

Analyse der Ligandenbindungsstelle des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors mittels Mutagenese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Uta Sixel, geborene Zielinski
aus Limburg an der Lahn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ivar von Kügelgen
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pöttsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.01.2011

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

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	10
2.	Einleitung	12
2.1.	Bekannte physiologische Funktionen des P2Y ₁₂ -Rezeptors	13
2.2.	Mechanismus der Thrombozytenaggregation	16
2.3.	Hemmung der Thrombozytenaggregation	17
2.4.	Auswahlkriterien der Aminosäuren im P2Y ₁₂ -Rezeptor für die Mutagenesestudie	20
2.5.	Pharmakologie des P2Y ₁₂ -Rezeptors	22
2.6.	Zielsetzung	25
3.	Methode	26
3.1.	Molekularbiologie	26
3.1.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.1.1.1.	Generelles Reaktionsschema der PCR	26
3.1.1.2.	RT (Reverse Transcriptase)-PCR	27
3.1.1.3.	Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR	27
3.1.1.3.1.	Prinzip der Mutagenese	27
3.1.1.3.2.	Durchführung der Mutagenese	28
3.1.1.4.	Ligation und Transformation (siehe 2.1.2 und 2.1.3)	28
3.1.2.	Ligation der Rezeptor-DNA in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor	30
3.1.3.	Transformation	31
3.1.3.1.	Prinzip der Transformation	31
3.1.3.2.	Durchführung der Transformation	31
3.1.4.	Amplifikation von E. coli	32
3.1.5.	Extraktion und Reinigung der Plasmid-DNA aus E. coli	32
3.1.6.	DNA-Nachweisverfahren	33
3.1.6.1.	Agarosegelelektrophorese	33
3.1.6.1.1.	Allgemeines zur Agarosegelelektrophorese	33
3.1.6.1.2.	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	34
3.1.6.1.2.1.	Elektrophorese zur Kontrolle der RT-PCR und Ligation der Rezeptor-DNA in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor	34

3.1.6.1.2.2.	Elektrophorese zur Kontrolle von extrahierter und gereinigter DNA aus E. coli	34
3.1.6.1.3.	Photodokumentation	34
3.1.6.2.	Restriktionsanalyse	34
3.1.6.3.	Sequenzanalyse	35
3.1.6.3.1.	Herstellung der Proben: Wildtyp-DNA und Mutanten-DNA	35
3.1.6.3.2.	Sequenzanalyse mit dem LI-COR 4200	36
3.2.	Zellkulturverfahren	36
3.2.1.	Kultivierung eukaryotischer Zellen	37
3.2.1.1.	Kultur von CHO-K1-Zellen	37
3.2.1.2.	Kryokonservierung von CHO-K1-Zellen	38
3.2.1.3.	Zellzählung	38
3.2.2.	Expression des menschlichen P2Y ₁₂ -Rezeptors in CHO-K1-Zellen	38
3.2.2.1.	Transfektion von CHO-K1-Zellen	38
3.2.2.2.	Selektion von Klonen der CHO-K1-Zellen	39
3.2.2.3.	Immunofluoreszenzfärbung mit dem V5-FITC-Antikörper	41
3.2.2.4.	Fluoreszenzmikroskopie	41
3.3.	Funktionelle Analyse	42
3.3.1.	Prinzip der cAMP-Bestimmung	42
3.3.2.	Durchführung der cAMP-Bestimmung	42
3.3.3.	Auswertung	44
3.4.	statistische Verfahren	44
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Molekularbiologie	45
4.1.1.	Klonierung und Amplifizierung der Rezeptor-Wildtyp-cDNA	45
4.1.1.1.	Gewinnung der P2Y ₁₂ -Rezeptor-Wildtyp-cDNA	45
4.1.1.2.	Ergebnis der Transformation und Amplifikation in E. coli	46
4.1.1.3.	Sequenzierung der P2Y ₁₂ -Rezeptor-Wildtyp-DNA	47
4.1.2.	Zielgerichtete Mutagenese des menschlichen P2Y ₁₂ -Rezeptors	48
4.1.2.1.	Primerkonstruktion für die Mutagenesereaktion	48
4.1.2.2.	Transformation und Amplifikation der mutierten Rezeptor-DNA	48

4.1.2.3.	Restriktionsanalyse	49
4.1.2.4.	Ergebnis der Sequenzanalyse	55
4.2.	Zellkultur	58
4.2.1.	Expression des P2Y ₁₂ -Rezeptors	58
4.2.1.1.	Transfektion und Klonierung	58
4.2.1.2.	Immunofluoreszenzfärbung mit dem V5-FITC-Antikörper	58
4.3.	Funktionelle Analyse mittels Bestimmung zellulärer cAMP-Konzentrationen	62
5.	Diskussion	65
5.1.	Methodenauswahl	65
5.1.1.	Mutagenesestudie	65
5.1.2.	Funktionelle Untersuchung	66
5.2.	Untersuchung des humanen P2Y ₁₂ -Rezeptors	66
5.2.1.	Extrazellularstruktur	66
5.2.1.1.	Cysteinreste des P2Y ₁ -Rezeptor-Proteins	66
5.2.1.2.	Cysteinreste des P2Y ₁₂ -Rezeptor-Proteins	69
5.2.2.	Transmembranregion	71
5.2.2.1.	Untersuchung der Transmembranregionen des P2Y ₁ -Rezeptors	71
5.2.2.2.	Untersuchung der Transmembranregionen des P2Y ₂ -Rezeptors	73
5.2.2.3.	Untersuchung der Transmembranregionen des P2Y ₁₂ -Rezeptors	74
5.2.2.3.1.	Transmembranregion 6	74
5.2.2.3.2.	Transmembranregion 7	75
5.2.2.3.3.	In der Literatur beschriebene Polymorphismen	75
5.3.	Weitere Beobachtungen zu den molekularpharmakologischen Versuchen am P2Y ₁₂ -Rezeptor	77
5.3.1.	Einsatz von DMSO	77
5.3.2.	Mögliche Bedeutung intensiver Signale bei der Immunofluoreszenzfärbung	78
5.3.3.	Auswahl einzelner Zelllinien für die funktionellen Versuche	78
5.3.4.	Methodische Einschränkung bei der cAMP-Bestimmung	79
5.4.	Fazit	80

5.5.	Ausblick	80
6.	Zusammenfassung	81
7.	Anhang	83
7.1.	Protokolle	83
7.1.1.	PCR	83
7.1.1.1.	Herstellung und Amplifikation von cDNA aus mRNA: RT-PCR	83
7.1.1.2.	Amplifizierung	83
7.1.2.	Kontrolle der Klonierung und Transformation	84
7.1.3.	Mutagenese	84
7.1.4.	Sequenzierung	85
7.1.4.1.	Kontrolle der Transformation von E. coli mit nachfolgender Extraktion der rezeptortragenden Plasmid-DNA	85
7.1.4.2.	Kontrolle der zielgerichteten Mutagenese	85
7.2.	Agarosegelelektrophorese	86
7.2.1.	Herstellung eines Agarosegels (0,7% / 0,9%)	86
7.2.2.	Durchführung der Elektrophorese	86
7.2.2.1.	Nachweis von cDNA nach Durchführung der RT-PCR und Amplifizierung	86
7.2.2.2.	Nachweis von DNA nach Klonierung und Transformation von E. coli und Extraktion der DNA	87
7.2.2.3.	Gelelektrophorese nach Durchführung der Restriktion	87
7.3.	Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung	88
7.3.1.	Herstellung eines Polyacrylamidgels (nach Vorgabe des Herstellers für LI-COR 4200)	88
7.3.2.	Sequenzanalyse mit dem LI-COR 4200	88
7.4.	Herstellung von Agarplatten zur Anzucht von E. coli	89
7.5.	Restriktionsanalyse	89
7.6.	Materialien	89
7.6.1.	Geräte	88
7.6.2.	Verbrauchsmaterialien	90

7.6.3.	Software	91
7.6.4.	Chemikalien	91
7.6.5.	Lösungen und Puffer	93
7.6.5.1.	Gelieferte Puffer für die Molekularbiologie	93
7.6.5.2.	Selbst hergestellte Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	94
7.6.5.3.	Selbst hergestellte Lösungen und Puffer für die funktionelle Analyse	95
7.6.6.	Medien	95
7.6.7.	Verwendete Reagenzienzusammenstellungen	95
7.6.7.1.	Beschreibung der verwendeten Versuchszusammenstellungen	96
7.6.7.1.1.	pcDNA3.1 Directional TOPO-Expression Kit	96
7.6.7.1.2.	QuickChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit	97
7.6.8.	Biologisches Material	97
7.6.8.1.	Vektor	97
7.6.8.2.	Enzyme	97
7.6.8.3.	mRNA für hP2Y ₁₂ -Rezeptor	98
7.6.8.4.	Bakterienstämme	98
7.6.8.5.	Eukaryotische Zelllinie	98
7.6.8.6.	Antikörper	98
7.6.8.7.	Oligonukleotide	99
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Danksagung	108
10.	Lebenslauf	109

1. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C17A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Cystein17 gegen Alanin
C97A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Cystein97 gegen Alanin
C175A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Cystein175 gegen Alanin
C270A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Cystein270 gegen Alanin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charged couple device
cDNA	komplementäre DNA
CHO	chinesische ovarielle Hamsterzellen
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL	Extrazellulärschleife
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat Natriumsalz
EZS	Extrazellularstruktur
F12	Ham F12 Nutrient Mixture
FBS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
G418	Geneticin
Gi/0	hemmendes G-Protein
G-Protein	Guanylnukleotid-bindendes Protein
Gq	aktivierendes G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure pH 5-6,5
hP2Y ₁₂ -Rezeptor	humaner P2Y ₁₂ -Rezeptor
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IP ₃	Inositoltriphosphat
K280A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Lysin280 gegen Alanin
M	Molare Konzentration (mol/l)
mol	Stoffmenge (1 mol = Teilchenzahl in 12 g Kohlenstoffisotop ¹² C)
mRNA	messenger RNA
pA ₂	negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration eines Antagonisten, bei der die Konzentration eines Agonisten verdoppelt werden muss, um den gleichen Effekt wie bei Abwesenheit des Antagonisten zu beobachten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-

	Konzentration
R256A	P2Y ₁₂ -Rezeptorkonstrukt mit Austausch Arginin256 gegen Alanin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	PCR mit dem Enzym Reverse Transkriptase
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
TAE	Trisacetat – EDTA
TBE	Trisborat – EDTA
TM	Transmembranregion
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheit (unit) oder Umdrehung
μ	mikro = 10 ⁻⁶
V	Volt
WT	Wildtyp

2. Einleitung

In vorliegender Arbeit wurde die molekulare Struktur des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptor mittels zielgerichteter Mutagenese untersucht. Der Rezeptor war kurz vor Beginn der Durchführung der hier beschriebenen Versuche kloniert worden (Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2001). Metabotrope P2Y-Rezeptoren gehören zusammen mit ionotropen P2X-Rezeptoren zu einer Gruppe von Rezeptoren, die durch extrazelluläre Nukleotide aktiviert werden können. P2X-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle (Übersicht in Khakh et al., 2001; Vial et al., 2004). P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und werden durch extrazelluläre Adenin- und Uridinnukleotide sowie UDP-Glucose aktiviert (Übersicht in Abbraccio et al., 2006; von Kügelgen, 2006). Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bildet eine der größten Proteinfamilien, die bisher in der Natur gefunden wurden. Sie alle verbindet ein gemeinsames strukturelles Merkmal: sieben helikale, transmembranäre Domänen (Moro et al., 1999). Eine Reihe von P2Y-Rezeptoren sind bis heute kloniert und untersucht worden (siehe Tabelle 1). Acht P2Y-Rezeptoren (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) sind bisher beim Menschen identifiziert worden. Die bisher klonierten Rezeptoren können dabei entweder an die Phospholipase C (Tabelle 1, P2Y_{1,2,4,6,11}-Rezeptor) und/oder an die Adenylatcyclase (Tabelle 1, P2Y_{11,12,13,14}-Rezeptor) koppeln. Dabei koppeln die Rezeptoren P2Y_{1,2,4,6} und 11 an ein aktivierendes G-Protein (Gq), die Rezeptoren P2Y_{12,13,14} an ein hemmendes G-Protein (G_{i/o}) und der P2Y₁₁ noch zusätzlich an ein stimulierendes G-Protein (Gs) (siehe Tabelle 1, Transduktionsweg). Daneben gibt es P2Y-Rezeptoren, die bisher ausschließlich in nicht-menschlichem Gewebe gefunden wurden: P2Y₃-Rezeptoren in Huhn und Truthahn sowie P2Y₈-Rezeptoren in *Xenopus* (siehe von Kügelgen und Wetter, 2000; von Kügelgen, 2006). In der Reihenfolge der Nomenklatur von P2Y-Rezeptoren fehlen einige Ziffern: Der ursprünglich als p2Y₇-Rezeptor beschriebene G-Protein-gekoppelte Rezeptor wurde als Leukotrien B₄-Rezeptor identifiziert (Huang et al., 1998), der p2Y₅- und der p2Y₉-Rezeptor als Rezeptoren für Lysophosphatidsäure (Noguchi et al., 2003; Pasternack et al., 2008). Für den p2Y₁₀-Rezeptor ist derzeit noch kein physiologischer Ligand eindeutig identifiziert worden (v. Kügelgen und Wetter, 2000; v. Kügelgen, 2006). Für das Nukleosid Adenosin gibt es vier humane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃, auch P1-Rezeptoren genannt (Fredholm et al., 2001). Kürzlich wurden auch für die Nukleobase Adenin G-Protein-gekoppelte Rezeptoren molekular identifiziert (Bender et al., 2002; Gorzalka et al., 2005; von Kügelgen et al., 2008).

2.1. Bekannte physiologische Funktionen des P2Y₁₂-Rezeptors

Der hier untersuchte P2Y₁₂-Rezeptor findet sich in hoher Expressionsdichte in der Thrombozytenmembran und spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation (siehe Tabelle 1, Zeile 10) (Jin und Kunapuli, 1998; Mateos-Trigos et al., 2002; Remijn et al., 2002; Übersicht in: Dorsam und Kunapuli, 2004). Daten von Versuchen an neuronalen Zellen sprechen für die Identität präsynaptischer P2Y- Rezeptoren als P2Y₁₂-Rezeptoren (Kulick und v. Kügelgen, 2002; Unterberger et al., 2002; Quintas et al., 2009). Durch Aktivierung dieses Rezeptors wird der Calciumeinstrom durch N-Typ-Calciumkanäle an neuronalen Fortsätzen moduliert (Kulick und von Kügelgen, 2002; siehe auch Simon et al., 2002). Darüber hinaus wurde eine Expression von P2Y₁₂-Rezeptoren in Mikrogliazellen und Oligodendrozyten gezeigt (Sasaki et al., 2003; Amadio et al., 2006). P2Y₁₂-Rezeptoren steuern beispielsweise Migrationsbewegungen von Mikrogliazellen (Haynes et al., 2006).

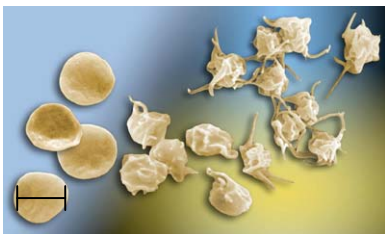
	Spezies	Verteilung der mRNA	Transduktionsweg	Aktivierung durch	Hemmung durch
P2Y ₁	Mensch	weit verteilt: Thrombozyten, Herz, Skelettmuskulatur, Nervensystem, Verdauungstrakt	Phospholipase C über Gq	2-Methyl-Thio-ADP > ADP > 2-Methyl-Thio-ATP > ATP	MRS2179, Reaktiv Blau 2, Suramin, PPADS
	Ratte, Maus, Rind, Huhn, Truthahn, Xenopus	siehe oben	siehe oben	siehe oben	
P2Y ₂	Mensch	weit verteilt: Lunge, Herz, Skelettmuskulatur, Milz, Niere	Phospholipase C über Gq	UTP=ATP > Ap4A	Suramin
	Ratte, Maus	siehe oben	siehe oben	siehe oben	
P2Y ₄	Mensch	Plazenta, Lunge, Gefäßmuskulatur	Phospholipase C; Adenylatcyclase über Gq	UTP > UTPγS >>ATP, UDP	PPADS, Reaktiv Blau 2
	Ratte	siehe oben	siehe oben	siehe oben	
P2Y ₆	Mensch	weit verteilt: Lunge, Herz, Aorta, Milz, Plazenta, Thymus, Intestinum, Gehirn	Phospholipase C über Gq	UDP=S-Bromo-UDP > UTP > 2-Methyl-Thio-ADP	Reaktiv Blau 2, PPADS
	Ratte	siehe oben	siehe oben	siehe oben	
P2Y ₁₁	Mensch	Milz, Intestinum, Immunozyten	Phospholipase C; Adenylatcyclase über Gq	ATPγS = Benzoyl-Benzoyl- ATP > ATP > 2-Methyl-Thio- ATP	Suramin, Reaktiv Blau 2
P2Y ₁₂	Mensch	Blutplättchen, Gehirn, Rückenmark, Niere	Phospholipase C; Adenylatcyclase über G _{i/0}	2-Methyl-Thio-ADP > ADP	Cangrelor (AR-C69931 MX), Clopidogrel (aktiver Metabolit) > 2-Methyl - Thio-AMP
	Ratte, Maus	siehe oben	siehe oben		
P2Y ₁₃	Mensch	Milz, Gehirn	Phospholipase C; Adenylatcyclase	2-Methyl-Thio-ADP = ADP > ADPβS > IDP	Cangrelor, nicht durch MRS2179

			über $G_{i/o}$		
P2Y ₁₄	Mensch	Myeloblast	Phospholipase C über $G_{i/o}$	UDP-Glucose	UDP*
	Ratte	keine Daten	keine Daten		

Tabelle 1: Klonierte und funktionell charakterisierte P2Y-Rezeptoren. Gezeigt sind die Verteilung der für die Rezeptoren kodierenden mRNA im Menschen, die Kopplung an G-Proteine, ein identifizierter Transduktionsweg (Phospholipase C oder Adenylatcyclase) sowie agonistisch und antagonistisch wirkende Substanzen. (Quelle: modifiziert nach von Kügelgen und Wetter, 2000; von Kügelgen, 2006; *siehe auch Fricks et al., 2008)
 Gq: aktivierendes G-Protein, $G_{i/o}$: hemmendes G-Protein

2.2. Mechanismus der Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation dient physiologisch dem Verschluss kleiner Gefäßdefekte. An den Bindegewebsfasern der Wundränder bleiben unter Beteiligung des von-Willebrand-Faktors Blutplättchen haften. Durch freigesetztes Adenosindiphosphat (ADP) laufen zwei Mechanismen ab. Durch Aktivierung des Gq-gekoppelten P2Y₁-Rezeptors werden in der Folge Calciumionen freigesetzt. Dadurch werden Aktin- und Myosinfilamente aktiviert. Es kommt zur Formveränderung der Thrombozyten, wie es beispielsweise in Abbildung 1 zu sehen ist. Hier wird gezeigt, wie sich die Morphologie der Thrombozyten zum Beispiel unter Einwirkung von ADP verändert (siehe auch Jin und Kunapuli, 1998; Dorsam und Kunapuli, 2004). Des Weiteren aktiviert ADP den in dieser Arbeit untersuchten P2Y₁₂-Rezeptor (Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2001), einen G_{i/o}-gekoppelter Rezeptor. Die Adenylatcyclase wird gehemmt, wodurch der cAMP-Spiegel in den Thrombozyten sinkt, so dass der plättchenstabilisierende Faktor wegfällt. Zusätzlich gibt es Hinweise auf die Beteiligung von ERK (extracellular signal-regulated kinase)-abhängigen Signaltransduktionswegen nach Aktivierung von P2Y₁₂-Rezeptoren auf Thrombozyten (Fälker et al., 2004; Garcia et al., 2007). Erst durch diese Vorgänge wird die irreversible Aggregation eingeleitet.

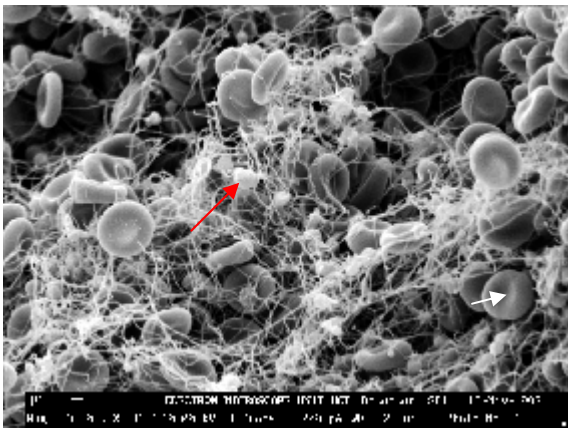


┌─┐ 0,5 – 2,5 µm

Abbildung 1: Thrombozyten schematisch; in der linken Bildhälfte sind Thrombozyten im Ruhezustand dargestellt, in der rechten Bildhälfte erkennt man Thrombozyten nach Aktivierung. Quelle: Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Bonn, mit Genehmigung von Frau Dr. Rox.

Fibrinogen bewirkt schließlich durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren (Glykoprotein IIb/IIIa) auf der aktivierten Plättchenmembran eine irreversible Vernetzung der Thrombozyten (Schmidt und Thewes, 2000). Solche Vernetzungen sind in Abbildung 2 in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme zu sehen. Im fädigen Fibrinnetz sind einzelne

Verklumpungen zu erkennen, die zusammengeballte Thrombozyten darstellen. Erythrozyten haften dem Netzwerk an.



- aggregierte Thrombozyten im Fibrinnetz nach Aktivierung
- Erythrozyt; Größe ca. 7 μm (weißer Pfeil im Bild)

Abbildung 2: Aktivierte Thrombozyten lagern sich in Klumpen zusammen, um mit dem Fibrinnetz einen Defekt zu verschließen; der einzelne Thrombozyt hat eine Größe von 0,5 – 2,5 μm

Aufnahme mit einem Rasterelektronenmikroskop.

Quelle: Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Bonn, mit Genehmigung von Frau Dr. Rox.

2.3. Hemmung der Thrombozytenaggregation

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation wurde als ein wertvolles Konzept bei der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen entdeckt (Fields, 1979). 2007 machten in Deutschland Erkrankungen des Kreislaufsystems 43,4% aller Sterbefälle aus. Damit steht diese Todesursache an erster Stelle (Quelle: Statistisches Bundesamt, 2008). Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation besitzen unterschiedliche Angriffspunkte: Acetylsalicylsäure hemmt die Cyclooxygenase in Thrombozyten und Endothelzellen irreversibel durch Acetylierung. Der Einsatz von Acetylsalicylsäure in einer Dosierung von 30 – 100 mg pro Tag führt unter anderem nachweislich zur Reduktion von Myokardinfarkten und zur Senkung der Häufigkeiten von transitorisch ischämischen Attacken und Hirninfarkten (Elwood, 2001). Eine der ersten placebokontrollierten, randomisierten Studien zur Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom wurde 1983 von Lewis et al. durchgeführt. Hier konnte der Einsatz von 324 mg

Acetylsalicylsäure täglich die Rate des kombinierten Endpunktes aus Tod und nichttödlichem Myokardinfarkt um 50 % senken. Weitere Studien zum Einsatz von Acetylsalicylsäure konnten diese Ergebnisse bestätigen: 1989 wurde in einer Studie an ca. 22.000 gesunden Menschen gezeigt, dass die prophylaktische Einnahme von 325 mg Acetylsalicylsäure eine Abnahme des Risikos für einen Myokardinfarkt um 44 % bedingt (US Physician's Health Study, 1989). 1998 konnte in einer Studie zur Behandlung hypertensiver Erkrankungen gezeigt werden, dass die Einnahme von 75 mg Acetylsalicylsäure täglich eine Reduktion vaskulärer Komplikationen um 15 % und eine Reduktion von Myokardinfarkten um 36 % bedingt (Hypertension Optimal Treatment HOT Treatment Study, Hansson et al., 1998). Mit Nebenwirkungen muss man bei einer täglichen Dosis von 30 – 100 mg vor allem in Form von Magenschleimhautschädigungen rechnen, die mit einer Gefahr von Blutungen und Erosionen verbunden sind. Das Glykoprotein IIb/IIIa bindet Fibrinmoleküle, so dass der entstehende Thrombus vernetzt wird. Der Antikörper Abciximab blockiert das Glykoprotein und damit die gemeinsame Endstrecke verschiedener Thrombozytenaktivierungswege. Der Antikörper muss intravenös verabreicht werden und wird nur in speziellen Fällen, z.B. bei einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie, angewandt, um eine Thrombusbildung zu verhindern (Marmur und Cavusoglu, 2002). In einer nicht-randomisierten Studie wurden 1076 Patienten mit Abciximab bei der perkutanen transluminalen Koronarangiographie behandelt. Es konnte eine signifikant niedrigere Rate des kombinierten Endpunktes aus Tod, Reinfarkt und Apoplex während des stationären Aufenthaltes nachgewiesen werden (2,4 % gegenüber der Kontrollgruppe mit 4,4 %) (Zahn et al., 2003). Als Blocker, nicht aber als Antikörper des Fibrinogen-Bindeproteins, wurde Tirofiban (Aggrastat®) entwickelt. Die Substanz wird zur Behandlung von Myokardinfarkten eingesetzt, die sich nicht durch eine ST-Streckenhebung auszeichnen, sogenannte NSTEMI (Non-ST elevated myocardial infarction). In einer Studie sollte der Nutzen von Tirofiban zusätzlich zur konventionellen Infarkttherapie gegenüber der alleinigen konventionellen Myokardinfarkttherapie herausgestellt werden. Dazu wurden 26 Patienten konventionell und 32 Patienten zusätzlich mit Tirofiban über 72 Stunden intravenös behandelt. Nach 72 Stunden konnte ein Unterschied verzeichnet werden: 67,9% der Patienten, die zusätzlich mit Tirofiban behandelt wurden, zeigten eine Rückentwicklung der ST-Strecke, wohingegen dies nur bei 32,1% der anderen Gruppe gezeigt werden konnte. Zusätzlich konnte keine Zunahme der Blutungsereignisse unter Tirofiban verzeichnet werden (Bayturan et al., 2004).

Der in dieser Arbeit untersuchte P2Y₁₂-Rezeptor ist Angriffspunkt der aktiven Metabolite der Thienopyridine Clopidogrel, Ticlopidin und des neu entwickelten Analogons Prasugrel: Die aktiven Metabolite sind eine neuere Möglichkeit der oralen Antikoagulation. Clopidogrel ist seit 1997 zugelassen (Jneid et al., 2003) und blockiert den P2Y₁₂-Rezeptor (Foster et al., 2001). Erst durch hepatische Metabolisierung wird der aktive Metabolit gebildet (Savi et al., 2000). Ticlopidin als erste Leitsubstanz der Thienopyridine wurde z.B. in der Canadian American Ticlopidin Study gegen Placebo im Jahr 1989 untersucht. Es konnte eine Reduktion des kombinierten Endpunktes von Apoplex, Myokardinfarkt und Tod um 23 % gezeigt werden (Gent et al., 1989). Bekannte Nebenwirkungen können sein: Diarrhö (ca. 2,5 %), Neutropenie (ca. 10 %), Thrombopenie und Hautreaktionen (Lüllmann et al., 2006). In weiteren Studien wurde die Wirkung von Clopidogrel untersucht. In der „Clopidogrel in Unstable angina to Prevent Recurrent Events (CURE)–Studie“ von 2001 wurde der Einsatz von 75 - 325 mg Acetylsalicylsäure mit 75 mg Clopidogrel täglich im Gegensatz zum alleinigen Einsatz von 75 mg Acetylsalicylsäure täglich untersucht. Das Ergebnis war, dass die kombinierte Therapie das Risiko von Myokardinfarkt, Apoplex und Tod um 11,4 % senkt, damit stärker als die Monotherapie (Abnahme um 9,3 %) (Jneid et al., 2003). In der „Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events (CAPRIE)–Studie“ von 1996 wurde der Einsatz von 75 mg Clopidogrel mit 325 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin®) verglichen. Das Ergebnis zeigte eine statistisch signifikante Reduktion des relativen Risikos um 8,7 % für Myokardinfarkt, Apoplex und Tod beim Einsatz von Clopidogrel und eine Senkung um 2,66 % beim alleinigen Einsatz von Acetylsalicylsäure. Kein Unterschied wurde für die Häufigkeit des Auftretens von intrazerebraler Blutung, Thrombozytopenie oder Neutropenie gefunden. Der Kostenfaktor war für Clopidogrel siebenmal höher als für Aspirin® (CAPRIE Steering Committee, 1996; Canon, 2002). Für ca. 10 % der Patienten, die mit Thrombozytenaggregationshemmern behandelt werden müssen, wurde eine Acetylsalicylsäure-Resistenz beschrieben (Gum et al., 2001a, 2001b). Auch bei Therapie mit Clopidogrel ist bei einigen Patienten die Thrombozytenaggregation nur unzureichend gehemmt. Nach den Ursachen wurde intensiv gesucht; zumindest teilweise scheint eine ungenügende Metabolisierung von Clopidogrel für das Therapieversagen verantwortlich zu sein (Wallentin et al., 2008). Eine Neuentwicklung stellt das Analogon Prasugrel dar, das vor kurzem für die Pharmakotherapie zugelassen wurde (Jakubowski et al., 2007; Wallentin et al., 2008). Acetylsalicylsäure und alle klinisch verwendeten Thienopyridine schalten aufgrund ihrer irreversiblen Wirkung die Thrombozytenaggregation für mehrere Tage aus, so dass die Therapie

schlecht steuerbar ist. Daher ist es ein wichtiges Ziel, neue Medikamente zur oralen Antikoagulation zu entwickeln. Für eine weiterführende rationale Arzneimittelentwicklung ist unter anderem die Strukturaufklärung der Ligandenbindungstasche des P2Y₁₂-Rezeptors notwendig. In dieser Arbeit wurde zur Strukturaufklärung eine Mutagenesestudie durchgeführt. Verwandte P2Y-Rezeptoren wurden ebenfalls schon mit dieser Methode untersucht (Zitate siehe unten). Nach Fertigstellung der Experimente dieser Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe mit Hilfe von Mutagenese-Versuchen gezeigt, dass der aktive Metabolit von Clopidogrel über eine Interaktion mit Cystein97 in der Transmembranregion 3 wirkt (Savi et al., 2006).

2.4. Auswahlkriterien der Aminosäuren im P2Y₁₂-Rezeptor für die Mutagenesestudie

Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren basierte auf Untersuchungen, die mit dem P2Y₁-Rezeptor durchgeführt wurden. Aus diesen Arbeiten wurde deutlich, dass für die Funktion des P2Y₁-Rezeptors die vier Cysteinreste in der Extrazellularstruktur an den Positionen 42, 124, 202 und 296 (Hoffmann et al., 1999) von funktioneller Bedeutung sind. Ebenso konnte sowohl für die positiv geladene Aminosäure Lysin 280 in der Transmembranregion 6 als auch für die konservierte Aminosäure Glutamin 307 in der Transmembranregion 7 eine funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden (Jiang et al., 1997). Die entsprechenden Aminosäuren des P2Y₁₂-Rezeptor (vier Cysteinreste an den Positionen 17, 97, 175 und 270 in der Extrazellularstruktur sowie Arginin 256 und Lysin 280 in den Transmembranregionen 6 und 7) wurden daher in dieser Arbeit zielgerichtet ausgetauscht. In Abbildung 3 sind diese Aminosäuren im Schema hervorgehoben dargestellt. Es sollten die Fragen geklärt werden, ob die Cysteinreste, ähnlich wie im P2Y₁-Rezeptor, Disulfidbrücken ausbilden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Arginin 256 und Lysin 280 vergleichbare Funktionen haben, wie sie für den P2Y₁-Rezeptor mit Lysin 280 und Glutamin 307 gezeigt wurden.

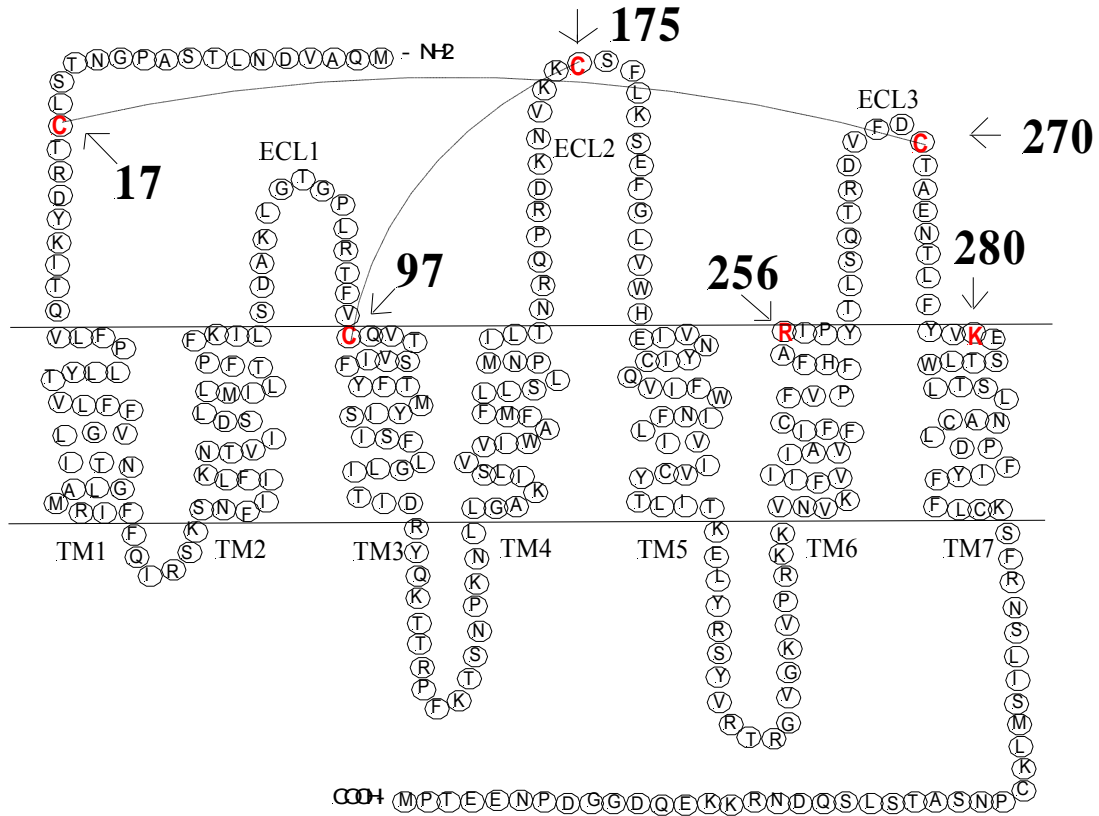


Abbildung 3: Zweidimensionales, transmembranäres Schema der Struktur des humanen P2Y₁₂-Rezeptors (die mutierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben, mögliche Disulfidbindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet)

ECL: Extrazellulärschleife

TM: Transmembranregion

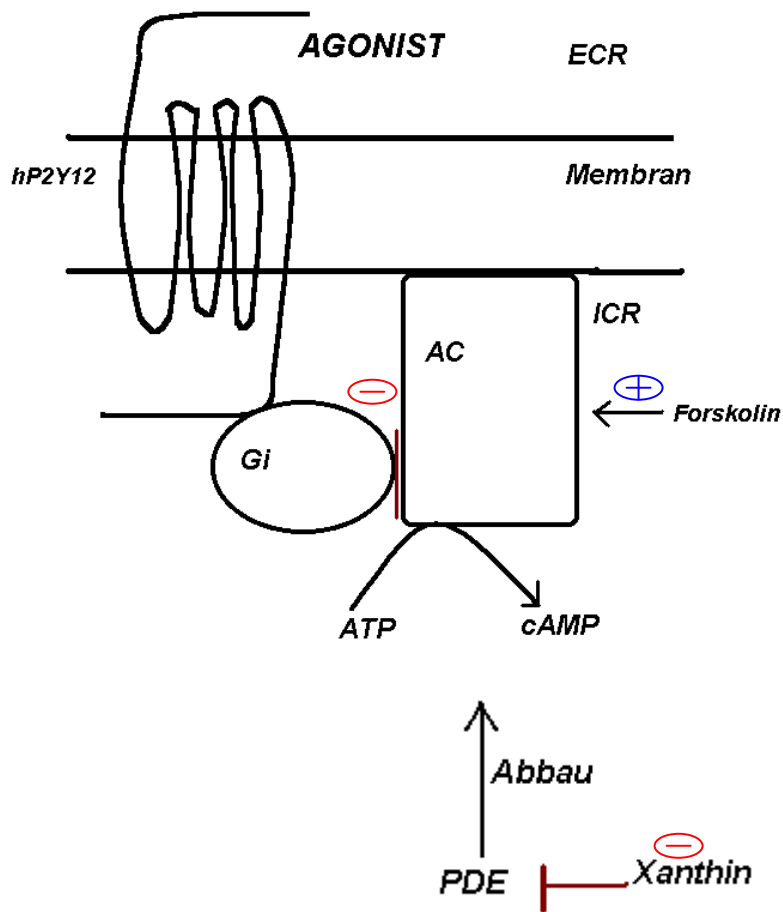
2.5. Pharmakologie des P2Y₁₂-Rezeptors

Die funktionelle Testung erfolgte durch eine Messung der Agonisten (ADP)-induzierten Hemmung der zellulären cAMP-Bildung. Die bekannten Agonisten für den P2Y₁₂-Rezeptor lassen sich hinsichtlich ihrer Potenz folgendermaßen ordnen: 2-Methylthioadenosindiphosphat = 2-Methylthioadenosintriphosphat > Adenosindiphosphat > Adenosindiphosphat-β-S > Adenosintriphosphat. Tabelle 2 zeigt die EC₅₀-Werte.

Agonist	EC ₅₀ -Werte
2-Methylthio-ADP	0,078 nM
2-Methylthio-ATP	0,098 nM
Adenosindiphosphat	42 nM
Adenosindiphosphat-β-S	404 nM
Adenosintriphosphat	690 nM

Tabelle 2: Am hP2Y₁₂-Rezeptor wirkende Agonisten mit halbmaximalen Konzentrationen (EC₅₀-Werte; Takasaki et al., 2001)

Zur Wirksamkeit von Antagonisten am rekombinanten P2Y₁₂-Rezeptors gibt es vergleichsweise wenig publizierte Daten. Hierbei wurden von Hollopeter et al. (2001) und Takasaki et al. (2001) antagonistisch wirkende Substanzen des P2Y₁₂-Rezeptors im Vergleich zum P2Y₁-Rezeptor getestet. Takasaki et al. (2001) zeigten, dass Reaktiv Blau 2, ein unselektiver P2-Antagonist, sowohl am P2Y₁-Rezeptor als auch am P2Y₁₂-Rezeptor antagonistisch wirkt (pA₂-Wert: 6,03; siehe Tabelle 3). Suramin, ein weiterer unselektiver P2-Antagonist, zeigte an beiden Rezeptoren nur eine schwache antagonistische Wirkung in einer Konzentration von 100 μM. PPADS und A3P5PS antagonisieren den P2Y₁-Rezeptor (pA₂-Werte: 6,37 und 6,03), zeigen aber keine Wirkung am P2Y₁₂-Rezeptor. 2-Methylthio-AMP blockierte dagegen nur die Wirkung des P2Y₁₂-Rezeptors mit einem pA₂-Wert von 6,44 (siehe Tabelle 3), nicht aber die des P2Y₁-Rezeptors. Cangrelor (AR-C69931 MX), ein potenter selektiver P2Y₁₂-Antagonist, blockiert den Rezeptor mit einem pA₂-Wert von 9,77 (siehe Tabelle 3). Hollopeter et al. (2001) konnten zeigen, dass die Substanz C1330-7 als Nichtnukleotidantagonist den Rezeptor blockiert (pA₂: 6,83; siehe Tabelle 3). Für die Substanz 2-Methylthio-AMP bestimmte diese Arbeitsgruppe einen pA₂-Wert von 7,96 (siehe Tabelle 3). Möglicherweise könnten Unterschiede in der Versuchsdurchführung die Unterschiede in den bestimmten pA₂-Werten für 2-Methylthio-AMP verursacht haben. Die



ECR: Extrazellularraum
 ICR: Intrazellularraum
 AC: Adenylatecyclase
 Gi: inhibitorisches G-Protein
 PDE: Phosphodiesterase
 cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat

Abbildung 4: Transduktionsweg nach Bindung eines Agonisten (z.B. ADP) an den P2Y₁₂-Rezeptor mit Aktivierung eines G_i-Protein und Hemmung der Adenylatecyclase. Die Abbildung zeigt schematisch die Abläufe der cAMP-Bestimmung, bei der nach Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten die Abnahme des gebildeten cAMP gemessen werden kann, nachdem die Adenylatecyclase zuvor mittels Forskolin stimuliert wurde. Die Phosphodiesterase, die cAMP in Zellen abbaut, wurde dabei mit einem Xanthin gehemmt.

2.6. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird eine molekularpharmakologische Analyse der Ligandenbindungsstelle des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors durch zielgerichtete Mutagenese der kodierenden DNA-Sequenz und anschließende pharmakologische Untersuchung der Funktion der Rezeptorkonstrukte durchgeführt. Untersucht werden mutierte Rezeptorkonstrukte mit Austausch der Aminosäuren Cystein an Position 17 durch Alanin (C17A), C97A, C175A, C270A, R256A und K280A, um Daten zur Bedeutung der jeweiligen Aminosäure des Rezeptorproteins für die Expression des Proteins und für die Rezeptorfunktion zu erhalten. Zur Wortwahl dieser Arbeit sei darauf hingewiesen, dass zur Verbesserung der Lesbarkeit teilweise Begriffe wie „C17A-Rezeptormutante“ verwendet werden, um beispielsweise ein mutiertes Rezeptorkonstrukt des humanen P2Y₁₂-Rezeptors zu kennzeichnen, bei dem zielgerichtet die Aminosäure Cystein an Position 17 durch Alanin ersetzt wurde. Mit Wildtyprezeptor wird ein Fusionsprotein gekennzeichnet, das die publizierte Originalsequenz des humanen P2Y₁₂-Rezeptorproteins mit zusätzlichen intrazellulären Epitopen (siehe Methode) aufweist.

3. Methode (Materialien sind im Anhang aufgeführt)

Im molekularbiologischen Teil der Arbeit wurde Rezeptor-kodierende DNA aus mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase umgeschrieben und in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor kloniert. Im Anschluss wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Verschiedene DNA-Nachweisverfahren (PCR mit photometrischer Auswertung, Sequenzierung) wurden angewendet. Im zweiten experimentellen Teil der Arbeit wurden die Rezeptorkonstrukte in Säugetierzellen (chinesische ovarielle Hamsterzellen, CHO-K1-Zellen) exprimiert. Hierbei wurde nach erfolgter Transfektion die Expressionsdichte des Rezeptorproteins an der Zelloberfläche fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Mittels cAMP-Bestimmung wurden die Rezeptoren funktionell untersucht.

3.1. Molekularbiologie

3.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.1.1.1. Generelles Reaktionsschema der PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion können definierte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Das hier verwendete Prinzip basiert auf drei hintereinander ablaufenden Schritten: 1) *Denaturierung* – die doppelsträngige DNA wird durch Temperaturerhöhung in zwei Einzelstränge aufgetrennt. 2) *Annealing* – Anlagern von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die als Primer dienen (in Richtung der zu vervielfältigenden DNA, 5'-3': sense oder forward; in Gegenrichtung, 3'-5': antisense oder reverse). 3) *Verlängerung* – ausgehend von den angelagerten Primern wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase der neue DNA-Strang in Anwesenheit von Desoxynukleotiden nach der Vorlage der Originalstränge aufgebaut. Die Wiederholung dieser drei Schritte führt zu einer exponentiellen Vermehrung der ursprünglichen DNA-Matrize („template“). Zur Durchführung wurde ein Thermocycler verwendet. Zum Teil wurde am Ende der Reaktionszyklen noch eine Reaktionsperiode angefügt („Korrektur“), in der die DNA-Polymerase unvollständige PCR-Produkte noch vervollständigen konnte. Die Reaktionsansätze wurden immer auf Eis gemischt und mit Mineralöl überschichtet.

3.1.1.2. RT (Reverse Transcriptase)-PCR

Für den P2Y₁₂-Rezeptor kodierende mRNA aus humanem Gehirngewebe (Clontech, Palo Alto USA) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen; im Labor der Arbeitsgruppe isoliert) wurde durch eine zweizeitige RT-PCR unter Verwendung eines Gemisches der Enzyme Reverse Transkriptase und Platinum Taq Polymerase in cDNA umgeschrieben (SuperScript One-Step RT-PCR mit Platinum Taq; Invitrogen). Im gleichen Reaktionsansatz wurde zunächst mRNA in cDNA umgeschrieben und diese dann in 15 Zyklen vermehrt. Dies war Ausgangsprodukt für eine im Anschluss durchgeführte PCR mit Pfu-Polymerase (Stratagene), um die cDNA quantitativ zu vermehren. Die Auftrennung in zwei Reaktionsansätze mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen wurde gewählt, weil sich die Pfu-Polymerase im Gegensatz zur Taq-Polymerase durch eine höhere Genauigkeit bei der Herstellung der DNA-Kopien auszeichnet. Diese Reaktion wurde mit dem Zusatz von DMSO durchgeführt, da ohne Zusatz keine Produkte erhalten wurden. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang unter Protokolle, 7.1.1.1 und 7.1.1.2.

3.1.1.3. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR

3.1.1.3.1. Prinzip der Mutagenese

Ziel der Mutagenese war der Austausch einzelner Aminosäuren: Cystein 17, 97, 175, 270, Arginin 256 und Lysin 280 jeweils durch Alanin. Dazu mussten ein oder zwei Basen im Triplet, das für eine dieser Aminosäuren kodiert, ausgetauscht werden. Bei der Reaktion wurde die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt, wobei sich der mutagene Primer anlagerte und durch die Pfu-Polymerase der neue DNA-Strang aufgebaut wurde. Im Laufe der PCR verschob sich dabei das Verhältnis von originärer DNA zu mutierter DNA immer mehr in Richtung der letztgenannten. Vor der Transformation der *E. coli* mit dem Produkt (3.1.3.2) wurde noch ein Verdau mit dem Restriktionsenzym Dpn I durchgeführt. Dieses Enzym baut die originäre, methylierte, aber nicht die mutierte PCR-amplifizierte DNA ab. Somit wird nochmals die Reaktionseffizienz erhöht. Die originäre DNA ist methyliert, da der für den Wildtyp Rezeptor kodierende Vektor in *E. coli* amplifiziert wurde.

3.1.1.3.2. Durchführung der Mutagenese

Als DNA-Vorlage diente das extrahierte und aufgereinigte Plasmid, welches das für den Wildtyprezeptor kodierende Insert enthält (3.1.4). Der Oligonucleotide-Primer wurde so konstruiert, dass mindestens 12 Basenpaare vor und hinter der Mutation erhalten blieben, um eine hohe Bindungsaffinität zur spezifischen Stelle zu gewährleisten. Mit Hilfe des Computerprogramms Vector NTI wurden dabei Primer ausgewählt, die bezüglich der Anzahl ausgetauschter Basen, Wahrscheinlichkeit zur Schleifenbildung und Annealing-Temperatur ähnlich beschaffen waren. Die Mutagenese konnte dadurch für alle Konstrukte in einem Arbeitsgang und damit unter gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt werden. Abbildung 5 zeigt schematisch den Ablauf der Mutagenese. Die Liste der mutagenen Primer befindet sich im Materialteil des Anhangs (7.6.8.7). Das Protokoll der Durchführung befindet sich ebenfalls im Anhang (7.1.3). Die langsame Reaktionsgeschwindigkeit der Pfu-Polymerase machte es notwendig, dass für die Verlängerungszeit 2 min pro Kilobase (kb) gewählt wurden. Bei einer Gesamtlänge von 6,5 kb entspricht das 13 min. Es wurde eine Zyklenzahl von 16 für den Austausch einzelner Aminosäuren gewählt. Im Anschluss an die PCR wurde jedem PCR-Produkt 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/µl) zugesetzt. Dpn I baut die von E. coli amplifizierte und damit methylierte DNA ab. Die Reaktion wurde bei 37 °C für eine Stunde durchgeführt.

3.1.1.4. Ligation und Transformation (siehe auch 3.1.2. und 3.1.3.)

Eine weitere PCR-Reaktion wurde durchgeführt, um die Ligation der Rezeptor-Wildtyp-DNA in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor und die anschließende Transformation in E. coli zu überprüfen (siehe unten). Als Template für die Reaktion wurden 10 Bakterienkolonien, die auf den Agarplatten bei 37°C über Nacht nach der Transformation (3.1.3.2) gewachsen waren, untersucht. Jede Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen und nach Abimpfen in ein Reaktionsgefäß mit 2 µl Wasser überführt. Die Wassersuspension wurde zunächst für 2 min auf 95 ° C erhitzt. Nach Zugabe der PCR-Reagenzien wurde eine PCR durchgeführt (siehe Protokoll im Anhang 7.1.2).

Versuche wurden von Hollopeter et al. (2001) folgendermaßen durchgeführt: 48 h Wachstum in den Zellkulturplatten sowie Zugaben von 0,25 mM IBMX und 10 μ M Forskolin. Takasaki et al. (2001) kultivierten die Zellen für 24 h und setzten dann 1 mM IBMX und 1 μ M Forskolin zu.

Antagonist	pA ₂ -Wert	Quelle	Selektivität
Reaktiv Blau 2	6,03	Takasaki et al., 2001	nicht selektiv
2-Methylthio-AMP	6,44	Takasaki et al., 2001	nicht selektiv
2-Methylthio-AMP	7,96	Hollopeter et al., 2001	nicht selektiv
Cangrelor (AR-C69931MX)	9,77	Takasaki et al., 2001	blockt selektiv P2Y ₁₂ - und P2Y ₁₃ -Rezeptor
C1330-7	6,83	Hollopeter et al., 2001	nicht selektiv

Tabelle 3: Kompetitive Antagonisten am P2Y₁₂-Rezeptor mit experimentell ermittelten pA₂-Werten

Neben reversiblen, kompetitiven Antagonisten sind irreversibel wirkende Antagonisten bekannt. Die aktiven Metabolite der Thienopyridiene Clopidogrel (Savi et al., 2006) und Prasugrel (Niitsu et al., 2005) wirken als irreversible Antagonisten am P2Y₁₂-Rezeptor. Die klinische Bedeutung von Clopidogrel wurde oben im Kapitel 1.3 bereits erläutert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Wildtyp-Rezeptors und der mutierten Rezeptorkonstrukte durch Messung der Agonisten-induzierten Hemmung der zellulären cAMP-Konzentration als Maß für die Rezeptor-vermittelte Änderung der Adenylatcyclase-Aktivität überprüft. Analog zur in der Literatur beschriebenen Methode (Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2001) wurden hierzu ADP und sein Analogon 2-Methylthio-Adenosindiphosphat als Agonisten in Konzentrationen von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁴ M angewandt. Die in Zellen mit Wildtyprezeptor beobachtete Hemmung diente dabei als Kontrolle. Zellen wurden 2 Stunden mit ³H-Adenin inkubiert (1,5 μ Ci pro Well). Die Aktivität der Adenylatcyclase wurde durch Zugabe des zellmembrangängigen direkten Stimulators Forskolin 20 μ M vorstimuliert, um hemmende Effekte leichter erkennen zu können. Kurz vor Zugabe des Agonisten wurde Isobutylmethylxanthin (IBMX) in einer Endkonzentration von 200 μ M je Well zugesetzt, welches die Phosphodiesterase hemmt, so dass das gebildete cAMP vermindert abgebaut wurde. Durch den Agonisten wurde das G_{i/o}-Protein aktiviert und die zuvor durch Forskolin stimulierte Adenylatcyclase gehemmt. Dies wurde durch die Abnahme des zellulären Gehaltes an radioaktiv markiertem cAMP bestimmt (siehe Abbildung 4). [³H]-cAMP wurde hierzu säulenchromatographisch aufgetrennt.

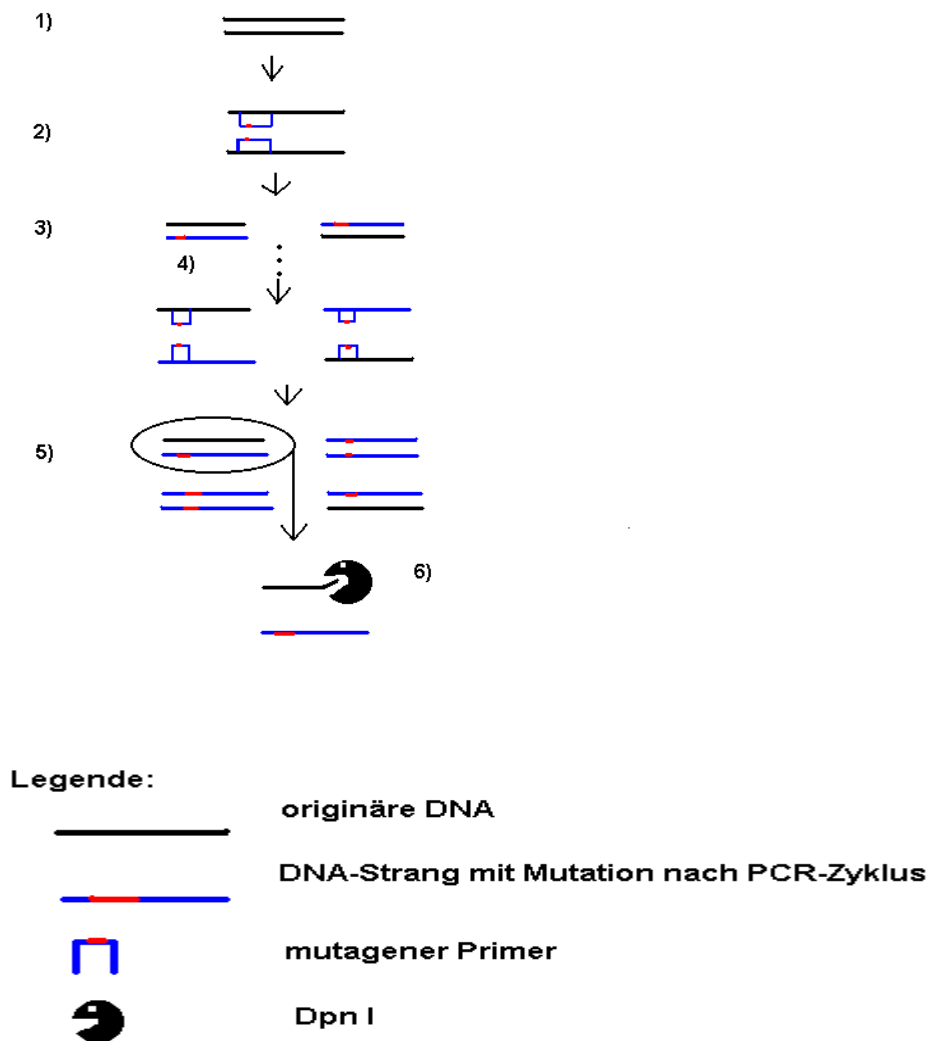


Abbildung 5: Ablauf der Mutagenese als schematische Darstellung der PCR mit mutagenen Primern

1) originäre DNA

2) Auftrennen in Einzelstränge und Anlagern des mutagenen Primers

3) das Ergebnis des 1. Zyklus sind gemischte DNA-Doppelstränge aus originärer DNA und mutierter DNA

4) nach diesem Schema laufen 16 Zyklen ab

5) am Ende der gesamten Reaktion liegt ein Gemisch aus doppelsträngiger DNA vor: beide Stränge mutiert – ein mutierter Strang mit einem originären Strang - beide Stränge originär (hier nicht gezeigt)

6) das Restriktionsenzym Dpn I baut die methylierte, originäre DNA ab.

Quelle: modifiziert nach Arbeitsanweisung in QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam)

3.1.2. Ligation der Rezeptor–DNA in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO–Vektor

Die für die Ligation benötigten Reagenzien einschließlich des Vektors sind unten aufgeführt (siehe 7.6.7.1.1). Es wurde das PCR-Produkt der RT-PCR (der Reaktion mit der Pfu-Polymerase) (siehe 3.1.1.2) verwendet (Abb.7 im Ergebniskapitel).

Ansatz: 3 µl des PCR Produktes
 0,75 µl Salzlösung aus dem Kit (NaCl – MgCl₂-Gemisch, 7.6.7.1.1)
 0,75 µl TOPO-Vektor

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt. Die Reaktion wurde für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Vektor trägt direkt nach der Bindungsstelle für die Topoisomerase I einen 4–Nukleotid 5´Einzelstrang–Überhang (GTGG) (siehe Abb.6). Zu diesem muss das PCR-Produkt eine komplementäre Sequenz haben, was durch Hinzufügen der Basen CACC (unterstrichen hervorgehoben in Tabelle 4) an den Beginn der gewünschten Sequenz im Forward-Primer erreicht wurde. Bei der Amplifikation im PCR-Verfahren wurde diese Sequenz nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA ebenfalls amplifiziert. Dadurch erhöhte sich die Effizienz einer korrekten Orientierung des PCR-Produktes im Vektor („directional cloning“).

hP2Y ₁₂ _forward	5´- <u>CACC</u> CAT GCA AGC CGT CGA CAA CCT C-3´
hP2Y ₁₂ _reverse	5´-CAT TGG AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3´

Tabelle 4: Verwendete Primer zur Amplifikation der cDNA des hP2Y₁₂.

Dargestellt ist das Primerpaar, das zur Amplifikation der cDNA nach Umschreiben der mRNA aus dem extrahierten Gehirngewebe und aus HEK-Zellen verwendet wurde. Der Forward-Primer trägt zu Beginn die Basensequenz CACC, die bei der Amplifikation der cDNA angefügt und mit amplifiziert wird. Durch diese zum Vektor komplementäre Sequenz kann die cDNA im späteren Ligationsverfahren korrekt ligiert werden.

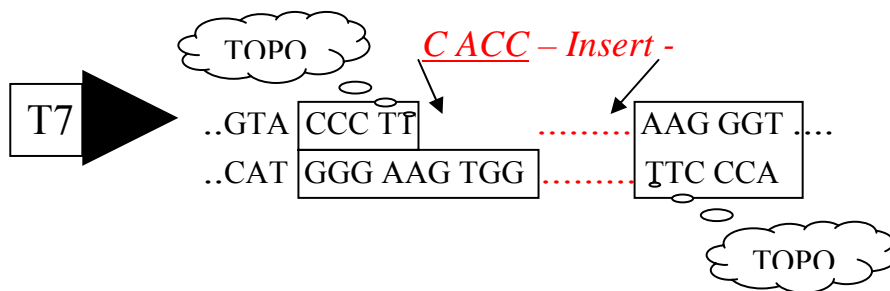
Die Topoisomerase I aus Vaccinien bindet an doppelsträngige DNA nach der Sequenz 5´-CCCTT und spaltet die Phosphodiesterbindungen in einem Einzelstrang (siehe Abb. 6). Die dadurch freiwerdende Energie wird zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3´-Ende des DNA-Stranges und einem Tyrosin-Rest (Tyr 274) der Topoisomerase I genutzt. Dadurch wird der Überhang mit der Sequenz 3´-GTGG-5´ frei. Das 5´-Ende des PCR-Produktes, das die komplementären Basenpaare zu dem Überhang der Vektorsequenz trägt (5´-CACC-PCR-Produkt-3´), kann nun an diese Stelle „andocken“. Die Topoisomerase wird aus der Bindung frei, indem die zuvor gelaufene Reaktion umgekehrt wird. Das PCR-Produkt wird auf diese Weise in den Vektor „ligiert“ (pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen).

Der Topoisomerase kommt damit Ligasefunktion zu, so dass diesem Reaktionsansatz keine Ligase zugefügt werden musste.

3.1.3. Transformation

3.1.3.1. Prinzip der Transformation

Dieses Verfahren wurde zur Vermehrung und Analyse der Plasmid-DNA verwendet, die für die Rezeptorproteine kodiert. Es wurden Top10-E. coli Bakterien verwendet (Invitrogen). Angewendete Schritte bei der Transformation von E. coli waren: Inkubationstemperatur bei nahezu 0 °C und die anschließende Durchführung eines kontrollierten Hitzeschocks bei 42 °C für 30 s (Harwood, 1996).



T7: T7-Promotor / priming site

TOPO: Topoisomerase

Insert: Rezeptor-DNA,

—> : an dieser Stelle des Vektors wird die Rezeptor-DNA ligiert

Abbildung 6:

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Klonierungsstelle des pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektors. Die Restriktionsschnittstelle der Topoisomerase ist graphisch hervorgehoben (TOPO). Rot dargestellt ist die zu ligierende Rezeptor-DNA (Insert), die zu Beginn die Basensequenz CACC als komplementäre Einheit zur Vektorsequenz tragen muss.

Quelle: verändert nach Arbeitsanweisung im pcDNA3.1 Directional TOPO-Expression Kit von Invitrogen (Karlsruhe).

3.1.3.2. Durchführung der Transformation

Es wurden TOP10-E. coli verwendet (Invitrogen; bereits zu je 50 µl aliquotiert). Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 2 µl des Ligationsansatzes (3.1.2) oder der Mutagenesereaktion (3.1.1.3.2) wurden hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte

ein „Hitze-Schock“ bei 42 °C für 30 sec. Direkt danach wurden die Bakterien wieder für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium (7.6.7.2.1) zugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 1 h horizontal mit ca. 250 U/min im Brutschrank bei 37 °C geschüttelt. 20 µl bzw. 200 µl dieser E. coli-Suspension wurden anschließend auf je einer Agarplatte mit 100 µg / ml Ampicillin ausgestrichen und 24 – 48 h im Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

3.1.4. Amplifikation von E. coli

Um E. coli quantitativ zu vermehren, wurde je eine Kolonie, die auf der Agarplatte gewachsen war (3.1.3.2), in ein Falcon 2059-Gefäß überimpft. Das Gefäß war mit 4 ml Nährlösung, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, gefüllt. Diese Bakterien-Suspension wurde für 12 bis maximal 16 Stunden horizontal mit ca. 250 U/min im Brutschrank bei 37 °C geschüttelt. Trübung der Lösung zeigte eine deutliche Zunahme der Bakterienzahl an.

3.1.5. Extraktion und Reinigung der Plasmid-DNA aus E. coli

Dieses Verfahren wurde verwendet, um Plasmide aus E. coli zu extrahieren. Dazu wurde eine Reagenzienzusammenstellung zur Aufreinigung von Qiagen (7.6.7.1.1) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei ~ 14.000 U/min durchgeführt. Dabei wurde stets die Filtersäule in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. 1,9 ml der Bakterien-Suspension (3.1.3) wurden in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches dann für 5-10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde quantitativ abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 250 µl RNase-Puffer resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Für genau 4,5 min wurde 250 µl Lysis-Puffer zugesetzt. Dadurch wurden die Bakterien einer Alkalisierung ausgesetzt. Zur Neutralisation wurden 350 µl Puffer zugefügt. Im Anschluss daran wurde für 10 min zentrifugiert. Dieser Überstand wurde quantitativ in eine Filtersäule überführt und für 2 min zentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde verworfen. Im Anschluss wurde 500 µl Puffer, welcher Zucker auswäscht, zugesetzt. Die Filtersäule wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde wieder verworfen. Danach wurde 750 µl Puffer, welcher Lipide auswäscht, hinzugefügt. Die Säule wurde abermals 2 min zentrifugiert. Danach wurde die Filtersäule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In die Mitte der Membran

wurde 50 µl eines 10 mM Tris-HCL- Puffers, pH 8,5, zur Elution der DNA pipettiert. Nach 1 min wurde die Filtersäule in dem Reaktionsgefäß für 2 min zentrifugiert. Dadurch wurde die gelöste DNA in dem Reaktionsgefäß aufgefangen.

3.1.6. DNA-Nachweisverfahren

3.1.6.1. Agarosegelelektrophorese

3.1.6.1.1. Allgemeines zur Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein DNA-Nachweisverfahren, um DNA-Stücke zwischen 200 und 20.000 Basenpaaren Länge nachweisen zu können (Harwood, 1996). Agarose ist ein lineares Polymer, das von Seetang extrahiert wird und als weißes Pulver erhältlich ist. Zum Gebrauch wird es unter Erhitzen auf 100 ° C in einer Pufferlösung gelöst. Dem Gel wurde 0,05 µg/ml des Fluorochroms Ethidiumbromid zugesetzt, um DNA-Banden später photographisch am UV-Messtisch darstellen zu können (siehe 3.1.5.1.3). Das Gel wurde in einen Horizontalgießstand gegossen. Die Geltaschen, in die die aufzutrennenden Proben hineinpipettiert werden, wurden mit Hilfe eines „Kammes“ gebildet. Dieser wurde in das noch flüssige Gel eingehängt. Die erhärtete Matrix enthält Poren, deren Größe von der Konzentration der eingesetzten Agarose abhängt. Als Puffer wurde ein Trisacetatpuffer (Zusammensetzung 7.6.5.2), pH 8,3, verwendet. Bei diesem pH-Wert liegen die sauren Phosphatgruppen der DNA dissoziiert vor, so dass die Migration von der Kathode zur Anode erfolgen kann. Auch dem Puffer wurde 0,05 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden mit einem Gemisch aus Bromphenol und Glycerin als Ladepuffer vermischt. Durch den Zusatz von Glycerin wird erreicht, dass die Proben in den Geltaschen zu Boden sinken. Bromphenol ist ein blauer Farbstoff, der ein genaues Pipettieren erleichtert und gleichzeitig eine Kontrolle des Verlaufes der Elektrophorese ermöglicht. Nach Anlage eines spannungskonstanten elektrischen Feldes (zunächst ca. 100 V, dann ca. 70 V) erfolgt zunächst eine Orientierung der Proben in den Geltaschen und dann die Migration durch das Gel. Zirkuläre Moleküle, wie z.B. Plasmide, „wandern“ schneller als ihr Molekulargewicht vermuten lässt. Die zirkuläre Formation der Basenpaare bewirkt eine scheinbare Verkleinerung der Moleküle, so dass diese schneller die Gelmatrix „durchwandern“ können als vergleichbare lineare Moleküle (Harwood, 1996).

3.1.6.1.2. Durchführung der Agarosegelelektrophorese

3.1.6.1.2.1. Elektrophorese zur Kontrolle der RT-PCR und Ligation der Rezeptor-DNA in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor

Zur Kontrolle der RT-PCR sowie der Ligierungsreaktion ist eine Gelelektrophorese mit einem 0,9 %igen-Agarosegel nach dem Protokoll im Anhang (7.2.1) durchgeführt worden.

3.1.6.1.2.2. Elektrophorese zur Kontrolle von extrahierter und gereinigter DNA aus E. coli

Für diese Kontrolle wurde ein 0,7 %iges-Agarosegel gegossen. Die Elektrophorese wurde wie in dem Protokoll im Anhang (7.2.1) beschrieben durchgeführt.

3.1.6.1.3. Photodokumentation

An einem Ultraviolett-Messtischplatz erfolgte die Auswertung der Gele. Die DNA wurde durch das zugesetzte Ethidiumbromid im ultravioletten Licht sichtbar. Der UV-Transilluminator hat eine Anregungswellenlänge von ca. 302 nm. Über einen UV-Filter und eine CCD-Kamera wurden Bilder aufgenommen und an ein Computersystem übertragen. Darstellung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms „Quantity one“ (BioRad).

3.1.6.2. Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme spalten Phosphodiesterbindungen der DNA innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Bei der die mutierten Rezeptorkonstrukte C17A und R256A kodierenden DNA wurden Restriktionsanalysen mit den Restriktionsenzymen Mlu NI bzw. Eco RI durchgeführt. Es wurden von beiden Mutanten zwei Kolonien (a und b) aufgearbeitet. Zur Funktionskontrolle des Enzyms wurde für C17A kodierende DNA mit Eco RI und für C97A kodierende DNA mit Mlu NI inkubiert. Die Analyse erfolgte nach dem Protokoll im Anhang (7.5). Die Auftrennung erfolgte über ein 0,9 %iges Agarosegel nach dem Protokoll im Anhang (7.2.1 und 7.2.2.3). Die Photodokumentation wurde wie unter 3.1.5.1.3 beschrieben durchgeführt.

3.1.6.3. Sequenzanalyse

3.1.6.3.1. Herstellung der Proben: Wildtyprezeptor-DNA und Mutanten-DNA

Die Thermocycling-DNA-Sequenzierungsprotokolle basieren auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode mit Didesoxynukleotiden, die von Sanger et al., 1977 beschrieben wurde. Für jeden verwendeten Primer mussten pro zu sequenzierender DNA-Sequenz vier separate Reaktionsansätze hergestellt werden, aufgetrennt nach den jeweils zugesetzten Didesoxynukleotiden: Didesoxy-GTP (G), Didesoxy-CTP (C), Didesoxy-TTP (T) und Didesoxy-ATP (A). Dazu wurde aus dem Primer und dem DNA-Template ein Mastermix angesetzt. Hiernach wurden vier Reaktionsgefäße mit G, C, T und A vorbereitet, zu denen dann der Mastermix zugefügt wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit Öl überschichtet. Die Durchführung der Reaktion erfolgte ähnlich wie beim PCR-Verfahren in einem Thermocycler nach dem Protokoll im Anhang (7.1.4). Es wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit“ der Firma Amersham verwendet (7.6.7.1). Insgesamt wurden vier fluorochromgekoppelte Primer verwendet, die über ihre Absorption im Infrarot-Licht nachgewiesen werden konnten: T7 und BGH, die zur Vektorsequenz komplementär sind und zum einen in forward (sense)-Richtung die kodierende Sequenz verlängern (T7), sowie zum anderen in reverse (antisense)-Richtung verlängern (BGH). Außerdem wurden noch zwei weitere Primer verwendet, die zu Abschnitten der Mitte der kodierenden Sequenz komplementär waren (siehe Abbildung 9), und ebenfalls einmal in forward (sense)-Richtung (hP2Y₁₂for517) und einmal in reverse (antisense)-Richtung (hP2Y₁₂rev621) den neuen DNA-Strang verlängert haben. Die Sequenzen dieser beiden Primer sind in Tabelle 5 dargestellt. Durch die Verwendung dieser vier Primer war sichergestellt, dass das ganze Insert komplett sequenziert wurde. So war der Ausschluss weiterer unerwünschter Mutationen möglich. Der Ansatz wurde auf Eis gemischt und musste wegen der Lichtempfindlichkeit der fluorochromgekoppelten Primer unter Rotlicht oder abgedunkeltem Licht vorbereitet werden.

hP2Y ₁₂ for517	5'-GGC ATT CAT GTT CTT ACT CTC-3'
hP2Y ₁₂ rev621	5'-TAT TTC ATG CCA GAC TAG ACC-3'
T7-forward (sense)	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
BGH-reverse (antisense)	5'-CCT CGA CTG TGC CTT CTA -3'

Tabelle 5: Nukleotidsequenzen der Sequenzierprimer

3.1.6.3.2.) Sequenzanalyse mit dem LI-COR 4200

Die Sequenzanalyse erfolgte durch die Auftrennung der Proben mittels einer Polyacrylamidgelelektrophorese nach dem im Anhang (7.3) beschriebenen Protokoll. Da die Polyacrylamidgelelektrophorese bei einer Temperatur von ca. 50 °C durchgeführt wurde, wurde als Puffer ein Boratpuffer (TBE) (Zusammensetzung siehe Material, 7.6.5.2) verwendet. Im Gegensatz zum Acetatpuffer (TAE), der bei der Agarosegelelektrophorese verwendet wurde, ist TBE etwas hitzestabiler. Die zuvor festgelegten Standardeinstellungen wurden über das Computersystem an den Sequenzer übermittelt (Protokoll im Anhang, 7.3.2). Die Proben wurden nach erfolgtem Vorlauf von 30 – 60 min aufgetragen und in 10 – 12 h elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Aktivierung der automatischen Datenaufnahme tastet ein Infrarot-Laser kontinuierlich das Gel auf der gesamten Breite ab. DNA-Fragmente, die sich nach ihrer Länge aufgetrennt haben, werden durch Absorption des markierten Primers nachgewiesen. Auf dem Bild erscheinen diese Stellen schwarz. Das gesamte Bild kann im BaseImager-Programm analysiert werden. Dazu legt man für jede Probe die einzelnen Spuren für G, C, T und A fest. Danach errechnet der Computer für jede Fragmentlänge die wahrscheinlichste Base aufgrund der Absorption in den vier Bahnen. Dabei werden auch mehrdeutige Basen angezeigt. Die aufgenommene Sequenz kann als Bilddatei gespeichert werden, welche mit Hilfe des Programms Vector NTI ausgewertet werden kann. Dieses Programm stellt die Basensequenz als Chromatogramm dar; das heißt, dass jeder der vier Basen eine farbliche Kurve zugeordnet wurde (siehe Abb. 11). Ein Gipfel (Peak) zeigt an, dass an dieser Stelle im Gel bei der Auftrennung von dieser Base das deutlichste und eindeutigste Signal ausgeht, welches der Laser erfassen kann. Wenn dieses Bild nicht eindeutig ist, muss dieser Sequenzabschnitt am Originalgelbild überprüft werden, welches während der Auftrennung vom Computer gespeichert wurde.

3.2. Zellkulturverfahren

Die funktionelle Analyse des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors erfolgte nach Expression der Rezeptorkonstrukte in ovariellen Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-K1, erhalten von der Arbeitsgruppe Prof. Bönisch, Pharmakologisches Institut Bonn). Die Zellen waren bei Passage 2 aliquotiert worden und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Arbeiten an den Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, an der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.2.1.1. Kultur von CHO-K1-Zellen

Die Anzucht und Kultivierung der CHO-Zellen wurde in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO₂ und in feuchter Atmosphäre durchgeführt. Der Boden der verwendeten Zellkulturflaschen hatte eine Fläche von 25 cm² oder 75 cm². Die Flaschen wurden mit einer Kappe mit integriertem Filter verschlossen, um die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten. Große Flaschen wurden verwendet, um Zellen in Kultur zu halten. Kleine Flaschen wurden für die Expressionsanalysen oder funktionelle Versuche verwendet. Das verwendete Nährmedium bestand aus F12, 1x Glutamax und 10 % fetalem Kälberserum (FBS), welches steril filtriert zugesetzt wurde. Zur Selektionierung von vektortragenden Zellen nach Transfektion (2.2.2.1) wurde dem Medium 800 µg/ml des Aminoglykosids G₄₁₈ zugesetzt. Für dieses Antibiotikum trägt der pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor ein Eukaryoten-Resistenzgen, das für eine Aminoglykosidtransferase kodiert (7.6.8.1). Eingefrorene Zellen wurden im Brutschrank zunächst für ca. 5 – 10 min langsam aufgetaut. Eine große Zellkulturflasche wurde mit 12 ml Medium gefüllt und im Brutschrank vorgewärmt. Die aufgetauten Zellen wurden dann vorsichtig in die Kulturflasche überführt und anschließend im Brutschrank gehalten. Bei Bedarf fand ein Mediumwechsel statt, um die Wachstumsbedingungen zu optimieren. Wenn die Zellen ca. 70 – 80 % konfluent waren, wurden sie gesplittet. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit F12 (ca. 12 ml in der großen Flasche, ca. 3 ml in der kleinen Flasche) im vorsichtigen Spülstrom „gewaschen“. Das Spülmedium wurde danach abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (ca. 3 ml in der großen Flasche, ca. 0,2 ml in der kleinen Flasche) bedeckt und 1 – 2 min im Brutschrank inkubiert. Das beginnende Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden wurde mit einem inversen Mikroskop kontrolliert. Die Lösung wurde vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden sofort mit Medium oder F12 wieder bedeckt (ca. 6 ml in der großen Flasche, ca. 1 ml in der kleinen Flasche). Im kräftigen Spülstrom wurden die Zellen dann so weit wie möglich vom Kulturflaschenboden abgelöst und somit resuspendiert. Die Zellen wurden dann, je nachdem in welchem Verhältnis die Kultur geteilt werden sollte, in die neue Kulturflasche überführt, die schon neues Medium (ca. 10 ml in der großen Flasche, ca. 2 ml in der kleinen Flasche) enthielt.

3.2.1.2. Kryokonservierung von CHO-K1-Zellen

Zum Einfrieren der Zellen aus einer kleinen Kulturflasche wurden die Zellen in G₄₁₈-freiem Medium resuspendiert, nachdem das Trypsin/EDTA-Gemisch eingewirkt hat (3.2.1.1). In ein 1,2 ml-Tiefgefriereröhrchen („Kryoröhrchen“) wurde 0,1 ml steriles Dimethylsulfoxid gefüllt und mit 1,1 ml der resuspendierten Zellen vorsichtig vermischt. Die Röhrchen wurden zum Vorgefrieren in den -20 °C-Gefrierschrank für ca. eine Stunde gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.1.3. Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Kammer durchgeführt. Dieses Verfahren wurde verwendet, um die Zellzahl für das cAMP-Assay abschätzen zu können. Dazu wurde beim Splittvorgang (3.2.1.1) ein Tropfen der vom Kulturflaschenboden abgelösten und in Medium oder F12 aufgenommenen Zellen in ein Zählfeld der Neubauer-Kammer gegeben. Es wurden vier Kleinstquadrate mit jeweils 0,05 mm Kantenlänge ausgezählt.

3.2.2. Expression des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors in CHO-K1-Zellen

3.2.2.1. Transfektion der CHO-K1-Zellen

Zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen zum einen im Verhältnis 1:6 gesplittet und im gleichen Schritt von der großen Kulturflasche in kleine Kulturflaschen überführt, so dass sich ein Gesamtfaktor von 1/18 ergab. Zur Transfektion sollten die Zellen zu ca. 70 % konfluent sein. Es wurden insgesamt 7 Kulturflaschen vorbereitet (Wildtyp und sechs Mutanten). Die Transfektion wurde mit Lipofectamin PlusTM Reagent nach einem Protokoll der Firma Invitrogen durchgeführt (siehe Abbildung 7). Es wurde Plasmid-DNA verwandt, die, wie oben beschrieben, aus E. coli-Kulturen gewonnen und dann aufgereinigt worden war (3.1.4). Zunächst wurden 6,25 µl der DNA-Lösung (ca. 0,5 µg / ml) in 250 µl F12 als serumfreies Medium gemischt. Anschließend wurden 10 µl PLUS-Reagenz zugesetzt und vermischt. Das Gemisch wurde für 15 min bei Raumtemperatur belassen. In dieser Zeit wurden 15 µl Lipofectamin in 250 µl F12 überführt und gemischt. Nach Ablauf der 15 min wurde dies dem DNA-Ansatz hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 15 min bei Raumtemperatur belassen, damit sich Komplexe ausbilden konnten. In

dieser Zeit wurde das Zellmedium von den Zellen in den vorbereiteten Kulturflaschen abgesaugt und durch 1 ml F12 ersetzt. Nach Ablauf der 15 min wurden die DNA-Komplexe auf die Zellen gegeben und für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde 1 ml des normalen Zellmediums mit Serum zugesetzt. Nach 48 h erfolgte der erste Mediumwechsel, wobei dieses Medium dann zusätzlich G₄₁₈ enthielt. In den folgenden zwei Wochen wurden alle zwei Tage Medienwechsel durchgeführt.

3.2.2.2. Selektion von Klonen der CHO-K1-Zellen

Zur Überprüfung der Expression und funktionellen Testung mussten die transfizierten CHO-Zellen kloniert werden. Nach erfolgter Transfektion mit Wildtyp oder mutierter Rezeptor-DNA waren die Zellkulturen nach 14 Tagen zu ca. 60 % konfluent. Eine Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen („48-Well-Platte“) wurde für je zwei Konstrukte genutzt, wobei jeweils nur 21 Wells pro Konstrukt verwendet wurden, um die Kontaminationsgefahr gering zu halten. Die Zellen wurden beim Splittvorgang in Medium aufgenommen (3.2.1.1) und mit F12 im Faktor 1/320 verdünnt. In jeweils 0,15 ml G₄₁₈-haltiges Medium wurden die Zellen in die Wells überführt. Insgesamt ergab sich dabei ein Verdünnungsfaktor von ca. 1/23000. Ein Klon wurde dann ausgewählt, wenn nur ein Zellhaufen im Well mikroskopisch zu sehen war und dieser Zellhaufen nicht zu schnell an Größe zugenommen hatte. Der Klon wurde dann in eine kleine Kulturflasche überführt und für weitere analytische Verfahren verwendet.

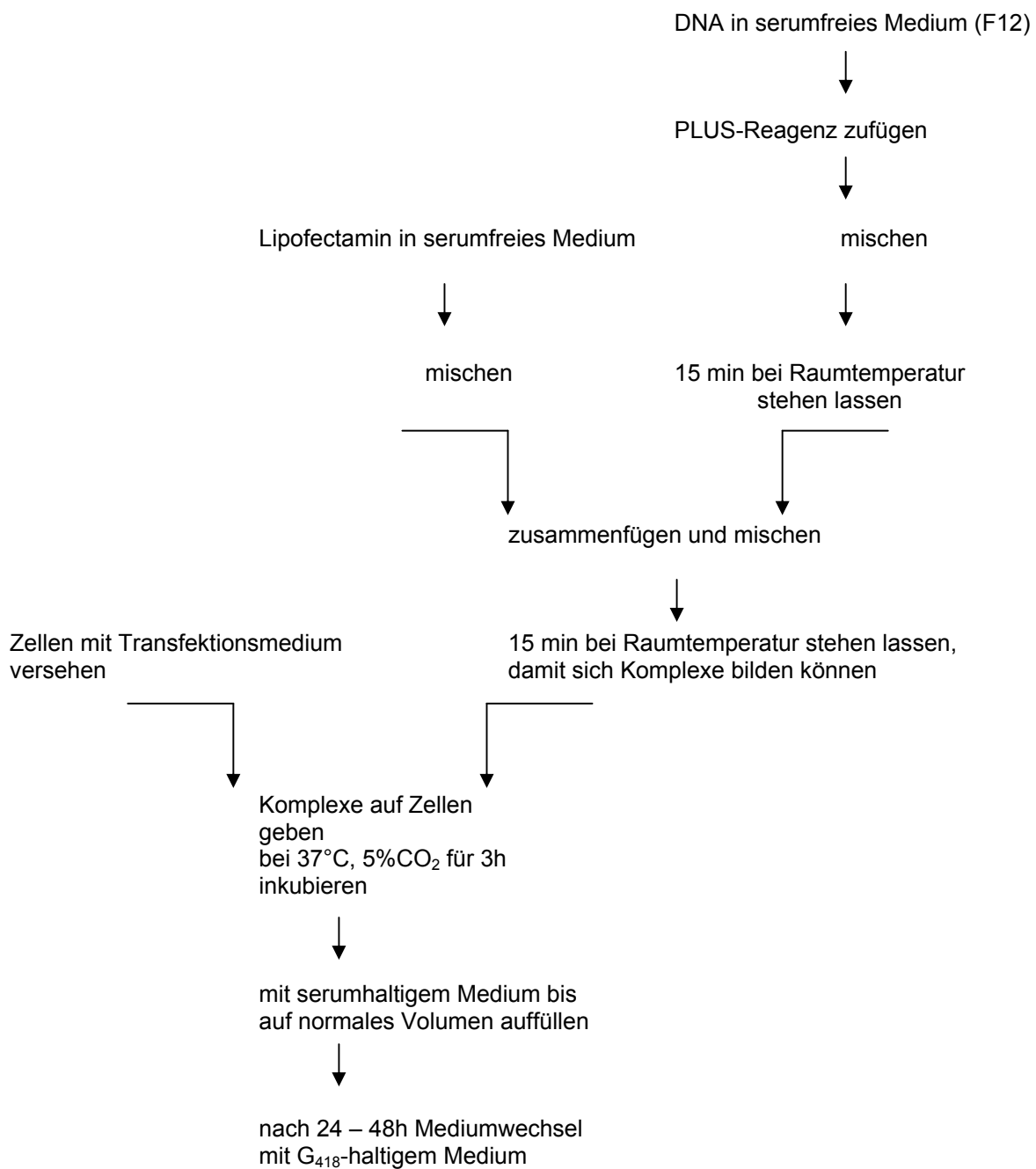


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der Durchführung der Transfektion von CHO-K1-Zellen

Quelle: Invitrogen life technologies (Karlsruhe) – Lipofectamine PlusTM Reagent

3.2.2.3. Immunofluoreszenzfärbung mit dem V5-FITC-Antikörper

Dieser Antikörper von der Firma Invitrogen ist gegen ein Epitop (eine 14 Aminosäuren lange Sequenz) im Rezeptor-Fusionsprotein gerichtet, für das der Vektor kodiert. Die Zellen wurden sieben Tage zuvor gesplittet, in Kultur gehalten und auf 8-Kammer-Objektträgern im Verhältnis von ca. 1:500 ausgesät. Nach diesen sieben Tagen waren die Zellen in den einzelnen Kammern zu ca. 70 – 80 % konfluent. In den Kammern befanden sich jeweils 1,5 – 2 ml Medium. Zur Verarbeitung von zwei Objektträgern mit je acht Kammern wurden am Versuchstag 4,5 ml PBS (Zusammensetzung siehe 7.6.5.3) mit 0,5 ml fetalem Kälberserum (10 %) gemischt. Von diesem Gemisch wurden 499 µl abgenommen und mit 1 µl der Antikörperlösung versetzt. Dieser Schritt musste bei abgedunkeltem Licht durchgeführt werden, da der Antikörper fluorochromgekoppelt ist. Zu den verbleibenden 4,5 ml wurden 4,5 µl Triton X-100 (0,1 %) zugesetzt („Blocklösung“). Die Objektträger wurden nach folgendem Protokoll bearbeitet: Das Medium wurde vorsichtig am Rand abgesaugt. Die Objektträger wurden zweimal mit PBS gewaschen. Auch hierbei wurde ein Flüssigkeitsrest vorsichtig, aber vollständig abgesaugt. Die Fixation erfolgte mit 100 %igem Methanol, welches für genau 5 min bei Raumtemperatur auf die Objektträger appliziert wurde. Nach Entfernen des Alkohols wurden die Kammern 5-mal für je 2 min mit PBS gewaschen; nach dem letzten Schritt wurde der Flüssigkeitsrest wieder durch vorsichtiges Absaugen vollständig entfernt. Dann wurde die Blocklösung (PBS mit FBS und Triton X-100) für 20 min bei Raumtemperatur zugesetzt. Dadurch sollten unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper maskiert werden. Diese Lösung wurde ebenfalls mittels Absaugen vollständig entfernt. Der Antikörper wurde mit 20 µl je Kammer eines 8-Kammer-Objektträgers in die Mitte der Kammer gegeben und wirkte für eine Stunde bei Dunkelheit und Raumtemperatur ein. Zum Schluss wurden die Objektträger zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen und die Kammern vorsichtig entfernt. Als Austrocknungsschutz wurde ein Deckglas auf dem Objektträger fixiert.

3.2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die Dokumentation der Färbung der Zellen erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskop mit einem Monochromator und einer CCD-Kamera sowie mit Hilfe des Programms TillVision (T.I.L.L Photonics). Über einen FITC-Filter und die CCD-Kamera wurden Bilder aufgenommen und mit dem Computerprogramm ausgewertet. Das hierfür verwendete Filterpaar erlaubt die Detektion von emittiertem Licht mit einer Wellenlänge größer als 515 nm („longpass-Filter“ 515 nm).

Es wurde zur Aufnahme der Bilder eine Exzitationswellenlänge von 475 nm, eine Belichtungszeit von 4 s, eine Auflösung von 640 x 480 Pixel sowie eine 40-fache Vergrößerung gewählt.

3.3. Funktionelle Analyse

3.3.1. Prinzip der cAMP-Bestimmung

CHO-K1-Zellen, die Wildtyp-Rezeptoren oder Mutanten stabil expremierten, wurden mittels eines cAMP-Assay funktionell untersucht. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturplatten ausgesät. Ziel war es, die Rezeptorfunktion über das Messen der rezeptorvermittelten Hemmung der zellulären Bildung von cAMP durch die Adenylatcyclase zu bestimmen. Hierzu wurde dem Inkubationsmedium radioaktiv markiertes Adenin ($[^3\text{H}]$ -Adenin) zugesetzt. Nach intrazellulärer Phosphorylierung zu ^3H -ATP wurde durch Aktivität der Adenylatcyclase dieses zu ^3H -cyclischem Adenosinmonophosphat (^3H -cAMP) umgewandelt. Da eine rezeptorvermittelte Hemmung (Kopplung des Rezeptors an Gi-Proteine) gemessen werden sollte, wurde die Adenylatcyclase gleichzeitig mit dem direkten Stimulator Forskolin (20 μM) stimuliert. Die Phosphodiesterase (PDE), die cAMP abbaut, wurde durch Zusatz von Isobutylmethylxanthin (IBMX, 200 μM) zum Inkubationspuffer gehemmt. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion wurden die Platten auf Eis gesetzt, die Lösung abgesaugt und eiskaltes Wasser zugefügt. Danach wurde eiskalte Trichloressigsäure mit nicht radioaktiv markiertem cAMP (100 μM) zugefügt. Die Auftrennung der Proben erfolgte säulenchromatographisch zunächst über ein kationisches Austauscherharz (Dowexsäulen) und in einem zweiten Schritt über Aluminiumsäulen. Das dabei aufgefangene radioaktiv markierte cAMP konnte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler, der die Anzahl radioaktiver Zerfälle misst, quantitativ als CPM (Zählereignisse pro Minute) gemessen werden.

3.3.2. Durchführung der cAMP-Bestimmung

18-24 h vor dem Versuch wurden Zellen in 6 Zellkulturplatten mit je 6 Vertiefungen („6-Well-Platten“) zu ca. 600.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden mit 1,25 ml Medium pro Vertiefung inkubiert. Das Medium enthielt 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G_{418} . Für den Versuch sollten die Zellen zu 80-90 % konfluent sein. Die Zellzahl wurde beim Splittvorgang durch Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (3.2.1.3) ermittelt, um standardisierte Bedingungen zu

gewährleisten. An jedem Versuchstag wurde die Versuchslösung neu angesetzt. Für 50 ml Versuchslösung, ausreichend für 6 Platten, wurden 72,05 mg Glucose, 297,9 mg HEPES, 5 ml NaCl-Stammlösung-10x, 38 ml Wasser und 5 ml KH_2PO_4 -Stammlösung-10x gemischt. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt (die Zusammensetzung der Stammlösungen ist im Anhang zu finden). Das Medium wurde aus den Vertiefungen der Zellkulturplatte sehr vorsichtig abgesaugt, durch je 300 μl der Inkubationslösung ersetzt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. 60 μl Lösung mit [2,8- ^3H]-Adenin (1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, PerkinElmer, Köln) wurden mit 1.94 ml der Inkubationslösung gemischt. Davon wurden 100 μl jeder Vertiefung zugefügt und anschließend wurde die Zellkulturplatte im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h 50 min wurden jeder Vertiefung 100 μl vorgewärmte Versuchslösung mit 1.2 mM IBMX (Phosphodiesteraseblocker; Endkonzentration 200 μM) zugefügt. Nach 10 min wurden in 100 μl Inkubationslösung Forskolin mit einer Endkonzentration von 20 μM und ADP als Agonisten des $\text{P}2\text{Y}_{12}$ -Rezeptors in Endkonzentrationen von 10 pM bis 100 μM zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde eine Vertiefung einer Zellkulturplatte nur mit Inkubationslösung und Forskolin in der Endkonzentration von 20 μM versetzt, als Negativkontrolle eine Vertiefung nur mit Inkubationslösung. Insgesamt befanden sich 600 μl Lösung in jeder Vertiefung. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Platten nach 10 min auf Eis gesetzt, die Lösung mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und 1 ml eiskaltes Wasser in jeder Vertiefung zugefügt. Nach weiteren 7,5 min erfolgte die Zugabe von 1 ml eiskalter 5%-iger Trichloressigsäure, versetzt mit 100 μM nicht radioaktiv markiertem cAMP. Die Platten standen anschließend eine Stunde auf Eis. Im Sprühstrahl einer Pipette wurden die Zellen im Anschluss zusätzlich mechanisch zerstört. Für die Chromatographie wurden aus jeder Vertiefung der Zellkulturplatte je 2 x 900 μl auf 2 Dowexsäulen aufgetragen. Mit 3 ml Wasser pro Säule wurden die Säulen gewaschen und im Anschluss in Aluminiumsäulen (1 g Al_2O_3 /Säule) mit 6 ml Wasser pro Säule eluiert. Auch diese wurden mit 7 ml Wasser pro Säule gewaschen. Erst dann wurden die Proben in Szintillationsgefäßen aufgefangen, indem mit 1,25 ml Tris-Puffer 100 mM, pH 8,5 in die Szintillationsgefäße eluiert wurde. 3 ml des Szintillatorgels wurden zugesetzt. Die Proben wurden zunächst kräftig manuell geschüttelt und anschließend durch einen Vortexer homogenisiert. Im Counter wurde die β -Zerfallsrate als Maß für den Gehalt an tritiummarkierten Verbindungen ermittelt. Die Säulenregeneration erfolgte nach dem in Tabelle 6 angegebenen Schema.

	Dowexsäulen	Aluminiumsäulen
vor dem Versuch	1) mit 3 ml Wasser aufschlämmen	1) mit 3 ml Wasser aufschlämmen
	2) 2,5 ml NaOH, 0,5 N	2) 2,5 ml Tris-Puffer, 500 mM pH 8,3
	3) 2,5 ml HCL, 1 N	3) 6 ml Wasser
	4) 6 ml Wasser	4) 6 ml Wasser
nach dem Versuch	1) mit 6 ml Wasser aufschlämmen	1) 5 ml Tris-Puffer, 500 mM pH 8,3
	2) mit Wasser überspülen, bis der Rand frei von Partikeln ist	2) mit Wasser überspülen, bis der Rand frei von Partikeln ist

Tabelle 6: Regenerationsschema der Dowexsäulen und der Aluminiumsäulen zur chromatographischen Bestimmung des cAMP-Gehaltes. Dazu wurde in der Versuchsanordnung selbst die Dowexsäulenreihe über die Aluminiumsäulenreihe gestellt. Zur Vorbereitung und Nachbereitung wurden die Säulen jedoch separat mit den unten angegebenen Eluaten gereinigt. Die Volumenangaben beziehen sich auf jeweils eine Säule der Säulenreihe.

3.3.3. Auswertung

Die gemessenen Werte der β -Zerfallsrate, die für Proben mit und ohne ADP erhalten wurden, wurden graphisch mit Hilfe des Programms „Graph Pad Prism“ dargestellt (siehe Abb. 13) und statistisch ausgewertet.

3.4. Statistische Verfahren

Es werden Mittelwerte mit dem mittleren Standardfehler angegeben. Zur statistischen Analyse wurden der t-Test oder (bei multiplen Vergleichen) eine Varianzanalyse gefolgt von dem „Multiple Comparison Post-Test nach Bonferroni“ durchgeführt (Programm Graph Pad Prism). Als Signifikanzgrenze wurde $P < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Molekularbiologie

4.1.1. Klonierung und Amplifikation der Rezeptor-Wildtyp-cDNA

4.1.1.1. Gewinnung der P2Y₁₂-Rezeptor-Wildtyp-cDNA

Als Vorlage zur Gewinnung der cDNA des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors wurde kommerziell erhältliche mRNA aus menschlichem Gehirngewebe (Clontech, Palo Alto USA) sowie zuvor isolierte mRNA aus HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) verwendet. Diese mRNA wurde unter Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und mittels PCR-Verfahren vermehrt. Dem Reaktionsansatz wurde DMSO zugefügt, da ohne DMSO keine Produkte in einer Gelelektrophorese vorhanden waren (Ergebnis nicht gezeigt). Nach Zusatz von DMSO wurde in jeder Reaktion eine Bande in der Agarosegelelektrophorese (Durchführung nach Protokoll im Anhang, 7.2.1) auf Höhe der 1.000 kb-Bande der Vergleichs-DNA-Leiter sichtbar. Man konnte also davon ausgehen, dass die Rezeptor-mRNA in humanem Gehirngewebe und in kultivierten humanen Nierenzellen vorhanden ist (siehe Abb. 8). Das nachgewiesene Produkt aus dem Gehirngewebe wurde für die weiteren Arbeitsschritte verwendet. Es ist ersichtlich, dass die Signalintensität schwächer ist als die Bande des Produktes aus den HEK-Zellen. Dafür weist das Produkt aus dem Gehirngewebe aber eine deutlich klarere Bande auf und ließ somit eine höhere Reinheit vermuten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden:

- 1) Die Rezeptor-mRNA ist in menschlichem Gehirngewebe und in Zellen aus embryonalem Nierengewebe vorhanden.
- 2) Der Reaktionsansatz zur quantitativen Amplifikation der cDNA erfordert DMSO, da ohne DMSO keine Produkte erhalten wurden. Jedes weitere PCR-Verfahren daher wurde mit 5 % DMSO durchgeführt.

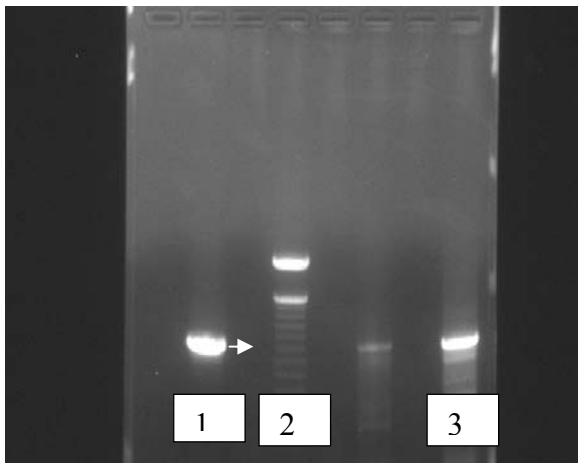


Abbildung 8: Nachweis von mRNA des humanen P2Y₁₂-Rezeptor in HEK-Zellen (1) und in humanem Gehirngewebe (3) mittels RT-PCR. Anhand der 100 bp-DNA-Leiter (2) ist ersichtlich, dass jeweils eine deutliche Bande bei ca. 1000 bp vorhanden ist (die 1000 bp-Linie ist mit einem Pfeil gekennzeichnet).

Es wurde eine zweizeitige PCR durchgeführt, im ersten Schritt zunächst eine RT-PCR mit wenigen Amplifikationszyklen: mRNA aus Gehirngewebe und aus HEK-Zellen wurde mit dem Enzym reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben; diese wurde mit 15 Zyklen durch die Taq-Polymerase vermehrt. In einem zweiten Schritt wurde die cDNA dann in 35 Zyklen durch die Pfu-Polymerase quantitativ amplifiziert. (Genaueres Protokoll siehe Anhang: PCR-Protokolle)

4.1.1.2. Ergebnis der Transformation und Amplifikation in *E. coli*

Durch Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA können einzelne Bakterien-Klone erzeugt werden, die dieses Plasmid vermehren. Auf diese Weise ist es möglich, größere Mengen des Plasmids herzustellen. Das Ergebnis einer Kontroll-PCR-Reaktion mit den verwendeten Primern (T7-Primer in forward (sense)-Richtung sowie reverse-Primer in antisense-Richtung), wie bei der Amplifikation der cDNA verwendet (3.1.1.2), stellte sicher, dass das Insert in korrekter Orientierung und mit einer Länge von ca. 1 kb vorhanden war. Eine Kolonie, für die das nachgewiesen werden konnte (Ergebnis nicht dargestellt), wurde über Nacht in 3 Ansätzen von je 4 ml Nährlösung amplifiziert. Nach 16 h Bebrütungszeit zeigte eine Trübung eine deutliche Zunahme der Bakterienzahl. Damit war auch das Zeitfenster von 12 – 16 h für ein erwartetes exponentielles Bakterienwachstum eingehalten. Im Folgenden wurde aus den drei Ansätzen die Plasmid-DNA extrahiert, wie unter 3.1.4 beschrieben. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Das Produkt mit dem deutlichsten Signal

wurde für die weiteren Versuche verwandt. Die beiden anderen Produkte wurden zunächst bei – 20 °C gelagert.

4.1.1.3. Sequenzierung der P2Y₁₂-Rezeptor-Wildtyp-DNA

Bevor die durch Ligation und Transformation gewonnene Wildtyp-DNA für weitere Verfahren wie Mutagenese und Transfektion eukaryotischer Zellen mit im Anschluss pharmakologisch funktionellen Versuchen genutzt werden konnte, musste das Produkt mittels Sequenzierung auf korrekte Basensequenz überprüft werden. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf der Kettenabbruch-Methode durch Didesoxynukleotide, die von Sanger et al., 1977 beschrieben wurde. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Der Vergleich der so bestimmten Sequenz mit der von Hollopeter et al. (2001) publizierten Sequenz (siehe auch Genbankeintrag #AF 313449) mittels des Programms Vector NTI (siehe 3.1.5.3.2) ergab, dass keine Deletionen vorlagen. In dem Basentriplett, das für die Aminosäure 309 kodiert, wurde ein Basenaustausch gefunden. Diese Aminosäure befindet sich im C-Terminus des Rezeptors. Hierbei handelte es sich um einen „single nucleotide polymorphism“ („CTG“ statt „TTG“, beide Triplets kodieren für Leucin), das heißt, die Mutation bewirkt keinen Aminosäureaustausch.

Es lassen sich also folgende Ergebnisse festhalten:

- 1) Die Transformation wies ein unerwartetes Ergebnis auf; es waren deutlich weniger Kolonien gewachsen, als nach der Protokollbeschreibung zu erwarten waren – 10 anstatt 1800 – 3000 und nur 10 % statt der erwarteten 90 % hatten das Insert aufgenommen.
- 2) Die anschließende DNA-Amplifikation war problemlos und zufriedenstellend nach Protokollvorgabe durchführbar.
- 3) Die anschließende Sequenzierung ergab, dass außer einer silent mutation im Basentriplett, das für die Aminosäure 309 kodiert, keine Abweichungen in der Basensequenz im Vergleich zum Genbankprodukt #AF 313449 vorhanden waren.

4.1.2. Zielgerichtete Mutagenese des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors

4.1.2.1. Primerkonstruktion für die Mutagenesereaktion

Ziel dieser Reaktion war es, einzelne Aminosäuren zielgerichtet auszutauschen: Cystein 17 im N-Terminus (C17), Cystein 97 an der Grenze Extrazellulärschleife 1/Transmembranregion 3 (C97), Cystein 175 in der Extrazellulärschleife 2 (C175), Cystein 270 in der Extrazellulärschleife 3 (C270), Arginin 256 (R256) in der Transmembranregion 6 und Lysin 280 (K280) in der Transmembranregion 7. Alle diese Aminosäuren sollten durch Alanin ersetzt werden (beispielsweise C17A). Neben den gewünschten Bedingungen für die Reaktionsdurchführung (2.1.1.3.2) sollte eine Änderung der Restriktionsschnittstellen mit beachtet werden. Bei R256A konnte durch den Austausch G zu C die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eco RI eliminiert werden. In Tabelle 7 sind die verwendeten mutagenen Primer dargestellt. Die ausgetauschten Basen sind fett hervorgehoben. Das für Alanin kodierende Triplet ist jeweils unterstrichen.

4.1.2.2. Transformation und Amplifikation der mutierten Rezeptor-DNA

Mit den entsprechenden Primern wurde die gewünschte Mutation zielgerichtet in die kodierende DNA eingefügt wie im Methodenkapitel beschrieben. Nach Transformation der jeweiligen Mutanten-DNA in *E. coli* war nach zwei Tagen ein deutliches Wachstum erkennbar: Die Agarplatte, die mit 200 µl der transformierten Bakteriensuspension beimpft worden war, wies bei allen Mutanten eher einen Bakterienrasen als einzeln stehende Kolonien auf. Dagegen waren einzelne Kolonien auf Platten zu finden, die nur mit 20 µl der Bakteriensuspension beimpft worden waren. Das Verfahren der Amplifikation, Extraktion und Reinigung der DNA wurde analog wie bei der Gewinnung der Wildtyprezeptor-DNA durchgeführt. Für die Amplifikation der Mutanten wurde je eine Kolonie von Plasmiden mit den Mutationen C97A, C175A, C270A und K280A und je zwei Kolonien von Plasmiden mit den Mutationen C17A und R256A verarbeitet.

C _{17A} _for/sense	5'-GGA ACA CCA GTC TG <u>G CCA</u> CCA GAG ACT ACA AAA TC-3'
C _{17A} _rev/antisense	5'-GAT TTT GTA GTC TCT GGT <u>GCC</u> CAG ACT GGT GTT CC -3'
C _{97A} _for/sense	5'-CTG AGA ACT TTT GTG <u>GCT</u> CAA GTT ACC TCC GTC-3'
C _{97A} _rev/antisense	5'-GAC GGA GGT AAC TTG <u>AGC</u> CAC AAAAGT TCT CAG-3'
C _{175A} _for/sense	5'-GAA TGT GAA GAA <u>AGC</u> CTC TTT CCT TAA ATC AGA GTT CG-3'
C _{175A} _rev/antisense	5'-CGA ACT CTG ATT TAA GGA AAG <u>AGG</u> CTT TCT TCA CAT TC-3'
C _{270A} _for/sense	5'-GGA TGT CTT TGA <u>CGC</u> CAC TGC TGA AAA TAC TCT G-3'
C _{270A} _rev/antisense	5'-CAG AGT ATT TTC AGC AGT <u>GGC</u> GTC AAA GAC ATC C-3'
R _{256A} _for/sense	5'-CCT TTC CAT TTT GCC <u>GCA</u> ATT CCT TAC ACC CTG AG-3'
R _{256A} _rev/antisense	5'-CTC AGG GTGTAA GGA ATT <u>GCG</u> GCA AAA TGG AAA GG-3'
K _{280A} _for/sense	5'-GAA AAT ACT CTG TTC TAT GTC <u>GCA</u> GAG AGC ACT CTG TGG-3'
K _{280A} _rev/antisense	5'-CCA CAG AGT GCT CTC <u>TGC</u> GAC ATA GAA CAG AGT ATT TTC-3'

Tabelle 7: Verwendete mutagene Primer

Dargestellt sind die verwendeten mutagenen Primer. Dabei sind die ausgetauschten Basen im forward (sense)-Primer blau hervorgehoben. Das dadurch für Alanin kodierende Triplet ist unterstrichen. Bei dem K_{280A}-Primer wurden unbeabsichtigt vier Basen ausgetauscht (▲); da sich dadurch aber keine weiteren Veränderungen der Aminosäuren ergab, wurde der Primer trotzdem verwendet. Für C_{17A} ergab sich durch die Mutation eine Änderung in der Restriktionsschnittstelle für Mlu NI (▲), siehe auch Tabelle 8. Für R_{256A} ergab sich durch den Austausch eine Änderung in der Restriktionsschnittstelle für Eco RI (▲), siehe auch Tabelle 8. Forward (for)/sense: Primer amplifiziert das Insert in forward-Richtung; reverse (rev)/antisense: Primer amplifiziert das Insert in reverse-Richtung.

4.1.2.3. Restriktionsanalyse

Mit dem Ziel, vor der Sequenzierung die erfolgreich durchgeführte Mutation zu erkennen, wurde bei DNA kodierend für die Rezeptormutante C_{17A} eine Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym Mlu NI durchgeführt, analog für R_{256A} mit Eco RI. Die veränderten Basensequenzen bei den Mutanten, und damit die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Pfeile deuten die Schnittstelle an, an der das Enzym die Phosphodiesterbindung in der DNA spaltet. Es wurden für beide Rezeptorkonstrukte je zwei Kolonien (a und b) aufgearbeitet und der Analyse unterzogen. Zur Funktionskontrolle des Enzyms wurde DNA kodierend für das C_{17A} Konstrukt mit Eco RI und C_{97A} kodierende DNA mit Mlu NI geschnitten. Die Auftrennung der Restriktionsprodukte erfolgte über ein Agarosegel. C_{17A} kodierende DNA erhielt durch die Mutation eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym Mlu NI, so dass insgesamt zwei Schnittstellen vorhanden waren. Das Plasmid wurde also an zwei

Stellen geschnitten. Bei der R256A kodierende DNA fiel eine vorhandene Schnittstelle für Eco RI weg, da statt des Guanin ein Cytosin eingebaut wurde (siehe Abbildung 10).

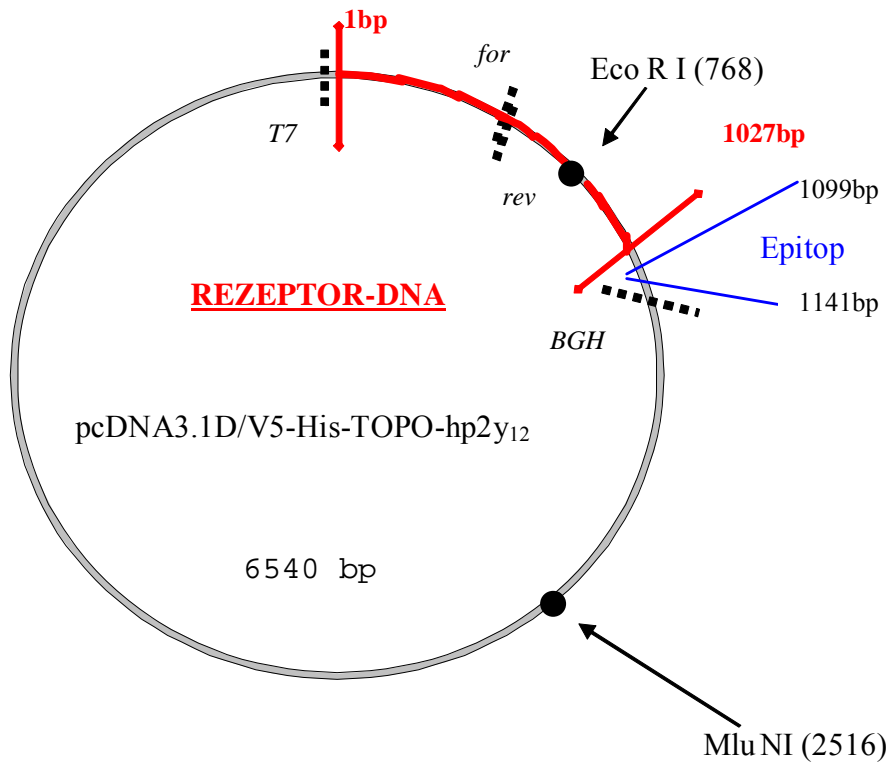
		Mlu NI
C17A	5'-...GTC <u>TGG CCA</u> CCA...-3'	5'- T G <u>G</u> C C A-3' ↑
		Eco RI
R256A	5'-...GCC <u>GCA ATT CCT</u> TAC...-3'	5'-G <u>A</u> A T T C-3' ↑

Tabelle 8: Vergleich der mutierten Stelle in der Rezeptor-DNA mit der Restriktionsschnittstelle der Restriktionsenzyme Mlu NI und Eco RI. Dargestellt ist die mutierte Sequenz in den Konstrukten C17A und R256A. Das mutierte Triplet ist kursiv hervorgehoben. Die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme Mlu NI und Eco RI sind zum einen im rechten Teil der Tabelle dargestellt. Zum anderen ist die dazugehörige Stelle in der Sequenz der beiden Konstrukte unterstrichen gezeigt. Die Pfeile zeigen, an welcher Stelle das Enzym die Phosphodiesterbindung spaltet. Bei R256A fällt die Hauptschnittstelle für Eco RI durch die Mutation weg (↑). Bei C17A ergibt sich eine zusätzliche Stelle für das Restriktionsenzym Mlu NI (↑).

Es war daher zu erwarten, dass das Plasmid bei der R256A kodierende DNA nicht geschnitten, bei der Kontrolle (Wildtyp-Sequenz) einmal geschnitten und bei der C17A kodierende DNA zweimal geschnitten werden sollte. Dabei durchwandert der nichtgeschnittene Plasmidring das Agarosegel schneller als das lineare, einfach geschnittene Fragment. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese mit den Produkten der Restriktionsanalyse. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt. Die Restriktion mit Mlu NI zeigte bei dem Produkt C17Aa zwei Fragmente (Abb. 10, Spur 2 und Tabelle 9, Zeile 2). Die Mutation war demnach erfolgreich. Die Restriktionreaktion mit dem Produkt C17Ab ergab ein Fragment (Abb.10, Spur 4 und Tabelle 9, Zeile 4). Hier hatte die Mutationsreaktion offensichtlich nicht funktioniert. Nach Restriktion mit Eco RI zeigte die Gelelektrophorese sowohl bei dem Produkt R256Aa als auch bei R256Ab eine Bande (Abb. 10, Spur 7 und 9 und Tabelle 9, Zeile 6 und 8). In Abbildung 10, Spur 1 ist das ungeschnittene Plasmid zu sehen. Die Produkte R256Aa und R256Ab sind auf der gleichen Höhe zu sehen. Das heißt, dass der Plasmidring erhalten geblieben sein muss. Die Mutation mit Wegfall der Restriktionsstelle war offensichtlich erfolgreich. Zur Funktionskontrolle des Enzyms wurde das Produkt C17A mit Eco RI und C97A mit Mlu NI behandelt. In beiden Fällen war ein langsamer laufendes Fragment zu erwarten, was sich im Agarose-Gelbild bestätigte (Abb. 10, Spuren 5 und 11).

Es lassen sich also folgende Ergebnisse festhalten:

- 1) Das Ergebnis der Restriktionsreaktion zeigte, dass die Mutation im Produkt C17Aa vorhanden war, nicht aber im Produkt C17Ab.
- 2) Weiterhin machte das Ergebnis einer weiteren Restriktionsreaktion wahrscheinlich, dass bei den Produkten R256Aa und R256Ab die Mutation vorhanden war. Zum Ausschluss weiterer und damit unerwünschter Mutationen war im Anschluss eine Sequenzierung nötig.



- ↔ DNA des hP2Y₁₂-Rezeptors im pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor
- Ansatzstellen der verwendeten Primer zum Sequenzieren der Rezeptormutanten
- Restriktionsschnittstellen für die verwendeten Enzyme der Restriktionsanalyse (siehe Abbildung 10)
- V5-Epitop

Abbildung 9: pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor mit kodierender Rezeptor-DNA von bp1–1027. Die Vektorsequenz enthält zudem die Sequenz des T7-Promotors. Anschließend an die für das Genprodukt mit Rezeptorepitopen kodierenden Sequenz trägt der Vektor die Kodierung für die „BGH reverse priming site“. Gegen das V5-Epitop des Rezeptorfusionsproteins ist der Antikörper gerichtet, der bei der Fluoreszenzfärbung verwendet wurde (siehe Abbildung 12).

Mutante	zu erwarten	Ergebnis
C ₁₇ Aa, ungeschnitten	Ring	Ring
C ₁₇ Aa, Mlu NI-Restriktion	<u>2 Fragmente</u>	<u>2 Fragmente</u>
C ₁₇ Ab, ungeschnitten	Ring	Ring
C ₁₇ Ab, Mlu NI-Restriktion	<i><u>2 Fragmente</u></i>	<i><u>1 Fragment</u></i>
R ₂₅₆ Aa, ungeschnitten	Ring	Ring
R ₂₅₆ Aa, Eco RI-Restriktion	<u>Ring</u>	Ring
R ₂₅₆ Ab, ungeschnitten	Ring	Ring
R ₂₅₆ Ab, Eco RI-Restriktion	<u>Ring</u>	<u>Ring</u>
Kontrolle		
C ₁₇ Ab, Eco RI-Restriktion	1 Fragment	1 Fragment
C ₉₇ A, Mlu NI-Restriktion	1 Fragment	1 Fragment
C ₉₇ A, ungeschnitten	Ring	Ring

Tabelle 9: Zusammenstellung der zu erwartenden und erhaltenen Ergebnisse der Restriktionsreaktion.

Dargestellt sind die erwarteten und durch eine Agarosegelelektrophorese bestätigten Ergebnisse. Fett und unterstrichen hervorgehoben ist die nachgewiesene Mutation in dem Konstrukt C₁₇Aa, da hier zwei Fragmente erwartet wurden und auch zwei Fragmente erhalten wurden. Ebenso hervorgehoben ist die wahrscheinliche Übereinstimmung der erwarteten und erhaltenen Ergebnisse für die Produkte R₂₅₆Aa und b. Kursiv und unterstrichen dargestellt ist die sicher nicht vorhandene Mutation im Konstrukt C₁₇Ab, da hier nur ein Fragment, statt der erwarteten zwei Fragmente erhalten wurde. Die Kontrollversuche haben gezeigt, dass die Enzyme funktionieren, da hier erwartetes und erhaltene Ergebnis in allen drei Fällen übereinstimmte.

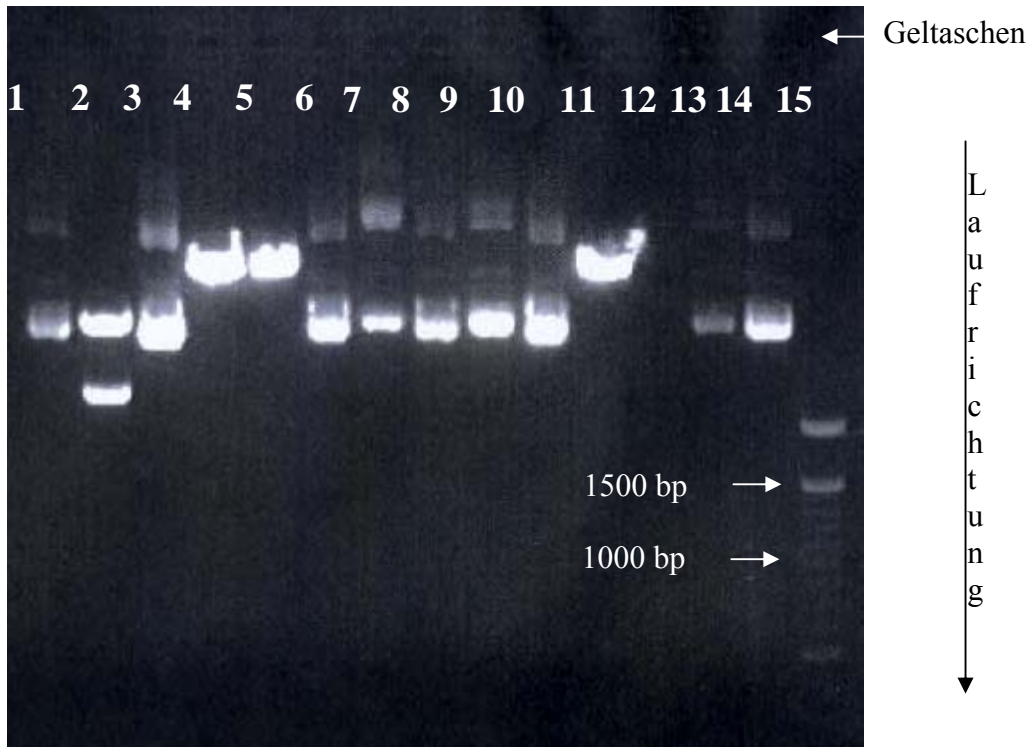


Abbildung 10: Gelelektrophorese mit Produkten der Restriktionsanalyse der Plasmide mit mutierter hP2Y₁₂-Rezeptor-DNA mit den Mutationen C₁₇A und R₂₅₆A mittels der Restriktionsenzyme Eco RI und Mlu NI:

Wildtyp-Rezeptor-Plasmide enthalten je eine Schnittstelle für Eco RI und für Mlu NI. Durch die Mutation von Cystein zu Alanin an Position 17 entsteht in der kodierenden DNA eine weitere Schnittstelle für Mlu NI. Das heißt, dass 2 Fragmente im Agarosegel sichtbar werden müssen. Durch die Mutation von Arginin zu Alanin an Position 256 fällt die Schnittstelle für Eco RI weg. Das heißt, dass der Plasmidring erhalten bleiben muss. Das erhaltene Plasmid (z.B. Spur 1) läuft in der Agarosegelelektrophorese schneller als ein lineares Fragment (z.B. Spur 5). (bp = Basenpaare) Banden von links nach rechts:

- 1) *C17Aa* kein Verdau mit Enzymen (Kontrolle; man erkennt das ungeschnittene Plasmid)
- 2) *C17Aa* Mlu NI-Restriktion: 2 Fragmente beweisen die zusätzliche Schnittstelle, weshalb dieses Produkt weiter verwandt wurde
- 3) *C17Ab*: Kontrolle
- 4) *C17Ab*: Mlu NI- Restriktion: nur ein Fragment erkennbar, d.h. keine weitere Schnittstelle vorhanden
- 5) *C17Ab*: Eco RI- Restriktion als Enzymkontrolle: ein Fragment erkennbar
- 6) *R256Aa*: Kontrolle
- 7) *R256Aa*: Eco RI- Restriktion: kein Unterschied zum unbehandelten Plasmid
- 8) *R256Ab*: Kontrolle
- 9) *R256Ab*: Eco RI- Restriktion: kein Unterschied zum unbehandelten Plasmid
- 10) *C97A*: Kontrolle
- 11) *C97A*: Mlu NI- Restriktion als Enzymkontrolle: ein Fragment erkennbar
- 12) frei
- 13) und 14) *K280A*: Es wurde überprüft, ob hier überhaupt genügend DNA vorhanden war
- 15) 100-Basenpaar DNA-Leiter

4.1.2.4. Ergebnis der Sequenzanalyse

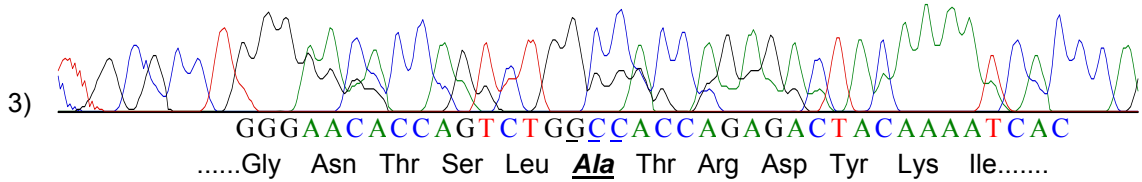
Durch die Sequenzierung mittels der Thermocycling-Methode wurde jedes durch Mutation erzeugte Konstrukt von mir untersucht. Dadurch wurde auch das Vorliegen weiterer, unerwünschter Mutationen ausgeschlossen. Ein Teil des Ergebnisses der Sequenzanalyse ist in Abbildung 11 dargestellt. Für das Konstrukt C17A zeigte die Sequenzanalyse wie erwartet die Basen GCC (kodierend für Alanin; siehe schwarzes und blaues Signal im dazugehörigen Chromatogramm in Zeile 3). Für das Konstrukt C97A bestätigte die Sequenzierung die erfolgreiche Mutation von TGT zu GCT (kodierend für Alanin; siehe schwarzes, blaues und rotes Signal im dazugehörigen Chromatogramm in Zeile 3). Für die Konstrukte C175A und C270A zeigte die Sequenzierung die erfolgreiche Mutation zu Alanin in der Basenfolge GCC (kodierend für Alanin; siehe schwarzes und blaues Signal im dazugehörigen Chromatogramm in Zeile 3). Bei Analyse des Konstruktes R256A bestätigte die Sequenzierung die erfolgreiche Mutation von CGA zu GCA (kodierend für Alanin; siehe schwarzes, blaues und grünes Signal im dazugehörigen Chromatogramm in Zeile 3). Für das Konstrukt K280A zeigte die Sequenzierung die erfolgreiche Mutation von AAA zu der Basenabfolge GCA (kodierend für Alanin; siehe schwarzes, blaues und grünes Signal im dazugehörigen Chromatogramm in Zeile 3). Für die analysierten Produkte konnten weitere unerwünschte Mutationen ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Als Vorlage zum Vergleich diente die zuvor sequenzierte Wildtyp-DNA. Das Unterprogramm „Contig express“ des Programms Vector-NTI erlaubt den Vergleich mehrerer Sequenzen, so dass auf diese Weise unerwünschte Mutationen ausgeschlossen werden konnten. Bei Verwendung des BGH-Primers in einem Volumen von 1 µl (Konzentration 1 µM) war nur ein schwaches Sequenziersignal nachweisbar, so dass das eingesetzte Volumen in der Sequenzierreaktion auf 2 µl erhöht werden musste und gleichzeitig mehr Reaktionsprodukt in die Geltaschen des Polyacrylamidgels aufgetragen wurde (4 µl statt 2 µl).

Es lassen sich also folgende Ergebnisse festhalten:

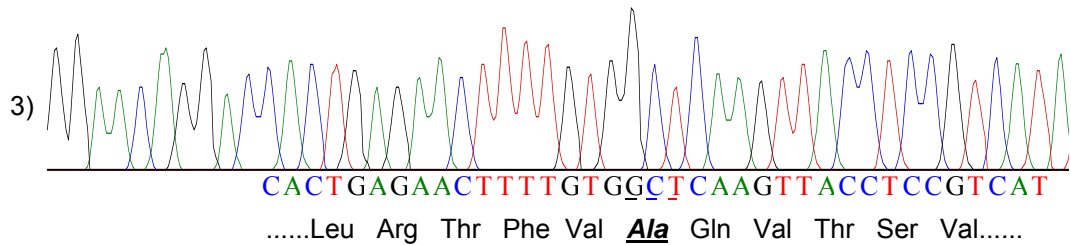
- 1) Die Sequenzierung bestätigte, dass alle geplanten Mutationen erfolgreich in die jeweiligen Konstrukte eingebaut werden konnten.
- 2) Durch vollständiges Sequenzieren der kodierenden Sequenz konnten weitere unerwünschte Mutationen ausgeschlossen werden.

C₁₇A

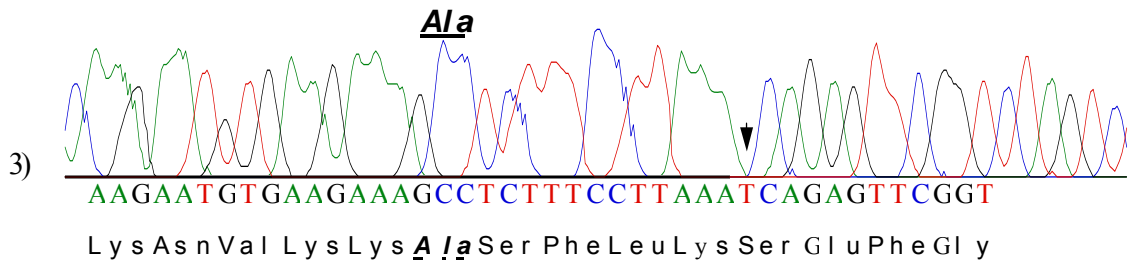
1)Gly Asn Thr Ser Leu Cys Thr Arg Asp Tyr Lys Ile.....
 2) TGGGAACACCAGTCTGTGCACCAGAGACTACAAAATCAC
 GGAACACCAGTCTGGCCACCAGAGACTACAAAATC
Ala

C₉₇A

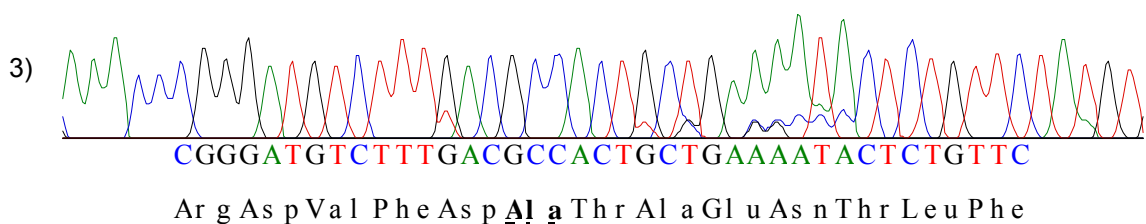
1)Leu Arg Thr Phe Val Cys Gln Val Thr Ser Val.....
 2) CACTGAGAACTTTTGTGTGTCAAGTTACCTCCGTCAT
 CTGAGAACTTTTGTGGCTCAAGTTACCTCCGTC
Ala

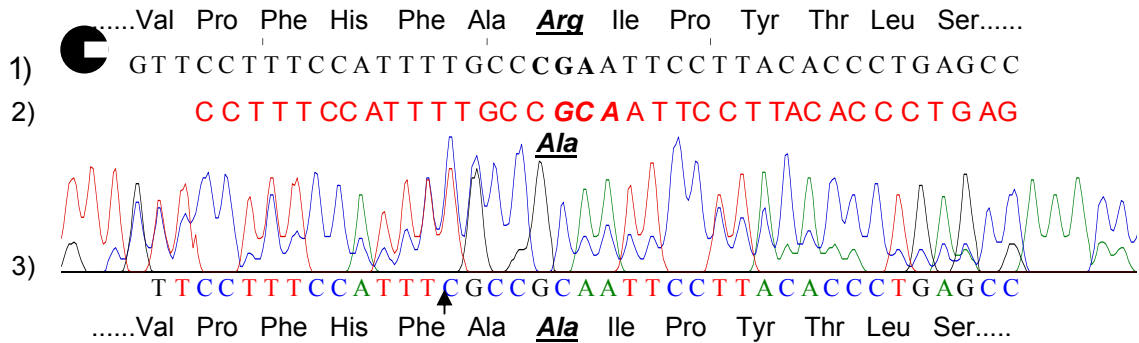
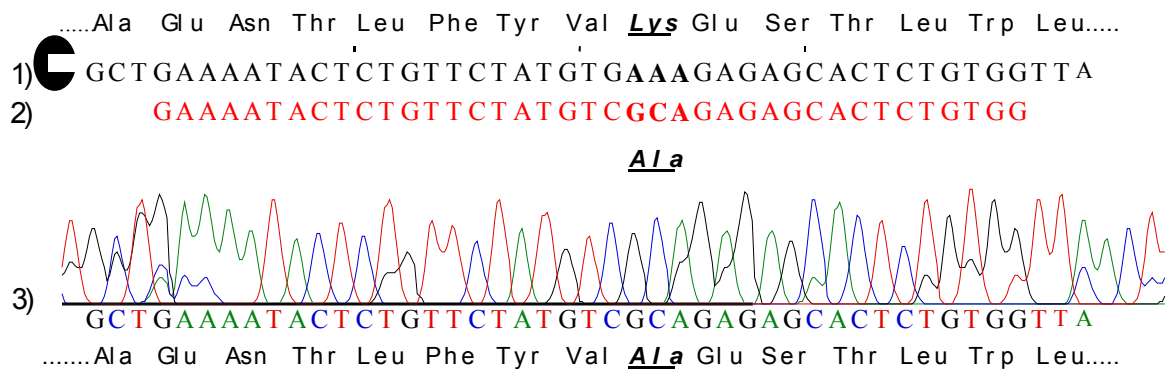
C₁₇₅A

1)Lys Asn Val Lys Lys Cys Ser Phe Leu Lys Ser Glu Phe Gly.....
 2) AAGAATGTGAAGAAATGCTCTTTCCTTAAATCAGAGTTCGGT
 GAATGTGAAGAAAGCCTCTTTCCTTAAATCAGAGTTCG
Ala

C₂₇₀A

1) ...Arg Asp Val Phe Asp Cys Thr Ala Glu Asn Thr Leu Phe.....
 2) CGG GAT GTC TTT GAC TGC ACT GCT GAA AAT ACT CTG TTC
 GGATGTCTTTGACGCCACTGCTGAAAATACTCTG
Ala



R₂₅₆AK₂₈₀A


- 1) originäre DNA. In der Nukleotidsequenz ist das zu mutierende Triplet hervorgehoben, darüber befindet sich die dazugehörige Aminosäuresequenz.
 - 2) mutagener Primer. In der Nukleotidsequenz ist das Triplet hervorgehoben, welches die Mutation zu Alanin (Ala) bewirkt.
 - 3) Chromatogramm. Das Ergebnis der Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft, was die Sequenz nach einzelnen Basen aufgetrennt darstellt, darunter befindet sich die Aminosäuresequenz mit Mutation zu Alanin (Ala)
-  : DpnI. Restriktionsenzym, welches nach Ablauf der Mutagenese die originäre (methylierte) DNA abbaut.

Abbildung 11: Identifizierung der zielgerichtet eingeführten Mutationen mittels Sequenzierung
Für jede Mutante sind Ausschnitte aus der Nukleotid- und der dazugehörigen Aminosäuresequenz gezeigt. Zeile 1) und 2) zeigen, wie die originäre DNA durch einen mutagenen Primer an dem gewünschten Nukleotidtriplett mutiert wurde, so dass im Rezeptor an dieser Stelle die Aminosäure Alanin (Ala) eingebaut wurde.

Bei **C175A** wurde am Originalgelbild überprüft, dass an der Stelle, an der scheinbar Thymin (T) fehlt (siehe **Pfeil**), zweifelsfrei Thymin nachweisbar war. Gleiches gilt für **R256A** (siehe **Pfeil**). Hier wurde am Originalgelbild zweifelsfrei überprüft, dass die Base Thymin, aber nicht Cystein nachweisbar war (eine spätere Überprüfung der Sequenzen in einem kommerziellen Labor – GATC, Konstanz – bestätigte die Ergebnisse).

4.2. Zellkultur

4.2.1.) Expression des P2Y₁₂-Rezeptors

4.2.1.1. Transfektion und Klonierung

Zur Expression und funktionellen Untersuchung des Rezeptors und der Mutationskonstrukte, wurden chinesische ovarielle Hamsterzellen (CHO-K1-Zellen) mit der Rezeptor-Wildtyp-DNA und der mutierten Rezeptor-DNA transfiziert. Die Transfektion wurde nach einem Protokoll der Firma Invitrogen wie unter 3.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Während der folgenden 15 Tage nach Transfektion wurde im Zwei-Tages-Rhythmus ein Mediumwechsel mit 800 µg/ml G418-haltigem Medium durchgeführt, um erfolgreich transfizierte Zellen zu isolieren. Nur die Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten und damit das Resistenzgen, das für die Aminoglykosidresistenz kodiert, exprimieren können, konnten weiterwachsen. Der Rest der Zellen ging zugrunde. Es konnten also nur vereinzelt Zellen am Boden anhaften, die sich dann vermehrten. Nach dem ersten Splittvorgang wuchsen die Zellen gleichmäßig, da jetzt nur noch solche vorhanden waren, die im G₄₁₈-haltigen Medium überleben konnten. Beim ersten Splittvorgang wurden Zellen in Zellkulturplatten mit Vertiefungen ausgesät, um einzelne Klone zu gewinnen. Nach einer Zeit von 18 – 26 Tagen konnten die klonierten Zellen mit Hilfe von Trypsin aus der Zellkulturplatte aufgenommen und in Kultur gebracht werden. Im Anschluss daran wurde mit diesen Zellen dann die Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt (vgl. 4.2.1.2).

4.2.1.2. Immunofluoreszenzfärbung mit dem V5-FITC-Antikörper (Invitrogen)

Ziel dieses Versuches war zu erkennen, ob das Rezeptor-Konstrukt (Wildtyp-Sequenz mit C-terminalen Rezeptor-Epitopen) und die mutierten Konstrukte überhaupt in der gewählten eukaryoten Zelle exprimiert werden konnten. Es war völlig unklar, inwieweit die vorgenommenen Mutationen in das Expressionsmuster eingegriffen hatten. Daher war es notwendig, vor der funktionellen Untersuchung die Expression des Rezeptors mittels Immunofluoreszenzfärbung zu überprüfen. Es wurde ein fluoreszenzgekoppelter Antikörper verwendet, der gegen eins der Epitope im Rezeptor-Fusions-Protein (eine 14 Aminosäuren lange Sequenz im Rezeptor-Fusionsprotein) gerichtet ist. Die direkte Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte in 8-Kammerobjektträgern nach dem Protokoll der Firma Invitrogen (wie unter 3.2.2.3 beschrieben). Die Auswertung der durch das Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder

(Einstellungen siehe 3.2.2.4) zeigte für jedes Konstrukt eine deutliche Anreicherung des Fluoreszenzsignals vor allem in der Membranregion. In Abbildung 12 sind diese Anreicherungen für den Wildtyprezeptor in Teil a und für die Mutationskonstrukte in Teil b bis h dargestellt (weiße Pfeile). Auch zellkernnah ließen sich z.T. Mehranreicherungen („Hotspots“) nachweisen (schwarzer Pfeil in Abbildung 12b). Es fiel auf, dass Zellen unterschiedlicher Klone nicht vergleichbar dicht gewachsen waren. Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren wiesen bei Betrachtung durch das Mikroskop einen dichten Rasen auf, so dass es schwierig war, einzeln liegende Zellen aufzunehmen. Zellen mit den Cystein-Mutationskonstrukten C17A und C270A waren dagegen durchweg nur sehr spärlich gewachsen, so dass alle vorhandenen Zellen in die jeweilige Auswertung mit eingeflossen waren. Bei den anderen vier Mutanten war der Kammerboden zum Teil lückenhaft bedeckt. Für die Auswertung waren jedoch genügend Zellen vorhanden. Es wurden pro Klon 2 - 4 Kammern untersucht, dabei 14 bis 35 Bilder pro Klon mit den oben genannten Einstellungen aufgenommen und mit Hilfe des Programmes Till Vision digital gespeichert. Von diesen Bildern wurden Einzelzellen für die statistische Auswertung ausgewählt (siehe Abbildung 13). Die Grenzen einzelner Zellen wurden mit Hilfe des Programms im digitalen Bild eingerahmt und deren Helligkeitswerte abzüglich des Hintergrundsignals errechnet. Dieser Wert wurde als Maß der Expression genommen. Schließlich wurden die Werte mehrerer Zellen gemittelt. Mittels dieses Mittelwertes – bezeichnet als relatives Fluoreszenzsignal in Abbildung 13 – wurde dann von jedem Zell-Typ ein Klon ausgewählt, der der funktionellen Testung zugeführt werden sollte: Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren–E5 sowie Zellen mit dem Konstrukten C17A–D6, C97A–E8, C175A–C3, C270A–F5, R256A–D2, und K280A–E7.

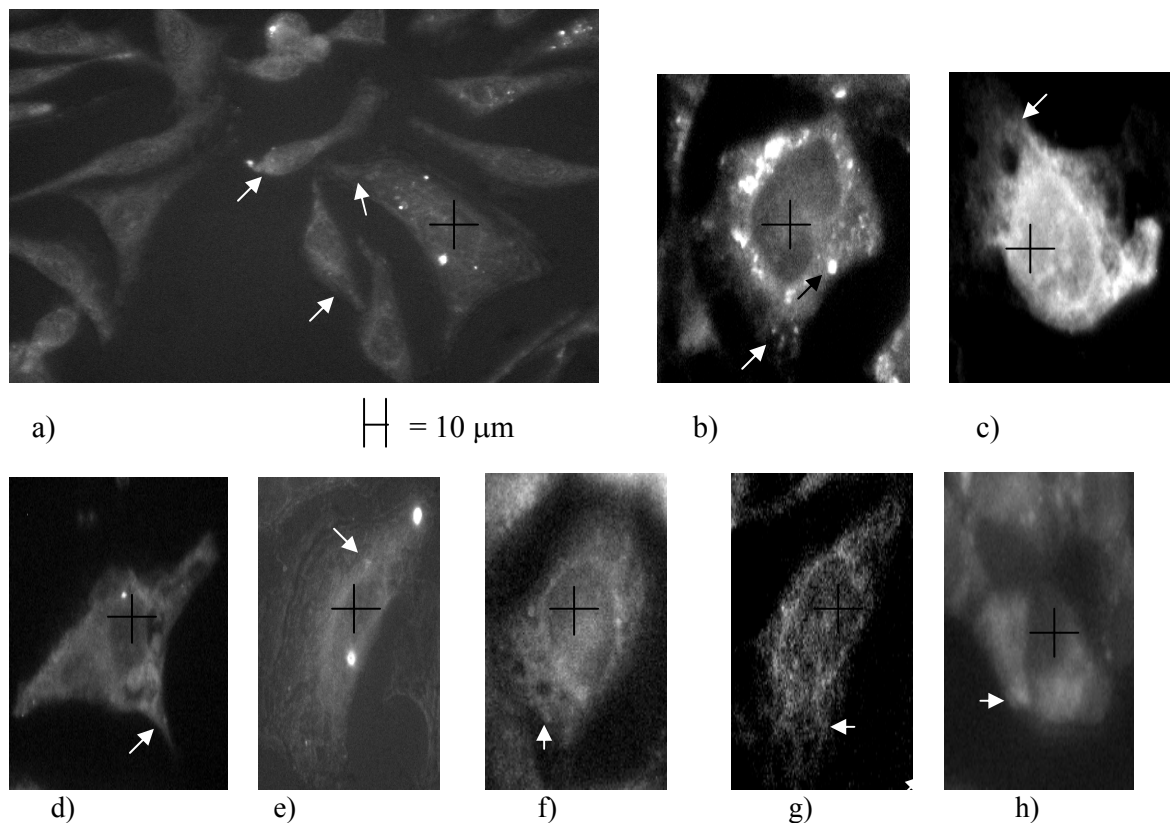


Abbildung 12: Direkte Immunofluoreszenzfärbung der transfizierten CHO-K1-Zellen mit dem V5FITC-Antikörper; Zellen mit a) Wildtyp-hP2Y12-Rezeptor, b) Konstrukt C17A, c) C97A, d) C175A, e) C270A, f) R256A-D2, g) R256A-B4, h) K280A

+: Zellkern

weißer Pfeil: Rezeptorfusionsprotein in der Zellmembran

schwarzer Pfeil: akkumulierte angefärbte Rezeptorfusionsproteine, die sich zellkernnah ansammeln
(nur in Abb. b)

Der FITC-konjugierte Antikörper ist gegen das V5-Epitop in den Rezeptorkonstrukten gerichtet. Die Zellen wurden nach einem einheitlichen Protokoll (siehe Methodenbeschreibung) behandelt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Auswertung erfolgte auf dem Computer mit Hilfe des Programms Till vision. Folgende Einstellungen wurden für die Aufnahmen gewählt: 475 nm Exzitationswellenlänge, 4 s Belichtungszeit, 40fache Vergrößerung. Die Helligkeitsskalierung wurde für alle Aufnahmen gleich gewählt.

Bild a) entspricht dabei dem Originalbild mit 640 x 480 Bildpunkten. Man erkennt mehrere einzelne CHO-K1-Zellen mit deutlichen Signalen an der Zellmembran (Pfeil). Die Bilder b – h sind Ausschnitte aus den Originalbildern, um eine Zelle einer jeden Mutante exemplarisch darzustellen. Die Anzahl der Zellen auf den Originalbildern waren: b): 23 Zellen; c) 29 Zellen; d) 2 Zellen; e) 8 Zellen; f) 35 Zellen; g) 31 Zellen; h) 66 Zellen

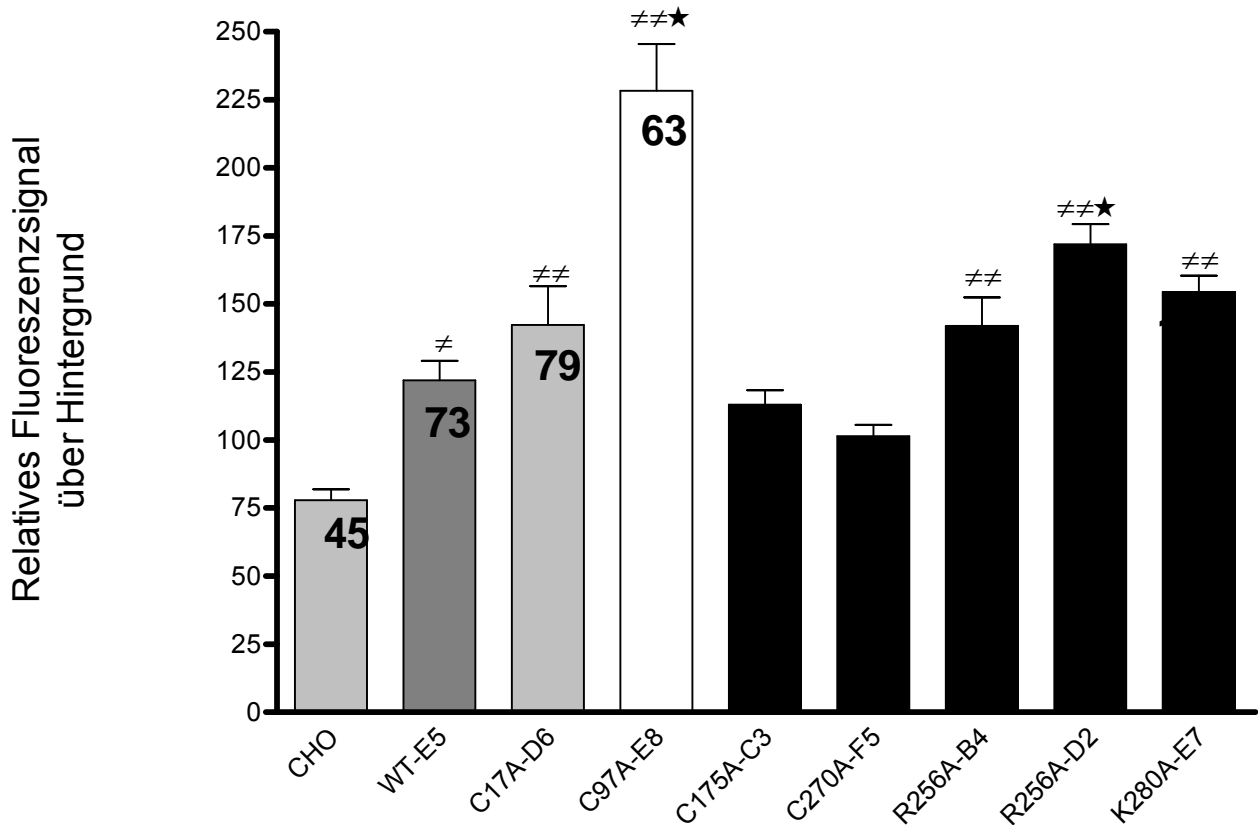


Abbildung 13: Statistische Analyse von Daten der in Abbildung 12 exemplarisch gezeigten Immunofluoreszenz-Färbung. CHO: nicht transfizierte CHO-Zellen; WT-E5: Klon E5 von CHO-Zellen, die mit der Wildtyp-hP2Y₁₂-Rezeptor-DNA transfiziert wurden; C17A-D6: Klon D6 von CHO-Zellen, die mit DNA kodierend für das Konstrukt C17A transfiziert wurden. Die Zellen wurden 7 Tage nach Aussaat mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen das V5-Epitop gefärbt. Das Fluoreszenzsignal über Zellarealen wurde als Maß der Expression der Rezeptorproteine gemessen. Mittelwerte \pm Standardfehler von (n) ausgewerteten Zellen. Varianzanalyse gefolgt vom Bonferroni Post-Test: ≠, ≠≠: signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ und $P < 0,01$ bei Test gegen nicht transfizierte CHO-Zellen; ★: $P < 0,01$ bei Test gegen den Wildtypklon; Zahl in den Balken: Anzahl ausgewerteter Zellen.

Die Messwerte der Klone wurden mit statistischen Verfahren verglichen. Alle Konstrukte wurden auf eine Kontrollgruppe von nichttransfizierten CHO-K1-Zellen bezogen und untereinander in Bezug gesetzt. Dabei ergaben sich im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen statistisch erhöhte Signale für Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor, den Cysteinmutationskonstrukten C17A und C97A, dem Konstrukt R256A (zwei getestete Klone) und dem Konstrukt K280A. Testung der Signalwerte von nichttransfizierte CHO-K1-Zellen gegen Werte für Zell-Klone mit den

Konstrukten C175A und C270A zeigte keine Signifikanz (Abbildung 13). Der statistische Vergleich zeigte auch gegenüber Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor nochmals erhöhte Werte in Zellen mit dem Konstrukt C97A (siehe Abbildung 13, Balken C97A-E8) und dem Konstrukt R256A (siehe Abbildung 13, Balken R256A-D2).

Es lassen sich also folgende Ergebnisse festhalten:

- 1) Sowohl mit Wildtyp-Rezeptor-DNA als auch mit DNA für mutierte Rezeptorkonstrukte transfizierte Zellen wiesen Signale auf, die vor allem in der Membran gelegen waren.
- 2) Die statische Analyse zeigt im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (CHO) eine signifikante Expression des Wildtyp-Rezeptors und der Konstrukte C17A, C97A, R256A und K280A. Die Analyse zeigt weiter, dass die Expressionsdichten der Mutanten C97A und R256A (Klon D2) sogar stärker sind als diejenige des Zellklons mit dem Wildtyp-Rezeptor.
- 3) Folgende Klone wurden für die weitere Analyse ausgewählt: Wildtyp-Rezeptor-E5, C17A-D6, C97A-E8, R256A-D2, K280A-E7; der zweitbeste Klon R256A-B4 sowie die Klone C175A-C3 und C270A-F5 wurden ebenfalls funktionell untersucht.

4.3. Funktionelle Analyse mittels Bestimmung zellulärer cAMP-Konzentration

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist über ein G_{i/o}-Protein hemmend an die Adenylatcyclase gekoppelt (Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2001, siehe Abbildung 4). Wie oben (Kapitel 2.5.) bereits dargestellt, wurde die Funktion des Wildtyp-Rezeptors und der mutierten Rezeptorkonstrukte durch Messung der Agonisten-induzierten Hemmung der zellulären cAMP-Bildung überprüft. Hierzu wurde ADP als Agonist verwendet (in einem Vorversuch zur Optimierung der Methode auch 2-Methylthio-ADP). Die in Zellen mit Wildtyprezeptor beobachtete Hemmung diente dabei als Kontrolle. Nach Vorinkubation der Zellen mit [³H]-Adenin wurde der zelluläre Gehalt an [³H]-cAMP nach einer säulenchromatographischen Trennung mittels Szintillationsmessung bestimmt. Um Hemmeffekte leichter nachweisen zu können, wurde die Aktivität der Adenylatcyclase durch Zugabe von Forskolin stimuliert. In Zellen mit dem Wildtyprezeptor führte Zugabe von Forskolin 20 µM zu einem deutlichen Anstieg des Gehaltes der Zellen an [³H]-cAMP (Anstieg von 1456±153 cpm pro Kavität, n = 7, auf 2579±128 cpm pro Kavität, n = 10, in Anwesenheit von Forskolin; P < 0,01). In Zellen mit den Rezeptorkonstrukten steigerte Forskolin ebenfalls den Gehalt an [³H]-cAMP; es gab keine

Unterschiede zu den Werten, die an den Zellen mit Wildtyprezeptoren bestimmt worden waren (Daten nicht gezeigt; Varianzanalyse gefolgt vom Tukey Post-Test). In Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor hemmte ADP die Forskolin-induzierte Bildung von [³H]-cAMP in konzentrationsabhängiger Weise mit signifikanten Effekten in den Konzentrationen 10⁻⁵ und 10⁻⁴ M (Abbildung 14a; schwarze Symbole). An Zellen mit der Rezeptormutante R256A führte ADP erst in einer Konzentration von 10⁻⁴ M zu einem signifikanten Hemmeffekt. Die Konzentrations-Wirkungskurve von ADP war bei dieser Mutante nach rechts verschoben; der Unterschied der Effekte von ADP 10⁻⁴ M an Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren und dem R256A-Konstrukt ist statistisch signifikant (Abbildung 14a). An Zellen mit den Rezeptorkonstrukten C17A, C97A, C175A und C270A verursachte ADP in zumindest einer getesteten Konzentration ebenfalls eine statistisch signifikante Hemmung der cAMP-Bildung (Abbildung 14 b). In Zellen mit dem Konstrukt C97A war der Effekt von ADP 10⁻⁴ M signifikant geringer als derjenige, der an Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren beobachtet wurde (Abbildung 14 b). An Zellen mit der Lysinmutante K280A hatte ADP keinen Effekt (Abbildung 14c). Der Unterschied des Effektes von ADP 10⁻⁴ M an Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren und des fehlenden Effektes von ADP 10⁻⁴ M an Zellen mit dem K280A-Konstrukt ist statistisch signifikant (Abbildung 14c). Insgesamt lassen sich für die pharmakologische Analyse der Eigenschaften des Wildtyp-Rezeptors und der mutierten Rezeptorkonstrukte folgende Ergebnisse festhalten: Eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve des Agonisten lässt sich für das Konstrukt R256A, in dem Arginin an Position 256 durch Alanin ersetzt wurde, feststellen. Die Aktivierbarkeit des Konstruktes K280A ist vollständig aufgehoben. Für drei Konstrukte, bei denen extrazelluläre Cysteine durch Alanin ersetzt wurden (C17A, C175A und C270A), lassen sich keine deutlichen Unterschiede zur Funktion des Wildtyp-Rezeptors erkennen; am C97A-Konstrukt wirkt ADP schwächer. Bei der Durchführung der Versuche wurde deutlich, dass die Methodik zunächst optimiert werden musste, da zunächst keine Hemmung der zellulären cAMP-Bildung für Zellen mit dem Wildtyprezeptor beobachtet wurde. Eine optimale Wachstumszeit in den Zellkulturplatten von 18 – 24 h wurde bestimmt. Um eine Freisetzung von endogenen Nukleotiden zu vermeiden, wurden Erschütterungen der Zellkulturplatten vermieden und Medienwechsel vorsichtig durchgeführt. Als Inkubationsmedien wurden serumfreie Lösungen verwendet, um Nukleotidase-Aktivität des Mediums auszuschließen.

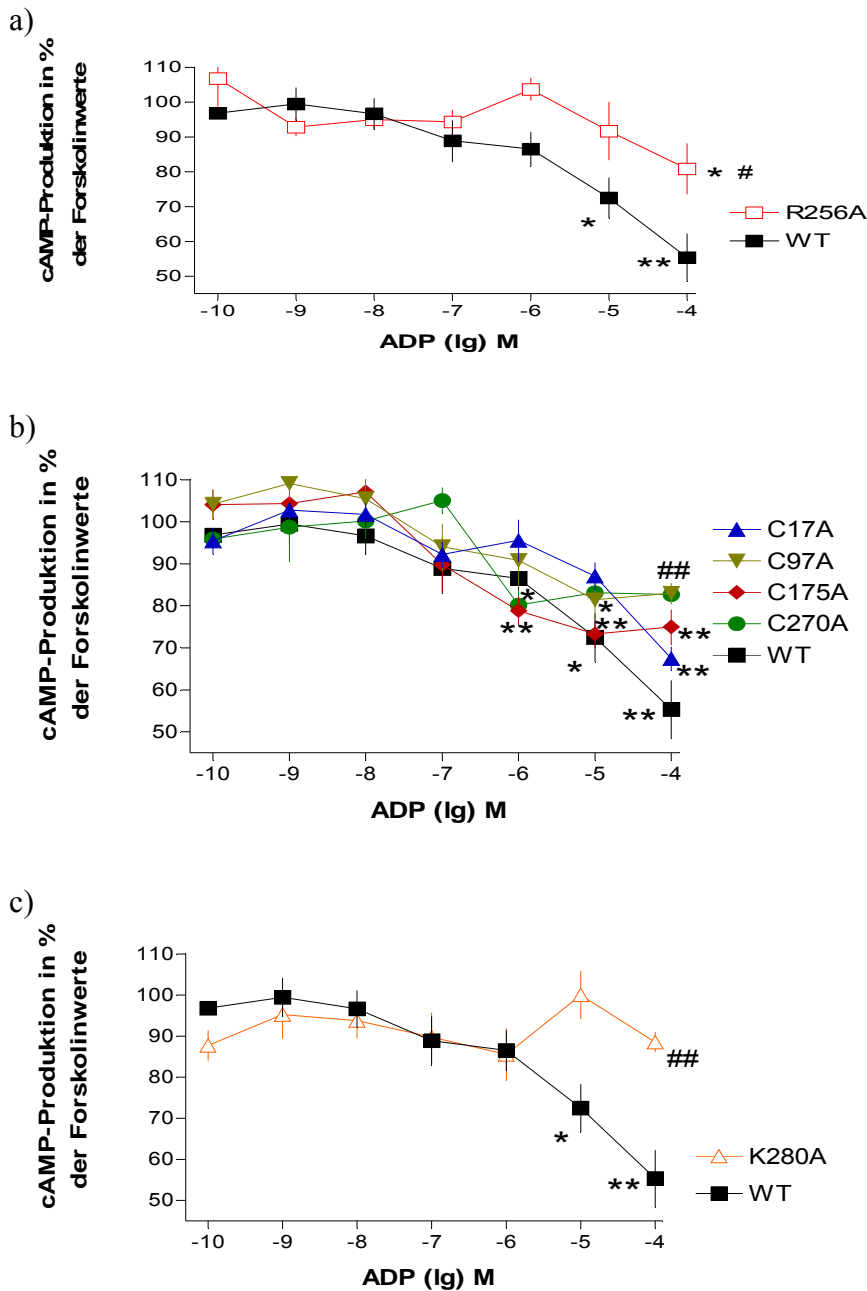


Abbildung 14: Hemmung des zellulären cAMP-Gehaltes durch Adenosindiphosphat (ADP) in CHO-Zellen, die humane P2Y12-Rezeptoren (WT, Wildtyp-Rezeptor) oder Rezeptor-Mutanten exprimieren (a: R256A; b: C17A, C97A, C175A oder C270A); c: K280A). Die Zellen wurden mit [³H]-Adenin vorinkubiert. ADP wurde in den angegebenen Konzentrationen (lg der molaren Konzentration) zusammen mit Forskolin 20 μM zugegeben. Angegeben ist der säulenchromatographisch aufgetrennte zelluläre [³H]-cAMP-Gehalt in % des Gehaltes der jeweiligen Kontrolle ([³H]-cAMP-Gehalt in Gegenwart von Forskolin ohne Zugabe von ADP). Mittelwerte ± Standardfehler von 3 bis 13 Experimenten. Varianzanalyse gefolgt vom Bonferroni Post-Test: *, **: signifikanter Unterschied mit P < 0,05 bzw. P < 0,01 bei Test gegen zugehörige Kontrolle; #, ##: P < 0,05 bzw. P < 0,01 bei Test gegen entsprechenden Wert in Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor.

5. Diskussion

5.1. Methodenauswahl

5.1.1. Mutagenesestudie

Ziel dieser Arbeit war es, eine erste Analyse der Ligandenbindungsstruktur des menschlichen P2Y₁₂-Rezeptors durchzuführen. Der Rezeptor war nach langer Suche erst im Jahre 2001 molekular identifiziert worden (Hollopeter et al., 2001, Takasaki et al., 2001, Zhang et al., 2001). Trotz der großen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung des P2Y₁₂-Rezeptors ist über die molekularen Eigenschaften des Rezeptors erst wenig bekannt. Als Grundlage für die Analyse wurde in dieser Arbeit die Technik der Mutagenese verwandt. Der P2Y₁-Rezeptor war in den letzten Jahren ebenfalls mit dieser Technik untersucht worden. Die am P2Y₁-Rezeptor erhobenen Daten wurden zur Auswahl der Aminosäuren genutzt, deren funktionelle Bedeutung in der vorliegenden Studie untersucht werden sollte. Der mögliche Vergleich mit Daten des P2Y₁-Rezeptors ließ es sinnvoll erscheinen, diese Technik auch in vorliegender Arbeit zu verwenden. Eine theoretische Alternative wäre die Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse gewesen. Jedoch müsste man zunächst versuchen, das Protein zu kristallisieren. Dies ist bisher aber erst im Jahr 2000 für Rhodopsin als Prototyp für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor erstmals erfolgreich angewandt worden (Palczewski et al., 2000). Erst 2007 wurde eine Röntgenstrukturanalyse des ersten klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, des β_2 -Adrenozeptors, publiziert (Rasmussen et al., 2007). Somit handelt es sich noch nicht um eine Standardmethode. Zudem würde eine Röntgenstrukturanalyse funktionelle Aspekte wie das Andocken eines Agonisten zumindest zurzeit noch nicht berücksichtigen. Es stellt sich dennoch die Frage, wie die Ergebnisse einer Mutagenesestudie zu interpretieren sind. Colquhoun widmete sich 1998 unter anderem dieser Frage. Es muss unterschieden werden, ob durch die Mutation alleine die Bindungsfähigkeit eines Liganden gestört oder die Fähigkeit zur Konformationsänderung beeinträchtigt ist oder gar dies auf beide Mechanismen zutrifft. Derzeit gibt es keine Verfahren, die dies genau zu unterscheiden vermögen. Dieser Sachverhalt muss bei der Interpretation der Mutagenesergebnisse mit berücksichtigt werden. In Zukunft noch durchzuführende Versuche mit Antagonisten könnten zur Differenzierung zwischen den beiden beschriebenen Mechanismen beitragen (siehe z.B. Guo et al., 2002). Tatsächlich weisen die Ergebnisse von Versuchen der Arbeitsgruppe, die auf die vorliegende Arbeit aufbauen,

daraufhin, dass für die Interaktion mit Agonisten und Antagonisten unterschiedliche Aminosäuren des Rezeptors verantwortlich sind (Hoffmann et al., 2008).

5.1.2. Funktionelle Untersuchung

Ebenso hätte es zur Testung mittels des cAMP-Assays eine Alternative gegeben. Es hätte eine Bindungsstudie durchgeführt werden können. Takasaki et al. untersuchten den Rezeptor 2001 mit dieser Methode. Eine Sättigungsstudie mit ³H-2-Methylthio-Adenosindiphosphat zeigte, dass der Rezeptor offenbar in zwei Konformationszuständen vorlag. Eine hochaffine (K_d-Wert von 0,23 nM) und eine niederaffine (K_d-Wert von 33 mM) Bindung in P2Y₁₂-Rezeptor-exprimierenden Zellen wurde gezeigt (Takasaki et al., 2001). Es ist ungeklärt, ob es sich hierbei um eine Eigenschaft des zu untersuchenden Rezeptors, eine Bindung an endogene Rezeptoren oder sonstige Bindungsstellen handelt (Takasaki et al., 2001). Für den P2Y₁₂-Rezeptor gibt es derzeit keinen kommerziell erhältlichen hochaffinen Liganden, der spezifisch genug wäre, eine solche Unterscheidung sicher zuzulassen.

5.2. Untersuchung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors

Die Grundlage für die Untersuchung der Ligandenbindungsstelle des humanen P2Y₁₂-Rezeptors bildeten Mutagenesestudien, die am P2Y₁-Rezeptor und am P2Y₂-Rezeptor durchgeführt wurden.

5.2.1. Extrazellularstruktur

Bei der Untersuchung des P2Y₁-Rezeptors wurden in der Extrazellulärschleife die potentiell zu mutierenden Aminosäuren nach zwei Gesichtspunkten ausgewählt: Cysteinreste und geladene Aminosäuren, vornehmlich Aspartat, Glutamat, Lysin und Arginin.

5.2.1.1. Cysteinreste im P2Y₁-Rezeptor-Proteins

Cysteine sind von besonderer Bedeutung, weil sie Disulfidbrücken ausbilden können und somit stabilisierend auf Rezeptorstruktur und damit Ligandenbindung einwirken können. Zudem könnten sie auch direkt an der Ligandenbindung beteiligt sein.

Der P2Y₁-Rezeptor weist vier Cysteinreste auf: an Position 42 im N-Terminus, an Position 124 an der Grenze Transmembranregion 3 zum Extrazellularraum, an Position 202 in der Extrazellulärschleife 2 und an Position 296 in der Extrazellulärschleife 3. Dieses Strukturmerkmal der vier Cysteinreste weisen nahezu alle P2Y-Rezeptoren auf (siehe Tabelle 10). Es gibt jedoch eine Ausnahme: Der P2Y₁₄-Rezeptor der Ratte hat in mehreren in der Genbank veröffentlichten Sequenzen nur drei extrazelluläre Cysteinreste (siehe Tabelle 10). In diesem Rezeptor scheint das zweite Cystein der Vierergruppe zu fehlen. Es ist allerdings derzeit noch unklar, ob es sich hier tatsächlich um eine Ausnahme handelt. Eine in unserer Arbeitsgruppe (von Kugelgen und Pelzer, unveröffentlichte Daten) durchgeführte Sequenzierung weist auf das Vorhandensein von vier extrazellulären Cysteinresten auch in diesem Rezeptorprotein hin, so dass man annehmen kann, dass alle P2Y-Rezeptoren vier extrazelluläre Cysteinreste besitzen.

P2Y-Rezeptor	Genbanknummer	Anzahl der Cysteinreste in EZS
P2Y₁-Rezeptor		
human	U42029	4
bovin	U34041	4
chick	X73268	4
rat	U22830	4
mouse	U22829	4
turkey	U09842	4
P2Y₂-Rezeptor		
human	NM_002564	4
mouse	L14751	4
rat	L46865	4
P2Y₃-Rezeptor		
chick	X98283	4
turkey	AF069555	4
P2Y₄-Rezeptor		
human	NM_002565	4
rat	Y11433	4
mouse	AJ277752	4
P2Y₆-Rezeptor		
human	AF007891	4
rat	D63665	4
xenopus-P2Y ₈	X99953	4
human-P2Y ₁₁	AF030335	4
P2Y₁₂-Rezeptor		
human	AF313449	4
rat	AF313450	4
P2Y₁₃-Rezeptor		
human	AF406692	4
mouse	NP_083084	4
P2Y₁₄-Rezeptor		
human	NM_014879	4
rat	U76206	3
mouse	AF177211	4

Tabelle 10: Vergleich der Anzahl der Cysteinreste in der Extrazellularstruktur von P2Y-Rezeptoren, die potentiell Disulfidbrücken ausbilden können (aus Genbanksequenzen abgeleitet)

Es gibt verwandte Rezeptoren, welche die beiden inneren Cysteinreste (analog zur C97 und C175 des humanen P2Y₁₂-Rezeptors) aufweisen, die wahrscheinlich eine funktionell wichtige Disulfidbrücke bilden. So wurden z. B. in einer Arbeit von LeGouill et al. (1997) die Bedeutung der Cysteinreste an Position 90 und 173 des Plättchen aktivierenden Faktors untersucht. Aufgrund der Mutagenesergebnisse wurde hier eine funktionelle Einheit vermutet. Cook et al.

untersuchten 1996 die Cysteinreste des Thyreotropin-releasing Hormon – Rezeptors. Auch hier wiesen die Ergebnisse auf das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 98 und 179 hin. In den beiden genannten Beispielen sind diese Cysteinreste an vergleichbarer Position, wie sie im P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor gefunden wurde. Das legt nahe, dass auch die Cysteinreste 97 und 175 im P2Y₁₂-Rezeptor eine funktionelle Einheit bilden könnten. Da sich hier zwei funktionelle Einheiten befinden, lässt das die Vorstellung zu, es könnte sich hierbei um eine Konformationsstabilisierung handeln. In einer 1999 publizierten Studie wurden alle vier Cysteine im P2Y₁-Rezeptor gegen Alanin ausgetauscht. Folgende Ergebnisse ließen sich ermitteln: Nach Mutation der beiden mittleren Cystein-Reste des P2Y₁-Rezeptors wurden die Rezeptorproteine nicht mehr in die Membran eingebaut (Hoffmann et al., 1999). Möglicherweise kommt dem Cystein 124 des humanen P2Y₁-Rezeptors eine Art „Ankerfunktion“ mit der Grenzlage zwischen Transmembranregion und Extrazellularraum zu. Nach Mutation von C42A und C296A zeigte sich jeweils eine mehr als 1000fache Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve. Als Agonist wurde 2-Methylthio-Adenosindiphosphat eingesetzt (EC₅₀-Werte: WT 2,2 nM; C42A 48.000 nM; C296A 5160 nM). Die Untersuchung an Doppelmutanten wies keinen additiven Effekt auf. Das legte nahe, dass beide äußeren Cysteinreste eine funktionelle Einheit bilden (Hoffmann et al., 1999). Aufgrund dieser Datenlage und der Vermutung, dass Clopidogrel über diese Strukturen an dem Rezeptor angreifen kann (siehe Hollopeter et al., 2001), wurden die vier Cysteinreste des humanen P2Y₁₂-Rezeptors in dieser Arbeit jeweils einzeln durch Alanin ausgetauscht.

5.2.1.2. Cysteinreste des P2Y₁₂-Rezeptor-Proteins

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Konstrukte C17A, C97A, C175A und C270A an der Zellmembran von CHO-K1-Zellen expremiert werden (Expressionsuntersuchung und funktionelle Daten). Eine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen ist also für die Expression des Rezeptors nicht notwendig. Etwa zeitgleich mit der Fertigstellung der Experimente der vorliegenden Arbeit wurde die Studie einer Arbeitsgruppe veröffentlicht, die ebenfalls die Cysteinreste des P2Y₁₂-Rezeptors mittels Mutagenese untersucht hatte (Ding et al., 2003). In der Studie von Ding et al. (2003) konnte für die Cysteinmutanten C97S und C175S keine Expression nachgewiesen werden, obwohl 61 bzw. 49 Klone untersucht wurden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass diese Aminosäuren eine Disulfidbrücke bilden und essentiell für

die Expression des Rezeptors zumindest in CHO-K1-Zellen sind. Es wurde ebenfalls ein Einzelzellklon der Doppelmutante C17S/C270S untersucht. Hier konnte kein Expressionsunterschied im Vergleich zum Wildtyprezeptor nachgewiesen werden, woraus der Schluss gezogen wurde, dass dies keine essentiellen Aminosäuren für die Expression sind und diese Aminosäuren keine Disulfidbrücken bilden, sondern vielmehr nur Einzelreste darstellen. In den hier beschriebenen Versuchen konnte jedoch für beide Cysteinmutanten C97A und C175A eine Expression durch Färbung bzw. das cAMP-Assay deutlich nachgewiesen werden, so dass man davon ausgehen kann, dass das jeweilige Rezeptorprotein in die Membran eingebaut wird. Mögliche Gründe für derart unterschiedliche Ergebnisse könnten in der Auswahl der substituierten Aminosäure liegen. Anstelle des hier verwendeten Austausches gegen Alanin tauschten Ding et al. Aminosäuren gegen Serin aus (Ding et al. 2003). Bei Substitution durch Alanin in dieser Arbeit zeigt die Immunofluoreszenzfärbung ein deutliches Signal in der Membran transfizierter CHO-K1-Zellen. Möglicherweise liegt bei Austausch gegen Serin ein Interaktionsproblem vor. In der Arbeit von Hoffmann et al. (1999) wurde bei der Untersuchung des P2Y₁-Rezeptors eine vergleichbare Beobachtung bezüglich der substituierten Aminosäure gemacht. Zudem unterscheiden sich experimentelle Details. In den hier beschriebenen Versuchen wurde der pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor verwendet, wohingegen in der Studie von Ding et al. (2003) der pcDNA3.1-Hygro(+)-Vektor benutzt wurde. Das eingesetzte Selektionsantibiotikum der CHO-K1-Zellklone war in dieser Arbeit Geneticin, während in der Studie von Ding et al. (2003) Hygromycin verwendet wurde. In der hier vorliegenden Arbeit befanden sich die Zellen nur 18 – 24 h auf einer Zellkulturplatte und wurden für 2 h mit [³H]-Adenin inkubiert. Die funktionell untersuchten Klone der Studie von Ding et al. (2003) befanden sich 2 Tage in einer Zellkulturplatte und wurden 4 h oder über Nacht radioaktiv inkubiert. Die eingesetzte Konzentration des Phosphodiesteraseblockers IBMX betrug in dieser Arbeit 0,2 mM, wogegen in der oben zitierten Studie 1 mM verwandt wurde. Ansonsten entsprach die Durchführung der Versuche der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik. Insofern sind die Ergebnisse vergleichbar. Die funktionellen Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Verlust eines Cysteinrestes (C97A) die Rezeptorfunktion zwar abschwächt, aber nicht auslöscht. Die Studie von Ding et al. (2003) postulierte dies für Cystein 17 und Cystein 270. Eine weitergehende Analyse der Bonner Arbeitsgruppe zeigte dann, dass eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 17 und Cystein 270 für die Rezeptorfunktion nur dann notwendig ist, wenn die Disulfidbrücke zwischen Cystein 97 und Cystein 175 auch zerstört ist; bei intakter

Disulfidbrücke zwischen Cystein 97 und Cystein 175 dagegen nicht (Algaier et al., 2008; Algaier I, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I, Manuskript in Vorbereitung). Zudem zeigten Versuche der Bonner Arbeitsgruppe, dass Cystein 97 und Cystein 175 Angriffspunkte der aktiven Metabolite von Prasugrel sind (Algaier et al., 2008).

5.2.2. Transmembranregion

5.2.2.1. Untersuchung der Transmembranregion des P2Y₁-Rezeptors

Folgende Auswahlkriterien waren in den Arbeiten der Arbeitsgruppe von K.A. Jacobson für auszutauschende Aminosäuren in den Transmembranstrukturen (TM) des P2Y₁-Rezeptors getroffen worden: Vorhandensein von positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin 128, Lysin 280 und Arginin 310 (siehe Tabelle 11, TM 3,6,7) sowie von konservierten Aminosäuren wie Phenylalanin 226, Serin 317 und Histidin 277 (siehe Tabelle 10, TM 5,6,7) sowie in diesem Rezeptor einzigartig vorkommende Aminosäuren wie Histidin 132, Threonin 221 und Glutamin 307 (siehe Tabelle 11, TM 3,5,7) und von Aminosäuren, die nach hypothetischen Berechnungen wahrscheinlich an der Ligandenbindung beteiligt sind wie Phenylalanin 131, Tyrosin 136, Threonin 222, Glutamin 307 und Serin 314 (siehe Tabelle 11, TM 3, 5,7) (Jiang et al., 1997). Alle Aminosäuren wurden gegen Alanin ausgetauscht. Als Agonist wurde 2-Methylthio-Adenosintriphosphat und 2-Methylthio-Adenosindiphosphat verwendet und die IP₃-Bildung gemessen. In dieser Studie konnte nur für Lysin 280 und Glutamin 307 gezeigt werden, dass sie sehr wahrscheinlich an der Ligandenbindung beteiligt sind. An entsprechender Position im P2Y₁₂-Rezeptor befinden sich die Aminosäuren Arginin 256 und Lysin 280. Für die übrigen Aminosäuren konnte entweder eine sichere Beteiligung an der Ligandenbindung (R128, S314, R310) oder nur ein modulierender Effekt gezeigt werden (H132, Y136, R131, F226, T221, T222; Jiang et al., 1997). Folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 11) ließen sich festhalten: R128A-, R310A-, und S314A-Rezeptorkonstrukte konnten auch durch Gabe hoher Agonistenkonzentrationen nicht stimuliert werden (EC₅₀-Wert für Wildtyp-Rezeptor mit 2-Methylthioadenosindiphosphat: 6,75 nM). K280A und Q307A zeigten bei Einsatz von 2-Methylthio-Adenosintriphosphat eine 950 bzw. 210fache Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve; alle anderen mutierten Rezeptorkonstrukte zeigten Eigenschaften, die sich nicht von denen des Wildtyp-Rezeptors unterschieden (Jiang et al., 1997). Es wurden zusätzlich funktionelle Studien mit den Antagonisten MRS2179 (Moro et al., 1998) und PPADS

(Guo et al., 2002) durchgeführt. MRS2179 ist ein Nukleotid-Bisphosphat und ist dem Agonisten ATP, welcher als Agonist einsetzbar ist, strukturell sehr ähnlich. Es blockiert die durch einen Agonisten hervorgerufene Stimulation der Phospholipase C. PPADS ist ein Pyridoxalphosphat analogon, das am Wildtyp-Rezeptor eine antagonistische Wirkung aufweist (Guo et al., 2002). Für K280A und Q307A konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Agonistenpotenz für 2-Methylthio-Adenosin triphosphat stark verringert war (EC_{50} -Werte: Wildtyp 1,2 nM, K280A 1160 nM, Q307A 325 nM) (Guo et al., 2002). Dieselben Mutanten konnten in einer anderen Untersuchung nicht durch 1 μ M MRS2179 blockiert werden (Moro et al., 1998). Weitere Untersuchungen der Mutanten K280A und Q307A mit PPADS ergaben Folgendes: 40 μ M PPADS zeigten für K280A eine 6,7 fache Affinitätsreduktion. Für Q307A konnten kaum Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (Guo et al., 2002). Darauf erfolgte die Untersuchung von K280A mit weiteren Antagonisten. Der Einsatz von MRS2210, einem PPADS-Analogon, NF023 als Suramin-Analogon und Reactive Blue 2 (RB2) zeigten klar eine Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve (pK_B -Werte: 5,6 für MRS2210; 5,0 für NF023; 5,8 für RB2). Ein 7-facher Affinitätsverlust konnte für RB2, 18fach für MRS2210 und 67fach für NF023 an K280A gezeigt werden (Guo et al., 2002). Diese Daten zeigen sehr deutlich, dass die Aminosäure Lysin 280 an der Bindung von Agonisten und Antagonisten beteiligt ist. Für Q307A wurde keine Rolle bei der Interaktion mit anderen Antagonisten festgestellt. Daher ist diese Aminosäure vermutlich an der Nukleotidbindung, nicht aber an der Bindung strukturell anderer Liganden beteiligt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im $P2Y_{12}$ -Rezeptorprotein Arginin 256 (analog zu Lysin 280 im humanen (h) $P2Y_1$ -Rezeptor) und Lysin 280 (analog zu Glutamin 307 im h $P2Y_1$ -Rezeptor) mutiert (jeweils durch Alanin ersetzt).

	in Ligandenbindung involviert	modulierende Effekte	keine Effekte
TM 3	R128A	F131A,H132A, Y136A	
TM5		T221A, T222A, F226A	
TM 6	K280A	H277A	
TM 7	Q307A, R310A, S314A		S317A

Tabelle 11: Zusammenfassung der funktionellen Ergebnisse von Mutagenesestudien am humanen P2Y₁-Rezeptor. Dargestellt sind ausgetauschte Aminosäuren, denen nach der funktionellen Analyse eine wichtige Funktion oder ein modulierender Effekt in der Ligandenbindung zugesprochen werden konnte (Jiang et al., 1997; Moro et al., 1998; Guo et al., 2002).

5.2.2.2. Untersuchung der Transmembranregion des P2Y₂-Rezeptors

Mutageneseuntersuchungen waren auch am humanen P2Y₂-Rezeptor durchgeführt worden.

Der P2Y₂-Rezeptor ist wie der P2Y₁-Rezeptor über ein Gq-Protein an die Phospholipase C gekoppelt und wird durch Adenosintriphosphat aktiviert (Erb et al., 1995). Ziel der Studie von Erb und Mitarbeitern war die Identifizierung möglicher basischer Aminosäuren in den Transmembranstrukturen, die in die Ligandenbindung involviert sein könnten: Lysin 107 und Arginin 110 in Transmembranregion 3, Histidin 262 und Arginin 265 (analog zu Lysin 280 im hP2Y₁-Rezeptor und Arginin 256 im hP2Y₁₂-Rezeptor) in Transmembranregion 6 sowie Lysin 289 (analog zu Glutamin 307 im hP2Y₁-Rezeptor und Lysin 280 im hP2Y₁₂-Rezeptor) und Arginin 292 in Transmembranregion 7. Funktionelle Untersuchungen ergaben Folgendes: Die Reste in Transmembranregion 3 sowie Lysin289 sind eher nicht an der Ligandenbindung beteiligt (EC₅₀-Werte: WT ca. 0,7 µM, K107I: ~ 0,6 µM, R110L: ~ 1 µM, K289I: ~ 1 µM). Für das Konstrukt H262L wurde ein abweichender EC₅₀-Wert von ~ 100 µM bestimmt. Möglicherweise hat Histidin 262 eine modulierende Funktion (Erb et al., 1995). Arginin 265 im humanen P2Y₂-Rezeptor entspricht Lysin 280 im P2Y₁-Rezeptor und Arginin 292 im humanen P2Y₂-Rezeptor Glutamin 307 im P2Y₁-Rezeptor. Die Substitution gegen Leucin verursachte bei den Konstrukten R265L und R292L eine 100 – 850fache Potenzabschwächung für ATP und UTP (EC₅₀-Werte: R265L: ~900 µM, R292L: ~ 1000 µM). In Zellen mit den Konstrukten R265L und R292L induzierten ADP und UDP als Partialagonisten am P2Y₂-Rezeptor auch in der Konzentration von 3 mM keinen Effekt (Erb et al., 1995). Ein interessanter Aspekt bei dieser Untersuchung war, dass der Austausch eines Lysins gegen ein Arginin die Agonistenpotenz vom Triphosphat zum Diphosphat verschoben hatte. Diese Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass hier

möglicherweise in die Tertiärstruktur eingegriffen wurde, da allein aufgrund der Molekülgrößenverhältnisse dieses Phänomen nicht erklärt werden kann (Erb et al., 1995). Neue Studien haben zudem die Beteiligung von Arginin 272 in der 3. Extrazellulärschleife des humanen P2Y₂-Rezeptors an der Bindung von Dinukleotid-Derivaten gezeigt (Hillmann et al., 2009).

5.2.2.3. Untersuchung der Transmembranregion des P2Y₁₂-Rezeptors

5.2.2.3.1. Transmembranregion 6

Aufgrund des Vergleiches mit dem P2Y₁-Rezeptor und dem unten diskutierten Arginin-Polymorphismus, wurde die Bedeutung von Arginin 256 in meiner Arbeit untersucht. Arginin 256 im P2Y₁₂-Rezeptor scheint eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung zu spielen. Dafür sprechen die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erhoben wurden. Es konnte eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve nachgewiesen werden. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch zwei weitere Arbeiten. In einem weiter unten beschriebenen Polymorphismus (5.2.2.3.3) wird ein Austausch von Arginin 256 gegen Glutamin durch eine Punktmutation in diesem kodierenden Triplet beschrieben. Der Verlust dieses Arginins führt in diesem Fall zu einer gestörten Signaltransduktion. Getestet wurde diese Mutation in einem cAMP-Assay, das im Wesentlichen der Methodik, wie sie in dieser Arbeit verwandt wurde, entspricht. Es wurden ebenfalls CHO-K1-Zellen als Expressionssystem, sowie 2-Methylthio-Adenosindiphosphat als Agonist in Konzentrationen von 0,1 – 10 µmol/l verwendet. Es wurden zwar keine Einzelzellklone untersucht, sondern nur Mischklone; auch war die eingesetzte Konzentration des Agonisten höher. Dennoch konnte vor allem im Vergleich gegen den Wildtyp-Rezeptor der Verlust der Adenylatcyclaseaktivität deutlich gezeigt werden. In diesem Fall gehen die Autoren davon aus, dass noch sehr viel feinere Regulationsmechanismen für die P2Y-Rezeptoren angenommen werden müssen (Cattaneo et al., 2003). Des Weiteren bestätigen auf der vorliegenden Arbeit aufbauende Versuche der Bonner Arbeitsgruppe die Ergebnisse bezüglich der Bedeutung von Arginin 256 (siehe Hoffmann et al., 2008; Hoffmann et al., 2009). Da dies an auch einem zweiten Expressionssystem – Astrozytomzellen statt CHO-K1-Zellen – gezeigt werden konnte, spricht viel dafür, dass Arginin 256 eine wichtige Rolle bei der Rezeptorfunktion spielt (Hoffmann et al., 2008).

5.2.2.3.2. Transmembranregion 7

Lysin 280 im humanen P2Y₁₂-Rezeptor ist das Äquivalent zu Glutamin 307 im humanen P2Y₁-Rezeptor. Auch diese Aminosäure wurde aufgrund der erhobenen Daten am P2Y₁-Rezeptor mit in die Studie einbezogen. Für die Mutante Q307A im P2Y₁-Rezeptor konnte eine Reduktion der Antagonistenpotenz sowie eine Reduktion der Wirksamkeit des Nukleotid-Antagonisten MRS 2179 nachgewiesen werden (5.2.1.3). Weitere Untersuchungen mit Antagonisten (PPADS, Reactive Blue 2, NF023) zeigten keine Unterschiede zum Wildtyprezeptor (5.2.1.3). Am P2Y₁₂-Rezeptor induzierte ADP an der Lysin280Alanin-Mutante keine Antwort bei der funktionellen cAMP-Bestimmung (Abbildung 14) trotz einer ausgeprägten Expression des Rezeptors an der Zellmembran (Abbildung 12). Dieses markante Ergebnis zeigt die besondere Bedeutung dieser Aminosäure für die Funktion des humanen P2Y₁₂-Rezeptors. Der Vergleich mit den Daten vom P2Y₁-Rezeptor zeigt auch, dass Struktur und Funktion von P2Y₁-Rezeptor und P2Y₁₂-Rezeptor zwar ähnlich sind, sich aber doch in wichtigen Details unterscheiden. Die besondere funktionelle Bedeutung von Lysin 280 des humanen P2Y₁₂-Rezeptors ist wohl die wichtigste neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, die Rezeptormodelle zur weiteren Entwicklung von Pharmaka entscheidend beeinflussen wird. Weitere Versuche der Bonner Arbeitsgruppe mit zusätzlichen Methoden wie cAMP-abhängige Reporteranalyse bestätigten die wichtige Funktion von Lysin 280 des humanen P2Y₁₂-Rezeptors für die Rezeptoraktivierung (Hoffmann et al., 2008).

5.2.2.3.3. In der Literatur beschriebene Polymorphismen

In der Literatur sind Daten von Patienten beschrieben worden, bei denen die Plättchenaggregation bei gleichzeitig vorliegender Mutation im P2Y₁₂-Gen gestört ist. So wurde zum Beispiel bei einem Patienten gezeigt, dass die ADP-abhängige Plättchenaggregation und die ADP-induzierte Hemmung der zellulären cAMP-Bildung beeinträchtigt war (Hollopeter et al., 2001). Die Testung der Funktionalität des P2Y₁-Rezeptors durch Bestimmung von intrazellulären Kalzium-Konzentrationen sowie Messung der Formveränderung der Plättchen ergaben, dass kein Fehler im P2Y₁-Rezeptor vorlag. Die Analyse kodierender Sequenzen für den P2Y₁₂-Rezeptor ergab eine Deletion von zwei Nukleotiden in dem für die Aminosäure 240 (Valin) kodierenden Triplet. Diese Aminosäure liegt nahe dem N-terminalen Ende der Transmembranregion 6. Durch Untersuchungen an einer Kontrollgruppe wurde ausgeschlossen, dass phänotypisch gesunde Menschen diese Mutation tragen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieser Patient

heterozygoter Träger dieser Mutation ist, das heißt, er hat ein Allel, das für den Wildtyprezeptor kodiert. Allerdings exprimiert er nicht den Wildtyp, sondern nur den defekten Rezeptor, so dass bei diesem Patienten keinerlei ADP-abhängige Rezeptoraktivierung nachweisbar war. Interessanterweise wies ein Familienmitglied ersten Grades die gleiche Deletion auf. Allerdings war bei dieser Person noch eine Aggregation durch ADP auslösbar, wenn auch in abgeschwächter Form. Dies führte zu dem Schluss, dass weitere Faktoren wie Expressionsunterschiede Aggregationsstörungen beeinflussen. Diese Faktoren sind derzeit noch ungeklärt (Hollopeter et al., 2001). In einem weiteren Fallbericht wurde ebenfalls ein Patient mit einer kongenitalen Blutungsstörung beschrieben. Bei dessen Plättchen funktionierte zwar die Formveränderung fehlerlos nach Stimulation mit 1 μM ADP (Cattaneo et al., 2003); die Aggregationsfähigkeit war aber nach Zugabe von 4 μM ADP vermindert und außerdem schnell reversibel. Formveränderung und Aggregationsfähigkeit wurden in unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Auch mit höheren Konzentrationen (20 μM) ließ sich keine Reaktion erzielen, wie sie an Plättchen gesunder Probanden beobachtet wird. Zugabe von Cangrelor (AR-C69931MX, P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonist) konnte keine verbesserte Plättchenaggregation induzieren. Diese Konstellation ließ einen Defekt im P2Y₁₂-Rezeptorprotein vermuten. Die Untersuchung der Bindungsfähigkeit mit ³³P-2-Methylthio-Adenosindiphosphat ergab, dass hier keine Unterschiede zur Kontrollgruppe vorlagen. Das heißt, dass der Defekt die Bindungsfähigkeit der Agonisten nicht beeinträchtigt (Cattaneo et al., 2003). Die Untersuchung der Sequenz ergab, dass zwei Missens-Mutationen vorlagen: Im kodierenden Triplet für die Aminosäure Aginin 256 (CGA) lag eine G – zu A-Transition vor, so dass ein Glutamin (CAA) an dieser Stelle eingebaut wird, und im kodierenden Triplet für die Aminosäure Aginin 265 (CGG) lag eine C – zu T-Transition vor, so dass ein Tryptophan (TGG) an dieser Stelle eingebaut wird. Da die kodierende Sequenz des P2Y₁₂-Rezeptors kein Intron enthält und in einer einzigen PCR mit einem Primerpaar sequenziert wurde, wurde der Schluss gezogen, dass beide identifizierten Mutationen auf zwei unterschiedlichen Allelen liegen, das heißt der Patient ist bezogen auf die Mutationen gemischt heterozygot (Cattaneo et al., 2003). Funktionell wurden diese Mutationen mittels cAMP-Bestimmung an rekombinanten Rezeptorkonstrukten in CHO-K1-Zellen untersucht. Zellen, die mit dem Wildtyp transfiziert wurden, zeigten bei Stimulation mit ADP in Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM eine Hemmung der Forskolin-induzierten cAMP-Bildung. Bei den Zellen, die mit mutierten Plasmid-Konstrukten transfiziert wurden, wurde in dem genannten Konzentrationsbereich jedoch kein Effekt nachgewiesen (Cattaneo et al., 2003). Offensichtlich kann der Rezeptor den Agonisten

zwar noch binden, jedoch ist die Signaltransduktion ins Zellinnere gestört. Das deutet darauf hin, dass es für diesen Rezeptor eine feinere Regulation als ein einfaches on / off-Modell geben muss. Arginin 265 ist Bestandteil der dritten Extrazellulärschleife. Transmembranregion 6, die unter anderem durch Arginin 256 gebildet wird, wird nach Untersuchungen von Rezeptoren (z.B. humaner A₃-Adenosinrezeptor (Gao et al., 2002), muskarinischer Acetylcholinrezeptor (Liu et al., 1995)) eine modulierende Funktion für den Aktivitätszustand des Rezeptors zugeschrieben. Homolog zu Arginin 265 im P₂Y₁₂-Rezeptor ist Arginin 287 im P₂Y₁-Rezeptor, für das ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden konnte (Literatur siehe oben). Es wurde diskutiert, dass Arginin 287 im P₂Y₁-Rezeptor mit den Phosphatgruppen der Agonisten interagiert. Bestimmung der Agonistenbindung an der Arginin zu Tryptophan-Mutante (Arg265Trp) zeigte allerdings keinen Unterschied zu Wildtyp-Rezeptoren (Cattaneo et al., 2003). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen in der Konformation von Extrazellulärschleife 3 (Arginin 265) letztlich den Aktivierungsmechanismus des Rezeptors, an der die Transmembranregion 6 (Arginin 256) beteiligt ist, so beeinflusst, dass der Ligand zwar binden, aber nicht aktivieren kann (Cattaneo et al., 2003). Kürzlich wurden zudem weitere Mutationen mit funktionellen Konsequenzen bei Patienten beschrieben; auch die Mutationen P258T und K174E löse eine Störung der Thrombozytenfunktion aus (Remijn et al., 2007; Daly et al., 2009).

5.3. Weitere Beobachtungen zu den molekularpharmakologischen Versuchen am P₂Y₁₂-Rezeptor

5.3.1. Einsatz von DMSO

Der Einsatz von 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde schon bei der PCR-Amplifikation der für den humanen P₂Y₁₃-Rezeptor kodierenden DNA beschrieben (Communi et al., 2001). Die PCR-Amplifikation der DNA-Sequenz des humanen P₂Y₁₂-Rezeptors ergab zunächst keine Produkte. Erst durch den Einsatz von 1 % DMSO bei der Amplifikation der cDNA und 5 % DMSO bei Thermocycling-Sequenzierreaktionen waren Produkte im Agarosegel bzw. im Polyacrylamidgel nachweisbar. DMSO wird in biochemischen Versuchen verwendet, um Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen. Wasserstoffbrückenbindungen werden in der DNA-Struktur zwischen den Basen Adenin und Thymin als Doppelbindung und zwischen Guanin und Cytosin als Dreifachbindung aufgebaut. Da der Guanin/Cytosin-Gehalt in der DNA-Sequenz des Rezeptors

mit ca. 48 % nicht übernormal hoch ist, liegt die Vermutung nahe, dass die DNA-Sequenz des Rezeptors vermehrt Wasserstoffbrückenbindungen mit für biochemische Reaktionen ungünstigen Sekundär- oder Tertiärstrukturen ausbildet.

5.3.2. Mögliche Bedeutung intensiver Signale bei der Immunfluoreszenzfärbung

Die Ergebnisse von Immunfluoreszenzfärbung und funktionellen Untersuchungen zeigen, dass der Rezeptor in allen hier mutierten Varianten translatiert wird. Deutlich zu sehen waren neben einer nachgewiesenen oder vermuteten Ansammlung in der Zellmembran intrazelluläre Signalanreicherungen. Das heißt, dass es eine vermehrte intrazelluläre, punktuelle Ansammlung von fluoreszierendem Material gab. Der verwendete monoklonale, FITC-gekoppelte Antikörper ist gegen eine 14 Aminosäuren lange Sequenz eines viralen Proteins im Rezeptor-Fusionsprotein gerichtet. Man erhofft sich, dass der Antikörper relativ spezifisch am Rezeptorepitop gebunden wird und nicht noch andere zelluläre Bestandteile angefärbt. Durch die Färbung konnten nicht nur membranöse, sondern auch zytoplasmatische Mehranreicherungen gezeigt werden. Dafür gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen kann es sein, dass der Rezeptor zwar als Protein hergestellt wird, aber aufgrund der Mutation das Endoplasmatische Retikulum nicht verlassen kann und somit auch nicht in die Membran eingebaut werden kann. Zum anderen könnte es aber auch sein, dass der Rezeptor nach Aktivierung durch im Zellkulturmedium vorhandene Agonisten (z.B. ADP) internalisiert worden und in Lysosomen angereichert worden ist. Auch bei schonender Zellkulturtechnik kann man im Zellkulturmedium Adeninnukleotide nachweisen (von Kügelgen, unveröffentlichte Beobachtung).

5.3.3. Auswahl der einzelner Zelllinien für die funktionellen Versuche

Für die ausgewählten Klone der Cysteinmutanten 175 und 270 wurde bei der statistischen Auswertung weder bei Testung gegen nichttransfizierten CHO-Zellen noch bei Testung gegen den Wildtypklon der CHO-Zellen ein signifikanter Unterschied in der Signalintensität nachgewiesen. Dennoch diese Klone für die funktionelle Testung ausgewählt, da die Einzelwerte der entsprechenden Messung die numerisch höchsten Werte innerhalb ihrer Gruppe aufwiesen (Werte nicht dargestellt). In später von der Bonner Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen mit Anwendung eines neuen zellulären Expressionssystems (CHO-FlpIn-Zellen) wurden für Wildtyp-

Rezeptoren und mutierte Cystein-Konstrukte nahezu identische Expressionswerte erzielt (Algaier et al., 2008; Algaier I, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I, Manuskript in Vorbereitung). Auch in diesen Versuchen verursachte Aktivierung der Konstrukte C175A und C270A durch Agonisten eine Hemmung der zellulären cAMP-Bildung (Algaier et al., 2008; Algaier I, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I, Manuskript in Vorbereitung); die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden also in weiteren Versuchen mit anderen Expressionssystemen bestätigt.

5.3.4. Methodische Einschränkungen bei der cAMP-Bestimmung

Grundlage für die funktionelle Testung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors durch ein cAMP-Assay ist das Transduktionssystem über ein G-Protein. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass Aktivierung des humanen P2Y₁₂-Rezeptors über ein G_{i/o}-Protein die Adenylatcyclase hemmt (Zhang et al., 2001; Foster et al., 2001). Die Menge des entstehenden cAMP kann als Maß für den Aktivitätszustand der Adenylatcyclase bestimmt werden. In Abbildung 4 ist der Vorgang schematisch dargestellt. Die Zellen wurden für die cAMP-Bestimmung mit Forskolin behandelt. Forskolin aktiviert direkt die katalytische Untereinheit der Adenylatcyclase. Der dann zugefügte Agonist kann über das G-Protein die Adenylatcyclase hemmen. Als Maß für eine konzentrationsabhängige Hemmung kann dann mit steigender Konzentration des eingesetzten Agonisten eine Abnahme des radioaktiv markierten cAMP gemessen werden.

Ein Hinweis auf eine hohe Empfindlichkeit des Rezeptors waren die experimentellen Schwierigkeiten bei der Durchführung der cAMP-Bestimmung. Die Zellen mussten extrem vorsichtig behandelt werden, um den möglichen Einfluss endogener Nukleotide zu verringern. Das heißt kurze Inkubationszeit, Vermeiden unnötiger Erschütterungen und vorsichtiges Wechseln des Mediums. Erst danach konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der cAMP-Bildung durch den angebotenen Agonisten ADP bei dem Wildtyp nachgewiesen werden. Aus der Literatur war bekannt, dass in einem Bereich von 10⁻⁵ bis 10⁻⁴ M ADP bei dem P2Y₁₂-Rezeptor (Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2001) eine solche konzentrationsabhängige Hemmung verursacht. Die Versuchsbedingungen mussten zunächst optimiert werden, bevor die pharmakologische Analyse der mutierten Rezeptorkonstrukte erfolgen konnten.

5.4. Fazit

Die vorliegende Arbeit liefert erste, sehr wichtige Ergebnisse zur Aufklärung der Struktur des humanen P2Y₁₂-Rezeptors mittels zielgerichteter Mutagenese. Die Tatsache, dass der P2Y₁₂-Rezeptor-Blocker Clopidogrel in den letzten Jahren das Pharmakon mit dem weltweit zweit höchsten Umsatz war, weist auf die besondere pharmakotherapeutische und klinische Bedeutung dieses Rezeptors hin. Die hier gezeigten Ergebnisse sind wichtige Daten zur Erstellung eines Rezeptormodells zur Entwicklung neuer, besser steuerbarer Pharmaka zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die vorliegende Arbeit zeigt die besondere Rolle von Arginin 256 und Lysin 280 für die Funktion des Rezeptors.

5.5. Ausblick

In nachfolgenden Versuchen müssten weitere Mutanten untersucht werden, bei denen nicht nur eine Aminosäure durch Alanin ersetzt wird, sondern auch Doppelmutanten und Serin-Mutanten hergestellt werden. Außerdem wäre eine funktionelle Testung mit Antagonisten sehr sinnvoll.

6. Zusammenfassung

Der P2Y₁₂-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sich durch sieben helikale und transmembranäre Strukturen auszeichnen. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt. In besonders hoher Dichte wird der P2Y₁₂-Rezeptor in Thrombozytenmembranen expremiert. Physiologisch spielt der P2Y₁₂-Rezeptor eine zentrale Rolle bei der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Zudem ist der Rezeptor an der Modulation des Kalziumeinstroms in neuronalen Fortsätzen und an der Steuerung von Migrationsprozessen von Mikrogliazellen beteiligt. Der aktive Metabolit von Clopidogrel ist ein irreversibler Antagonist am P2Y₁₂-Rezeptor. Die Tatsache, dass Clopidogrel in den letzten Jahren das Pharmakon mit dem weltweit zweithöchsten Umsatz war, weist auf die besondere pharmakotherapeutische und klinische Bedeutung dieses Rezeptors hin. Mit der molekularen Identifizierung des Rezeptors im Jahr 2001 wurden Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Struktur des Rezeptors möglich. Die vier extrazellulären Cysteine an den Positionen 17, 97, 175 und 270 wurden in den Experimenten dieser Promotionsarbeit zielgerichtet durch Anwendung mutagener Primer gegen Alanin ausgetauscht, um die funktionelle Bedeutung von extrazellulären Disulfidbrücken erkennen zu können. Disulfidbrücken scheinen für die Wirkung der Thienopyridine Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel wichtig zu sein. An Hand von Ergebnissen früherer Untersuchungen an P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptoren wurden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zwei weitere Aminosäuren in Transmembranstrukturen (TM) ausgewählt: zum einen Arginin 256 in TM 6 und zusätzlich Lysin 280 in TM 7. Auch diese Aminosäuren wurden mittels zielgerichteter Mutagenese durch Alanin ersetzt. Die Ergebnisse der mittels direkter Immunocytochemie mit einem monoklonalen, Fluorezenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper durchgeführten Expressionsversuche zeigen, dass für Wildtyp-Rezeptoren und die Rezeptorkonstrukte C17A, C97A, R256A und K280A membranständige Signale in stabil transfizierten Chinesischen Hamster Ovarialzellen (CHO-Zellen) nachweisbar waren. Funktionell wurden Wildtyp-Rezeptoren und mutierte Konstrukte in stabil transfizierten CHO-Zellen durch Messung der ADP-induzierten Hemmung der zellulären cAMP-Bildung untersucht. Hierzu wurde ein [³H]-cAMP Affinitätsassay angewendet. ADP hemmte die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung in Zellen mit Wildtyp-Rezeptoren. An Zellen mit dem Rezeptorkonstrukt R256A wurde eine Wirkabschwächung von ADP mit einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve und an Zellen mit dem Konstrukt K280A ein kompletter Wirkverlust des Agonisten ADP beobachtet. Der Austausch von extrazellulären Cysteinresten durch Alanin führte

beim Konstrukt C97A zu einer Abschwächung der Antwort auf Rezeptoraktivierung. Der Nachweis der besonderen Rolle von Arginin 256 und Lysin 280 für die Funktion des humanen P2Y₁₂-Rezeptors ist die wichtigste neue Erkenntnis der vorliegenden Arbeit. Die Erkenntnisse ermöglichen die Erstellung eines Rezeptormodells zur Unterstützung einer rationalen Arzneistoffentwicklung für diesen klinisch sehr wichtigen Rezeptor.

7. Anhang

7.1. Protokolle

7.1.1. PCR

7.1.1.1. Herstellung und Amplifikation von cDNA aus mRNA: RT-PCR

Ansatz: 25 µl 2x Puffer für RT-PCR-Mix
21 µl Wasser

2 µl Primer (10 µM; Material.8.7, PCR-Primer)
1 µl mRNA
1 µl RT / Platinum Taq Mix
auf Eis gemischt
mit ca. 20 µl Mineralöl überschichtet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) RT-PCR	30 Minuten 50 °C
2) RT-PCR	4 Minuten 95 °C
3) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
4) Anlagern	30 Sekunden 56,8 °C
5) Verlängern	90 Sekunden 72 °C
6) Auffüllen	5 Minuten 72 °C
7) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 5 auf Schritt 3: 14 x; insgesamt also 15 Durchläufe

7.1.1.2. Amplifizierung

Ansatz: 5 µl 10x Puffer für Pfu-Polymerase
41 µl Wasser
0,5 µl dNTP
0,5 µl DMSO
2,5 µl Primer (10 µM)
0,5 µl cDNA aus 1.1.1
0,5 µl Pfu-Polymerase
auf Eis gemischt
mit ca. 20 µl Mineralöl überschichtet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) aufwärmen	2 Minuten 95 °C
2) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
3) Anlagern	30 Sekunden 56,8 °C
4) Verlängern	2 Minuten 72 °C
5) Auffüllen	8 Minuten 72 °C
6) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 4 auf Schritt 2: 34 x; insgesamt also 35 Durchläufe

7.1.2. Kontrolle der Klonierung und Transformation

Ansatz: Mastermix zu 180 μ l für 10 Kolonien

- 101 μ l 2x Puffer
- 73 μ l Wasser
- 2 μ l DMSO
- 0,5 μ l T7-Primer (100 μ M)
- 0,5 μ l hP2Y12_rev-Primer (100 μ M)
- 4 μ l Taq-Polymerase

Kolonien von der Agarplatte aufnehmen

in 2 μ l Wasser gelöst

den Ansatz bei 95 °C für 10 min stehen lassen

18 μ l des Mastermix hinzugefügt

auf Eis gemischt

mit ca. 20 μ l Mineralöl überschichtet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) aufwärmen	4 Minuten 95 °C
2) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
3) Anlagern	30 Sekunden 52°C
4) Verlängern	120 Sekunden 72 °C
5) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 4 auf Schritt 2: 29 x; insgesamt also 30 Durchläufe

7.1.3. Mutagenese

Ansatz: Mastermix zu 325,5 μ l für 6 Mutanten

- 36 μ l 10x Puffer
- 262,5 μ l Wasser
- 7 μ l dNTP
- 17,5 μ l DMSO
- 3,5 μ l des extrahierten und aufgereinigten Plasmides

je Mutantenkonstrukt

46,5 μ l Mastermix

1,25 μ l des forward (sense)-Primers (10 μ M; siehe Primerliste)

1,25 μ l des reverse (antisense)-Primers (10 μ M; siehe Primerliste)

1 μ l Pfu-Polymerase

auf Eis gemischt

mit ca. 20 μ l Mineralöl überschichtet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) aufwärmen	2 Minuten 95 °C
2) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
3) Anlagern	1 Minute 55°C
4) Verlängern	13 Minuten 68 °C
5) Auffüllen	13 Minuten 68 °C
6) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 4 auf Schritt 2: 15 x; insgesamt also 16 Durchläufe

7.1.4. Sequenzierung

7.1.4.1. Kontrolle der Transformation von E.coli mit nachfolgender Extraktion der rezeptortragenden Plasmid-DNA

verwendete Primer: BGH, hP2Y12for517, hP2Y12rev621

Ansatz für hP2Y12for517,
hP2Y12rev621

17,5 µl Wasser
1 µl DMSO
1 µl Primer (1 µM)
1,5 µl extrahierte DNA

für BGH-Primer:

16,5 µl Wasser
1 µl DMSO
2 µl Primer (1 µM)
1,5 µl extrahierte DNA

je 1,5 µl ddNTP in PCR-Tube (aus Sequenzierungs-Kit)

je 4,5 µl des Premix dazu

auf Eis gemischt
mit ca. 30 µl Mineralöl überschichtet
in Dunkelheit gearbeitet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) aufwärmen	2 Minuten 95 °C
2) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
3) Anlagern	30 Sekunden 52 °C
4) Verlängern	30 Sekunden 70 °C
5) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 4 auf Schritt 2: 31 x; insgesamt also 32 Durchläufe

7.1.4.2. Kontrolle der zielgerichteten Mutagenese

Primer für jede Mutante: T7, BGH, hP2Y12for517, hP2Y12rev621

Ansatz für eine Mutante und
1 Primer (außer BGH)

17,45 µl Wasser
1,05 µl DMSO
1 µl Primer (1 µM)
1,5 µl Mutanten-DNA

für BGH-Primer:

15,45 µl Wasser
1,05 µl DMSO
3 µl Primer (1 µM)
1,5 µl Mutanten-DNA

je 1,5 µl ddNTP in PCR-Tube (aus Sequenzierungs-Kit)

je 4,5 µl des Premix dazu

auf Eis gemischt
mit ca. 30 µl Mineralöl überschichtet
unter Lichtschutz gearbeitet

Protokoll:

Schritt	Programm
1) aufwärmen	2 Minuten 95 °C
2) Denaturieren	30 Sekunden 95 °C
3) Anlagern	30 Sekunden 52 °C
4) Verlängern	30 Sekunden 70 °C
5) Pause	unendlich bei 3 °C

Wiederholungen: Schleife von Schritt 4 auf Schritt 2: 31 x; insgesamt also 32 Durchläufe

7.2. Agarosegelelektrophorese

7.2.1. Herstellung eines Agarosegels 0,7% / 0,9%

0,7 bzw 0,9 g Agarosegelpulver

100 ml 1x TAE-Puffer

mischen und unter Erhitzen auflösen,
auf ca. 50° C abkühlen lassen

0,05 µl/ml Ethidiumbromid

zufügen,
das noch zähflüssige Gel in die Gelkammer gießen und einen Kamm für 14 Taschen, in die das abzutrennende Gemisch hineinpipettiert wird, einhängen,
in ca. 30 min erkalten lassen,

7.2.2. Durchführung der Elektrophorese

7.2.2.1. Nachweis von cDNA nach Durchführung der RT-PCR und Amplifizierung

9,5 µl PCR-Produkt

1 µl Bromphenol/Glycerin („Ladepuffer“)

mischen;

den Horizontalgießstand in die Gelkammer einhängen

den „Kamm“ entfernen

1l 1x TAE Puffer mit

0,05 µg / ml Ethidiumbromid

mischen und in die Gelkammer gießen, bis das Gel mit Puffer überspült wird

9,5 µl des Gemisches

in eine Gelkammer pipettieren

3,5 µl 100bp-DNA-Leiter	in eine Gelkammer pipettieren
Spannung von 105 V	initial anlegen, bis die Auftrennung optisch sichtbar wird, dann
Spannung von 70 V	für ca. eineinhalb Stunden anlegen

TAE: Tris-Acetat-EDTA-Puffer; siehe Materialliste unter Punkt 7.6.5.2

7.2.2.2. Nachweis von DNA nach Klonierung und Transformation von E.coli und Extraktion der DNA

1 µl aufgereinigte DNA	
1,5 µl Bromphenol/Glycerin („Ladepuffer“)	mischen;
den Horizontalgießstand in die Gelkammer einhängen	
den „Kamm“ entfernen	
1l 1x TAE Puffer	
0,05 µg / ml Ethidiumbromid	mischen und in die Gelkammer gießen, bis das Gel mit Puffer überspült wird
2 µl des Gemisches	in eine Gelkammer pipettieren
1,5 µl 100bp-DNA-Leiter	in eine Gelkammer pipettieren
Spannung von 105 V	initial anlegen, bis die Auftrennung optisch sichtbar wird, dann
Spannung von 70 V	für ca. eineinhalb Stunden anlegen

7.2.2.3. Gelelektrophorese nach Durchführung der Restriktion

Herstellen der Proben:	a) 0,5 µl DNA der Proben, die nicht der Restriktion unterzogen wurden	
	1 µl Bromphenol/Glycerin („Ladepuffer“)	mischen
	b) 9 µl der DNA nach erfolgter Restriktion	
	1 µl Bromphenol/Glycerin („Ladepuffer“)	mischen
den Horizontalgießstand in die Gelkammer einhängen		
den „Kamm“ entfernen		
1l 1x TAE Puffer mit		

0,05 µg / ml Ethidiumbromid	mischen und in die Gelkammer gießen, bis das Gel mit Puffer überspült wird, dann
1,5 µl des Gemisches von a)	in eine Gelkammer pipettieren
9,5 µl des Gemisches von b)	in eine Gelkammer pipettieren
1 µl 100bp-DNA-Leiter	in eine Gelkammer pipettieren
Spannung von 105 V	initial anlegen, bis die Auftrennung optisch sichtbar wird, dann
Spannung von 70 V	für ca. eineinhalb Stunden anlegen

7.3. Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzieranalyse

7.3.1. Herstellung eines Polyacrylamidgels (nach Vorgabe des Herstellers für LI-COR 4200)

Glasplatten	mit handelsüblicher Seife waschen mit 70% Ethanol reinigen
0,5 mm-Abstandhalter	zwischen beide Platten am Rand einlegen Platten mittels Schraubvorrichtung aneinander pressen, so dass das Gel eine Dicke von 0,5 mm bekommt
24 ml „Monomer-Solution“ (Ultra Pure) mit 6 ml „Buffer Reagent“ und mit 240 µl Ammoniumpersulfat, 10 %	mischen, dann im kontinuierlichem Strahl zwischen die Glasplatten blasenfrei gießen
Haifischzahnkamm mit 48 Kammern	einlegen und das Gel in ca. zwei Stunden polymerisieren lassen

7.3.2. Sequenzanalyse mit dem LI-COR 4200

polymerisiertes Gel	in den Sequenzer LI-COR 4200 einspannen
1 l 1x TBE-Puffer	in beide Pufferwannen einfüllen
Computerprogramm des BaseImage-Paketes aufrufen, um die Standardwerte festzulegen und die automatische Datenaufnahme zu aktivieren:	
1500 V, 35 mA; 31,5 W, 50 °C	Vorlauf durchführen für zwei Stunden
1 – 4 µl des PCR-Produktes	in die Geltaschen von links nach rechts pipettieren

die Proben in ca. 10–12 h elektrophoretisch
auftrennen

7.4. Herstellung von Agarplatten zur Anzucht von E.coli: (4 Petrischalen à 25 ml)

3,2 g Agarpulver

100 ml Wasser

aufkochen bis das Pulver gelöst ist

die Lösung autoklavieren

auf ca. 50° C abkühlen lassen

100 µg/ml Ampicillin

unter sterilen Bedingungen zufügen und durch

Schwenken vermischen

je 25 ml der Lösung

mittels einer 25 ml-Pipette unter sterilen

Bedingungen in jede Petrischale pipettieren

7.5. Restriktionsanalyse

Ansatz für Mlu NI: 2 µl Puffer für Mlu NI
 16 µl Wasser
 1 µl DNA von C17A bzw. C97A als Kontrolle
 1 µl Mlu NI

Ansatz für Eco RI: 2 µl Puffer für Eco RI
 16 µl Wasser
 1 µl DNA von R256A
 1 µl Eco RI

bei 37 ° C für 1 h inkubieren

7.6. Materialien

7.6.1. Geräte

accu-jet (Pipettierhilfe)	Brand	Wertheim
achromatischer Auflichtkondensor des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Autoklav	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Brutschrank	Heraeus	Hanau
CCD-Kamera des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Dispensette	Brand	Wertheim
Feinwaage	Sartorius	Göttingen

FITC-Filter des Imaging-System DCLP 500 (470 – 520 nm)	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Oberkochen
Flüssigstickstofftank	Harsco Corporation	Vertrieb: Pabisch, Köln
Frischhaltefolie	Selina	Discounter
Gelelektrophoresekammer	BioRad	München
Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Laborhandschuhe	Ansell	München
Mikroskop	Zeiss	Oberschleißheim
Mikrozentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Monochromator des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Multipipette	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter	Knick	Berlin
Pipette	Eppendorf	Hamburg
Quarz-Lichtwellenleiter des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Radioaktivität-Counter	Beckmann	Krefeld
Scan Kamera des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Sequenzier LI-COR 4200	MWG	Ebersberg
Sterilarbeitsplatz	Heraeus	Wertheim
Sterilarbeitsplatz, Filter	Heraeus	Wertheim
Thermo-Cycler	Biometra	Göttingen
Tischzentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Vakuumpumpe	KNF	Freiburg
Vortexgerät	Heidolph	
Wasserbad	Eich (Merck bzw. VWR)	Langenfeld
Xenon-Lampe des Imaging-System	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Neubauer Zählkammer für Zellzählung		

7.6.2. Verbrauchsmaterialien

Combitip 1,25; 2,5; 5; 12,5; 50 ml	Eppendorf	Hamburg
Coverslips	Fisher Scientific	Düsseldorf

Cryovial 1,2ml	Nunc	Wiesbaden
Cryovial 1,8ml	Nunc	Wiesbaden
Dowex-Säule für Chromatographie	Bio Rad	München
Falcon-Tube, 14ml	Merck bzw. VWR	Langenfeld
4-, 8-Kammerobjektträger	Nunc	Wiesbaden
Kulturflaschen 25 cm ² , 80 cm ²	Nunc	Wiesbaden
Microtube 1,5ml	Sarstedt	Nümbrecht
Microtube 2ml	Eppendorf	Hamburg
Multiwellplatte, 6 Well	Greiner	Solingen
Multiwellplatte, 12 bzw. 24 Well	Corning incorporated	Asbach
Multiwellplatte, 48 Well	Falcon	Heidelberg
Parafilm	American Can Company	Greenwich
PCR-Tube	Roche	Mannheim
Petrischale 35mm, 60mm	Nunc	Wiesbaden
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Roth	Karlsruhe
Pipetten 1 ml, 2 ml, 10 ml, 25 ml	Nunc	Wiesbaden
Sterilfilter	Schleicher und Schuell	Dassel
Superpolyethylenials, 20ml	Packard	

7.6.3. Software

BaseImage	LI-COR; MWG	Ebersberg
Graph Pad Prism; 3.03	Graph Pad	San Diego
Office 97 (Word, Excel)	Microsoft	
Quantity One	Bio Rad	München
TILL Vision	T.I.L.L. Photonics	Martinsried
Vector NTI	Informax	Bethesda, Maryland

7.6.4. Chemikalien

2-Methylthio-ADP	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
------------------	---------------	-------------

Agarose-Electrophoresis Grade	Invitrogen	Karlsruhe
Aluminium für Säulenchromatographie	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Ampicillin	Invitrogen	Karlsruhe
CaCl ₂	Merck bzw. VWR	Langenfeld
cAMP	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Invitrogen	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
dNTP für Pfu-Polymerase-PCR	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Leiter (50- und 100 bp)	Invitrogen	Karlsruhe
Ethanol, 70 %	Merck bzw. VWR	Langenfeld
Ethidiumbromid	Invitrogen	Karlsruhe
Nutrient Mixture Ham's F-12 + L-Glutamin zur Vereinzelung und Kultur von CHO-Zellen	Invitrogen	Karlsruhe
fetales Kälberserum (FBS)	Invitrogen	Karlsruhe
Forskolin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Geneticin (G418)	Invitrogen	Karlsruhe
Glucose	Merck bzw. VWR	Langenfeld
GlutaMax-I Supplement 200 nM (100x) mit L-Alanyl-L-Glutamin; 200 mM gelöst in 0,85 % NaCl	Invitrogen	Karlsruhe
Glycin	Invitrogen	Karlsruhe
³ H-Adenin	Perkin Elmer Life Science	Überlingen
HCL	Merck bzw. VWR	Langenfeld
HEPES (Hydroxyethyl-piperazin- ethansulfonsäure pH 5-6,5)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Hexokinase	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Isobuthylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Immersionsöl	Olympus	Hamburg
Isopropanol	Merck bzw. VWR	Langenfeld

KCL	Merck bzw. VWR	Langenfeld
KH ₂ PO ₄	Merck bzw. VWR	Langenfeld
KHPO ₄	Merck bzw. VWR	Langenfeld
LB-Agar	Invitrogen	Karlsruhe
Lysin	Invitrogen	Karlsruhe
MgCl ₂	Merck bzw. VWR	Langenfeld
Na ₂ HPO ₄	Merck bzw. VWR	Langenfeld
NaCl	Riedel-de-Häen	Taufkirchen
PCR-Mineral-Oil	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
RNase-freies Wasser	Invitrogen	Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen	Karlsruhe
Szintillatortgel	Lumac	Groningen
Trichloressigsäure	Merck bzw. VWR	Langenfeld
TRIS-HCL	Merck bzw. VWR	Langenfeld
(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid)		
Triton	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Trypsin (1:250; 0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA)	Invitrogen	Karlsruhe

Lösungen für Polyacrylamidgel:

a) Ultra Pure Sequa-Gel Complete Buffer

Reagent

National Diagnostics; BioZym Oldendorf

b) Ultra Pure Sequa-Gel XR

National Diagnostics; BioZym Oldendorf

7.6.5. Lösungen und Puffer

7.6.5.1. gelieferte Puffer für die Molekularbiologie

Blue Juice Loading Buff 10x	Invitrogen	Karlsruhe
-----------------------------	------------	-----------

<u>für Taq-Polymerase,2x:</u> 2 x Reaction-Mix mit 0,4 mM von jedem dNTP 2,4 mM MgSO ₄ reverse Transkriptase / Taq-Mix	Invitrogen	Karlsruhe
<u>für Pfu-Polymerase,10x:</u> 200 mM Tris-Hcl 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄ 1% Triton X-100 1mg/ml BSA	Stratagene	Amsterdam
<u>für Eco RI:</u> 50 mM Tris-HCL 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1mM Dithioerthritol pH 7,5	Roche	Mannheim
<u>für MluNI:</u> 33 mM Tris-Acetat 10 mM Mg-Acetat 0,5 mM Dithiothreit pH 7,9	Roche	Mannheim

7.6.5.2. Selbst hergestellte Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

TAE-Puffer, 10 X:	400 mM Tris-Acetat 10 mM EDTA pH 8,3
TBE-Puffer, 10 X:	1,0 M Tris-Acetat 0,9 M Borsäure 0,01M EDTA pH 8,4

7.6.5.3. Selbst hergestellte Lösungen und Puffer für die funktionelle Analyse

Trichloressigsäure, 5 %:	50 g Trichloressigsäure 1 l demineralisiertes Wasser	(pulverisierte Form)
Tris-Puffer, 100 mM / 500 mM	12,12 g / 60,6 g Tris-Hcl 1 l demineralisiertes Wasser pH 8,0	
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCL 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3	
Stammlösung-A für cAMP-Assay ,10X:	124 x 10 mM Nacl 5 x 10 mM KCl 1,45 x 10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 1,25 x 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O	
Stammlösung-B für cAMP-Assay ,10X:	1,25 x 10 mM KH ₂ PO ₄	

7.6.6. Medien

Zellkultur der CHO-K1-Zellen:	Nutrient Mixture Ham's F-12 1x Glutamax 10 % FBS	
Inkubationsmedium für cAMP-Assay (50 ml):	72,05 mg Glucose 297,9 mg HEPES 5 ml NaCl-Stammlösung, 10x 38 ml Wasser, demineralisiert 5 ml KH ₂ PO ₄ -Stammlösung, 10 x pH 7,4 ad 50 ml Gesamtvolumen Wasser, demineralisiert	

7.6.7. Verwendete Reagenzienzusammenstellungen

pcDNA3.1 Directional TOPO-Expression Kit	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Miniprep-Kit	Quiagen	Hilden

Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Amsterdam
Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit	Amersham Biosciences UK	Buckinghamshire
Transfektions-Kit (Lipofectamine Plus Reagent)	Invitrogen	Karlsruhe
SuperScript One-Step RT-PCR mit Platinum Taq	Invitrogen	Karlsruhe

7.6.7.1. Beschreibung der verwendeten Versuchszusammenstellungen

7.6.7.1.1. pcDNA3.1 Directional TOPO-Expression Kit

pcDNA3.1D/V5-His-TOPO-Vektor	10 ng/µl Plasmid-DNA in: 50 % Glycerol 50 mM Tris-HCL, pH 7,4 1 mM EDTA 2 mM DTT 0,1 % Triton X-100 100 µg / ml fetales Kälberserum 30 µM Bromphenol Blau
dNTP Mix	12,5 mM dATP; 12,5 mM dCTP; 12,5 mM dGTP; 12,5 mM dTTP; in Wasser (pH 8)
Salzlösung	1,2 M NaCl 0,06 M MgCl ₂
T7-Primer	0,1 µg / µl in TE-Puffer, pH 8
BGH-Primer	0,1 µg / µl in TE-Puffer, pH 8
TOP 10 E.coli	21 x 50 µl
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

7.6.7.1.2. QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit

PfuTurbo DNA Polymerase	2,5 U / μ l
10 x Puffer	siehe Pufferzusammensetzungen
DpnI	10 U / μ l
dNTP Mix	

7.6.8. biologisches Material

7.6.8.1. Vektor

pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	Invitrogen	Karlsruhe
-----------------------	------------	-----------

Dieser Vektor ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der eine Länge von 5514 Basenpaare hat. Er besitzt ein Ampicillinresistenzgen, was zur Selektion von vektortragenden E. coli genutzt werden kann. Weiterhin verfügt der Vektor über ein Neomycinresistenzgen, wodurch stabiltransfizierte eukaryotische Zellen unter Selektionsdruck mit Geneticin (G418) gesetzt werden können. Hinter dem CMV-Promotor befindet sich eine Klonierungsstelle („multiple cloning site (MCS)“), die neben Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme auch die Sequenz des T7 Promotors enthält und gleichzeitig als Primeransatz für den gleichnamigen Primer dient, um in forward (sense)-das Insert zu vermehren. Die TOPO Cloning site wird bei der Ligierung eines PCR-Produktes in den Vektor verwendet (1.2.2). Hinter der MCS enthält der Vektor die Kodierung für ein V5-Epitop, gegen das ein Antikörper gerichtet ist, mit dessen Hilfe rekombinante Proteine in transfizierten eukaryoten Zellen detektiert werden können. Dahinter befindet sich die BGH-Sequenz, gegen die ein Primer gerichtet ist, der in das Insert gegenläufig zum T7-Primer die Sequenz vermehrt.

7.6.8.2. Enzyme

Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene	Amsterdam
Platinum Taq-Polymerase	Invitrogen	Karlsruhe
DpnI (im Mutagenese-Kit)	Stratagene	Amsterdam

EcoRI	Roche	Mannheim
MluNI	Roche	Mannheim

7.6.8.3. mRNA für hP2Y12-Rezeptor

human brain cells: isoliert von Dr. Brüss (Ins.)	Clontech	Palo Alto USA
HEK-Zellen: isoliert in AG v. Kügelgen (Ins.)	Prof. Bönisch aus Institut	Bonn

7.6.8.4. Bakterienstämme

Top-10 E.coli	Invitrogen	Karlsruhe
Genotyp: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG		

7.6.8.5. Eukaryotische Zelllinie

CHO-K1-Zellen; Passage 2	Prof. Bönisch aus Institut	Bonn
--------------------------	----------------------------	------

7.6.8.6. Antikörper

V5-FITC	Invitrogen	Karlsruhe
---------	------------	-----------

7.6.8.7. Oligonukleotide

PCR-Primer hP2Y12_forward	für hP2Y12 aus humanem Hirngewebe (Clontech) / HEK-Zellen 5`-CAC CAT GCA AGC CGT CGA CAA CCT C-3`
hP2Y12_reverse	5`-CAT TGG AGT CTC TTC ATT TGG GTC ACC-3`
Vektorsequenzierprimer T7	im pcDNA3.1D/V5-His-Vektor 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`
BGH Reverse	5`-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3`
Sequenzierprimer für die Mutanten	in der hP2Y12-cDNA
C17A_for/sense	5`-GGA ACA CCA GTC TGG <u>CCA</u> CCA GAG ACT ACA AAA TC-3`
C17A_rev/antisense	5`-GGA ACA CCA GTC TGG CCA CCA GAG ACT ACA AAA TC-3`
C97A_for/sense	5`-CTG AGA ACT TTT GTG <u>GCT</u> CAA GTT ACC TCC GTC-3`
C97A_rev/antisense	5`-GAC GGA GGT AAC TTG AGC CAC AAAAGT TCT CAG-3`
C175A_for/sense	5`-GAA TGT GAA GAA <u>AGC</u> CTC TTT CCT TAA ATC AGA GTT CG-3`
C175A_rev/antisense	5`-CGA ACT CTG ATT TAA GGA AAG AGG CTT TCT TCA CAT TC-3`
C270A_for/sense	5`-GGA TGT CTT TGA <u>CGC</u> CAC TGC TGA AAA TAC TCT G-3`
C270A_rev/antisense	5`-CAG AGT ATT TTC AGC AGT GGC GTC AAA GAC ATC C-3`
R256A_for/sense	5`-CCT TTC CAT TTT GCC <u>GCA</u> ATT CCT TAC ACC CTG AG-3`
R256A_rev/antisense	5`-CTC AGG GTGTAA GGA ATT GCG GCA AAA TGG AAA GG-3`
K280A_for/sense	5`-GAA AAT ACT CTG TTC TAT GTC <u>GCA</u> GAG AGC ACT CTG TGG-3`
K280A_rev/antisense	5`-CCA CAG AGT GCT CTC TGC GAC ATA GAA CAG AGT ATT TTC-3`
Sequenzierprimer für das Klonierungsprodukt und die Mutanten	in der hP2Y12-DNA
hP2Y12for517	5`-GGC ATT CAT GTT CTT ACT CTC-3`
hP2Y12rev621	5`-TAT TTC ATG CCA GAC TAG ACC-3`

Die unterstrichenen Triplets in den mutagenen Primern entsprechen dem für Alanin kodierenden Triplet; dabei sind die ausgetauschten Basenpaare fett hervorgehoben.

Wesentliche Inhalte dieser Promotionsschrift wurden veröffentlicht in:

Originalarbeit:

Kristina Hoffmann, Uta Sixel, Francesca Di Pasquale, Ivar von Kügelgen. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y₁₂-receptor. *Biochemical Pharmacology*, 2008; 76: 1201-1213.

Tagungsbeitrag:

Ivar von Kügelgen, Irina Algaier, Francesca Di Pasquale, Kristina Hoffmann, Jens Straßburger, Uta Zielinski. Molecular pharmacology of P2Y₁₂-receptors. *Pharmacological Reports*, 2006; 58: 260-262.

8. Literaturverzeichnis

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, 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, von Kügelgen I. 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, Tramini G, Martorana A, Viscomi MT, Sancesario G, Bernardi G, Volonté C. Oligodendrocytes express P2Y₁₂ metabotropic receptor in adult rat brain. *Neuroscience*. 2006; 141: 1171-1180

Bayturan O, Bilge AR, Sekuri C, Utuk O, Tikiz H, Eser E, Tezcan UK. The Effect of Tirofiban on ST Segment Resolution in Patients with Non-ST Elevated Myocardial Infarction. *Jpn Heart J*. 2004; 45: 913-920

Bender E, Buist A, Jurzak M, Langlois X, Baggerman G, Verhasselt P, Ercken M, Guo HQ, Wintmolders C, Van den Wyngaert I, Van Oers I, Schoofs L, Luyten W. Characterization of an orphan G protein-coupled receptor localized in the dorsal root ganglia reveals adenine as a signaling molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99: 8573-8578

Cannon CP; CAPRIE Investigators. Effectiveness of clopidogrel versus aspirin in preventing acute myocardial infarction in patients with symptomatic atherothrombosis (CAPRIE trial). *Am J Cardiol.*, 2002; 90: 760-762..

Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, Ware J, Ruggeri ZM. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100: 1978-1983

Colquhoun D. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol.*, 1998; 125: 924-947

Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G_i. *J Biol Chem.*, 2001; 276: 41479-41485

Cook JV, McGregor A, Lee T, Milligan G, Eidne KA. A disulfide bonding interaction role for cysteines in the extracellular domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinology*, 1996; 137: 851-2858

- Daly ME, Dawood BB, Lester WA, Peake IR, Rodeghiero F, Goodeve AC, Makris M, Wilde JT, Mumford AD, Watson SP, Mundell SJ. Identification and characterization of a novel P2Y₁₂ variant in a patient diagnosed with type 1 von Willebrand disease in the European MCMDM-1VWD study. *Blood*, 2009; 113: 4110-4113
- Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*, 2003; 101: 3908-3914.
- Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest*, 2004; 113: 340-345
- Elwood PC. Reducing the risk: heart disease, stroke and aspirin. *J Med Assoc Thai*, 2001; 84: 1164-1174
- Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem*, 1995; 270: 4185-4188
- Fälker K, Lange D, Presek P. ADP secretion and subsequent P2Y₁₂ receptor signalling play a crucial role in thrombin-induced ERK2 activation in human platelets. *Thromb Haemost*, 2004; 92: 114-123
- Fields W. Role of antiplatelet agents in cerebrovascular disease. *Drugs*, 1979; 18: 150-155
- Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ Jr, Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chitala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest*, 2001; 107: 1591-1598.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 2001; 53: 527-552.
- Fricks IP, Maddileti S, Carter RL, Lazarowski ER, Nicholas RA, Jacobson KA, Harden TK. UDP is a competitive antagonist at the human P2Y₁₄ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008 May; 325(2): 588-594.
- Gao ZG, Chen A, Barak D, Kim SK, Muller CE, Jacobson KA. Identification by site-directed mutagenesis of residues involved in ligand recognition and activation of the human A₃ adenosine receptor. *J Biol Chem*, 2002; 277: 19056-19063
- Garcia A, Shankar H, Murugappan S, Kim S, Kunapuli SP. Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets. *Biochem J*, 2007; 404: 299-308

- Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, Panak E, Roberts RS, Sicurella J, Turpie AG. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet*, 1989; 1: 1215-1220.
- Gorzalka S, Vittori S, Volpini R, Cristalli G, von Kügelgen I, Müller CE. Evidence for the functional expression and pharmacological characterization of adenine receptors in native cells and tissues. *Mol Pharmacol.*, 2005; 67: 955-964
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol.*, 2001a; 88: 230-235
- Gum PA, Thamarasan M, Watanabe J, Blackstone EH, Lauer MS. Aspirin use and all-cause mortality among patients being evaluated for known or suspected coronary artery disease: A propensity analysis. *JAMA*, 2001b; 286: 1187-1194
- Guo D, von Kügelgen I, Moro S, Kim YC, Jacobson KA. Evidence for the Recognition of Non-Nucleotide Antagonists Within the Transmembrane Domains of the Human P2Y₁ Receptor. *Drug Develop Res.*, 2002; 57: 173-181
- Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet*, 1998; 351: 1755-1762
- Harwood AJ. *Methods in Molecular Biology 58. Basic DNA and RNA Protocols.* Totowa NJ: Humana Press, 1996
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci.* 2006; 9: 1512-1519
- Hillmann P, Ko GY, Spinrath A, Raulf A, von Kügelgen I, Wolff SC, Nicholas RA, Kostenis E, Höltje HD, Müller CE. Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y₂ receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *J Med Chem.* 2009; 52: 2762-2775
- Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y₁ receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem.*, 1999; 274: 14639-14647
- Hoffmann K, Sixel U, Di Pasquale F, von Kügelgen I. Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y₁₂-receptor. *Biochem Pharmacol.*, 2008; 76: 1201-1213

- Hoffmann K, Baqi Y, Morena MS, Glänzel M, Müller CE, von Kügelgen I. Interaction of new, very potent non-nucleotide antagonists with Arg256 of the human platelet P2Y₁₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 331: 648-55
- Hollopeter G, Jantzen H-M, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang R-B, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 2001; 409: 202-207
- Huang WW, Garcia-Zepeda EA, Sauty A, Oettgen HC, Rothenberg ME, Luster AD. Molecular and biological characterization of the murine leukotriene B₄ receptor expressed on eosinophils. *J Exp Med.*, 1998; 188: 1063-1074.
- Jakubowski JA, Matsushima N, Asai F, Naganuma H, Brandt JT, Hirota T, Freestone S, Winters KJ. A multiple dose study of prasugrel (CS-747), a novel thienopyridine P2Y₁₂ inhibitor, compared with clopidogrel in healthy humans. *Br J Clin Pharmacol.*, 2007; 63: 421-430
- Jiang Q, Guo D, Lee BX, Van Rhee AM, Kim YC, Nicholas RA, Schachter JB, Harden TK, Jacobson KA. A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y₁ receptor. *Mol Pharmacol.*, 1997; 52: 499-507.
- Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95: 8070-8074
- Jneid H, Bhatt DL, Corti R, Badimon JJ, Fuster V, Francis GS. Aspirin and clopidogrel in acute coronary syndromes: therapeutic insights from the CURE study. *Arch Intern Med.*, 2003; 163: 1145-1153
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.*, 2001; 53: 107-118
- von Kügelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.*, 2006; 110: 415-432
- von Kügelgen I, Schiedel AC, Hoffmann K, Alsdorf BB, Abdelrahman A, Müller CE. Cloning and functional expression of a novel G_i protein-coupled receptor for adenine from mouse brain. *Mol Pharmacol.*, 2008; 73: 469-477
- von Kügelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 2000; 362: 310-323
- Kulick MB, von Kügelgen I. P2Y-Receptors Mediating an Inhibition of the Evoked Entry of Calcium through N-Type Calcium Channels at Neuronal Processes. *J Pharmacol Exp Ther* , 2002; 303: 520-526

Le Gouill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem.*, 1997; 272: 21289-21295

Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3rd, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med.*, 1983; 309: 396-403

Liu J, Conklin BR, Blin N, Yun J, Wess J. Identification of a receptor/G-protein contact site critical for signaling specificity and G-protein activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92: 11642-11646

Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittel verstehen – Medikamente gezielt einsetzen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006, 16. Auflage

Marmur JD, Cavusoglu E. The use of the glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists during percutaneous coronary intervention. *J Interv Cardiol.*, 2002; 15: 71-84

Mateos-Trigos G, Evans RJ, Heath MF. Effects of P2Y₁ and P2Y₁₂ receptor antagonists on ADP-induced shape change of equine platelets: comparison with human platelets. *Platelets*, 2002; 13: 285-292

Moro S, Guo D, Camaioni E, Boyer JL, Harden TK, Jacobson KA. Human P2Y₁ receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J Med Chem.*, 1998; 41: 1456-1466

Moro S, Hoffmann C, Jacobson KA. Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y₁ receptor. *Biochemistry*, 1999; 38: 3498-3507

Niitsu Y, Jakubowski JA, Sugidachi A, Asai F. Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel, potent antiplatelet agent with in vivo P2Y₁₂ receptor antagonist activity. *Semin Thromb Hemost.*, 2005; 31: 184-194

[No authors listed]. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. *N Engl J Med.*, 1989; 321: 129-135

[No authors listed]. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*, 1996; 348: 1329-1339.

Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem.*, 2003; 278: 25600-25606

- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289: 739-745
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Aboud KA, Lee YA, Rüschemdorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y₅ and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet.*, 2008; 40: 329-334
- Quintas C, Fraga S, Gonçalves J, Queiroz G. The P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors mediate autoinhibition of transmitter release in sympathetic innervated tissues. *Neurochem Int.* 2009; 55: 505-513
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.*, 2007; 450: 383-387
- Remijn JA, IJsseldijk MJ, Strunk AL, Abbes AP, Engel H, Dikkeschei B, Dompeling EC, de Groot PG, Slingerland RJ. Novel molecular defect in the platelet ADP receptor P2Y₁₂ of a patient with haemorrhagic diathesis. *Clin Chem Lab Med.*, 2007 45: 187-189
- Remijn JA, Wu YP, Jeninga EH, IJsseldijk MJ, van Willigen G, de Groot PG, Sixma JJ, Nurden AT, Nurden P. Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2002; 22: 686-691.
- Sanger F, Nickeln S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 5463-5467
- Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, Kohsaka S. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia.*, 2003; 44: 242-250
- Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2000; 84: 891-896
- Savi P, Zachayus JL, Delesque-Touchard N, Labouret C, Hervé C, Uzabiaga MF, Pereillo JM, Culouscou JM, Bono F, Ferrara P, Herbert JM. The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y₁₂ receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 11069-11074.
- Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen*. Berlin: Springer Verlag, 2000, 28. Auflage
- Simon J, Filippov AK, Goransson S, Wong YH, Frelin C, Michel AD, Brown DA, Barnard EA. Characterization and channel coupling of the P2Y₁₂ nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem.*, 2002; 277: 31390-31400

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 P2Y₁ receptor. *Mol Pharmacol.*, 2001; 60: 432-439

Unterberger U, Moskvina E, Scholze T, Freissmuth M, Boehm S. Inhibition of adenylyl cyclase by neuronal P2Y receptors. *Br J Pharmacol.*, 2002; 135: 673-684

Vial C, Roberts JA, Evans RJ. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci.*, 2004; 25: 487-493

Wallentin L, Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Jakubowski JA, Sugidachi A, Winters KJ, Siegbahn A. Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease. *Eur Heart J.*, 2008 29: 21-30

Zahn R, Fraiture B, Siegler KE, Schnieder S, Gitt AK, Seidl K, Gandjour A, Wendland G, Vogt S, Lauterbach KW, Senges J. Effectiveness of the glycoprotein IIb/IIIa antagonist abciximab during percutaneous coronary interventions (PCI) in clinical practice at a single high-volume center. *Z Kardiol.*, 2003; 92: 438-444.

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Oiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ Jr. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *Biol Chem.*, 2001; 276: 8608-8615

9. Danksagung

Herrn Professor Dr. med Manfred Göthert danke ich für die Möglichkeit, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn eine Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med Ivar von Kügelgen für die Überlassung des Themas und seine umfassende kompetente sowie außerordentlich geduldige und umfangreiche Betreuung während der Labortätigkeit und der Erstellung der Dissertationsschrift.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn bedanken, insbesondere bei Frau Ingeborg Pelzer und Frau Melanie Kulick für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stete Unterstützung sowie Frau Agnes Redmer für ihre kollegiale Hilfe.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt insbesondere meinem Mann, meiner Mutter, meiner Familie und allen Freunden, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit stets liebevoll unterstützt haben.