

Molekularpharmakologische Analyse des P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten Elinogrel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Katharina Schlomberg

aus Lippstadt

2025

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: 05.09.2025

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	9
1.1	Purinerge Rezeptoren	9
1.2	Der humane P2Y ₁₂ -Rezeptor	9
1.2.1	Bedeutung für die primäre Hämostase	9
1.2.2	Physiologie und Pathophysiologie	10
1.2.3	Signaltransduktion	11
1.2.4	Pharmakologie	13
1.3	Elinogrel	14
1.4	Fragestellung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Testsubstanzen und Antikörper	16
2.1.2	Biologisches Material	16
2.1.3	Weitere Materialien	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Fluoreszenzmikroskopie	17
2.2.2	AlphaScreen®-Assay	20
2.2.3	Auswertung	26
2.2.4	Statistische Verfahren	30
3.	Ergebnisse	31
3.1	Expression des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors	31
3.1.1	Expression des Rezeptors als Fusionsprotein	31
3.1.2	Expression des K280A-mutierten Rezeptors als Fusionsprotein	31

3.1.3	Expression des Wildtyp-Rezeptors	33
3.1.4	Einfluss des Agonisten	35
3.2	Molekularpharmakologische Analyse am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor	36
3.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Überblick	36
3.2.2	Analyse am Rezeptor als Fusionsprotein	37
3.2.3	Analyse am Wildtyp-Rezeptor	47
3.2.4	Analyse am K280A-mutierten Rezeptor als Fusionsprotein	52
3.2.5	Vergleich der Agonisten und der Rezeptorvarianten	52
3.2.6	pA ₂ -Wert von Elinogrel	52
4.	Diskussion	58
4.1	Eignung der Methoden	58
4.1.1	Alpha-Screen®-Verfahren	58
4.1.2	Fehlerquellen	58
4.1.3	Standardgerade	59
4.1.4	Einwirkungen auf die Signaltransduktion	60
4.2	Expression des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors	61
4.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Agonisten	62
4.3.1	Vergleich der Agonisten	62
4.3.2	Vergleich der Rezeptorvarianten und Auswirkung der K280A-Mutation	62
4.4	Wirkung von Elinogrel am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor	64
4.4.1	Antagonismus	64
4.4.2	Bindungsmechanismus von Elinogrel	65
4.4.3	Affinität von Elinogrel	65
4.4.4	Einordnung des pA ₂ -Werts	66
4.4.5	Einfluss der K280A-Mutation	68
4.4.6	Wissenschaftliche Bedeutung - Überblick	69

5.	Zusammenfassung	70
6.	Abbildungsverzeichnis	71
7.	Tabellenverzeichnis	74
8.	Literaturverzeichnis	75
	Anhang	85
9.	Erklärung zum Eigenanteil	95
10.	Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

2-MeSADP	2-Methylthioadenosindiphosphat
[³ H]PSB0413	[³ H]2-Propylthioadenosinmonophosphat(1,1-dichloro-1-phosphonomethyl-1-phosphonyl)anhydrid
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ANCOVA	Kovarianzanalyse
ANOVA	Varianzanalyse
AR-C67085	2-Propylthio-β,γ-difluoromethylen-D-adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Kälberserum-Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHO-Zellen	Chinesische Hamsterovarienzellen
CHO-ECFP-Zellen	Chinesische Hamsterovarienzellen, die stabil ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein exprimieren
CHO-ECFP-K280A-Zellen	Chinesische Hamsterovarienzellen, die stabil ein Fusionsprotein aus dem K280A-mutierten humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein exprimieren
CHO-WT-Zellen	Chinesische Hamsterovarienzellen, die stabil den humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor ohne Modifikation (Wildtyp) exprimieren

DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
EC ₅₀ -Wert	Halbmaximal wirksame Konzentration
ECFP	Verstärkt cyan fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ERK	Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
G _i -Protein	Inhibitorisches G-Protein
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks ausgeglichene Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hP2Y ₁₂ -ECFP	Fusionsprotein aus dem humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein
hP2Y ₁₂ R	humaner P2Y ₁₂ -Rezeptor
P	Phosphat
P2Y ₁₂ R	P2Y ₁₂ -Rezeptor

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pK _B -Wert	Schätzwert für die Affinitätskonstante
PSB-0739	1-Amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4-[[4-(phenylamino)-3-sulfo-phenyl]amino]-2-anthracensulfonsäure.
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
RT	Raumtemperatur, 21 - 24 °C
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TM	Transmembrandomäne
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Purinerge Rezeptoren

Purinerge Rezeptoren sind Rezeptoren in der Zellmembran, die durch das Nukleosid Adenosin oder seine phosphorylierten Nukleotide aktiviert werden (Burnstock und Kennedy, 1985). Sie spielen eine wichtige Rolle bei vielen verschiedenen Aspekten der menschlichen Physiologie und Pathophysiologie und werden in die G-Protein-gekoppelten, durch Adenosin aktivierten P1-Rezeptoren und die durch Nukleotide aktivierten P2-Rezeptoren unterteilt (Kügelgen, 2021). Bei diesen wird weiter zwischen zwei Rezeptorfamilien unterschieden: P2X-Rezeptoren sind ionengesteuerte Ligandenkanäle und werden durch Adenosintriphosphat (ATP) aktiviert, während es sich bei den P2Y-Rezeptoren um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) für verschiedene Adenosin- und Uracilnukleotide handelt (Müller et al., 2020). Sie gehören zur δ -Subgruppe der Klasse A GPCRs, (Fredriksson et al., 2003; Lagerström und Schiöth, 2008) und bestehen als solche aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen (TMs), die durch je drei intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden werden (Kügelgen, 2019). Von den bisher bekannten acht P2Y-Rezeptor-Subtypen bei Säugetieren ($P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$) (Abbracchio et al., 2006) spielt der $P2Y_{12}$ -Rezeptor ($P2Y_{12}R$) eine besondere Rolle als pharmakologische Zielstruktur der Thrombozytenaggregationshemmung (Andre et al., 2003; Kügelgen, 2017) und soll daher hier näher beleuchtet werden.

1.2 Der humane $P2Y_{12}$ -Rezeptor

1.2.1 Bedeutung für die primäre Hämostase

Die Thrombozytenaggregation ist nicht nur physiologisch als Teil der Hämostase von offensichtlicher Relevanz, sondern nimmt auch pathophysiologisch wegen der Vielzahl an schweren Erkrankungen, die durch Thrombenbildung ausgelöst oder verstärkt werden, eine Sonderstellung ein und soll im Folgenden kurz dargestellt werden. Der Ablauf des hier kurz umrissenen Prozesses ist dabei im Detail komplex und beruht auf einer Vielzahl umfassender Signalketten. Die normale Funktion der beiden Rezeptoren aus der $P2Y$ -Familie, die in der Thrombozytenmembran liegen, $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$ (Hechler et al., 1998; Hollopeter et al., 2001), und ihr Zusammenspiel sind hierbei Voraussetzungen für eine

uneingeschränkte Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte Thrombozytenaggregation und damit für eine normale Blutstillung (Abbraccio et al., 2006).

Im Organismus lagern sich Thrombozyten, sobald es zu einer Verletzung des Gefäßendothels kommt, an dieses an („Adhäsion“) und werden gleichzeitig aktiviert. Dies führt zu einer Formveränderung der Thrombozyten und zur Sekretion verschiedener Mediatoren wie z.B. Fibrinogen, ADP und Thromboxan A₂ (TXA₂), einem Lipid mit starken prothrombotischen Eigenschaften (Schmidt et al., 2017; Speckmann et al., 2019). Das freigesetzte ADP bindet an die genannten Rezeptoren und setzt jeweils mehrere intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen in Gang (s. 1.2.3). Hierbei vervollständigt der P2Y₁₂-Rezeptor die über P2Y₁ initiierte Thrombozytenaggregation, indem er zu einer vermehrten Aktivierung des Glykoproteins (GP) IIb/IIIa auf der Membran der Thrombozyten beiträgt, was Voraussetzung für die Fibrinogen-basierte Quervernetzung der Thrombozyten ist. Zusätzlich wird die Wirkung anderer Agonisten für weitere Rezeptoren in der Zellmembran potenziert, ein positives Feedback generiert und vermehrt aggregationsfördernde Moleküle sezerniert (Cattaneo, 2011). Die Thrombusbildung wird hierbei bedeutend gefördert und stabilisiert, und der entstehende eng vernetzte Pfropf aus Thrombozyten sorgt für einen ersten und schnellen Verschluss der Wunde (Pape et al., 2023; Schmidt et al., 2017; Speckmann et al., 2019).

1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie

Die bekannteste Funktion des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) besteht in seiner Relevanz für die beschriebene Thrombozytenaggregation und ist durch die hohe Expression des Rezeptors in Thrombozyten bedingt (Ohlmann et al., 2013). Während lange davon ausgegangen wurde, dass der Rezeptor ausschließlich auf Thrombozyten und im Nervengewebe verschiedener Hirnregionen vorhanden ist (Hollt et al., 2001), ist mittlerweile bekannt, dass der hP2Y₁₂R von einer Vielzahl menschlicher Zellen exprimiert wird. So konnten neuere Studien seine Existenz auch auf verschiedenen Zellen des Immunsystems nachweisen (Makrophagen und Mikroglia, dendritische Zellen, Eosinophile) sowie auf vaskulären glatten Muskelzellen und Osteoklasten (Ben Addi et al., 2010; Haynes et al., 2006; Kronlage et al., 2010; Muniz et al., 2015; Su et al., 2012; Wihlborg et al., 2004). Die Diversität dieser Zelltypen lässt vermuten, dass der Rezeptor neben der Thrombozytenaggregation an der Signalverarbeitung verschiedenster weiterer (patho-)

physiologischer Vorgänge im menschlichen Körper beteiligt ist, von denen einige bereits näher untersucht worden sind (Li et al., 2023).

So konnte neben einer Mitwirkung an Prozessen bei neuropathischen Schmerzen, der Neuroinflammation, beim Knochenumbau oder der vaskulären Kontraktion (Amadio et al., 2014; Horváth et al., 2014; Syberg et al., 2012; Wihlborg et al., 2004) beispielsweise auch eine unterstützende Rolle des P2Y₁₂-Rezeptors bei proinflammatorischen und immunmodulatorischen Prozessen nachgewiesen werden, ebenso wie eine Mitbeteiligung an der Pathogenese von autoimmunen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, dem Systemischen Lupus Erythematoses und dem Asthma Bronchiale (Horváth et al., 2014; Łukasik et al., 2018; Mansour et al., 2020). Möglichkeiten zum Einsatz von P2Y₁₂-Inhibitoren in der Therapie der Sepsis und von einigen Tumoren werden aktuell erforscht (Hanachi et al., 2020; Gresele et al., 2018).

1.2.3 Signaltransduktion

Physiologisch wird der P2Y₁₂R durch die Bindung seines endogenen Agonisten ADP aktiviert (s. 1.2.1). Eine Konformationsänderung des Rezeptors führt dabei zur Initiierung verschiedener Signalkaskaden über die gekoppelten inhibitorischen G_{i2}-Proteine (Bodor et al., 2003). Dabei wird durch die Aktivierung des Rezeptors der Austausch des an das G_i-Protein gebundene Guanosindiphosphats (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) erleichtert und die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins trennen sich in die GTP-tragende G_α- und eine G_{βγ}-Untereinheit.

Die α_i-Untereinheit des G_i-Proteins hemmt die membranständige Adenylatcyclase (AC), was zu einem verminderten Spiegel des intrazellulären Botenstoffs cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) führt, der frei durch die Zelle diffundieren kann (Berg et al., 2018). Hierdurch wird v.a. die Proteinkinase A (PKA) vermindert aktiviert (Robison et al., 1968), die viele weitere Proteine phosphoryliert und damit Einfluss auf deren Aktivität nimmt. Dazu gehört auch das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), das in phosphorylierter Form die Sekretion und Adhäsion von Thrombozyten hemmt (Ito et al., 2018).

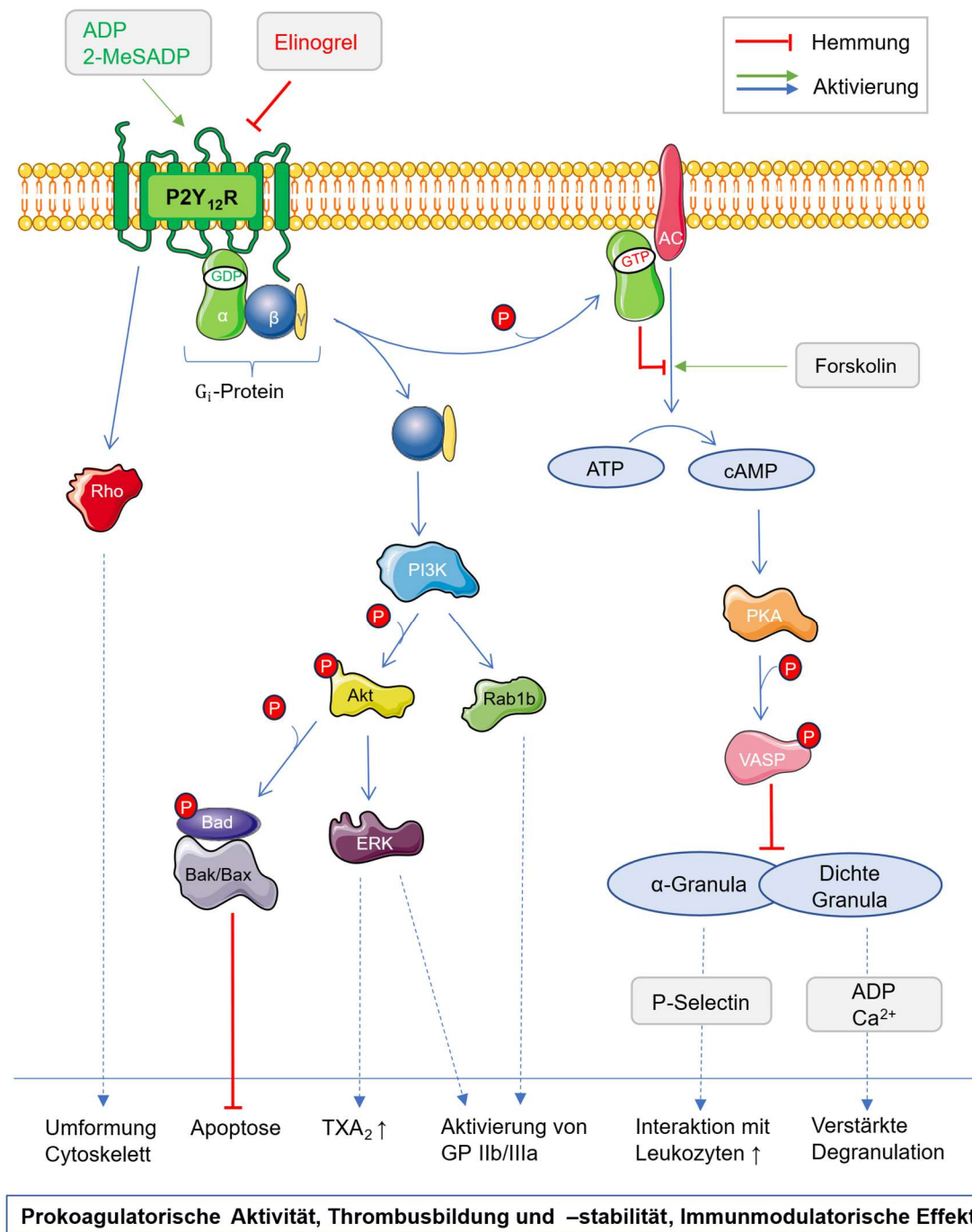


Abb. 1: Schematische Übersicht der Signaltransduktion des P2Y₁₂-Rezeptors. Dargestellt werden zudem ihre Effekte bei der Thrombozyten-Aktivierung. Modifiziert nach Li et al., 2023 und Zhang et al., 2013. 2-MeSADP: 2-Methylthioadenosindiphosphat; AC: Adenylatcyclase; ADP: Adenosindiphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; ERK: Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase; GDP: Guanosindiphosphat; G_i-Protein: Inhibitorisches G-Protein; GP: Glykoprotein; GTP: Guanosintriphosphat; P: Phosphat; P2Y₁₂R: P2Y₁₂-Rezeptor; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKA: Proteinkinase A; TXA₂: Thromboxan A₂; VASP: Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein. Erstellt mit Power Point (Microsoft) und Servier Medical Art (Les Laboratoires Servier, Lizenz unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>, modifiziert).

Die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert dagegen die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und setzt damit weitere Signalkaskaden in Gang. Das im Rahmen der enzymatischen Reaktion entstehende Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) beeinflusst die Aktivität des Guannukleotidaustauschfaktors RASA3 der kleinen GTPase Rap1 (Stefanini und Bergmeier, 2016), welche wiederum eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Integrinen und damit der Zelladhäsion spielt (Gremmel et al., 2016). Auch die PI3K-bedingte Phosphorylierung der Kinase Akt führt zur Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, also des GP IIb/IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenmembran, was eine Schlüsselkomponente für die Expansion und Stabilität der Thrombozytenaggregate darstellt (Li et al., 2023). Zusätzlich wird auch die TXA₂-Produktion begünstigt (Garcia et al., 2010).

Neben den G_i-vermittelten Signalwegen gibt es Hinweise auf davon unabhängige Signalweiterleitungen des P2Y₁₂Rs, beispielsweise über Rho und die Rho-Kinase, die zur Umformung des Thrombozyten-Cytoskeletts führt (Hardy et al., 2005; Soulet et al., 2004). Die beschriebenen Transduktionswege sind in Abb. 1 zur Übersicht schematisch dargestellt.

1.2.4 Pharmakologie

Da der G_i-abhängige Signalweg nicht nur in humanen Thrombozyten aktiviert wird, sondern auch in ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die den rekombinanten hP2Y₁₂-Rezeptor exprimieren (Herbert und Savi, 2003), konnten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Wirkstoffe eingesetzt werden, die an unterschiedlichen Stellen in die beschriebene Signaltransduktion eingreifen. Verwendet wurden hierbei Forskolin als direkter Aktivator der Adenylatcyclase (Hanoune und Defer, 2001, s. Abb. 1) sowie der endogene P2Y₁₂-Agonist ADP (Hollopeter et al., 2001) und der ebenfalls agonistisch wirkende potente P2Y₁₂-Aktivator 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) mit einer halbmaximalen Konzentration im nanomolaren Bereich (Kügelgen, 2006). ATP, seine Analoga und Diadeninnukleotide können als partielle Agonisten oder Antagonisten wirken (Chang et al., 2012; Kauffenstein et al., 2004; Kügelgen, 2019).

Antagonisten des P2Y₁₂Rs stehen im Fokus der Forschung zur Entwicklung neuer Thrombozytenaggregationshemmer, um die Therapie weiter zu verbessern und Nebenwirkungen zu reduzieren. Klinisch eingesetzt werden aktuell Clopidogrel, Prasugrel, Cangrelor und Ticagrelor (Collet et al., 2021). Es wurde zudem eine Vielzahl an weiteren anta-

gonistischen Wirkstoffen entwickelt; hierzu gehören z.B. der kompetitive P2Y₁₂R-Antagonist AR-C67085 (Ingall et al., 1999; Kügelgen, 2019), der inverse Agonist Selatogrel (Beavers et al., 2022; Pons et al., 2022), das radiomarkierte [³H]PSB-0413 (El-Tayeb et al., 2005), Suramin, reaktives Blue-2 (Kügelgen, 2006; Kügelgen und Wetter, 2000) und viele weitere neue Stoffklassen (Kügelgen, 2024). Zu den Kandidaten klinisch eingesetzter Substanzen gehören außerdem das mittlerweile durch Clopidogrel ersetzte Ticlopidin (Panak et al., 1983) sowie das klinisch getestete und im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchte Elinogrel (Michelson, 2009).

1.3 Elinogrel

Elinogrel (PRT-060128) ist ein direkt wirkender, reversibler und kompetitiver Antagonist des P2Y₁₂-Rezeptors (Serebruany et al., 2014; Ueno et al., 2010). Der Wirkstoff mit der chemischen Struktur eines Quinazolin-2,4-dions (s. Abb. 2) wurde in den 2000ern von zwei großen Pharmafirmen (Portola Pharmaceuticals Inc. und Novartis AG) entwickelt für einen möglichen klinischen Einsatz in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms und zur Prävention von sekundären thrombotischen Ereignissen. Als erster Wirkstoff war Elinogrel dabei sowohl oral als auch intravenös verfügbar und somit gut geeignet für den glatten Übergang zwischen der Akut- und Langzeitbehandlung (Oestreich, 2010).

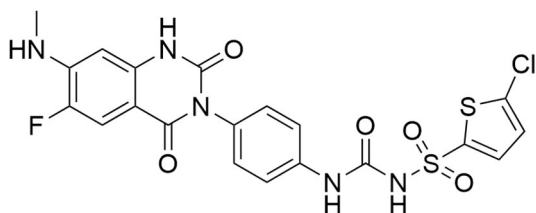


Abb. 2: Strukturformel von Elinogrel. Erstellt mit ChemDraw® (PerkinElmer).

In klinischen Phase-I-Studien zeigte der Wirkstoff eine schnelle und potente Inhibition der ADP-vermittelten Thrombozytenreaktion mit schnellem An- und Abfluten der Wirkung. Effekte konnten auch in Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen werden, die nicht auf die damalige Goldstandard-Medikation Clopidogrel ansprachen und waren nebenwirkungsarm (Oestreich, 2010). Die Entwicklung von Elinogrel wurde 2012 eingestellt, nachdem in klinischen Phase-II-Studien vermehrt unerwünschte Blutungsereignisse und erhöhte Dyspnoeraten beobachtet wurden (Serebruany et al., 2014; Welsh et al., 2012). Als P2Y₁₂-Inhibitor mit einzigartigem Wirkprofil bleibt Elinogrel aber weiterhin interessant.

1.4 Fragestellung

Zu den weltweit häufigsten Todesursachen gehören seit Jahrzehnten insbesondere die ischämischen Herzerkrankungen (Nowbar et al., 2019). Da bei ihrer Prävention und Therapie vielfach P2Y₁₂R-Antagonisten zum Einsatz kommen, ist ein detailliertes Verständnis der Funktionsweise des Rezeptors essentiell für die Entwicklung weiterer Wirkstoffe.

Diese Arbeit untersucht die molekularpharmakologische Wirkung des Thrombozytenaggregationshemmers Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor. Elinogrel galt lange als vielversprechender Wirkstoffkandidat mit einer starken, direkten und reversiblen Wirkung am hP2Y₁₂R (s. 1.3). In seinen chemischen Eigenschaften unterscheidet es sich deutlich von anderen P2Y₁₂-Inhibitoren; ein tieferes Verständnis seiner molekularen Wirkungsweisen ist also sehr interessant, um Rückschlüsse auf die Bindungsmechanismen und Eigenschaften des Rezeptors ziehen zu können.

Für die Analyse sollen CHO-Zellen verwendet werden, die ein Fusionsprotein aus dem hP2Y₁₂R und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) oder eine P2Y₁₂R Wildtyp (WT)-Variante exprimieren. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays von PerkinElmer soll die Änderung der intrazellulären cAMP-Konzentration als Maß der Aktivität des Rezeptors unter verschiedenen extrazellulären Einflüssen bestimmt werden, um so Konzentrations-Wirkungs-Kurven für verschiedene Agonisten ohne und mit Elinogrel erstellen und das pharmakologische Verhalten des Antagonisten beurteilen zu können. Anhand dieser sollen zudem die jeweiligen EC₅₀-Werte (halbmaximal wirksame Konzentrationen) sowie ein pK_B-Wert als Schätzwert für die Affinitätskonstante von Elinogrel berechnet werden, um letztlich eine Schildplot-Analyse durchführen zu können (s. 2.2.3.2.5) und den pA₂-Wert als Maß für die antagonistische Potenz von Elinogrel berechnen zu können. Anhand analoger Experimente an K280A-mutierten P2Y₁₂R-exprimierenden Zellen soll außerdem eine mögliche Beteiligung dieses Aminosäurerests bei der Bindung von Elinogrel näher beurteilt werden.

Durch die beschriebenen Experimente sollen also letztlich Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus von Elinogrel gezogen werden und seine Affinität zum Rezeptor näher bestimmt werden. So soll dazu beigetragen werden, den P2Y₁₂-Rezeptor und seine molekularpharmakologischen Eigenschaften besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Testsubstanzen und Antikörper

Folgende Testsubstanzen wurden verwendet:

- 2-MeSADP als Trinatriumsalz (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- ADP als Natriumsalz (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- Elinogrel (Tocris, Abingdon)
- Forskolin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Zudem wurde das AlphaScreen®-cAMP-Assay Kit von PerkinElmer verwendet. Es beinhaltet folgende Bestandteile:

- a) cAMP-Standard (50 µM)
- b) Biotin-cAMP-Tracer (Feststoff); hiermit wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eine Ausgangslösung (1 µM) erstellt.
- c) Anti-cAMP-AlphaScreen®-Akzeptor-Beads mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS und 0,05 % Proclin-300 (pH 7,2). Auf der Oberfläche befinden sich monoklonale Hasen-Antikörper (hochspezifisch für cAMP; Kreuzreaktion mit cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) < 0,005 %).
- d) Streptavidin-Donor-Beads mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS und 0,05 % Proclin-300 (pH 7,2)

Der verwendete Antikörper MA1-80281 (Ausgangskonzentration 0,1 mg/ml) ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (IgG2a), der mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) konjugiert und gegen das V5-Epitop gerichtet ist (Hersteller: Thermo Fisher Scientific, Waltham).

2.1.2 Biologisches Material

Für die Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet:

- a) CHO-ECFP-Zellen: Es handelte sich um eine eukaryotische Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters. Die Zellen exprimierten stabil ein Rezeptorfusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor und ECFP (verstärkt cyan

fluoreszierendes Protein). Verwendet wurde der sechste Klon ab Passage 18 (eingefroren im Dezember 2014) aus der AG Kügelgen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Bonn. Die Original-Quelle der nicht-transfizierten Zellen ist Life Technologies (Karlsruhe).

- b) CHO-WT-Zellen: Es handelte sich um eine eukaryotische Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters. Die Zellen exprimierten stabil den hP2Y₁₂-Rezeptor ohne Modifikation (Wildtyp). Verwendet wurden die Zellen ab Passage 7 (eingefroren im Mai 2014) aus der AG Kügelgen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Bonn.
- c) CHO-ECFP-K280A-Zellen: Es handelte sich um eine eukaryotische Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters. Die Zellen exprimierten stabil ein Rezeptorfusionsprotein aus einem modifizierten hP2Y₁₂-Rezeptor und ECFP. Lysin an Position 280 war dabei durch Alanin ersetzt worden (K280A-Mutation). Verwendet wurden Zellen ab Passage 7 (eingefroren im Mai 2014) aus der AG Kügelgen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie Bonn.

2.1.3 Weitere Materialien

Geräte, Verbrauchsmaterialien, Medien und Puffer, Chemikalien und verwendete Software sind in Anhang 1 aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Bei dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop handelt es sich um ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 700 mit Basisstativ Axio Observer.Z1; Zeiss, Oberkochen) unter Einsatz des 40x/1,2 DIC M27 Plan-Apochromat-Objektives und einer Laser-Scanning-Einheit (Zeiss, Oberkochen) und einer Inkubationseinheit (Incubator XLmulti S1; Pecon, Erbach).

2.2.1.1 Vorbereitungen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen 24 – 48 h vor Beginn des Versuches auf runde Glasplättchen gesplittet (Durchmesser 25 mm, autoklaviert). Dafür wurde zunächst mit dem Standardprotokoll für das Splitten der Zellen begonnen (s.

Anhang 2.1.2), nach mechanischer Ablösung der Zellen die Suspension aber nicht in eine Zellkulturflasche pipettiert, sondern je 50 µl auf die in 6-Well-Platten liegenden Glasplättchen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 – 10 min wurden die Zellen vorsichtig mit je 1,5 ml Kulturmedium II überschichtet (s. Anhang 2.1.1) und anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die Zellen wurden vor Beginn eines Versuches mikroskopisch kontrolliert, das Plättchen in einen Spannring eingesetzt und die Oberfläche anschließend dreimal vorsichtig mit je 1 ml Hanks ausgeglichene Salzlösung (HBSS) gewaschen. Nach Reinigung der Plättchenunterseite mit Ethanol (EtOH, 100 %) konnte der Ring schließlich im Mikroskop platziert und die Analyse begonnen werden. Zu Beginn der Messungen wiesen die Zellen auf den Plättchen eine Konfluenz zwischen 50 % und 80 % auf.

2.2.1.2 Markierung mit Antikörper

Abweichend zum Vorgehen bei den mit ECFP markierten Zellen, wurde für die fluoreszenzmikroskopische Analyse der CHO-WT-Zellen (s. 2.1.2) die Intensität vor und nach Markierung mit einem an den fluoreszierenden Farbstoff FITC gekoppelten Antikörper gemessen. Der verwendete Antikörper MA1-80281 (s. 2.1.1) erkennt die Sequenz IPN-PLLGL, die in den P/V-Proteinen des Paramyxovirus SV5 vorhanden ist. In den WT-Zellen wird das Epitop über die Vektorsequenz kodiert, was die Anfärbung ermöglicht.

Zunächst wurden die Zellen 24 – 48 h vor Beginn der Markierung – analog zum Vorgehen bei den ECFP-markierten Zellen – auf Glasplättchen gesplittet (s. 2.2.1.1). Für die Antikörper-Markierung wurde dann das Medium aus den Wells entfernt, diese erst zweimal mit je 2 ml HBSS gewaschen und dann 5 min lang mit 1 ml Methanol (100 %) inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Methanol wieder entfernt, die Wells nochmal mit 2 ml HBSS gewaschen und anschließend 1 ml einer Blocken-Lösung hinzugefügt. Diese enthielt eine Mischung aus HBSS, 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) und 2 ‰ Triton x-100. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Lösung entfernt und durch 225 µl einer den Antikörper enthaltenden Lösung (erstellt durch Verdünnung der Ausgangslösung in Blocken-Lösung im Verhältnis 1 : 500) ersetzt. Diese wurde zentral auf die auf dem Plättchen haftenden Zellen getropft und die Platte dann für eine Stunde im Dunkeln auf feuchten Tüchern gelagert. Im Anschluss wurde die Antikörper-Lösung entfernt, die Plättchen zweimal

mit je 2 ml HBSS gespült, in den Spannring eingesetzt und ein letztes Mal mit 1 ml HBSS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml HBSS konnten die Zellen nach Reinigung der Plättchenunterseite mit EtOH dann unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.2.1.3 Expressionsanalyse

Die Analyse von CHO-Zellen, die verschiedene Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors exprimierten, erfolgte mithilfe des 40x Ölimmersions-Objektivs des Fluoreszenzmikroskops. Für die Messung wurde zunächst unter lichtmikroskopischer Kontrolle in eine zum Glasplättchen parallele Ebene mittig durch die Zellen fokussiert und nach Anregung mit einem Festkörperlaser (5 mW), der bei 2 % seiner Maximalleistung arbeitete, die Fluoreszenzintensität gemessen und bildlich dargestellt.

ECFP-markierte Zellen: Die Auflösung betrug 1748 x 1748 Pixel bei einer durchschnittlichen Pixelgröße von 0,09 µm. Nach Anregung mit der 445 nm Linie des Lasers erfolgte die Detektion der Fluoreszenz bei Wellenlängen ab 454 nm.

Antikörper-markierte WT-Zellen: Die Auflösung betrug 1596 x 1596 Pixel bei einer durchschnittlichen Pixelgröße von 0,10 µm. Nach Anregung mit der 488 nm Linie des Lasers erfolgte die Detektion der Fluoreszenz bei Wellenlängen ab 493 nm.

Für die Expressionsanalyse wurde dann die mittlere Fluoreszenzintensität in quadratischen Regionen der entstandenen Bilder gemessen. Dafür wurden in der Membran jeder analysierten Zelle mindestens 4 Messquadrate definiert (je 0,5 µm x 0,5 µm). Gewählt wurden möglichst weit voneinander entfernte Bereiche, in denen die Zelle außerdem keine Nachbarzelle berührte, um Überlappungen zu vermeiden. Ein weiteres Quadrat wurde im Cytosol der Zellen definiert (5 µm x 5 µm), möglichst so, dass keine Anteile des Zellkerns enthalten waren, in dem oft ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität zu erkennen war. Die Hintergrundfluoreszenz wurde in einem Quadrat außerhalb der Zellen bestimmt (10 µm x 10 µm). Das Auslesen der Bilder erfolgte durch das Programm MARS Data Analysis Software (BMG Labtech); der Versuchsaufbau ist in Abb. 3 dargestellt. Analysiert wurden pro Zellreihe mindestens sechs einzelne Zellen.

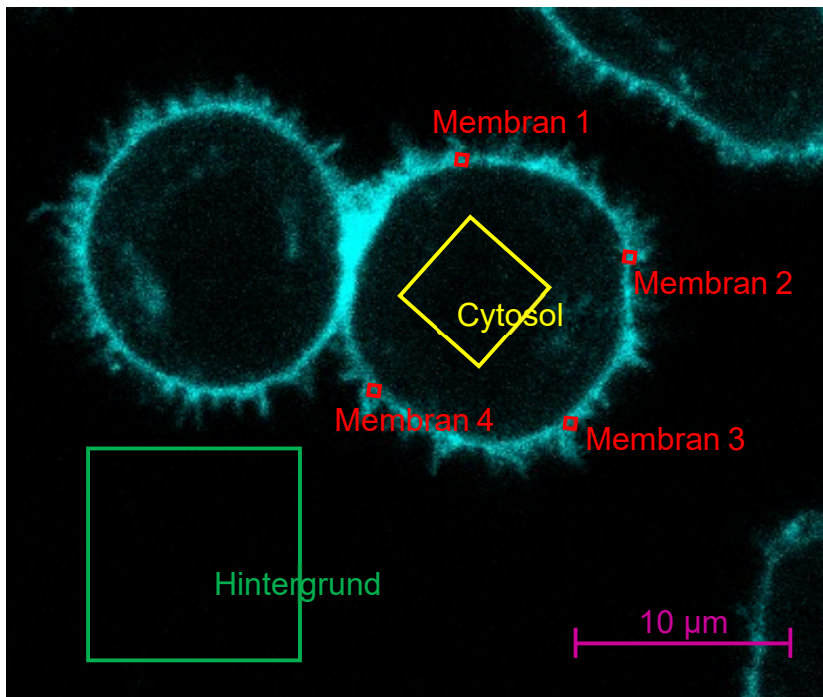


Abb. 3: Versuchsaufbau der Expressionsanalyse. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität in quadratischen Regionen im mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bild (Anregung mit dem Laser bei Wellenlänge 445 nm, Detektion bei Wellenlängen ab 454 nm). Dabei wurden Fluoreszenzwerte für folgende Bildbereiche ermittelt: Hintergrund (grünes Quadrat, 10 µm x 10 µm) außerhalb der Zellen, Cytosol (gelbes Quadrat, 5 µm x 5 µm) im Zellinnern möglichst ohne Anteile des Zellkerns und außerdem 4 getrennte Regionen in verschiedenen Bereichen der Zellmembran (rote Quadrate, je 0,5 µm x 0,5 µm). Die dargestellte Fluoreszenzfarbe dient der Veranschaulichung und entspricht nicht dem reellen Bild.

2.2.2 AlphaScreen®-Assay

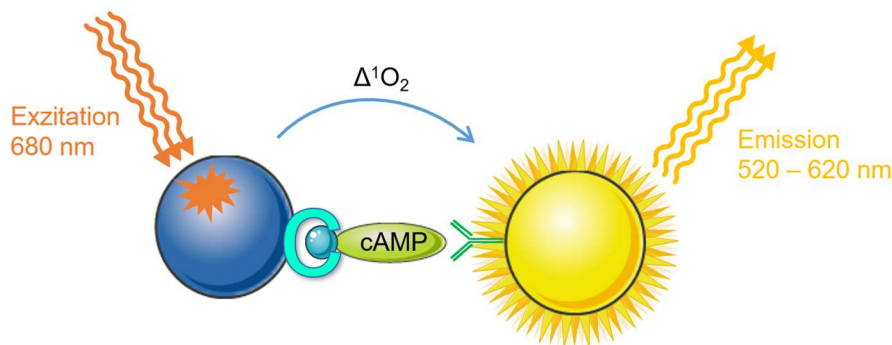
Die Durchführung des cAMP-Assays erfolgte mit den Bestandteilen des AlphaScreen®-cAMP-Assay Kits (PerkinElmer, s. 2.1.1) und nach einem Standardprotokoll, das auf dem Handbuch zum Kit basiert und weiterentwickelt wurde (AG von Kügelgen, Bonn). Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden aufgeführt.

2.2.2.1 Prinzip der Methode

Mithilfe des cAMP-Assays können Veränderungen der cAMP-Konzentration durch Agonisten oder Antagonisten in G-Protein exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Das Prinzip wird in Abb. 4 dargestellt. An Biotin gekoppelte cAMP-Tracer werden durch Streptavidin-Donor-Beads gebunden. In Abwesenheit von freiem cAMP können die Tracer

durch Anti-cAMP-Antikörper gebunden werden, die an Akzeptor-Beads gekoppelt sind, wodurch die Donor- und Akzeptor-Beads in unmittelbare Nähe zueinander gelangen. Unter Belichtung mit 680 nm wandeln die Donor-Beads umgebenden Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff um, dessen Moleküle in Lösung ca. 200 nm weit diffundieren können. Befinden sich Akzeptor-Beads innerhalb dieser Reichweite, so wird Energie übertragen, die von den Akzeptor-Beads als Lichtsignal (520 – 620 nm) freigesetzt wird und detektiert werden kann. Das maximale Signal entsteht in Abwesenheit von freiem cAMP, da dieses mit dem Biotin-cAMP um die Bindungsstellen an den Akzeptor-Beads konkurriert. Eine Stimulation der Zellen und nachfolgende Produktion von freiem cAMP führt daher zu einer Erniedrigung des Alpha-Screen-Signals proportional zur Menge des produzierten cAMPs (Perkin-Elmer AlphaScreen® cAMP User Manual).

a) In Abwesenheit von freiem cAMP



b) In Anwesenheit von freiem cAMP

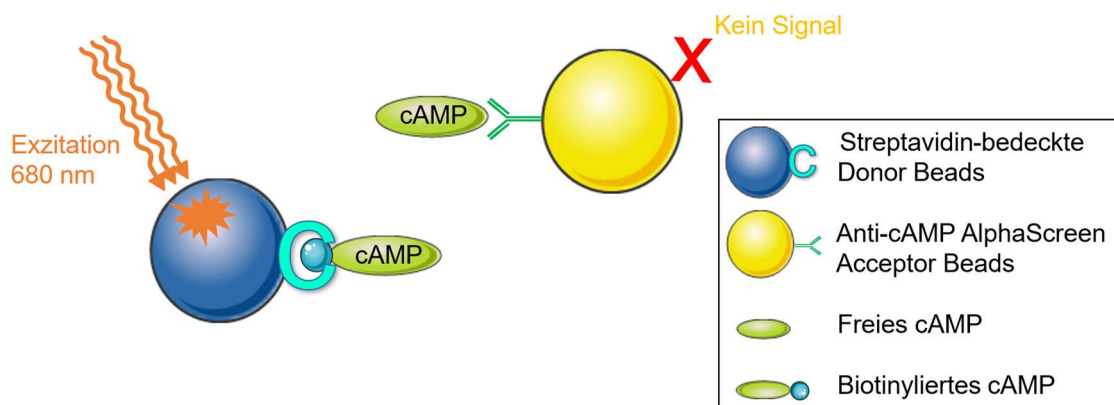


Abb. 4: Prinzip des AlphaScreen®-cAMP-Assays. cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat. Modifiziert nach dem PerkinElmer AlphaScreen® cAMP User Manual. Erstellt mit Power Point (Microsoft) und Servier Medical Art (Les Laboratoires Servier, modifiziert, Lizenz unter <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2.2.2.2 Vorbereitung der Zellen

Um Zellen für ein Experiment vorzubereiten, wurden sie ca. 24 h vor Beginn des Versuches auf eine 24-Well-Platte gesplittet. Hierfür entsprach das Vorgehen zunächst dem Protokoll für das Splitten der Zellen im Rahmen der normalen Kultivierung (s. Anhang 2.1.2) bis zum Schritt der Trypsin-Zugabe. Um einen Zellverlust zu vermeiden, wurde das Trypsin nach einer Inkubation von 2 – 3 min im Brutschrank dann aber nicht abgenommen, sondern der Flaschenboden sofort sehr gründlich und wiederholt mit 12 ml Medium abgespült. Aus der entstandenen Zellsuspension wurden anschließend je 500 µl in jede Vertiefung der 24-Well-Platte pipettiert, durch Schwenken gleichmäßig verteilt, und die Platte bis zum Beginn des Experiments bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert. Verwendet wurden je nach Experiment CHO-ECFP-Zellen, CHO-WT-Zellen oder CHO-ECFP-K280A-Zellen, die jeweils verschiedene Varianten des hP2Y₁₂Rs exprimierten (s. 2.1.2).

2.2.2.3 Vorbereitung der Lösungen

Herstellung des Lysepuffers:

Um den Lysepuffer (LB) zu erstellen, wurden zunächst Ausgangslösungen der in Tab. 1 angegebenen Substanzen in Reinstwasser hergestellt und vermischt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt (7,39 – 7,41, durch Zugabe von Natriumhydroxid-Lösung bzw. Essigsäure unter Kontrolle eines pH-Meters) und die Lösung anschließend auf Eis gelagert. Der Puffer wurde vor jedem Experiment frisch hergestellt.

Tab. 1: Inhaltsstoffe des Lysepuffers. BSA: Kälberserum-Albumin; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure.

Komponente	Menge	Finale Konzentration
Reinstwasser	19,3 ml	
BSA	20 mg	1 g/l $\triangleq$ $1,5 \cdot 10^{-5}$ M
Tween 20	600 µl einer 10 % Lösung	3 µl/ml $\triangleq$ $1,8 \cdot 10^{-9}$ M
HEPES	100 µl einer 1 M Lösung	5 mM

Vorbereitung der Komponenten des cAMP-Assays:

Vor Beginn des eigentlichen Versuchs wurden Lösungen aus den im Kit bereitgestellten Reagenzien (s. 2.1.1) durch Verdünnung mit LB in der gewünschten Menge hergestellt:

- a) Akzeptor-Beads-Lösung: je 1 μ l Anti-cAMP-Akzeptor-Beads-Ausgangslösung + 49 μ l LB
- b) Donor-Beads-Lösung: je 50 μ l Streptavidin-Donor-Beads-Ausgangslösung + 8 μ l Biotin-cAMP (1 μ M) + 1142 μ l LB
- c) Standard-cAMP-Verdünnungsreihe: Durch sukzessive Verdünnung und Vermischung der Standard-cAMP-Ausgangslösung mit dem LB wurde eine Verdünnungsreihe erstellt mit folgenden Konzentrationen [nM]: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39.

Die Arbeitsschritte mit den Donor-Beads erfolgten dabei bei gedämmtem Licht, um eine vorzeitige Aktivierung zu verhindern. Alle Lösungen wurden nach Herstellung und bis zu ihrer Verwendung auf Eis und im Dunkeln gelagert.

2.2.2.4 Vorbereitung der 24-Well-Platte

Die am Vortag in Schritt 2.2.2.2 vorbereitete 24-Well-Platte mit den Zellen wurde nun gewaschen. Dafür wurde zunächst das die (jetzt adhären) Zellen bedeckende Medium abgenommen und jedes Well zweimal vorsichtig mit je 1 ml HBSS gespült, um möglichst alle Reste von Medium und Stoffwechselprodukten zu entfernen. Im Anschluss wurde jedes Well – nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen am Boden – mit je 800 μ l HBSS bedeckt und die Platte für 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.5 Vorbereitung der Testsubstanzen und von Forskolin

Testsubstanzen:

Aus den jeweiligen Agonisten als Feststoff wurde eine Ausgangslösung in destilliertem Wasser hergestellt (2-MeSADP: 10^{-5} M, ADP: 10^{-2} M) und diese mit HBSS zu den gewünschten Testlösungs-Konzentrationen verdünnt. Die gewünschte Testkonzentration von Elinogrel wurde durch Erstellen einer Ausgangslösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) und weiterer Verdünnung mit diesem Lösungsmittel erreicht. Alle Ausgangslösungen der Testsubstanzen wurden zwischen Experimenten im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

Forskolin:

Aus einer vorbereiteten Ausgangslösung (Forskolin in DMSO : EtOH [1 : 7], Lagerung bei RT) wurde eine Verdünnung mit HBSS erstellt. Da Forskolin darin nur schwer löslich ist, erfolgte die Zugabe schrittweise unter heftigem Schütteln. Die Lösung wurde einige Minuten vor der Gabe zu den Zellen hergestellt und analog zu der 24-Well-Platte im Wasserbad bei 37 °C warmgehalten.

2.2.2.5 Zugabe der Testsubstanzen

Die Gabe der Testsubstanzen zu den Zellen in der 24-Well-Platte mittels Pipette erfolgte unter kontinuierlicher Erwärmung der Platte im Wasserbad bei 37 °C. In den Wells für die Kontrollen wurde anstelle der Testsubstanz eine äquivalente Menge des jeweiligen Lösungsmittels verwendet, das jeweils analog zur Testsubstanz vorbereitet wurde. Zugabe und Inkubation erfolgten in der dargestellten Reihenfolge (Mengenangaben pro Well):

- 1 µl Antagonisten-Lösung bzw. 1 µl DMSO
- Inkubationszeit 10 min
- 100 µl Agonisten-Lösung bzw. 100 µl HBSS, im Anschluss direkt 100 µl Forskolin-Lösung bzw. 100 µl HBSS-DMSO-EtOH-Lösung
- Inkubationszeit 10 min

Welche Substanz jeweils verwendet wurde, ist in Tab. 2 dargestellt; eine Übersicht aller verwendeten Zielkonzentrationen der Testsubstanzen zeigt Tab. 4 (Anhang).

Die Reaktionen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit beendet, indem die Flüssigkeiten aus der Platte entfernt wurden. Jedes Well wurde mit 200 µl des LB befüllt und die Platte bei ständiger Bewegung 40 min lang inkubiert für ein vollständiges Lysieren der Zellen. Die Lagerung erfolgte dabei auf Eis, um weitere Reaktionen in den Zellen zu verhindern.

2.2.2.6 Befüllen der 96-Well-Platte

Das Befüllen der 96-Well-Platte erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT, $\pm$ 21 – 24 °C) im abgedunkelten Raum. Zunächst wurden in jedes Well 20 µl der vorbereiteten Akzeptor-Bead-Lösung (s. 2.2.2.3) vorgelegt. In diese wurden dann 20 µl einer der folgenden Lösungen gegeben:

- a) Zelllysat-Lösung aus einem Well der 24-Well-Platte
- b) Vorbereitetes Standard-cAMP in jeweiliger Verdünnung (Triplets, s. 2.2.2.3)
- c) Lysepuffer (10 – 15 Wells)

Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 60 µl der Streptavidin-Donor-Bead-Biotin-cAMP-Lösung (s. 2.2.2.3) hinzugegeben und die Platte erneut für 60 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert.

Tab. 2: Übersicht der zur 24-Well-Platte zugegebenen Substanzen. HBSS: Hanks ausgeglichene Salzlösung; DMSO: Dimethylsulfoxid; EtOH: Ethanol.

Bezeichnung	HBSS	DMSO		HBSS		HBSS-DMSO-EtOH	
		ø Elinogrel	+ Elinogrel	ø Agonist	+ Agonist	ø Forskolin	+ Forskolin
Versuche ohne Antagonisten							
Kontrolle	800 µl	1 µl		100 µl		100 µl	
Forskolin	800 µl	1 µl		100 µl			100 µl
Agonist	800 µl	1 µl			100 µl		100 µl
Versuche mit Antagonisten							
Kontrolle	800 µl		1 µl	100 µl		100 µl	
Forskolin	800 µl		1 µl	100 µl			100 µl
Agonist	800 µl		1 µl		100 µl		100 µl

2.2.2.7 Messung

Die Ausmessung und Quantifizierung der emittierten elektromagnetischen Strahlung nach Anregung mit Strahlung der Wellenlänge 680 nm erfolgte im Anschluss im Mikroplatten-Photometer POLARstar Omega (BMG Labtech) als AlphaScreen-Werte.

2.2.3 Auswertung

2.2.3.1 Expressionsanalyse

Von den gemessenen Rohwerten der mittleren Fluoreszenzintensität F_{roh} in den quadratischen Regionen (s. Abb. 3) in Membran (M1 – M4) und Cytosol (C) einer Zelle wurde zuerst die Hintergrund-Fluoreszenz F_B des entsprechenden Bildes abgezogen und anschließend die entstehenden Werte der Quadrate in der Membran gemittelt.

Cytosol (Zelle x): $F_{C, x} = (F_{\text{roh}(C)} - F_B)$

Membran (Zelle x): $F_{M, x} = \frac{(F_{\text{roh}(M1)} - F_B) + (F_{\text{roh}(M2)} - F_B) + (F_{\text{roh}(M3)} - F_B) + (F_{\text{roh}(M4)} - F_B)}{4}$

Aus so erhaltenen Intensitätswerte jeder einzelnen analysierten Zelle wurde dann jeweils die Mittelwerte $\overline{F_C}$ und $\overline{F_M}$ für alle Zellen einer Zellreihe gebildet. Zusätzlich wurde für jede Zelle der Faktor berechnet, um den die Intensität in der Membran höher war als im Cytosol ($\frac{F_M}{F_C}$) und diese Werte wiederum gemittelt.

2.2.3.2 cAMP-Assay

Als Rohdaten lagen die vom Mikroplatten-Photometer gemessenen Werte als Alpha-Screen-Signal $A_{\text{roh}, x}$ (in cps) der jeweiligen Lösungen aus der 96-Well-Platte vor.

2.2.3.2.1 Erstellung der cAMP-Standardgeraden:

Um das Hintergrund-Signal zu ermitteln, wurde zunächst der Mittelwert $\overline{A_{LB}}$ aller gemessenen Werte des Lysepuffers (LB) gebildet ($n \geq 10$). Die Messwerte für jede cAMP-Konzentration wurden standardisiert, indem der Hintergrundwert $\overline{A_{LB}}$ durch den Rohwert der jeweiligen cAMP-Konzentration $A_{\text{roh}, cAMP}$ geteilt wurde: $A_{cAMP} = \frac{\overline{A_{LB}}}{A_{\text{roh}, cAMP}}$.

Die berechneten Werte A_{cAMP} (y-Achse) wurden gegen die jeweilige Standard-cAMP-Konzentration (x-Achse) aufgetragen; die verwendeten Konzentrationen waren dabei 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 und 0,39 nM mit jeweils $n \geq 2$ (Ausnahme: für $c = 50$ nM und $c = 100$ nM teilweise $n = 1$).

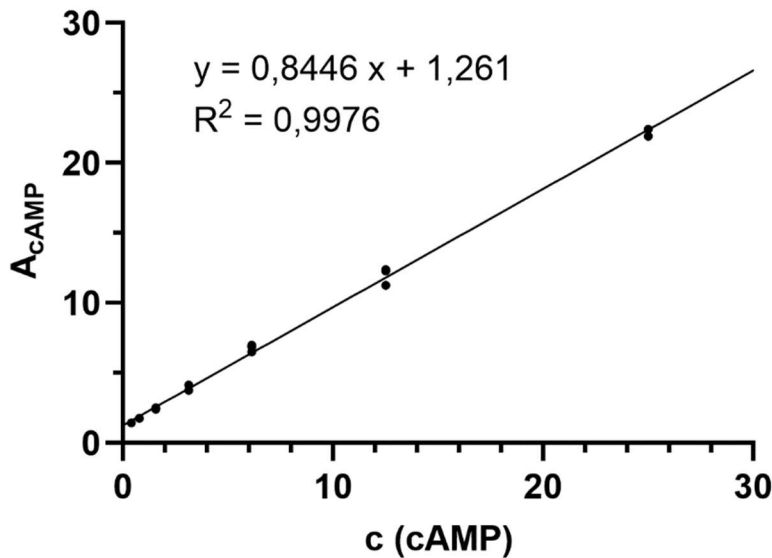


Abb. 5: Beispiel einer erstellten cAMP-Standardgeraden. Aufgetragen wurde die cAMP-Konzentration c (cAMP) gegen standardisierte Messwerte A_{cAMP} und mittels einfacher linearer Regression eine Ausgleichsgerade errechnet (im Beispiel $n = 18$). Angegeben werden außerdem die Geradengleichung sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 .

Mittels einfacher linearer Regression wurde dann eine Ausgleichsgerade erstellt (s. Abb. 5), deren Geradengleichung ($y = mx + b$) also die Berechnung der in einer Probe enthaltenen cAMP-Konzentration aus einem standardisierten Wert $A_x = \frac{\overline{A_{LB}}}{A_{roh, x}}$ ermöglicht. Da die Kurve global gesehen einen sigmoidalen Verlauf haben sollte (s. PerkinElmer Alpha-Screen® cAMP User Manual) und also nur in jeweils kleinen Bereich annähernd linear verläuft, wurden die Werte für die höheren cAMP-Konzentrationen entfernt, wenn die berechneten Punkte zu weit von der Geraden abwichen. Zur Entscheidung wurde hierfür das zusätzlich zur Geradengleichung angegebene Bestimmtheitsmaß R^2 herangezogen, das beschreibt, wie gut die Punkte durch die Gerade abgebildet werden ($0 \leq R^2 \leq 1$, bessere Übereinstimmung zwischen Punkten und Gerade bei größerem R^2). Entfernt wurden die Punkte für $c = 100$ nM, $c = 50$ nM und $c = 25$ nM in dieser Reihenfolge, bis sich der höchste R^2 -Wert ergab, da die ermittelten cAMP-Konzentrationen fast immer in Bereichen deutlich unterhalb von 25 nM lagen und somit die niedrigeren Standardwerte eine höhere Relevanz für eine akkurate Rückrechnung auf die cAMP-Konzentration hatten. In der Regel wurde die Gerade letztendlich aus je drei Werten für die verwendeten Konzentrationen

von 0,39 nM bis 25 nM gebildet (R^2 meist $> 0,95$). Experimente wurden verworfen bei einem $R^2 \leq 0,9$, um eine Verfälschung der Werte durch eine zu ungenaue Standardgerade zu vermeiden.

2.2.3.2.2 Berechnung der cAMP-Werte

Als nächstes erfolgte die Standardisierung der AlphaScreen-Werte der auf der 6-Well-Platte getesteten Lösungen nach der gleichen Methode wie vorher für die Standard-cAMP-Werte: $A_{\text{Test}} = \frac{\overline{A_{\text{LB}}}}{A_{\text{roh, Test}}}$. Mithilfe der Standardgeraden und ihrer Gleichung ($y = mx + b$) konnten dann die zugehörigen, in den Wells vorhandenen cAMP-Konzentrationen berechnet werden: $c_{\text{cAMP}} = x = \frac{y - b}{m} = \frac{A_{\text{Test}} - b}{m}$. Sich hierbei ergebende Werte ≤ 0 wurden auf 0 gesetzt (cAMP-Konzentration muss ≥ 0 sein). Hieraus ergaben sich die cAMP-Konzentrationen für die Testbedingungen Kontrolle (K), Forskolin (F) und Agonist in Konzentration x (Agonist_x, pro Experiment 3 – 6 verschiedene Konzentrationen) mit jeweils $2 \leq n \leq 6$. Die konkrete Zusammensetzung der jeweiligen Testlösung ist in Tab. 2 aufgeführt.

2.2.3.2.3 Berechnung der Forskolin-induzierten Erhöhung der cAMP-Konzentration:

Anschließend wurde der Mittelwert $\bar{K}$ der cAMP-Konzentrationen der Kontrollen sowie der Mittelwert $\bar{F}$ der Forskolin-enthaltenden Wells berechnet und ihre Differenz $\bar{F} - \bar{K}$, die also die Netto-Erhöhung der cAMP-Konzentration durch Forskolin angibt.

Für jeden Wert F (= Agonist₀) und jeden Wert Agonist_x wurde berechnet, welcher Anteil der durch Forskolin induzierten Erhöhung der cAMP-Konzentration unter der jeweiligen Testbedingung erreicht wurde:

$$\text{Forskolin-induzierter Anstieg der cAMP-Konzentration [\%]} = \frac{\text{Agonist}_x - \bar{K}}{\bar{F} - \bar{K}} * 100$$

2.2.3.2.4 Erstellung der Konzentration-Wirkungs-Kurven

Um die so erhaltenen Daten weiter zu analysieren, wurden die Werte aus den einzelnen Experimenten mit den gleichen Versuchsbedingungen zusammengeführt. Pro Versuchsgruppe (jeweils gleiche Agonisten, Konzentration von Elinogrel und Zelltypen) wurden mindestens 3 unabhängige Experimente einbezogen.

Sämtliche Werte eines Experimentes wurden verworfen, wenn

- a) R^2 der Standardgeraden $\leq 0,9$ war (s. 2.2.3.2.1).

Die Standardgerade war ungenau und somit die Berechnung der cAMP-Werte nicht zuverlässig.

- b) Ein Wert ($\neq$ Kontrolle) für den Forskolin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration ≥ 140 % lag.

In der Regel war das der Fall bei sehr niedrigen cAMP-Werten in den „Forskolin“-Wells ohne Agonisten. Es war ein Hinweis darauf, dass die Zellen nicht auf das Forskolin reagiert hatten und somit eine Berechnung der Forskolin-induzierten Veränderung der cAMP-Konzentration durch einen Agonisten nicht sinnvoll war.

- c) Die Abweichung der Mittelwerte für den Forskolin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration von hoher und niedriger Agonistenkonzentration (Unterschied von mindestens zwei Logarithmusstufen) ≤ 15 % war.

Dies war ein Hinweis darauf, dass die Zellen nicht auf den Agonisten reagiert hatten und somit ein Vergleich verschiedener Agonisten-Konzentrationen nicht sinnvoll war (Anmerkung: bei den K280A-Zellen wurde die Schwelle auf ≤ 5 % gesetzt, da generell nur sehr geringe Unterschiede erkennbar waren, s. 3.2.4).

Aus den erhaltenen Daten wurden anschließend mithilfe des Programms Prism 9 (Graph Pad) Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierbei handelte es sich um 4-Parameter-logistische Kurven. Angepasst wurden die Kurven durch Regression der kleinsten Quadrate und nach dem Modell $y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{\log(\text{EC}_{50} - x) \cdot \text{Steigung}}}$.

2.2.3.2.5 Schildplot-Analyse

Aus der dargestellten Kurve ergab sich jeweils der EC_{50} -Wert als Maß der halbmaximalen Wirkung des Agonisten; hieraus konnte dann der pK_B -Wert als Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten berechnet werden:

$$\text{pK}_B = \log(dr - 1) - \log[B] \text{ mit } dr = \frac{\text{EC}_{50} (\text{mit B})}{\text{EC}_{50} (\text{ohne B})} \text{ und } B = \text{Antagonist}$$

Zur Darstellung im Schildplot wurde $\log(dr-1)$ gegen die logarithmisch dargestellte Antagonisten-Konzentration aufgetragen und mittels einfacher linearer Regression eine Aus-

gleichsgerade erstellt (Arunlakshana und Schild, 1959). Mit einer zu ANCOVA (Analyse der Kovarianz) äquivalenten Methode wurde statistisch überprüft, ob die Steigung m der Geraden signifikant unterschiedlich zu 1 ist. Bei einer Steigung von $m = 1$ zeigt der Schnittpunkt mit der Abszisse den pA_2 -Wert als Maß für die antagonistische Potenz.

Zusätzlich zum Schildplot wurden die pK_B -Werte dargestellt, indem sie gegen die jeweils eingesetzte logarithmische Antagonistenkonzentration aufgetragen wurden, mittels einfacher linearer Regression eine Ausgleichsgerade berechnet und mittels ANCOVA-Äquivalents überprüft wurde, ob die Steigung signifikant unterschiedlich zu 0 ist.

2.2.4 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse wurde das Programm Prism 9 (Graph Pad) genutzt. Daten werden stets als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten von zwei Gruppen wurden durch einen Zweistichproben-t-Test ermittelt (unabhängige Gruppen, zweiseitig). Statistische Signifikanzen zwischen mehreren Gruppen wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey ermittelt. Die Vergleiche der am besten passenden Werte gewählter ungeteilter Parameter von Kurven basieren auf F-Tests. Ein Vergleich zwischen Geraden erfolgte wie oben beschrieben mittels Kovarianzanalyse (ANCOVA)-Äquivalents. Korrespondierende signifikanzangegebende p-Werte liegen bei jeweils *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Expression des humanen P2Y₁₂-Rezeptors

Für die hier durchgeführten molekularpharmakologischen Untersuchungen wurden CHO-Zellen verwendet, die verschiedene Varianten des hP2Y₁₂Rs exprimierten. Zur Evaluation der Eignung der Zellen für die Versuche wurden initial Expressionsanalysen durchgeführt.

3.1.1 Expression des Rezeptors als Fusionsprotein

Die hierfür verwendeten CHO-ECFP-Zellen exprimierten stabil ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (hP2Y₁₂-ECFP), das bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Auf den angefertigten Fluoreszenzmikroskopiebildern zeigte sich eine Färbung der Zellen als Darstellung detektierte Fluoreszenzaktivität (s. Abb. 6A); das Protein wurde also exprimiert. Dass insbesondere die Umrisse der Zellen erkennbar waren, lässt auf ein bevorzugtes Vorkommen des exprimierten Rezeptors in der Zellmembran schließen. Zusätzlich ließ sich oft eine verstärkte Anfärbung des Zellkerns erkennen. Innerhalb der Membran lag optisch eine weitgehend diffuse Verteilung des hP2Y₁₂-ECFP-Komplexes vor. Die Färbung der Zellen zeigte sich schon bei Anregung mit einer geringen Laserintensität; es ist von einer hohen Menge exprimierter Fusionsproteine auszugehen. Die Analyse der Bilder ergab eine signifikant erhöhte relative Fluoreszenzintensität in der Membran gegenüber der im Cytosol, sowohl ohne als auch nach Vorinkubation mit 2-MeSADP (s. Abb. 6A, 6B, 8A, 8B). Der Rezeptor mit seinem fusionierten Protein ist also v.a. in der Zellmembran zu finden.

3.1.2 Expression des K280A-mutierten Rezeptors als Fusionsprotein

Die verwendeten CHO-ECFP-K280A-Zellen exprimierten stabil ein Fusionsprotein aus ECFP und einer K280A-mutierten Variante des hP2Y₁₂Rs. Auf den Fluoreszenzmikroskopiebildern war Fluoreszenzaktivität als Anfärbung der Zellen erkennbar (s. Abb. 6C), die sich verstärkt in der Zellmembran und teilweise im Zellkern erkennen ließ. In der Analyse konnte eine signifikante Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität der Zellmembran gegenüber der im Cytosol nachgewiesen werden (s. Abb. 8C). Auch der mutierte Rezeptor scheint also vornehmlich in der Zellmembran vorhanden zu sein. Die beschriebenen Effekte zeigten sich auch nach Vorinkubation mit 2-MeSADP (s. Abb. 6D, 8D).

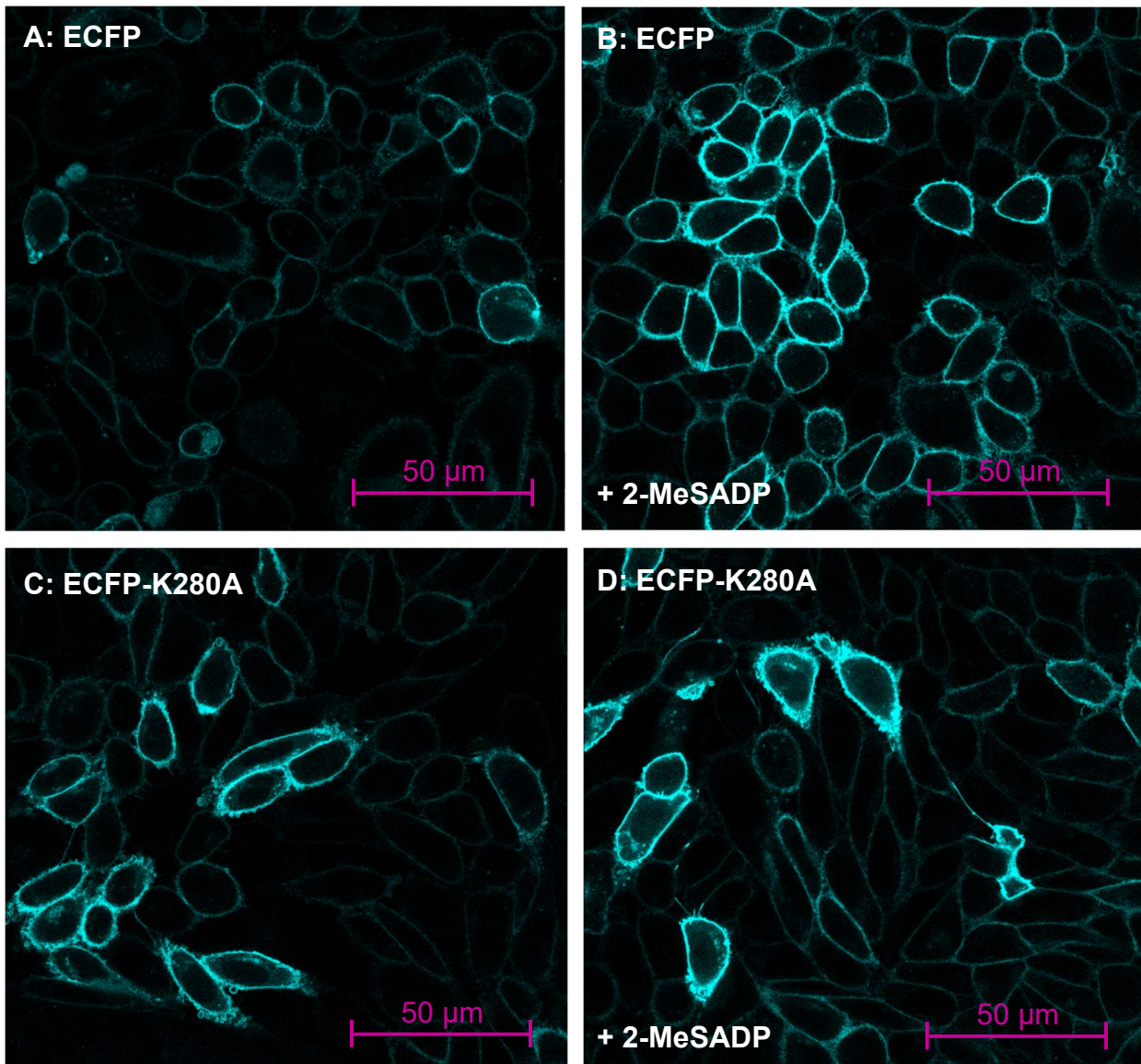


Abb. 6: Verteilung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors in Zelle und Membran. Für die Untersuchungen wurden ovarielle Zellen des Chinesischen Hamsters verwendet, die verschiedene Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten (A, B: Fusionsprotein aus dem hP2Y₁₂R und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP); C, D: Fusionsprotein aus dem durch eine K280A-Mutation veränderten hP2Y₁₂R mit ECFP). Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT, 21 – 24 °C) in 1 ml HBSS (Hanks ausgeglichene Salzlösung) mit dem 40x Ölimmersions-Objektiv des konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht, entweder ohne Zugabe von Testsubstanzen (A, C) oder nach Zugabe von und 10-minütiger Inkubation der Zellen mit 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, 100 nM) bei RT (B, D). Gemessen wurde jeweils die Fluoreszenzintensität des ECFPs (hellblau dargestellt), deren Verteilung auf die Expression des daran gekoppelten Rezeptors schließen lässt. Die Anregung mit dem Laser erfolgte bei Wellenlänge 445 nm, die Detektion bei Wellenlängen ab 454 nm.

3.1.3 Expression des Wildtyp-Rezeptors

Die abschließende Expressionsanalyse erfolgte an CHO-Zellen, die die Wildtyp-Variante des hP2Y₁₂Rs exprimierten. Da in diesem Fall kein fluoreszierendes Protein gekoppelt war, erfolgte eine Markierung des Rezeptors mit einem an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Antikörper (s. 2.1.1). Im Kontrollbild der nicht-markierten Zellen ließ sich optisch keine Fluoreszenz erkennen (s. Abb. 7A) und es war keine Fluoreszenzintensität messbar. Nach Antikörper-Markierung konnten die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden (s. Abb. 7B). Insbesondere im Bereich der Plasmamembran zeigte sich eine erhöhte Fluoreszenzintensität, was entsprechend dort auf eine erhöhtes Vorkommen des Rezeptors schließen lässt. In der Bildanalyse zeigte sich dieser vermutete Unterschied der relativen Fluoreszenzintensität zwischen Membran und Cytosol als signifikant zugunsten der Membran erhöht (s. Abb. 8E). Der Rezeptor ist also auch hier hauptsächlich in der Membran der Zellen zu finden.

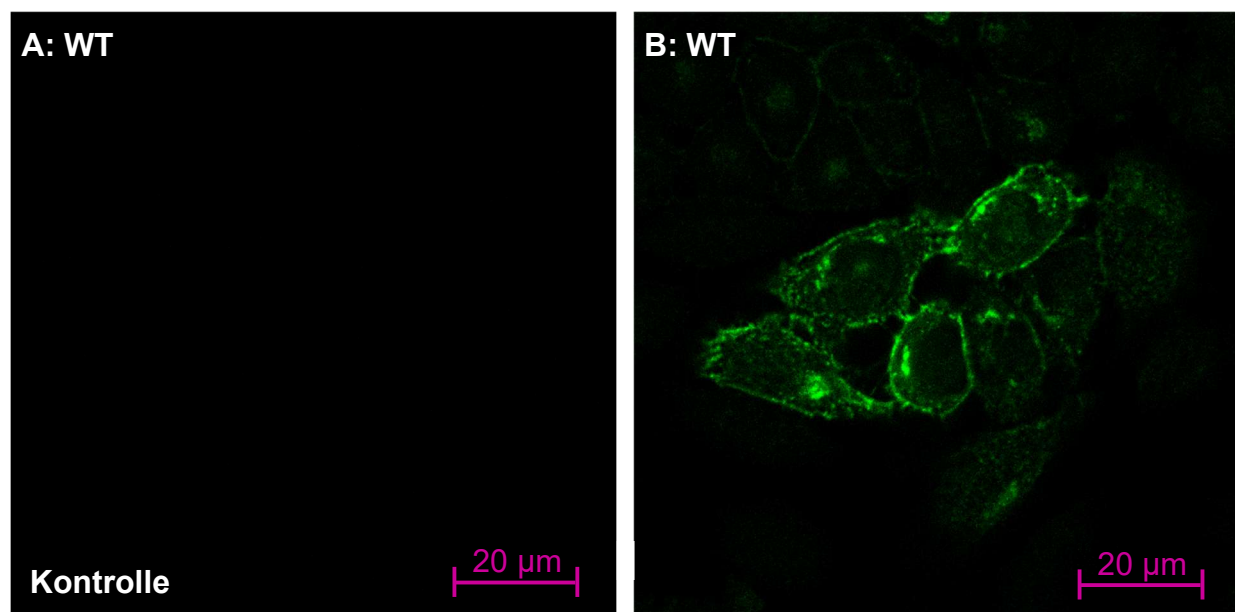


Abb. 7: Antikörper-Färbung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors. Es wurden ovarielle Zellen des Chinesischen Hamsters verwendet, die die Wildtyp-Variante (WT) des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur (21 – 24 °C) in 1 ml Hanks ausgeglichener Salzlösung mit dem 40x Ölimmersions-Objektiv des konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht. Gemessen wurde jeweils die Fluoreszenzintensität (grün dargestellt), die Rückschlüsse auf die Expression des so markierten Rezeptors erlaubt. Die Laseranregung erfolgte bei Wellenlänge 488 nm, die Detektion bei Wellenlängen ab 493 nm. A) Zellen ohne vorherige Anfärbung. B) Zellen nach Markierung des Rezeptors durch den Antikörper MA1-80281, der an den fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist und die Sequenz IPNPLLGL erkennt, die in den P/V-Proteinen des Paramyxovirus SV5 vorhanden ist.

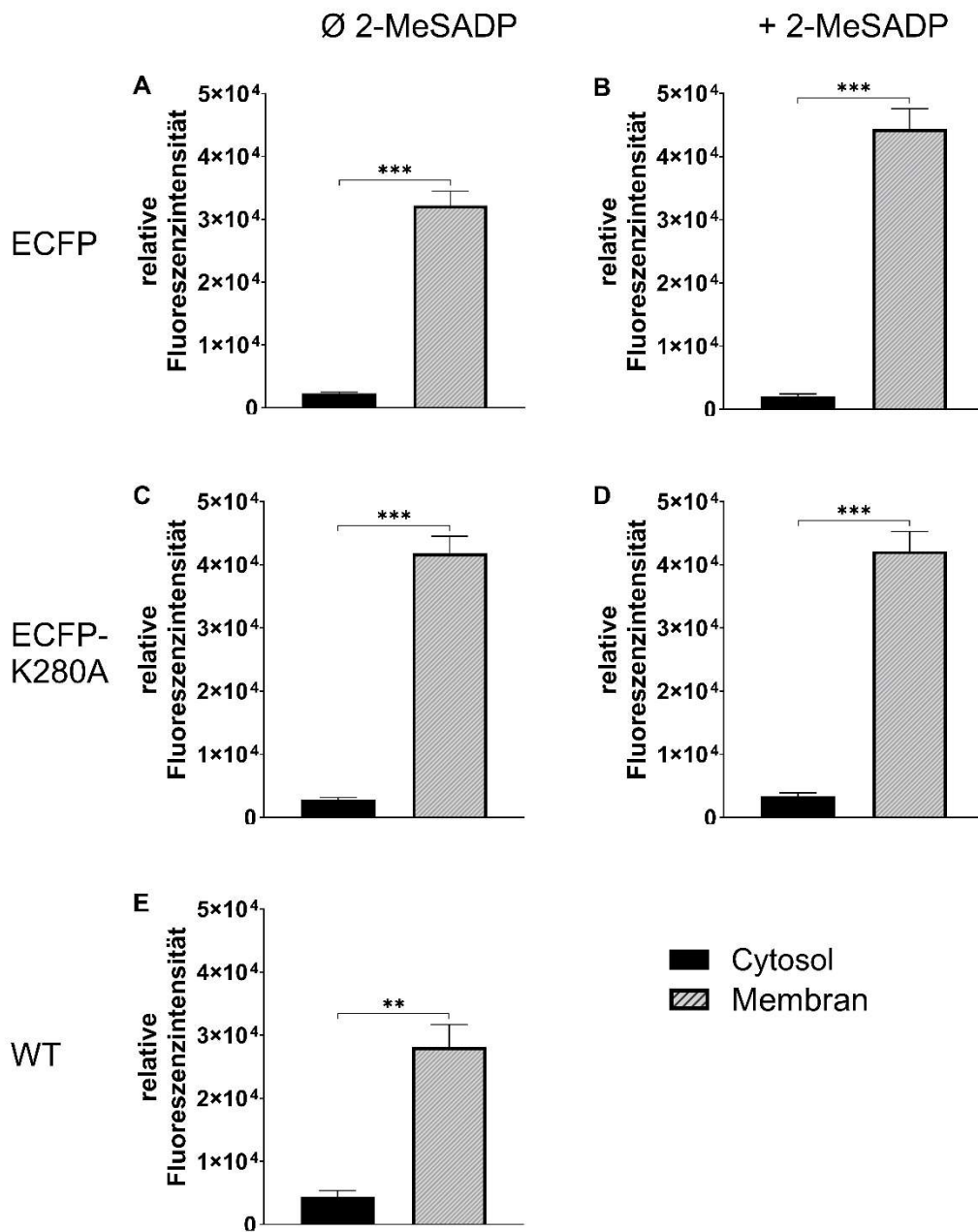


Abb. 8: Verteilung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors in Zellmembran und Cytosol. Die Analyse erfolgte an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten. A, B) Fusionsprotein aus dem hP2Y₁₂R und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP); C, D) Fusionsprotein aus dem durch eine K280A-Mutation veränderten hP2Y₁₂R mit ECFP (ECFP-K280A), E) Wildtyp-Variante (WT). Die Messung im Fluoreszenzmikroskop erfolgte ohne (A, C, E) oder nach (B, D) Zugabe von und 10-minütiger Inkubation der Zellen mit 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, 100 nM). Pro Zelle wurde die mittlere Fluoreszenzintensität in vier Quadranten der Größe 0,5 µm x 0,5 µm in der Membran und einem Quadrat der Größe 5 µm x 5 µm im Cytosol gemessen. Dargestellt werden jeweils die unter Beachtung der Hintergrundfluoreszenz berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten in Cytosol und Membran. Die Zahl analysierter Zellen war jeweils n = 6. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte dargestellt (**: p < 0,01; ***: p < 0,001).

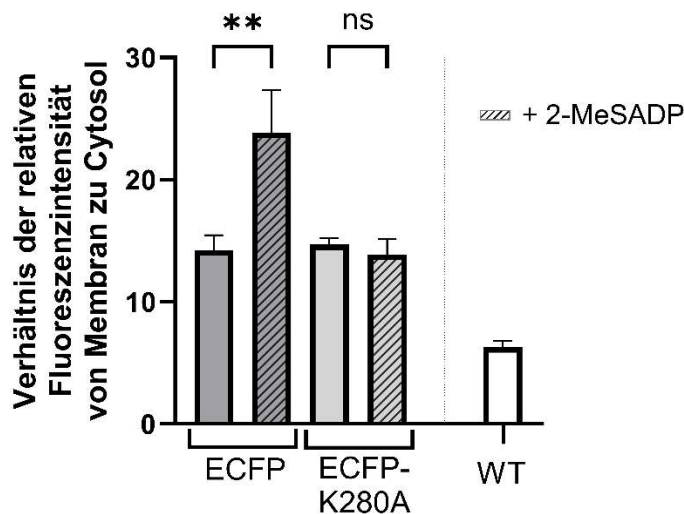


Abb. 9: Verhältnis der Verteilung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors in Zellmembran und Cytosol. Die Analyse erfolgte mithilfe von ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die verschiedene Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten. ECFP: Fusionsprotein aus dem hP2Y₁₂R und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP); ECFP-K280A: Fusionsprotein aus dem durch eine K280A-Mutation veränderten hP2Y₁₂R mit ECFP; WT: Wildtyp-Variante. Die Messungen im Fluoreszenzmikroskop erfolgten ohne (nicht geriffelt Balken) oder nach (geriffelte Balken) Zugabe von und 10-minütiger Inkubation der Zellen mit 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, 100 nM). Für die Untersuchung der WT-Zellen wurde dafür der Rezeptor durch den Antikörper MA1-80281 markiert, der an den fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist. Pro Zelle wurde die mittlere Fluoreszenzintensität in vier Quadranten der Größe 0,5 µm x 0,5 µm in der Membran und einem Quadrat der Größe 5 µm x 5 µm im Cytosol gemessen. Dargestellt wird der Quotient aus den unter Beachtung der Hintergrundfluoreszenz daraus berechneten relativen Fluoreszenzintensitäten der Membran und des Cytosols. Die Zahl analysierter Zellen war jeweils n = 6. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte dargestellt (ns: nicht signifikant; **: p < 0,01).

3.1.4 Einfluss des Agonisten

Die CHO-ECFP-Zellen und die CHO-ECFP-K280A-Zellen wiesen im Versuchsaufbau ohne 2-MeSADP ein ähnliches Verhältnis der relativen Fluoreszenzintensität von Membran zu Cytosol auf (s. Abb. 9). Hierbei war die Fluoreszenz in der Membran jeweils ca. um das 14-fache höher als im Cytosol. Bei den nicht-mutierten CHO-ECFP-Zellen führte eine 10-minütige Vorinkubation mit dem Agonisten 2-MeSADP (100 nM) optisch zu einer deutlich gesteigerten Anfärbung der Zellmembran im Bild (s. Abb. 6A, 6B). Während sich bei den CHO-ECFP-Zellen nach Vorinkubation mit dem Agonisten eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses der relativen Fluoreszenzintensität von Membran zu Cytosol auf etwa

das 24-fache nachweisen ließ, war der Unterschied für die CHO-ECFP-K280A-Zellen nicht signifikant (s. Abb. 9). In CHO-Zellen erhöht 2-MeSADP also die Zahl der nicht-mutierten hP2Y₁₂Rs in der Zellmembran im Verhältnis zum Cytosol, nicht aber die des K280A-mutierten Rezeptors. Bei den CHO-WT-Zellen zeigte sich eine etwa 6-fach erhöhte Fluoreszenz in der Membran im Verhältnis zum Cytosol. Ein Versuch mit 2-MeSADP-Vorinkubation war wegen der notwendigen Anfärbung mit den Antikörpern nicht sinnvoll.

3.2 Molekularpharmakologische Analyse am humanen P2Y₁₂-Rezeptor

Für die molekularpharmakologische Analyse am hP2Y₁₂R wurden für Zellen, die verschiedene Varianten des Rezeptors exprimierten, Konzentrations-Wirkungs-Kurven eines Agonisten erstellt und ihre Beeinflussung durch den Antagonisten Elinogrel untersucht. Als Ausgangspunkt für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration unter Einfluss des Agonisten und ggf. zusätzlich des Antagonisten bestimmt (s. 2.2.2 und 2.2.3.2). Mit den sich ergebenden jeweiligen EC₅₀-Werten sowie den pK_B-Werten wurde anschließend eine Schildplot-Analyse durchgeführt (s. 2.2.3.2.5).

3.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Überblick

Für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde der aus den Versuchsergebnissen berechnete Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration gegen die jeweils verwendete logarithmische Konzentration des Agonisten aufgetragen. Für jede Experimentreihe wurden in initialen Testversuchen pro verwendeter Elinogrel-Konzentration verschiedene Logarithmus-Stufen der Agonisten-Konzentration getestet, um den optimalen Konzentrationsbereich für die weiteren Experimente zu finden. Hierbei ergaben sich jeweils sigmoidale Kurven zwischen zwei annähernd horizontal verlaufenden Plateaus der minimalen und der maximalen Wirkung des Agonisten auf den Forskolin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration (Ergebnisse der Testversuche nicht gezeigt). Alle darauffolgenden Experimente wurden dann möglichst mit den logarithmischen Stufen der Agonisten-Konzentrationen im Bereich von Minimum bis Maximum durchgeführt.

In sämtlichen Versuchskonstellationen führte Forskolin zu einer signifikanten Erhöhung der cAMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Ergebnisse nicht gezeigt). Der

Forskolin-induzierter Anstieg der cAMP-Konzentration konnte in allen Versuchen mit einer zunehmenden Konzentration des jeweiligen Agonisten signifikant gesenkt werden.

3.2.2 Analyse am Rezeptor als Fusionsprotein

Zunächst erfolgte die Analyse anhand der CHO-Zellen, die das Fusionsprotein hP2Y₁₂R-ECFP exprimierten. Untersucht wurde die Wirkung von Elinogrel in Kombination mit dem potenten Agonisten 2-MeSADP und in Kombination mit dem endogenen Agonisten ADP.

3.2.2.1 2-Methythioadenosindiphosphat

3.2.2.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Die Auswertung der Ergebnisse ergab sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit signifikanter Verringerung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration bei zunehmender Agonisten-Konzentration (Abb. 10-12). Die Ausgangskurve ohne Zugabe von Elinogrel im Versuchsaufbau zeigte dabei eine signifikante Verringerung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration von 100 % (Kontrolle ohne Agonisten-Zugabe) auf ca. 15 % bei der maximal verwendeten 2-MeSADP-Konzentration von 10^{-8} M. Im Versuch mit 1 nM Elinogrel zeigte sich eine maximale Senkung auf ca. 8 %, bei allen höheren eingesetzten Konzentrationen von Elinogrel (10, 30, 100 und 300 nM) auf Werte nahe null (ca. 0,5 – 2,5 %).

Aus der Ausgangskurve (ohne Elinogrel), konnte für das 2-MeSADP eine halbmaximal wirksame Konzentration (EC_{50} -Wert) von 21 pM berechnet werden (s. Abb. 10).

Die niedrigste eingesetzte Konzentration von Elinogrel (1 nM) führte zu keiner sichtbaren Seitverschiebung der Ausgangskurve. Es ergab sich ein EC_{50} -Wert von 30 nM (s. Abb. 10). Da der EC_{50} -Wert nicht signifikant unterschiedlich war zu dem der Ausgangskurve, konnte hieraus kein pK_B -Wert berechnet werden.

Versuche mit etwas höher konzentriertem Elinogrel von 10 nM führten zu einer Rechtsverschiebung der Ausgangskurve (s. Abb. 11A). Es ergab sich ein EC_{50} -Wert von 108 pM, der signifikant unterschiedlich zu dem der Ausgangskurve war. Um die gleiche inhibierende Wirkung auf die Forskolin-induzierte Steigerung der cAMP-Konzentration zu haben, benötigt man also in Anwesenheit von 10 nM Elinogrel höhere Konzentrationen von 2-

MeSADP. Als Schätzwert für die Affinitätskonstante von Elinogrel konnte aus den beiden genannten EC_{50} -Werten ein scheinbarer pK_B -Wert von 8,6 berechnet werden.

hP2Y₁₂-ECFP

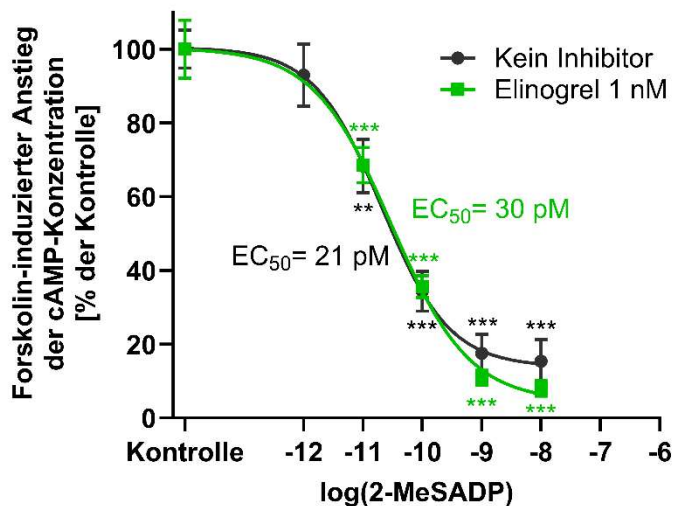
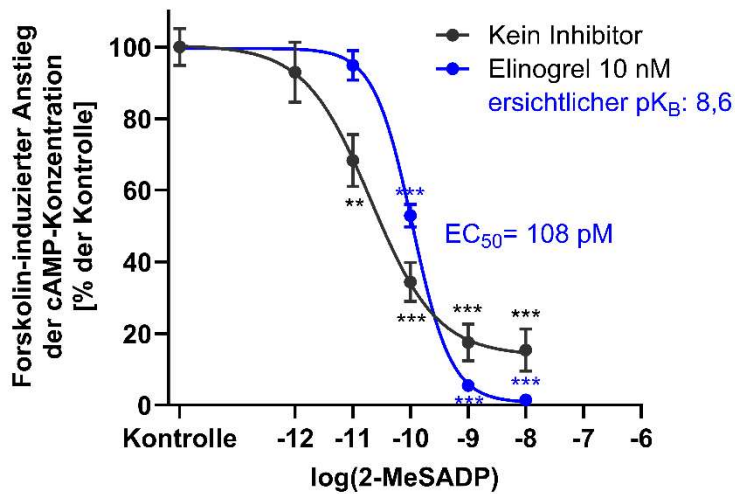


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (1 nM). Die Analyse erfolgte an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) konnte die cAMP-Konzentration in den Zellen nach 10 min Inkubation mit Forskolin (10 μ M) und dem Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, verschiedene Konzentrationen) bei 37 °C bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt als Anteil des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration an der Kontrolle (ohne Agonistenzugabe). Zusätzlich erfolgen weitere Messungen unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (1 nM, Inkubation 10 min vor Zugabe des Agonisten). Durch nichtlineare Regression konnten 4-Parameter-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und anhand dieser der EC_{50} -Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) berechnet werden. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 4 – 8 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey.

hP2Y₁₂-ECFP

A



B

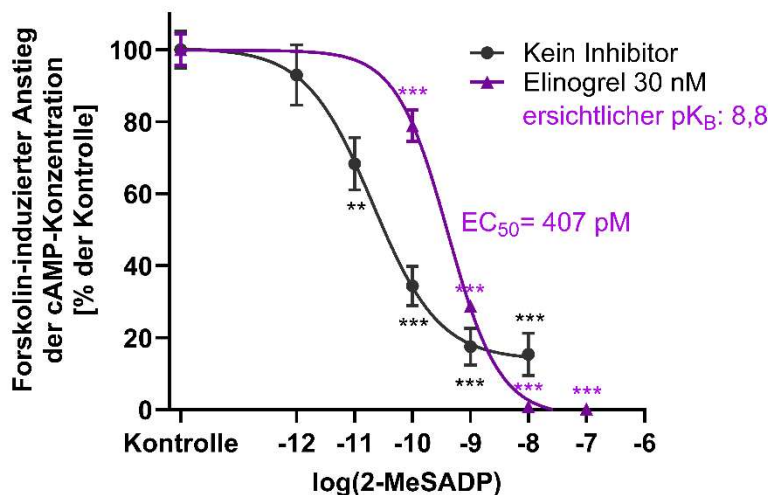
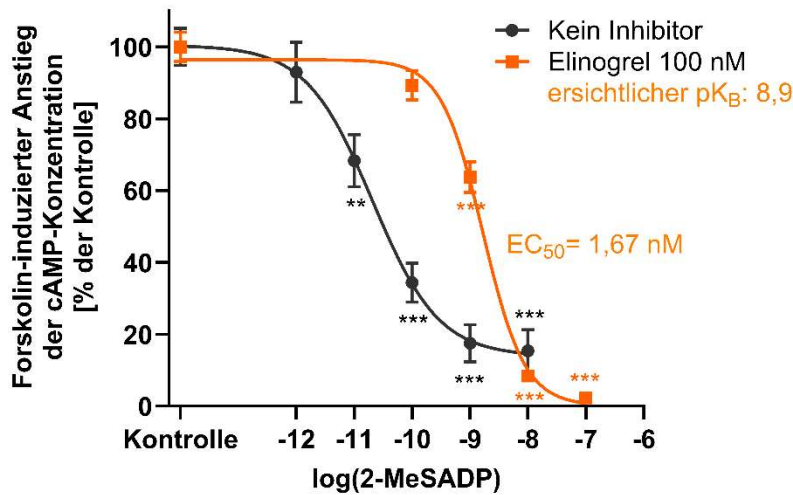


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM, 30 nM). An ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten, konnte mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration durch den Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) ohne/unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (A: 10 nM, B: 30 nM) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden. Berechnet wurden jeweils der EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten). Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 8 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als **: p < 0,01; ***: p < 0,001 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey. Für weitere Details s. Abb. 10.

hP2Y₁₂-ECFP

A



B

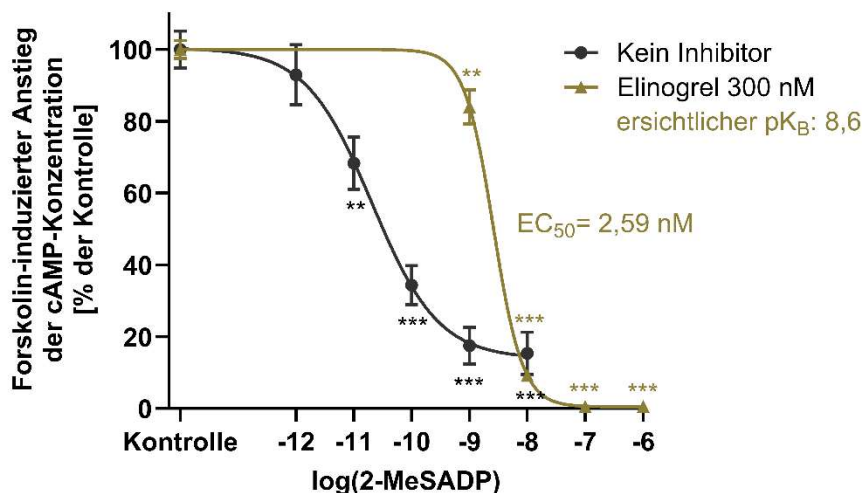


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (100 nM, 300 nM). An ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten, konnte mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration durch den Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) ohne/unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (A: 100 nM, B: 300 nM) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden. Berechnet wurden jeweils der EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten). Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 8 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als **: p < 0,01; ***: p < 0,001 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey. Für weitere Details s. Abb. 10.

Bei einer Elinogrel-Konzentration von 30 nM zeigte sich eine stärkere Rechtsverschiebung der Ausgangskurve als durch 10 nM Elinogrel mit einem daraus resultierenden EC_{50} -Wert von 407 pM und einem pK_B -Wert von 8,8 (s. Abb. 11B). Analog führte eine weitere Erhöhung der Elinogrel-Konzentration zu noch weiterer Rechtsverlagerung der Ausgangskurve und höheren EC_{50} -Werten (1,67 nM bei 100 nM Elinogrel und 2,59 nM bei 300 nM Elinogrel, s. Abb. 12). Die EC_{50} -Werte waren signifikant unterschiedlich zu dem der Ausgangskurve und die hieraus berechneten scheinbaren pK_B -Werte lagen bei 8,9 und 8,6.

Insgesamt zeigte sich also ab einer Elinogrel-Konzentration von 10 nM bis zur höchsten getesteten Konzentration von 300 nM mit zunehmender Konzentration eine ebenfalls zunehmende Rechtsverschiebung der Ausgangskurve und hieraus resultierenden zunehmend erhöhten EC_{50} -Werten. Da die Steigungen sämtlicher Konzentrations-Wirkungskurven nicht signifikant unterschiedlich zu der der Ausgangskurve waren, kann von einer parallelen Verschiebung ausgegangen werden. Je höher die Konzentration von Elinogrel, desto höher muss also die Konzentration von 2-MeSADP sein, um die gleiche inhibierende Wirkung auf die Forskolin-induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration zu haben.

3.2.2.1.2 Schildplot-Analyse

Im Anschluss konnte anhand der erhobenen Daten und der soeben erläuterten Konzentrations-Wirkungskurven eine Schildplot-Analyse durchgeführt werden (s. 2.2.3.2.5). Hierbei wurde aus den jeweiligen EC_{50} -Werten das Konzentrationsverhältnis $dr = EC_{50, + \text{ Elinogrel}} / EC_{50, \emptyset \text{ Elinogrel}}$ berechnet und dieses gegen die jeweils eingesetzte Elinogrel-Konzentration aufgetragen und mittels einfacher linearer Regression die Schildplotgerade erstellt. Wenn diese annähernd eine Steigung von $m = 1$ besitzt, zeigt der Schnittpunkt mit der X-Achse den pA_2 -Wert als Maß der antagonistischen Potenz von Elinogrel an.

Für die Berechnung wurden alle EC_{50} -Werte hinzugezogen, die signifikant unterschiedlich zu dem der Ausgangskurve waren. Es ergab sich eine Gerade mit einer Steigung von $m = 1,006 \pm 0,1543$, die nicht signifikant unterschiedlich zur Einheitskurve ($m = 1$) war (s. Abb. 13A). Dies lässt auf einen linear konzentrationsabhängigen und damit kompetitiven Antagonismus durch Elinogrel schließen. Der sich aus der Geraden ergebende pA_2 -Wert von Elinogrel lag bei 8,72.

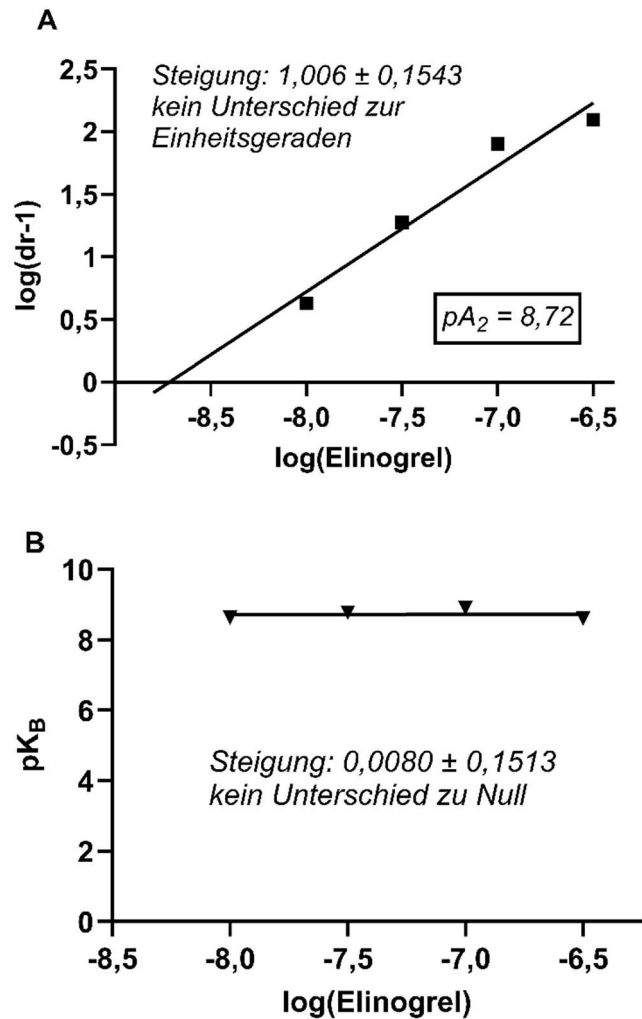
hP2Y₁₂-ECFP

Abb. 13: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) mit 2-Methylthioadenosindiphosphat. Die Versuche erfolgten an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten. Anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) am hP2Y₁₂R ohne/mit Beeinflussung durch Elinogrel in verschiedene Konzentrationen konnte der jeweilige EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) bestimmt und das Konzentrationsverhältnis $dr = EC_{50} (+ \text{Antagonist}) / EC_{50} (- \text{Antagonist})$ berechnet werden sowie der pK_B-Wert von Elinogrel (Schätzwerte für die Affinitätskonstante des Antagonisten, $pK_B = \log(dr - 1) - \log[B]$ mit B = Antagonist). A) Bei Auftragung von $\log(dr-1)$ gegen die eingesetzten Elinogrel-Konzentrationen und nach einfacher linearer Regression ergibt sich die gezeigte Gerade des Schildplots. Bei einer annähernden Steigung von $m = 1$ zeigt der Schnittpunkt mit der Abszisse den pA₂-Wert (antagonistische Potenz) von Elinogrel. B) Darstellung der errechneten pK_B-Werte in Abhängigkeit von der Elinogrel-Konzentration und der durch einfache lineare Regression erstellten Ausgleichsgeraden. Mit einer zu ANCOVA (Analyse der Kovarianz) äquivalenten Methode wurde statistisch überprüft, ob die Steigung m der Geraden signifikant unterschiedlich zu 1 (A) oder 0 (B) war.

Zur abschließenden Überprüfung der Abhängigkeit der experimentell ermittelten pK_B -Werte von der eingesetzten Konzentration des Antagonisten wurden die pK_B -Werte aus den einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven gegen die jeweilige Elinogrel-Konzentration aufgetragen und mit einfacher linearer Regression eine Ausgleichsgerade erstellt (s. Abb. 13B). Es ergab sich eine Gerade mit einer Steigung von $0,0080 \pm 0,1513$, die nicht signifikant unterschiedlich zu null war. Somit scheint der experimentell bestimmte pK_B -Wert unabhängig von der eingesetzten Konzentration von Elinogrel zu sein.

3.2.2.2 Adenosindiphosphat

3.2.2.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Im Anschluss wurden weitere Versuche mit den CHO-ECFP-Zellen durchgeführt; die Durchführung war dabei analog zum bisher beschriebenen Vorgehen. Anstelle des potenten Antagonisten 2-MeSADP wurde jetzt der endogene $P2Y_{12}$ R-Agonist ADP eingesetzt. Wie zuvor mit 2-MeSADP ergaben sich sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit signifikanter Verringerung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration bei zunehmender Konzentration des Agonisten (s. Abb. 14, 15). Allerdings waren für eine ähnlich starke Senkung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration deutlich höhere ADP-Konzentrationen nötig als 2-MeSADP-Konzentrationen in den vorher beschriebenen Versuchen (um 2 – 3 Logarithmusstufen, s. Abb. 10 – 12).

Die Ausgangskurve ohne Zugabe von Elinogrel im Versuch ergab eine Verringerung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration von 100 % (Kontrolle ohne Agonisten-Zugabe) auf ca. 13 % bei der höchsten verwendeten ADP-Konzentration von 10^{-6} M. Bei allen untersuchten Konzentrationen von Elinogrel (10, 30, 100 nM) zeigte sich eine maximale Senkung auf Werte fast bis null (ca. 0,2 – 3,3 %). Die Berechnung des EC_{50} -Werts aus der Ausgangskurve ohne Elinogrel-Einfluss ergab eine halbmaximal wirksame ADP-Konzentration von 13 nM (s. Abb. 14).

Der Einsatz von Elinogrel führte zu einer Rechtsverschiebung der Ausgangskurve (s. Abb. 14, 15). Die Verschiebung zeigte sich hierbei zunehmend ausgeprägt mit höheren Elinogrel-Konzentrationen. Da die Steigungen sämtlicher Konzentrations-Wirkungs-Kurven nicht signifikant unterschiedlich zu der der Ausgangskurve waren, kann von einer parallelen Verschiebung ausgegangen werden.

Für 10 nM Elinogrel ergab sich hieraus in der ADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ein EC_{50} -Wert von 93 nM, für 30 nM Elinogrel ein Wert von 228 nM und für die höchste eingesetzte Konzentration von 100 nM Elinogrel ein Wert von 956 nM (s. Abb. 14, 15). Alle EC_{50} -Werte waren signifikant unterschiedlich zu dem der Ausgangskurve. Je höher die eingesetzte Elinogrel-Konzentration, desto mehr ADP wird benötigt, um die gleiche inhibierende Wirkung auf die Forskolin-induzierte Steigerung zu erzielen.

Die aus den sich ergebenden EC_{50} -Werten berechneten scheinbaren pK_B -Werte lagen bei 8,8 (Elinogrel 10 nM), 8,7 (Elinogrel 30 nM) und 8,9 (Elinogrel 100 nM).

hP2Y₁₂-ECFP

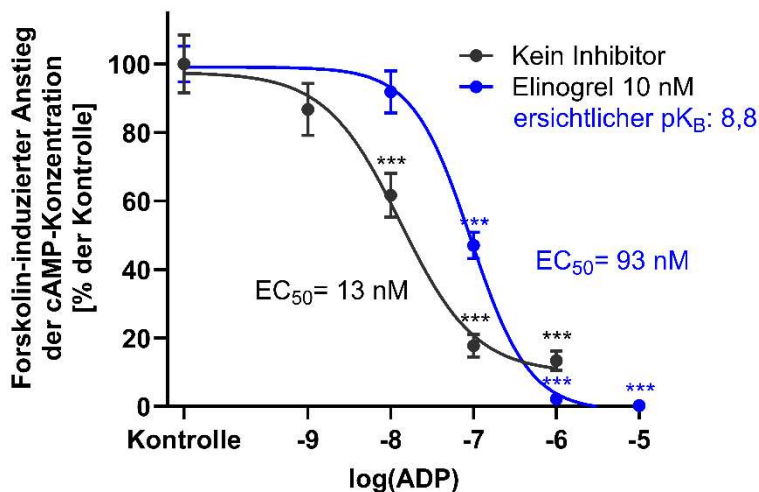
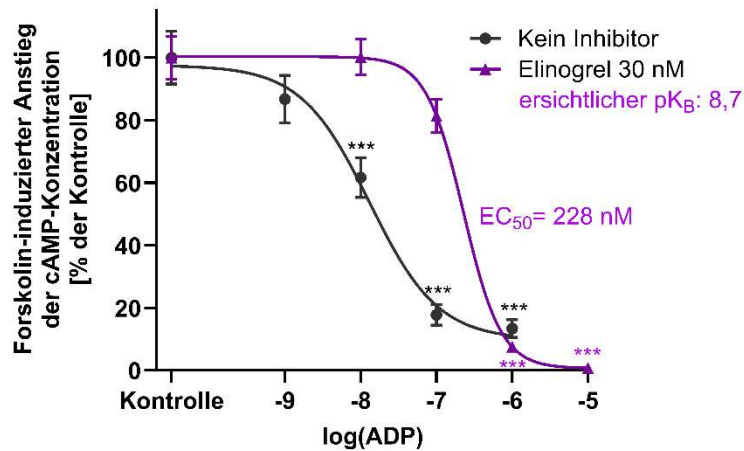


Abb. 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Adenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM). Die Analyse erfolgte an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) konnte die cAMP-Konzentration in den Zellen nach 10 min Inkubation mit Forskolin (10 µM) und dem Agonisten Adenosindiphosphat (ADP, verschiedene Konzentrationen) bei 37 °C bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt als Anteil des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration an der Kontrolle ohne Agonistenzugabe. Zusätzlich erfolgen Messungen unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (10 nM; Inkubation 10 Minuten vor der Zugabe des Agonisten). Durch nichtlineare Regression konnten 4-Parameter-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und anhand dieser der jeweilige EC_{50} -Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B -Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten) berechnet werden. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als ***: $p < 0,001$ gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey.

hP2Y₁₂-ECFP

A



B

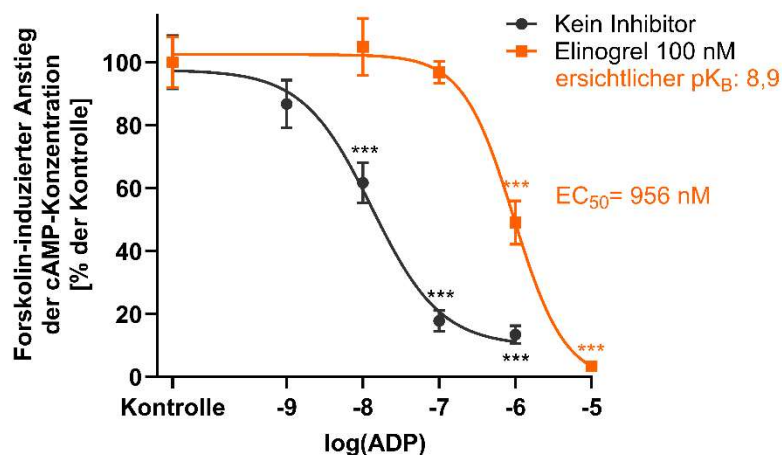
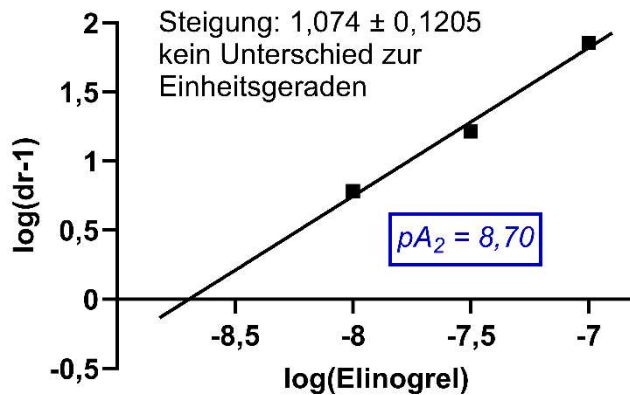


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Adenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (30 nM, 100 nM). An ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten, konnte mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration durch den Agonisten Adenosindiphosphat (ADP) ohne/unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (A: 30 nM, B: 100 nM) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden. Berechnet wurden jeweils der EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten). Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 4 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als ***: p < 0,001 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey. Für weitere Details s. Abb. 14.

hP2Y₁₂-ECFP

A



B

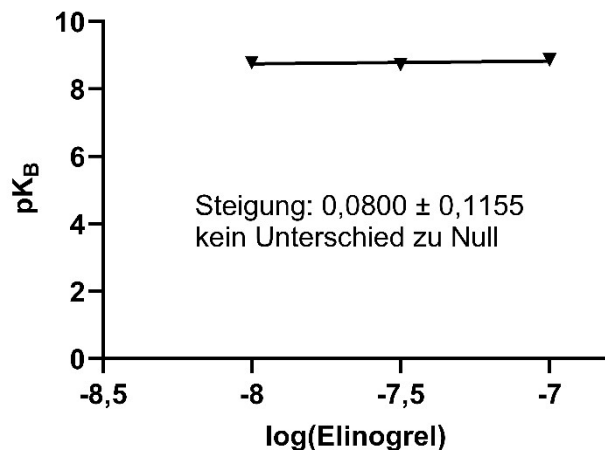


Abb. 16: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) mit Adenosindiphosphat. Verwendet wurden ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten. Anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Adenosindiphosphat (ADP) am hP2Y₁₂R ohne/mit Beeinflussung durch Elinogrel in verschiedenen Konzentrationen konnte der jeweilige EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) bestimmt und das Konzentrationsverhältnis $dr = EC_{50} (+ \text{Antagonist}) / EC_{50} (- \text{Antagonist})$ berechnet werden sowie der pK_B-Wert von Elinogrel (Schätzwerte für die Affinitätskonstante des Antagonisten, $pK_B = \log(dr - 1) - \log [B]$ mit $B = \text{Antagonist}$). A) Bei Auftragung von $\log(dr-1)$ gegen die jeweiligen Elinogrel-Konzentrationen und nach einfacher linearer Regression ergibt sich die gezeigte Gerade des Schildplots. Bei annähernder Steigung von $m = 1$ zeigt der Schnittpunkt mit der Abszisse den pA₂-Wert (antagonistische Potenz) von Elinogrel. B) Darstellung der errechneten pK_B-Werte in Abhängigkeit von der Elinogrel-Konzentration und der durch einfache lineare Regression erstellten Ausgleichsgeraden. Mit einer zu ANCOVA (Analyse der Kovarianz) äquivalenten Methode wurde statistisch überprüft, ob die Steigung m der Geraden signifikant unterschiedlich zu 1 (A) oder 0 (B) ist.

3.2.2.2.2 Schildplot

Die nachfolgende Schildplot-Analyse aus den ADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergab eine Gerade mit einer Steigung von $m = 1,074 \pm 0,1205$, die nicht signifikant unterschiedlich zur Einheitskurve ($m = 1$) war (s. Abb. 16A). Auch mit dem endogenen P2Y₁₂R-Agonisten ADP scheint der Antagonist Elinogrel also kompetitiv zu konkurrieren. Der sich aus der Geraden ergebende pA₂-Wert von Elinogrel als Schnittpunkt mit der Abszisse lag bei 8,70.

Die abschließende Auftragung der experimentell ermittelten pK_B-Werte gegen die entsprechend eingesetzte Elinogrel-Konzentration ergab nach linearer Regression eine Ausgleichsgerade mit einer Steigung von $0,0800 \pm 0,1155$ (s. Abb. 16B). Diese war nicht signifikant unterschiedlich zu null. Somit scheint auch hier der experimentell bestimmte pK_B-Wert unabhängig von der eingesetzten Elinogrel-Konzentration zu sein.

3.2.3 Analyse am Wildtyp-Rezeptor

Im Anschluss an die Versuche mit den CHO-ECFP-Zellen erfolgte die Analyse anhand von CHO-Zellen, die die Wildtyp-Variante des hP2Y₁₂Rs exprimierten. Untersucht wurde die Wirkung von Elinogrel in Kombination mit 2-MeSADP als potentem Agonisten. Das Vorgehen entsprach hierbei dem bereits beschriebenen im Rahmen der Analysen an den CHO-ECFP-Zellen (s. 3.2.2).

3.2.3.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Es ergaben sich wiederum sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit einer signifikanten Senkung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration mit zunehmender Agonisten-Konzentration. Die für die Versuche benötigten 2-MeSADP-Konzentrationen waren hierbei im Schnitt etwas höher als für die CHO-ECFP-Zellen (s. Abb. 10-12 und 14, 15). Insbesondere zeigte sich für alle erzeugten Kurven ohne und mit Elinogrel-Einfluss ein deutlich veränderter Wert des maximalen Effekts. So war der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration unter allen Versuchsbedingungen nur auf Werte im Bereich von 43 – 57 % senkbar und diese lagen somit bedeutend höher als die entsprechenden Werte bei den CHO-ECFP-Versuchen (s. 3.2.2.1.1 und 3.2.2.2.1).

Für die Ausgangskurve ohne Elinogrel zeigte sich ein EC_{50} -Wert von 1,3 nM (s. Abb. 17). Unter Elinogrel-Einfluss kam es zu einer leichten Rechtsverschiebung der Ausgangskurve (s. Abb. 17-19), die mit zunehmender Elinogrel-Konzentration deutlicher wurde. Die Steigungen aller Konzentrations-Wirkungs-Kurven waren hierbei nicht signifikant unterschiedlich zu der der Ausgangskurve, sodass von einer parallelen Verschiebung ausgegangen werden kann. Auch für die WT-Zellen gilt also: Je höher die eingesetzte Elinogrel-Konzentration, desto mehr 2-MeSADP wird benötigt, um die gleiche inhibierende Wirkung auf den Forskolin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration zu erzielen.

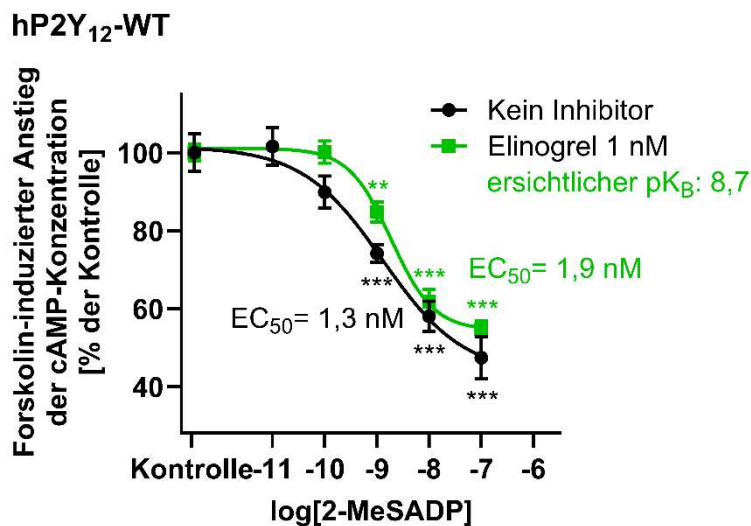
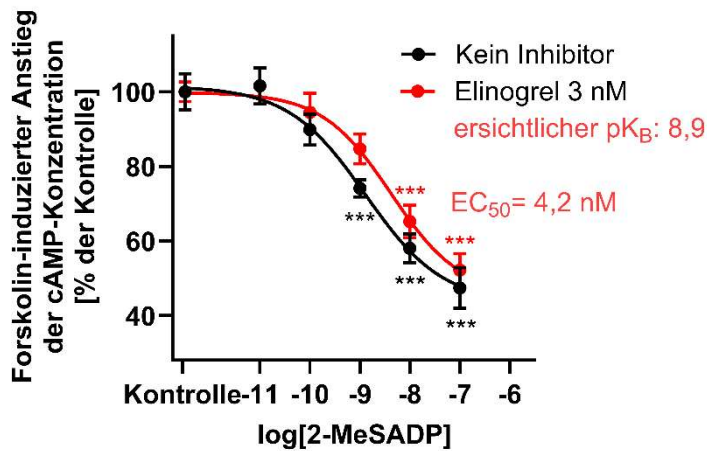


Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (1 nM). Die Analyse erfolgte mithilfe von ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die die Wildtyp-Variante des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) konnte die cAMP-Konzentration in den Zellen nach zehnminütiger Inkubation mit Forskolin (10 μ M) und dem potenten Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, verschiedene Konzentrationen) bei 37 °C bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt als Anteil des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration an der Kontrolle (ohne Agonistenzugabe). Zusätzlich erfolgten weitere Messungen unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (1 nM; Inkubation 10 Minuten vor Zugabe des Agonisten). Durch nichtlineare Regression konnten 4-Parameter-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und anhand dieser der EC_{50} -Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B -Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten) berechnet werden. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 4 – 6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey.

hP2Y₁₂-WT

A



B

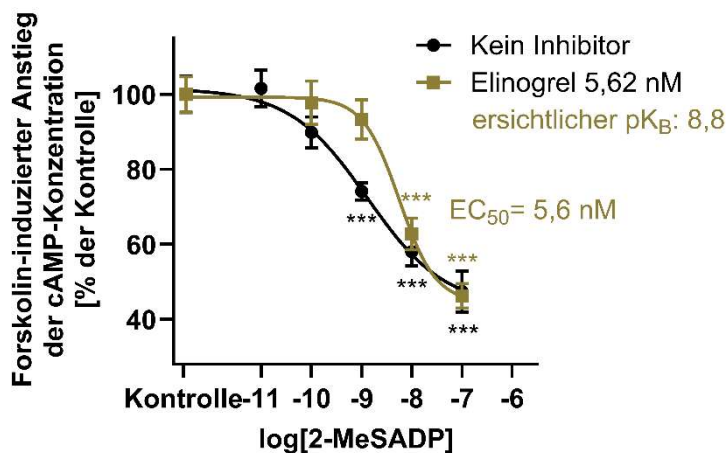
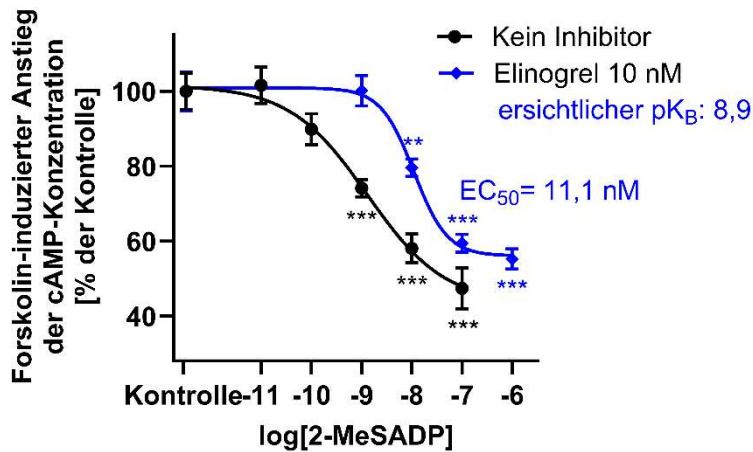


Abb. 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (3 nM, 5,62 nM). An ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die die Wildtyp-Variante des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten, konnte mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration durch den Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) ohne/unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (A: 3 nM, B: 5,62 nM) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden. Berechnet wurden jeweils der EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten). Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 8 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als ***: p < 0,001 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey. Für weitere Details s. Abb. 17.

hP2Y₁₂-WT

A



B

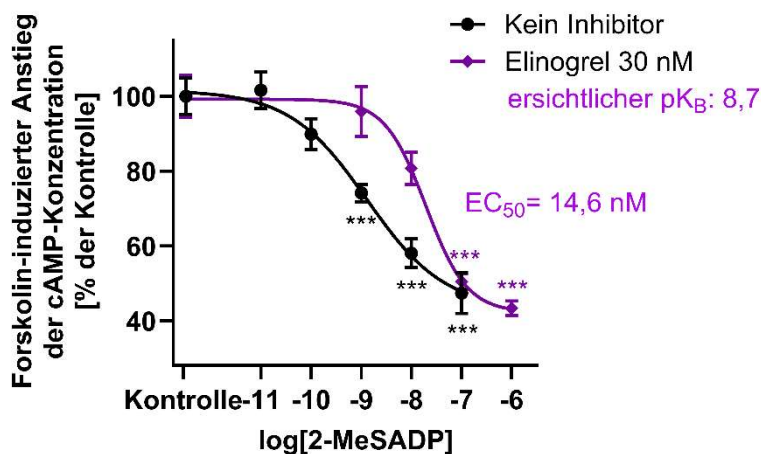
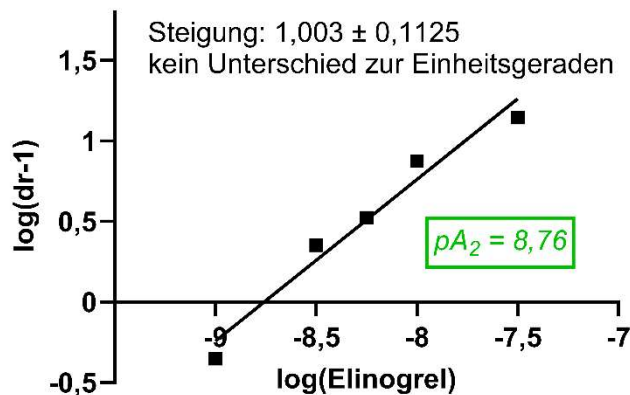


Abb. 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM, 30 nM). An ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die die Wildtyp-Variante des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten, konnte mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration durch den Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) ohne/unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (A: 10 nM, B: 30 nM) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden. Berechnet wurden jeweils der EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten). Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus je 3 – 6 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als **: p < 0,01; ***: p < 0,001 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey. Für weitere Details s. Abb. 17.

hP2Y₁₂-WT

A



B

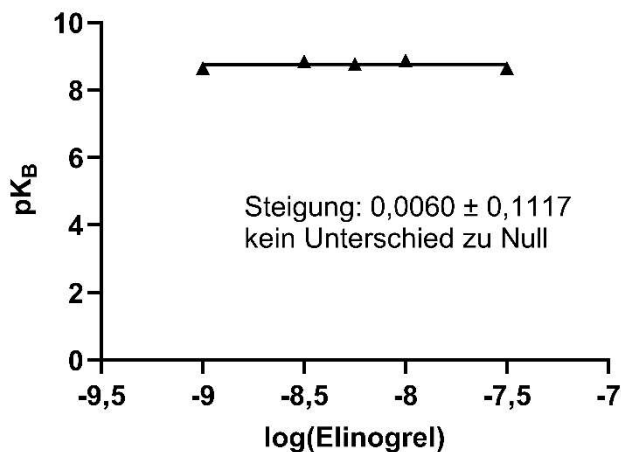


Abb. 20: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor (Wildtyp-Variante) mit 2-Methylthioadenosindiphosphat. Die Versuche erfolgten an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die die Wildtyp-Variante des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (hP2Y₁₂R) exprimierten. Anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) am hP2Y₁₂R ohne/mit Beeinflussung durch Elinogrel in verschiedene Konzentrationen konnte der jeweilige EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) bestimmt und das Konzentrationsverhältnis $dr = EC_{50} (+ \text{Antagonist}) / EC_{50} (- \text{Antagonist})$ berechnet werden sowie der pK_B-Wert von Elinogrel (Schätzwerte für die Affinitätskonstante des Antagonisten, $pK_B = \log(dr - 1) - \log [B]$ mit B = Antagonist). A) Bei Auftragung von $\log(dr-1)$ gegen die eingesetzten Elinogrel-Konzentrationen und nach einfacher linearer Regression ergibt sich die gezeigte Gerade des Schildplots. Bei einer annähernden Steigung von $m = 1$ zeigt der Schnittpunkt mit der Abszisse den pA₂-Wert (antagonistische Potenz) von Elinogrel. B) Darstellung der errechneten pK_B-Werte in Abhängigkeit von der Elinogrel-Konzentration und der durch einfache lineare Regression erstellten Ausgleichsgeraden. Mit einer zu ANCOVA (Analyse der Kovarianz) äquivalenten Methode wurde statistisch überprüft, ob die Steigung m der Geraden signifikant unterschiedlich zu 1 (A) oder 0 (B) ist.

Die niedrigste eingesetzte Elinogrel-Konzentration von 1 nM ergab einen EC_{50} -Wert von 1,9 nM und ließ somit einen scheinbaren pK_B -Wert von 8,7 errechnen (s. Abb. 17). Für die nächsthöheren eingesetzten Konzentrationen ergaben sich aus den jeweiligen EC_{50} -Werten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (4,2 nM, 5,6 nM und 11,1 nM) scheinbare pK_B -Werte von 8,9 (Elinogrel 3 nM), 8,8 (Elinogrel 5,62 nM) und 8,9 (Elinogrel 10 nM). Die höchste der an diesem Zelltyp eingesetzten Elinogrel-Konzentrationen (30 nM) zeigte einen EC_{50} -Wert von 14,6 nM und somit einen scheinbaren pK_B -Wert von 8,7 (s. Abb. 18, 19).

3.2.3.2 Schildplot-Analyse

Die anhand der beschriebenen Daten durchgeführte Schildplot-Analyse aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit 2-MeSADP führte zu einer Ausgleichs-Geraden mit einer Steigung von $m = 1,003 \pm 0,1125$, die nicht signifikant unterschiedlich zur Einheitskurve mit $m = 1$ war (s. Abb. 20A). Es lässt sich auf einen kompetitiven Bindungsmechanismus von Elinogrel auch am WT-hP2Y₁₂-Rezeptor schließen. Aus der Geraden ergab sich ein pA_2 -Wert von 8,76 für Elinogrel.

Zur abschließenden Überprüfung der Abhängigkeit der experimentell ermittelten pK_B -Werte von der eingesetzten Konzentration des Antagonisten Elinogrel wurden erneut die pK_B -Werte aus den einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven gegen die jeweilige Elinogrel-Konzentration aufgetragen und mit einfacher linearer Regression eine Ausgleichs-gerade erstellt (s. Abb. 20B). Es ergab sich eine Gerade mit einer Steigung von $0,0060 \pm 0,1117$, die nicht signifikant unterschiedlich zu null war. Somit scheint der experimentell bestimmte pK_B -Wert auch hier unabhängig von der eingesetzten Konzentration von Elinogrel zu sein.

3.2.4 Analyse am K280A-mutierten Rezeptor als Fusionsprotein

Zuletzt erfolgte die Analyse an den CHO-Zellen, die das Fusionsprotein aus ECFP und der K280A-mutierten Variante des hP2Y₁₂Rs exprimierten. Untersucht wurde die Wirkung von Elinogrel in Kombination mit 2-MeSADP.

Die Experimente mit den mutierten Zellen gestalteten sich wesentlich schwieriger, da die Zellen deutlich weniger auf das 2-MeSADP reagierten als es in den vorhergehenden Ex-

perimenten mit den CHO-ECFP-Zellen oder den CHO-WT Zellen der Fall gewesen war. Aus diesem Grund mussten die Grenzwerte für die Einbeziehung eines Experimentes in die Auswertung leicht angepasst werden (s. 2.2.3.2.4). Trotz dieser Maßnahme mussten viele Experimente verworfen werden, sodass die Experimentreihe nach Versuchen mit nur einer Konzentration von Elinogrel (10 nM) beendet wurde.

hP2Y₁₂-ECFP-K280A

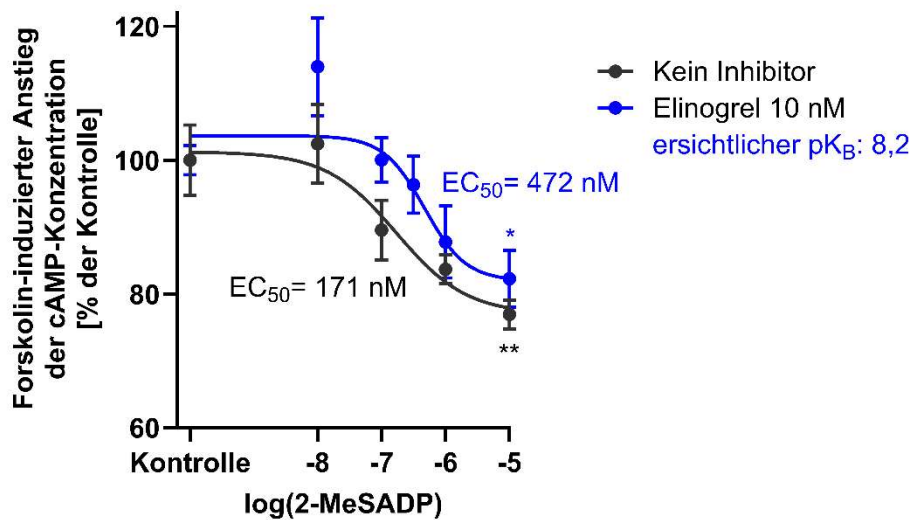


Abb. 21: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am mutierten humanen P2Y₁₂-Rezeptor (K280A-Mutation im Fluoreszenz-markierten Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM). Die Analyse erfolgte mithilfe von ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die ein Fusionsprotein aus dem mutierten humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) exprimierten. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) konnte die cAMP-Konzentration in den Zellen nach 10 min Inkubation mit Forskolin (10 µM) und dem Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP, verschiedene Konzentrationen) bei 37 °C bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt als Anteil des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration an der Kontrolle (ohne Agonistenzugabe). Zusätzlich erfolgen weitere Messungen unter Einfluss des Antagonisten Elinogrel (10 nM; Inkubation 10 min vor der Zugabe des Agonisten). Durch nichtlineare Regression konnten 4-Parameter-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und anhand dieser der jeweilige EC₅₀-Wert (halbmaximal wirksame Konzentration) sowie der pK_B-Wert (Schätzwert für die Affinitätskonstante des Antagonisten) berechnet werden. Die Ergebnisse werden dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte aus je 5 unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede werden angegeben als (*: p < 0,05; **: p < 0,01 gegen die Kontrolle nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) im multiplen Vergleich nach Tukey).

In beiden erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven ließ sich der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration nicht unter 76 % senken (s. Abb. 21) und lag somit nochmal deutlich höher als für die CHO-ECFP-Zellen und auch für die WT-Zellen in den jeweiligen Experimenten mit 2-MeSADP (s. 3.2.2.1.1 und 3.2.3.1). Die K280A-Mutation scheint also die Wirkung des 2-MeSADPs deutlich zu vermindern.

Unter Vorbehalt der veränderten Grenzwerte ergaben die Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den Experimenten für die Ausgangskurve ohne Elinogrel-Einfluss einen EC_{50} -Wert von 171 nM und nach Vorinkubation mit 10 nM Elinogrel einen EC_{50} -Wert von 472 nM (s. Abb. 21), was einen scheinbaren pK_B -Wert für Elinogrel von 8,2 errechnen lässt.

3.2.5 Vergleich der Agonisten und der Rezeptorvarianten

Im Rahmen der Experimente wurden insgesamt vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven als Ausgangskurven ohne den Einfluss von Elinogrel erzeugt, die dementsprechend die reine agonistische Wirkung am Rezeptor zeigen. Zur besseren Verdeutlichung und Vergleichbarkeit der Wirkung der verschiedenen Agonisten sowie die Wirkung auf die verschiedenen Zelltypen sind die jeweiligen Kurven in Abb. 22 erneut im direkten Vergleich dargestellt und werden im Folgenden ergänzend erläutert.

3.2.5.1 Vergleich der Agonisten

Den beiden anhand der CHO-ECFP-Zellen erstellten Kurven gemein war der sigmoidale Verlauf mit signifikanter Verringerung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (ohne Agonisten) bei zunehmender Konzentration des jeweiligen Agonisten 2-MeSADP oder ADP (s. 3.2.2.1.1 und 3.2.2.2.1). Beide Agonisten bewirken also eine Hemmung der Adenylatcyclase. Es zeigt sich bei etwa gleicher Steigung eine parallele Rechtsverschiebung der ADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve um ca. drei Logarithmusstufen der Agonistenkonzentration im Vergleich zur 2-MeSADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 22), sodass bei dem sich hieraus ergebenden deutlich erhöhten EC_{50} -Wert von ADP am $P2Y_{12}R$ (vgl. 3.2.2.1.1 und 3.2.2.2.1) von einer deutlich höheren Potenz von 2-MeSADP im Vergleich zu ADP ausgegangen werden kann.

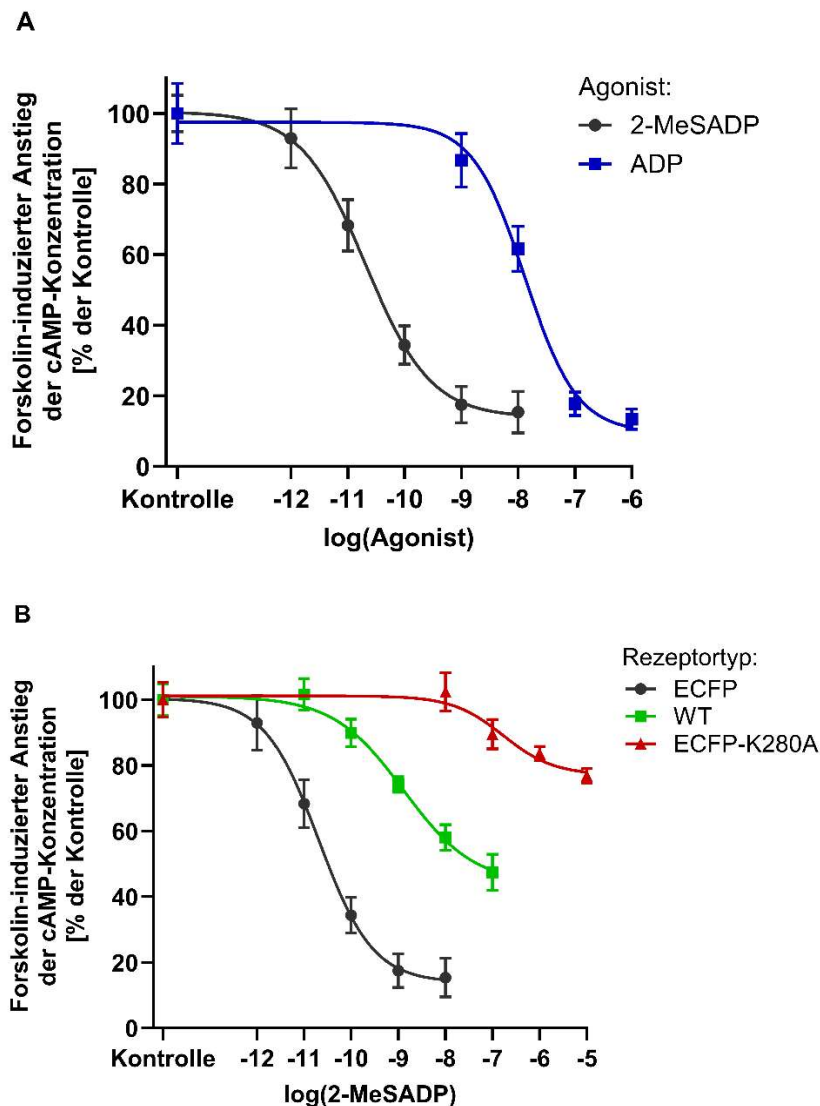


Abb. 22: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von verschiedenen Agonisten und an verschiedenen Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors. Die Versuche erfolgten an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), die entweder ein Fusionsprotein aus dem humanen P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) oder die Wildtyp-Variante des hP2Y₁₂Rs oder eine K280A-mutierte Variante als Fusionsprotein mit ECFP exprimierten. Mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) konnte die Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in den Zellen nach 10 min Inkubation mit Forskolin (10 µM) und den Agonisten 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) oder Adenosindiphosphat (ADP) bei 37 °C bestimmt werden. Die Darstellung erfolgt als Anteil des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration an der Kontrolle (ohne Agonistenzugabe). Gezeigt werden die durch nichtlineare Regression erstellten 4-Parameter-Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Darstellung der Datenpunkte als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte aus je 4 – 8 unabhängigen Experimenten ohne Angabe von Signifikanzen). A) Vergleich der Agonisten an den CHO-ECFP-Zellen, Daten aus Abb. 10, 14. B) Vergleich der Zelltypen mit dem Agonisten 2-MeSADP, Daten aus Abb. 10, 17, 21.

3.2.5.2 Vergleich der Rezeptorvarianten

In allen drei der verschiedenen Varianten der hP2Y₁₂R exprimierenden Zellreihen kam es bei Zugabe einer (jeweils unterschiedlichen) ausreichend hohen Konzentration von 2-MeSADP zu einer signifikanten Senkung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration; in allen drei Zellreihen hatte das 2-MeSADP also einen messbaren Effekt auf die Aktivität der AC. In der Stärke dieses Effekts unterschieden sich die Zelltypen und damit die Rezeptortypen jedoch deutlich (s. Abb. 22).

Bei den initial untersuchten CHO-ECFP-Zellen war dabei sowohl der Maximaleffekt auf den Forskolin-induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration mit einer Senkung um etwa 85 % am größten als auch der EC₅₀-Wert am niedrigsten als Hinweis auf eine hohe Potenz an diesem Rezeptortyp. In den CHO-WT-Zellen war der maximale Effekt auf die Aktivität der AC deutlich geringer ausgeprägt als bei der ECFP-modifizierten Rezeptorvariante; scheinbar führt die Kopplung mit ECFP zu einer gesteigerten Wirkung des 2-MeSADPs am Rezeptor. Die CHO-ECFP-K280A-Zellen zeigen einen noch weiter reduzierten Maximaleffekt (s. Abb. 22), obwohl sie ebenfalls mit ECFP gekoppelt sind und also abgesehen von der eingefügten Mutation analog zu den CHO-ECFP-Zellen reagieren sollten. Die einzelne Punktmutation des Lysins an der Stelle 280 scheint den Effekt von 2-MeSADP also deutlich zu reduzieren und für eine halbmaximale Wirkung sind etwa 10 000-fach höhere Konzentrationen nötig als bei den nicht-mutierten CHO-ECFP-Zellen (vgl. 3.2.4).

3.2.6 pA₂-Wert von Elinogrel

Aus den drei ermittelten Schildplot-Geraden (CHO-ECFP-Zellen mit 2-MeSADP (s. Abb. 13), CHO-ECFP-Zellen mit ADP (s. Abb. 16) und CHO-WT-Zellen (s. Abb. 20) konnte eine gemeinsame Geradengleichung errechnet werden (s. Abb. 23, vgl. 4.4.3) und – bei einer Steigung von 1,016, die nicht signifikant unterschiedlich zu 1 ist – der gemeinsame pA₂-Wert bestimmt werden. Der endgültige in dieser Arbeit bestimmte pA₂-Wert von Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor liegt damit bei 8,74.

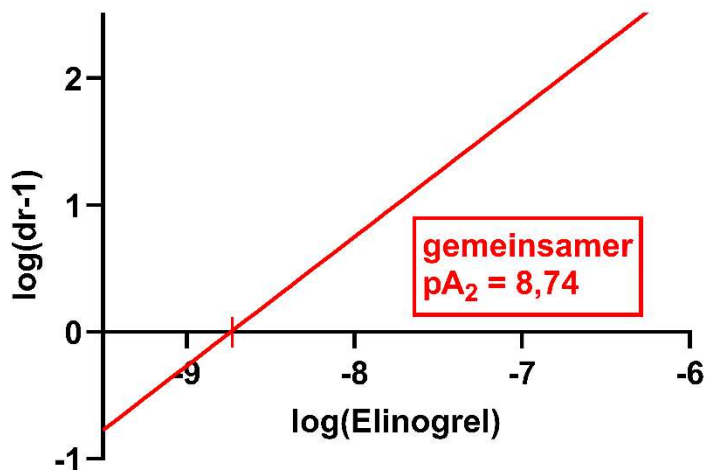


Abb. 23: Gemeinsame Schildplot-Gerade des Antagonisten Elinogrel an verschiedenen Varianten des humanen $P2Y_{12}$ -Rezeptors. Die Versuche erfolgten an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die entweder ein Fusionsprotein aus dem humanen $P2Y_{12}$ -Rezeptor (h $P2Y_{12}$ R) und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP) oder die Wildtyp-Variante des h $P2Y_{12}$ Rs exprimierten (WT). Aus den letztlich erzeugten Schildplot-Geraden der Konstellationen h $P2Y_{12}$ R-ECFP mit 2-MeSADP, h $P2Y_{12}$ R-ECFP mit ADP und h $P2Y_{12}$ R-WT mit 2-MeSADP konnte eine gemeinsame Geradengleichung ermittelt werden, deren Gerade hier dargestellt ist (Daten aus Abb. 13, 16, 20). Mit einer zu ANCOVA (Analyse der Kovarianz) äquivalenten Methode wurde statistisch ermittelt, dass die Steigung m der Geraden nicht signifikant unterschiedlich zu 1 ist.

4. Diskussion

4.1 Eignung der Methoden

4.1.1 Alpha-Screen®-Verfahren

Die Ansätze, um pharmakologische Auswirkungen von Liganden auf GPCRs zu testen, sind vielfältig und haben jeweils eigenen Vor- und Nachteile. Während ein proximaler Rezeptor-Assay es ermöglicht, die Fähigkeit zur G-Protein-Kopplung oder früher nachgeschalteter Signale direkt zu testen, hat ein weiter distaler Ansatz den Vorteil, dass das bereits verstärkte Signal den Fehler durch Hintergrundsignale vermindert. Hierbei haben sich cAMP-Assays als vielseitig und gut geeignet erwiesen, insbesondere auch für pharmakologische Untersuchungen mit Agonisten und Antagonisten (Vasudevan, 2017). In einer Studie, die fünf verschiedene cAMP-Assays verglich, schnitt das AlphaScreen®-Verfahren (PerkinElmer) gut ab und zeigte Vorteile wie eine hohe Sensitivität und breite Dynamikbereiche gegenüber vergleichbaren Assays (Gabriel et al., 2003). In vielen Publikationen konnte der Assay erfolgreich eingesetzt werden und wies gute Ergebnisse auf (z.B. Bartho et al., 2012; Breit et al., 2004; Moll et al., 2006; Slominski et al., 2006). Es kann also von einer prinzipiellen und guten Eignung des AlphaScreen®-cAMP-Assays ausgegangen werden, der spezifisch dafür entwickelt wurde, direkt die cAMP-Menge messen zu können, die durch die Modulation der AC-Aktivität durch GPCRs beeinflusst wird (PerkinElmer AlphaScreen® cAMP User Manual). Da es sich bei dem hier untersuchten P2Y₁₂R um einen G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt, der dementsprechend auf die AC wirkt (s. 1.2.3), waren die Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz des Assays erfüllt.

4.1.2 Fehlerquellen

Der cAMP-Assay wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nach dem beschriebenen Protokoll (s. 2.2.2) in möglichst standardisierter Form durchgeführt. Das Protokoll war dabei ausgehend von dem vom Hersteller empfohlenen Vorgehen in vorhergehenden Projekten optimiert und überprüft worden (AG von Kügelgen). Trotzdem ergaben sich im Rahmen der praktischen Durchführung vereinzelt Probleme in der Standardisierung, die zu Fehlern führen könnten.

So war beispielsweise bei der Zugabe der Testsubstanzen zur 24-Well-Platte (s. 2.2.2.5) eine vollständige Randomisierung der Well-Anordnung nicht praktikabel, da die Substanzen manuell zugegeben wurden und ein korrektes Befüllen der Wells ansonsten deutlich erschwert und verlangsamt worden wäre. Um systemische Fehler möglichst zu vermeiden, wurde daher die Anordnung von „Blöcken“ mit denselben Versuchsbedingungen randomisiert, was nichtsdestotrotz zu einer nicht vorhersagbaren Verzerrung einzelner Ergebnisse geführt haben könnte. Aus dem gleichen Grund – der manuellen Zugabe – konnte die Zugabe nicht für jedes Well auf die Sekunde genau erfolgen. Da der anschließende Reaktionsstopp durch Entfernung der Flüssigkeit in den Wells zeitgleich erfolgte, hatten die zuerst befüllten Wells somit eine etwas verlängerte Inkubationszeit als die zuletzt befüllten. Diese Ungenauigkeit in den Inkubationszeiten sowie die teilweise problematische Randomisierung könnten durch einen maschinellen Versuchsaufbau gelöst werden, der im Rahmen dieser Arbeit nicht verfügbar war.

Weitere – schwer vermeidbare – Ungenauigkeiten könnten durch Abweichungen von Temperatur oder pH-Wert entstanden sein, die im Laufe der Durchführung trotz optimaler initialer Einstellung auftreten sein könnten, oder durch leicht unterschiedliche, wetterbedingte Beleuchtungsstärken trotz Abdunklung des Raums bei der Arbeit mit den lichtempfindlichen Donor-Beads (s. 2.2.2.3). Dies sollte jedoch bei vereinzelter Auftreten nicht zu systemischen Fehlern geführt haben.

4.1.3 Standardgerade

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die tatsächliche cAMP-Konzentration in den Wells aus dem gemessenen AlphaScreen-Signal mithilfe der cAMP-Standardgeraden errechnet (s. 2.2.3.2.1). Diese ist global gesehen eine sigmoidale Kurve; im gängigen Verfahren – und so auch hier – wird aber oft der Bereich um den Wendepunkt der Kurve als annähernd linear angesehen und mittels einfacher linearer Regression eine Standardgerade erstellt. Wie man in der dargestellten Beispielgeraden (s. Abb. 5) erkennen kann, lässt sich i.d.R. eine Gerade mit einem hohen R^2 -Wert erstellen, was auf eine tatsächliche annähernde Linearität in dem Bereich schließen lässt. Nichtsdestotrotz werden so besonders hohe gemessene Werte (also vornehmlich einzelne Werte bei der Kontrolle ohne Agonisten), die im nicht-linearen Bereich liegen, falsch-niedrigen cAMP-Konzentrationen zugeordnet. Die errechneten cAMP-Werte wurden aber nahezu immer durch die

Eichgerade abgedeckt, sodass insgesamt von einer guten Abbildung der tatsächlichen Werte durch die errechneten ausgegangen werden kann. Falls viele Werte außerhalb des „linearen“ Bereichs liegen, könnte dieses Problem gelöst werden, indem keine Standardgerade, sondern mittels 4-Parameter-logistischer Gleichung die sigmoidale Standardkurve errechnet wird.

4.1.4 Einwirkungen auf die Signaltransduktion

Im Zuge der Auswertung der Experimente wurde aus dem ursprünglich gemessenen Alpha-Screen-Signal die tatsächliche cAMP-Konzentration im Überstand in den Wells errechnet. Für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wäre die bestimmte tatsächliche cAMP-Konzentration jedoch als Vergleichswert nicht sinnvoll, da neben der Adenylatcyclase viele weitere Signalwege auf die cAMP-Konzentration einwirken (Omori und Kotera, 2007) und cAMP nicht nur intrazellulär vorkommen kann, die Zellen aber im Verlauf des Experiments lysiert und somit auch extrazelluläres cAMP in die Messung eingehen würde. Aus diesem Grund erfolgte eine Berechnung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration. Das im Versuch zugegebene Forskolin ist ein direkter Aktivator der AC (s. 1.2.4), was die signifikante cAMP-Erhöhung nach Forskolin-Zugabe erklärt (s. 3.2.1). Durch die Berechnung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration werden daher AC-unabhängige Einflüsse auf die cAMP-Konzentration weitgehend herausgerechnet. Da das G_i -Protein auch unter Forskolin-Stimulation als direkter Inhibitor der AC wirkt (Simonds, 1999), wird v.a. das Vorhandensein von aktivem G_i -Protein und damit – wie gewünscht – die $P2Y_{12}R$ -Aktivierung gemessen (s. 1.2.3). Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte aber stets bedacht werden, dass im Rahmen dieser Methode nur eine indirekte Messung der Rezeptoraktivität möglich ist. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass G_i -Proteine eine intrinsische, Rezeptor-unabhängige Aktivität in Bezug auf die AC besitzen (Melsom et al., 2014), was mit dem Assay nicht von einer Rezeptor-getriggerten Antwort unterschieden werden kann. Zudem können viele Faktoren wie kovalente Modifikationen, Homo- und Heterodimerisierung, Protein-Interaktionen, Phosphorylierung und Aktivierungen durch multiple Agonisten Einfluss auf die GPCR-Funktion nehmen (Thomsen et al., 2005).

Der Einsatz von Forskolin kann hierbei zudem als problematisch angesehen werden, da eine künstliche Manipulation des Signals zu Streuung und Fehlern führen kann (Hill et al.,

2010; Gilissen et al., 2015). Er ist jedoch notwendig, da die basale AC-Aktivität und cAMP-Level in der Zelle relativ niedrig sind (Houslay und Milligan, 1997) und eine zusätzliche Erniedrigung durch Gi-abhängige AC-Inhibierung zu großen Schwierigkeiten in der Messgenauigkeit führen würde.

4.2 Expression des humanen P2Y₁₂-Rezeptors

Das Ziel der durchgeführten Expressionsanalyse lag nicht in einer Quantifizierung der exprimierten Proteinmenge, sondern in einer Überprüfung einer generellen – und augenscheinlich ausreichend hohen – Expression des Rezeptors sowie seiner relativen Verteilung in der Zelle. In allen drei getesteten Zellreihen mit verschiedenen exprimierten Varianten des hP2Y₁₂Rs zeigte sich das Vorkommen des Rezeptors in der Zellmembran signifikant höher als im Cytosol (s. 3.1.1 – 3.1.3). Das war zu erwarten, da es sich bei dem Rezeptor um einen GPCR und daher einen membrangebundenen Rezeptor handelt (Lagerström und Schiöth, 2008) und bestätigt in allen drei Versuchsreihen das Vorhandensein des Rezeptors für die folgenden Versuche. Seine präferentielle Lage in der Membran ermöglicht die Interaktion mit extrazellulären Liganden, was notwendig für die hier durchgeführte pharmakologische Analyse war.

Die Ergebnisse suggerieren, dass 2-MeSADP das Vorkommen des hP2Y₁₂Rs in der Zellmembran im Verhältnis zum Cytosol in den CHO-ECFP-Zellen erhöht (s. 3.1.4). Baurand et al. konnten 2005 nachweisen, dass die hP2Y₁₂Rs in Thrombozyten nach Aktivierung sehr schnell internalisiert werden und wieder in die Zellmembran zurückkehren können, eine erhöhte Expression wurde jedoch nicht beschrieben. Sowohl in Mikroglia-Zellen als auch Thrombozyten konnte eine erhöhte membranäre P2Y₁₂R-Darstellung nach Stimulation mit starken Agonisten nachgewiesen werden (Moore et al., 2015; Haberstock-Debic et al., 2011), die das Vorhandensein eines induzierbaren P2Y₁₂R-Pools nahelegen. Hierbei handelte es sich jedoch um Agonisten anderer Zellrezeptoren und nicht um P2Y₁₂R-Agonisten. Die Daten aus dieser Arbeit legen nahe, dass es in den getesteten Zellen einen rein P2Y₁₂R-abhängigen Mechanismus zur Expressionserhöhung / verstärktem Einbau in die Membran gibt oder eine P2Y₁₂R-unabhängige 2-MeSADP-Antwort existiert. Dass die Erhöhung aber in den K280A-Zellen nicht mehr gezeigt werden konnte (s. 3.1.4) und die Mutation des Rezeptors den einzigen Unterschied im strukturellen Aufbau der Zellen bildet, favorisiert die erste Hypothese. Die Mutation scheint zudem dafür verantwortlich zu

sein, dass der positive Effekt von 2-MeSADP auf die Darstellung in der Membran vermindert oder sogar aufgehoben wird.

4.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Agonisten

Vergleicht man die vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven als Ausgangskurven ohne den Einfluss von Elinogrel erzeugt, die die reine agonistische Wirkung am Rezeptor zeigen so ergibt sich ein interessanter Einblick in die Wirkung der verschiedenen Agonisten sowie die Wirkung auf die verschiedenen Zelltypen.

4.3.1 Vergleich der Agonisten

Vergleicht man die Wirkung der beiden Agonisten 2-MeSADP und ADP anhand der erstellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven, so führen beide zu einer Hemmung der Adenylatcyclase (s. 3.2.5.1); es zeigt sich aber ein deutlicher Unterschied in ihrer Potenz. Die parallele Rechtsverschiebung der ADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve um ca. drei Logarithmusstufen der Agonistenkonzentration im Vergleich zur 2-MeSADP-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (s. Abb. 22) und der sich hieraus ergebende deutlich erhöhte EC_{50} -Wert von ADP am $P2Y_{12}R$ (vgl. 3.2.2.1.1 und 3.2.2.2.1) bestätigen die bekannte deutlich höhere Potenz von 2-MeSADP (Kügelgen, 2017). Während in Studien für ADP als endogener Agonist ein pEC_{50} -Wert von 6,0 (Foster et al. 2001; Hollopeter et al. 2001; Takasaki et al. 2001) ermittelt werden konnte, kann die Affinität des synthetischen Agonisten 2-MeSADP mit einem pEC_{50} -Wert von 9,0 (Takasaki et al. 2001, vgl. Tab. 3) als etwa 1000-fach stärker eingeschätzt werden. Dies bestätigt das hier ermittelte Verhältnis der EC_{50} -Werte von 21 pM (2-MeSADP, s. 3.2.2.1.1) zu 13 nM (ADP, s. 3.2.2.2.1), welches also ebenfalls ca. 1:1000 beträgt.

4.3.2 Vergleich der Rezeptorvarianten und Auswirkung der K280A-Mutation

Vergleicht man die Wirkung des 2-MeSADPs auf die unterschiedlichen analysierten Rezeptorvarianten, so ergibt sich bei allen ein messbarer hemmender Effekt auf die Aktivität der AC mit jedoch deutlich unterschiedlicher Ausprägung.

Die WT-Zellen sollten von allen Zelltypen das beste „Modell“ des Rezeptors darstellen, da der Rezeptor nicht modifiziert ist. Der hier ermittelte EC_{50} -Wert von 1,3 nM (s. 3.2.3.1) erscheint im Vergleich mit bereits vorhandenen Daten aus anderen Publikationen sinnvoll,

da 2-MeSADP bekannt ist als potenter Agonist mit einer halbmaximal wirksamen Konzentration im nanomolaren Bereich (Kügelgen, 2006). Bei den CHO-ECFP-Zellen zeigte sich die höchste Potenz des Agonisten am Rezeptor (s. 3.2.5.2); scheinbar führt die Kopplung mit ECFP zu einer gesteigerten Wirkung des 2-MeSADPs am Rezeptor.

Die CHO-ECFP-K280A zeigen einen – insbesondere im Vergleich zu den sich nur durch die Punktmutation im Rezeptor unterscheidenden CHO-ECFP-Zellen – deutlich verminderten Effekt von 2-MeSADP (s. 3.2.5.2). In einer Experimentreihe mit den gleichen CHO-Zellen, die stabil das K280A-Konstrukt exprimierten, und unter Verwendung eines anderen als des hier verwendeten cAMP-Assays, zeigte 2-MeSADP keinen signifikanten Effekt auf die Rezeptor-vermittelte Verminderung der cAMP-Produktion (Hoffmann et al., 2008b), was im Widerspruch zu den hier gezeigten Ergebnissen steht. Beachtet werden sollte jedoch, dass eine signifikante Senkung der Forskolin-induzierten Steigerung der cAMP-Konzentration hier erst ab einer 2-MeSADP-Konzentration von 10^{-5} M auftrat, während in der genannten Studie nur Konzentrationen bis 10^{-6} M verwendet wurden. Andererseits gestaltete sich das Experimentieren mit den K280A-Zellen, wie bereits erwähnt, äußerst schwierig (s. 3.2.4), sodass für eine sinnvolle Auswertung ein Grenzwert angepasst werden musste (s. 2.2.3.2.4) und die Ergebnisse daher kritisch betrachtet werden sollten. Eine Evaluation der Auswirkungen der Mutation auf die Rezeptoraktivität mit höheren 2-MeSADP-Konzentrationen von mindestens 10^{-5} M scheint jedoch lohnenswert zu sein. Im Einklang stehen die Ergebnisse aber auf jeden Fall in der Hinsicht, als dass die K280A-Mutation die 2-MeSADP-vermittelte Rezeptorwirkung auf die cAMP-Konzentration sehr deutlich einschränkt.

Die Aminosäure Lysin 280 befindet sich im oberen Drittel der Transmembrandomäne 7 des Rezeptors (Kügelgen, 2006). Wie durch die Analyse der Kristallstruktur gezeigt werden konnte, führt die Bindung von 2-MeSADP an den Rezeptor zur Stabilisierung einer einwärts gerichteten Position der Transmembran-Helices 6 und 7, was essentiell für die Deckelformation der Bindungstasche ist (Zhang et al., 2014). Es ist daher gut vorstellbar, dass K280 essentiell für eine vollständige Bindung des Agonisten ist – und damit die Aktivierung des Rezeptors, was die hier gezeigte deutlich verminderte Wirkung des Agonisten an der K280A-mutierten Variante des Rezeptors erklären würde.

4.4 Wirkung von Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor

4.4.1 Antagonismus

In den Versuchen am nicht-mutierten Rezeptor (CHO-ECFP-Zellen und CHO-WT-Zellen) führte der Einsatz von Elinogrel in den meisten Fällen zu einer parallelen Rechtsverschiebung der weiter oben diskutierten jeweiligen Ausgangskurve (s. 4.3.1). Die Ausnahme bildet der Versuch an den CHO-ECFP-Zellen mit 2-MeSADP und 1 nM Elinogrel. Anscheinend ist diese Konzentration zu gering, um einen signifikanten Effekt auf den EC₅₀-Wert der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu haben. Bei allen höheren eingesetzten Elinogrel-Konzentrationen wurde die parallele Rechtsverschiebung mit zunehmender Konzentration immer stärker. Dies lässt auf einen rein kompetitiven Mechanismus von Elinogrel schließen, da der Effekt von höheren Antagonisten-Konzentrationen durch entsprechend höhere Agonisten-Konzentrationen aufgefangen werden kann. Dass der Antagonismus „übersteigbar“ ist, wird unterstützt durch die Tatsache, dass es bei allen eingesetzten Elinogrel-Konzentrationen mit einer entsprechend hohen Agonisten-Konzentration zu einer signifikanten Erniedrigung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration kam. Dies galt sowohl für 2-MeSADP als auch für ADP und zeigte sich sowohl an der ECFP-gekoppelten als auch der WT-Variante des Rezeptors (s. 3.2.5.1 und 3.2.5.2).

Ein Unterschied zeigte sich jedoch in den Auswirkungen auf den Maximaleffekt des Agonisten. Während dieser bei den WT-Zellen durch das Hinzufügen von Elinogrel in verschiedenen Konzentrationen auf annähernd gleichem Level blieb, zeigte sich bei den CHO-ECFP-Zellen sowohl für die Versuche mit 2-MeSADP als auch mit ADP eine Abweichung. Der jeweils ursprüngliche Maximaleffekt der Senkung des Forskolin-induzierten Anstiegs der cAMP-Konzentration um ca. 85 – 87 % in den beiden Ausgangskurven wird nach Elinogrel-Vorinkubation und mit zunehmender Elinogrel-Konzentration verstärkt auf jeweils annähernd 100 % (s. 3.2.2). Mögliche Erklärungen hierfür lägen beispielsweise in einem Einfluss von Elinogrel auf die Struktur des Rezeptors oder einer zusätzlichen allosterischen und verstärkenden Wirkung von Elinogrel. Diese träten jedoch scheinbar nur bei Kopplung des Rezeptors an ECFP auf. Auch eine mögliche Hemmung von Nukleotidasen durch Elinogrel und somit längere Wirkung der Agonisten kann in Betracht gezogen wer-

den, allerdings sollte der Effekt theoretisch dann auch bei den WT-Zellen auftreten. Da dies hier nicht der Fall war, sollten die ersten zwei Hypothesen bevorzugt werden.

4.4.2 Bindungsmechanismus von Elinogrel

Der für Elinogrel bekannte Mechanismus ist laut verschiedenen Veröffentlichungen kompetitiv (z.B. Angiolillo et al., 2012; Leonardi et al., 2010; Ueno et al., 2010), es stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus, diese Aussage zu einer originalen Studie zurückzuverfolgen. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung des antagonistischen Verhaltens von Elinogrel und seiner Affinität anhand von Schildplot-Analysen. Verschiedene Punkte unterstützen hierbei die These des kompetitiven Bindungsmechanismus. Zunächst zeigte Elinogrel eindeutig einen übersteigbaren Antagonismus bei den CHO-ECFP- und auch den CHO-WT-Zellen (s. 4.4.1). Sowohl bei den Experimenten mit ADP als auch denen mit 2-MeSADP ergaben sich in den Schildplot-Analysen Geraden, deren Steigungen nicht signifikant unterschiedlich zu 1 waren, was auf einen linear konzentrationsabhängigen und damit kompetitiven Antagonismus hinweist. Zudem lagen sämtliche ermittelten scheinbaren pK_B -Werte aus allen Experimenten an den nicht-mutierten Zellen mit Werten zwischen 8,6 und 8,9 (s. 3.2.2.1.1, 3.2.2.2.1 und 3.2.3.1) in einem sehr ähnlichen Bereich. Die Werte sind dabei „scheinbar“, da sie jeweils nur anhand einer einzelnen Antagonisten-Konzentration ermittelt wurden. Für die genannten Konstellationen konnte dann aber jeweils eine Unabhängigkeit der ermittelten pK_B -Werte von der Elinogrel-Konzentration gezeigt werden (s. 3.2.2.1.1, 3.2.2.2.1 und 3.2.3.1) was ebenfalls für einen kompetitiven Mechanismus spricht. Dementsprechend scheint Elinogrel am hP2Y₁₂R in der Tat als kompetitiver Antagonist zu wirken.

4.4.3 Affinität von Elinogrel

Der endgültige in dieser Arbeit anhand einer gemeinsamen Geradengleichung aus verschiedenen Schildplotgeraden bestimmte pA_2 -Wert von Elinogrel am humanen P2Y₁₂-Rezeptor liegt bei 8,74 (s. 3.2.6). Der 1947 durch Schild eingeführte pA_2 -Wert ist dabei definiert als der negative dekadische Logarithmus der molaren Dosis eines Antagonisten, die den Effekt einer Agonistenkonzentration zu dem der halben Dosis reduziert (Schild, 1947). Damit ist er ein Maß für die Affinität eines Antagonisten zu seinem Rezeptor und somit seiner antagonistischen Potenz. Bei einem rein kompetitiven Antagonisten entspricht er

dessen pK_B -Wert und hat dieselbe Relevanz wie die Dissoziationskonstante der Antagonist-Rezeptor-Interaktion für die Klassifizierung von Wirkstoffen und Rezeptoren (Tallarida et al., 1979).

Die zwei im Rahmen dieser Arbeit zuerst erzeugten Schildplot-Geraden zeigen die pA_2 -Werte als Maß der Affinität von Elinogrel am $hP2Y_{12}R$ -ECFP-Konstrukt anhand von Versuchen mit 2-MeSADP und ADP. Da der pA_2 -Wert unabhängig vom eingesetzten Agonisten ist (Arunlakshana und Schild, 1959), sollten diese Geraden annähernd identisch sein. Tatsächlich unterscheiden sich sowohl Steigung als auch Achsenabschnitte nicht signifikant voneinander, was für eine gute Qualität der Ergebnisse spricht. Die Schildplot-Gerade aus den Experimenten am $hP2Y_{12}$ -WT-Rezeptor wurde zwar ebenfalls am $hP2Y_{12}R$ erzeugt, da sich die Rezeptoren aber durch die ECFP-Kopplung unterscheiden, handelt es sich streng genommen nicht um denselben Rezeptor (man beachte auch den unterschiedlichen maximalen Effekt von 2-MeSADP, s. 3.2.3.1). Da sich die erzeugte Gerade aber ebenfalls in Steigung und Achsenabschnitten nicht signifikant von den beiden anderen Schildplot-Geraden unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Affinität von Elinogrel für die beiden Rezeptorvarianten nicht unterscheidet, sodass die Errechnung einer gemeinsamen Geradengleichung aus den drei Geraden gerechtfertigt ist (s. Abb. 23) und hieraus letztlich die Bestimmung des gemeinsamen pA_2 -Wertes erfolgen konnte.

4.4.4 Einordnung des pA_2 -Werts

Vergleicht man Liganden des $hP2Y_{12}R$ in ihrer Affinität, so zeigen sich – natürlicherweise – große Unterschiede. Einige ausgewählte Liganden mit ihrer Affinität sind in Tab. 3 dargestellt. Dabei reichen die pK_B -Werte der hier genannten Antagonisten von 6,9 beim aktiven Metaboliten von Clopidogrel bis 9,8 bei PSB-0739, was, da es sich um eine logarithmische Darstellung der Affinitätskonstanten K_B handelt, einen enormen Unterschied in ihrer Rezeptoraffinität bedeutet. Man beachte jedoch die irreversible – und damit in vivo deutlich stärkere – Wirkung von Clopidogrel. Mit dem experimentell bestimmten Wert von 8,74 (s. 3.2.6) gehört Elinogrel zu den potenteren Antagonisten, was sich auch in klinischen Studien erkennen ließ (s. 1.3). Besonders interessant ist hierbei auch der Vergleich mit den aktuell klinisch eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmern.

Tab. 3: Ausgewählte Liganden mit Wirkung am humanen P2Y₁₂-Rezeptor. Modifiziert nach Kügelgen, 2024. ADP: Adenosindiphosphat; AR-C67085: 2-Propylthio- β , γ -difluoromethylen-D-adenosintriphosphat; [³H]PSB0413: [³H]2-Propylthioadenosin-monophosphat(1,1-dichloro-1-phosphonomethyl-1-phosphonyl)anhydrid; PSB-0739: 1-Amino-9,10-dihydro-9,10-dioxo-4-[[4-(phenylamino)-3-sulfophenyl]amino]-2-anthracensulfonsäure.

		pEC ₅₀ /pK _B	Ausgewählte Referenzen
Physiologischer Agonist	ADP	6,0	Foster et al., 2001; Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001
Synthetischer Agonist	2-Methylthio-ADP	9,0	Takasaki et al., 2001
Antagonist	Cangrelor	9,4	Ingall et al., 1999
	AR-C67085	8,2	Ingall et al., 1999
Selektiver Antagonist	Ticagrelor	8,6	Hoffmann et al., 2014; Springthorpe et al., 2007
	Selatogrel	7,4	Baldoni et al., 2014
	PSB-0739	9,8	Baqi et al., 2009; Hoffmann et al., 2009
Irreversibler Antagonist	Clopidogrel (aktiver Metabolit)	6,9	Herbert und Savi, 2003
Radioligand	[³ H]2-Methylthio-ADP	9,0	Takasaki et al., 2001
	[³ H]PSB0413	8,3	El-Tayeb et al., 2005; Ohlmann et al., 2013

Der pK_B-Wert von Elinogrel liegt dabei deutlich höher als der pEC₅₀-Wert des bereits genannten irreversibel wirkenden Clopidogrels (6,9; s. Tab. 3) und lediglich ein wenig höher

als der pK_B -Wert von Ticagrelor (8,6; s. Tab. 3), welches – ebenso wie Elinogrel – reversibel wirkt. Trotz einer sehr unterschiedlichen Struktur scheint sowohl ihre Affinität als auch Wirkungsweise sehr ähnlich zu sein, was auf einer ähnlichen Bindungsart beruhen könnte. Der aktive Metabolit R-138727 von Prasugrel wies in Studien mit 2-MeSADP eine halbmaximale Konzentration von etwa 1 μM auf (Algaier et al., 2008) und scheint somit eine geringere Affinität zum Rezeptor zu besitzen als Elinogrel.

Das ebenfalls klinisch eingesetzte Cangrelor wirkt wie Ticagrelor und Elinogrel reversibel, weist aber einen pK_B -Wert von 9,4 auf und ist damit der potenteste klinisch verwendete $P2Y_{12}$ R-Antagonist. Die erhöhte Blutungsrate unter Elinogrel, die zum Abbruch seiner Entwicklung geführt hat (s. 1.3), lässt sich rein anhand des ermittelten pK_B -Wertes daher hier nicht erklären. Zwar wurde die betreffende Studie im Vergleich zu Clopidogrel durchgeführt, was, wie bereits genannt, ein deutlich weniger potenter Antagonist ist und daher vermuten lassen könnte, dass potentere Antagonisten per se zu einer stärkeren Thrombozytenaggregationshemmung und damit Blutungsneigung führen, doch relativiert der im Vergleich zu Cangrelor niedrige pK_B -Wert diese These wieder, da unter Cangrelor-Behandlung in Phase III-Studien im Vergleich zu Clopidogrel keine verstärkten Blutungsergebnisse zu beobachten waren (Walsh und Price, 2014).

4.4.5 Einfluss der K280A-Mutation

Im Rahmen der Experimente an den K280A-mutierten Zellen ergab sich ein scheinbarer pK_B -Wert von 8,2 (s. 3.2.4), der somit deutlich niedriger war als alle bestimmten scheinbaren pK_B -Werte der nicht-mutierten Zellen (8,6 – 8,9, s. 3.3.2.2.1, 3.2.2.2.1 und 3.2.3.1). Wenn es sich um einen tatsächlichen pK_B -Wert handeln würde, würde dies implizieren, dass die Affinität von Elinogrel zum Rezeptor durch die Mutation gemindert wird und somit könnte man vermuten, dass K280 an der Bindung von Elinogrel direkt oder indirekt beteiligt ist. Da sich die Experimente an den K280A-mutierten Zellen jedoch schwierig gestalteten (s. 3.2.4), konnte dies hier nicht weiterverfolgt werden. Andere Studien liefern ebenfalls Hinweise darauf, dass Lysin280 eine wichtige Rolle bei der Liganden-Erkennung des humanen $P2Y_{12}$ -Rezeptors spielt (Hoffmann et al., 2008a; s. 4.3.2). Es scheint daher lohnenswert, die Bedeutung der Aminosäure K280 des Rezeptors weiter zu untersuchen.

4.4.6 Wissenschaftliche Bedeutung - Überblick

Da die ischämischen Herzerkrankungen vor allem in westlichen Ländern das größte Gesundheitsproblem darstellen, liegt in ihrer Therapie und Prävention eins der zentralen medizinischen Interessensgebiete unserer Zeit. Die besondere Bedeutung des P2Y₁₂-Rezeptors als pharmakologisches Ziel für viele der klinisch eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer wurde hier bereits mehrfach hervorgehoben (s. z.B. 1.2.1). Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Eigenschaften des ursprünglich vielversprechenden Wirkstoff-Kandidaten Elinogrel – sein kompetitiver Wirkmechanismus und seine starke Affinität zum Rezeptor mit einem pA₂-Wert von 8,74, sowie einer wahrscheinlichen Beteiligung der Aminosäure K280 bei der Bindung des Agonisten 2-MeSADP und einer möglichen bei der Bindung von Elinogrel – unterstützen und erweitern die bereits vorhandenen Kenntnisse über den Rezeptor. Durch Rückschlüsse auf Affinitäten und Bindungsstellen können tiefere Einblicke in die genauen Bindungs- und Wirkungsmechanismen des Rezeptors gewonnen werden. Dies hilft, die molekularen Prozesse besser zu verstehen, wodurch letztlich ein Beitrag zur Entwicklung neuer Wirkstoffe geleistet wird.

5. Zusammenfassung

Der humane P2Y₁₂-Rezeptor (hP2Y₁₂R) spielt eine Schlüsselrolle in der Thrombozytenaggregation und ist eine der wichtigsten pharmakologischen Zielstrukturen für Aggregationshemmer, die klinisch im Rahmen der Prävention und Therapie von thrombotischen Erkrankungen eingesetzt werden. Es handelt sich um einen G_i-Protein-gekoppelten Rezeptor, der bei Aktivierung zu einer Senkung der intrazellulären Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt, was über verschiedene Signalwege zur Hemmung der für die Aggregation notwendige Sekretion und Adhäsion von Thrombozyten führt. Zu seinen Liganden gehört Elinogrel, ein direkter, reversibler P2Y₁₂-Antagonist, dessen Entwicklung als Pharmakon nach klinischen Phase-II Studien wegen unerwünschter Blutungsereignisse beendet wurde.

In dieser Arbeit sollten nähere Untersuchungen zur Bindung und der Affinität von Elinogrel am hP2Y₁₂R durchgeführt werden. Die Versuche erfolgten an ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die entweder ein Fusionsprotein aus dem hP2Y₁₂R und dem verstärkt cyan fluoreszierenden Protein (ECFP), die Wildtyp-Variante des hP2Y₁₂Rs oder eine K280A-mutierte Variante als Fusionsprotein mit ECFP exprimierten. Nach einer initialen Expressionsanalyse konnte der Forskolin-induzierte Anstieg der cAMP-Konzentration mithilfe des AlphaScreen®-cAMP-Assays (PerkinElmer) bestimmt und hieraus Konzentrations-Wirkungs-Kurven verschiedener Agonisten erstellt werden – ohne oder unter Einfluss von Elinogrel. Anhand dieser Daten konnten dann Schildplot-Analysen erfolgen.

Die Expressionsanalyse ergab ein vornehmliches Vorkommen des Rezeptors in der Zellmembran, das am hP2Y₁₂R-ECFP-Konstrukt durch 2-Methylthioadenosindiphosphat (2-MeSADP) gesteigert werden konnte. In den Versuchen zeigte sich 2-MeSADP deutlich potenter als der endogene Agonist ADP und es konnte eine wahrscheinliche Beteiligung der Aminosäure K280 bei der Bindung von 2-MeSADP nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen auf einen rein kompetitiven Wirkmechanismus von Elinogrel hin und zeigen seine starke Affinität zum Rezeptor mit einem pA₂-Wert von 8,74 am nicht-mutierten Rezeptor. Diese Ergebnisse helfen dabei, tiefere Einblicke in die genauen Bindungs- und Wirkungsmechanismen zu gewinnen und tragen so zu einem besseren Verständnis der molekularen Prozesse dieses klinisch so relevanten Rezeptors bei.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht der Signaltransduktion des P2Y ₁₂ -Rezeptors	12
Abbildung 2:	Strukturformel von Elinogrel	14
Abbildung 3:	Versuchsaufbau der Expressionsanalyse	20
Abbildung 4:	Prinzip des AlphaScreen®-cAMP-Assays	21
Abbildung 5:	Beispiel einer erstellten cAMP-Standardgeraden	27
Abbildung 6:	Verteilung des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors in Zelle und Membran	32
Abbildung 7:	Antikörper-Färbung des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors	33
Abbildung 8:	Verteilung des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors in Zellmembran und Cytosol	34
Abbildung 9:	Verhältnis der Verteilung des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors in Zellmembran und Cytosol	35
Abbildung 10:	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (1 nM)	38
Abbildung 11:	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM, 30 nM)	39
Abbildung 12:	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (100 nM, 300 nM)	40

Abbildung 13: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) mit 2-Methylthioadenosindiphosphat	42
Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Adenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM)	44
Abbildung 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Adenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (30 nM, 100 nM)	45
Abbildung 16: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (als Fluoreszenz-markiertes Fusionsprotein) mit Adenosindiphosphat	46
Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (1 nM)	48
Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (3 nM, 5,62 nM)	49
Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (Wildtyp-Variante) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM, 30 nM)	50
Abbildung 20: Schildplot-Analyse des Antagonisten Elinogrel am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor (Wildtyp-Variante) mit 2-Methylthioadenosindiphosphat	51

- Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 2-Methylthioadenosindiphosphat am mutierten humanen P2Y₁₂-Rezeptor (K280A-Mutation im Fluoreszenz-markierten Fusionsprotein) und ihre Beeinflussung durch Elinogrel (10 nM) 53
- Abbildung 22: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von verschiedenen Agonisten und an verschiedenen Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors 55
- Abbildung 23: Gemeinsame Schildplot-Gerade des Antagonisten Elinogrel an verschiedenen Varianten des humanen P2Y₁₂-Rezeptors 57

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe des Lysepuffers	22
Tabelle 2: Übersicht der zur 24-Well-Platte zugegebenen Substanzen	24
Tabelle 3: Ausgewählte Liganden mit Wirkung am humanen P2Y ₁₂ -Rezeptor	67
Tabelle 4: Überblick über alle im Verlauf der Experimente für die Reaktion auf den 24-Well-Platten verwendeten Agonisten, Antagonisten und Lösungen sowie ihrer Konzentrationen	94

8. Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems J-M, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, KNIGHT GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. 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

Algaier I, Jakubowski JA, Asai F, Kügelgen I von. Interaction of the active metabolite of prasugrel, R-138727, with cysteine 97 and cysteine 175 of the human P2Y₁₂ receptor. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1908–1914

Amadio S, Parisi C, Montilli C, Carrubba AS, Apolloni S, Volonté C. P2Y₁₂ receptor on the verge of a neuroinflammatory breakdown. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 975849

Andre P, Delaney SM, LaRocca T, Vincent D, DeGuzman F, Jurek M, Koller B, Phillips DR, Conley PB. P2Y₁₂ regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries. *J Clin Invest* 2003; 112: 398–406

Angiolillo DJ, Welsh RC, Trenk D, Neumann F-J, Conley PB, McClure MW, Stephens G, Kochman J, Jennings LK, Gurbel PA, Wójcik J, Dabrowski M, Saucedo JF, Stumpf J, Buerke M, Broderick S, Harrington RA, Rao SV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of elinogrel: results of the platelet function substudy from the intravenous and oral administration of elinogrel to evaluate tolerability and efficacy in nonurgent percutaneous coronary intervention patients (INNOVATE-PCI) trial. *Circ Cardiovasc Interv* 2012; 5: 347–356

Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol Chemother* 1959; 14: 48–58

Baldoni D, Bruderer S, Krause A, Gutierrez M, Gueret P, Astruc B, Dingemanse J. A new reversible and potent P2Y₁₂ receptor antagonist (ACT-246475): tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in a first-in-man trial. *Clin Drug Investig* 2014; 34: 807–818

Baqi Y, Atzler K, Köse M, Glänzel M, Müller CE. High-affinity, non-nucleotide-derived competitive antagonists of platelet P2Y₁₂ receptors. *J Med Chem* 2009; 52: 3784–3793

Bartho JD, Ly K, Hay DL. Measurement of cAMP in an undergraduate teaching laboratory, using ALPHAscreen technology. *Sci Signal* 2012; 5: tr1

Baurand A, Eckly A, Hechler B, Kauffenstein G, Galzi J-L, Cazenave J-P, Léon C, Gachet C. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol Pharmacol* 2005; 67: 721–733

Beavers CJ, Effoe SA, Dobesh PP. Selatogrel: A Novel Subcutaneous P2Y₁₂ Inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 2022; 79: 161–167

Ben Addi A, Cammarata D, Conley PB, Boeynaems J-M, Robaye B. Role of the P2Y₁₂ receptor in the modulation of murine dendritic cell function by ADP. *J Immunol* 2010; 185: 5900–5906

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr. GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum 2018

Bodor ET, Waldo GL, Hooks SB, Corbitt J, Boyer JL, Harden TK. Purification and functional reconstitution of the human P2Y₁₂ receptor. *Mol Pharmacol* 2003; 64: 1210–1216

Breit A, Lagacé M, Bouvier M. Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties. *J Biol Chem* 2004; 279: 28756–28765

Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? *Gen Pharmacol* 1985; 16: 433–440

Cattaneo M. The platelet P2Y₁₂ receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* 2011; 117: 2102–2112

Chang H, Yanachkov IB, Dix EJ, Li YF, Barnard MR, Wright GE, Michelson AD, Frelinger AL. Modified diadenosine tetraphosphates with dual specificity for P2Y₁ and P2Y₁₂ are

potent antagonists of ADP-induced platelet activation. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 2573–2580

Collet J-P, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, Dendale P, Dorobantu M, Edvardsen T, Folliguet T, Gale CP, Gilard M, Jobs A, Jüni P, Lambrinou E, Lewis BS, Mehilli J, Meliga E, Merkely B, Mueller C, Roffi M, Rutten FH, Sibbing D, Siontis GCM. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2021; 42: 1289–1367

El-Tayeb A, Griessmeier KJ, Müller CE. Synthesis and preliminary evaluation of 3HPSB-0413, a selective antagonist radioligand for platelet P2Y₁₂ receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 5450–5452

Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ, Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001; 107: 1591–1598

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: 1256–1272

Gabriel D, Vernier M, Pfeifer MJ, Dasen B, Tenaillon L, Bouhelal R. High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement. *Assay Drug Dev Technol* 2003; 1: 291–303

Garcia A, Kim S, Bhavaraju K, Schoenwaelder SM, Kunapuli SP. Role of phosphoinositide 3-kinase beta in platelet aggregation and thromboxane A₂ generation mediated by G_i signalling pathways. *Biochem J* 2010; 429: 369–377

Gilissen J, Geubelle P, Dupuis N, Laschet C, Pirotte B, Hanson J. Forskolin-free cAMP assay for G_i-coupled receptors. *Biochem Pharmacol* 2015; 98: 381–391

Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42: 191–204

Gresele P, Malvestiti M, Momi S. Anti-platelet treatments in cancer: Basic and clinical research. *Thromb Res* 2018; 164 Suppl 1: S106-S111

Haberstock-Debic H, Andre P, Mills S, Phillips DR, Conley PB. A clopidogrel-insensitive inducible pool of P2Y₁₂ receptors contributes to thrombus formation: inhibition by elinogrel, a direct-acting, reversible P2Y₁₂ antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 339: 54–61

Hannachi N, Ogé-Ganaye E, Baudoin J-P, Fontanini A, Bernot D, Habib G, Camoin-Jau L. Antiplatelet Agents Have a Distinct Efficacy on Platelet Aggregation Induced by Infectious Bacteria. *Front Pharmacol* 2020; 11: 863

Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 145–174

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: 415–429

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan W-B, Julius D. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1512–1519

Hechler B, Léon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; 92: 152–159

Herbert J-M, Savi P. P2Y₁₂, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Semin Vasc Med* 2003; 3: 113–122

Hill SJ, Williams C, May LT. Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 1266–1275

Hoffmann K, Baqi Y, Morena MS, Glänzel M, Müller CE, Kügelgen I von. Interaction of new, very potent non-nucleotide antagonists with Arg256 of the human platelet P2Y₁₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 648–655

Hoffmann K, Lutz DA, Straßburger J, Baqi Y, Müller CE, Kügelgen I von. Competitive mode and site of interaction of ticagrelor at the human platelet P2Y₁₂ -receptor. *J Thromb Haemost* 2014; 12: 1898–1905

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

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202–207

Horváth G, Göllöncsér F, Csölle C, Király K, Andó RD, Baranyi M, Koványi B, Máté Z, Hoffmann K, Algaier I, Baqi Y, Müller CE, Kügelgen I von, Sperlág B. Central P2Y₁₂ receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol Dis* 2014; 70: 162–178

Houslay MD, Milligan G. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 217–224

Ingall AH, Dixon J, Bailey A, Coombs ME, Cox D, McInally JI, Hunt SF, Kindon ND, Teobald BJ, Willis PA, Humphries RG, Leff P, Clegg JA, Smith JA, Tomlinson W. Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem* 1999; 42: 213–220

Ito Y, Ohno K, Morikawa Y, Tomizawa A, Mizuno M, Sugidachi A. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is not a major mediator of platelet aggregation, thrombogenesis, haemostasis, and antiplatelet effect of prasugrel in rats. *Sci Rep* 2018; 8: 9955

Kauffmanstein G, Hechler B, Cazenave J-P, Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1980–1988

Kenakin T. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1997

Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, Robaye B, Conley PB, Kim H-C, Sargin S, Schön P, Schwab A, Hanley PJ. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal* 2010; 3: ra55

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

Kügelgen I von. Structure, Pharmacology and Roles in Physiology of the P2Y₁₂ Receptor. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1051: 123–138

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

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

Kügelgen I von. Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes - an update. *Purinergic Signal* 2024

Kügelgen I von, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362: 310–323

Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 339–357

Leonardi S, Rao SV, Harrington RA, Bhatt DL, Gibson CM, Roe MT, Kochman J, Huber K, Zeymer U, Madan M, Gretler DD, McClure MW, Paynter GE, Thompson V, Welsh RC. Rationale and design of the randomized, double-blind trial testing INtraveNous and Oral administration of elinogrel, a selective and reversible P2Y₁₂-receptor inhibitor, versus clopidogrel to eVALuate Tolerability and Efficacy in nonurgent Percutaneous Coronary Interventions patients (INNOVATE-PCI). *Am Heart J* 2010; 160: 65–72

Li X, Zhang G, Cao X. The Function and Regulation of Platelet P2Y₁₂ Receptor. *Cardiovasc Drugs Ther* 2023; 37: 199–216

Łukasik ZM, Makowski M, Makowska JS. From blood coagulation to innate and adaptive immunity: the role of platelets in the physiology and pathology of autoimmune disorders. *Rheumatol Int* 2018; 38: 959–974

Mansour A, Bachelot-Loza C, Nessler N, Gaussem P, Gouin-Thibault I. P2Y₁₂ Inhibition beyond Thrombosis: Effects on Inflammation. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1391

Melsom CB, Ørstavik Ø, Osnes J-B, Skomedal T, Levy FO, Krobert KA. Gi proteins regulate adenylyl cyclase activity independent of receptor activation. *PLoS One* 2014; 9: e106608

Michelson AD. New P2Y₁₂ antagonists. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 371–377

Moll D, Prinz A, Gesellchen F, Drewianka S, Zimmermann B, Herberg FW. Biomolecular interaction analysis in functional proteomics. *J Neural Transm (Vienna)* 2006; 113: 1015–1032

Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VTS, Michell-Robinson M, Leong SY, Butovsky O, Ludwin SK, Séguéla P, Bar-Or A, Antel JP. P2Y₁₂ expression and function in alternatively activated human microglia. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015; 2: e80

Müller CE, Baqi Y, Namasivayam V. Agonists and Antagonists for Purinergic Receptors. Springer New York 2020; 2041: 45–65

Muniz VS, Baptista-Dos-Reis R, Benjamim CF, Mata-Santos HA, Pyrrho AS, Strauch MA, Melo PA, Vicentino ARR, Silva-Paiva J, Bandeira-Melo C, Weller PF, Figueiredo RT, Neves JS. Purinergic P2Y₁₂ Receptor Activation in Eosinophils and the Schistosomal Host Response. *PLoS One* 2015; 10: e0139805

Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality From Ischemic Heart Disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2019; 12: e005375

Oestreich JH. Elinogrel, a reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the treatment of acute coronary syndrome and prevention of secondary thrombotic events. *Curr Opin Investig Drugs* 2010; 11: 340–348

Ohlmann P, Lecchi A, El-Tayeb A, Müller CE, Cattaneo M, Gachet C. The platelet P2Y₁₂ receptor under normal and pathological conditions. Assessment with the radiolabeled selective antagonist (3)HPSB-0413. *Purinergic Signal* 2013; 9: 59–66

Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* 2007; 100: 309–327

Panak E, Maffrand JP, Picard-Fraire C, Vallée E, Blanchard J, Roncucci R. Ticlopidine: a promise for the prevention and treatment of thrombosis and its complications. *Haemostasis* 1983; 13 Suppl 1: 1–54

Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart, New York: Thieme, 2023

Pons V, Garcia C, Tidten-Luksch N, Mac Sweeney A, Caroff E, Galés C, Riederer MA. Inverse agonist efficacy of selatogrel blunts constitutive P2Y₁₂ receptor signaling by inducing the inactive receptor conformation. *Biochem pharmacol* 2022; 206: 115291

Robison GA, Butcher RW, Sutherland EW. Cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 1968; 37: 149–174

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen*. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Berlin: Springer, 2017

Serebruany VL, Sibbing D, DiNicolantonio JJ. Dyspnea and reversibility of antiplatelet agents: ticagrelor, elinogrel, cangrelor, and beyond. *Cardiology* 2014; 127: 20–24

Simonds WF. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 66–73

Slominski A, ZBYTEK B, PISARCHIK A, Slominski RM, ZMIJEWSKI MA, WORTSMAN J. CRH functions as a growth factor/cytokine in the skin. *J Cell Physiol* 2006; 206: 780–791

Soulet C, Sauzeau V, Plantavid M, Herbert JM, Pacaud P, Payrastre B, Savi P. Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y₁₂ ADP-receptor. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 135–146

Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Alzheimer C. *Physiologie*. München: Elsevier, 2019

Springthorpe B, Bailey A, Barton P, Birkinshaw TN, Bonnert RV, Brown RC, Chapman D, Dixon J, Guile SD, Humphries RG, Hunt SF, Ince F, Ingall AH, Kirk IP, Leeson PD, Leff P, Lewis RJ, Martin BP, McGinnity DF, Mortimore MP, Paine SW, Pairaudeau G, Patel A, Rigby AJ, Riley RJ, Teobald BJ, Tomlinson W, Webborn PJH, Willis PA. From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 6013–6018

Stefanini L, Bergmeier W. RAP1-GTPase signaling and platelet function. *J Mol Med (Berl)* 2016; 94: 13–19

Su X, Floyd DH, Hughes A, Xiang J, Schneider JG, Uluckan O, Heller E, Deng H, Zou W, Craft CS, Wu K, Hirbe AC, Grabowska D, Eagleton MC, Townsley S, Collins L, Piwnicka-Worms D, Steinberg TH, Novack DV, Conley PB, Hurchla MA, Rogers M, Weilbaecher KN. The ADP receptor P2RY₁₂ regulates osteoclast function and pathologic bone remodeling. *J Clin Invest* 2012; 122: 3579–3592

Syberg S, Brandao-Burch A, Patel JJ, Hajjawi M, Arnett TR, Schwarz P, Jorgensen NR, Orriss IR. Clopidogrel (Plavix), a P2Y₁₂ receptor antagonist, inhibits bone cell function in vitro and decreases trabecular bone in vivo. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2373–2386

Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Matsumoto M, Matsumoto S, Ohishi T, Soga T, Matsushime H, Furuichi K. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 432–439

Tallarida RJ, Cowan A, Adler MW. pA₂ and receptor differentiation: a statistical analysis of competitive antagonism. *Life Sci* 1979; 25: 637–654

Thomsen W, Frazer J, Unett D. Functional assays for screening GPCR targets. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16: 655–665

Ueno M, Rao SV, Angiolillo DJ. Elinogrel: pharmacological principles, preclinical and early phase clinical testing. *Future cardiol* 2010; 6: 445–453

Vasudevan NT. cAMP assays in GPCR drug discovery. *Methods Cell Biol* 2017; 142: 51–57

Walsh JA, Price MJ. Cangrelor for treatment of arterial thrombosis. *Expert Opin Pharmacother* 2014; 15: 565–572

Welsh RC, Rao SV, Zeymer U, Thompson VP, Huber K, Kochman J, McClure MW, Gretler DD, Bhatt DL, Gibson CM, Angiolillo DJ, Gurbel PA, Berdan LG, Paynter G, Leonardi S, Madan M, French WJ, Harrington RA. A randomized, double-blind, active-controlled phase 2 trial to evaluate a novel selective and reversible intravenous and oral P2Y₁₂ inhibitor elinogrel versus clopidogrel in patients undergoing nonurgent percutaneous coronary intervention: the INNOVATE-PCI trial. *Circ Cardiovasc Interv* 2012; 5: 336–346

Wihlborg A-K, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, Erlinge D. ADP receptor P2Y₁₂ is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1810–1815

Zhang J, Zhang K, Gao Z-G, Paoletta S, Zhang D, Han GW, Li T, Ma L, Zhang W, Müller CE, Yang H, Jiang H, Cherezov V, Katritch V, Jacobson KA, Stevens RC, Wu B, Zhao Q. Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature* 2014; 509: 119–122

Zhang S, Ye J, Zhang Y, Xu X, Liu J, Zhang SH, Kunapuli SP, Ding Z. P2Y₁₂ protects platelets from apoptosis via PI3k-dependent Bak/Bax inactivation. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 149–160

Anhang

Anhang 1. Weitere Materialien	86
Anhang 1.1 Geräte	86
Anhang 1.2 Verbrauchsmaterialien	87
Anhang 1.3 Medien und Puffer	88
Anhang 1.4 Chemikalien	89
Anhang 1.5 Software	90
Anhang 2. Weitere Methoden	91
Anhang 2.1 Zellkulturtechnik	91
Anhang 2.1.1 Medien	91
Anhang 2.1.2 Zellkultur	92
Anhang 2.2 Zusatzinformationen zur Versuchsdurchführung	94

Anhang 1. Weitere Materialien

Anhang 1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Autoklav	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Brutschrank	Heraeus	Wehrheim
Feinwaage	Sartorius	Göttingen
Fluoreszenzmikroskop LSM 700	Zeiss	Oberkochen
Flüssigstickstofftank, -196 °C	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Gefrierschrank, -20 °C	Siemens	Berlin / München
Inkubationseinheit für das Fluoreszenzmikroskop	Pecon	Erbach
Kühlschrank, 4 °C	Siemens	Berlin / München
Mikroplatten-Photometer POLARstar Omega	BMG Labtech	Ortenberg
Mikroskop	Zeiss	Oberkochen
pH-Meter	Mettler Toledo	Columbus
Pipetten 1 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg
Pipettierhilfe	Brand	Wertheim
Reinstwasseranlage PURELAB	EIGA	High Wycombe
Sterilarbeitsplatz	Heraeus	Wehrheim

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Sterilarbeitsplatz, Filter	Heraeus	Wehrheim
Vakuumpumpe	Ilmvac	Ilmenau
Vortexmischer	VELP Scientifica	Usmate
Wasserbad	B. Braun	Melsungen

Anhang 1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Glasplättchen, Durchmesser 25 mm	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Falcon-Röhre, 15 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Falcon-Röhre, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Filtropur-Flaschen	Sarstedt	Nümbrecht
Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific	Waltham
Laborhandschuhe	Meditrade	Kiefersfelden
Labortücher	ZVG	Troisdorf
Multiwellplatte, 6-Well	Greiner bio-one	Kremsmünster
Multiwellplatte, 24-Well	Greiner bio-one	Kremsmünster
Multiwellplatte, 96-Well	Greiner bio-one	Kremsmünster
Parafilm	American National Can	Bishopville
Pipettenspitzen, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt	Nümbrecht

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt	Nümbrecht
Pipetten, 1 ml, 2 ml, 10 ml	Greiner bio-one	Kremsmünster
Pipetten, 5 ml, 25 ml	Corning Incorporated	Corning
Reagiergefäß, 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Reagiergefäß, 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Spritze, 20 ml, mit Kanüle	B. Braun	Melsungen
Sterilfilter, 0,2 µm	Schleicher und Schuell	Dassel
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner bio-one	Kremsmünster

Anhang 1.3 Medien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Life Technologies	Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies	Karlsruhe
Hanks ausgeglichene Salzlösung (HBSS)	Life Technologies	Karlsruhe
Hams Nährstoffmischung F-12, GlutaMax	Life Technologies	Karlsruhe
Kälberserum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Tween 20	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

Anhang 1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Life Technologies	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
DMSO, steril	Roth	Karlsruhe
Essigsäure, wasserfrei	Roth	Karlsruhe
Ethanol, 70 %, vergällt mit Methylethylketon	Fischar	Saarbrücken
Ethanol, 100 %	Roth	Karlsruhe
Hygromycin B (in PBS, 50 mg/ml)	Life Technologies	Karlsruhe
Immersionsöl	Zeiss	Oberkochen
Methanol, 100 %	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Trypsinethylendinitrilo-tetraessigsäure (Trypsin-EDTA, 0,05 %)	Life Technologies	Karlsruhe

Anhang 1.5 Software

Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
ChemDraw®	PerkinElmer	Waltham
Citavi 6	Swiss Academic Software	Wädenswil
MARS Data Analysis Software Version 2.10 R3	BMG Labtech	Ortenberg
Medical Art	Les Laboratoires Servier	Suresnes
Office 2021 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft	Redmond
Prism 9	Graph Pad	San Diego
ZEN 3.6, blaue Edition	Zeiss	Oberkochen

Anhang 2. Weitere Methoden

Anhang 2.1 Zellkulturtechnik

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Verwendete Medien, Puffer und Chemikalien waren ebenfalls steril, wurden bei 4 °C gelagert und vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt (RT, $\pm$ 21 – 24 °C).

Anhang 2.1.1 Medien

Für die Herstellung der Zellkulturmedien wurde fetales Kälberserum (FCS) im 50 °C warmen Wasserbad über 20 Minuten hitzeinaktiviert und anschließend zu einer vorgefertigten Nährlösung gegeben. Je nach Medium (s. u.) wurde außerdem ein Antibiotikum zugesetzt und die Mischung schließlich mithilfe einer Vakuumpumpe steril filtriert, um das Kontaminationsrisiko möglichst gering zu halten.

Kulturmedium I (für die Zellkultur direkt nach dem Auftauen der Zellen):

- 90 % Hams Nährstoffmischung F-12 + GlutaMax
- 10 % FCS, hitzeinaktiviert

Kulturmedium II (Standard für die Zellkultur aller verwendeten Zellreihen):

- 90 % Hams Nährstoffmischung F-12 + GlutaMax
- 10 % FCS, hitzeinaktiviert
- Hygromycin B, 500 µg/ml

Einfriermedium:

- 72 % Hams Nährstoffmischung F-12 + GlutaMax
- 20 % DMSO, sterilfiltriert
- 8 % FCS, hitzeinaktiviert

Anhang 2.1.2 Zellkultur

Die vorliegende Analyse am humanen P2Y₁₂-Rezeptor erfolgte mithilfe von ovariellen Zellen des Chinesischen Hamsters, die den genannten Rezeptor – je nach Zelltyp – in verschiedenen Variationen exprimieren (CHO-ECFP-Zellen, CHO-WT-Zellen und CHO-ECFP-K280A-Zellen, Details s. 2.1.2).

In der Regel erfolgte die Kultivierung der Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm²; daher beziehen sich die im Folgenden genannten Volumina auf die Verwendung von Flaschen dieser Größe. Bei der gelegentlichen Arbeit mit 25 cm²-Zellkulturflaschen wurde entsprechend maximal ein Drittel der angegebenen Volumina eingesetzt. Die Zugabe oder Abnahme von Medien und Puffern erfolgte stets mithilfe von sterilen Pipetten.

Auftauen der Zellen:

Zu Beginn der Zellkultur wurden eingefrorene Zellen jeder verwendeten Zellreihe einmalig aufgetaut. In diesem Zuge wurde eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 20 ml Kulturmedium I vorbereitet (s. Anhang 2.1.1) und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ vorgewärmt. Das die gefrorenen Zellen enthaltende Kryoröhrchen wurde von -196 °C vorsichtig auf RT erwärmt und die Zellen anschließend in die 37 °C warme Zellkulturflasche übertragen, um mit der adhärenen Zellkultur zu beginnen. Etwa 24 h später erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel, indem das alte Medium durch frisches ersetzt wurde.

Kultivierung der Zellen:

Nach erfolgreichem Auftauen der Zellen wurde die Kultivierung der Zellen folgendermaßen fortgesetzt: Sobald bei mikroskopischer Kontrolle eine Teilung der Zellen erkennbar war (in der Regel nach ca. 48 bis 72 h), wurde von nun an für alle Schritte das Antibiotikum Hygromycin B enthaltende Kulturmedium II (s. Anhang 2.1.1) verwendet, welches die Selektion der Zellen unterstützen sollte, die den P2Y₁₂-Rezeptor exprimierten. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchter Atmosphäre. Um Kontaminationen so weit wie möglich auszuschließen, wurden die Zellen enthaltenden Kulturflaschen dabei durch eine Kappe mit integriertem Filter verschlossen. Das Wachstum der Zellen erfolgte adhärent auf dem Boden der Zellkulturflasche.

Um den Zellen möglichst optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, wurde regelmäßig ein Teil des Mediums erneuert; bei deutlicher Gelbfärbung des Mediums als Hinweis auf eine Ansäuerung und folglich hohe Stoffwechselaktivität der Zellen erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Dafür wurde jeweils die gewünschte Menge des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

Um die Zellpopulation vital zu halten, wurde sie regelmäßig gesplittet, d.h. ein gewisser Anteil in eine neue Zellkulturflasche übertragen, sobald ein zu dichtes Wachstum zu erkennen war (i. d. R. ab einer Konfluenz von 70 – 80 %). Hierfür wurden nach Abnahme des Kulturmediums 10 ml DPBS auf die Zellen gegeben und nach einmaligem Schwenken wieder entfernt, um anschließend 1,2 ml einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung tropfenweise hinzuzufügen und die Zellen damit für zwei bis drei Minuten im Brutschrank zu inkubieren. Sobald im Mikroskop eine – durch das Trypsin hervorgerufene – ausreichende Abrundung und damit beginnende Ablösung der Zellen erkennbar war, wurde die Trypsin-Lösung dann vorsichtig wieder abgenommen. Mithilfe einer Pipette wurden die Zellen anschließend mechanisch vom Flaschenboden getrennt, indem 10 ml des Kulturmediums etwa 15-mal in starkem Strom auf verschiedene Bereiche des Flaschenbodens gespült wurden. Abschließend wurde der gewünschte Anteil der entstandenen Zellsuspension in eine neue, etwa 12 ml Kulturmedium enthaltende Zellkulturflasche überführt.

Einfrieren der Zellen:

Die Konservierung von Zellen für den späteren Gebrauch durch Einfrieren erfolgte mit einer 80 – 100 % konfluenten Zellpopulation, bei der zuvor ein Mediumwechsel zum antibiotikafreien Kulturmedium I (s. Anhang 2.1.1) stattgefunden hatte. Zunächst wurden die Schritte des Standardprotokolls für das Splitten der Zellen befolgt (s. o.), nach Abnahme des Trypsins jedoch nur 1 ml Kulturmedium I zugegeben und dieses mehrfach in starkem Strom auf die Zellen gespült, um sie abzulösen. 1 ml des Einfriermediums (s. Anhang 2.1.1) wurde anschließend zur Zellsuspension hinzugefügt, sodass diese einen finalen DMSO-Anteil von 10 % aufwies. Nach Umfüllung in ein Kryoröhrchen wurde die Suspension für etwa 24 h im Gefrierschrank bei -20 °C eingefroren, bevor sie bis zur weiteren Verwendung bei -196 °C im Stickstofftank gelagert wurde.

Anhang 2.2 Zusatzinformationen zur Versuchsdurchführung

Die genauen Verdünnungen der Substanzen auf der 24-Well-Platte sind in Tab. 4 gezeigt.

Tab. 4: Überblick über alle im Verlauf der Experimente für die Reaktion auf den 24-Well-Platten verwendeten Agonisten, Antagonisten und Lösungen sowie ihrer Konzentrationen. HBSS: Hanks ausgeglichene Salzlösung; 2-MeSADP: 2-Methylthioadenosindiphosphat; ADP: Adenosindiphosphat; DMSO: Dimethylsulfoxid; EtOH: Ethanol.

Testsubstanz	Lösungs- mittel	Konzentration der Testlösung	Finale Ver- dünnung in HBSS	Finale Konzent- ration
Agonisten				
2-MeSADP	HBSS	10 mM	1 : 10	1 mM
		1 mM		100 µM
		100 µM		10 µM
		10 µM		1 µM
		1 µM		100 nM
		100 nM		10 nM
		10 nM		1 nM
		1 nM		100 pM
		100 pM		10 pM
ADP	HBSS	100 µM	1 : 10	10 µM
		10 µM		1 µM
		1 µM		100 nM
		100 nM		10 nM
		10 nM		1 nM
Antagonist				
Elinogrel	DMSO	100 mM	1 : 1000	100 nM
		30 mM		30 nM
		10 mM		10 nM
		3 mM		3 nM
		1 mM		1 nM
Forskolin und Lösungsmittel				
Forskolin	HBSS : DMSO : EtOH 800 : 1 : 7	100 µM	1 : 10	10 µM
HBSS				
DMSO			1 : 1000	
DMSO: EtOH 1:7			1 : 100	

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte zusammen mit Herrn Prof. Dr. Ivar von Kügelgen.

Sämtliche Versuche und Analysen wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Diana Hanna von mir eigenständig durchgeführt. Dabei erfolgte die Durchführung des cAMP-Assays nach einem Standardprotokoll, das – basierend auf dem Handbuch zum Kit – zuvor in der AG von Kügelgen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie weiterentwickelt worden war.

Die Analyse der Daten, die statistischen Auswertungen und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten eigenständig mit der unter Material und Methoden genannten Software. Weitere Abbildungen wurden selbst mit Hilfe von Servier Medical Art, Power Point und ChemDraw® erstellt. Die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse erfolgten selbstständig, ebenso wie die Recherche und Auswertung relevanter Literatur.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

Worte allein reichen nur schwerlich aus, um zu beschreiben, wie dankbar ich bin. Denn in den sechs Jahren meines Medizinstudiums haben viele besondere Menschen meinen Weg durch Höhen und Tiefen begleitet und ich bin dankbar für jede*n Einzelne*n von euch. Nichtsdestotrotz gibt es einige, die ich hervorheben möchte, weil sie auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, die für mich einen besonderen Abschluss des Studiums bedeutet.

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen dafür, dass Sie mir nicht nur netterweise das Thema überlassen haben, sondern mir in all den Jahren stets ausgesprochen freundlich, hilfsbereit und kompetent bei jeder Frage weiterhelfen konnten. Danke für alles!

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn für die stets herzliche und motivierende Atmosphäre bedanken. Besonders hervorzuheben ist Dr. rer. nat. Diana Hanna, die mir bei Fragen im Labor stets weiterhelfen konnte. Mein Dank gilt außerdem Sujeepan Pannerselvam sowie meinen Laborkollegen Jannis Spintge und Philipp Koch.

Bei Herrn Prof. Dr. Jens Müller bedanke ich mich herzlich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Zuletzt möchte ich den Menschen danken, die einen ganz besonderen Platz in meinem Herzen haben. Mama, Papa, Niklas und die besten Omas der Welt – ihr begleitet mich schon mein ganzes Leben lang und eine liebevollere Familie könnte ich mir nicht wünschen. Danke für jeden Tag. Jonas – diese Arbeit ist mit Erinnerungen an Sonne in Neuseeland und Papierschiffchen im Regen gefüllt. Danke, dass mit dir jeder Tag zu einem Abenteuer wird.