abbildung 19) bestand eine signifikant höhere Lichtintensität an der Zellmembran in der transient exprimierten Zelllinie, zytoplasmatisch war die Lichtintensität ebenfalls in der transienten Zelllinie erhöht, allerdings nicht signifikant. Die Zellen mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 20) zeigten stabil exprimiert eine insgesamt höhere Lichtintensität, die aber nur an der Zellmembran statistisch signifikant war. Die Rezeptoren, die N-Terminus zusätzlich an GFP gekoppelt waren (GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 und GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5; Abbildung 21 und 22) zeigten eine statistisch signifikante bevorzugte zytoplasmatische (Über-)Expression in den jeweils stabil exprimierten Zelllinien. Die Zellen mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA5 (Abbildung 23) zeigten ein insgesamt höheres

Lichtintensitätsniveau in der transient exprimierten Zelllinie, welches allerdings nur an der Zellmembran signifikant war.

Das Maß der Lichtintensität an der Zellmembran und im Zytoplasma aller stabil exprimierten, mit CFP gekoppelten Rezeptoren wurde in Relation zum nicht-modifizierten, lediglich mit CFP markierten Wildtyprezeptor verglichen (Abbildung 24). Membranständig bestand in keiner Rezeptorvariante ein statistisch signifikanter Unterschied zum Wildtyprezeptor oder untereinander, zytoplasmatisch zeigte sich eine signifikante Überexpression der am N-Terminus zusätzlich an GFP gekoppelten Rezeptoren GFP_hP2Y₁₂_CFP und GFP_hP2Y₁₂_delIPDZ_CFP (jeweils $p < 0,01$).

Tab. 6: Übersicht über die mit CFP markierten Konstrukte. Angegeben sind die Anzahl der jeweiligen Messdaten an der Zellmembran, im Zytoplasma, sowie im Hintergrund der transienten (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptoren. Die Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der gemessenen Lichtintensität an Zellmembran und Zytoplasma wurden verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur), statistisch signifikante p-Werte sind mit * markiert.

Rezeptor	MW \pm SEM in Zellmembran/ Zytoplasma	p-Wert	Anzahl Messdaten n=		
			Zell- membran	Zyto- plasma	Hinter- grund
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5_t	23076 \pm 7349/ 7375 \pm 3040	0,11	11	11	4
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5_s	8222 \pm 715/ 868 \pm 69	<0,01*	30	30	10
hP2Y ₁₂ _delIPDZ_CFP_pcDNA5_t	8137 \pm 404/ 577 \pm 30	<0,01*	30	30	6
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_t	11266 \pm 1171/ 2256 \pm 202	<0,01*	30	30	11
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_s	28932 \pm 3808/ 4142 \pm 550	<0,01*	30	30	7
GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5_t	6666 \pm 1078/ 7175 \pm 1330	0,94	17	17	7
GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5_s	21745 \pm 4102/ 21458 \pm 4198	0,99	29	29	5
GFP_hP2Y ₁₂ _delIPDZ_CFP_pcDNA5_t	7140 \pm 2399/ 7362 \pm 2739	0,99	18	18	7
GFP_hP2Y ₁₂ _delIPDZ_CFP_pcDNA5_s	30042 \pm 4218/ 32870 \pm 4489	0,88	31	31	5
hP2Y ₁₂ _CFP__YFP_pcDNA6.2_t	24045 \pm 4017/ 6325 \pm 778	<0,01*	31	31	9
hP2Y ₁₂ _CFP__YFP_pcDNA6.2_s	4954 \pm 1389/ 2341 \pm 906	0,23	19	19	5

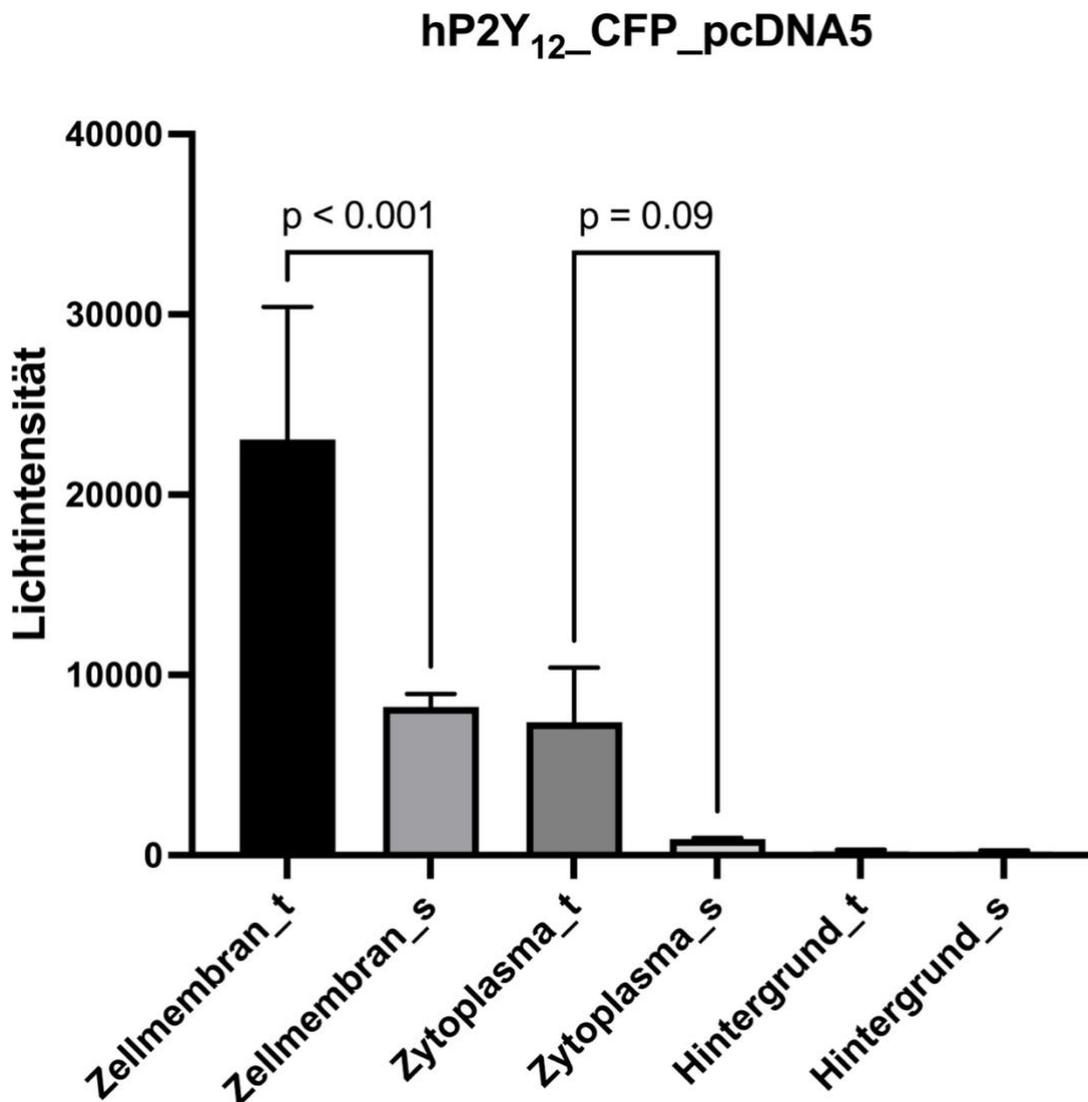


Abb. 19: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transient und stabil transfizierter Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

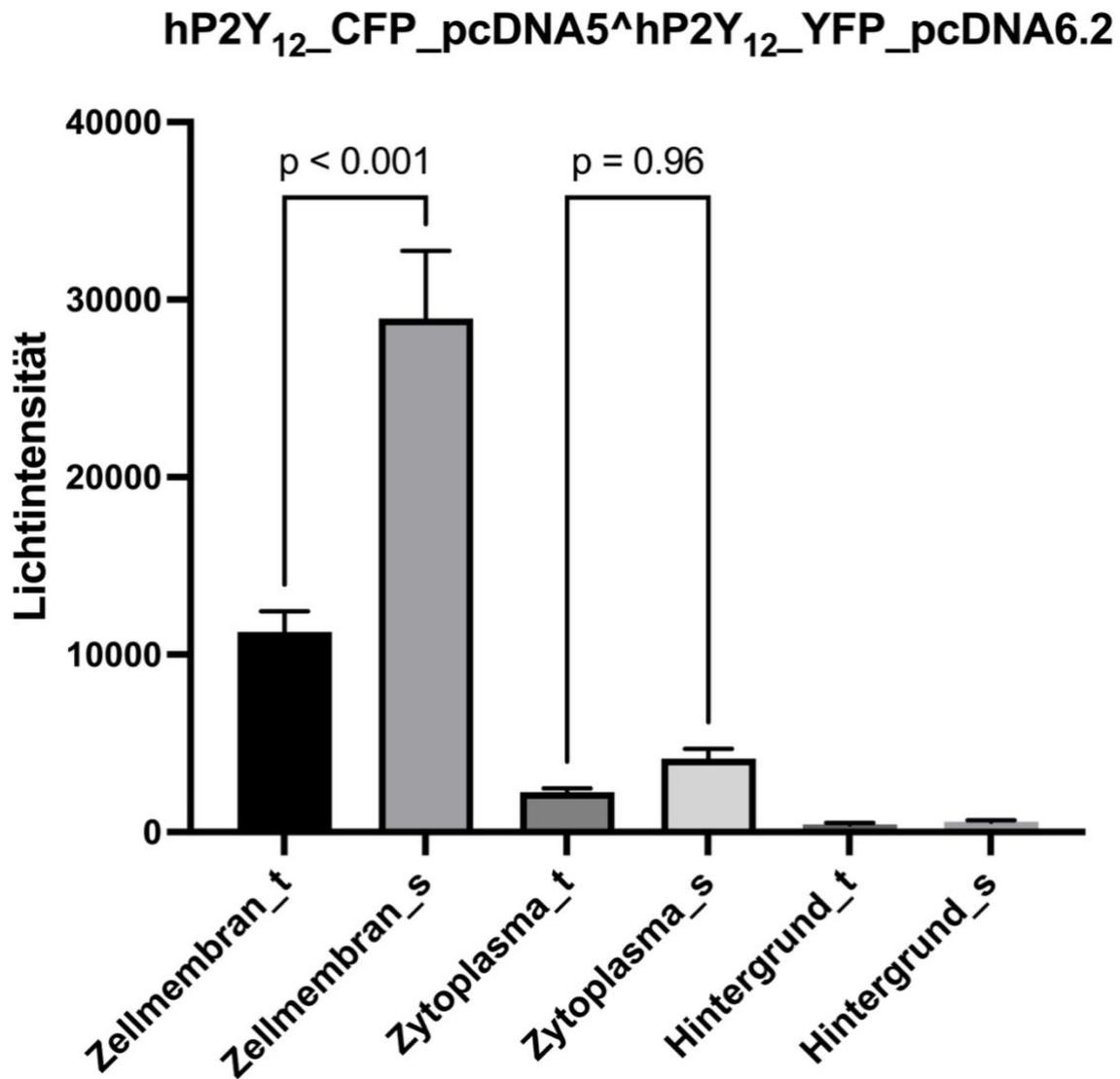


Abb. 20: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5

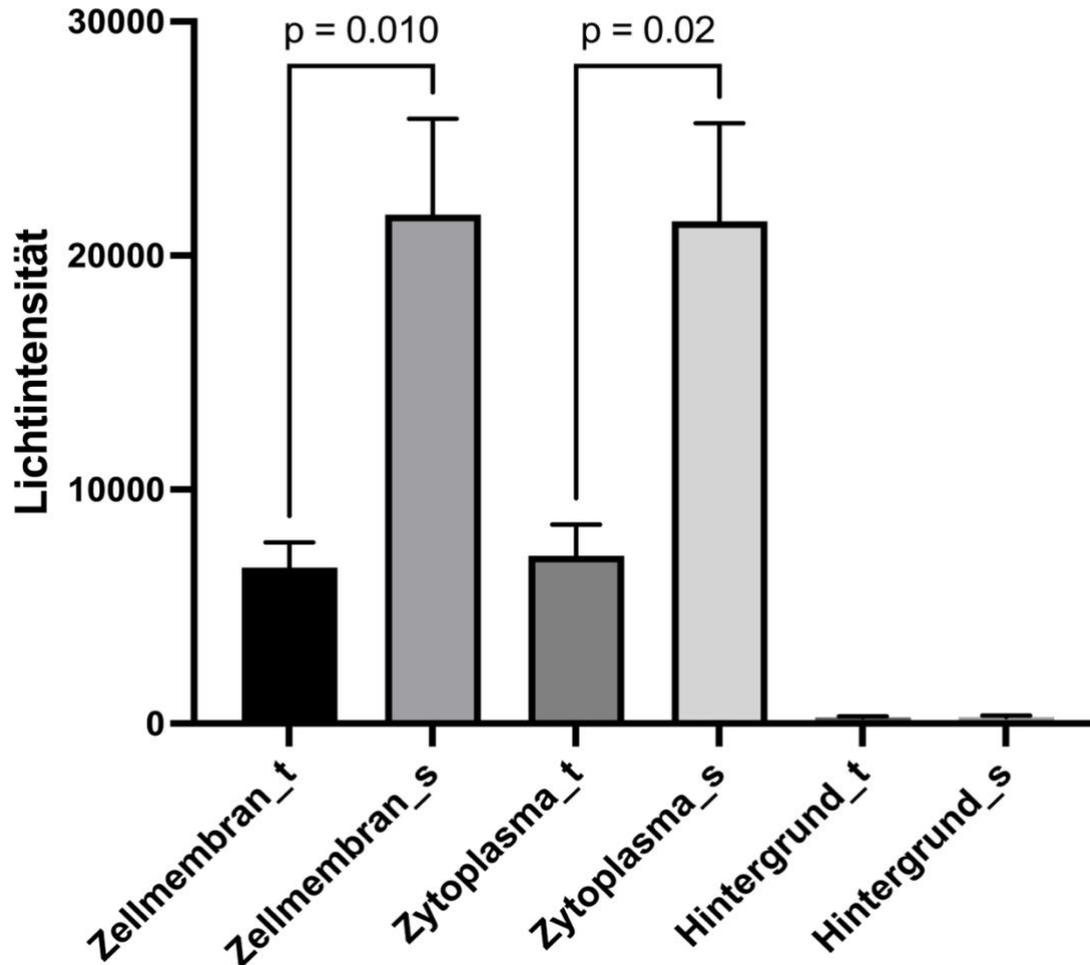


Abb. 21: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

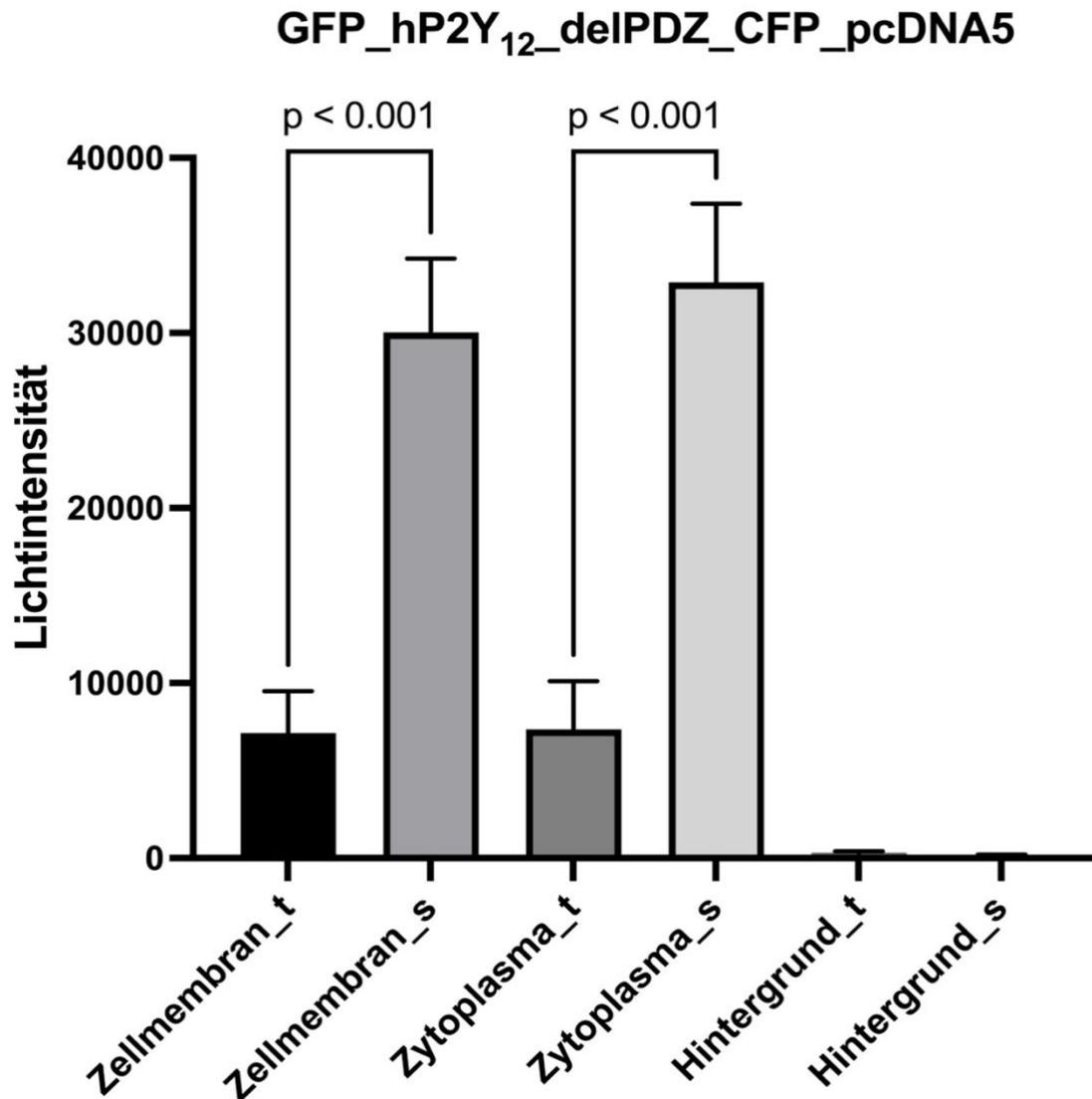


Abb. 22: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

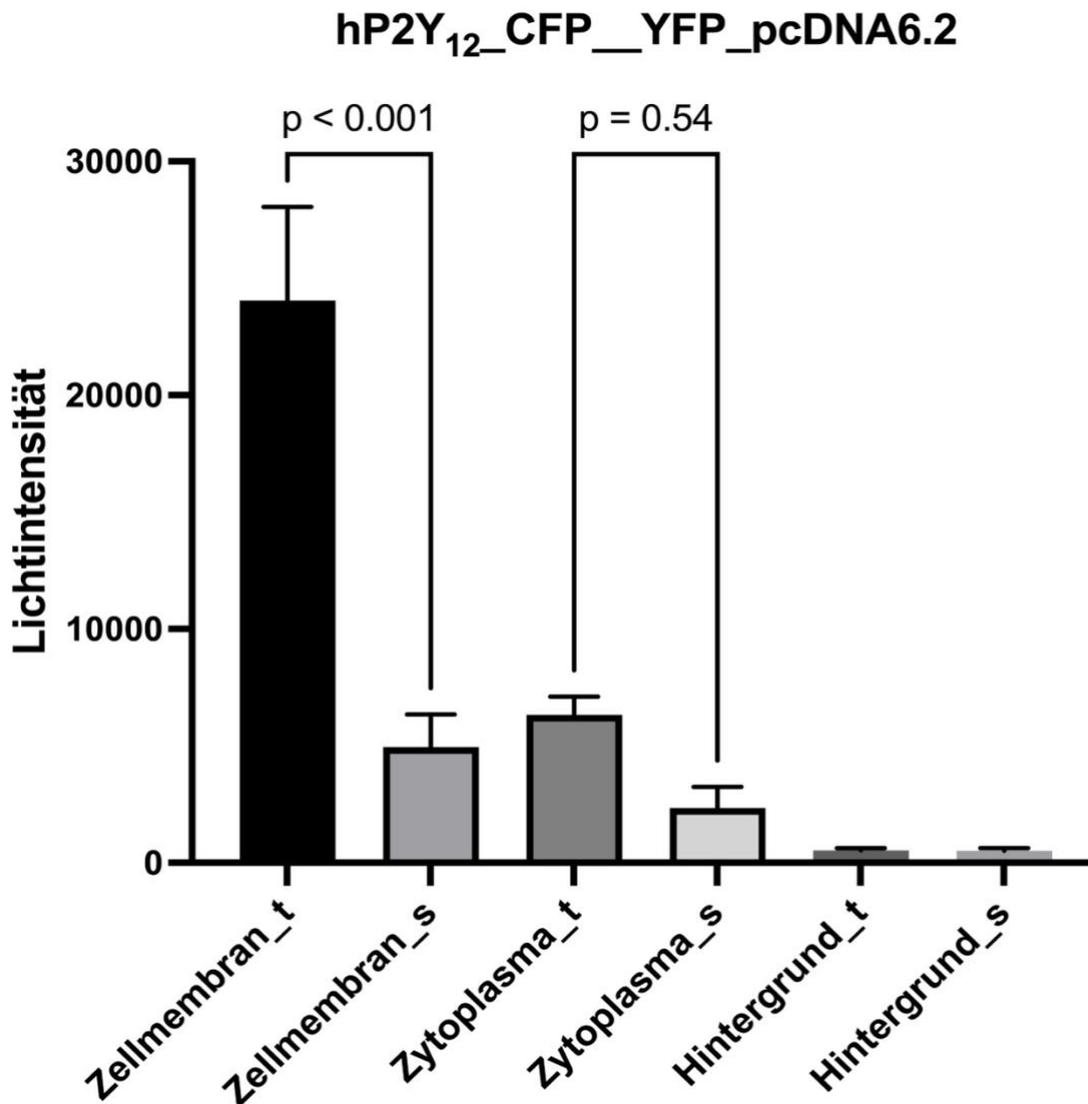


Abb. 23: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA5. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

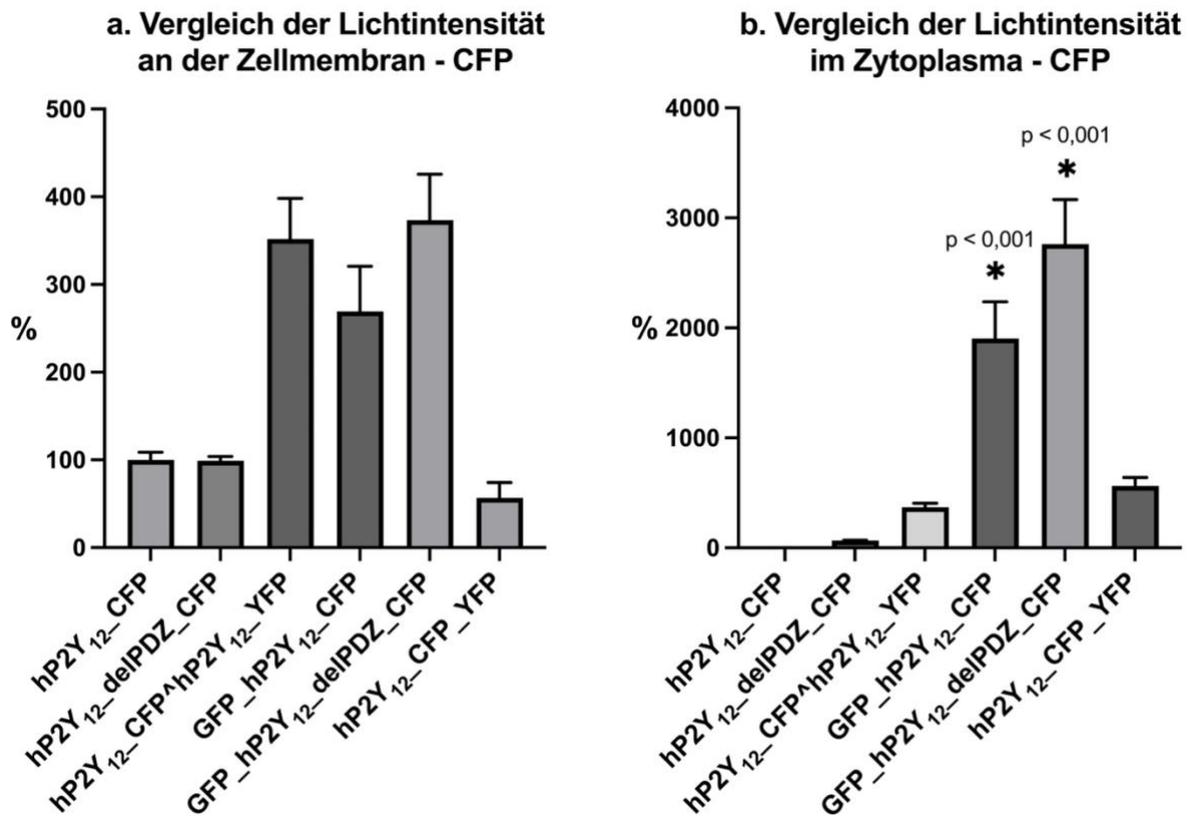


Abb. 24: Vergleich der Lichtintensitäten der mit CFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor, dessen mittlere Lichtintensität als 100% definiert wurde (ANOVA und Bonferroni-Korrektur). Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit * markiert. Die Anzahl der absoluten Messungen n können jeweils Tabelle 6 entnommen werden. Mittelwerte \pm SEM.

3.4.2 GFP

Die Ergebnisse der Auswertung der an GFP gekoppelten Rezeptoren werden in Abbildung 25-28 und Tabelle 7 abgebildet und im Folgenden detailliert erläutert. Bei allen mit GFP markierten Rezeptoren (GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6, Abbildung 25; GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6, Abbildung 26; GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA6, Abbildung 27) war keine bevorzugt isolierte membranständige Expression mehr nachweisbar, stattdessen wurden die Rezeptoren diffus zytoplasmatisch mit teils lokalisierter Mehranreicherung in Zellkompartimenten (beispielsweise Abbildung 12) (über-)exprimiert.

Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurde zwischen den transienten und stabil exprimierten Zelllinien eines Rezeptorkonstruktes verglichen, um eine mögliche Änderung im zeitlichen Verlauf zu evaluieren. Tendenziell nahm die Lichtintensität als Maß der Rezeptorexpression an beiden Messpunkten in den stabil exprimierten Zelllinien zu, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Das Maß der Lichtintensität an der Zellmembran und im Zytoplasma aller stabil exprimierten, mit GFP gekoppelten Rezeptoren wurde in Relation zum nicht-modifizierten, lediglich mit GFP markierten Wildtyprezeptor verglichen (Abbildung 28). Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen den Rezeptoren an der Zellmembran oder im Zytoplasma nachgewiesen, da die intrazelluläre (Über-)Expression bereits beim nicht-mutierten, lediglich N-Terminal an GFP gekoppelten Wildtyprezeptor vorhanden war.

Tab. 7: Übersicht über die mit GFP markierten Konstrukte. Angegeben sind die Anzahl der jeweiligen Messdaten an der Zellmembran, im Zytoplasma, sowie im Hintergrund der transienten (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptoren. Die Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der gemessenen Lichtintensität an Zellmembran und Zytoplasma wurden verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur).

Rezeptor	MW \pm SEM in Zellmembran/ Zytoplasma	p-Wert	Anzahl Messdaten n=		
			Zellmembran	Zytoplasma	Hintergrund
GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6_t	13451 \pm 6690/ 15074 \pm 8723	0,98	9	9	5
GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6_s	33872 \pm 5913/ 48747 \pm 6957	0,19	7	7	4
GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6_t	33425 \pm 5037/ 39098 \pm 5894	0,7	16	16	7
GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6_s	38535 \pm 5397/ 39393 \pm 5498	0,99	28	28	5
GFP_hP2Y₁₂_deIPDZ_CFP_pcDNA6_t	20709 \pm 5538/ 22362 \pm 6174	0,97	17	17	7
GFP_hP2Y₁₂_deIPDZ_CFP_pcDNA6_s	25747 \pm 5003/ 27466 \pm 5218	0,96	30	30	5

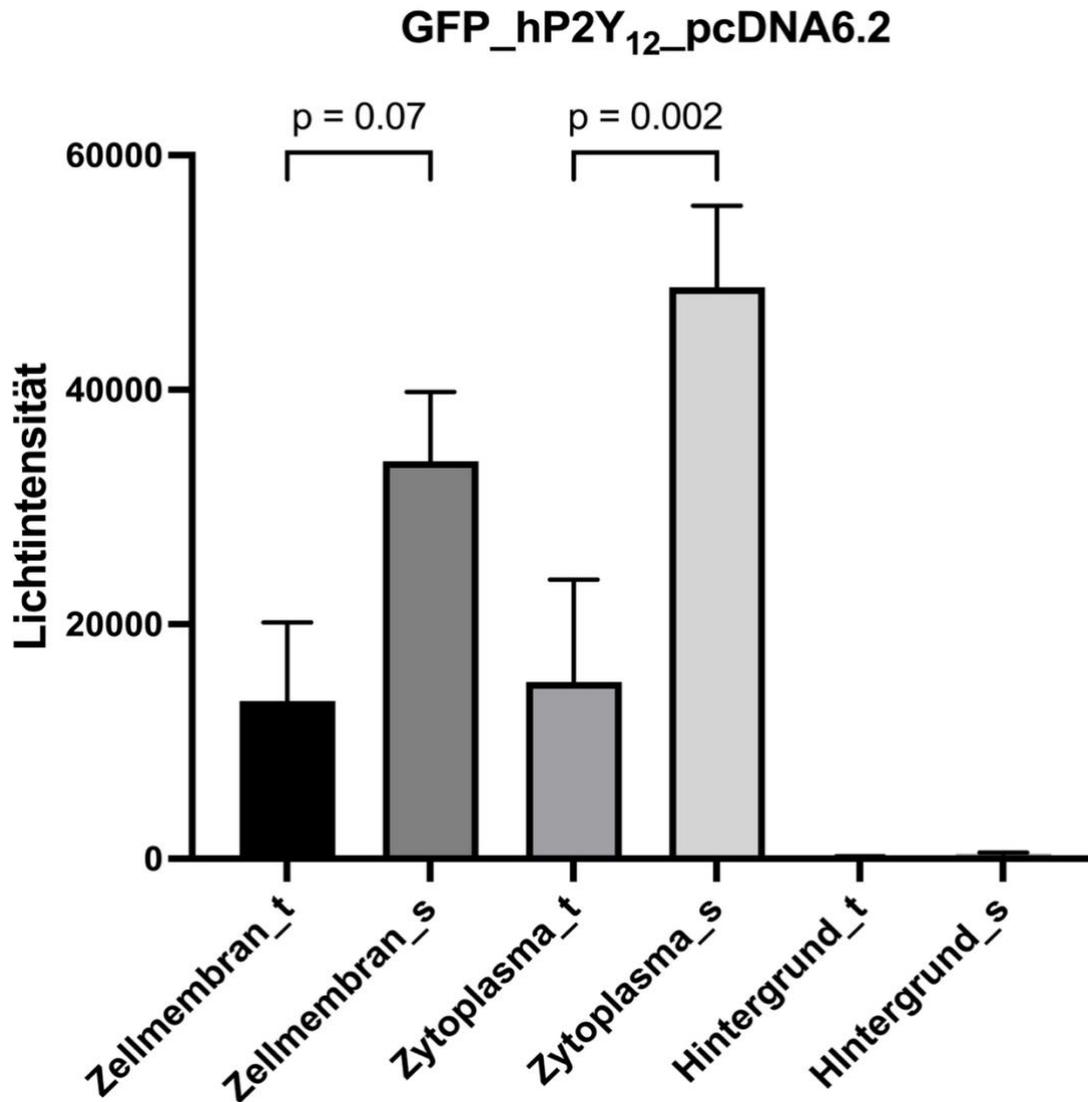


Abb. 25: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 7 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

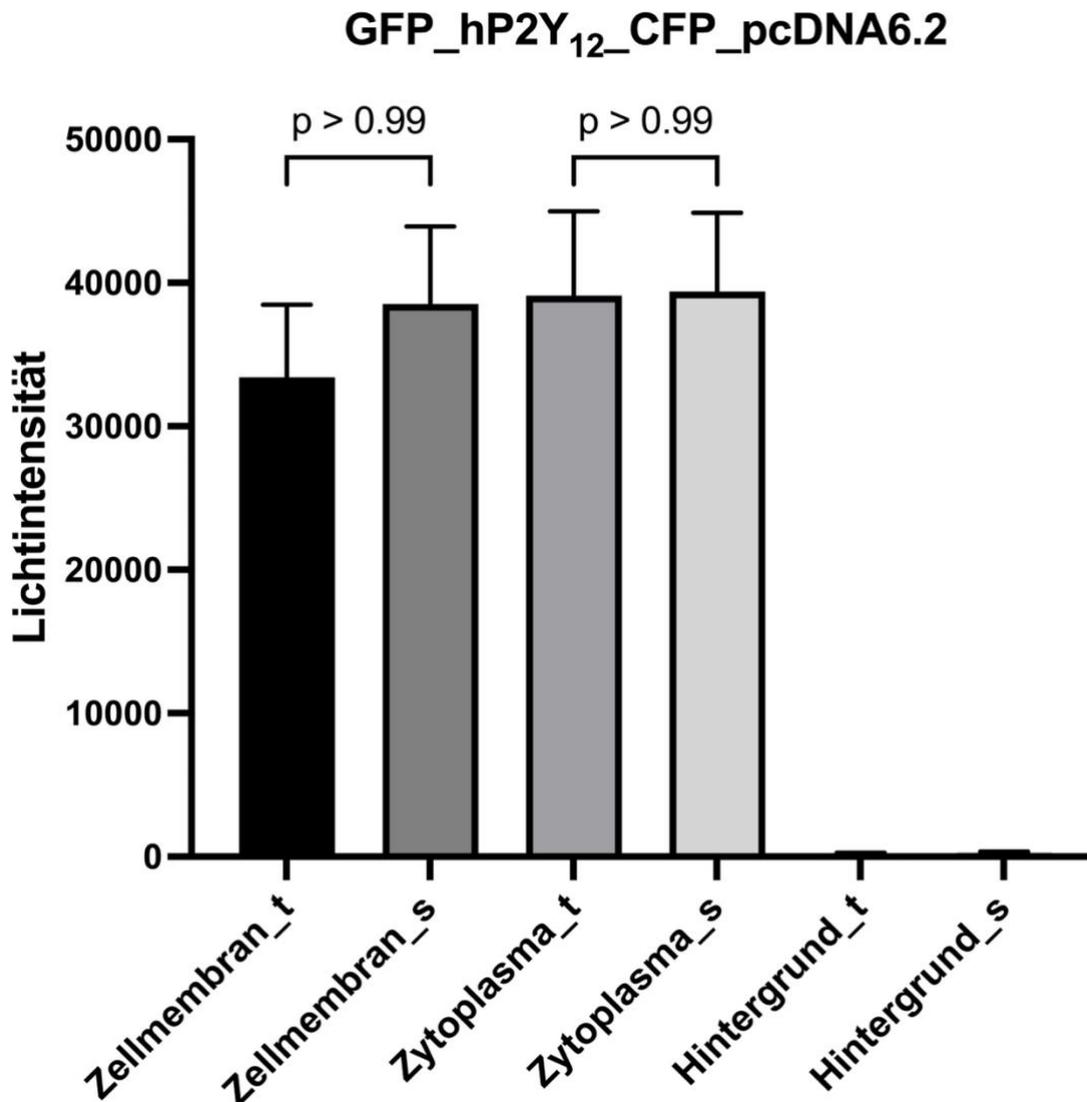


Abb. 26: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 7 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

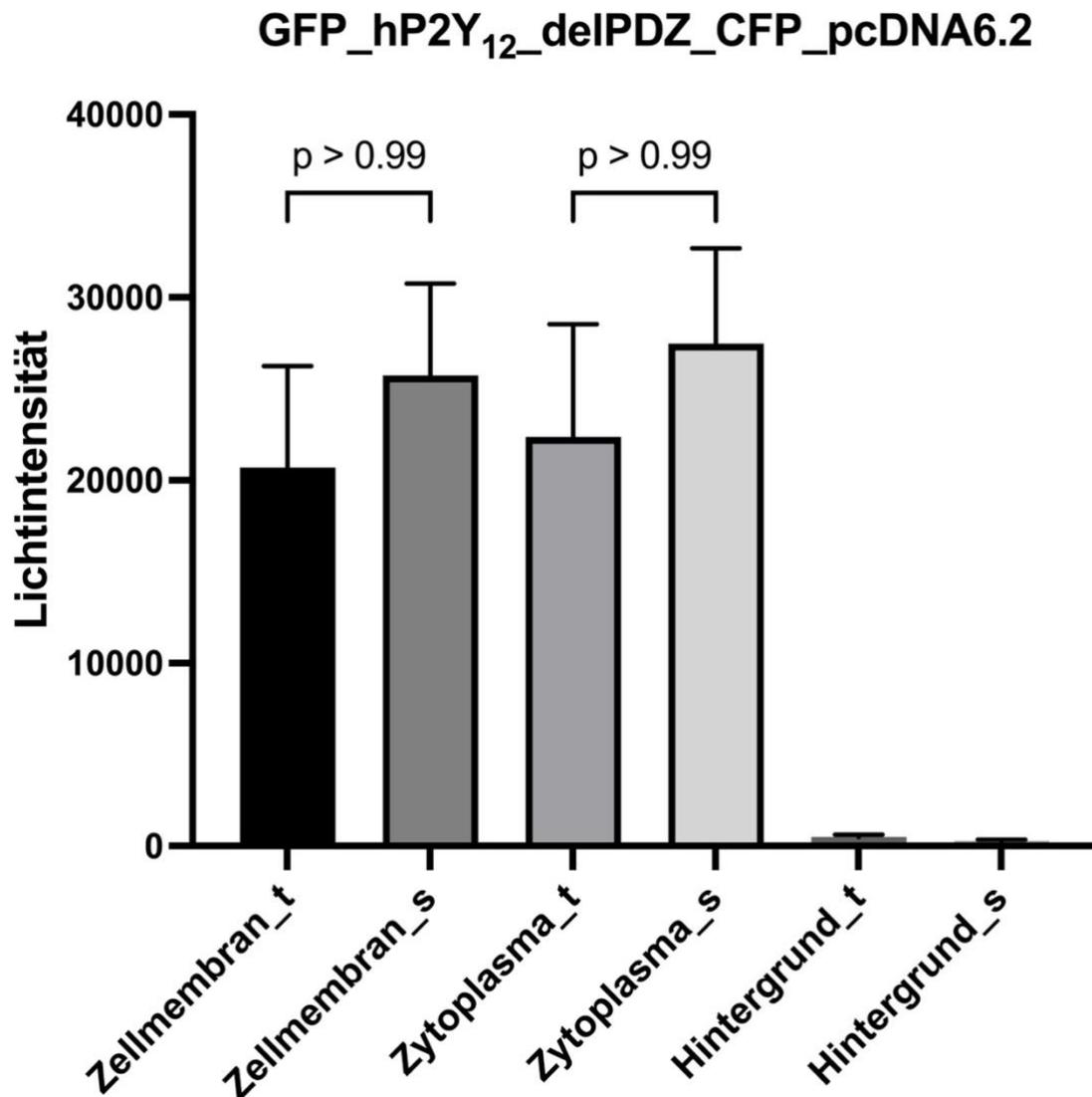
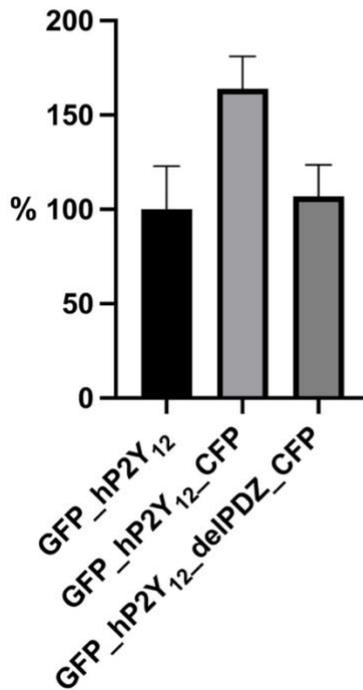


Abb. 27: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_delIPDZ_CFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 7 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

a. Vergleich der Lichtintensität an der Zellmembran - GFP



b. Vergleich der Lichtintensität im Zytoplasma - GFP

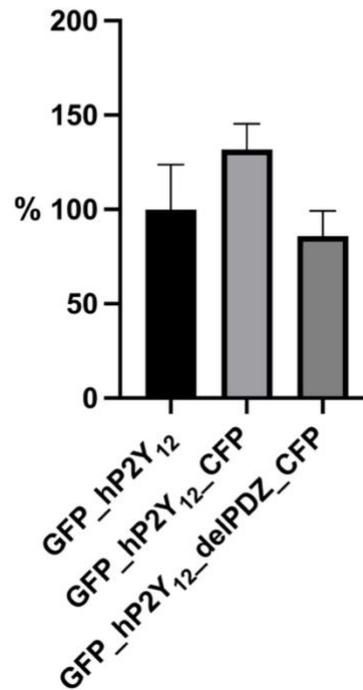


Abb. 28: Vergleich der Lichtintensitäten der mit GFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor, dessen mittlere Lichtintensität als 100% definiert wurde (ANOVA und Bonferroni-Korrektur). Die Anzahl der absoluten Messungen n können jeweils Tabelle 7 entnommen werden. Mittelwerte \pm SEM.

3.4.3 YFP

Die Ergebnisse der Auswertung der an YFP gekoppelten Rezeptoren werden in Abbildung 29 – 36 und Tabelle 8 abgebildet und im Folgenden detailliert erläutert. Für den transient exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2, den transient und stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2, den transient exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2, den transient und stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2, den transient und stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2, sowie den transient und stabil exprimierten Rezeptor hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2 konnte eine statistisch signifikante bevorzugte membranständige Expression nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die stabil exprimierten Rezeptoren hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2, hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2, und transient und stabil exprimierten Zelllinien mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2 zeigten eine gemischte bzw. zytoplasmatische Expression des Rezeptors (Tabelle 8).

Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden zwischen den transienten und stabil exprimierten Zelllinien eines Rezeptorkonstruktes verglichen, um eine mögliche Änderung im zeitlichen Verlauf zu evaluieren. In Zellen mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 29) blieb die bevorzugte membranständige Expression bestehen, allerdings hatten die transient exprimierten Zellen eine insgesamt signifikant höhere Lichtintensität. Beim lediglich C-Terminal mit YFP gekoppelten Wildtyprezeptor hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 30) blieb die bevorzugte membranständige Expression ohne eine signifikante Änderung der Lichtintensität bestehen. Die Lokalisation der Rezeptorexpression änderte sich lediglich in der stabilen Zelllinie bei der Variante hP2Y₁₂_del321_342 (Abbildung 31), die transient membranständig, und stabil dann diffus zytoplasmatisch exprimiert wurde. Die Zellen mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 32) zeigten in der transient exprimierten Zelllinie eine membranständig signifikant stärkere Lichtintensität als Maß der Expression, zytoplasmatisch war die Lichtintensität knapp nicht statistisch signifikant transient stärker ausgeprägt. In Zellen mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 33) bestand zwischen der transient und stabil exprimierten Zelllinie kein statistisch signifikanter Unterschied. Beim Rezeptor hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 34) änderte sich der Ort der bevorzugten Expression nicht, zytoplasmatisch

war aber das Maß der Lichtintensität in der transienten Zelllinie knapp statistisch signifikant höher. Die Zelllinien mit dem Rezeptor hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2 (Abbildung 35) zeigten sowohl transient als auch stabil eine diffuse zytoplasmatische Expression ohne statistisch signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf. Das Maß der Lichtintensität an der Zellmembran und im Zytoplasma aller stabil exprimierten, mit YFP gekoppelten Rezeptoren wurde in Relation zum nicht-modifizierten, lediglich mit YFP markierten Wildtyprezeptor verglichen (Abbildung 36). An der Zellmembran zeigt sich eine signifikant geringere Expression für hP2Y₁₂_CFP^hP2Y₁₂_YFP ($p < 0,001$) und hP2Y₁₂_CFP_YFP ($p = 0,01$), sowie eine signifikant höhere Expression für hP2Y₁₂_P341A ($p < 0,001$), hP2Y₁₂_delPDZ_YFP ($p < 0,001$), und hP2Y₁₂_2PDZ_YFP ($p < 0,001$). Zytoplasmatisch war eine signifikant geringere Expression für hP2Y₁₂_CFP^hP2Y₁₂_YFP ($p = 0,02$), sowie eine signifikant höhere Expression für hP2Y₁₂_CFP_YFP ($p < 0,001$) und hP2Y₁₂_delPDZ_YFP ($p = 0,02$) nachweisbar.

Tab. 8: Übersicht über die mit YFP markierten Konstrukte. Angegeben sind die Anzahl der jeweiligen Messdaten an der Zellmembran, im Zytoplasma, sowie im Hintergrund der transienten (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptoren. Die Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der gemessenen Lichtintensität an Zellmembran und Zytoplasma wurden verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur), statistisch signifikante p-Werte sind mit * markiert.

Rezeptor	Mittelwerte der Lichtintensität \pm SEM in Zellmembran/ Zytoplasma	p-Wert	Anzahl Messdaten n=		
			Zellmembran	Zytoplasma	Hintergrund
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_t	18241 \pm 2637/ 6181 \pm 905	<0,01 *	30	30	11
hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_s	2049 \pm 149/ 1427 \pm 259	0,08	30	30	7
hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_t	25016 \pm 2636/ 9574 \pm 1466	<0,01 *	30	30	14
hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2_s	20674 \pm 3112/ 10104 \pm 1834	0,01*	23	23	5
hP2Y ₁₂ _del321_342_YFP_pcDNA6.2_t	30599 \pm 3344/ 10662 \pm 1743	<0,01 *	30	30	8
hP2Y ₁₂ _del321_342_YFP_pcDNA6.2_s	17034 \pm 2935/ 17694 \pm 3952	0,99	16	16	5
hP2Y ₁₂ _P341A_YFP_pcDNA6.2_t	50405 \pm 2105/ 17854 \pm 1111	<0,01 *	30	30	8
hP2Y ₁₂ _P341A_YFP_pcDNA6.2_s	39685 \pm 4588/ 10365 \pm 2140	<0,01 *	16	16	5
hP2Y ₁₂ _2PDZ_YFP_pcDNA6.2_t	38438 \pm 4284/ 13486 \pm 2385	<0,01 *	30	30	6
hP2Y ₁₂ _2PDZ_YFP_pcDNA6.2_s	46451 \pm 4222/ 11015 \pm 1912	<0,01 *	16	16	5

hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2_t	45698 ± 4170/ 20174 ± 2351	<0.01 *	30	30	7
hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2_s	43684 ± 3141/ 8887 ± 1843	<0.01 *	16	16	5
hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2_t	12747 ± 1507/ 19505 ± 2901	0,08	30	30	9
hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2_s	14209 ± 2595/ 15164 ± 3320	0,97	18	18	5

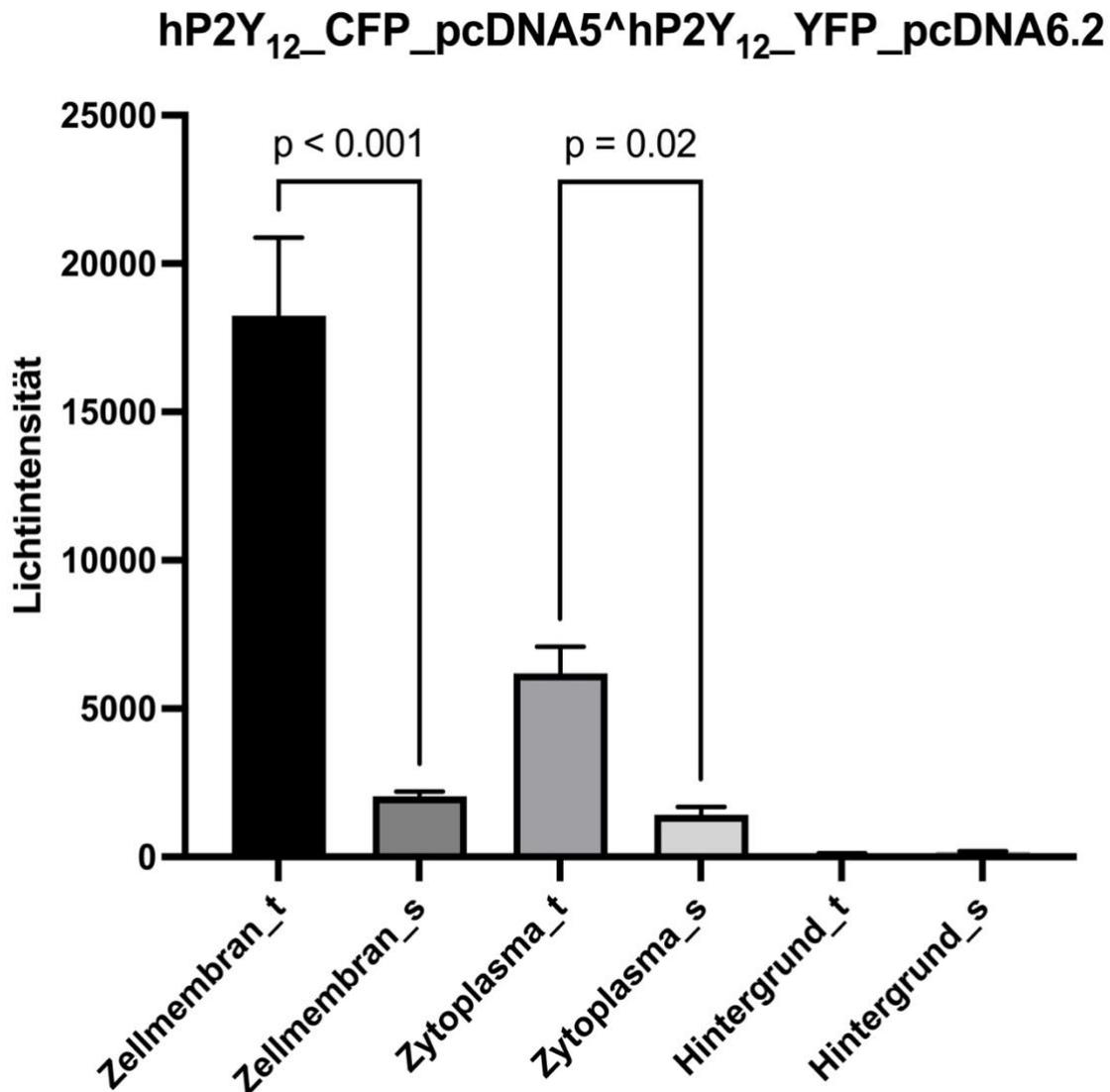


Abb. 29: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

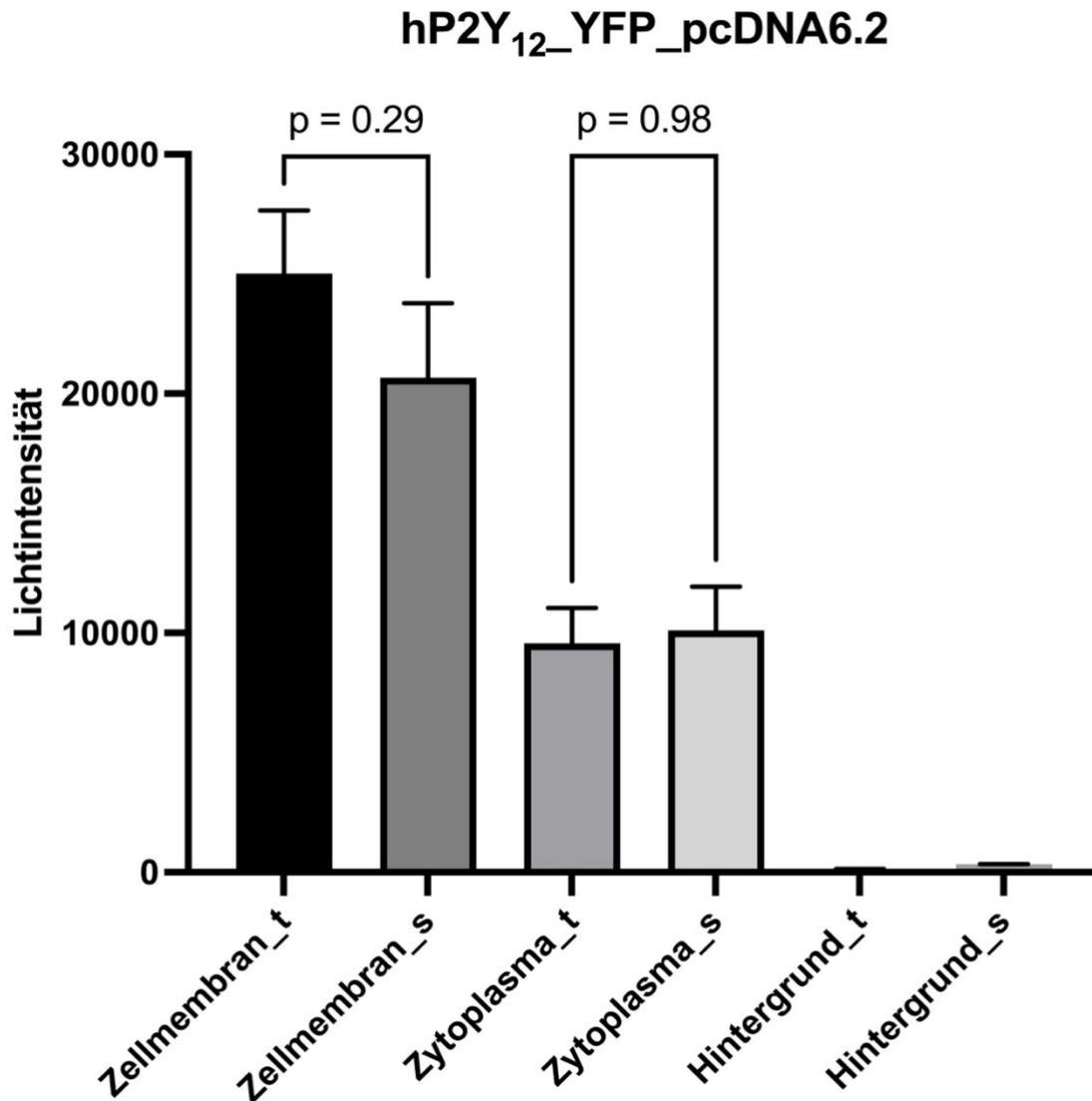


Abb. 30: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

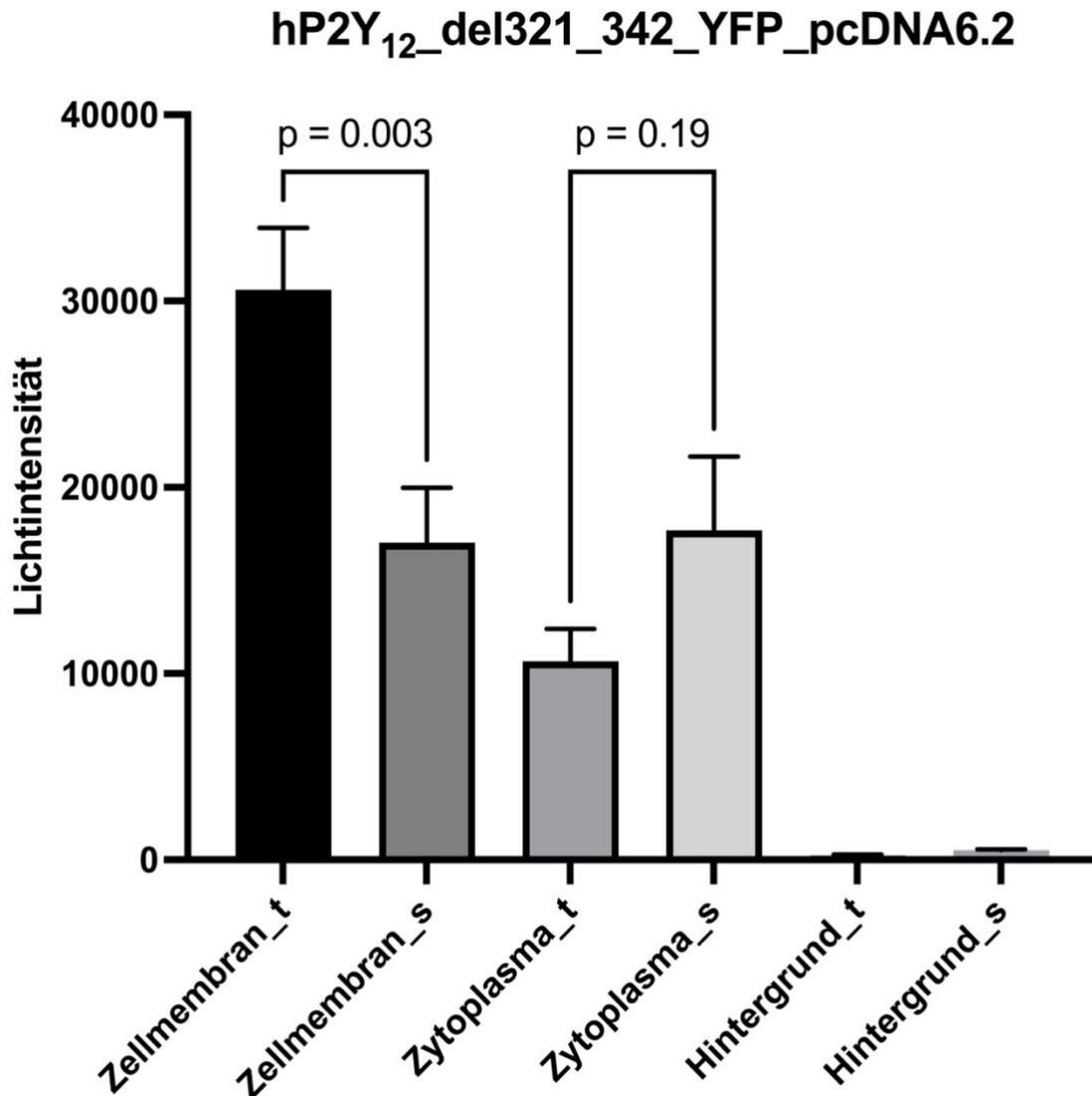


Abb. 31: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

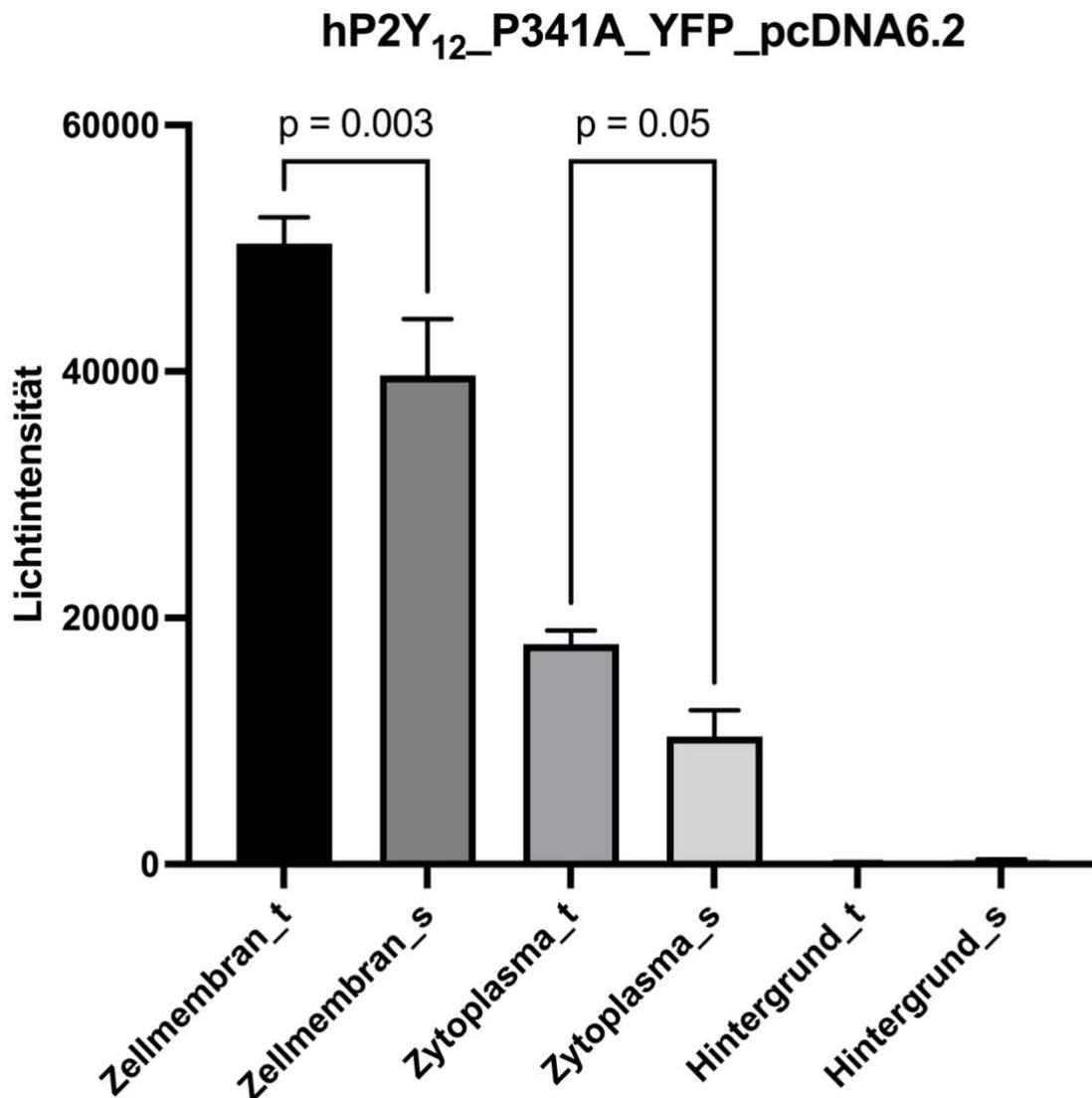


Abb. 32: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

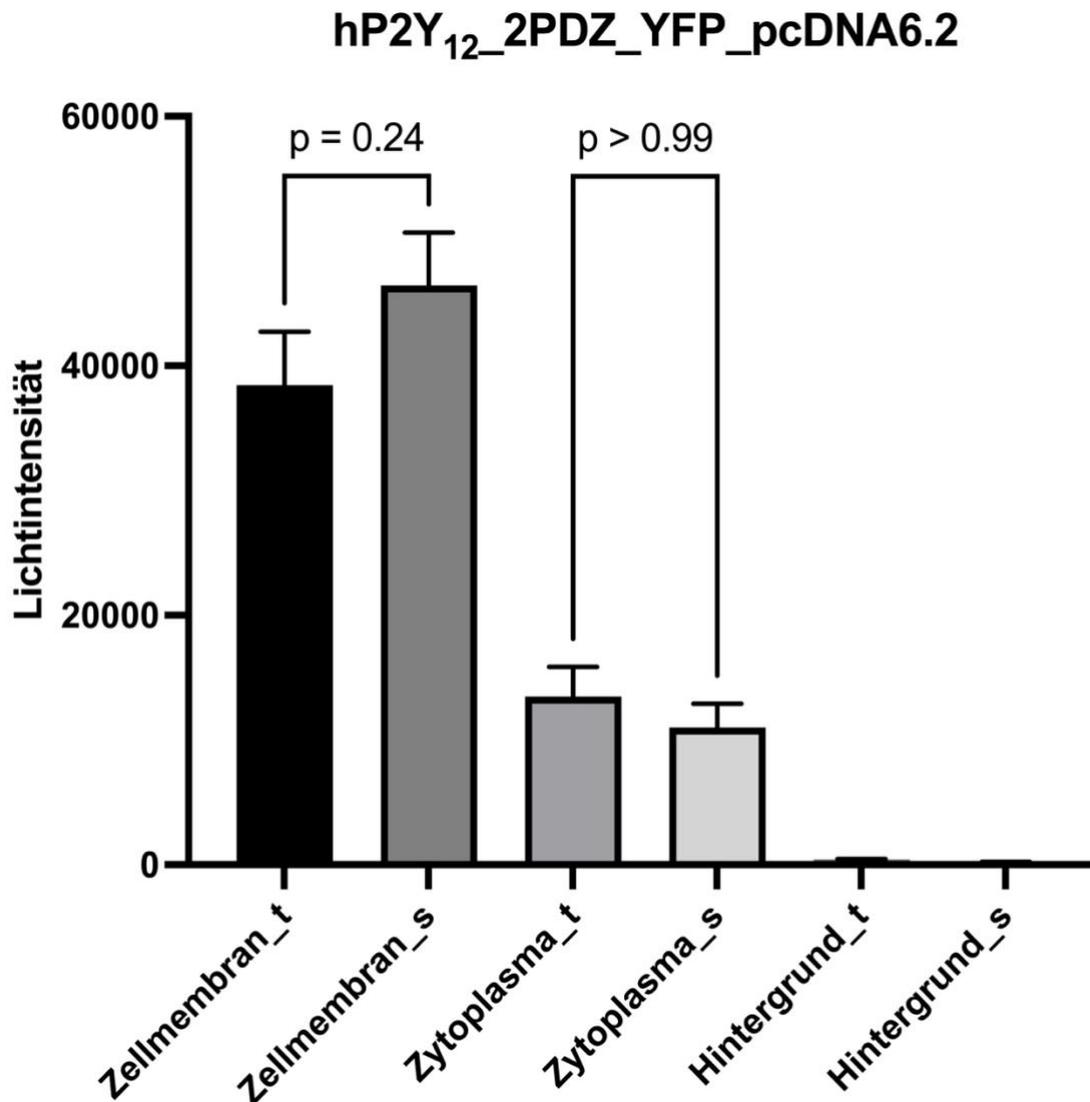


Abb. 33: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

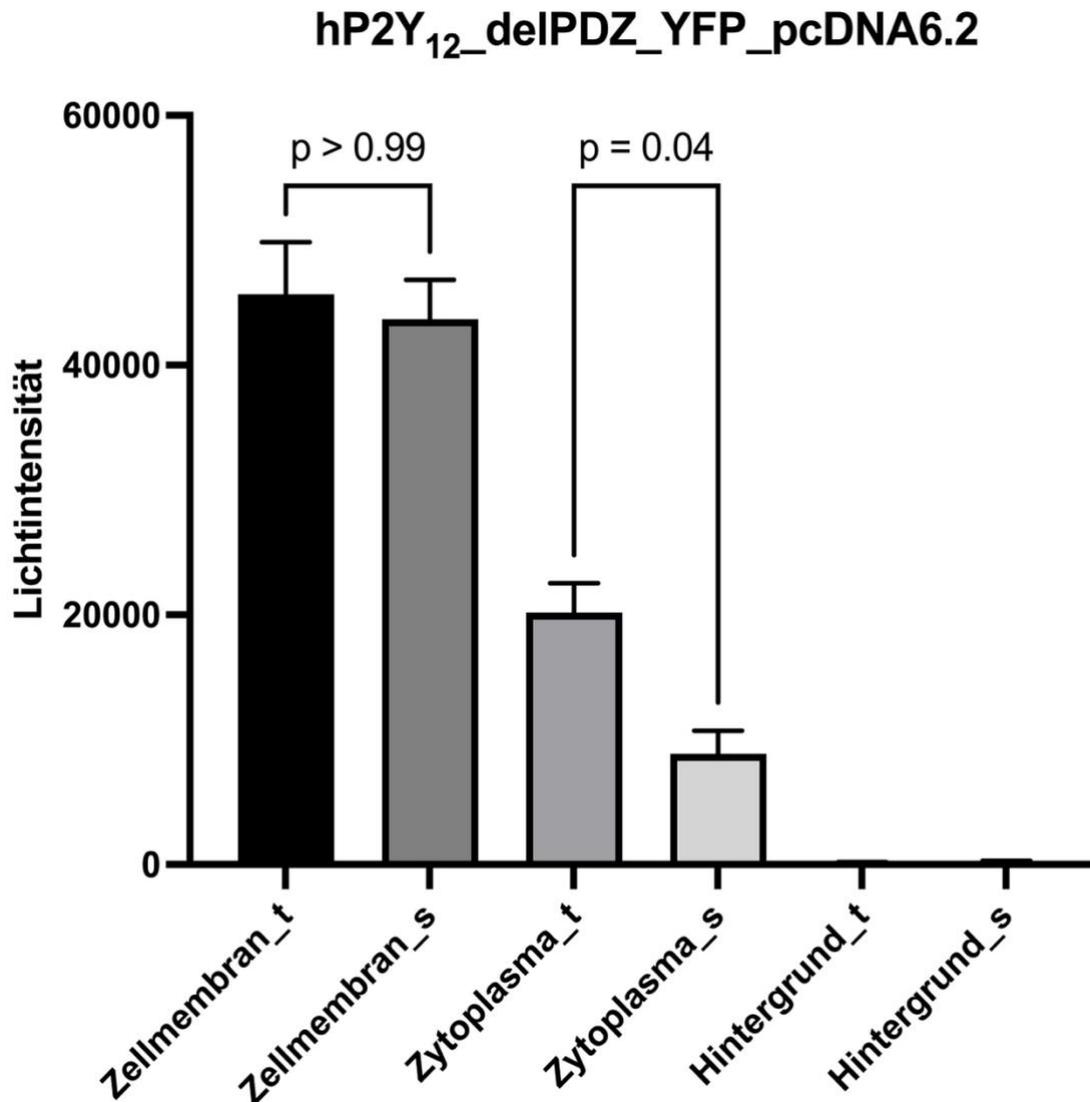


Abb. 34: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_delIPDZ_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

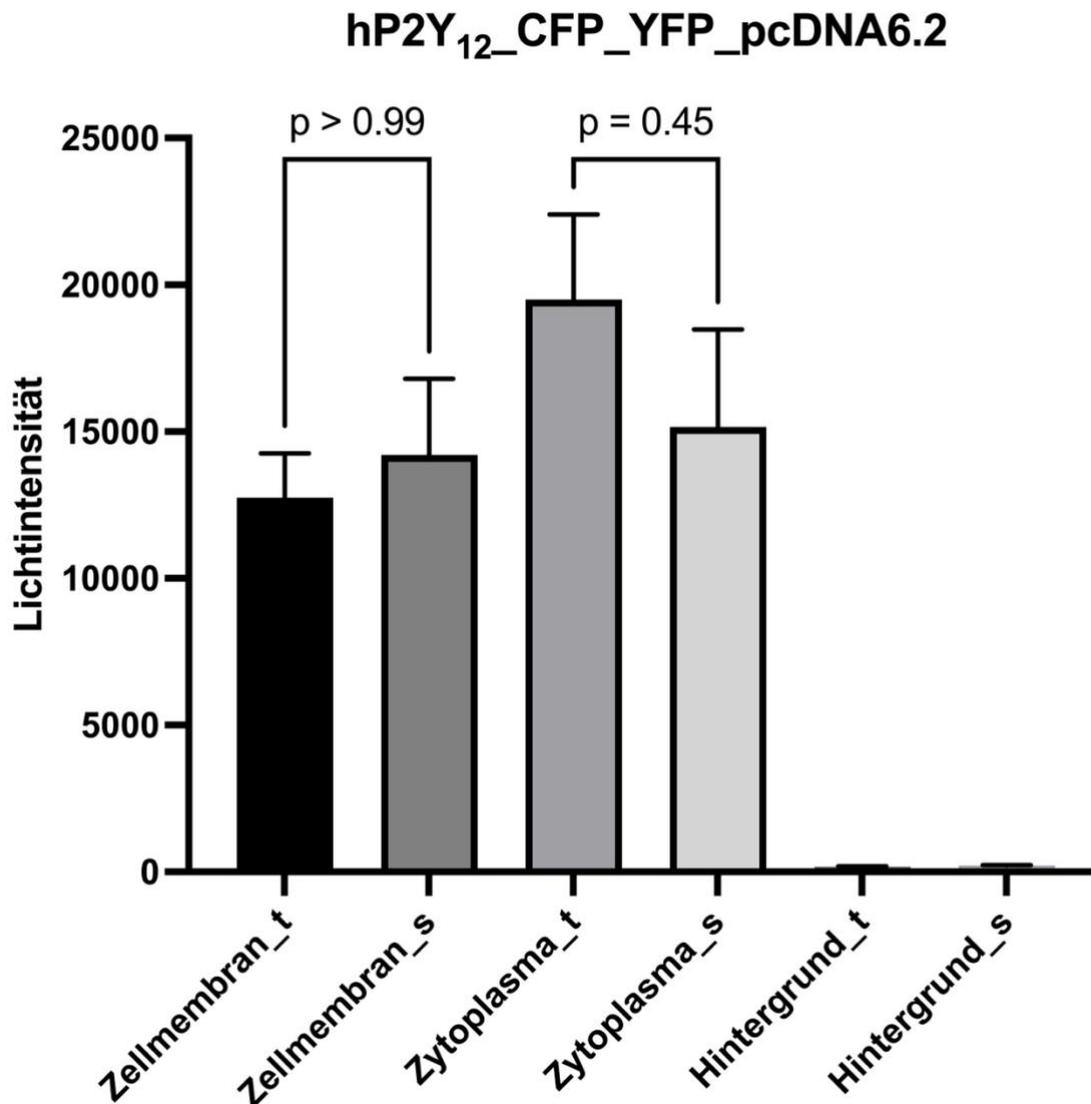


Abb. 35: Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2. Die Lichtintensitäten an Zellmembran und Zytoplasma wurden jeweils zwischen der transienten und stabilen Zelllinie verglichen (ANOVA und Bonferroni-Korrektur) mit Angabe der p-Werte, die Anzahl der absoluten Messungen n können Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte +- SEM.

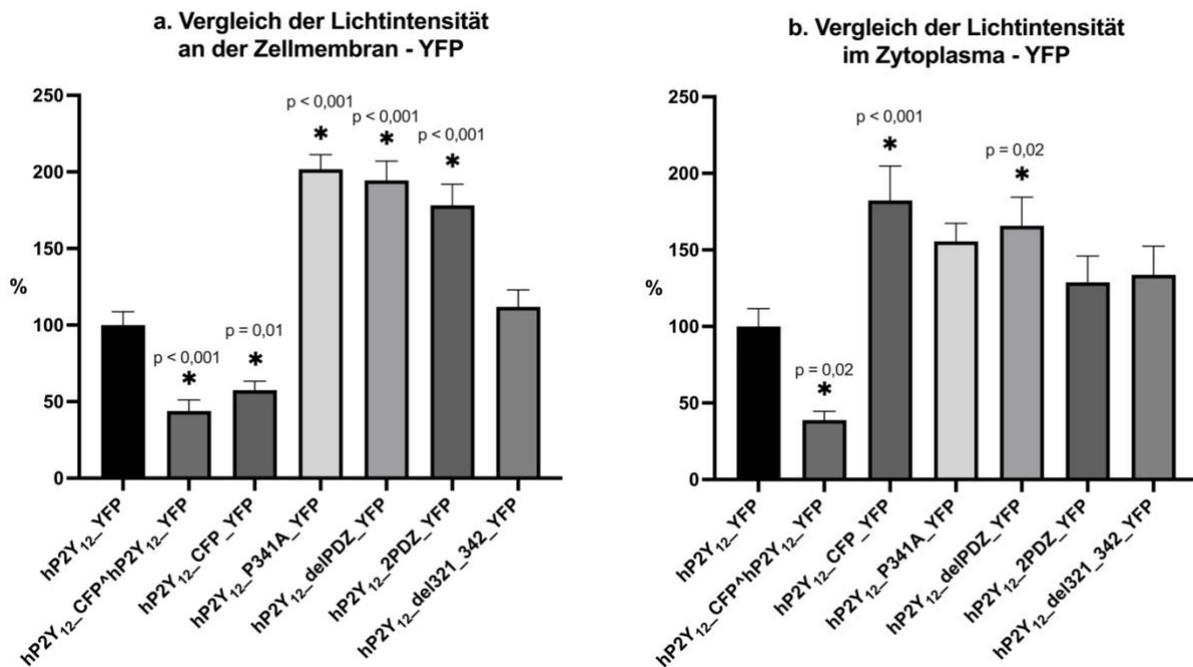


Abb. 36: Vergleich der Lichtintensitäten der mit YFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor, dessen mittlere Lichtintensität als 100% definiert wurde (ANOVA und Bonferroni-Korrektur). Die Anzahl der absoluten Messungen n können jeweils Tabelle 8 entnommen werden. Mittelwerte \pm SEM.

4. Diskussion

4.1 Molekularbiologie

Mutagenesestudien von an fluoreszente Proteine geknüpfte Fusionsrezeptoren sind ein etabliertes Untersuchungsmodell, welches auch in anderen P2Y-Rezeptoren bereits Verwendung gefunden hat, beispielsweise an P2Y₁ und P2Y₂-Rezeptoren (Attah et al., 2020; Luo et al., 2011; Tulapurkar et al., 2006). Die Klonierung und Transformation einiger Konstrukte gestalteten sich jedoch in der vorliegenden Arbeit unerwartet schwierig. Trotz Optimierung der Abläufe und der verwendeten Materialien gelang es wiederholt nicht alle gewünschten Rezeptormutationen zu klonieren (vergleiche Tabelle 4), daher konnten auch nicht alle Produkte transformiert und transfektiert werden. Hiervon betroffen waren vor allem die Klonierungsversuche des Vektors pcDNA5™/FRT/V5-His TOPO®. Insbesondere das PCR-Produkt mit der Mutation del321_342 konnte nicht ohne zusätzliche unerwünschte Mutationen kloniert werden, des Weiteren gelang die Klonierung der PCR-Produkte mit den Mutationen 2PDZ und P341A nicht, da es ungewöhnlich häufig zur Bildung leerer Vektoren kam. Es erfolgte daher der zunächst probatorische Wechsel auf den Klonierungsvektor Vivid Colors™ pcDNA™6.2/C-YFP-GW/TOPO™, an den alle PCR-Produkte mit den jeweils gewünschten Mutationen P341A, delPDZ, 2PDZ, und del321_342 kloniert werden und weitergehend untersucht werden konnten. Der unterschiedliche Erfolg in der Klonierung mit den beiden Vektorsystemen konnte nicht abschließend geklärt werden; beide Vektoren verwenden grundsätzlich die gleiche Technologie der TOPO™ Klonierungsmethode. Diese Methode stellt zwei grundlegende Anforderungen an PCR-Produkte, die erfolgreich kloniert werden sollen: das Vorhandensein einer sogenannten Kozak-Sequenz, also einer bestimmten Basenfolge, die den Start der Translation markiert, sowie einen singulären 3´ Adenin-Überhang, der durch die Verwendung einer *Taq*-Polymerase erzeugt wird (Green und Sambrook, 2021). Beide Vektoren besitzen an ihrem 3´ Ende einen singulären Thymin-Überhang. Nach Paarung der Adenin-Überhänge mit den Thyminen der jeweiligen Vektoren erfolgte die nachfolgende Ligation. Einer der Hauptunterschiede beider Vektoren liegt in der weiteren Methodik der Transfektion, da der pcDNA5-Vektor ein Flp/FRT-System zur Transfektion enthält, und der pcDNA6-Vektor durch eine andere Methode, in der vorliegenden Arbeit durch Lipofektion, transfektiert werden muss. Die

Transfektion gelang bei der Verwendung beider Vektoren mit den unterschiedlichen Methoden (siehe 2.2.5 und 2.2.6) jeweils problemlos. Die weiteren Untersuchungen wurden an allen erstellten Konstrukten fortgeführt, jedoch gelang die Klonierung aller gewünschten Mutationen nur an den pcDNA6-Vektor. Hierdurch war bedauerlicherweise nicht für alle mutierten Rezeptoren der Vergleich jeweils unter gleichen Mutanten an unterschiedlichen Vektoren und fluoreszenten Farbstoffen möglich, was in zukünftigen Studien ebenfalls interessant wäre.

4.2 Laserscanningmikroskopie

Bei der Auswertung der statistischen Ergebnisse der Laserscanningmikroskopie ist insgesamt im Rahmen dieser Arbeit zu beachten, dass teilweise eine nur geringe Anzahl an Messungen pro Konstrukt und Ort der Messung (Zellmembran/Zytoplasma/Bildhintergrund) durchgeführt werden konnte, da es bei manchen Konstrukten nur wenige Zellen mit dem exprimierten Rezeptor gab. Insbesondere bei den N-Terminal mit GFP markierten Konstrukten waren teilweise nur sehr wenige Zellen vorhanden, und die vorhandenen Zellen wiesen oftmals eine auffällige rundliche Form mit Ablagerung des fluoreszenten Rezeptors in intrazellulären Zellkompartimenten auf (vergleiche Abbildung 11 und Abbildung 13). Zudem ist die in dieser Arbeit verwendete Auswertung der Lichtintensität nur ein indirektes Maß für die Expression der verschiedenen untersuchten Rezeptoren.

Zudem ist eine mögliche Fehlerquelle der statistischen Ergebnisse, dass die Messpunkte einzeln händisch ausgesucht werden mussten. Insbesondere bei den Messpunkten an der Zellmembran kann es bei nur geringer Abweichung des Messortes zu deutlich unterschiedlichen Messergebnissen und damit der statistischen Auswertung kommen. Es wurde versucht, dieser Problematik durch mehrfache Messungen einer Zelle, sowie der Messungen ausschließlich durch eine Person, und somit der möglichst konformen Auswahl der Messpunkte entgegenzukommen, dennoch muss dies als mögliche Fehlerquelle beachtet werden.

Zusätzlich ist zu beachten, dass es innerhalb der pcDNA5/CFP Rezeptormutanten auf Grund der bereits zuvor beschriebenen molekularbiologischen Problematik nicht möglich war die Rezeptormutanten del321_342, 2PDZ und P341A zu untersuchen. Es bleibt daher unklar, ob die Expressionsmuster dieser Rezeptorvarianten an dem an pcDNA6

gebundenen Vektor ohne Weiteres auf pcDNA5-Vektoren übertragen werden können. Trotz den vorhandenen Limitationen dieser Arbeit können die hier beschriebenen Ergebnisse als erste Hinweise zum Expressionsverhalten bei verschiedenen Mutationen am C-Terminus unter besonderer Beachtung der PDZ-Domäne gewertet werden, die in weiteren Expressions- und zusätzlich Funktionsstudien validiert und weiterverfolgt werden müssen.

4.3 Vergleich der Rezeptorvarianten

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, durch zielgerichtete Mutagenese insbesondere des C-Terminus die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors zu untersuchen. In Anlehnung an vorherige Publikationen wurde hierbei ein besonderer Fokus insbesondere auf die sogenannte PDZ-Domäne gelegt, die eine besondere Rolle im Rezeptortransport spielt (Nisar et al., 2011). Neben der Replikation der durch Nisar et al. beschriebenen Mutation P341A in CHO-Zellen, wurden durch zielgerichtete Mutagenese weitere Rezeptoren entwickelt, entweder mit Deletion der PDZ-Domäne (delPDZ), Dopplung der PDZ-Domäne (2PDZ), oder Deletion eines Großteils des C-Terminus (del321_342). Durch Fusion mit einem fluoreszenten Protein entweder am N- oder C-Terminale Ende des Rezeptors konnte anhand der Lichtintensität als Maß der Expression im Fluoreszenzmikroskop eine Aussage und Vergleich über die verschiedenen Expressionsmuster der Rezeptoren getroffen werden.

Der Wildtyprezeptor hP2Y₁₂ wurde in der transienten und in der stabilen Zelllinie sowohl an CFP/pcDNA5TM/FRT/V5-His TOPO gebunden, als auch an YFP/Vivid ColorsTM pcDNATM6.2/C-YFP-GW/TOPOTM signifikant membranständig exprimiert. Auch die Varianten P341A, delPDZ und 2PDZ wurden transient und stabil an YFP/Vivid ColorsTM pcDNATM6.2/C-YFP-GW/TOPOTM signifikant membranständig exprimiert. Unabhängig von der Art der Mutation des C-Terminus war also zusammenfassend die reine Expression des Rezeptors an der Zellmembran unbeeinträchtigt. Lediglich beim Konstrukt del321_342 fand sich ein Unterschied zwischen der transienten und stabilen Expression, da es zwar transient zu einer signifikanten membranständigen Expression kam, diese aber in der stabilen Zelllinie diffus ausgeprägt war. Mikroskopisch war bereits in der transient exprimierten Zelllinie in vereinzelt Zellen eine diffus intrazelluläre Expression zu beobachten, in der stabil exprimierten Zelllinie war der Rezeptor in dem Großteil der

Zellen diffus intrazellulär ausgeprägt (Abbildung 15). Dieser Beobachtung liegt möglicherweise zu Grunde, dass bei der Mutation del321_342 die Bildung und Expression des Rezeptors, sowie der Transport zur und primäre Einbau in die Zellmembran ungestört scheint, wie anhand der transienten Zelllinie zu sehen ist, aber bei stabiler Expression Anteile des intrazellulären Recyclings beeinträchtigt sind. Stabile Zelllinien werden durch antibiotikahaltiges Medium selektiert, es kommt daher dauerhaft zum Untergang nicht transfektierter Zellen und somit Freisetzung von Nukleotiden und mehr oder weniger potenter möglicher Liganden des P2Y₁₂-Rezeptors (Schiedner et al., 2008). Bei Untersuchung stabil exprimierter Zelllinien ist also anzunehmen, dass die meisten Rezeptoren bereits mehrfach ihrer physiologischen Funktion nachgekommen sind und den Rezeptorkreislauf der Ligandenbindung, Zellinternalisierung und Recycling mit endgültigem Rücktransport an die Zellmembran überstanden haben sollten (Cunningham et al., 2017). Möglicherweise ist also bei der Mutation del321_342 das Rezeptorrecycling beeinträchtigt, weshalb der Rezeptor nicht mehr adäquat in die Zellmembran eingebaut werden kann und diffus intrazellulär verbleibt. Ähnliche Unterschiede zwischen transient und stabil exprimierten Zelllinien konnten für die Rezeptormutanten delPDZ, 2PDZ und P341A nicht beobachtet werden. Ob die Beeinträchtigung primär die Rezeptorinternalisierung, Sortierung im endoplasmatischen Retikulum, oder den Wiedereinbau in die Zellmembran betrifft, ist anhand dieser Beobachtung nicht zu entscheiden und bedarf weiterer Untersuchungen, jedoch sind diese Ergebnisse als Hinweis zu deuten, dass möglicherweise auch weiter proximal der PDZ-Domäne gelegenen Anteilen des C-Terminus eine wichtige Rolle beim Rezeptorrecycling zukommt. Hierbei spielt vermutlich die Bindung von Arrestin zur Rezeptorinternalisierung eine Rolle, die jedoch abhängig vom Ort der Phosphorylierung am C-Terminus des Rezeptors ist, wie in verschiedenen Arbeiten an dem P2Y₁₂-Rezeptor gezeigt werden konnte (Mundell et al., 2008; Nisar et al., 2011; Sente et al., 2018). Ähnliche Vorgänge konnten auch für andere P2Y-Rezeptoren gezeigt werden, beispielsweise dem P2Y₂-Rezeptor. In einer Mutagenesestudie von Pottie et al. wurde der C-Terminus des P2Y₂-Rezeptors verschieden modifiziert, und so demonstriert, dass die Konstitution und Phosphorylierung des terminalen C-Terminus einen Einfluss auf die Interaktion mit Arrestin ausübt (Pottie et al., 2022).

Zudem wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Lichtintensität, also der vermuteten Rezeptordichte an der Zellmembran zwischen den einzelnen Rezeptorvarianten gibt. Auch bei den hier untersuchten Konstrukten ist zu beachten, dass die Ergebnisse teils auf Grund der geringen Anzahl an Messungen nur bedingt zu verwerten sind, jedoch konnte für die C-Terminal CFP und YFP gekoppelten Rezeptoren nachgewiesen werden, dass die Wildtyprezeptoren insgesamt eine geringere Signalintensität aufweisen, als die Rezeptoren mit Mutation (Abbildung 24 und Abbildung 35). Die stärkere Signalintensität der mutierten Rezeptorvarianten könnte durch eine verminderte Qualität der exprimierten Rezeptoren erklärt werden; um ein ähnliches Maß an Funktion zu erreichen wie der Wildtyprezeptor könnte bei eingeschränkter Rezeptorfunktion der mutierten Rezeptoren eine höhere Quantität notwendig sein. Diese Hypothese sollte in weiteren funktionellen Versuchen weiter untersucht werden. In vorherigen funktionellen Studien konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass der an ein fluoreszentes Protein, in diesem Fall C-terminal an enhanced CFP gekoppelte Rezeptor, weiterhin auf Agonisten funktionell reagiert, und zwar sogar mit erhöhter Potenz (Hoffmann et al., 2014).

Auffällig ist zudem, dass alle Rezeptorvarianten, die N-terminal an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurden statistisch signifikant diffus im Zytoplasma exprimiert wurden, unabhängig davon, ob es sich um den Wildtyprezeptor hP2Y₁₂, oder eine Rezeptorvariante handelt. Teilweise kam es in einigen Zellen zu einer lokalen Mehranreicherung in intrazellulären Kompartimenten; um welche Kompartimente es sich hierbei handelt, ob möglicherweise das endoplasmatische Retikulum als Transportstation oder Lysosomen, da der Rezeptor vermehrt abgebaut wird, ist rein bildmorphologisch nicht festzulegen und bedarf weiterer Untersuchungen. Durch die N-Terminale Modifikation scheint also die reine Konstruktion und Expression des Rezeptors unbeeinträchtigt, jedoch die physiologische Expression in der Zellmembran gestört zu sein. Wodurch diese Störung besteht, ob am fehlerhaften Transport zur oder Einbau in die Membran, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Diese Beobachtung war so allerdings nicht erwartet und lässt die Frage nach einer möglichen Relevanz der proximalen Aminosäuren des N-Terminus offen.

4.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit feststellen, dass alle untersuchten Rezeptoren unabhängig von ihrer Mutation und von der Art des fluoreszierenden Farbstoffes am N- oder C-Terminus zur Expression führten.

Alle N-Terminale durch Kopplung an Fluoreszenzfarbstoff modifizierten Rezeptoren haben die Fähigkeit zur selektiven membranständigen Expression verloren. Unabhängig von der Art der Mutation des C-Terminus war sowohl bei der Deletion des Großteils des C-Terminus (del321_342), sowie bei der Deletion oder Verdopplung der PDZ-Domäne (delPDZ/2PDZ), als auch bei ausschließlichem Ersatz des Prolins innerhalb der PDZ-Domäne gegen Alanin (P341A) die bevorzugte membranständige Expression unbeeinträchtigt. Weder der Transport zur noch Einbau in die Zellmembran scheint also durch die hier untersuchten Modifikationen des C-Terminus gestört zu sein. Als einzige Ausnahme konnte die stabil exprimierte Zelllinie hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2 beobachtet werden, bei der es vorwiegend zur diffusen intrazellulären Ausbildung des Rezeptors kam. Möglicherweise kommt den proximal der PDZ-Domäne gelegenen Anteilen des C-Terminus eine Bedeutung beim Rezeptorrecycling oder Rezeptortraffic zu, diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die vorliegende Arbeit konnte einen Teil der durch Nisar et al. publizierten Beobachtungen der Expression verschiedener am C-Terminus modifizierten Varianten des P2Y₁₂-Rezeptors bestätigen (Nisar et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass alle hier untersuchten Rezeptorvarianten zur Expression führen. Zusätzlich wurde eine zuvor nicht publizierte Variante mit gedoppeltem PDZ-Motiv untersucht, welches ebenfalls zu einer dem Wildtyprezeptor entsprechenden membranständigen Expression führte. Unerwarteterweise zeigte sich für die stabil exprimierte Zelllinie mit der Rezeptormutante del321_342 keine membranständige Expression und auch kein Verbleib in einem lokalisierten intrazellulären Kompartiment, sondern eine diffuse intrazelluläre Expression. Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu von Nisar et al. (Nisar et al., 2011) beschriebene Beobachtung der membranständigen Expression könnte neben tatsächlich für die membranständige Ausbildung relevante Sequenzen des auch proximal der PDZ-Domäne gelegenen C-Terminus auch rein praktisch-experimenteller Natur sein; während in unserer Arbeit die Kopplung an fluoreszente Protein mit einem vektorvermittelten

Verfahren gewählt wurde, verwendeten Nisar et al. Hämagglutinin-Antikörper-Bindungsverfahren.

Zusätzlich beobachteten wir, dass Rezeptoren, die an ihrem N-Terminus durch die Kopplung an Fluoreszenzfarbstoff modifiziert wurden nicht mehr selektiv membranständig ausgebildet wurden. Möglicherweise spielt der N-Terminus ebenfalls eine Rolle beim korrekten Transport zur oder Einbau in die Zellmembran, und diese Funktion wurde durch Modifikation verhindert.

In folgenden Untersuchungen muss die qualitative Funktion der modifizierten Rezeptoren durch weitere funktionelle Assays erforscht werden. Zusätzlich kann durch weitere Mutagenesestudien der N-Terminus des hP2Y₁₂-Rezeptors und dessen Funktion bei Expression und Transport in den Zellen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Der humane (h) P2Y₁₂-Rezeptor ist ein Gi-Protein-gekoppelter-Rezeptor, der zu einer der bedeutendsten Proteingruppen des menschlichen Organismus gehört und über die Inhibition der Adenylatzyklase und Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels weitere Signalkaskaden auslöst. Der hP2Y₁₂-Rezeptor spielt zusammen mit dem P2Y₁-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. hP2Y₁₂-Rezeptoren finden sich aber beispielsweise auch im zentralen Nervensystem auf Mikrogliazellen. Daten von Patienten mit Mutationen im hP2Y₁₂-Rezeptorprotein haben wesentlich zum Verständnis der Funktion verschiedener Rezeptorbestandteile beigetragen. Nisar et al. beschrieben 2011 einen Patienten mit einer Mutation innerhalb der PDZ-Domäne des terminalen C-Terminus des hP2Y₁₂-Rezeptor, genauer Ersatz des Prolins durch Alanin an Aminosäure 341 (P341A), der klinisch eine milde Blutungsneigung zeigte. Eine PDZ-Domäne besteht aus vier Aminosäuren, ETPM (Glutaminsäure, Threonin, Prolin, Methionin), die eine definierte Proteinregion am C-Terminus bilden, der spezifische Funktionen zur Signalvermittlung, Rezeptortransport und Endozytose, sowie Rezeptorre cycling zukommen (Marchese et al., 2008). Nisar et al. beschrieben 2011 in ihrer Arbeit, dass die Mutation innerhalb der PDZ-Domäne vor allem die quantitative Expression des Rezeptors an der Zellmembran durch vermindertes Arrestin-abhängiges Recycling nach Agonistenbindung beeinflusst (Nisar et al., 2011).

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, den C-Terminus des Rezeptors durch zielgerichtete Mutagenese zu verändern, und die so erzeugten Konstrukte anhand ihrer Expression zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf die Relevanz und Funktion einzelner Abschnitte und Aminosäuren des C-Terminus ziehen zu können.

Sowohl bei Deletion des Großteils des C-Terminus (del321_342), Deletion lediglich der PDZ-Domäne, Verdopplung der PDZ-Domäne, als auch Ersatz des Prolins innerhalb der PDZ-Domäne durch Alanin (P341A) kam es nach Ligation an einen mit Fluoreszenzfarbstoff gebundenen Vektor und anschließender Transfektion in CHO-Zellen zu einer Expression des Rezeptors. Die Expression war in allen Mutanten in der Regel unverändert primär membranständig vorhanden. Als einzige Ausnahme konnte die stabile Zelllinie mit der Mutation del321_342 identifiziert werden, bei der die membranständige

Expression aufgehoben war und der Rezeptor primär diffus intrazellulär vorlag. Möglicherweise liegt die Ursache in einem gestörten Rezeptorrecycling, für das auch weiter proximal gelegene Anteile des C-Terminus notwendig sind.

Weiterhin war die membranständige Expression aller Rezeptorvarianten aufgehoben, bei denen eine N-terminale Modifikation durch Bindung an ein fluoreszentes Protein vorgenommen wurde. Möglicherweise ist hierdurch der Rezeptortransport oder Einbau in die Zellmembran gestört, weswegen der Rezeptor intrazellulär verweilt. Weitere Untersuchungen, z.B. Mutagenesestudien am N-Terminus sind notwendig, um die molekularen Ursachen genauer zu erforschen.

6. Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 281–341.

André P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, et al. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; 112: 398–406.

Attah IY, Neumann A, Al-Hroub H, Rafahi M, Baqi Y, Namasivayam V, et al. Ligand binding and activation of UTP-activated G protein-coupled P2Y₂ and P2Y₄ receptors elucidated by mutagenesis, pharmacological and computational studies. *Biochim Biophys Acta (BBA) - General Subjects* 2020; 1864: 129501.

Baurand A. Differential Regulation and Relocalization of the Platelet P2Y Receptors after Activation: A Way to Avoid Loss of Hemostatic Properties? *Mol Pharm* 2004; 67: 721–33.

Bekard IB, Dunstan DE. Tyrosine Autofluorescence as a Measure of Bovine Insulin Fibrillation. *Biophys J* 2009; 97: 2521–31.

Cattaneo M, Lecchi A, Lombardi R, Gachet C, Zighetti ML. Platelets From a Patient Heterozygous for the Defect of P2_{cyc} Receptors for ADP Have a Secretion Defect Despite Normal Thromboxane A₂ Production and Normal Granule Stores: Further Evidence That Some Cases of Platelet ‘Primary Secretion Defect’ Are Heterozygous for a Defect of P2_{cyc} Receptors. *Arterioscl Thromb Vasc* 2000; 20.

Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, et al. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Conf Proc* 2003; 100: 1978–83.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802–5.

Cui G, Zhang S, Zou J, Chen Y, Chen H. P2Y₁₂ receptor gene polymorphism and the risk

of resistance to clopidogrel: A meta-analysis and review of the literature. *Adv Clin Exp Med* 2017; 26: 343–9.

Cunningham MR, Aungraheeta R, Mundell SJ. Pathophysiological consequences of receptor mistraffic: Tales from the platelet P2Y₁₂ receptor. *Mol Cell End* 2017; 449: 74–81.

Cunningham Margaret R., Nisar SP, Cooke AE, Emery ED, Mundell SJ. Differential Endosomal Sorting of a Novel P2Y₁₂ Purinoreceptor Mutant: Regulation of P2Y₁₂ Recycling via Rab- GTPases. *Traffic* 2013; 14: 585–98.

Cunningham Margaret R., Nisar SP, Mundell SJ. Molecular mechanisms of platelet P2Y₁₂ receptor regulation. *Biochem Soc Trans* 2013; 41: 225–30.

Daly ME, Dawood BB, Lester WA, Peake IR, Rodeghiero F, Goodeve AC, et al. Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood* 2009; 113: 4110–3.

Dangelmaier C, Mauri B, Patel A, Kunapuli SP, Kostyak JC. D121 Located within the DRY Motif of P2Y₁₂ Is Essential for P2Y₁₂-Mediated Platelet Function. *IJMS* 2022; 23: 11519.

Ding Z. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003; 101: 3908–14.

Fontana G, Ware J, Cattaneo M. Haploinsufficiency of the platelet P2Y₁₂ gene in a family with congenital bleeding diathesis. *Haematol* 2009; 94: 581–4.

Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny J-L, Aiach M, et al. Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Aggregation Is Associated with P2Y₁₂ Gene Sequence Variations in Healthy Subjects. *Circulation* 2003a; 108: 989–95.

Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger J-N, Emmerich J, Reny J-L. P2Y₁₂ H2 Haplotype Is Associated With Peripheral Arterial Disease: A Case-Control Study. *Circulation* 2003b; 108: 2971–3.

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors

in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1256–72.

Gebremeskel S, LeVatte T, Liwski RS, Johnston B, Bezuhly M. The reversible P2Y₁₂ inhibitor ticagrelor inhibits metastasis and improves survival in mouse models of cancer: P2Y₁₂ Inhibitor Ticagrelor Inhibits Metastasis. *Int J Canc* 2015; 136: 234–40.

Green MR, Sambrook J. Cloning Polymerase Chain Reaction (PCR) Products: TOPO TA Cloning. *Cold Spring Harb Protoc* 2021; 2021: pdb.prot101311.

Guidetti GF, Lova P, Bernardi B, Campus F, Baldanzi G, Graziani A, et al. The G_i-coupled P2Y₁₂ Receptor Regulates Diacylglycerol-mediated Signaling in Human Platelets. *J Biol Chem* 2008; 283: 28795–805.

Hardy AR. P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors for ADP desensitize by distinct kinase-dependent mechanisms. *Blood* 2005; 105: 3552–60.

Hardy AR. Reciprocal cross-talk between P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* 2004; 104: 1745–52.

Hardy AR, Hill DJ, Poole AW. Evidence that the purinergic receptor P2Y₁₂ potentiates platelet shape change by a Rho kinase-dependent mechanism. *Platelets* 2005; 16: 415–29.

Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25: 4–12.

Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. The Role of Amino Acids in Extracellular Loops of the Human P2Y₁ Receptor in Surface Expression and Activation Processes. *J Biol Chem* 1999; 274: 14639–47.

Hoffmann K, Lutz DA, Straßburger J, Baqi Y, Müller CE, von Kügelgen I. Competitive mode and site of interaction of ticagrelor at the human platelet P2Y₁₂-receptor. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1898–905.

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 Pharm* 2008; 76: 1201–13.

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202–7.

Horváth G, Göllöncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, et al. Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol D* 2014; 70: 162–78.

Ignatovica V, Megnis K, Lapins M, Schiöth HB, Klovins J. Identification and analysis of functionally important amino acids in human purinergic 12 receptor using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system: Investigation of P2Y₁₂ ligand binding sites. *FEBS Journal* 2012; 279: 180–91.

Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, Kennedy C, von Kügelgen I, Li B, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 2413–33.

Jacobson KA, Paoletta S, Katritch V, Wu B, Gao Z-G, Zhao Q, et al. Nucleotides Acting at P2Y Receptors: Connecting Structure and Function. *Mol Pharmacol* 2015; 88: 220–30.

Jones ML, Norman JE, Morgan NV, Mundell SJ, Lordkipanidzé M, Lowe GC, et al. Diversity and impact of rare variants in genes encoding the platelet G protein-coupled receptors. *Thromb Haemost* 2015; 113: 826–37.

Kanamarlapudi V, Owens SE, Saha K, Pope RJ, Mundell SJ. ARF6-Dependent Regulation of P2Y Receptor Traffic and Function in Human Platelets. *PLoS ONE* 2012; 7: e43532.

Kawaguchi A, Sato M, Kimura M, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y. Expression and function of purinergic P2Y₁₂ receptors in rat trigeminal ganglion neurons. *Neurosci Res* 2015; 98: 17–27.

Khan A, Li D, Ibrahim S, Smyth E, Woulfe DS. The Physical Association of the P2Y₁₂ Receptor with PAR4 Regulates Arrestin-Mediated Akt Activation. *Mol Pharmacol* 2014; 86: 1–11.

von Kügelgen I. Pharmacology of P2Y receptors. *Brain Res Bull* 2019; 151: 12–24.

von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharm Thera* 2006; 110: 415–32.

von Kügelgen I, Harden TK. Molecular Pharmacology, Physiology, and Structure of the P2Y Receptors. *Adv Pharmacol*, vol. 61, Elsevier, 2011, 373–415.

Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DGM, et al. Contribution of Hepatic Cytochrome P450 3A4 Metabolic Activity to the Phenomenon of Clopidogrel Resistance. *Circulation* 2004; 109: 166–71.

Lecchi A, Razzari C, Paoletta S, Dupuis A, Nakamura L, Ohlmann P, et al. Identification of a new dysfunctional platelet P2Y12 receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood* 2015; 125: 1006–13.

Leon C, Ravanat C, Freund M, Cazenave J-P, Gachet C. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1941–7.

Li D, D'Angelo L, Chavez M, Woulfe DS. Arrestin-2 Differentially Regulates PAR4 and ADP Receptor Signaling in Platelets. *J Biol Chem* 2011; 286: 3805–14.

Liverani E, Rico MC, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. P2Y12 Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36: 961–71.

Luo W, Wang Y, Reiser G. Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and μ -opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking: Retention of GPCRs by p23 and p24A. *J Neurochem* 2011; 117: 71–81.

Mao Y, Zhang L, Jin J, Ashby B, Kunapuli SP. Mutational analysis of residues important for ligand interaction with the human P2Y12 receptor. *Eur J Pharmacol* 2010; 644: 10–6.

Marchese A, Paing MM, Temple BRS, Trejo J. G Protein–Coupled Receptor Sorting to Endosomes and Lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 601–29.

Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VTS, Michell-Robinson M, Leong SY, et al. P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015; 2: e80.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51: 263–73.

Mundell SJ, Barton JF, Mayo-Martin MB, Hardy AR, Poole AW. Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1393–404.

Mundell SJ, Luo J, Benovic JL, Conley PB, Poole AW. Distinct Clathrin-Coated Pits Sort Different G Protein-Coupled Receptor Cargo. *Traffic* 2006; 7: 1420–31.

Nisar S, Daly ME, Federici AB, Artoni A, Mumford AD, Watson SP, et al. An intact PDZ motif is essential for correct P2Y12 purinoceptor traffic in human platelets. *Blood* 2011; 118: 5641–51.

Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, et al. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest* 1995; 95: 1612–22.

O'Brien KA, Gartner TK, Hay N, Du X. ADP-Stimulated Activation of Akt During Integrin Outside-in Signaling Promotes Platelet Spreading by Inhibiting Glycogen Synthase Kinase-3 β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2232–40.

Paoletta S, Sabbadin D, von K ugelgen I, Hinz S, Katritch V, Hoffmann K, et al. Modeling ligand recognition at the P2Y12 receptor in light of X-ray structural information. *J Comput Aided Mol Des* 2015; 29: 737–56.

Paredes-Gamero EJ, Craveiro RB, Pesquero JB, Fran a JP, Oshiro MEM, Ferreira AT. Activation of P2Y1 receptor triggers two calcium signaling pathways in bone marrow erythroblasts. *Eur J Pharmacol* 2006; 534: 30–8.

Patel YM, Lordkipanidz  M, Lowe GC, Nisar SP, Garner K, Stockley J, et al. A novel mutation in the P2Y12 receptor and a function-reducing polymorphism in protease-

activated receptor 1 in a patient with chronic bleeding. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 716–25.

Pottie E, Storme J, Stove CP. The P2Y2 Receptor C-Terminal Tail Modulates but Is Dispensable for β -Arrestin Recruitment. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 3460.

Priyadharsini R, Umamaheswaran G, . Raja TAR, Arun Kumar AS, Subraja K, Dkhar SA, et al. Frequency of single nucleotide platelet receptor gene polymorphism (P2Y12-i744T>C) in coronary artery disease patients among TAMILIAN population. *J Community Genet* 2017; 8: 127–32.

Rassow J, Netzker R, Hauser K, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie. 3. Stuttgart: Thieme, 2012.*

Reed GW, Cannon CP, Waalen J, Teirstein PS, Tanguay J-F, Berger PB, et al. Influence of smoking on the antiplatelet effect of clopidogrel differs according to clopidogrel dose: Insights from the GRAVITAS trial: Smoking and Clopidogrel Response After PCI. *Cathet Cardiovasc Intervent* 2017; 89: 190–8.

Remijn JA, IJsseldijk MJW, Strunk ALM, Abbes AP, Engel H, Dikkeschei B, et al. Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y12 of a patient with haemorrhagic diathesis. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45.

Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, et al. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. *Glia* 2003; 44: 242–50.

Satonaka H, Nagata D, Takahashi M, Kiyosue A, Myojo M, Fujita D, et al. Involvement of P2Y12 receptor in vascular smooth muscle inflammatory changes via MCP-1 upregulation and monocyte adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308: H853–61.

Savi P, Zacharyus J-L, Delesque-Touchard N, Labouret C, Herve C, Uzabiaga M-F, et al. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *PNAS* 2006; 103: 11069–74.

Schiedner G, Hertel S, Bialek C, Kewes H, Waschütza G, Volpers C. Efficient and reproducible generation of high-expressing, stable human cell lines without need for

antibiotic selection. *BMC Biotechnol* 2008; 8: 13.

Schöneberg T, Hermsdorf T, Engemaier E, Engel K, Liebscher I, Thor D, et al. Structural and functional evolution of the P2Y₁₂-like receptor group. *Purinergic Signalling* 2007; 3: 255–68.

Sente A, Peer R, Srivastava A, Baidya M, Lesk AM, Balaji S, et al. Molecular mechanism of modulating arrestin conformation by GPCR phosphorylation. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25: 538–45.

Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 246–51.

Shanker G, Kontos JL, Eckman DM, Wesley-Farrington D, Sane DC. Nicotine upregulates the expression of P2Y₁₂ on vascular cells and megakaryoblasts. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22: 213–20.

Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, et al. Impaired platelet function in a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon: P2Y₁₂ deficiency with an initiation codon mutation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2315–23.

Smith SMG, Judge HM, Peters G, Armstrong M, Fontana P, Gaussem P, et al. Common sequence variations in the P2Y₁₂ and CYP3A5 genes do not explain the variability in the inhibitory effects of clopidogrel therapy. *Platelets* 2006; 17: 250–8.

Smith TH, Li JG, Dores MR, Trejo J. Protease-activated receptor-4 and purinergic receptor P2Y₁₂ dimerize, co-internalize, and activate Akt signaling via endosomal recruitment of β -arrestin. *J Biol Chem* 2017; 292: 13867–78.

Soulet C, Sauzeau V, Plantavid M, Herbert JM, Pacaud P, Payrastre B, et al. Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y₁₂ ADP-receptor. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 135–46.

Su J, Li X, Yu Q, Liu Y, Wang Y, Song H, et al. Association of P2Y₁₂ Gene Promoter DNA Methylation with the Risk of Clopidogrel Resistance in Coronary Artery Disease Patients.

BioMed Res Int 2014; 2014: 1–8.

Suh D-H, Trinh HKT, Liu J-N, Pham LD, Park SM, Park H-S, et al. P2Y₁₂ antagonist attenuates eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse model of asthma. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 333–41.

Tang X-F, Fan J-Y, Meng J, Jin C, Yuan J-Q, Yang Y-J. Impact of new oral or intravenous P2Y₁₂ inhibitors and clopidogrel on major ischemic and bleeding events in patients with coronary artery disease: A meta-analysis of randomized trials. *Atherosclerosis* 2014; 233: 568–78.

Thomas MR, Outteridge SN, Ajjan RA, Phoenix F, Sangha GK, Faulkner RE, et al. Platelet P2Y₁₂ Inhibitors Reduce Systemic Inflammation and Its Prothrombotic Effects in an Experimental Human Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2562–70.

Tozaki-Saitoh H, Miyata H, Yamashita T, Matsushita K, Tsuda M, Inoue K. P2Y₁₂ receptors in primary microglia activate nuclear factor of activated T-cell signaling to induce C-C chemokine 3 expression. *J Neurochem* 2017; 141: 100–10.

Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K. P2Y₁₂ Receptors in Spinal Microglia Are Required for Neuropathic Pain after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 2008; 28: 4949–56.

Tsai M-J, Ou S-M, Shih C-J, Chao P, Wang L-F, Shih Y-N, et al. Association of prior antiplatelet agents with mortality in sepsis patients: a nationwide population-based cohort study. *Intensive Care Med* 2015; 41: 806–13.

Tulapurkar ME, Zundorf G, Reiser G. Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y₁ nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem* 2006; 96: 624–34.

Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 3. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

Wang Q, Shi N-R, Lv P, Liu Juan, Zhang J-Z, Deng B-L, et al. P2Y₁₂ receptor gene polymorphisms are associated with epilepsy. *Purinergic Signalling* 2023; 19: 155–62.

Webster CM, Hokari M, McManus A, Tang XN, Ma H, Kacimi R, et al. Microglial P2Y₁₂

Deficiency/Inhibition Protects against Brain Ischemia. *PLoS ONE* 2013; 8: e70927.

Wihlborg A-K, Wang L, Braun OÖ, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, et al. ADP Receptor P2Y₁₂ Is Expressed in Vascular Smooth Muscle Cells and Stimulates Contraction in Human Blood Vessels. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1810–5.

Zhang J, Zhang K, Gao Z-G, Paoletta S, Zhang D, Han GW, et al. Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature* 2014a; 509: 119–22.

Zhang K, Zhang J, Gao Z-G, Zhang D, Zhu L, Han GW, et al. Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature* 2014b; 509: 115–8.

Zhang Y, Peti-Peterdi J, Muller CE, Carlson NG, Baqi Y, Strasburg DL, et al. P2Y₁₂ Receptor Localizes in the Renal Collecting Duct and Its Blockade Augments Arginine Vasopressin Action and Alleviates Nephrogenic Diabetes Insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 2978–87.

Zhao X, Cooper M, Michael JV, Yarman Y, Baltz A, Chuprun JK, et al. GRK2 regulates ADP signaling in platelets via P2Y₁ and P2Y₁₂. *Blood Adv* 2022; 6: 4524–36.

Zhong X, Kriz R, Seehra J, Kumar R. N-linked glycosylation of platelet P2Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Letters* 2004; 562: 111–7.

Zoheir N, Elhamid SA, Abulata N, Sobky MEI, Khafagy D, Mostafa A. P2Y₁₂ receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting: *Blood Coagulation Fibrinolysis* 2013; 24: 525–31.

7. Anhang

7.1 Protokolle

7.1.1 Mutagene PCR

Die in fester Form gelieferten Primer werden mit sterilisiertem H₂O jeweils standardmäßig auf eine Zielkonzentration von 100 pmol/μl gelöst. Für die anschließende PCR-Reaktion werden jeweils 2 μl der gewünschten Primer (siehe 7.2.12.) mit 36 μl sterilisiertem H₂O versetzt (= 40 μl Primer-Mix).

Der Pipettiervorgang wird grundsätzlich unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

1 μl DNA-Template

2 μl Primer-Mix

22,5 μl DNA-Polymerase-Mix (siehe 7.2.9.1)

Die Variation der Temperatur- und Zeitangaben kommt durch die Verwendung unterschiedlicher Primer bei verschiedenen PCR-Ansätzen zu Stande.

1. Vorbereitung der Polymerase	95 °C	5 Minuten	
2. Denaturierung	94 – 95 °C	30 Sekunden	} 38x
3. Annealing	55 – 66,8 °C	30 Sekunden	
4. Elongation	68 – 72 °C	75 – 120 Sekunden	
5. Abschließende Elongation	68 – 72 °C	10 Minuten	
6. Ende	3 °C	∞	

7.1.2 Abbau methylierter DNA mittels DpnI

Dem PCR-Produkt werden 0,5 μl DpnI zugegeben. Im Thermocycler wird die Lösung 40 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen auf 80 °C für 20 Minuten wird DpnI inaktiviert.

7.1.3 Herstellung des Agarose-Gels (0,8%/1%)

0,8 g Agarose werden mit 80 ml/100ml TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und kurz aufgekocht, sodass die Agarose sich vollständig auflöst. Nach leichter Abkühlung Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid. Das noch warme, flüssige Gel wird in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Durch Einhängen eines Kammes entstehen nach Abkühlung Taschen, in die die zu untersuchende DNA pipettiert wird. Das Gel mindestens 20 Minuten abkühlen und aushärten lassen.

7.1.4 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach PCR

10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Bromophenol-haltigen Ladungspuffer (BlueJuice™) vermischen. Nach Entfernen des Kammes in die entstandenen Kammern des 1%-igen Agarosegels jeweils die PCR-Ladungspuffer-Lösung pipettieren. Zuletzt in eine eigene Kammer 4 µl einer 1 kB-DNA-Leiter geben. Die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgießen, bis das Gel komplette von Flüssigkeit bedeckt ist. Spannung von 65 mV anlegen und etwa 90 – 120 Minuten angelegt lassen.

7.1.5 Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese nach Plasmidpräparation

3 µl Plasmid-DNA mit 2 µl Bromophenol-haltigen Ladungspuffer (BlueJuice™) vermischen. Nach Entfernen des Kammes in die entstandenen Kammern des 0,8%-igen Agarosegels jeweils die PCR-Ladungspuffer-Lösung pipettieren. Zuletzt in eine eigene Kammer 4 µl einer 1 kB-DNA-Leiter bzw. einen zirkulären Vektor geben. Die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgießen, bis das Gel komplett von Flüssigkeit bedeckt ist. Spannung von 65 mV anlegen und etwa 90 – 120 Minuten angelegt lassen.

7.1.6 Isolation von DNA aus Agarosegel nach QIAquick® Gel Extraction Kit Protocol

Die DNA wird mit möglichst wenig Agarosegel mit einem Einmalskalpell herausgeschnitten. Das extrahierte Stück Gel wird gewogen. Pro 100 mg Gewicht werden 300 µl Diffusionspuffer QG hinzugegeben. Mindestens 10 Minuten (bzw. bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat) im Wasserbad bei 50 °C inkubieren. Die Lösung sollte nun eine gelbe Farbe haben. Pro 100 mg Gewicht werden 100 µl Isopropanol hinzugefügt.

Eine QIAquick® DNA-Austauschsäule wird in ein 2 ml Eppendorfgefäß platziert. Die Lösung wird in die Austauschsäule pipettiert. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Flüssigkeit verwerfen.

0,5 ml QG-Puffer zugeben. Hierdurch werden letzte Agarosegelreste entfernt. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Flüssigkeit verwerfen.

0,75 ml PE-Puffer zugeben. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Flüssigkeit verwerfen.

Erneut 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur ohne Zugabe weiterer Flüssigkeit zentrifugieren.

Die DNA-Austauschsäule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß stellen. 50 µl EB-Puffer zugeben. 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

Etwa 60% der Gesamt-DNA befinden sich nun im Eluat. Dieses kann nun für weitere Klonierungsverfahren verwendet werden.

7.1.7 Herstellung von Agar-Platten für E. coli (100 µg/ml Ampicillin, 10 Platten)

Ampicillin auf Raumtemperatur erwärmen lassen. 6,4 g Agar werden mit 200 ml destilliertem Wasser im Flüssigkeitsprogramm des Autoklavs bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Die folgenden Schritte werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die autoklavierte Agar-Lösung etwa 20 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Anschließend 2 ml Ampicillin hinzugeben, vorsichtig vermischen. Jeweils 20 ml Flüssigkeit, möglichst ohne die Entstehung von Luftblasen, auf insgesamt 10 Petrischalen pipettieren. 30 Minuten lang abkühlen und erhärten lassen. Die Agar-Platten können anschließend mit Parafilm-Verschlussfolie verschlossen und im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

7.1.8 Ligation an Klonierungsvektor

3 µl PCR-Produkt (siehe 7.1.1.)

0,75 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

0,75 µl Vektor

5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

7.1.9 Transformation an E. coli

2 µl Ligationsansatz (siehe 7.1.8.)

50 µl One Shot TOP 10 E. coli Chemically Competent Cells

30 Minuten auf Eis inkubieren.

Ein Wasserbad auf exakt 42 °C erhitzen. Das Bakteriengemisch exakt 30 Sekunden lang in Wasserbad hitzeschocken. Anschließend direkt für 3 Minuten auf Eis stellen.

Zugabe von 250 µl S.O.C-Medium.

Bei 37 °C für 60 Minuten im Wärmeschüttler bei 225 U/Min. inkubieren.

Anschließend je 20 µl bzw. 200 µl der E. coli Suspension auf je eine auf 37 °C vorgewärmte Agarplatte (siehe 7.1.7.) pipettieren und ausstreichen. Für 24 (- 48) Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubieren.

7.1.10 Amplifikation von E. coli

4 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium in Falcon-Röhrchen pipettieren. Je eine Kolonie der Agarplatte aufnehmen und in Nährlösung überimpfen.

Suspension für 12 – 14 Stunden horizontal und mit nicht vollständig verschlossenem Deckel bei 37 °C im Wärmeschüttler mit 250 U/Min. inkubieren.

7.1.11 Plasmidpräparation nach QIAprep® Miniprep Protokoll

2 ml der amplifizierten E. coli-Suspension (siehe 7.1.10.) in ein Eppendorfgefäß pipettieren. 3 Minuten bei 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Die Bakterien setzen sich am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand aus Nährmedium wird abpipettiert und verworfen.

Die verbliebenen Bakterien mit 250 µl P1-Puffer versetzen. Durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer wird die Lyse-Reaktion gestartet, die Suspension verfärbt sich blau. Gefäße verschließen und 4–6-mal vorsichtig schwenken, um den Austritt genomischer DNA zu verhindern. Möglichst exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

350 µl N3-Puffer zugeben und schwenken, bis die blaue Farbe milchig-trüb wird. N3-Puffer neutralisiert die Lyse. 10 Minuten bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

Die Suspension hat sich in zwei Phasen geteilt. Am Boden befindet sich ein weißer Klumpen aus Bakterienzellen, der flüssige Überstand enthält die extrahierte Plasmid-DNA. 800 µl des flüssigen Überstands in eine DNA-Austauschsäule pipettieren. Die Austauschsäule in ein Eppendorf-Gefäß stellen. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

Die DNA ist nun in der Austauschsäule gebunden, der flüssige Überstand wird verworfen. 0,5 ml PB-Puffer zugeben. PB-Puffer säubert die DNA von Nuklease-Rückständen. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Flüssigkeit verwerfen.

0,75 ml PE-Puffer zugeben. 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren. Flüssigkeit verwerfen.

Erneut 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur ohne Zugabe weiterer Flüssigkeit zentrifugieren.

Die DNA-Austauschsäule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß stellen. 50 µl EB-Puffer zugeben. 60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend 60 Sekunden bei 14.100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren.

Etwa 60 % der Gesamt-DNA wurden durch den EB-Puffer aus der Austauschsäule gelöst und befinden sich nun in flüssiger Form, die übrigen etwa 40% befinden sich noch gebunden in der Austauschsäule und können bei Bedarf erneut eluiert werden.

7.1.12 Einsatz von Restriktionsenzymen

10 µl Template (z.B. GFP_hP2Y₁₂_deIPDZ_CFP_pcDNA6)

5 µl Puffer (z.B. NEB 2, NEB 3)

je 1 µl Restriktionsenzym (z.B. Msc I, Xho I, Mln I)

2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubieren. Im Anschluss Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 80 °C inaktivieren. 1 Minute bei 14.100 rpm abzentrifugieren. Im Verhältnis 1:10 mit sterilem H₂O verdünnen. Anschließend PCR.

7.2 Materialien

7.2.1 Geräte

Autoklave	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Brutschrank	Heraeus	Wertheim
Einmalhandschuhe	Ansell	München
Feinwaage	Sartorius	Göttingen
Flüssigstickstofftank	Harsco	Düsseldorf
Gelelektrophoresekammer	BioRad	München
Laserscanningmikroskop	Zeiss	Oberkochen
Mikroskop	Zeiss	Oberkochen
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Pipette	Eppendorf	Hamburg
Pipettierhelfer	Brand	Wertheim
Sterile Werkbank (PCR)	Heraeus	Wertheim
Sterile Werkbank (Zellkultur)	Heraeus	Wertheim
Thermocycler	Biometra	Göttingen
Wasserbad	Eich	Langenfeld

7.2.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäß 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg
Eppendorfgefäß 2 ml	Eppendorf	Hamburg
Falcon-Gefäß (15 ml)	Vwr	Darmstadt
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc	Wiesbaden
Petrischalen	Nunc	Wiesbaden

Pipetten (1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml)	Nunc	Wiesbaden
-------------------------------------	------	-----------

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Roth	Karlsruhe
--	------	-----------

QIAprep 2.0 spin columns	Qiagen	Hilden
--------------------------	--------	--------

7.2.3 Software

LSM-Software (ZEN SP2)	Carl Zeiss	Jena
------------------------	------------	------

Graph Pad Prism	Graph Pad	San Diego
-----------------	-----------	-----------

7.2.4 Chemikalien

Agarose	Invitrogen	Karlsruhe
---------	------------	-----------

Blasticidin	Invitrogen	Karlsruhe
-------------	------------	-----------

DMEM/F12, GlutaMAX™	Invitrogen	Karlsruhe
---------------------	------------	-----------

DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim
------	---------------	-----------

DNA-Leiter (1 kb)	Invitrogen	Karlsruhe
-------------------	------------	-----------

Ethidiumbromid	Invitrogen	Karlsruhe
----------------	------------	-----------

Fetales Kälberserum	Invitrogen	Karlsruhe
---------------------	------------	-----------

Hygromycin	Invitrogen	Karlsruhe
------------	------------	-----------

Lipofectamin 2000	Invitrogen	Karlsruhe
-------------------	------------	-----------

Trypsin/EDTA	Invitrogen	Karlsruhe
--------------	------------	-----------

Zeocin	Invitrogen	Karlsruhe
--------	------------	-----------

7.2.5 Lösungen und Puffer

Blue Juice Loading Buffer (10X)	Invitrogen	Karlsruhe
---------------------------------	------------	-----------

EB-Puffer (Lot.No. 142319066)	Qiagen	Hilden
-------------------------------	--------	--------

N3-Puffer (Lot.No. 142317000)	Qiagen	Hilden
-------------------------------	--------	--------

NEB 2 Puffer (Lot.No. 1002)	New England Biolabs Inc.	Frankfurt a.M.
-----------------------------	--------------------------	----------------

NEB 3 Puffer (Lot. 0081101)	New England Biolabs Inc. Frankfurt a.M.	
P1-Puffer (Lot.No. 142323808)	Qiagen	Hilden
P2-Puffer (Lot. No. 142322525)	Qiagen	Hilden
PB-Puffer (Lot.No. 142324191)	Qiagen	Hilden
PBS	Invitrogen	Karlsruhe
PE-Puffer (Lot.No. 142324184)	Qiagen	Hilden
TAE-Puffer (10X; selbst hergestellt)	400 mM	Tris-Acetat
	10 mM	EDTA
	pH 8,3	

7.2.6 Medien

CHO-Nährmedium (selbst hergestellt)	450 ml	DMEM/F12, GlutaMAX™
	50 ml	10% Fetales Kälberserum
	je nach Medium zusätzlich	
	1 µl/ml	Zeocin
bzw.	1 µl/ml	Blasticidin
bzw.	600 µg/ml	Hygromycin
LB-Medium (selbst hergestellt)	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	1 N	NaOH
	destilliertes H ₂ O	
	pH 7,0	

Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Cat. No. 31985062): Invitrogen, Karlsruhe

S.O.C. Medium P/N 46-0700 (Cat. No. 15544034): Invitrogen, Karlsruhe

7.2.7 Vektoren

pcDNA5™/FRT/V5-His TOPO® TA Expression Kit P/N 46-0273 (Cat. No. K602001):
Invitrogen, Karlsruhe

Vivid Colors™ pcDNA™6.2/C-YFP-GW/TOPO™ Mammalian Expression Vector (Cat.
No. K36120): Invitrogen, Karlsruhe

pOG44 Flp-Rekombinase Expression Vector (Cat. No. V600520): Invitrogen, Karlsruhe

7.2.8 hP2Y₁₂-Rezeptor-Template

GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6 AG von K ugelgen Bonn

hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5 (Maxiprep) AG von K ugelgen Bonn

7.2.9 Enzyme

7.2.9.1 DNA-Polymerase-Mix

Accu-Prime Pfx Super Mix 50 rxn (Cat. No. 12344-040): Invitrogen, Karlsruhe

Platinum PCR Supermix 50 rxn (Cat. No. 11306): Invitrogen, Karlsruhe

PCR SuperMix High Fidelity 25 rxn (Cat.No. 10790-020): Invitrogen, Karlsruhe

7.2.9.2 Restriktionsenzyme

DpnI	5'GA ^{m6} ↓T C3' 3'CT ↑A ^{m6} G5'	Thermo Scientific	Waltham
Mlu I	5'A↓CGCGT3' 3'TGCGC↑A5'	New England Biolabs Inc	Frankfurt a.M.
Msc I	5'TGG↓CCA3' 3'ACC↑GGT5'	New England Biolabs Inc.	Frankfurt a.M.
Xho I	5'C↓TCGAG3' 3'GAGCT↑C5'	Sigma	Steinheim

7.2.10 Bakterienst amme

One Shot TOP10 E. coli Invitrogen Karlsruhe

Chemically	Competent	Cells
Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG		

7.2.11 Zelllinie

CHO-K1-Zelllinie	AG von Kugelgen	Bonn
------------------	------------------	------

7.2.12 Primer

hP2Y ₁₂ _rstop	5'-TTA CAT TGG AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3'
hP2Y ₁₂ _flpfor	5'-CAC CAT GCA AGC CGT CGA CAA CCT C-3
CFP_end	5'-CTG GGT CGA ATT CGC CCT TTT ACT TGT ACA GC-3'
GFP_for5	5'-GGT GAT ATC CTC GAG ACC ATG GTG AGC AAG G-3'
hP2Y ₁₂ _rev	5'-CAT TGG AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3'
hP2Y ₁₂ _2PDZ	5'-CAT TGG AGT CTC TCC CAT TGG AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3'
hP2Y ₁₂ _d321_neu	5'-TGT TGC AGA ATT GGG GCA CTT CAG CAT ACT TAT C-3'
hP2Y ₁₂ _dPDZ_neu	5'-ATT TGG GTC ACC ACC ATC CTG TTC TTT TTT CC-3'
hP2Y ₁₂ _P341A_r	5'-CAT TGC AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3'

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sekundärstruktur des P2Y ₁₂ -Rezeptors mit typischem Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.	15
Abbildung 2: Gelelektrophorese nach PCR.	45
Abbildung 3: Gelelektrophorese nach Plasmidpräparation.	45
Abbildung 4: Mikroskopie der nicht-transfektierten CHO-Kontrollzellen (a-c).	47
Abbildung 5: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten, nicht-mutierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5.	48
Abbildung 6: Mikroskopie der stabil transfektierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP_pcDNA5(Phe79Ala).	48
Abbildung 7: Mikroskopie der transient exprimierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA5^hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2	49
Abbildung 8: Mikroskopie der transient exprimierten Zelllinie GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA6.2	50
Abbildung 9: Mikroskopie der stabil exprimierten Zelllinie GFP_hP2Y ₁₂ _CFP_pcDNA6.2	51
Abbildung 10: Mikroskopie der transient exprimierten Zelllinie GFP_hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP_pcDNA6.2	52
Abbildung 11: Mikroskopie der stabil exprimierten Zelllinie GFP_hP2Y ₁₂ _delPDZ_CFP_pcDNA6.2	53
Abbildung 12: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie GFP_hP2Y ₁₂ _pcDNA6.2	54
Abbildung 13: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _CFP_YFP_pcDNA6.2	54
Abbildung 14: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _YFP_pcDNA6.2	55
Abbildung 15: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _del321_342_YFP_pcDNA6.2	55
Abbildung 16: Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y ₁₂ _P341A_YFP_pcDNA6.2	56

- Abbildung 17:** Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2 57
- Abbildung 18:** Mikroskopie der transienten (a) und stabil (b) exprimierten Zelllinie hP2Y₁₂_delPDZ_YFP_pcDNA6.2 58
- Abbildung 19:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5. 621
- Abbildung 20:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. 632
- Abbildung 21:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5. 643
- Abbildung 22:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA5. 654
- Abbildung 23:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA5. 665
- Abbildung 24:** Vergleich der Lichtintensitäten der mit CFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor. 676
- Abbildung 25:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_pcDNA6.2. 69
- Abbildung 26:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_CFP_pcDNA6.2. 70
- Abbildung 27:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors GFP_hP2Y₁₂_delPDZ_CFP_pcDNA6.2. 721

- Abbildung 28:** Vergleich der Lichtintensitäten der mit GFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor. 732
- Abbildung 29:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_pcDNA5^hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. 787
- Abbildung 30:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_YFP_pcDNA6.2. 78
- Abbildung 31:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_del321_342_YFP_pcDNA6.2. 79
- Abbildung 32:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_P341A_YFP_pcDNA6.2. 810
- Abbildung 33:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_2PDZ_YFP_pcDNA6.2. 821
- Abbildung 34:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_delPDZ_YFP_pcDNA6.2. 832
- Abbildung 35:** Darstellung der Lichtintensitäten an Zellmembran, Zytoplasma und Hintergrund des transient (_t) und stabil (_s) exprimierten Rezeptors hP2Y₁₂_CFP_YFP_pcDNA6.2. 843
- Abbildung 36:** Vergleich der Lichtintensitäten der mit YFP gekoppelten, stabil exprimierten Rezeptoren an der Zellmembran (a) sowie im Zytoplasma (b) in Relation zum nicht-mutierten Wildtyprezeptor. 854

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die bislang identifizierten, humanen P2Y-Rezeptoren, modifiziert nach (Abbracchio 2006; von Kügelgen 2006; von Kügelgen und Harden 2011).	16
Tabelle 2: Übersicht der bei bisherigen Mutagenesestudien am P2Y ₁₂ -Rezeptor untersuchten Aminosäuren.	18
Tabelle 3: Übersicht über die durch PCR gewonnenen hP2Y ₁₂ -Rezeptorvarianten	44
Tabelle 4: Übersicht über die nach Klonierung und Plasmidpräparation gewonnenen hP2Y ₁₂ -Rezeptorvarianten.	46
Tabelle 5: Übersicht über die transfektierten Zelllinien, die hinsichtlich ihrer Expression unter dem Laserscanningmikroskop analysiert wurden	47
Tabelle 6: Übersicht über die mit CFP markierten Konstrukte.	61
Tabelle 7: Übersicht über die mit GFP markierten Konstrukte.	69
Tabelle 8: Übersicht über die mit YFP markierten Konstrukte.	76

10. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. von Kugelgen für die Möglichkeit zur Anfertigung der Arbeit, sowie zur stets freundlichen Anleitung und Beistand sowohl bei der praktischen Arbeit im Labor als auch bei theoretischen Diskussionen.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Pfeifer und allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn für die lehrreiche Zeit.

Ich danke meinen Freunden, Kollegen und Mentoren am Universitätskinderklinikum Bonn, die mir stets mit freundschaftlichem und professionellem Rat bei der Anfertigung der Arbeit und vielen anderen Lebensfragen zur Seite standen.

Meinen Herzensfamilien und Freunden in Japan, für deren liebevolle Aufnahme und die vielen Erfahrungen, die mein Leben so geprägt haben, ich für immer dankbar bin.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich bei all meinen Ideen und Träumen unterstützt hat. Ganz besonders danke ich Dir, Mama, dass Du mir alles ermöglicht hast.

11. Lebenslauf

Name: Judith Leyens

Geburtsort: Siegburg

Sprachkenntnisse: Deutsch, Englisch, Japanisch

Publikationen:

- 2023 **Spontaneous breathing in selected neonates with very mild congenital diaphragmatic hernia.** Kipfmueller F, **Leyens J** et al. *Pediatr Pulmonol.* 2023; 1-8.
- 2023 **Dynamics of pulmonary hypertension severity in the first 48 hours in neonates with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia;** **Leyens J** et al., *Front. Pediatr.*, 05 June 2023, Sec. Neonatology, Volume 11 - 2023/Poster Presentation Congenital Diaphragmatic Hernia International Symposium 2022, Glasgow, UK, und 48. Jahrestagung der GNPI, Aachen, Deutschland
- 2023 **Evaluation of levosimendan as treatment option in preterm infants with cardiac dysfunction and pulmonary hypertension;** Schroeder et al., *Eur J Pediatr.* 2023; 182(7): 3165–3174.
- 2023 **Ductus arteriosus flow pattern and outcome prediction in neonates with congenital diaphragmatic hernia;** Bo B et al., *Pediatr Pulmonol* 2023 Mar 15.
- 2022 **Image quality and radiation dose of dual source high pitch computed tomography in pediatric congenital heart disease.** Kravchenko, D. et al. *Sci Rep* 12, 9934 (2022)
- 2021 **The combined prevalence of classified rare rheumatic diseases is almost double that of ankylosing spondylitis.** **Leyens, J.**et al. *Orphanet*

J Rare Dis 16, 326 (2021);/Poster Presentation EULAR (European League against rheumatism) Kongress 2016, London, UK

- 2020 **Therapeutic options for patients with rare rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis.** Bender, T.T.A. et al. Orphanet J Rare Dis 15, 308 (2020).
- 2018 **Mücke, Martin: Fälle seltener Erkrankungen (Lehrbuch).** Kapitel 9 „Im Fieberwahn“, Kapitel 10 „Wenn die Luft wegbleibt“, 1. Auflage, Elsevier Verlag, New York, Jun 2018