

**Charakterisierung des heterolog exprimierten  
metabotropen purinergen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aus dem Hirn  
der Ratte (rP2Y<sub>1</sub>) in HEK293-Zellen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.),**

genehmigt durch  
die Fakultät der Naturwissenschaften  
der Otto-von Guericke Universität Magdeburg

von **DIPLOM-BIOLOGE CHRISTIAN VÖHRINGER**

geb. am 11. April 1964 in Reutlingen

Gutachter:  
PROF. DR. GEORG REISER  
PROF. DR. ECKART D. GUNDELFINGER  
PROF. DR. HERBERT ZIMMERMANN

Eingereicht am:

18. April 2000

Verteidigung am:

17. Oktober 2000

Annette und meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Reiser am Institut für Neurobiochemie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Reiser danke ich für die interessante Themenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen, sowie für sein stetes Interesse am erfolgreichen Fortgang dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Organisatoren des Graduiertenkollegs "Biologische Grundlagen neuronaler Erkrankungen" für die Förderung dieser Arbeit, die vielen Möglichkeiten zur Fortbildung und besonders der freundlichen Unterstützung von Elke Schillings im Sekretariat des Kollegs.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E.D. Gundelfinger für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am Leibniz-Institut für Neurobiologie den Großteil der praktischen Arbeiten meines Projekts durchzuführen. Für viele wertvolle Tips, anregende Diskussionen, tatkräftige Unterstützung und ein sehr angenehmes Arbeitsklima gilt mein aufrichtiger Dank der gesamten Arbeitsgruppe, aus der stellvertretend Kathrin Zobel, Dr. Th. Dresbach, Dr. K.-H. Smalla, Dr. C. Seidenbecher, Dr. K. Langnaese, Dr. W. Tischmeyer, Dr. M. Kreutz und Angelika Durek genannt sein sollen.

Insbesondere möchte ich mich hier bei Herrn Dr. J.J. Ubl bedanken, der mich mit der Technik und der Strategie des „Ca<sup>2+</sup>-Imaging“ vertraut gemacht und durch konstruktive Begleitung des Projekts und kritische Durchsicht des Manuskripts wesentlich zu seinem Erfolg beigetragen hat. Sicherlich nicht weniger Anteil hatte Herr Dr. R. Schäfer, dem ich für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen auch außerhalb des Labors, sowie die Durchsicht des Manuskripts danken möchte. Herrn Dr. R. Stricker und Frau Dr. A. Horstmeyer möchte ich für ihre Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft danken.

Für ihre technische Unterstützung danke ich Frau Christoph, Frau Schubert und Frau Hennig. Allen anderen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Eckehard Hülser, Michael Aggensteiner, Marco Ritzmann, Bärbel Stix und Gundula Streibel möchte ich für die gute Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. G. Schmalzing für die Bereitstellung des rP2Y<sub>1</sub>-cDNA Klons und Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1	<b>G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) .....</b>	<b>8</b>
1.2	<b>G-Proteinaktivierung und Signaltransduktionskaskade von GPCR.....</b>	<b>10</b>
1.3	<b>Regulation von GPCR-Aktivität.....</b>	<b>13</b>
1.4	<b>Einteilung, Vorkommen und physiologische Wirkungen purinerger Rezeptoren .....</b>	<b>14</b>
1.5	<b>Klonierte P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren und die endogenen „P2Y<sub>1</sub>/P2Y<sub>2</sub>- ähnlichen“ Rezeptoren .....</b>	<b>18</b>
1.6	<b>Effektoren der P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor Signaltransduktionskaskade .....</b>	<b>19</b>
	1.6.1 Stimulation der Phospholipase C (PLC) .....	19
	1.6.2 Stimulation von Proteinkinase C (PKC) .....	20
	1.6.3 Regulation von Adenylatzyklase (AC) .....	21
1.7	<b>Regulation der Aktivität von P2Y<sub>1/2</sub>-Rezeptoren durch posttranslationale Modifikationen .....</b>	<b>23</b>
1.8	<b>„Green Fluorescent Protein“ (GFP) als Fusionsanteil heterolog exprimierter GPCR .....</b>	<b>24</b>
1.9	<b>Zielstellung des Projekts .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
2.1	<b>Materialien .....</b>	<b>29</b>
	2.1.1 Geräte.....	29
	2.1.2 Laborgeräte .....	29
2.2	<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>30</b>
	2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	30
	2.2.2 Zellkultur Methoden .....	30
	2.2.3 Ca <sup>2+</sup> -Imaging.....	31
	2.2.4 Immunoassays.....	31
	2.2.5 Gelelektrophorese .....	31
	2.2.6 Primeroligonukleotide für die PCR bzw. RT-PCR: .....	31
	2.2.7 Sonstige Materialien .....	32
	2.2.8 Puffer und Lösungen.....	32
2.3	<b>Methoden .....</b>	<b>33</b>
	2.3.1 Molekularbiologische Methoden .....	33
	2.3.2 DNA-Sequenzierung.....	39
	2.3.3 Zellbiologische Methoden.....	42
	2.3.4 Proteinchemische Methoden .....	44
	2.3.5 Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen.....	46
	2.3.6 Zytoplasmatische Kalziumfreisetzung .....	47
	2.3.7 Mikroskopie .....	51

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
3.1	Erzeugung der Expressionsvektorkonstrukte für den P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor (rP2Y <sub>1</sub> ) aus dem ZNS der Ratte .....	53
3.2	Nukleotidsequenz des cDNA-Klons für den P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor aus dem Hirn der Ratte .....	54
3.3	Sequenzmotive in der Aminosäuresequenz der P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	58
3.4	RT-PCR: Gewebsverteilung der rP2Y <sub>1</sub> Rezeptoren in der Ratte .....	59
3.5	Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien.....	61
3.6	PCR Analyse der Gesamt-RNA aus stabil-transfizierter HEK293 Zelllinien.....	61
3.7	<b>Immunodetektion des P2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors in HEK293 Zellen</b> .....	<b>64</b>
	3.7.1 Lokalisation des rP2Y <sub>1</sub> -eGFP Fusionsproteins .....	64
	3.7.2 Untersuchung der glykosylierten Membranproteine stabil-transfizierter HEK293 rP2Y <sub>1</sub> -eGFP Zellen .....	65
3.8	<b>Transiente Expression des rP2Y<sub>1</sub>-wt Konstrukts in C-6-4-2 Gliom- und HEK293 Zellen</b> .....	<b>67</b>
3.9	<b>Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien</b> .....	<b>69</b>
	3.9.1 Variabilität der Ca <sup>2+</sup> -Antworten bei HEK293-Zellen am Beispiel der stabil transfizierten Zelllinie rP2Y <sub>1</sub> -eGFP .....	69
3.10	<b>Zusammenhang zwischen der Intensität der GFP-Fluoreszenz und der 2-MeSADP Sensivität bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen</b> .....	<b>71</b>
3.11	<b>Ca<sup>2+</sup>-Messungen an stabil-transfizierten HEK293 Zelllinien</b> .....	<b>72</b>
3.12	<b>Konzentrations-Effekt Kurven der verschiedenen Nukleotidagonisten an den HEK293 Zelllinien</b> .....	<b>74</b>
3.13	<b>Inhibition P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor abhängiger Ca<sup>2+</sup>-Antworten in HEK293 Zellen</b> .....	<b>79</b>
3.14	<b>Mechanismen der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)</b> .....	<b>82</b>
	3.14.1 Erfolgt die durch P2Y-Agonisten evozierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung für P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>2</sub> aus denselben Speichern? .....	82
	3.14.2 Anteil von extrazellulärem Ca <sup>2+</sup> an der durch 2-MeSATP induzierten [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> -Erhöhung.....	84
	3.14.3 Kapazitiver Ca <sup>2+</sup> -Einstrom bei HEK293 Zellen.....	85
3.15	<b>Phospholipase C (PLC) –Kopplung der in HEK293 Zellen exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren</b> .....	<b>88</b>
3.16	<b>Wirksamkeit verschiedener strukturanaloger ATP-Verbindungen an den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren</b> .....	<b>91</b>
3.17	<b>Beteiligung von G<sub>q/11</sub>-Protein an der Signaltransduktion der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen</b> .....	<b>94</b>

<b>3.18</b>	<b>Experimente zum Desensitierungsverhalten des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in den verschiedenen HEK293 Zelllinien .....</b>	<b>95</b>
<b>3.19</b>	<b>Heterologe Desensitierung zwischen P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zelllinien .....</b>	<b>100</b>
<b>3.20</b>	<b>Proteinphosphorylierung und P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorregulation.....</b>	<b>101</b>
	3.20.1 Beteiligung von Proteinkinase C (PKC) und Calmodulin aktivierter Kinase (CamK) an der Regulation von P2Y <sub>1</sub> -Rezeptoren in HEK293-Zellen.....	101
	3.20.2 Beteiligung von Proteinphosphatasen an der P2Y <sub>1</sub> -Rezeptorregulation .....	102
<b>3.21</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen.....</b>	<b>105</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Nachweis der funktionellen Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293.....</b>	<b>112</b>
	4.1.1 Biochemische Charakterisierung .....	112
	4.1.2 Pharmakologische Charakterisierung.....	113
	4.1.3 G-Protein-Kopplung.....	117
	4.1.4 Kapazitiver Ca <sup>2+</sup> -Einstrom.....	119
<b>4.2</b>	<b>Rezeptorregulation .....</b>	<b>121</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>138</b>

## 1 Einleitung

Nukleotide wie z.B. ATP und ihre Abbauprodukte - ADP und Adenosin - besitzen neben ihrer Rolle im intrazellulären Energiehaushalt noch eine wichtige Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle. Dabei sind sie am komplexen Prozeß der Signalweiterleitung zwischen Zellen beteiligt und entfalten ihre Wirkung durch die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren gehören zu den sogenannten P1- oder P2-Rezeptoren. Einige Vertreter dieser Rezeptoren gehören zur Klasse der liganden-aktivierten Ionenkanäle, andere zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Ihr ubiquitäres Vorkommen – nicht nur Neuronen und gliale Zellen besitzen diese Rezeptoren, sondern ebenso fast alle nicht-neuronalen Zellen – und ihr Einfluß auf grundlegende zelluläre Prozesse legen die Vermutung nahe, daß Nukleotide zu den ältesten extrazellulären Botenstoffen überhaupt gehören und unterstreichen die Tatsache, daß auch zwischen nicht- neuronalen Zellen eine “Reizweiterleitung” existiert [1].

### 1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Viele Botenstoffe (Hormone, Neurotransmitter, Peptidhormone und Wachstumsfaktoren) sind nicht membranpermeabel und vermitteln deshalb ihre Signalwirkung über für sie spezifische, integrale Membranoberflächenmoleküle, sogenannte Rezeptoren, ins Zellinnere. Diese Signaltransduktion kann prinzipiell auf unterschiedliche Weise erfolgen: i) die Bindung des Botenstoffs aktiviert eine rezeptoreigene Strukturdomäne, die Tyrosin-Kinaseaktivität besitzt. Diese führt zur Phosphorylierung des Rezeptors selbst und anderer zellulärer Proteine, die dadurch in ihrer Aktivität reguliert werden (z.B. der Insulinrezeptor und Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren) ii) Rezeptormoleküle, die einen Ionenkanal bilden, werden durch die Bindung des Botenstoffs geöffnet bzw. geschlossen. Dies führt zur Veränderung des Ionenmilieus in der Zelle, d.h. in der Regel zur Veränderung des Membranpotentials (z.B. GABA-, nikotinischer Rezeptor, ionotope Glutamatrezeptoren, purinerge P2X-Rezeptoren) iii) die Rezeptoren der meisten Gewebshormone und Neurotransmitter vermitteln das Signal über die Aktivierung trimerer Proteinkomplexe (G-Proteine) an Effektoren in der Zelle.

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist eine der größten proteinkodierenden Gen-Familien im Vertebratengenom. Es sind bereits über 1000 (ca. 1200 ) Mitglieder dieser Gruppe bekannt und es ist zu erwarten, daß noch eine ganze Anzahl im Laufe der großen molekularen Genomkartierungsprojekte (z.B. das „human genom project“) hinzukommen. Die bekannten GPCR werden auf Grund von Sequenzhomologien, die diese



vor allem in den sieben membrandurchspannenden Domänen (TMD) aufweisen, in fünf Klassen eingeteilt. Die Klassen A und B stellen die zahlenmäßig größten Klassen dar und die meisten der bisher bekannten GPCR sind dort eingeordnet.

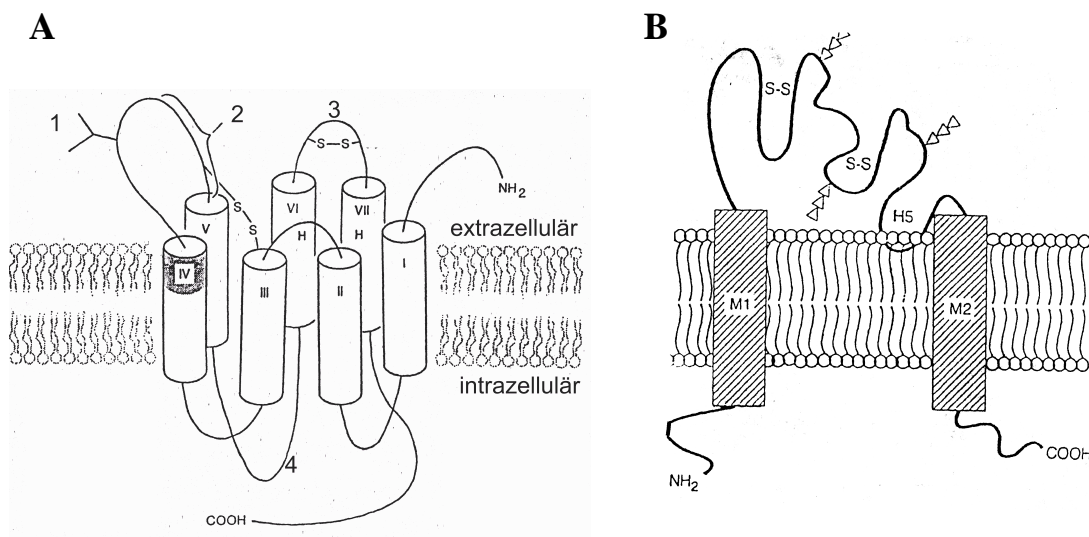
**Klasse A Rodopsin ähnliche** (u.a. muskarinische Acetylcholinrezeptoren, Endothelin, Bradykinin-, Dopamin-, Adreno-, Histamin-, Serotonin-, Angiotensin-, Adenosin-, Purino-rezeptoren, Thrombin- bzw. Protease-aktivierte Rezeptoren, sowie die große Gruppe der olfaktorischen Rezeptoren)

**Klasse B Sekretin-ähnliche** (Calcitonin-, Glukagon-, Growth hormone-releasing Faktor, Sekretinrezeptoren u.a.)

**Klasse C metabotrope Glutamatrezeptoren** (mGluR I-III) ähnliche

**Klasse D Pheromonrezeptoren**

**Klasse E cAMP Rezeptoren (Dictyostelium)**



(Grafik abgewandelt aus [2])

**Abbildung1: Strukturmodell eines GPCR und eines Liganden-gesteuerten Ionenkanals**

**A ) Strukturmodell eines GPCR der Klasse A:** Der extrazelluläre N-Terminus weist potentielle Glykosylierungsstellen auf (1). Die 7 TMD (I-VII) von ca. 20-30 Aminosäuren Länge, sind über extrazelluläre bzw. intrazelluläre Schleifen verbunden (s. Abb. 1A: 3 und 4). Bestimmte Schleifen können zusammen mit extrazellulär liegenden Bereichen einiger TMD [3] eine Ligandenbindungstasche für „kleine Liganden“ (z.B. Nukleotide) bilden. Größere Liganden werden von speziellen Bereichen extrazellulärer Schleifen erkannt (2). Intrazelluläre Schleifen (IS), v.a. die dritte IS (in der Abb. mit 4 bezeichnet) und der C-Terminus sind an der Interaktion des Rezeptors mit G-Proteinen beteiligt. Der C-Terminus spielt eine wichtige Rolle für die Rezeptorregulation (z.B. Desensitisierung) und bei der Interaktion mit anderen Proteinen (z.B. beim  $\beta$ 2-Adrenozeptor [4]). Im C-terminalen Bereich liegen Konsensussequenzen potentieller, posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung und Palmitoylierung.

**B) Liganden-gesteuertes Ionenkanal des P2X<sub>2</sub>-Typs** (1 Untereinheit)

Diese Rezeptoruntereinheiten besitzen 2 TMD, N- und C-Terminus liegen intrazellulär. Die extrazelluläre Schleife dieser ATP-sensitiven, nicht-selektiven Kationenkanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  [2]) weist ebenfalls Glykosylierungsstellen auf.

Definitionsgemäß interagieren GPCR, durch ihre spezifischen Liganden aktiviert, mit intrazellulären G-Proteinen und leiten so das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weiter. Die strukturelle Organisation der GPCR hat große Ähnlichkeit mit der des Bakteriorhodopsins (BR). Zwar fehlt dafür noch der direkte Beweis, aber es gibt eine Fülle von experimentellen Befunden, die diese Strukturähnlichkeit belegen. BR gehört selbst nicht zur Gruppe der GPCR, wurde aber auf Grund seiner leichten Verfügbarkeit als „Prototyp“ GPCR-ähnlicher Proteine in seiner Ultrastruktur aufgeklärt. Wie BR besitzen alle GPCR sieben hydrophobe, die Membran durchspannende, helikale Domänen (7 TMD).

Vermutlich bilden sie in der Plasmamembran, durch ihre Lage zueinander, eine charakteristische BR-ähnliche Tertiärstruktur: die sogenannte „Tonnenstruktur“ („barrel structure“ Abbildung 1 A). In Abhängigkeit zu dieser Tertiärstruktur werden funktionelle Eigenschaften ausgebildet, die von entscheidender Bedeutung für Ligandenerkennung und G-Protein Bindung sind. Diese funktionellen Rezeptoreigenschaften stehen in kausalem Zusammenhang mit dem Vorhandensein bestimmter Aminosäuren in wichtigen räumlichen Positionen des Rezeptorproteins. Für  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptoren wurden auf Grund ihrer Aminosäuresequenz Strukturmodelle berechnet an denen die mechanistische Vorstellung gewonnen wurde, daß sehr wahrscheinlich positiv geladene Aminosäuren in den TMD 3, 6 und 7 durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Bindung der Phosphatgruppen von ATP beteiligt sind [5].  $\text{P2X}$ -Rezeptoren sind Liganden-kontrollierte Ionenkanäle, die sich aus 3 – oder einem Vielfachen von 3 - Untereinheiten zusammensetzen [6]. Elektrophysiologische Daten legen die Existenz von homomeren und heteromeren  $\text{P2X}$ - Rezeptortypen nahe (Evans & Suprenant in [2,7]).

## 1.2 G-Proteinaktivierung und Signaltransduktionskaskade von GPCR

Konformationelle Veränderungen, die durch die Bindung eines Signalmoleküls am entsprechenden Rezeptor ausgelöst werden, führen zur Interaktion der intrazellulären Schleifen mit bestimmten G-Proteinen. G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Im nicht-aktiven Zustand ist an die  $\alpha$ -Untereinheit des trimeren G-Proteinkomplexes GDP gebunden. Durch die Ligand/Rezeptor-Interaktion wird GDP gegen GTP ausgetauscht und der ternäre G-Proteinkomplex zerfällt in die aktivierte  $\text{G}\alpha$ -Untereinheit, die GTP gebunden hält, und die  $\text{G}\beta,\gamma$ -Untereinheit. Die  $\text{G}\alpha$ -Untereinheit assoziiert ihrerseits mit

Effektorenzymen, die dadurch aktiviert werden und zur Bildung von sekundären Botenstoffen führen. Auch die  $\beta,\gamma$ -Untereinheit ist in der Lage spezifische Effektorsysteme zu aktivieren, was ebenfalls zur Bildung von „second messenger“ Molekülen (z.B. cAMP) oder zur direkten Aktivierung von Ionenkanälen (z.B.  $K^+$ -Kanal) führen kann.

Die Aktivierung der Effektorsysteme hält solange an, wie die Assoziation mit  $G\alpha$ -GTP besteht. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP umgesetzt, was zur Dissoziation von  $G\alpha$  vom Effektor führt und dessen Aktivierung beendet.  $G\alpha$ -GDP reassoziert anschließend mit  $G\beta,\gamma$  zum inaktiven trimeren G-Proteinkomplex, der damit für eine neue Aktivierung bereitsteht. Die für isolierte  $G\alpha$ -Untereinheiten ermittelte GTPase-Aktivität ist sehr niedrig ( $t_{1/2}$  ca. 10-20 s), obwohl sie ca. 100mal höher ist als die GTPase-Aktivität von monomeren, ras-homologen Proteinen (z.B. die „kleinen G-Proteine“ Ras und Rho). Dieser Befund steht im Widerspruch zur Geschwindigkeit der GTPase-Aktivität vieler G-Proteine (u.a. Transducin in [8]), die unter *in vivo*-Bedingungen gemessen wurden. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang, die Beteiligung von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP), die diese Aktivitätssteigerung bewirken sollen. Unklar ist jedoch die Lokalisation dieser GAP.  $G\alpha$ -Untereinheiten besitzen GAP-ähnliche Strukturdomänen [9], die diese Funktion übernehmen könnten. Daneben ist die Beteiligung separater GAP nicht auszuschließen und sehr wahrscheinlich spielen auch die Effektorproteine der G-Proteine eine Rolle bei der Regulation der GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheit. Besitzen Effektorproteine von G-Proteinen tatsächlich GAP-Aktivität ist hier ein Rückkopplungsmechanismus verwirklicht, der über einen integralen Bestandteil des jeweiligen Signaltransduktionswegs vermittelt wird und deshalb ebenfalls den spezifischen Kontrollmechanismen dieses Transduktionswegs unterworfen ist [10,11].

Eine weitere Möglichkeit der Regulation auf der Ebene der G-Proteine besteht in der Interaktion sogenannter „Regulatorproteine der G-Protein Signaltransduktion“ (RGS) mit  $G\alpha$ -Untereinheiten. Insbesondere spielt diese Proteinfamilie bei der Desensibilisierung von G-Protein gekoppelten und MAPK-Kinase abhängigen Transduktionsprozessen in Hefe- und Säugerzellen eine Rolle [8]. Ergänzend sollen hier noch die GTP-Austauschfaktoren (GEF) erwähnt werden, die bei der Regulation von Proteinen der Raf-Superfamilie (i.e. Rho-GTPasen) beteiligt und oft Angriffspunkte bakterieller Toxine sind [12].

Zwei sehr wichtige Effektorsysteme der G-Proteinaktivierung sind das Adenylatzyklase-System (AC) und die Phospholipasen A, C und D (PLA, PLC, PLD), die zur Bildung der wichtigen „second messenger“ Inositol (1,4,5) trisphosphat (durch PLC) und cAMP

(durch AC), oder von Arachidonsäure (durch PLA<sub>2</sub>) und Cholin (durch PLD) führen. Über Konzentrationsveränderungen der sekundären Botenstoffe DAG, cAMP bzw. Ca<sup>2+</sup>, das durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt wird, werden im Allgemeinen Ser/Thr-Proteinkinasen (PKA, PKC und CamKII) aktiviert. Dies führt sowohl zu kurzfristigen Effekten, wie z.B. der „feed-back“-Hemmung der Rezeptoren, der Aktivierung oder Hemmung von Enzymen durch Phosphorylierung, als auch zu länger anhaltenden Wirkungen, wie z.B. Proliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose oder dem Überleben von Zellen.

Lange anhaltende Effekte sind mit einer Aktivierung der „immediate early genes“ (i.e.g.) c-fos und c-jun verbunden, die generell über zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege erreicht werden kann: i) Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB / ATF und SRE) werden durch aktivierte Kinasen (z.B. PKA, PKC und CamK) phosphoryliert und führen zur Induktion von c-fos [13], oder ii) durch Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), die u.a. durch CamK eingeleitet werden kann, werden i.e.g induziert. Wichtige Elemente der unterschiedlichen MAPK –Wege sind Raf / Mos, MEK und ERK [14] bzw. MEKK1-4, MKK und JNK/p38 [15]. Eine gemeinsame, wichtige Komponente dieser MAPK-Wege ist die Aktivierung - d.h. Phosphorylierung - des TCF (ternary complex factors) Elk1, der ebenfalls zur c-fos Induktion führt.

Die Dephosphorylierung von Elk1 durch Calcineurin [13], einer Ca<sup>2+</sup>-regulierten Ser/Thr-Phosphatase, ist ein möglicher Abschaltmechanismus dieser c-fos Aktivierung. C-fos und C-Jun können mit weiteren AP-1 Proteinen zu Komplexen zusammentreten und eine ganze Reihe von „late response“ Genen induzieren. Mitogene Signale werden von GPCR aber auch auf eine weitere, indirekte Weise vermittelt. Durch Tyrosinphosphorylierung von Adapterproteinen (z.B. Shc, Grb2) werden Signalmoleküle wie z.B. PLC $\gamma$ , GAP, PI3K rekrutiert. Zusammen mit Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTK) führen sie zur Bildung von Multiproteinkomplexen, die eine Aktivierung von Ras-Protein zur Folge haben. Die Aktivität von Ras führt letztlich zur Aktivierung von ERK1/ERK2.

GPCR tragen über verschiedene Mechanismen zur Bildung dieser Multiproteinkomplexe bei: i) durch eine Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen (z.B. EGF-Rezeptor) – diskutiert wird hier die Bedeutung von  $\beta$ , $\gamma$ -Untereinheiten [16] - ii) durch die Bildung von Integrindimeren und der anschließenden PKC/Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivierung einer FAK (focal adhesion kinase z.B. Pyk2), oder iii) durch Bindung spezifischer Kinasen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GRK) und von Src-Kinasen (z.B.  $\beta$ 2 adrenerger Rezeptor,  $\beta$ -

Arrestin, c-SRC). Dabei spielen Desensibilisierung und Internalisierung der GPCR mittels „clathrin-coated pits“ eine Rolle [17].

### 1.3 Regulation von GPCR-Aktivität

Eine permanente Aktivierung oder Inhibition von Signaltransduktionskomponenten, wie sie z.B. durch die Wirkung von Cholera- und Pertussistoxin auf  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten hervorgerufen wird, führt zu pathologischen Zuständen. Aber nicht nur pathogene Mikroorganismen und Pharmaka können zur Daueraktivierung von GPCR führen, spontane oder konstitutive Aktivierung von GPCR, die unabhängig von der Anwesenheit spezifischer Agonisten erfolgt, ist für eine Reihe von Erkrankungen beim Menschen verantwortlich. Spontan auftretende Mutationen in der Rezeptorsequenz können einen aktivierten Zustand des Rezeptors stabilisieren. Diese aktivierte Rezeptorkonformation ist wichtig für eine effiziente Interaktion des Rezeptors mit den entsprechenden G-Proteinen [18].

Die Mechanismen der Signaltransduktion unterliegen deshalb einer strengen Kontrolle, d.h. auf jeder Ebene dieser Transduktionskaskaden stehen Mechanismen zur Signaltermination bzw. -modulation zur Verfügung. Auf der Ebene der Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung spielen der „turn-over“ des Liganden, die Modulation der Rezeptoraffinität, die vor allem vom Aktivitätszustand der auf der Zelloberfläche vorhandenen GPCR abhängt, und die Gesamtzahl aktivierbarer GPCR in der Plasmamembran, die durch Rezeptordesensibilisierung, -internalisierung und -recycling [19] reguliert werden kann, eine wichtige Rolle.

Homologe Desensibilisierung bei GPCR beruht auf der Aktivität einer Klasse von Proteinkinasen (Ser/Thr), die als G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) bezeichnet werden. Diese Gruppe besteht bis jetzt aus 6 Mitgliedern: GRK 1-6. Darunter GRK 1, auch Rhodopsin Kinase genannt, und GRK 2/3, ebenfalls als  $\beta$ -adrenerge Rezeptor Kinase ( $\beta$ -ARK) bekannt. Die Regulation der GRK-Aktivität erfolgt subtypspezifisch, in  $Ca^{2+}$ -abhängiger Weise durch Kalziumsensorproteine wie Calmodulin (GRK 4,5,6) oder Recoverin (GRK1,2,5).

Die GRK-induzierte Rezeptorphosphorylierung begünstigt die Bindung von  $\beta$ -Arrestinproteinen an die GPCR. Arrestine verhindern die erneute Kopplung von G-Proteinen an die GPCR und markieren die Rezeptoren sehr wahrscheinlich für die Endozytose [20]. Die Internalisierung der GPCR erfolgt im Allgemeinen über Clathrinvesikel [21,22,17]. Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen Caveolin-haltige Vesikel die Internalisierung vermitteln [23]. Heterologe Desensibilisierung erfolgt durch die Aktivität von "second messenger" Proteinkinasen (z.B. PKA, PKC und CamK), d.h. nicht nur aktivierte Rezeptoren können phos-

phoryliert werden, sondern ebenfalls Rezeptoren die kein Signalmolekül gebunden haben. Solche Rezeptoren werden von Proteinkinasen, die in Folge der Aktivierung anderer Rezeptoren aktiv sind, phosphoryliert und dadurch desensitisiert. Durch heterologe Desensitisierung wird die Aktivität unterschiedlicher GPCR einer Zelle reguliert, die ähnliche Signaltransduktionswege benutzen, aber durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden. PKC und PKA sind vermutlich auch an der Regulation der Expression von GRK und Arrestinen [24,25] beteiligt.

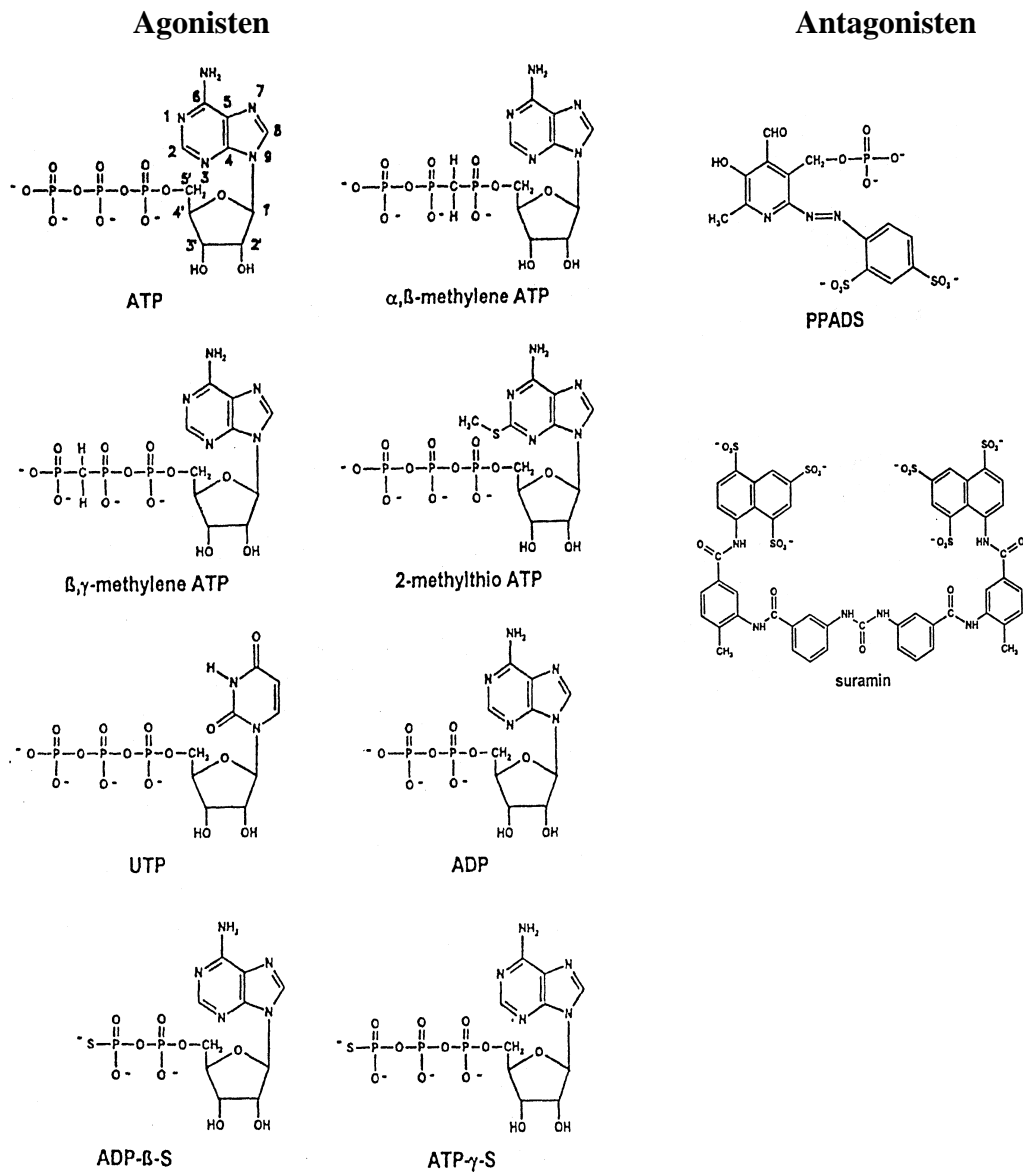
Die Internalisierung desensitisierte Rezeptoren ist Voraussetzung für den Vorgang des Rezeptorrecycling. Dabei werden desensitisierte GPCR in Endosomen durch Phosphatasen dephosphoryliert, womit sie erneut in einen aktivierbaren Zustand gebracht werden können. Internalisierte Rezeptoren unterliegen aber zu einem gewissen Anteil auch der Degradation, d.h. diese Rezeptoren werden durch Proteasen in Lysosomen abgebaut. GPCR, die im Laufe ihrer Aktivierung irreversibel verändert werden, wie es bei Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR1-3) der Fall ist, unterliegen naturgemäß in hohem Ausmaß einem - zumindest teilweisen - Abbau und sind beispielhaft für GPCR-Regulation, die in starkem Maß auf transkriptioneller Ebene stattfindet.

### **1.4 Einteilung, Vorkommen und physiologische Wirkungen purinergere Rezeptoren**

Extrazelluläre Purine (ATP, ADP und Adenosin) und Pyrimidine (UTP, UDP) vermitteln interzelluläre Signale über Rezeptoren, die sich in zwei übergeordnete Gruppen einteilen lassen: die Adenosin oder P1-Rezeptoren und die P2-Rezeptoren, die vor allem durch die Di- und Triphosphate von Adenosin und Uridin aktiviert werden. Bei den P1-Rezeptoren lassen sich auf Grund molekularer, biochemischer und pharmakologischer Charakteristika vier Subtypen beschreiben: A1, A2A, A2B und A3, wobei alle zu den GPCR gehören. Unterschiede in der molekularen Struktur und der Signaltransduktionsmechanismen führen bei den P2-Rezeptoren zu einer Unterteilung in zwei Familien, den Ligandengesteuerten Ionenkanälen (P2X) und den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (P2Y).

Über Agonistenwirkungsreihen, die mit diversen ATP-Analoga durchgeführt wurden, wurde zunächst eine pharmakologische Unterteilung der unterschiedlichen P2-Rezeptorsubtypen etabliert. Alle P2-Rezeptoren haben ein breites Spektrum ähnlicher Agonisten: ATP, ADP, UTP, UDP und Diadenosinpolyphosphate (z.B. [26]). Das macht die pharmakologische Differenzierung der P2-Rezeptortypen bzw. deren Subtypen kompliziert, weil spezifische

Antagonisten und Agonisten, die verlässlich zwischen P2Y und P2X-Rezeptoren unterscheiden, nicht verfügbar sind.



**Abbildung 2: Strukturen einiger Schlüsselsubstanzen (Agonisten und Derivate)**

Strukturformeln einiger Schlüsselsubstanzen zur pharmakologischen Klassifizierung von P2Y-Rezeptoren und der zwei gebräuchlichsten antagonistisch wirkenden Substanzen.

Zur Klassifizierung der Rezeptoren werden deshalb, mit Hilfe stabiler ATP/ADP-Analoga, Agonistenwirkungsreihen erstellt. Ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen P2X- und P2Y-Rezeptoren ist die Wirksamkeit von  $\alpha,\beta$  methylen-ATP bzw.  $\beta,\gamma$  methylen-ATP, die beide praktisch nur P2X-Rezeptoren aktivieren (vor allem P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub>). ADP, 2-MeSADP, ADP $\beta$ S und UTP sind hingegen fast ausschließlich an P2Y-Rezeptoren aktiv [2].

Die Koexpression verschiedener P2-Rezeptoren in der gleichen Zelle, die Stabilität und Reinheit der eingesetzten Substanzen und die Wirkung von Ektonukleotidasen [27] machen die Interpretation der erhaltenen Wirkungsreihen kompliziert. Die Revision der anfänglichen Klassifizierung wurde auch durch molekularbiologische Erkenntnisse notwendig. Es stellte sich nämlich heraus, daß eine größere Anzahl von Rezeptorsubtypen existiert als auf Grund der pharmakologischen Daten zu erwarten war. Mittlerweile sind eine Anzahl unterschiedlicher P2-Rezeptortypen bzw. deren Sequenzen publiziert. Bis heute sind die Sequenzen von sieben P2X-Rezeptortypen (P2X 1-7) und von zehn P2Y-Rezeptortypen (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>3</sub>, P2Y<sub>4</sub>, p2y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, p2y<sub>8</sub>, P2Y<sub>9</sub>, P2Y<sub>10</sub>, P2Y<sub>11</sub>) kloniert und als echte Gruppenmitglieder durch die Charakterisierung der exprimierten Rezeptoren akzeptiert (Übersicht in [28] oder [29]). Von den P2Y-Rezeptoren stammen acht aus dem Säuger genom (durch Großbuchstaben in der Abkürzung zu erkennen), die anderen zwei sind homologe Sequenzen aus anderen Vertebraten (Aves p2y<sub>5</sub> und Xenopus p2y<sub>8</sub>).

Rezeptor-cDNA-Sequenzen metabotroper P2-Rezeptoren (P2Y) des P2Y<sub>1</sub>/ P2Y<sub>2</sub>-Typs wurden aus verschiedenen Spezies und Geweben isoliert. Darunter P2Y<sub>1</sub>-Sequenzen aus Hühnerhirn [30], Truthahnhirn [31], M1N6 Insulinomzellen der Maus, R1Nm5f Insulinomzellen der Ratte [32], Rinderaortenepithel [33], Erythro-Leukämie Zellen [34], Plazentazellen [35], Hirngewebe [36], sowie Ovarienzellen des Menschen [37]. P2Y<sub>2</sub>-Sequenzen stammen aus Neuroblastomzellen NG-108 [38], dem Epithel menschlicher Luftwege [39], alveolaren Epithelzellen Typ II der Ratte [40], Hypophysengewebe der Ratte [41], einem Mammakarzinom der Maus [42], menschlichem Knochengewebe [43], Koronargewebe der Ratte [44] und aus Wistar-Ratte [45].

Erste Schwerpunkte der Forschung an purinergen Rezeptoren waren Herzmuskel, vaskuläres System (Folkow et al. 1949, Hashimoto et al. 1964 in [2]), Blutplättchenaggregation und Mastzellaktivierung. Mittlerweile sind purinerge Rezeptoren in den unterschiedlichsten biologischen Systemen, von der Einzelzelle bis hin zum ganzen Organismus nachgewiesen. Ihr ubiquitäres Vorkommen zeigt die Beteiligung an vielfältigen physiologischen Funktionen: die Kontraktion glatter Muskulatur, Neurotransmission in PNS und ZNS, exokrine und endokrine Sekretion, wie z.B. die Insulin- [46,47] und Cytokinsekretion [48], Apoptose [49], Immunantwort, Entzündungsgeschehen, Schmerz, Modulation von Herzfunktionen und die Regulation des extrazellulären Ionenmilieus – Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> in Niere und Lunge [50,51] - um nur einige zu nennen (s.a. [2]).

Die Frage nach der physiologischen Funktion von extrazellulären Nukleotiden und ihren Rezeptoren ist eng mit der Frage nach den Freisetzungsorten extrazellulärer Nukleotide



verbunden. Die ersten bekannten Gewebe in denen Nukleotide freigesetzt werden waren der Herzmuskel (unter hypoxischen Bedingungen wird Adenosin ausgeschüttet), der Skelettmuskel und sensorische Nervenenden im Ohr des Kaninchens. Die Funktion von ATP als Neurotransmitter oder Kotransmitter und von Adenosin als Neuromodulator ist vielfach belegt (Übersicht in [52] und [2]) und es gibt Hinweise, daß Diadenosinpolyphosphate die gleiche Funktion übernehmen [53]. Weitere wichtige Purinquellen sind Chromaffinzellen der Nieren (Cena Rojas et al. 1990), Blutplättchen (Born and Kratzer 1984, Gordon et al. 1986), Erythrozyten (Forrester et al. 1990, Ellsworth et al. 1995), Mastzellen, basophile Leukozyten [54], Fibroblasten, Endothelzellen (Ravelic et al. 1991, Bodin et al. 1992) und Epithelzellen [55,56] von denen ATP unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen freigesetzt werden kann (Übersicht in [2]). UTP wird auf physiologisch relevante Stimuli von kultivierten Endothelzellen, Epithel- und Astrozytomzellen freigesetzt ([55,57] und Übersicht in [58]).

Trophische Effekte extrazellulärer Nukleotide und Nukleoside auf gliale und neuronale Zellen [59], die von J.T.Neary, M.P.Abracchio und G. Burnstock postuliert werden, sind medizinisch von besonderem Interesse. Bei Reparaturmechanismen im Hirn nach ischämischen oder traumatischen Verletzungen, wenn es zur Freisetzung großer Mengen von Nukleotiden und Nukleosiden aus sterbenden oder beschädigten Zellen kommt, scheinen diese als trophische bzw. neuroprotektive Faktoren zu wirken. Es gibt Hinweise auf die nukleotidinduzierte Synthese bestimmter Neurotrophine und Pleiotrophine bei Astrocyten [2]. Beschrieben wurden auch synergistische Effekte von Nukleotiden und Peptidwachstumsfaktoren (bFGF) auf die Mitogenese von Astrocyten [60]. Die trophischen Effekte der extrazellulären Nukleotide sind wahrscheinlich durch P2-Rezeptoren vermittelt, die subtypspezifisch an verschiedene Transduktionssysteme koppeln und neben  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung, den Phosphoinositolmetabolismus, die Proteinphosphorylierung und die MAPK-Kaskade beeinflussen.

P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren besitzen unter den metabotropen, purinergen P2-Rezeptoren (P2Y), bei weitem die größte Verbreitung in Geweben und Zellen. Die Tatsache, daß genau diese beiden Rezeptortypen sehr oft gleichzeitig in einer Zelle exprimiert werden, unterstreicht die differenzierte physiologische Wirkung der verschiedenen Nukleotide (ATP und UTP). Entsprechend groß ist die Fülle experimenteller und klinischer Befunde für diese Rezeptoren [2] und deshalb konzentriert sich das Folgende auf Erkenntnisse zu diesen Subtypen.

## 1.5 Klonierte P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren und die endogenen „P2Y<sub>1</sub>/P2Y<sub>2</sub>-ähnlichen“ Rezeptoren

Heterolog exprimierte, rekombinante P2Y-Rezeptoren sind 308 – 373 Aminosäuren lange, glykosylierte Proteine mit einer molekularen Masse zwischen 41- 53 kDa. Ihre Tertiärstruktur entspricht mit hoher Wahrscheinlichkeit der eines 7 Transmembranrezeptorproteins (GPCR), das an G-Proteine koppelt (s.a. Abbildung 1 A). Als P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren im engeren Sinne, werden nur die klonierten P2Y-Rezeptoren bezeichnet. Da ihre cDNA-Sequenz bekannt ist, lassen diese sich eindeutig einem P2Y-Subtyp zuordnen. Endogene P2Y-Rezeptoren, die sich auf Grund ihres pharmakologischen Profils einem Subtyp zuordnen lassen, werden in Unterscheidung zu den klonierten Rezeptoren als „P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-ähnliche“ Rezeptoren bezeichnet (s. Tabelle 1).

Die Aktivierung der meisten P2Y-Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die durch die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern erreicht wird. Dieser Effekt ist über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit nachfolgender Inositol (1,4,5) trisphosphat (InsP<sub>3</sub>)–Bildung vermittelt. Es gibt jedoch auch P2Y-Rezeptoren, die die Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung ohne PLC-Aktivierung erreichen (Frelin et al. 1993, Vigne et al. 1994 in [61]). Daneben sind sind P2Y-Rezeptoren beschrieben, die die Adenylatzyklase inhibieren [62,63] und andere regulieren die Aktivität unterschiedlicher Ionenkanäle. Dies geschieht direkt über die β,γ-Untereinheit der beteiligten G-Proteine, ohne daß zytosolische „second-messenger“ Systeme involviert sind [64,65]. Die Ursache der unterschiedlichen Kopplung an verschiedene Signaltransduktionswege beruht offensichtlich nicht auf sequenzspezifischen Unterschieden zwischen den Rezeptorsubtypen, eher unterliegt diesem Effekt die unterschiedliche G-Protein-Ausstattung des jeweiligen Zelltyps. Beispielsweise ist ein P2Y<sub>1</sub>-Rezeptortyp, dessen cDNA-Sequenz in drei unterschiedlichen Zelltypen völlig identisch ist, zelltypspezifisch an unterschiedliche Signaltransduktionssysteme gekoppelt: zum einen aktivierend an PLC, zum anderen inhibierend an Adenylatzyklase [66].

**Tabelle 1: Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften klonierter P2Y<sub>1</sub>-/P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren und den entsprechenden „P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen“ bzw. „P2Y<sub>2</sub>-ähnlichen“ Rezeptoren.**

Aus der Tabelle wird deutlich, daß die Sensitivität von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und von „P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen“ Rezeptoren gegenüber ATP bzw. ADP stark variieren kann. Es besteht die Möglichkeit, daß diese Unterschiede im jeweiligen experimentellen Ansatz begründet sind. Wahrscheinlicher aber ist, daß diese Unterschiede auf Modifikationen der Rezeptorstrukturen zurückzuführen sind, weil an einigen „P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen“ Rezeptoren ATP als partieller Agonist wirkt [67,68,69]. Abkürzungen: A3P5P (Adenosin-3', 5' Diphosphat), PPADS (Pyridoxal - phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure)

	Rezeptor-Typ		Antagonisten	G-Proteine und Effektoren
	rekombinante P2Y Agonistenwirkungsreihe	endogene P2Y-ähnliche Agonistenwirkungsreihe		
P2Y <sub>1</sub>	2-MeSADP = 2-MeSATP = ATP >>> ADP >>>> UTP	2-MeSADP = 2-MeSATP ADP >>>> ATP >>> UTP	A3P5PS, A3P5P, Suramin, PPADS	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>i</sub> PLCβ, AC, PLD
P2Y <sub>2</sub>	UTP = ATP > ADP >>> 2-MeSADP = 2-MeSATP	UTP = ATP > ADP >>> 2-MeSADP = 2-MeSATP	Suramin, PPADS	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>i/o</sub> PLCβ, AC, PLA <sub>2</sub> , PLD

## 1.6 Effektoren der P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor Signaltransduktionskaskade

### 1.6.1 Stimulation der Phospholipase C (PLC)

Generell bewirken endogene und klonierte P2Y-Rezeptoren die Aktivierung von PLCβ, die durch die aktivierte Gα-Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen vermittelt wird. Vergleicht man die Dynamik der Signalweiterleitung von P2Y- und P2X-Rezeptoren, zeigt sich eine typische Eigenschaft der metabotropen Rezeptoren: die beobachtete Reaktionszeit der GPCR ist auf Grund der Beteiligung von sekundären Botenstoffen – z.B. Ca<sup>2+</sup>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> oder cAMP- und/oder veränderter Ionenleitfähigkeiten wesentlich länger als die sehr schnell vermittelte Antwort eines Ionenkanals.

Typisch für „P2Y<sub>1</sub>-ähnliche“ Rezeptoren ist die Interaktion mit G-Proteinen der Klasse G<sub>q/11</sub>, die durch Pertussistoxin (PTX) nicht hemmbar sind [2]. „P2Y<sub>1</sub>-ähnliche“ Rezeptoren, die inhibierend auf Adenylatzyklase wirken, sind dagegen durch PTX hemmbar und wirken über G-Proteine der Klasse G<sub>i/o</sub> (Boyer et al. 1995, Berti Mattera et al. 1996, und Webb et al. 1996 in [2]). P2Y<sub>2</sub>- und „P2Y<sub>2</sub>-ähnliche“ Rezeptoren interagieren mit G-Proteinen der Klasse G<sub>i/o</sub> und/oder G<sub>q/11</sub> und sind deshalb PTX sensitiv, partiell sensitiv oder unempfindlich (Dubyak Moatassim et al. 1993 in [2]). Bei G<sub>i</sub> gekoppelten P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren führt die β,γ-Untereinheit zur Aktivierung von PLC-β<sub>2</sub>. Die Hauptwirkung von P2Y-Rezeptoren ist die G-Protein vermittelte Aktivierung von Phospholipase C, die Phosphatidyli-

sitolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Diacylglycerol (DAG) umsetzt. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> aktiviert den InsP<sub>3</sub>-Rezeptor und leitet dadurch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ein. Neben der transienten Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> kommt es durch DAG – z.T. in Kooperation mit Ca<sup>2+</sup> – zur Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), wodurch diverse zelluläre Wirkungen (s.u.) ausgelöst werden. Die Stimulation von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren führt auch zur Aktivierung der PLD. Der Mechanismus dieser Aktivierung ist der Aktivierung von PLC nachgelagert und vermutlich PKC/Ca<sup>2+</sup>/G-Protein abhängig [2]. Es kann bis jetzt nicht ausgeschlossen werden, daß PLD-Aktivierung unmittelbar in Folge der PLC-Wirkung erfolgt und somit nicht notwendigerweise mit der PKC-Aktivierung verknüpft ist. Möglicherweise existieren beide Aktivierungsmechanismen sogar gleichzeitig.

Die Aktivierung von PLD führt zur enzymatischen Umsetzung membranständiger Phosphatidylcholin (PC) –Moleküle. Daraus entstehen Cholin und Phosphatidylsäure (PA), die weiter zu DAG umgewandelt werden kann. Die physiologische Bedeutung dieser Reaktion in Folge einer P2Y-Rezeptoraktivierung ist nicht bekannt, für den P2Z/P2X<sub>7</sub>-Rezeptor – hier wird PLD unmittelbar durch den Rezeptor aktiviert – gibt es Beweise für eine Beteiligung der PLD an cytotoxischen Vorgängen [70,71], die durch ATP ausgelöst werden. Die Beteiligung der PLD an vesikulären Transportvorgängen [72], Phagozytoseprozessen [73], Degranulierung von neutrophilen Leukozyten [74], Sekretionsprozessen [75] und der Monozytenstimulation durch LPS [76] sind ebenfalls belegt.

### 1.6.2 Stimulation von Proteinkinase C (PKC)

Die P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-induzierte Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Freisetzung und Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung führt (unter Beteiligung der PKC) zur Aktivierung einer ganzen Reihe von Signaltransduktionswegen, die zelltypspezifisch von beiden Rezeptortypen benützt werden. Dazu zählen die Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger K<sup>+</sup>-Kanäle, die Induktion der Stickstoffmonoxidsynthetase (NOS) und in der Folge die Bildung von EDRF (endothel-derived relaxing factor) bzw. EDHF (endothel-derived hyperpolarizing factor), die Stickstoffmonoxid (NO) entsprechen. Eine bemerkenswerte, gewebespezifische Zuordnung der P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren läßt sich bei der Regulation des extrazellulären Ionenmilieus über diese gemeinsamen Signaltransduktionswege treffen. In respiratorischen Epithelien werden entsprechende Ionenkanäle praktisch ausschließlich durch P2Y<sub>2</sub>-Aktivität reguliert. In nicht-respiratorischen Epithelien (z.B. bei der Vasodilatation) findet die Regulation der beteiligten Ionenkanäle über P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren statt. Weitere Beispiele für Rezeptor-spezifische Effekte sind die Zytokin-

sekretion ( P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren) und die Blutplättchenaggregation (P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren). Die Aufklärung weiterer gewebespezifischer P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoreffekte lassen sich auf Grund der Tatsache erwarten, daß inzwischen transgene Mausmodelle (knock-out) für beide Rezeptoren verfügbar sind [77,78,79].

Zu den Effekten die in Folge der PKC-Aktivierung induziert werden gehören die Aktivierung der Phosphatidyl-spezifischen Form der PLC und PLD, der mitogen-aktivierten Proteinkinasekaskade (MAPK) und die Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms durch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle. Die Ca<sup>2+</sup>/Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-unabhängige Aktivierung von PKC, der eine Tyrosinkinase-vermittelte Phosphorylierung der MAPK folgt, ist möglicherweise der Weg auf dem bei Endothelzellen die Prostazyklinproduktion erfolgt [80].

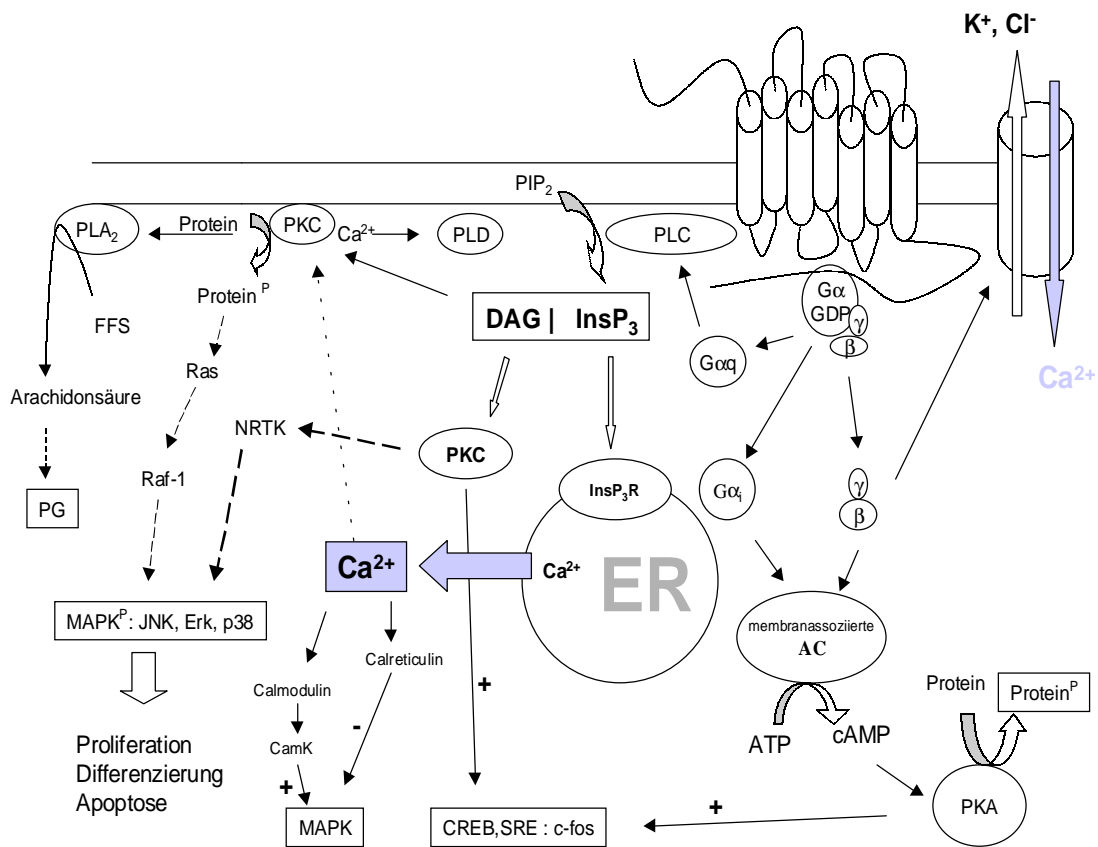
Prostaglandine spielen im zellulären Metabolismus, der Sekretion, der Genexpression und beim Wachstum eine Rolle. Mitogene Effekte von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die von PKC über Raf-1 und MAPK vermittelt werden, sowie die Induktion von „immediate early genes“ sind ebenfalls belegt [81]. Bei Astrozyten sind P2Y<sub>1</sub> bzw. P2Y<sub>2</sub> unabhängig voneinander an Phosphatidylinositol (PI)/Ca<sup>2+</sup>-regulierte PLC, Ca<sup>2+</sup>-regulierte PLC und ERK (extracellular signal-regulated kinase) Signaltransduktionskaskaden gekoppelt. Vermutlich erfolgt die P2Y-Rezeptor vermittelte ERK-Aktivierung durch PKC $\gamma$ , einer Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen Isoform der PKC, in Zusammenarbeit mit PLD. Darüber hinaus gibt es Befunde für eine ERK-Beteiligung an der Vermittlung mitogener Effekte (DNA-Neusynthese), die durch P2Y-Aktivierung ausgelöst werden [14].

Die Sekretion von Arachidonsäure oder die Synthese von Prostaglandinen wird über die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> vermittelt. Bei der Induktion der Prostazyklinproduktion durch P2Y<sub>2</sub> -Rezeptoren sind vermutlich ebenfalls eine Ca<sup>2+</sup>/Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-unabhängige Isoform der PKC und die Aktivierung der MAPK-Kaskade beteiligt [80]. PKC-unabhängig erfolgt dagegen die Aktivierung von streßaktivierten Proteinkinasen in bestimmten Nierenzellen durch die Stimulation mit UTP und ATP [82]. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren führen zur Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Chloridkanälen in Zellen, die an der epithelialen Flüssigkeitssekretion beteiligt sind [51,50] u.a.). Auch die Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen und von nicht-selektiven Kationenkanälen durch P2Y<sub>2</sub> [83], sowie die Inhibition von N-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strömen [84] ist belegt.

### 1.6.3 Regulation von Adenylatzyklase (AC)

Die P2Y<sub>2</sub> vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase (AC) beruht auf der Aktivierung von G<sub>i</sub> [85], in einigen Fällen ist sie aber ein sekundärer, Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Effekt (Munshi et al 1993, Garristen et al 1992 in [2]). In Nierenepithelzellen bewirkt eine P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorakti-

vierung eine Zyklooxygenase-abhängige Erhöhung der cAMP-Konzentration, was eine Beteiligung von PGE<sub>2</sub> impliziert [86]. Der postulierten, inhibierenden P2Y<sub>1</sub>-Wirkung auf die AC [62] [63], [87], [66] unterliegt ein bisher noch ungeklärter Mechanismus, d.h. es ist noch strittig ob der beteiligte Rezeptor tatsächlich ein klassisches Mitglied der P2Y<sub>1</sub>-Gruppe ist [88]. In Schwannzellen ist die AC-Inhibition in klassischer Weise PTX hemmbar, jedoch besteht die Möglichkeit, daß neben G<sub>iα</sub> auch β,γ Untereinheiten zur Inhibition der AC führen [87,89,66]. Die in diesem Abschnitt dargestellten Befunde zur Beteiligung der verschiedenen Effektoren an den von P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren benützten Signaltransduktionswegen, wurden in graphisch zusammengefaßt: graphisch zusammengefaßt:



**Abbildung 3 :Übersicht über die wichtigsten Signaltransduktionswege von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren**

Die Abbildung zeigt die vielfältigen Verflechtungen der Signaltransduktionswege der P2Y-Rezeptoren. Die Abkürzungen bedeuten: PLC/ PLA<sub>2</sub>/PLD Phospholipase C, bzw. A<sub>2</sub>, D; PKA, PKC Protein-kinase A bzw. C; MAPK mitogen-aktivierte Proteinkinase; PG Prostaglandin; AC Adenylatzyklase; JNK Jun-Kinase; ERK extrazellulär signal-regulated kinase; DAG Diazylglyzerol; InsP<sub>3</sub> Inositol (1,4,5) trisphosphat, InsP<sub>3</sub>-R Inositol (1,4,5) trisphosphat-Rezeptor; PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositolbisphosphat; NRTK „non-receptor“ Tyrosinkinase; ATP Adenosin 5'-triphosphat; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; ER Endoplasmatisches Retikulum; FFS freie Fettsäuren; CREB/ SRE cAMP response element binding protein bzw serum response element binding protein; Ras/Raf gehören zu

den „kleinen G-Proteinen“, die durch GTP aktiviert werden (Tyrosinkinase und ein „kleines G-Protein“); CamK Calmodulin-abhängige Kinase. Pluszeichen bzw. Minuszeichen stehen für Aktivierung bzw. Hemmung.

### **1.7 Regulation der Aktivität von P2Y<sub>1/2</sub>-Rezeptoren durch posttranslationale Modifikationen**

Im Gegensatz zu den am besten untersuchten GPCR – den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren – ist für die purinergen Rezeptoren bisher nur wenig bzgl. ihrer Regulation bekannt. Generell desensibilisieren P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren nur relativ langsam. Ihre heterologe Desensibilisierung erfolgt mit einer niedrigen Geschwindigkeit ( $t_{1/2}$  etwa 15 min), ist multifaktoriell und PKC/ $Ca^{2+}$  unabhängig [89]. Die an der homologen Desensibilisierung der purinergen P2-Rezeptoren beteiligten posttranslationalen Prozesse beinhalten vermutlich die bekannten Reaktionen von Rezeptorphosphorylierung durch GRK, Abkopplung vom G-Protein und Internalisierung und sind Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- und  $Ca^{2+}$ -abhängig [90,91]. Partielle heterologe Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>- Antworten durch P2Y<sub>2</sub>-Aktivierung sind berichtet, nicht jedoch die P2Y<sub>1</sub> induzierte Desensibilisierung der P2Y<sub>2</sub>-Antwort [92]. Bei endothelialen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren wird die maximale, durch UTP induzierte Desensibilisierung nach etwa 10 min erreicht, wobei der Phosphorylierung von bestimmten Aminosäureresten im C-terminalen Teil des Rezeptors eine besondere Rolle zuzukommen scheint [93]. Die Resensibilisierung der Rezeptoren benötigt bei diesen Zellen etwa den gleichen Zeitraum. Die durch Agonistwirkung stimulierte Internalisierung von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren ist gezeigt [94], was ebenfalls als ein indirekter Beweis für die Rezeptorregulation durch Phosphorylierungsprozesse gewertet werden kann. Neben der Desensibilisierung durch Phosphorylierung ist die Herunterregulierung der P2Y<sub>2</sub>-mRNA für HL-60 Zellen bekannt, die auf einer inflammatorischen Aktivierung der Zellen beruht [95].

Weitere posttranslationale Modifikation wie z.B. Myristoylierung oder Glykosylierung, lassen sich auf Grund der Analyse der Sequenzdaten der klonierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptorsequenz (Sequenzmotife für beide Modifikationen sind auch in anderen P2Y-Rezeptorsequenzen vorhanden) und auf Grund des Unterschieds zwischen berechneter und scheinbarer Größe der Rezeptorproteine (SDS-PAGE) vermuten. Daneben spricht die Existenz weiterer Sequenzmotife für eine mögliche Beteiligung der CamK II bzw. der PKC an der Regulation der Rezeptoren z.B. durch Desensibilisierung, Internalisierung bzw. Rezeptorrecycling. Berichte in der Literatur die solche posttranslationalen Modifikationen an P2Y-Rezeptoren direkt belegen gibt es aber bis jetzt noch nicht.

## 1.8 „Green Fluorescent Protein“ (GFP) als Fusionsanteil heterolog exprimierter GPCR

Zu großen Fortschritten im detaillierten Verständnis der zellulären Reaktionen, die durch GPCR-Aktivierung ausgelöst werden, führte die Kombination von pharmakologischen, zellbiologischen und molekularbiologischen Befunden. Die Möglichkeit Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration oder der Verteilungsgradienten in einzelnen Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffindikatoren wie Fura-2 direkt zu visualisieren (s.a. S 48), führte zu entscheidenden Befunden für die Aufklärung von Vorgängen, die in die Regulation der Kalziumhomöostase bei Zellen involviert sind.

Nicht-invasive Techniken zur Untersuchung der Dynamik von Transportvorgängen zellulärer Proteine, die in diesem Zusammenhang von Interesse sind (GPCR, G-Proteine, Kinasen u.a.), beschränkten sich noch bis vor Kurzem auf den Einsatz von Fluorochrom-markierten (Rezeptor-) Liganden [96,97], die immunocytochemische Markierung dieser Proteine oder - bei rekombinant exprimierten Proteinen – die Fusion von Markerepitopen (HA, c-myc, FLAG™ oder VSV) an diese Proteine. Voraussetzung für den sinnvollen Einsatz Fluorochrom-modifizierter Liganden ist eine hohe Affinität und Selektivität für den untersuchten Rezeptortyp. Vor allem bei kleinen endogenen Liganden (z.B. Nukleotiden) ist die Konservierung dieser Eigenschaften nach chemischer Modifikation problematisch. Andererseits liegt es in der Natur von immunohistochemischen Experimenten, daß sie an fixierten und permeabilisierten Zellen bzw. Geweben durchgeführt werden. Diese Tatsache macht Antikörper für den Einsatz in Experimenten, die zur Untersuchung der Dynamik von Prozessen - möglichst in Echtzeit - durchgeführt werden („Zell-Imaging“) ungeeignet. Vor diesem Hintergrund läßt sich das große Potential von GFP als Fusionsanteil in einem Expressionskonstrukt, das sich durch diese Markierung in seiner zellulären Verteilung *in vivo* leicht verfolgen läßt, sehr deutlich erkennen. GFP-GPCR-Fusionsproteine ermöglichen die Analyse von Effekten spezifischer Pharmaka auf die Rezeptorregulation in einem physiologischen Kontext. Dabei läßt sich die Dynamik dieser Vorgänge *in vivo*, mit unmittelbarer zeitlicher und räumlicher Auflösung beobachten.

GFP ist ein fluoreszierendes Protein ( 238 Aminosäuren, ca. 27 kDa) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Im Gegensatz zu Biolumineszenz-Reporterproteinen sind für die GFP-Fluoreszenz keine anderen Substrate oder Co-Faktoren nötig (Übersicht in [98]). Modifizierte Formen von GFP wurden als Fusionsprotein erfolgreich bei der Untersuchung von Transportprozessen [99] und der subzellulären Lokalisation rekombinanter Proteine [100]



eingesetzt. Zur Untersuchung von GPCR-Regulationsmechanismen wurde diese Technik erstmals erfolgreich von Barak et al. 1997 [101] eingesetzt. In den letzten 2-3 Jahren folgten weitere GPCR-GFP-Fusionsproteine an denen neben Agonist-induzierter Rezeptorinternalisierung, -recycling und zellulärer Verteilung auch eine Reihe pharmakologischer Aspekte erforscht wurden.

GPCR-GFP Expressionsstudien in Säugerzelllinien liegen für den Cholecystokinin Typ A CCK<sub>1</sub> Rezeptor [102], den Thyrotropin-releasing-hormon Rezeptor-1 TRHR-1, die  $\alpha_{-1A}$  und  $\alpha_{-1B}$  Adrenozeptoren, den Vasopressin V2 Rezeptor, den Parathyroidhormonrezeptor, den CXCR-1 Chemokininrezeptor (Übersicht in [4]) und den Ca<sup>2+</sup>-Sensorrezeptor [103] vor. Alle bisher veröffentlichten Rezeptor-GFP Konstrukte sind am C-terminalen Ende mit GFP markiert und es ist bemerkenswert, daß es bei allen in Folge ihrer Aktivierung zur Produktion der erwarteten sekundären Botenstoffe kommt. Die Kopplung an die jeweiligen, „natürlichen“ Signaltransduktionskaskaden dieser Rezeptorfusionsproteine erfolgt in Agonist-abhängiger Weise und darüber hinaus ist die agonist-induzierte Phosphorylierung dieser GPCR-GFP Proteine bewiesen. Klare Belege sprechen auch für die Interaktion dieser modifizierten Rezeptoren mit Proteinen der Arrestinfamilie, d.h. für eine spezifische Regulation der Rezeptoraktivität.

Hohe Expressionsraten werden bei der heterologen, transienten Expression vor allem durch den Gebrauch viraler Promotoren erreicht. Eine solche Überexpression führt bei der Expression von GPCR in Säugerzelllinien nicht selten zu artifiziellen Veränderungen der Lokalisation und Regulation dieser Rezeptoren. Ein nicht unerheblicher Anteil des exprimierten Proteins scheint im Golgi-Apparat oder in anderen intrazellulären Kompartimenten zu verbleiben und nicht effizient zur Plasmamembran transportiert zu werden. Diese artifiziellen Veränderungen können bei GPCR-GFP Konstrukten direkt beobachtet werden (z.B. [4]), was einen nicht zu unterschätzenden Vorteil dieser Modifikation zur i) Identifikation und Etablierung von effizienten Bedingungen bei der transienten Transfektion oder ii) zur schnellen und sicheren Identifikation von entsprechenden, rekombinanten Zellklonen bei der stabilen Transfektion eukaryontische Zellen darstellt.

### **1.9 Zielstellung des Projekts**

Die physiologische Rolle der unterschiedlichen P2Y-Rezeptoren ist sehr breit gefächert. Sie besitzen wichtige Funktionen bei der Regulation von physiologischen Prozessen (Neurotransmission, vaskulärer Tonus, Blutplättchenaggregation, Sekretion, Ionen-

homöostase u.a.) Unterstrichen werden diese Schlüsselfunktionen durch das steigende therapeutische Interesse an Nukleotiden bzw. Nukleotidanaloga bei der Behandlung von Mukoviszidose [39], Vasospasmen, stressbedingter Inkontinenz, Diabetes, Entzündungskrankheiten, Krebs, Herzrhythmusstörungen und dem möglichen neuroprotektiven Potential, das in der Regulation purinerner Rezeptoraktivität liegt ([59] und Übersicht in Agteresch et al. 1999 [104]).

Eine herausragende Rolle nehmen in dieser Rezeptorgruppe die P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren ein, denn diese Rezeptoren weisen eine universelle zelluläre Verbreitung auf und vermitteln die bis jetzt am besten untersuchten physiologischen Effekte purinerner GPCR-Aktivierung. Projekte die sich mit der physiologischen Rolle von P2Y-Rezeptoren, d.h. vor allem der Regulation der involvierten Signaltransduktionskaskaden auf der Ebene der Rezeptoren (Desensibilisierung, Internalisierung und Recycling) befassen, stehen generell vor dem Problem, daß P2Y-Rezeptoren wie GPCR im Allgemeinen eine sehr niedrige Expressionsrate aufweisen. Dieser Umstand erschwert ihre experimentelle Zugänglichkeit entscheidend. Bei purinergen Rezeptoren kompliziert die häufige Koexpression verschiedener P2-Subtypen in einer Zelle die Zuordnung bzw. die Spezifität des gemessenen Effekts. Erschwerend wirkt sich auch die fehlende Verfügbarkeit echter, Subtyp-spezifischer Antagonisten bzw. Agonisten aus. Immunocytochemische Methoden lassen sich auf Grund des völligen Fehlens von P2Y-spezifischen Antikörpern ebenfalls nicht einsetzen.

Einen möglichen Ansatz zur Lösung bzw. Umgehung dieser Probleme bietet die stabile, heterologe Expression dieser Rezeptoren in Säugerzelllinien. Entsprechende Modifikationen („tag“) der genspezifischen cDNA erlauben den Einsatz immunocytochemischer Methoden, da sehr oft spezifische, gegen ein „tag“ gerichtete Antikörper käuflich zu erwerben sind (s.a. Kapitel 1.8). Bei Experimenten mit solchermaßen modifizierten GPCR ist es unumgänglich zu verifizieren, daß die Modifikation des Rezeptorproteins keine Auswirkungen auf die Pharmakologie des exprimierten Rezeptors hat. Für GPCR, die wie purinerge P2Y-Rezeptoren sehr kleine endogene Liganden haben, kann man annehmen, daß eine N-terminale Modifikation praktisch keinen Einfluß auf die Ligandenbindung oder die Rezeptorfunktion hat. Im Fall von GFP-Fusionsproteinen erscheint eine N-terminale Platzierung des GFP-Anteils wenig sinnvoll, denn die erfolgreiche funktionelle Expression dieses Konstrukts würde den Transport des 27 kDa großen, globulär strukturierten GFP-Anteils durch die Plasmamembran in den extrazellulären Raum erfordern. Bei einer C-terminalen Fusion des GFP-Anteils (der Rezeptor wird dabei um mehr als 50% vergrößert !)

kommt der Überprüfung der grundlegenden Rezeptorfunktionen eine um so größere Bedeutung zu.

Bei der Auswahl geeigneter Zelllinien zur GPCR-Expression spielen die G-Protein- bzw. Rezeptorausstattung der Wirtszelle und die endogene (Nicht-) Expression des zu transfizierenden Rezeptors die entscheidende Rolle. Eine niedrige endogene Expression des Rezeptors garantiert die Existenz aller Signaltransduktionskomponenten, die zur funktionellen Expression und physiologischen Regulation des heterologen Rezeptors nötig sind, macht aber u.U. die Abgrenzung zwischen Effekten schwierig, die durch die endogenen bzw. durch die heterologen Rezeptoren ausgelöst werden. Liegt keine endogene Expression vor besteht das Risiko, daß die exprimierten „zusätzlichen“ Rezeptoren in artifizierlicher Weise reguliert werden oder an nicht-physiologische Signaltransduktionskomponenten koppeln. Die universelle Verbreitung der P2Y-Rezeptoren erweist sich auch in diesem Punkt als bedeutsam, d.h. bis jetzt sind extrem wenige Zelllinien (T-Zelllinie Jurkat [33], 1321N1 Astrozytomzelllinie [105], A-10 Zellen [40] und die K562 Leukämiezellen [106]) verfügbar, in denen bis jetzt keine Expression von P2Y-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte.

Vor diesem Hintergrund war die Klonierung eines Subtyps der P2Y-Rezeptorfamilie neuronalen bzw. glialen Ursprungs, sowie die Etablierung und Charakterisierung stabil transfizierter Zelllinien das Hauptziel dieses Projekts. Die funktionelle heterologe Expression dieses Rezeptors zielte auf die Schaffung von Zelllinien ab, die sich zur Untersuchung der physiologischen Funktion des Rezeptors, der Dynamik seiner zellulären Lokalisation und der Regulation der Rezeptoraktivität eignen. Ein weiteres Ziel bestand darin an den rekombinanten Rezeptorproteinen Erkenntnisse zu Struktur-Funktionsbeziehungen dieses Rezeptortyps zu gewinnen, die möglicherweise zur Identifizierung von spezifischen Antagonisten oder Agonisten beitragen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen sollte ein rekombinanter cDNA-Klon eines P2Y<sub>1</sub> Rezeptors aus dem Hirn der Ratte mit „green fluorescent protein“ (GFP) am C-terminalen Ende modifiziert und stabil in HEK293 Zellen exprimiert werden. Ebenfalls sollten HEK293 Zellen mit dem identischen, nicht-modifizierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor stabil transfiziert werden und die rekombinanten Zelllinien im Vergleich zu den nicht-transfizierten HEK293 Zellen charakterisiert werden.

Die experimentelle Strategie des Projekts gliedert sich wie folgt:

1. Identifizierung, Charakterisierung und geeignete Umklonierung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor cDNA-Klons.
2. Verifizierung der Funktionalität der Expressionskonstrukte nach transienter Expression
3. Etablierung von stabil rP2Y<sub>1</sub> bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP exprimierenden, klonalen HEK293 Zelllinien.
4. Mikrofluorimetrische und biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Zelllinien bzgl. Rezeptorexpression, zellulärer Lokalisation und Funktionalität des rP2Y<sub>1</sub>
5. Untersuchung der Rezeptorregulation mittels mikrofluorimetrischer und (immuno-) fluoreszenzmikroskopischer Methoden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

#### 2.1.2 Laborgeräte

Brutschrank	Memmert
Feinwaage A200S	Sartorius, Göttingen
WaageL610D	
Waage L2200P	
Magnetrührer RCD-basic	IKA Labortechnik, Staufen i.Br.
Vortexer Vibrax-VXR	
Ultra-Turrax T8 und T25	
DNA-Thermocycler Trio-Block	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsöfen, Typ Hybaid MKII	
Mini Cycler	MJ-Research, Biozym Oldendorf
Filmkassetten und Intensifying screen	Kodak
Kühlzentrifuge Sorvall, Typ RC-5B	DuPont de Nemours, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Typ 5402	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Typ 5415	
Thermomixer 5436	
Biofuge 22 R	Haereus, Hanau
Variofuge 3.2 RS	
Begasungsbrutschrank BB16	
Sterilbank Lamin Air HB2448	
Trockensterilisator Typ ST 6120	
Reinstwasseranlage Typ MilliQ plus	Millipore, Eschborn
UV-Photometer, Typ Ultrospec 2000	Pharmacia, Freiburg
Photometer Gene Quant	
Peristaltikpumpe P1	
Mikrowellengerät Mikromat	AEG
Kühlzentrifuge Avanti	Beckmann
Tischultrazentrifuge TL-100	
Schütteltisch CM-9	Desaga
Schütteltisch Typ 3011	GFL
Schütteltruhe Typ 3033	
Schütteltruhe	NEW Brunswick Scientific GmbH
UV-Transluminator UVP	HEROLAB, Wiesloch
Videodokumentationsystem Eagle eye	Stratagene, Heidelberg
UV-crosslinker	
Vakuumtrockner Univapo 100 H	Unieqip, Martinsried
Unitherm Kreislaufkühler 4/14	
Eisbereiter AF 10	Scotsman
Gasbrenner Fireboy eco	Integra Biosciences
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, München
Flüssigkeitsszintillationenzähler Typ 1600 TR	Canberra Packard, Downers Groove USA
Durchsichtmikroskop Diavert	Leitz
Fluoreszenzmikroskop DM-RXE	Leica
Spannungsgerät PS500X	Hoefer Scientific Instruments, SF
Elektrophoresekammer	Mighty Small II
Tankblotapparatur	TE Series Transphor
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, München
Gene Pulser II	

Elektroporator zur Zelltransfektion auf Deckgläschen:

S48 Stimulator und Kammer  
Kammer

Astro Med. Inc. GRASS, Instrument Div;  
Eigenbau Werkstatt Leibnitz Institut für  
Neurobiologie, Magdeburg

Kühlschrank

Liebherr

Tiefkühlschrank (-20°C)

Elektrolux

Tiefkühlschrank (-80°C) VIP-Series

Sanyo

pH-Meter pH 538

WTW

Heitzblock Dri-Block DB-2A

TECHNE

ELISA Photometer Multiscan MCC/340

Titertek, Labsystems Finland

ABI-Prism Systemsequenzer 310

Perkin Elmer, Üblingen

Mikroskop Axiovert 135

Zeiss, Jena

$\alpha$ , $\beta$ -Handmonitor LB122

Berthold

Schüttelwasserbad

Haake, Karlsruhe

### 2.1.2.1 Sonstige Geräte

Variable Pipetten, Multipette, Eppendorf, elektische Pipettierhilfen, diverse Proben­träger  
Neolab.

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alkalische Phosphatase, T4-Ligase, T4Polymerase, Klenow-Enzym, dNTPs, Restriktionsenzyme, „random priming“ Labelling Kit, DNA-Molekulargewichtsstandard No 13, 100 bp Ladder, No 21 MBI Fermentas, Villnus, Lithauen; Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Agar Fa. Otto Nordwald (Difco), Hamburg; CorexR Zentrifugenröhrchen, DuPont de Nemours, Bad Homburg; Glaswaren (Flaschen, Kloben etc. ) aus Duran, Schott, Mainz; Restriktionsenzyme, BioLabs, Schwalbach; Taq Polymerase, Dynazyme Biometra, Göttingen; Reversetranskriptase MuLV Promega ; Reverse Transkriptase MuLV, Trifast-Reagenz , RNase Inhibitor, peq Lab, Erlangen; Ampicilin, Kanamycin, RNase A, Boehringer, Mannheim; Phenol, Proteinase K, Formamid, Fa. Roth (Karlsruhe); Lysozym, Serva, Heidelberg; Big Dye-Terminator Cycle Sequencing Kit , Perkin Elmer, Weiterstadt; Cyclist Sequenzier Kit, Pfu-Polymerase, pBluescript SK+, pUC18-Vektor, XL1 Blue: E.coli, recA1, end A1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F<sup>+</sup>proAB lacqZDM15 Tn10( Tetrec)], Stratagene Heidelberg; Plasmidvektor pEGFPN, Clontech (Gen-Bank Accession # U55762, #U57608, # U57609), Heidelberg; MOPS (Morpholinopropansulfonsäure), DEPC (Diethylpyrocarbonat), DTT (1,4 Dithiothreitol), Sigma, Deisenhofen; Formaldehyd, Na-Azid, Merck, Darmstadt; Einmal Sterilfilter FP 030/2 0.45 $\mu$ m, Schleicher & Schuell, Dassel; Petrischalen (90 mm, 120 mm), Polystyrolgefäße (steril, 15 ml, 50 ml), Greiner, Frickenhausen; Reaktionsgefäße 0.5 ml, Easy Pure Kit, Biozym, Oldendorf; Reaktionsgefäße 1,5 ml Roth, Karlsruhe oder Eppendorf , Hamburg; Elektroporationsküvetten 0.2/0.4 cm, Invitrogen, NV Leek, Niederlande;

### 2.2.2 Zellkultur Methoden

Geneticin (G 418) , Calbiochem Bad Soden; DMSO (Dimethylsulfonoxid), Poly-D-Lysin, Heparin, Sigma, Deisenhofen; FCS (fetal calf serum), DOTAP Lipofektionsreagenz, Boehringer, Mannheim; Ham's F12-, DMEM-Pulvermedium mit L-Glutamin, Natriumhydrogencarbonat, Penicillin/ Streptomycin (10 000/10 000 E mg/ml), Phenolrot 0.5%, Trypsin/ EDTA-Lösung (0.05%/0.02%) , Seromed, Fa Biochrom, Berlin; Kryoröhrchen, Zellkulturschalen, 24-well-Platten, Greiner, Frickenhausen; Zellkulturschalen, Nunc Wiesbaden;

HEPES (Hydroxyethylpiperatinethansulfonsäure), PBS nach Dulbecco, Serva, Heidelberg; HEK293-Zellen, Leibnitz-Institut für Neurobiologie Magdeburg Abt. Gundelfinger; Deckgläschen (22 mm, OmniLab); Objektträger, Menzel Glas;

### 2.2.3 Ca<sup>2+</sup>-Imaging

Fura2-AM, Biomol, Hamburg/ Molecular Probes (MobiTec Göttingen); CPA (Cyclopiazon-säure), KN-62, Alexis; Okadain Säure, Calyculin A, TPA, Bisindolylmaleimid, U73122, Monensin, Calbiochem, Bad Soden; 2-MeSATP, 2-MeSADP, Biotrend, Köln; ATP $\alpha$ S, NEN Du Pont, Brüssel, Belgien; Immersionsöl 518 N, Zeiss; UTP, ATP, ADP, etheno-ATP, Tunicamycin, PPADS, Heparin, Pertussis-Toxin, Cholera-Toxin, Sigma, Deisenhofen;

### 2.2.4 Immunoassays

Polyklonales  $\alpha$ -GFP Peptid-Kaninchen IgG Antikörperserum (affinitätsgereinigt) „Living colors“, Clontech, Heidelberg;  $\alpha$ -GFP-Kaninchen IgG polyklonales Serum, Invitogen, NV Leek, Niederlande; Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-IgG Antikörper Cy3-konjugiert (affinitätsgereinigt), Kaninchen- $\alpha$ -Maus IgG Antikörper Horse Radish Peroxidase (HRP)-konjugiert, Ziege- $\alpha$  Kaninchen-IgG Antikörper HRP-konjugiert, Dianova, Hamburg; Lektin ConA-Digoxigenin konjugiert,  $\alpha$ -Digoxigenin HRP-konjugierte Fab-Fragmente, Boehringer, Mannheim; Gelatine Blockierungsreagenz für Western Blot, Boehringer, Mannheim; Albumin (Bovine Fraction V) Sigma, Deisenhofen; Instant Magermilchpulver, Elbmilch; Mercaptoethanol, Fluka, Buchs, CH; Tween 20, Serva, Heidelberg; Dextranmethylnrhodamin (MW 10 kDa), WGA-TexasRed, Molecular Probes, Oregon USA; Aquatex Einbettmedium, Merck, Darmstadt;

### 2.2.5 Gelelektrophorese

Acrylamid, Bisacrylamid, Biomol, Hamburg; TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenamin), Glycin, Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), Coomassie Brillant blue, Bromphenolblau, Xylencyanol FF, Serva, Heidelberg; Agarose SeaKem, SeaKem über Biozym Oldendorf; Ethidiumbromid, Merck, Darmstadt; Hybond N Nylonmembran, Amersham; Nitrocellulose Transfer-Membran PROTRAN, Whatmann 3MM Filterpapier, Schleicher & Schuell, Dassel; Protein Molekulargewichts Standard: „Rainbow Full Range“ perstained, Amersham, Braunschweig; Prestained SDS-PAGE Standards, „low-range“, Bio-Rad, München;

### 2.2.6 Primeroligonukleotide für die PCR bzw. RT-PCR:

Die Primeroligonukleotide (Abbildung 4) für die PCR bzw. RT-PCR wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert, entschützt und lyophilisiert geliefert. Vor ihrer Verwendung wurden die Primer in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst, so daß eine 100  $\mu$ M Stammlösung vorlag.

TM3f: 5'-GAA TTC YTS TTC CTC ACC TGC ATM AG -3'

TM3nf: 5'-GAA TTC TCA CCT GCA TCA GYG YRC AC-3'

TM7r: 5'-GAA TTC AYR GGG TCA ACG CAR CTG TT-3'

rat P2Y1ges f: 5'-TGG AAT TCA TGA CGG AGG TTC CGT GGT CG-3'

rat P2y1ges r: 5'-ACG AAT TCT CAC AAG GTG GTG TCG CCA TT-3'

rat P2Y1osb r: 5'-TAG GAT CCT GCC AAG GTG GTG TCG CCA TT-3'

rat GAPDH f : 5'-GAA TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCA -3'

rat GAPDH r : 5'-TAT GTC GTG GAG TCT ACT GGC GTC -3'

Sequenzierprimer für das pEGFP-Konstrukt (GFP tag befindet sich am C-Terminus des Rezeptors)

k-gfp: 5'- CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G-3'

Primeroligonukleotid zur cDNA-Synthese:

Oligo(d)TV : 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT V-3'

#### **Abbildung 4: Auflistung der eingesetzten Primeroligonukleotide und deren Nukleotidsequenz**

Die Abkürzungen „f“ und „r“, stehen für sense bzw. antisense und zeigen die relative Lage des Oligonukleotids zum codierenden Strang der Matrizen-DNA an. Y steht für C/T, M für A/C, R für A/G, V für A/C/G. Zur genspezifischen Sequenz hinzugefügte Restriktionssequenzen sind unterstrichen.

### **2.2.7 Sonstige Materialien**

Szintillationscocktail Ultima Gold, Packard, Dreieich; Roti-Hybri Quick Hybridisierlösung, Roth, Karlsruhe; ECL-Reagenzien, Amersham, Braunschweig; Radionuklide: alle von Amersham, Braunschweig

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-Desoxyadenosin-5'-triphosphat ([ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP; ~ 110 TBq/mmol)

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-Desoxycytosin-5'-triphosphat ([ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP; ~ 110 TBq/mmol)

[ $\alpha^{35}\text{S}$ ]-Thiodesoxyadenosin-5'-triphosphat ([ $\alpha^{35}\text{S}$ ]-dATP; > 37 TBq/mmol)

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.a. (pro analysi) Qualität von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### **2.2.8 Puffer und Lösungen**

Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem sterilen Wasser (Umkehrosiose Reinstwasseranlage oder Destillationsanlage) hergestellt. 1x Puffer wurden aus konzentrierten Stammlösungen verdünnt und der pH-Werts bei RT eingestellt. Ergänzende Komponenten wurden den Lösungen als „Festsubstanz“ (z.B. NaCl, Tween 20) oder aus Stammlösungen ( z.B. EDTA, Na-Azid) zugegeben. Die benötigten Lösungen sind im Einzelnen bei der Beschreibung der jeweiligen Methode angegeben. Spezielle Reaktionspuffer für den Einsatz der verschiedenen Enzyme, wurden als 10-fach Konzentrate vom jeweiligen Enzymlieferanten bezogen und nach Vorschrift eingesetzt.



## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1.1 Aufreinigung von DNA

##### 2.3.1.1.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Midi-Kulturen

LB-Medium (autoklaviert): 10g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 100 mg/L Antibiotikum (Ampicilin bzw. Kanamycin), Lösung 1: 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8.0

Lösung 2: 0.2 M NaOH, 1% w/v SDS in H<sub>2</sub>O dd, Lösung 3: 60 ml 5 M NaAcetat, 11.5 ml Eisessig, 28.5 ml H<sub>2</sub>O dd, Lösung 4: 1.6 M NaCl, 13% (w/v) Polyethylenglycol 8000, TE/RNase: TE (pH 8.0) /RNase (20µg/ml), 1 x TE: 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM EDTA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA, die für gentechnische Arbeiten (Vektorpräparation), als Transfektionsmaterial oder zur Isolierung subklonierter DNA-Fragmente gebraucht wurde, wurden die entsprechenden E.coli Zellen (Stamm XL1-Blue) einer alkalischen Lyse nach Birnboim and Doly ([107] modifiziert) unterzogen. Dazu wurden 250 ml einer Übernachtskultur des plasmidhaltigen Bakterienklons in einem SLA 1500 Rotor zentrifugiert (4.000 rpm, 4°C, 10 min). Das Sediment wurde mit 18 ml der Lösung 1 unter Zusatz von 36 mg Lysozym 10 min bei 37°C resuspendiert. Durch Zugabe von 40 ml der Lösung 2 erfolgte die Lyse der Bakterien. Aus dem Lysat wurden durch Zugabe von eisgekühlter Lösung 3 (30 ml) ein weißes, flockiges Präzipitat ausgefällt, das sich aus Zelltrümmern, genomischer DNA und SDS zusammensetzt. Zur Abtrennung dieses Präzipitats wurde erneut im SLA 1500 zentrifugiert (7.000 rpm, 4°C, 15 min). Der plasmidhaltige Überstand wurde filtriert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 52 ml Isopropanol gefällt. Das Sediment der abschließenden Zentrifugation im SL1500 Rotor (10.000 rpm, 20°C, 15 min) wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Präzipitat einer PEG-Fällung unterzogen. Dazu wurde die Plasmid-DNA in TE gelöst, mit eisgekühlter 5 M LiCl-Lösung versetzt, gut gemischt und anschließend im SS34 Rotor zentrifugiert (10.000 rpm, 4°C, 15 min), um hochmolekulare RNA-Verunreinigungen zu fällen. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde über eine erneute Isopropanolfällung und Zentrifugation im SS34 Rotor (10.000 rpm, RT, 10 min) sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 500 µl TE /RNase gelöst, für 30 min bei RT inkubiert und mit 500 µl der Lösung 4 vermischt. Das PEG-Präzipitat wurde durch Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 5 min) gewonnen, der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Plasmid-DNA einer abschließenden Phenolextraktion unterzogen.

Für jede Plasmidpräparation wurden Reinheit und Menge der DNA spektralphotometrisch bestimmt. Die Absorbionsmessung erfolgte in einer Quarzglasküvette bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Phenol, Protein). Die DNA-Menge wurde mit Hilfe des Extinktionswerts, der bei 260 nm bestimmt wurde, ermittelt. Eine optische Dichte ( $OD_{260\text{ nm}}$ ) von 1.0 entspricht etwa 50 µg doppelsträngiger DNA. Als Reinheitskriterium wurde der Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm herangezogen, der für reine DNA zwischen 1.8 und 2.0 liegt.

##### 2.3.1.1.2 Plasmidminipräparation (verkürzt nach [107])

TENS-Lösung: 10 mM Tris (pH 7.4), 1 mM EDTA, 100 mM NaOH, 0.5 % (w/v) SDS

Diese Schnellmethode zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde zur Untersuchung von Bakterienklonen auf vorhandenes Plasmidinsert und zur Isolierung von doppelsträngiger DNA zur Sequenzierung eingesetzt. 1.5 ml einer Übernachtskultur eines plasmidtragenden Bakterienklons wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 2 min bei 14.000g in

einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl verworfen und das Bakteriensediment anschließend resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl TENS-Lösung und intensiver Vermischung erfolgte die Bakterienlyse. Zum klaren Lysat wurden 150 µl 3M Na-Acetatlösung (pH 5.2) zugegeben und behutsam gemischt. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (14.000 g, RT, 4 min), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurde 1 ml 100 % (v/v) Ethanol zugegeben, gemischt und für 15 min (17.000 g, Raumtemperatur) zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, im Vacuumtrockner lyophilisiert und dann in 50 µl TE/RNase aufgenommen.

#### **2.3.1.1.3 Phenolextraktion zur Reinigung von DNA**

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1); Chloroform/Isoamylalkohol (98:2); 3M NaAcetat pH 5.2

Zur DNA-Probe wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch gegeben, gut gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min zentrifugiert (17 000 g, RT). Um Phenolreste zu eliminieren wurde die obere wässrige Phase insgesamt dreimal mit Chloroform extrahiert und zur Phasentrennung jeweils zentrifugiert. Aus der von Protein gereinigten, wässrigen Phase wurde die DNA durch Zusatz von NaAcetat (0.1x Volumen) und 2,5x Volumen 100%-igem Ethanol und einer Zentrifugation präzipitiert (17 000 g, RT, 20 min). Das Sediment wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in H<sub>2</sub>O dd oder TE-Puffer resuspendiert.

#### **2.3.1.1.4 Isolierung genomischer DNA**

Die Methode durch SDS / ProteinaseK-Behandlung [108] genomische DNA zu isolieren ist eine sehr gebräuchliche Methode und in Standardwerken zu Methoden in der Molekularbiologie (z.B. „Essential Molecular Biology“) beschrieben.

DNA-Lysepuffer: 1% (w/v) SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K, 50mM Tris/HCl pH 9.0, 0.1M EDTA, 0.2 M NaCl ; Chloroform/Isoamylalkohol (24:1); Phenol/Chloroform Isoamylalkohol (25:24:1)

Kulturzellen bzw. tierisches Gewebe wurde mit ca. 10 ml DNA-Lysepuffer/mg Naßgewicht versetzt und die Proben bei 55°C unter vorsichtiger Rotation für 3-16 h inkubiert. Gewebeproben wurden zuvor in tiefgefrorenem Zustand (< -70°C) in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert. Nach der Inkubation im DNA-Lysepuffer wurde den Proben mit 0.1x Volumen Phenol für 3h bei RT sehr behutsam, aber gründlich, vermischt. Probe und Phenolphase sollen dabei eine möglichst große Kontaktfläche ausbilden können. Eine Zentrifugation (10 min, 4000 g, 25°C) führte zur Phasentrennung, die untere Phenolphase wurde verworfen, die obere Phase erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert. Nach der Phasentrennung (3000 g, RT, 10 min) wurde die wässrige Phase in ein frisches Gefäß überführt und 5 min auf Eis gelagert. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 2.5 ml 7.5 M Na-Acetat und 10 ml eiskaltem Ethanol. Die denaturierte genomische DNA wurde mit einer Pasteurpipette aus der Lösung gewonnen, mit 70%tigem Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Zur Resuspendierung wurde die DNA in ein Reaktionsgefäß überführt und in TE-Puffer (pH 7.5) ü.N. gelöst. Die Ausbeute wurde über 0.3% Agarosegelelektrophorese und eine spektral-photometrische Messung bestimmt.

### 2.3.1.2 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde zwei Methoden eingesetzt: eine LiCl/Harnstoff-Methode mit anschließender phenolischer Extraktion und die Aufreinigungsmethode mit „Trifast“-Reagenz.

#### 2.3.1.2.1 RNA-Präparation aus Gewebe (LiCl/Harnstoff Methode)

4M LiCl/8M Harnstoff: 42.25 g LiCl, 120 Harnstoff ad 250 ml H<sub>2</sub>O; 1M Tris/HCl pH 7.5: 12.11 g Tris ad 100 ml H<sub>2</sub>O, 10% SDS: 10g SDS ad 100 ml H<sub>2</sub>O; Proteinase K: 10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7.5, aliquotiert und bei -20°C gelagert; Phenol: Tris/HCl äquilibriert pH 8.0; Chlorophorm/ Isoamylalkohol (24:1): 240 ml Chloroform, 10 ml Isoamylalkohol; 2M Na-Acetat pH 5.0: 13.61 g ad 100 ml; H<sub>2</sub>O depc: 100 ml H<sub>2</sub>Odd wurden 200 µl Diethylpyrocarbonat für 2h behandelt und autoklaviert; Tris-SDS: 10mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 % SDS

Zur Aufreinigung wurde 1 g Gewebe in 10 ml LiCl/Harnstoff mit Hilfe eines Ultraturax-Homogenisators zerkleinert und über Nacht (ü.N.) bei 4°C inkubiert. Das Sediment der anschließenden Zentrifugation (17000 g, 4°C, 30 min) wurde erneut in 4 ml LiCl/Harnstoff homogenisiert und zentrifugiert. Das neuerliche Sediment wurde in 4 ml Tris-SDS, 20 µl Proteinase K-Lösung resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch die Zugabe und intensives Mischen mit 2 ml Phenol und 2 ml Chloroform/ Isoamylalkohol wurde die Reaktion gestoppt und die erste phenolische Extraktion der Probe durchgeführt. Die Phasentrennung wurde durch eine Zentrifugation im „swing-out“-Rotor (10 000 g, RT, 10 min) erzielt. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und weitere zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Aus der gereinigten wässrigen Phase des letzten Schritts, wurde die RNA durch Zugabe von 0.1 x Volumen Na-Acetat und 2x Volumen Ethanol, nach Inkubation bei -20°C für 16 h, mittels Zentrifugation (16.500 g, -10°C, 30 min) im „swing out“-Rotor gewonnen. Die isolierte RNA wurde kurz an der Luft getrocknet, dann in H<sub>2</sub>O depc bei 58°C gelöst und die Ausbeute am Photometer bestimmt.

#### 2.3.1.2.2 PqGOLD TriFast™ Protokoll (Fa. PqLab, Erlangen)

Die Methode eignet sich zur gleichzeitigen Isolierung von RNA, DNA und Proteinen aus einer Probe. Die Extraktionsmethode basiert auf einer Einzelschritt-flüssigphasen-Separation, die mit Hilfe eines einphasigen Phenol/Guanidinisothiocyanat-Reagenz erreicht wird. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phase auf : dabei enthält die wässrige Phase die RNA, die Interphase die DNA und die organische Phenolphase die Proteine.

Trifast-Lösung: enthält Phenol, Guanidinisothiocyanat

Die Zell- bzw. Gewebeprouben (1ml Trifast-Lösung/ 50-100 mg Probe) wurden mit Trifastlösung homogenisiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von Chloroform (0,2 ml /ml Homogenat ) und eine intensive Durchmischung. Die anschließende Zentrifugation (12000 g, RT, 5 min) führte zur Phasentrennung. Zur RNA-Isolierung wurde die wässrige, obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol gemischt und für 10-15 min bei RT inkubiert. Eine weitere Zentrifugation (12000 g, 4°C, 10 min) führte zur Präzipitation der separierten RNA, die abschließend zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen, dann kurz an der Luft getrocknet und in H<sub>2</sub>O depc oder in 0,5 % SDS bei 55-60°C gelöst wurde.

Die in der Interphase enthaltene DNA wurde aus der restlichen Lösung (s. Phasentrennung oben) durch Zugabe von Ethanol gewonnen. Eine Zentrifugation (2000 g, 4°C, 5 min) führte zur Sedimentation der genomischen DNA. Das erhaltene Pellet wurde wiederholt

mit 10 % (v/v) Ethanol/ 0.1M Na-Citrat gewaschen (30 min, RT) und zentrifugiert (2000 g, 4°C, 5 min). Vor dem Lösen der DNA in 8 mM NaOH, wurde ein letzter Waschschriff mit 75% (v/v) Ethanol durchgeführt und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Proteine wurden aus der verbleibenden organischen Phase (erster Überstand der DNA-Isolierung) durch Zugabe von 1,5 ml Isopropanol gewonnen. Zur Präzipitation wurde für 10 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert, anschließend wurde das Sediment zweimal mit mit 0.3 M Guanidin/ 95 % Ethanol und dann mit 100 % Ethanol gewaschen. Um die Proteinsedimente zu lösen wurden die Pellets in 0,5 % SDS vorsichtig erwärmt (max. 70°C) 1h auf einem Thermomixer geschüttelt.

### 2.3.1.3 Gelelektrophorese zu Aufreinigung, Isolierung und Analyse von DNA

[109]

RNA, PCR-Produkte, Plasmide, sowie Spaltprodukte aus Restriktionsansätzen wurden - abhängig von ihrer Größe - mittels Agarosegelelektrophorese oder nicht-denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Dazu wurden für die Agarosegelelektrophorese Mini- und Midi-Sub Cell Kammern bzw. zur vertikalen PAA-Gelelektrophorese Eigenbaukammern (technische Werkstatt Universität Tübingen) verwendet. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Ethidiumbromid (30ng/ml Agaroselösung bzw. 300ng/ml Badlösung) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde ein rechnergestütztes Videosystem mit Videoprinter eingesetzt.

Probenauftragelösung (6-fach konzentriert): 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v), XylenCyanol FF, 30 % (w/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O; TAE-Puffer (10-fach konzentriert): 48.4 g Tris, 11.4 ml Eisessig, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ad 1 l H<sub>2</sub>O; TBE-Puffer (10-fach konzentriert): 108 g Tris, 55 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) ad 1 l H<sub>2</sub>O.

#### 2.3.1.3.1 Nichtdenaturierende Agarosegel-Elektrophorese für DNA

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde die entsprechende Agarosemenge in 0.5x TBE bzw. 1x TAE – Puffer in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzt und nach Abkühlung Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt. Die noch flüssige Agarose wurde in einen abgedichteten Gelträger, in den der gewünschte Gelkamm eingesetzt war, gegossen und dieser bis zum Aushärten der Agarose auf einem Nivelliertisch positioniert. Kamm und Abdichtung wurden entfernt, der Gelträger mit dem Agarosegel im puffergefüllten Tank der Elektrophoreseapparatur plaziert. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit Probenauftragelösung versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 75 Volt TBE-Gel bzw. 50 Volt TAE-Gel (entspricht ca 7-10 V/cm).

#### 2.3.1.3.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese für RNA

MOPS-Puffer (10-fach konzentriert): 20.9 g MOPS, 4.1 g Na-Acetat, 5 ml 0.5 M; EDTA (pH 8.0); pH 7.0 mit 4M NaOH einstellen ad 0.5l H<sub>2</sub>O und durch 0.45µm Einmalfilter sterilfiltrieren; in dunkler Flasche lichtgeschützt lagern.

RNA-Probenauftragelösung: 50% (v/v) Glycerin, 1mM EDTA, 0.4% (w/v) Bromphenolblau; 1% Agarosegellösung: 0.5 g Agarose in 30 ml H<sub>2</sub>O depec, 5 ml 10-fach MOPS-Puffer, 1.5 ml 37% säurefreies Formaldehyd, 50 µl Ethidiumbromidlösung (55ng/ µl), mit H<sub>2</sub>O depec auf 50 ml. Alle benützten Geräte und Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert bzw. mit RNase-inhibierenden Reagenzien behandelt (DEPC, Ethanol, RNaseAway). Alle Arbeiten wurden mit Einmalhandschuhen durchgeführt.

Zur RNA-Agarosegelelektrophorese wurde die Mini Sub Cell Apparatur (40 ml Gel) von Bio-Rad verwendet. Die noch flüssige Agarose wurde in den abgedichteten Gelträger, in

den ein Gelkamm eingesetzt war, gegossen und dieser zum Aushärten der Agarose auf einen Nivelliertisch im Laborabzug gestellt. Kamm und Abdichtung wurden entfernt und der Gelträger mit dem Agarosegel im puffergefüllten Tank der Elektrophoreseapparatur positioniert. Zur Probenvorbereitung wurde die RNA (10-20 µg in maximal 6 µl) mit 2 µl 10-fach MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl deionisiertem Formamid gemischt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben für 5 min bei 70°C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt, mit 3 µl Probenauflösung versetzt und erneut anzentrifugiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei konstanter Spannung von 45 Volt (entsprechen ca 7-10 V/cm) für etwa 3 h.

#### **2.3.1.3.3 Vertikale nichtdenaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)**

30% Acryamidgellösung: 87 g Acrylamid, 3g Bisacrylamid ad 300 ml H<sub>2</sub>O; APS-Lösung: 10 % (w/v) APS in H<sub>2</sub>O; TEMED.

Zur Herstellung von 7 % PAGE-Gelen wurden 7 ml 30 % Acrylamidlösung, 3 ml 10-fach TBE und 20 ml H<sub>2</sub>O gemischt. Diesem Ansatz wurden 30 µl TEMED und 300 µl APS-Lösung zugesetzt. Die Gellösung wurde zwischen abgedichtete Glasplatten (1mm Distanzhalter, 10 x 12 cm) gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation wurden Gelkamm und untere Abdichtung entfernt, die Taschen von Gelresten befreit und das Gel in die Kammer eingesetzt. Mit Auflöserlösung versetzte Proben wurden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei konstanter Spannung (110 Volt, 1x TBE Laufpuffer) für ca. 90 min. durchgeführt.

#### **2.3.1.3.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Bind-Lösung: enthält Glasmilch; Melt-Lösung: enthält Essigsäure; Salt-Lösung: enthält Natriumiodid, Tris-HCl pH 7.5; Wash-Lösung: enthält Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl pH 7.5 (Easy Pure™ Kit der Fa. Biozym Oldendorf)

Zur Isolierung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente, wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel präpariert. Die DNA-haltige Agarose wurde mit „Salt“-Reagenz versetzt und bei 65°C in einem Thermomixer inkubiert, um die Agarosetextur aufzulösen. Durch Zugabe der „Bind“-Lösung erfolgte die Adsorption der DNA. Die Bindematrix wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand entfernt und die Matrix mit „wash“-Lösung behandelt. Um die DNA von der Matrix zu eluieren wurde das Sediment in H<sub>2</sub>O resuspendiert und durch Zentrifugation abgetrennt. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

#### **2.3.1.3.5 Isolierung von DNA aus PAGE-Gelen**

Elutionspuffer: 0.5 M NH<sub>4</sub>Acetat, 10 mM MgAcetat, 1mM EDTA pH 8.0, 0.1% (w/v) SDS

Zur Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen wurden die isolierten DNA-Banden in 200 µl Elutionspuffer überführt. Nach einer Inkubation von 6-12 h wurde die aus dem Gelmaterial in den Puffer diffundierte DNA mittels Ethanol präzipitiert, entsalzt und getrocknet.

### **2.3.1.4 Einsatz RNA- bzw. DNA-abhängiger DNA-Polymerasen**

#### **2.3.1.4.1 Erzeugung komplementärer DNA (cDNA-Synthese)**

Im ersten Schritt wurden Oligonukleotid/RNA-Komplexe erzeugt, indem pro Ansatz 1-3 µg Gesamt-RNA mit 2.5 µg oligo-(dT)<sub>18</sub>V-Primer (Abbildung 4) für 5 min bei 70°C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert wurden. Zur Erststrangsynthese wurden diese DNA/RNA-Hybride mit Moloney-Murine-Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 20-30 µl umgeschrieben: dazu wurde zu diesen Ansätzen 2-3 µl 10-fach Reaktionspuffer, 2 µl 4dNTP (10mM), 2-3 µl DTT (50mM), Reverse Transkriptase (150-200 U) und RNase Inhibitor (20 U) zugegeben und das Endvolumen mit H<sub>2</sub>O depe eingestellt. Die Ansätze wurden gemischt, abzentrifugiert und für 60-90 min bei 42°C inkubiert. Durch thermische Denaturierung (10 min, 75°C) wurde die Reaktion abgestoppt und die Produkte der reversen Transkription (cDNA) bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Werden cDNA-Synthese und PCR-Reaktion kombiniert, spricht man von RT-PCR. In die anschließende PCR-Reaktion wurden jeweils 1-2 µl der M-MuLV-RT-Produkte pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

#### **2.3.1.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Mit Hilfe der PCR [110] können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert und darüber hinaus auch gezielt modifiziert werden (gerichtete Mutagenese). Bei der PCR wird unter Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen (z.B. Taq-Polymerase) und Primeroligonukleotiden ein Teilstück einer DNA-Matrize vervielfacht. Die Spezifität dieser Reaktion wird vor allem durch die Sequenzbeschaffenheit der eingesetzten Oligonukleotide (i.a. sind sie 17-25 Nukleotide lang) bestimmt. Die Oligonukleotide (Primer) sind zu einem ganz bestimmten Bereich der DNA-Sequenz der Matrize komplementär und lagern sich spezifisch an diese Bereiche an. Dieser Oligonukleotid/DNA-Komplex ist Voraussetzung für die DNA-Neusynthese durch die Polymerase. Unter bestimmten Bedingungen findet diese Anlagerung jedoch auch an nahe verwandte (sequenzhomologe) DNA-Sequenzen statt. Deshalb können mit Hilfe modifizierter Oligonukleotidsequenzen die Zielsequenzen mutiert oder sequenzhomologe Teilabschnitte verschiedener Gene amplifiziert werden.

Für jedes PCR-Experiment wurden Negativkontrollen durchgeführt, d.h. diese Ansätze enthielten alle Komponenten des Reaktionsgemischs (inklusive Primer) außer DNA bzw. RNA. Diese Ansätze entsprechen damit einer Kontaminationskontrolle der jeweils eingesetzten Substanzen. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (50 µl) ergibt sich wie folgt: je 0,2 µM sense- und antisense -Primer, 1x PCR-Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,8-1.2 Units Polymerase (Taq-Polymerase, Fa. Amersham oder Dynazyme, Fa. Biometra) und 100- 150 µM 4dNTP-Mix. Einer initialen Denaturierung bei 96°C (5 min.) folgten i.a. 25-30 Reaktionszyklen. solcher Reaktionszyklus setzte sich aus Denaturierung (95°C, 30 sek.), Primeranlagerung (30-60 sek.) und Primerverlängerung (1-3 min.) zusammen. Die optimalen PCR-Bedingungen (siehe Tabelle 2) wurden für die unterschiedliche Primerpaare gesondert ausgetestet. PCR-Produkte, die zur Subklonierung in Plasmid-Vektoren bestimmt waren, wurden auf TAE-Agarosegelen aufgetrennt, mit Glasmilch aus dem Gel isoliert und die Klonierungsprodukte wurden durch Nukleotidsequenzierung kontrolliert.

**Tabelle 2: Aufbau der PCR-Programme für die verschiedenen Primerpaare**

Prinzipiell bestehen die PCR-Temperaturprogramme aus einem initialen Denaturierungsschritt (A) und einer unterschiedlichen Anzahl anschließender Amplifikationszyklen, die sich jeweils aus Denaturierung (1), Primeranlagerung (2) und Primerverlängerung (3) zusammensetzen. Wird die Temperatur während der Primeranlagerung in einem bestimmten Bereich schrittweise abgesenkt (hier von 62°C- 53°C mit 0.2°C/s ) spricht man von einer „touch-down“-PCR. Sie kann angewendet werden, wenn sich für ein Primerpaar und die entsprechende Matrize keine optimale Hybridisierungstemperatur ermitteln lässt (z.B. degenerierte Primersequenzen). Ebenso kann die Temperatur schrittweise erhöht werden (hier erste Zyklen bei 57°C bzw.59°C, restliche Zyklen bei 61°C/ 62°C), um Produktausbeute und Spezifität der Primerbindung zu optimieren. Diese Temperaturzyklen können unterschiedlich oft durchlaufen werden (B), um eine optimale Produktsynthese zu erreichen. Ein abschließender Temperaturschritt (C) gewährleistet die Fertigstellung aller sich in der Synthese befindenden DNA-Doppelstränge und kann zur Modifikation der DNA-Enden (z.B. TA-Klonierung) eingesetzt werden.

Primerpaar	Amplifikationszyklus					
	A	1	2	3	B	C
RP2Y <sub>1</sub> - gesamt	95°C 5 min	94°C 45 sec	62°C-53°C	72°C 90 sec	34 Zyklen	74°C 3 min
P2Y <sub>2</sub> -gesamt	95°C 5 min	94°C 45 sec	62°C-53°C	72°C 90 sec	34 Zyklen	74°C 3 min
TM3-TM7	95°C 5 min	94°C 45 sec	57°C 45 sec 62°C 45 sec	72°C 90 sec	7 Zyklen 25 Zyklen	74°C 3 min
RP2Y <sub>1</sub> eGFP	95°C 5 min	94°C 45 sec	59°C 30 sec 61°C 30 sec	72°C 3 min	5 Zyklen 25 Zyklen	74°C 5 min
GAPDH (hum)	95°C 5 min	94°C 45 sec	61°C 30 sec	72°C 60 sec	25 Zyklen	74°C 3 min

### 2.3.2 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger eingesetzt [111]. Die Sequenzierreaktionen wurden radioaktiv (<sup>35</sup>S- $\alpha$ -dATP) mit dem Sequencing-Kit „Cyclist“ (Stratagene) bzw. nicht-radioaktiv mit dem Sequencing-Kit ABI-PRISM (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch denaturierende Gelelektrophorese und Filmexposition bzw. durch computerunterstützte Kapillarelektrophorese im ABI-PRISM-System 310. Die Sequenzierungen wurden gemäß den Herstellervorgaben als Standardreaktionen durchgeführt und sind deshalb nicht detailliert beschrieben.

#### 2.3.2.1.1 Computerprogramme zur (Nukleotid-) Sequenzanalyse

Die Analyse (clustal, prosite, profilescaan u.a.) der erhaltenen Sequenzen (z.B. Abbildung 9 und Abbildung 10) wurden mit Hilfe des Programmpakets *HUSAR* am Deutschen Krebsforschungsinstitut (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt. Dieses Programm basiert auf der GCG Software in der Version 8.1 (Genetic Computer Group, Inc; Madison Wisconsin) Enzymatische Behandlung von DNA

Alle Techniken, die im Zuge der Erzeugung rekombinanter DNA-Konstrukte eingesetzt wurden, wurden in Anlehnung an die in den Standardwerken (z.B. Maniatis [112], Current Protocols in Molecular Biology [108] u.a.) veröffentlichten Protokollen durchgeführt.

Modifikationen wurden, falls vom Hersteller vorgeschlagen, wie beschrieben durchgeführt. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse, zur Vorbereitung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten und PCR-Produkten, die einer Ligasebehandlung unterzogen werden sollten, wurden in einem Volumen von 20 µl folgende Komponenten vereinigt: 0.2-2 µg DNA, 10 x Reaktionspuffer und 3 Units Restriktionsenzym/ µg DNA. Dieser Ansatz wurde 1-5 h bei 37°C inkubiert (Temperatur ist enzymabhängig!). Zur Analyse der Spaltprodukte wurde eine Gelelektrophorese mit 6 µl dieses Ansatzes, der mit 1 µl Auftragelösung versetzt wurde, durchgeführt. Zur späteren enzymatischen Weiterbehandlung wurde der restliche Ansatz einer phenolischen Extraktion (S.34) unterzogen.

#### **2.3.2.1.2 Entfernung von 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase**

Die freien Enden linearisierter DNA-Moleküle (i.d.R. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA zur Vorbereitung von Vektor-DNA) wurden mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase; CIP) an den 5'-Enden dephosphoryliert, bevor diese in die Ligasereaktion eingesetzt wurden. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit Ethanol gefällt und in 12 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1.5 U CIP und 1,5 µl CIP-Puffer wurde die Reaktion bei 37°C für 30 min durchgeführt. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl Auftragelösung und anschließender TAE-Agarosegelelektrophorese.

#### **2.3.2.1.3 Umwandlung überstehender freier DNA-Enden (sticky ends) in glatte Enden (blunt ends)**

Um 5'-überstehende DNA-Enden aufzufüllen bzw. 3'-überstehende zu entfernen wurde T4-DNA Polymerase (Produkt des T4-Bakteriophagengens 43; rekombinant aus *E. coli*) eingesetzt. Die mit Restriktionsenzymen behandelte DNA (0.5-2 µg) wurde einer phenolischen Extraktion unterzogen und in 10 mM Tris/HCl (pH 8.0) resuspendiert. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 100 µM 4dNTP, 10 U T4-Polymerase bei 11°C für 20 min durchgeführt. Beendet wurde die Reaktion durch einen Hitzeschritt bei 75°C (10 min), dem die Aufreinigung durch eine präparative Gelelektrophorese folgte.

#### **2.3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA**

Linearisierte Vektor-DNA und DNA-Fragmente, die freie, zueinander komplementäre Enden (sticky- oder blunt-ended) besitzen können durch die Behandlung mit T4-DNA-Ligase verknüpft werden. Die Ligrationsreaktion wurde in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt, die eingesetzte DNA-Gesamtmenge betrug 50-300 ng. Für Vektor- und „Insert“-DNA wurde ein molares Verhältnis von 1:1 – 1:10 angestrebt. Im Reaktionsansatz befand sich der vom Hersteller gelieferte Ligasepuffer und 5-200 U T4-DNA-Ligase. Die Ansätze wurden je nach Bedarf zwischen 16-48 h bei 10-20 °C inkubiert. Nach Reaktionsende wurden die Ansätze mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die resuspendierten Ligrationsprodukte wurden anschließend zur Transfektion von *E.coli*-Zellen verwendet. Methoden für den Gentransfer in prokaryontische Organismen.

### **2.3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen**

#### **2.3.2.2.1 Präparation elektrokompenter *E.coli*-Zellen (XL-1 Blue)**

Aus einer Übernachtskultur *E.coli* wurde 1l LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 unter Schütteln (250 r.p.m) im Schikanekolben inkubiert. Die Kultur wurde kurz auf Eis abgekühlt, auf vier sterile GSA-Zentrifugenbecher verteilt, zentrifugiert (Sorvall GSA 1500 Rotor, 7000 rpm, 4°C, 15 min) und in je 250 ml sterilem H<sub>2</sub>O



resuspendiert. Anschließend wurden drei weitere Waschschrte durchgeführt, nach denen die Zellen jeweils in 125 ml kaltem H<sub>2</sub>O, in 20 ml und 3 ml kaltem 10% (w/v) Glycerin resuspendiert wurden. Die Zellen wurden in 40 µl Portionen aliquotiert (ca. 5 x 10<sup>10</sup> Zellen pro ml), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zu 4 Monate gelagert.

#### 2.3.2.2.2 Präparation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E.coli*-Zellen (XL-1 Blue) [113]

Ca<sup>2+</sup>Cl<sub>2</sub>-Lösung: 100 mM CaCl<sub>2</sub> / 20 % (w/v) Glycerin

Aus einer Übernachtskultur *E.coli* wurden 200 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 kultiviert. Die Kultur wurde im GSA-Rotor abzentrifugiert (7 000 rpm, 4°C, 10 min), das Sediment in 20 ml eisgekühlter Ca<sup>2+</sup>Cl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und in 1ml Portionen aliquotiert. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei -70°C gelagert.

### 2.3.2.3 Transformation

Die Transformation von *E.coli*-Zellen erfolgte mittels Elektroporation (BioRad Gene Pulser) oder durch eine CaCl<sub>2</sub>-Methode.

#### 2.3.2.3.1 Elektroporation [114]

SOC-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextract, 0.5 g NaCl ad 1l H<sub>2</sub>O, 20 % (w/v) Glucose

Elektrokompetente Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit der entsprechenden DNA (100-200 ng, max. Volumen 2µl) gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Invitrogene, Elektrodenabstand 0.2 cm) gefüllt und elektroporiert (Bio-Rad Gene-Pulser™; Einstellung: 25 µF, 2,5 kV, 250 Ohm; 4-8 ms). Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37°C mit mäßiger Rotation (50 r.p.m) inkubiert. Die transformierten Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (14000 g, 2 min) ankonzentriert und auf geeigneten Selektionsmediumplatten ausgestrichen. Die Transformationseffizienz dieser Methode lag für *E.coli* bei etwa 1x10<sup>8</sup> bis 3x10<sup>9</sup> rekombinanten Zellen pro µg Plasmid-DNA.

#### 2.3.2.3.2 Transformation CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E.coli* [115]

CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen wurde auf Eis getaut, 200 µl der Zellsuspension mit Plasmid-DNA (100-200 ng, max. Volumen 20µl) gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend einem Hitzeschock (42°C, 45 sec) ausgesetzt, erneut für auf Eis gelagert (5 min) und nach Zugabe von 900 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C kultiviert. Die transformierten Zellen wurden durch Zentrifugation (14000 g, 1 min ) ankonzentriert und auf geeigneten Selektionsmediumplatten ausgestrichen. Die Transformationseffizienz dieser Methode lag bei 5x10<sup>6</sup> bis 1x10<sup>7</sup> rekombinanten Zellen pro µg Plasmid-DNA.

### 2.3.3 Zellbiologische Methoden

#### 2.3.3.1 Kultivierung von Mammaliazellen („Human Embryonic Kidney“ 293-Zellen)

Ham's F12-Medium (steril filtriert): Ham's F12-Medium mit 1g/l Glukose, 2.2g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 % FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml); DMEM-Medium (steril filtriert): DMEM-Medium mit Hypoxanthin ,1 g/l Glukose, 2.2g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10% FCS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml); PBS (autoklaviert): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8; Trypsin/ EDTA-Lösung: 0.05 % (w/v) Trypsin, 0.02 % (w/v) EDTA; Poly-D-Lysin Lösung: 0.01 % (w/v) Poly-D-Lysin in 0.15 M Boratpuffer pH 8.4; Medium-Mix: 1:1 Gemisch aus Ham's F12- und DMEM-Medium.

##### 2.3.3.1.1 Kultivierung in Zellkulturschalen

HEK293 Zellen wurden in Zellkulturschalen in Medium-Mix bei 37°C kultiviert. Die Atmosphäre des Brutschranks war H<sub>2</sub>O-gesättigt und bestand aus 5% CO<sub>2</sub>/ 95 % Luft. Die Zelllinien wurden bei Konfluenz (i.d.R. nach 3-4 Tagen) nach Bedarf 1:10-1:20 verdünnt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und dann durch Trypsin-Lösung (5 min, 37°C) abgelöst. Vorsichtiges Klopfen löste die Zellen vollständig vom Kulturschalenboden, die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 4 ml FCS-haltigem DMEM-Medium abgestopt. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Röhrchen überführt und zur Vereinzlung der Zellen mehrfach mit einer 5 ml Glaspipette verwirbelt. Der Verdünnung entsprechend wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen verteilt.

##### 2.3.3.1.2 Kultivierung der HEK293-Zellen auf Deckgläschen (z.B. [116])

Zur Durchführung der Ca<sup>2+</sup>-Messungen und der mikroskopischen Untersuchung der Zellen, wurden die Zellen auf Deckgläschen (Ø 22mm) kultiviert. Dazu wurden die Deckgläschen mit Methanol und Ethanol entfettet, bei 80°C getrocknet und 2 h bei 180°C trockener Hitze sterilisiert. Je drei dieser sterilen Deckgläschen wurden auf dem Boden einer 60 mm<sup>2</sup> Kulturschale durch Vaseline fixiert und mit 0.01 % (w/v) Poly-D-Lysin Lösung überschichtet (20 min, 37°C). Die beschichteten Deckgläschen wurden mit PBS gewaschen und mit 4 ml Medium-Mix überschichtet. In die Schalen wurden jeweils ca. 1 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgebracht. Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Mammaliazellen.

Einfriermedium: 10 % (v/v) DMSO, 10 % (v/v) DMEM in FCS

Zellen einer 145 mm<sup>2</sup>-Zellkulturschale, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden vereinzelt, abzentrifugiert (500 g, 4°C, 5 min) und in 6 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1,5 ml der Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen portioniert und schrittweise eingefroren (2h bei -20°C, ü. N. bei -70°C). Später wurden die Zellen in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen zügig bei 37°C ange-taut bis sich das noch gefrorene Medium aus dem Röhrchen in 5 ml FCS überführen ließ. Nach vollständigem Auftauen wurden die Zellen abzentrifugiert (500 g, 4°C, 5 min) und die Zellen auf 90 mm<sup>2</sup> Kulturschalen in 7ml Medium-Mix (20 % FCS) kultiviert. Nach ca. 12 h fand der erste Mediumwechsel statt, alle weiteren Wechsel wurden im gewöhnlichen Turnus mit Medium-Mix durchgeführt.

### 2.3.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen

#### 2.3.3.2.1 Lipofektion

Die Methode beruht auf der Fähigkeit von kationischen Lipidmolekülen mit der Zellmembran zu fusionieren [117]. Die Lipidmoleküle bilden in wässriger Phase positiv geladene Liposomen aus und komplexieren negativ-geladene DNA-Moleküle. Diese Lipid/ DNA-Komplexe ermöglichen so die Adsorption der DNA an die Zelloberfläche und die DNA wird bei der Fusion von Liposomen und Zellmembran direkt ins Zytoplasma aufgenommen.

Zur Transfektion wurden  $1-5 \times 10^5$  Zellen in einer  $90 \text{ mm}^2$  Kulturschale kultiviert bis 70 % Konfluenz (log-Phase) erreicht war. Die Zellen wurden 2-3 mal mit Medium-Mix ohne FCS gewaschen und abschließend mit 5 ml Medium-Mix überschichtet. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz DOTAP (Durchführung gemäß Herstellerprotokoll). Pro Ansatz wurden zwischen 5-10  $\mu\text{g}$  gereinigte, linearisierte Plasmid-DNA mit 6  $\mu\text{g}$  DOTAP in einem Endvolumen von 600  $\mu\text{l}$  gemischt. Der Lipofektionsmix wurde für 15-30 min bei RT inkubiert und dann den Zellen zugetropft. Die Schalen wurden anschließend für 6-8 h bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert und danach mit FCS auf eine Endkonzentration von 20 % (v/v) gebracht. Nach weiteren 12 h Kultur wurde das Medium komplett entfernt und durch Standardmedium ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen entweder für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingexperimente aus den Kulturschalen gewonnen, d.h. auf Glasplättchen umgesetzt, oder einer G418-Selektion unterworfen. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz bei 488nm beurteilt. Dazu wurde wenn nötig der Leervektor pEGFPN2 im Verhältnis 1:20 zum „Zielpasmid“ kotransfiziert.

#### 2.3.3.2.2 Elektroporation von HEK293-Zellen

##### 2.3.3.2.2.1 Elektroporation von HEK293-Zellen in der Kuvette

Zur Elektroporation  $1-2 \times 10^7$  Zellen in einer  $120 \text{ mm}^2$  Kulturschale bis zur log-Phase kultiviert und anschließend vereinzelt. Die Zellen wurden in 400  $\mu\text{l}$  DMEM-Medium ohne FCS überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Für einen 250  $\mu\text{l}$  Transfektionsansatz wurden 20-30  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 125  $\mu\text{g}$  Heringsperma-DNA auf ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  gebracht. Dieser DNA-Mix wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.4 cm) vorgelegt und mit 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension vermischt. Nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen elektroporiert (500  $\mu\text{F}$ , 150 V, 100 Ohm; 25-40 ms). Es folgte die Zugabe von kaltem, FCS-haltigen DMEM-Medium, eine erneute Lagerung auf Eis und die Überführung der Zellen in eine Kulturschale. Der Kultivierung für 24 h folgte die Gewinnung der Zellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingexperimente oder eine G418-Selektion.

##### 2.3.3.2.2.2 Elektroporation von HEK293 -Zellen auf Deckgläschen [118]

HEK293 Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und mittels zwei hochfrequenter Elektroporationspulse, (6 msec, 130 Volt; 15 sec Pause) entgegengesetzter Polarität, mit Heparin (200  $\mu\text{g}$  / ml) oder Plasmid-DNA beladen. Gleichzeitig wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Texas-Red Dextran® TRD (MW: 10 kDa; Konzentration: 90  $\mu\text{g}$  /ml) beladen, um Zellen identifizieren zu können, die Heparin bzw. DNA aufgenommen hatten. Die Elektroporation wurde in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem NaHBS-Medium durchgeführt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen eingesetzt (Heparin), oder in Medium-Mix überführt und bei  $37^\circ\text{C}$  weiterkultiviert.

### 2.3.3.3 Selektion stabiler Zellklone mittels dominanter Markergene [119]

Selektionsmedium: Medium-Mix mit 500-1000 µg/ml Geneticin (G418)

Zur Erzeugung klonaler Zelllinien wurden HEK293-Zellen 24-48 h nach der Transfektion mit pEGFPN-Plasmidkonstrukten in Selektionsmedium umgesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte 2-3 Wochen mit regelmäßigem Mediumwechsel bis einzelne Zellklone mit bloßem Auge sichtbar wurden. Diese G418-resistenten Zellklone wurden mittels „Klonieringen“ (ca. 2mm lange, Ø 1mm Glasröhrchenabschnitte) isoliert. Die Zellen dieser einzelnen Klone wurden in Kulturplatten vereinzelt und weiterkultiviert. Die mikroskopische Analyse der GFP-Fluoreszenz dieser Zellen und/oder die Überprüfung der Zellen durch „Ca<sup>2+</sup>-Imaging“ Experimente führte zur Identifikation rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor exprimierender Klone, die in einem weiteren Vereinzlungsschritt subkloniert wurden. Insgesamt wurden vier solcher Selektionsrunden durchgeführt. An GFP-positiven, stabil exprimierenden Klonen der vierten Selektionsrunde wurden die weitergehenden Untersuchungen durchgeführt.

## 2.3.4 Proteinchemische Methoden

### 2.3.4.1 Methoden zur Proteinbestimmung

#### 2.3.4.1.1 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz 10B [120]

Amidoschwarzlösung: 14.4 g Amidoschwarz 10B in 1l Methanol/Eisessig (8:1) gelöst und filtriert;  
Waschlösung: Methanol/Eisessig (8:1)

Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>Odd etwa 1:20 verdünnt und auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Zu den Proben wurde je 1 ml Amidoschwarzlösung gegeben, kurz gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (2500g, 10 min) wurden die Proben mit 5 ml Waschlösung versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und zwei weitere Waschschrte in beschriebener Weise durchgeführt. Die gefärbten Proteinpellets wurden 30 min bei RT in 2.5 ml 0.1M Natronlauge gelöst. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 620 nm gegen 0.1M Natronlauge als Leerwert. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine BSA-Eichreihe (5-80 µg) erstellt. Alle Werte wurden als Doppelansatz gemessen.

#### 2.3.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford [121]

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliant G-250 in 50 ml 95% EtOH lösen, 100 ml Phosphorsäure zugeben und mit H<sub>2</sub>Odd auf 1l auffüllen

Diese Bestimmung wurde in Multitestplatten durchgeführt. Die OD<sub>620nm</sub> der Proben wurde im Tripelettansatz mit einem ELISA-Reader (Titertek Multiscan MCC 340) bestimmt und gegen eine BSA-Eichreihe ausgewertet. Die Proteinproben wurden mit H<sub>2</sub>Odd 1:20 bis 1:50 verdünnt und 1:5 mit Bradford-Reagenz versetzt. Die Messung am ELISA-Reader wurde unmittelbar nach der Zugabe des Reagenz vorgenommen.

### 2.3.4.2 Aufreinigung von Proteinen

#### 2.3.4.2.1 Grobfractionierung von Säugerzellen

Lysepuffer: 10 mM HEPES/NaOH pH.7.4 mit Proteinaseinhibitoren (0.2 mM Pefabloc SC, 1 µg/ml Pepstatin, 1mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin), 3 mM MgCl<sub>2</sub>

Solubilisierungspuffer: Lysepuffer, 1% (w/v) Triton X-100 oder 1% (w/v) SDS.

Zur Fraktionierung wurden 20-300 mg Zellen eingesetzt. Das Naßgewicht wurde auf das 5 bis 6-fache des eigentlichen Proteingewichts geschätzt. Die Zellpellets wurden in 2-6 ml Lysepuffer homogenisiert. Dazu wurde das Zellpellet zweimal für 10 sec mit einem Ultraturrxhomogenisator behandelt und mit 7 Pulsen einer Sonotrode (50%-Leistung) beschallt. Eine Probe (ca. 200 µl) des Lysats wurde als Kontrolle aufbewahrt. Das Lysat wurde zentrifugiert (500 g, RT, 5 min) und der Überstand 1h bei 55.000 rpm (135.000g) in der TL-100 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand ergab die Probe „cytosolische Proteine“. In einem Waschschrift wurde das Pellet erneut mit ca 3 ml Lysepuffer resuspendiert (Teflonmörser und Bohrmaschine). Es erfolgte eine erneute Zentrifugation in der Ultrazentrifuge, der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250 µl der Solubilisierungslösung resuspendiert (Protein-Detergenzverhältnis: 1:12). Nach einer Inkubation (45 min, RT) wurde die nächste Ultrazentrifugation durchgeführt. Der Überstand ergab die Probe „Membranproteine 1“, das Pellet wurde in weiteren 250µl der Solubilisierungspuffer resuspendiert und weitere 30 min bei RT inkubiert. Der Überstand nach der folgenden Zentrifugation repräsentiert die Probe „Membranproteine 2“, das Pellet wurde in je 200- 400 µl Probenpuffer resuspendiert und ergab die Probe „Triton nicht-lösliches Protein“.

#### 2.3.4.2.2 Präparation von Plasmamembranen

PL-Lysepuffer: 5 mM Tris (pH 8.1), 50 µM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 Tablette/50 ml Proteinase-Inhibitorcocktail Complete™; Homogenisationspuffer: 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 0.32 M Sucrose, 1 Tablette/50 ml Proteinase-Inhibitorcocktail Complete™.

Plasmamembranen von nicht transfizierten und stabil exprimierenden HEK293-Zelllinien wurden über eine Sucrosedichtegradientenzentrifugation angereichert. Dazu wurden HEK293-Zellen konfluent bewachsener Kulturschalen durch mechanische Ablösung geerntet, abzentrifugiert (500g, 4°C, 5 min), einmal mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lysepuffer pro g Naßgewicht resuspendiert, mit einem Ultraturrxhomogenisator homogenisiert und zur Abtrennung der Zellkerne erneut zentrifugiert (5 min, 500g, 4°C). Die Membrantrümmer im Überstand wurden durch eine Zentrifugation (45.000 g, 4°C, 20 min) ankonzentriert und in 1-2 ml Homogenisationspuffer resuspendiert. Je 1 ml des Homogenats wurde auf einen Stufendichtegradienten (0.8/1.0/ 1.5/ 2.0 M Sucrose) aufgesetzt und für 40 min zentrifugiert (76 000 g, 4°C). Plasmamembranfragmente reicherten sich an der Grenzschicht der 1.0M/1.5M Dichtestufe an und wurden abgezogen. Die gereinigte Fraktion wurde mit 25 mM HEPES pH 7.4 1:1 verdünnt und in einer weiteren Zentrifugation (120 000 g, 4°C, 20 min) sedimentiert. Dieses Plasmamembranpellet wurde in Homogenisationspuffer resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt und auf 2 mg/ml eingestellt. Bis zur Verwendung wurden diese Proben bei -80°C gelagert.

#### 2.3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

[122]

100 ml Trenngel: 44.3 g Acrylamid, 0.9 g Bisacrylamid ad 100 ml; 100 ml Sammelgel: 43.6 g Acrylamid, 1.3 g Bisacrylamid ad 100 ml; Trenngelpuffer: 1.5 M Tris/0.4 % (w/v) SDS/ 0.725g EDTA (pH 8.8); Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/0.4 % (w/v) SDS/ 0.145g EDTA (pH 6.8); 2 x Probenpuffer: 250 mM Tris/ HCl (pH 8) , 4 % (w/v) SDS, 50 mM DTT, 3 mM EDTA, 20 % (w/v) Glycerol, 0.005 % (w/v) Bromphenolblau; Coomassie-Färbelösung: 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O; Entfärbelösung: 10 % (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O

Die SDS-PAGE wurde unter Verwendung von 0.75 mm dicken Minigelplatten mit einem linearen Acrylamidgradienten von 5-20 % T im Trenngel durchgeführt (T: % (w/v) von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Gel). Die Ausbildung des Acrylamidgradienten wurde durch einen Glyceringradienten 5-20 % (v/v) unterstützt. Der Anteil „C“ Bisacryl-

amid an der Gesamtmenge Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid betrug 2 %. Das Trenngel wurde mit einem Sammelgel (T: 5 %, C:2.7 %, 20 % Glycerin (v/v)) überschichtet (s.Tabelle3). Die verwendeten Proteinproben wurden für 3 min bei 95°C mit Probenpuffer solubilisiert und bei -20°C aufbewahrt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine (max. Volumen 30 µl) erfolgte in einer Vertikal-Minigelapparatur zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard. Die Elektrophorese erfolgte unter Kühlung bei 4°C mit einer Anfangsstromstärke von 8 mA und einer Grenzspannung von 250 V. Nachdem die Bromphenolfront das Gelende erreicht hatte, wurde das Gel entweder mit einer Coomassie-Lösung [120] angefärbt oder für den Elektortransfer auf eine Blotmembran [123] verwendet. Die Entfärbung des Coomassie-Hintergrunds erfolgte durch Hitzebehandlung des Gels in H<sub>2</sub>O oder durch Inkubation in Entfärbelösung.

**Tabelle 3: SDS PAGE Gelzusammensetzung**

Auflistung der Bestandteile mit Mengenangabe zur Herstellung von 5 SDS-PAGE Gradientengelen zur Proteinanalyse. Näheres siehe Text.

Bestandteile	5 Gele 0.75mm; 8 cm Trenngel		Sammelgel 5%
	20%	5%	
Trenngelpuffer (ml)	3.564	3.564	
Sammelgelpuffer (ml)			2.268
Trenngellösung (ml)	5.8	1.45	
Sammelgellösung (ml)			0.93
TEMED (µl)	9	9	12
87% (v/v)Glycerol (ml)	3.03	0.75	1.93
Wasser (ml)	0.725	7.3	3.22
10% (w/v) APS (µl)	30	48	48

**2.3.4.4 Transfertechniken**

2.3.4.4.1.1 Elektrotransfer von Proteinbanden auf Nitrocellulosemembran (Western Blottechnik) [123]

Transferpuffer: 0.002 % (w/v) SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol  
Ponceau S-Lösung: 0.2 % (w/v) Ponceau S in 3 % Essigsäure

Ungefärbte SDS-Proteingele wurden für 5-15 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Elektrotransfer erfolgte in einer Tankblotapparatur unter Kühlung bei 4°C und konstanter Stromstärke von 200 mA (etwa 10 V/cm Feldstärke) für 1.5 h. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer in PonceauS-Lösung angefärbt, um die Qualität des Proteintransfers zu kontrollieren. Die Lage der Banden des Molekulargewichtsstandards wurden auf der Membran markiert und die Membran in H<sub>2</sub>O oder TBST entfärbt.

**2.3.5 Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen**

2.3.5.1.1 Immunodetektion

10x TBS-Stammlösung: 24.2 g Tris, 80 g NaCl mit H<sub>2</sub>O auf 1l (pH 7.6); TBST: 1x TBS, 0.1 % (w/v) TWEEN 20; Blockierungslösung: TBST, 5 % (w/v) Magermilchpulver; TBSA: 1x TBS, 0.05 % (w/v) NaAzid

Die Blockierung der Membranen und alle weiteren Schritte erfolgten unter leichtem Schütteln auf einem Testplattenschüttler. Die Blots wurden in 15 ml Blockierungslösung (1h, RT) inkubiert und nachfolgend insgesamt vier TBST-Waschschritten ausgesetzt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der nach Bedarf in TBSA verdünnt wurde, erfolgte bei 4°C für

16 h. Soweit möglich wurde die eingesetzte Antikörperlösung mehrfach verwendet. Vor der Hybridisierung mit dem sekundären Antikörper erfolgten erneute TBST-Waschschritte. Der Zweitantikörper aus Ziege ( Ziege- $\alpha$ -Maus-IgM; Verdünnung 1:4000 in Blockierungslösung) wurde als Peroxidasekonjugat (POD) eingesetzt, die Inkubation erfolgte für 2h bei RT. Nach neuerlichem Waschen wurde die Detektion der immunomarkierten Proteinbanden mittels ECL-Reagenz (Amersham) durchgeführt. Dazu wurden die Komponenten nach Herstellerangaben gemischt und die Membran für 60 sec in diesem Mix inkubiert. Zur Visualisierung der Signale wurde in einer Filmkassette chemilumineszenz-sensitives Filmmaterial (Hyperfilm ECL) der Membran zu Belichtung ausgesetzt. Die Belichtungszeiten betragen 15 sek-30 min, entwickelt und fixiert wurde das Filmmaterial in einem Gerät der Firma Kodak.

#### 2.3.5.1.2 Lektinblotting

ConA-Bindepuffer: TBS, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>; ConA-Lösung: ConA-Bindepuffer, 20 $\mu$ g ConA-Digoxigenin/ml, 0.05% NaAzid; Blockierungslösung: 0.5% Blockierungsreagenz in TBS

Die Zuckerstrukturen von Proteinen wurden auf Western-Blots mit Hilfe von Digoxigenin-konjugierten Lektinen untersucht. Unspezifische Bindungsstellen der Blotmembranen wurden durch Inkubation in Blockierungslösung (1 h, RT) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 5 mal in TBST gewaschen und dann für 10 min in ConA (ConcanavalinA)-Bindepuffer inkubiert. Die Lektininkubation erfolgte mit ConA-Lösung für 2 h bei RT. Bei Kontrollmembranen enthielt die ConA-Lösung zusätzlich noch 0.2 M Methyl- $\alpha$ -D-Mannosid. Nach erneuter TBST-Waschprozedur erfolgte die Inkubation der Membran mit POD- $\alpha$ -Dig-FAB-Fragmenten (0.1U/ 10 ml in TBS) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die lektinmarkierten Proteine durch ECL-Chemilumineszenz detektiert.

#### 2.3.5.1.3 Stripping-Prozedur von Blot-Membranen

Stripping-Puffer: 0.2 M Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) TWEEN 20 (pH 5.2)

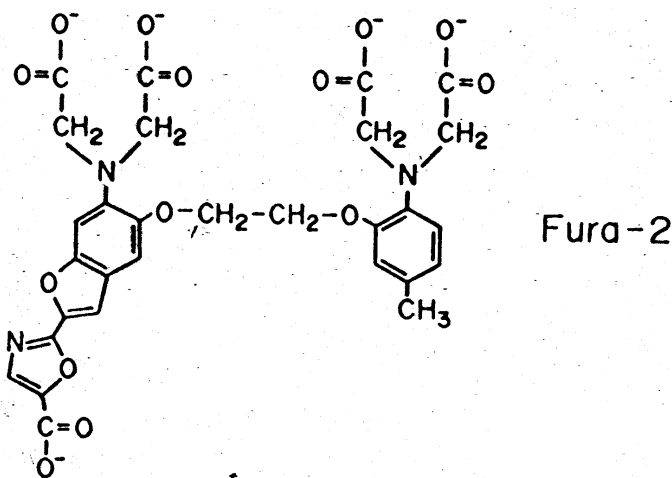
Um einzelne Membranen wiederholt mit unterschiedlichen Antikörpern hybridisieren zu können, wurde folgendes Protokoll angewandt: die Membranen wurden zweimal für je 1 h und 1 mal für 10 min in „stripping“-Puffer inkubiert und anschließend viermal für 10 min mit TBST gewaschen. Die so behandelten Membranen wurden erneut blockiert und mit den entsprechenden AK inkubiert (S. 46).

## 2.3.6 Zytoplasmatische Kalziumfreisetzung

### 2.3.6.1 Grundlagen der Ca<sup>2+</sup>-Messungen

Messungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen im Gleichgewichtszustand und während zellulärer Regulationsprozesse wurden auf Einzelzellebene erst durch spezifische Fluoreszenzfarbstoffe, die eine hohe Quantenausbeute aufweisen, möglich. Erst sie ermöglichen die Visualisierung eines zweidimensionalen Fluoreszenzsignals, dessen Intensität von der intrazellulären Konzentration der freien Ionen abhängt, und die Auswertung mittels „dual excitation ratio imaging“-Technik. Aus der Standardfluoreszenz-Gleichung nach Bright [124] folgt, daß die Fluoreszenzemission eines Farbstoffs im Wesentlichen von seiner intrazellulären Kompartimentierung, der Zellbeladung mit dem Farbstoff, und dem Störtauschen der Meßanlage abhängt. Um diese Schwierigkeiten zu beseitigen werden spezifische ratiometrische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Diese Farbstoffe zeigen eine gegenläufige Änderung in der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Wellenlängen. D.h. in Abhängigkeit der Ionenkonzentration liegen unterschiedliche Zustandsformen des Farbstoffs vor: ionengebundene bzw. ionenfreie Form. Wird die Fluoreszenzintensität beider Zustandsformen gemessen

und zueinander ins Verhältnis gesetzt, dann wird die Fluoreszenzmessung sowohl von der Schichtdicke der Probe, als auch von der intrazellulären Konzentration des Farbstoffs unabhängig [125]. Fura-2 (Abbildung 5) ist ein Beispiel eines solchen spezifischen, dual anregbaren Fluoreszenzfarbstoffs, der zur Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eingesetzt werden kann. Fura-2 ist als Acetoxymethylester praktisch ungeladen und deshalb membrangängig. In der Zelle werden die Esterbindungen gespalten und Fura-2 liegt in seiner stark geladenen, freien Form vor (Abbildung 5), die nicht mehr membrangängig ist und sich in der Zelle anreichert. Erst in dieser Form läßt sich Fura-2 durch UV-Licht anregen und weist dabei eine so hohe Quantenausbeute auf, daß die Sensitivität für Ca<sup>2+</sup>-Messungen an Einzelzellen ausreicht. Fura-2 besitzt, da es in Abhängigkeit der Konzentration freier Ca<sup>2+</sup>-Ionen in unterschiedliche Zustandsformen vorliegt (ionengebunden bzw. ionenfrei), eine gegenläufige Änderung der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 380 nm.



**Abbildung 5: Struktur des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2**

Ca<sup>2+</sup>-sensitive Farbstoffe wie Fura-2 werden in Ca<sup>2+</sup>-Messungen eingesetzt, weil sie eine gegenläufige Änderung in der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Wellenlängen zeigen. In Abhängigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration liegen unterschiedliche Zustandsformen des Farbstoffs vor: ionengebundene bzw. ionenfreie Form. Zellen werden mit dem membrangängigen Fura-2/AM - einem Methyl-esterderivat – beladen, aus dem in der Zelle Fura-2 freigesetzt wird.

### 2.3.6.2 Mikrofluorimetrische Ca<sup>2+</sup>-Messungen „FURA-2 ratio imaging“ (z.B.

[116])

NaHBS Ca<sup>2+</sup>-frei (nominell Ca<sup>2+</sup>-frei): Zusammensetzung wie NaHBS, jedoch ohne CaCl<sub>2</sub>; Fura2/AM: 2 mM Fura2/AM in DMSO

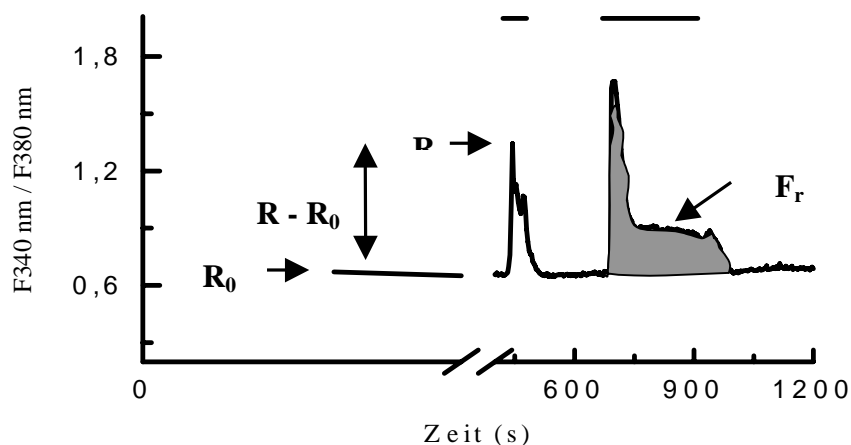
Die Messungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsveränderungen wurden mit Fura-2 durchgeführt. Eingesetzt wurden HEK293-Zellen, die auf Glasplättchen kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit Fura-2 beladen, indem sie für 30 min bei 37°C im Zellkulturschrank (dunkel !) mit 2 µM Fura-2/Acetoxymethylester (Fura-2/AM) inkubiert wurden. Die beladenen Zellen wurden in einer Perfusionskammer (Durchflußvolumen 0,2 ml) auf den Präparatetisch eines Mikroskops (Zeiss, Axiovert 135, Jena Deutschland) überführt. Während des Experiments wurden die Zellen kontinuierlich mit 32°C warmem NaHBS-Medium superfundiert. Die Flußgeschwindigkeit betrug ca. 2 ml/min. Überschüssiges Medium wurde mittels einer Pumpe abgesaugt. Um während des Experiments unterschiedlich komplementierte



NaHBS-Lösungen (i.A. Nukleotidagonisten oder Inhibitoren) einsetzen zu können, wurde in das Schwerkraftperfusionssystem ein 6-Wegehahn (Thomachrom, Type RH0112) von Reichelt (Heidelberg, Deutschland) integriert. Die Einzelzellmessungen wurden mit Hilfe des Imagingsystems von *TILL Photonics GmbH* (München, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen wurden alternierend durch Licht der Wellenlängen 340 nm bzw. 380 nm angeregt (20-100 ms pro Wellenlänge, 33 Hz-Frequenz) und die resultierende Fluoreszenz bei >510 nm (Emissionswellenlänge) gemessen. Änderungen des Fluoreszenzverhältnisses F340 / F380 entsprechen den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsveränderungen. Die Imagedaten wurden auf einem PC gespeichert, um anschließend die Änderungen des Fluoreszenzverhältnisses [ $\Delta$  (F340 nm/ F380 nm)] für einzelne Zellen auswerten zu können.

#### 2.3.6.2.1 Auswertung der gemessenen Daten

Die abschließende Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software *Sigmaplot* von Jandel Scientific, Düsseldorf. Ausgewertet wurden die Ca<sup>2+</sup>-Antworten, d.h. die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, jeder einzelnen Zelle. Dazu wurden die F340 nm/ F380 nm- Werte jeder Zelle gegen die Zeit (t) in Diagrammen aufgetragen.



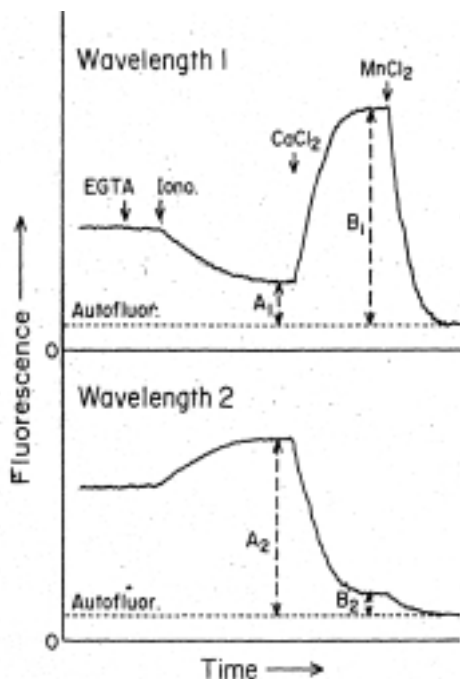
**Abbildung 6: Diagramm zur Auswertung von Fura-2 Ca<sup>2+</sup>-Meßdaten.**

Es bedeuten: R<sub>0</sub> Ruhewert, R Maximum der transienten Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung, R-R<sub>0</sub> Amplitudendifferenz. F<sub>r</sub> Fläche des Transienten (grau), als Maß für die freigesetzte Kalziummenge in relativen Flächeneinheiten.

Aus diesen Diagrammen wurden entweder die Amplitudendifferenzen  $\Delta$  F340 nm/ F380 nm, d.h. R- R<sub>0</sub>, oder die Fläche F<sub>r</sub> unter den transienten Kalziumkonzentrationserhöhungen bestimmt (Abbildung 6). Die in den Auswertungen angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert der Amplitudendifferenz bzw. der Flächen, der aus N Einzelzellen ermittelt wurde, dazu wurde jeweils der Standardfehler (SEM) angegeben. Durchgeführt wurden jeweils 2-5 Experimente pro Versuchsansatz, die zur Stichprobenmenge N zusammengefasst wurden.

## 2.3.6.3 Kalibrierung der Fura-2 Messung an HEK293-Zelllinien [126]

Optimale Bedingungen für eine gute Fluoreszenzausbeute ergeben sich aus der Balance von Beladungszeit, Farbstoffkonzentration und Expositionszeit. Die gemessenen Zellen dürfen nicht mit Farbstoff überladen werden, da die Hydrolyseprodukte von Fura-2/AM toxisch wirken und Fura-2 Pufferwirkung auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration der Zelle hat. Um die Verwendbarkeit der eingesetzten Beladungs- und Meßbedingungen bei HEK293-Zellen zu überprüfen wurden „in situ“ Kalibrierungsmessungen (Abb. 7) durchgeführt. Als Maß für die Verwendbarkeit der Versuchbedingungen wurde die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der Zellen im Ruhezustand herangezogen, die unter diesen Bedingungen normalerweise ermittelt wurde. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Zellen sollte im Ruhezustand im Bereich von 50-200 nM liegen. Bei der *in situ* Kalibrierungsmethode wird zur Ermittlung von  $R_{\min}$  die minimale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Erniedrigung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und dem Einsatz eines Ionophors - hier Digitonin (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) - erreicht. Die in Abbildung 7 gezeigten Spuren verdeutlichen das Ergebnis eines Einzelzellexperiments. Beispielhaft sind die beiden Kurvenverläufe dargestellt, die sich für die Anregungswellenlängen 340 nm bzw. 380 nm ergeben. Im Experiment ist die Konzentration des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators vernachlässigbar klein.  $R_{\min}$  ergibt sich aus dem Verhältnis der beiden Plateauwerte ( $A_1/A_2$ ) der Einzelwellenlängen (340 nm bzw. 380 nm), die sich in Anwesenheit von EGTA (6 mM)/NaHBS/Digitonin (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) einstellen. Entsprechend ergibt sich  $R_{\max}$  ( $B_1/B_2$ ) in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  in hohem molaren Überschuß und Digitonin. Die Konstante  $S_f/S_b$  (maximaler Fluoreszenzwert Fura-2 zu Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$ ) ergibt sich aus  $A_2/B_2$ . Der Wert für die Autofluoreszenz wird im Experiment durch den  $\text{Mn}^{2+}$ -Quench des intrazellulären Fura-2 ermittelt.



**Abbildung 7: Musterkurven zur Durchführung der *in situ*  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalibrierungsexperimente**

Musterkurven zur Durchführung der *in situ*  $\text{Ca}^{2+}$ -Kalibrierungsexperimente: Die gezeigten Spuren repräsentieren die Originalspuren (340 nm und 380 nm) eines Einzelzellexperiments in dem die extrazelluläre Fura-2 Konzentration vernachlässigbar klein und Digitonin (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) kontinuierlich vorhanden ist. Der Einsatz des Ionophors sorgt für den schnellen Ausgleich zwischen extrazellulärer und intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Zur Ermittlung von  $R_{\min}$  muß die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf den niedrigst möglichen Wert erniedrigt werden. Dies wird durch die Eliminierung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erreicht. Freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, deren Konzentration im NaHBS Medium bei 1.8 mM liegt, werden durch 6 mM EGTA komplexiert.  $R_{\min}$  ergibt sich aus dem Verhältnis der Plateauwerte ( $A_1/A_2$ ), die sich unter diesen Bedingungen einstellen. Durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) liegen

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in hohem molaren Überschuß vor und sättigen das vorhandene intrazelluläre Fura-2 vollständig ab.  $R_{\max}$  ergibt sich entsprechend aus dem Verhältnis der Plateauwerte  $B_1/B_2$ . Die Konstante  $S_f/S_b$  (maximaler Fluoreszenzwert Fura-2 zu Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$ ) ergibt sich aus  $A_2/B_2$ . Die Werte für  $R_{\min}$  und  $R_{\max}$  müssen noch um die Autofluoreszenz der Zellen bereinigt werden. Der Autofluoreszenzwert ergibt sich, wenn die Fluoreszenz des intrazellulären Fura-2/ $\text{Ca}^{2+}$  durch Zugabe von

Mn<sup>2+</sup> (3 mM) ausgelöscht (Mn<sup>2+</sup>-Quench) wird. Zur Berechnung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurden diese Werte in Formel 1 (s.u.) eingesetzt.

Die Berechnung der Kalziumkonzentration aus den Einzelwellenlängen erfolgt über folgende Formel 1:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{S_f}{S_b}$$

Tabelle 4 faßt die Kennwerte zusammen, die zur Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentration verwendet wurden. Diese Werte wurden aus > 50 Zellen, die in jeweils 2-5 Kalibrierungsexperimenten gemessen wurden, ermittelt. Die Kalziumkonzentrationen die sich als Ruhewert bei Zellen der drei verschiedenen Zelllinien in ergeben, wenn das Verhältnis der Wellenlängen 340 nm/380 nm zwischen 0.7 und 1.0 liegt, sind von vergleichbarer Größe und liegen in einem Konzentrationsbereich, der typisch für den physiologischen Ruhezustand vieler Säugerzellen ist. Aus diesem Grund wurden bei der Auswertung der einzelnen Ca<sup>2+</sup>-Messungen nur Zellen einbezogen, die zu Beginn der Experimente einen Ruhewert R<sub>0</sub> (F<sub>340 nm</sub> / F<sub>380 nm</sub>) zwischen 0.7 und 1.0 aufwiesen. Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> die R<sub>0</sub>-Werten in diesem Bereich entspricht, liegt zwischen 130-270 nM (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Kennwerte der Ergebnisse der Fura-2 Kalibrierungsmessungen an HEK293 Zelllinien.**

In der Tabelle sind die Mittelwerte der in Abbildung 7 erläuterten Kennwerte angegeben, die bei der Durchführung der Kalibrierungsmessungen an Fura-2 beladenen Zellen ermittelt wurden. Für die drei HEK293 Zelllinien wurden aus diesen Werten die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (nM) berechnet, die F340 nm / F380 nm -Werten von 0.7 bzw. 1.0 entsprechen.

Zelllinie	N/(Exp.)	R <sub>max</sub>	R <sub>min</sub>	S <sub>f</sub> /S <sub>b</sub>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> bei ratio 0.7 in nM	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> bei ratio 1.0 in nM
HEK 293	97/(5)	22.7	0.16	12.2	129 ± 21	212 ± 23
HEK RP2Y <sub>1</sub> -wt	90/(4)	13.9	0.15	11.6	152 ± 15	250 ± 25
HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	77/(5)	20.15	0.12	26.7	174 ± 7	267 ± 10

## 2.3.7 Mikroskopie

### 2.3.7.1 Immuno- und GFP-Fluoreszenzmikroskopie

PBS: 10 mM K-Phosphat pH 7.2, 150 mM NaCl; NaHBS: 145 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 2mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>x 2H<sub>2</sub>O, 25 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4; die Osmolarität sollte 320-350 mOsm betragen; Fixierlösung: 4% (w/v) para-Formaldehyd in PBS; Glycin-Lösung: 0.1% (w/v) Glycin in PBS; PB: 3% BSA in PBS; PT: 0.1% Triton X-100 in PBS; PBT: 0.3% Triton X-100 und 3% BSA in PBS; Einbettmedium: Aquatex; α-GFP-AS: polyklonales α-GFP-Antiserum (1:200 Verdünnung); sekundäre Antikörper: α-Kaninchen/Cy3 Konjugat bzw. α-Kaninchen/Cy2 Konjugat jeweils in 1:100 Verdünnung in PBS; WGA-TexasRed®-Konjugat: das Lektin wurde in PBS verdünnt (Konzentration 100 µg/ml).

Die Untersuchungen wurden an Zellen durchgeführt, die auf Deckgläschen kultiviert wurden. Vor den Inkubationsschritten wurden die Zellen mit PBS (3 ml) gewaschen und anschließend in eine feuchte Kammer überführt (Petrischale mit feuchtem Kleenex und Para-

film). Nach einem weiteren Waschschrift mit 150 µl PBS wurden die Deckgläschen 15 min bei RT mit 150µl der Fixierlösung behandelt. Überschüssiges Formaldehyd wurde durch drei Glycinwaschschritte (je 150 µl, 5 min) abgesättigt und die Zellen danach dreimal mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung des GFP-Anteils des rP2Y<sub>1</sub>-GFP Rezeptors wurden die Präparate permeabilisiert (150 µl PT, RT, 10 min) und unspezifische Bindungsstellen mit PBT abgesättigt (150 µl, 30 min, 37°C). Die Zellen wurden ü.N. bei 4°C mit dem α-GFP-AS inkubiert und danach fünfmal ausgiebig mit PBT (je 150 µl) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und ebenfalls für 16 h bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBT und PBS (je 3 x) wurden die Deckgläschen in Einbettmedium auf Objektträger aufgebracht und mit den entsprechenden Filterkombinationen (s.Tabelle 5) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

**Tabelle 5: Eigenschaften der eingesetzten Fluorochrome**

Angegeben sind die Anregungs- und Emissionswellenlängen für einige gängige bzw. in dieser Arbeit verwendete Fluorochrome, die mit denentsprechenden Filtersätzen verwendet werden können.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge (nm)	Emissionswellenlänge (nm)	Farbe
Cy2	490	520	Grün
Rhodamin (TRITC)	552	570	Rot
Texas Red®	596	620	Rot
Cy3	552	570	Rot
GFP	488	512	Grün

Bei den Experimenten in denen TexasRed®-konjugiertes Lektin WGA eingesetzt wurde, erfolgten nach der Inkubation mit dem sekundärem Antikörper (hier Cy2-Konjugat) drei PBT-Waschschritte und dann die Lektinfärbung. Das Lektinkonjugat wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt und 4h bei RT inkubiert. Im Anschluß wurden die letzten Waschschritte mit PBT und PBS (je 3mal) durchgeführt und die Deckgläschen in Einbettmedium auf Objektträgern fixiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Auswertung am Mikroskop kühl und lichtgeschützt.

### 3 Ergebnisse

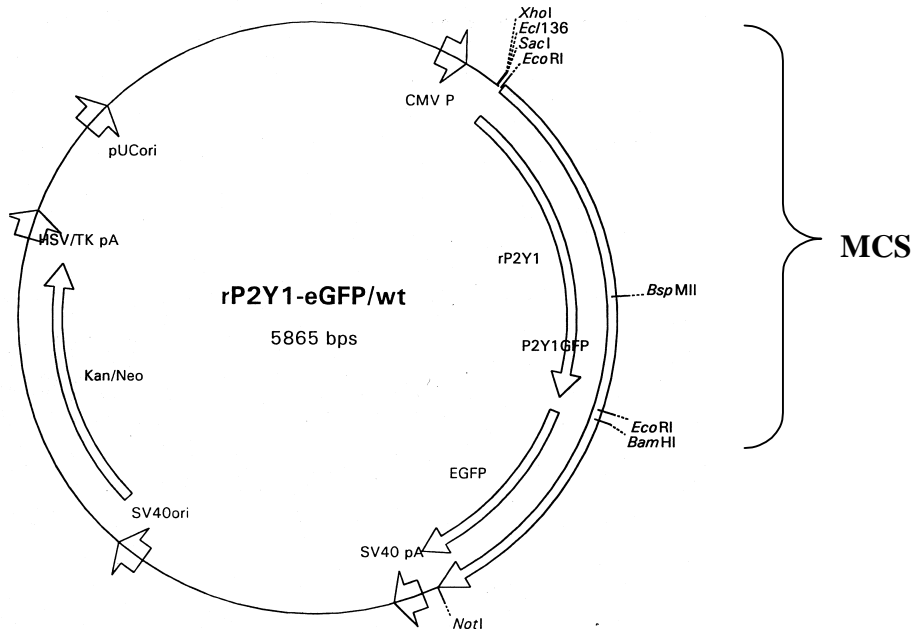
#### 3.1 Erzeugung der Expressionsvektorkonstrukte für den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (rP2Y<sub>1</sub>) aus dem ZNS der Ratte

Der eingesetzte P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor cDNA-Klon ist ca. 1500 bp lang und wurde über eine PCR-Strategie aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattenhirn isoliert. Die Nukleotidsequenzierung ergab, daß der Klon neben der Nukleotidsequenz für den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor auch Sequenzinformation der 3' und 5' untranslatierten Bereiche enthält. Wie alle bisher isolierten P2Y-Rezeptoren ist die gesamte Protein-codierende Sequenz (Exon) nicht durch nicht-translatierte Bereiche (Intron) unterbrochen. Zur Subklonierung des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in den Expressionsvektor pEGFPN3 (Abb. 8) wurde mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion) die vollständige codierende Sequenz CDS (Nukleotidposition 620 – 1741; [32]) aus dem cDNA-Klon amplifiziert. Dazu wurden Primeroligonukleotide eingesetzt, die in ihrer Sequenz komplementär zur entsprechenden Nukleotidsequenzen am Beginn („sense primer“: 5'- TG GAA TTC ATG ACG GAG GTT CCG TGG TCG-3') bzw. am Ende („anti -sense primer“: 5'-AC GAA TTC TCA CAA GGT GGT GTC GCC ATT -3') der CDS für den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor sind, d.h. beginnend mit dem Startcodon ATG bzw dem Stopcodon TGA. Um die Klonierung zu vereinfachen wurden die Primer jeweils am 5'-Ende mit einer Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoRI (unterstrichen) versehen. Das entstandene Konstrukt wird im Weiteren als „rP2Y<sub>1</sub>-wt“ bezeichnet.

Um ein klonierbares PCR-Produkt für die Erzeugung des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Vektorkonstrukts zu erhalten, wurde das Stopcodon des wildtypischen rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors durch den Einsatz eines modifizierten Primeroligonukleotids in ein Codontriplett für Alanin mutiert. (P2Y<sub>1</sub>-eGFP reversed primer: 5'-TA GGA TCC TGC CAA GGT GGT GTC GCC ATT -3'). Die zusätzlich eingeführte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI (unterstrichen) ermöglichte die gerichtete Subklonierung dieses PCR-Produkts in den pEGFPN3 Vektor. Nach Restriktionsenzymbehandlung weist das PCR-Produkt unterschiedliche überhängende Enden (am 5'-Ende eine EcoRI -Schnittstelle, am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle) auf, über die es gerichtet, d.h. in „sense“-Orientierung, in den vorbereiteten pEGFPN3-Vektor (ebenfalls EcoRI / BamHI behandelt) eingefügt werden konnte. Das entstandene Konstrukt wird im Weiteren als „rP2Y<sub>1</sub>-eGFP“ bezeichnet.

Nach der Identifikation rekombinanter Bakterienklone, die durch die Transformation mit den Ligationsprodukten (pEGFPN Plasmid-DNA und PCR-Produkt für rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw.

rP2Y<sub>1</sub>-eGFP) erzeugt wurden, wurde die „sense“-Orientierung der enthaltenen Konstrukte durch Restriktionsanalyse (XhoI/BspMII) überprüft und die Sequenzidentität mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.



**Abbildung 8: Eigenschaften und Aufbau der rP2Y<sub>1</sub>-pEGFPN Expressionskonstrukte**

Das PCR-Produkt für die komplette CDS des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors wurde in die EcoRI (rP2Y<sub>1</sub>-wt) bzw. in die EcoRI/BamHI (rP2Y<sub>1</sub>-eGFP) Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsregion (MCS) des entsprechend vorbereiteten pEGFPN-Vektors eingefügt. Das rP2Y<sub>1</sub>-wt Konstrukt besitzt sein originäres Stopcodon und führt zu Expression des rP2Y<sub>1</sub>-Wildtyprezeptors. Beim rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Konstrukt wurde das Stopcodon TGA durch gerichtete Mutagenese in GCT umgewandelt, damit das GFP-Fusionsprodukt entstehen konnte. Das pEGFPN-Plasmid besitzt neben der MCS eine Region die Neomycin- bzw. Kanamycinresistenz (Neo/ Kan) vermittelt und Replikationsursprungsorte eukaryontischer (SV40 ori) und prokaryontischer Art (pUC ori) beinhaltet. Die heterologe Expression wird durch den SV40-Promotor angetrieben. Die entstehenden Transkripte werden durch einen SV40 polyA-Bereich mit einen polyA-Tail versehen. Die relative Lage der gencodierenden Regionen (rP2Y<sub>1</sub>, EGFP, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP, Neo/ Kan) zu ihren Promotoren sind durch Pfeile angegeben. Die „sense-Orientierung“ der rP2Y<sub>1</sub>-Sequenz im Vektor wurde vor der Sequenzierung durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen XhoI/BspMII überprüft.

### 3.2 Nukleotidsequenz des cDNA-Klons für den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor aus dem Hirn der Ratte

	1					50
p2y1ges	ATGACGGAGG	TTCCGTGGTC	GGCTGTCCCC	AACGGGACAG	ATGCTGCCTT	
p2y1gfp	ATGACGGAGG	TTCCGTGGTC	GGCTGTCCCC	AACGGGACAG	ATGCTGCCTT	
rnu22830	ATGACCGAGG	TGCCTTGGTC	GGCTGTCCCC	AACGGGACAG	ATGCTGCCTT	
	51					100
p2y1ges	CCTGGCTGGC	CTGGGCTCCC	TTTGGGGAAA	CAGTACAATC	GCCTCGACTG	
p2y1gfp	CCTGGCTGGC	CTGGGCTCCC	TTTGGGGAAA	CAGTACAATC	GCCTCGACTG	
rnu22830	CCTGGCTGGC	CTGGGCTCCC	TTTGGGGAAA	CAGTACAATC	GCCTCGACTG	

## Ergebnisse: Vektorkonstrukte

	101				150
p2y1ges	CAGCAGTTTC	CTCTTCATTC	CGATGTGCC	TGATCAAGAC	CGGCTTCCAG
p2y1gfp	CAGCAGTTTC	CTCTTCATTC	CGATGTGCC	TGATCAAGAC	CGGCTTCCAG
rnu22830	CAGCAGTTTC	CTCTTCATTC	CGATGTGCC	TGATCAAGAC	CGGCTTCCAG
	151				200
p2y1ges	TTCTACTACC	TGCCTGCGGT	CTACATCTTA	GTGTTTCA	TAGGCTTCCT
p2y1gfp	TTCTACTACC	TGCCTGCGGT	CTACATCTTA	GTGTTTCA	TAGGCTTCCT
rnu22830	TTCTACTACC	TGCCTGCGGT	CTACATCTTA	GTGTTTCA	TAGGCTTCCT
	201				250
p2y1ges	TGGCAACAGC	GTGGCAATCT	GGATGTTTGT	TTTCCACATG	AAGCCTTGA
p2y1gfp	TGGCAACAGC	GTGGCAATCT	GGATGTTTGT	TTTCCACATG	AAGCCTTGA
rnu22830	TGGCAACAGC	GTGGCAATCT	GGATGTTTGT	TTTCCACATG	AAGCCTTGA
	251				300
p2y1ges	GCGGCATCTC	GGTGTACATG	TTCAATTTGG	CTCTGGCCGA	CTTTTTGTAT
p2y1gfp	GCGGCATCTC	GGTGTACATG	TTCAATTTGG	CTCTGGCCGA	CTTTTTGTAT
rnu22830	GCGGCATCTC	GGTGTACATG	TTCAATTTGG	CTCTGGCCGA	CTTTTTGTAT
	301				350
p2y1ges	GTGCTCACCC	TACCAGCTCT	CATCTTCTAC	TACTTCAACA	AGACTGACTG
p2y1gfp	GTGCTCACCC	TACCAGCTCT	CATCTTCTAC	TACTTCAACA	AGACTGACTG
rnu22830	GTGCTCACCC	TACCAGCTCT	CATCTTCTAC	TACTTCAACA	AGACTGACTG
	351				400
p2y1ges	GATCTTCGGG	GATGTTATGT	GCAAGCTGCA	GAGGTTTCATC	TTCCATGTAA
p2y1gfp	GATCTTCGGG	GATGTTATGT	GCAAGCTGCA	GAGGTTTCATC	TTCCATGTAA
rnu22830	GATCTTCGGG	GATGTTATGT	GCAAGCTGCA	GAGGTTTCATC	TTCCATGTAA
	401				450
p2y1ges	ACCTCTATGG	CAGCATCTTG	TTCCTCACCT	GCATCAGTGC	ACACAGGTGC
p2y1gfp	ACCTCTATGG	CAGCATCTTG	TTCCTCACCT	GCATCAGTGC	ACACAGGTGC
rnu22830	ACCTCTATGG	CAGCATCTTG	TTCCTCACCT	GCATCAGTGC	ACACAGGTGC
	451				500
p2y1ges	AGTGGCGTGG	TGTACCCTCT	CAAGTCTCTG	GGCAGGCTCA	AGAAAAAGAA
p2y1gfp	AGTGGCGTGG	TGTACCCTCT	CAAGTCTCTG	GGCAGGCTCA	AGAAGAAGAA
rnu22830	AGTGGCGTGG	TGTACCCTCT	CAAGTCTCTG	GGCAGGCTCA	AGAAGAAGAA
	501				550
p2y1ges	TGCCATTTAT	GTCAGTGTGC	TGGTATGGCT	CATTGTGGTG	GTGGCCATCT
p2y1gfp	TGCCATTTAT	GTCAGTGTGC	TGGTATGGCT	CATTGTGGTG	GTGGCCATCT
rnu22830	TGCCATTTAT	GTCAGTGTGC	TGGTATGGCT	CATTGTGGTG	GTGGCCATCT
	551				600
p2y1ges	CCCCATTCT	CTTCTACTCT	GGCACTGGGA	TTCGGAAAAA	CAAACTGTC
p2y1gfp	CCCCATTCT	CTTCTACTCT	GGCACTGGGA	TTCGGAAAAA	CAAACTGTC
rnu22830	CCCCATTCT	CTTCTACTCT	GGCACTGGGA	TTCGGAAAAA	CAAACTGTC
	601				650
p2y1ges	ACCTGCTACG	ACTCCACGTC	AGATGAGTAC	CTGCGAAGTT	ATTTTCATCTA
p2y1gfp	ACCTGCTACG	ACTCCACGTC	AGATGAGTAC	CTGCGAAGTT	ATTTTCATCTA
rnu22830	ACCTGCTACG	ACTCCACGTC	AGATGAGTAC	CTGCGAAGTT	ATTTTCATCTA

## Ergebnisse: Vektorkonstrukte

	651				700
p2y1ges	CAGTATGTGC	ACGACTGTGG	CCATGTTCTG	CATCCCCCTG	GTGCTGATCT
p2y1gfp	CAGTATGTGC	ACGACTGTGG	CCATGTTCTG	CATCCCCCTG	GTGCTGATCT
rnu22830	CAGTATGTGC	ACGACTGTGG	CCATGTTCTG	CATCCCCCTG	GTGCTGATCT
	701				750
p2y1ges	TGGGCTGTTA	TGGATTAATT	GTTAGAGCTT	TGATCTACAA	AGATCTGGAC
p2y1gfp	TGGGCTGTTA	TGGATTAATT	GTTAGAGCTT	TGATCTACAA	AGATCTGGAC
rnu22830	TGGGCTGTTA	TGGATTAATT	GTTAGAGCTT	TGATCTACAA	AGATCTGGAC
	751				800
p2y1ges	AACTCTCCTC	TCCGGAGGAA	ATCCATTTAC	CTGGTGATAA	TTGTCTGAC
p2y1gfp	AACTCTCCTC	TCCGGAGGAA	ATCCATTTAC	CTGGTGATAA	TTGTCTGAC
rnu22830	AACTCTCCTC	TCCGGAGGAA	ATCCATTTAC	CTGGTGATAA	TTGTCTGAC
	801				850
p2y1ges	GGTGTTTGCT	GTGTCTTACA	TCCCTTTCCA	TGTGATGAAA	ACGATGAATT
p2y1gfp	GGTGTTTGCT	GTGTCTTACA	TCCCTTTCCA	TGTGATGAAA	ACGATGAATT
rnu22830	GGTGTTTGCT	GTGTCTTACA	TCCCTTTCCA	TGTGATGAAA	ACGATGAATT
	851				900
p2y1ges	TGAGGGCACG	GCTGGATTTC	CAGACCCCAG	AAATGTGTGA	TTTCAACGAC
p2y1gfp	TGAGGGCACG	GCTGGATTTC	CAGACCCCAG	AAATGTGTGA	TTTCAACGAC
rnu22830	TGAGGGCACG	GCTGGATTTC	CAGACCCCAG	AAATGTGTGA	TTTCAACGAC
	901				950
p2y1ges	AGGGTTTATG	CCACCTATCA	GGTAACAAGA	GGTCTAGCAA	GTCTCAACAG
p2y1gfp	AGGGTTTATG	CCACCTATCA	GGTAACAAGA	GGTCTAGCAA	GTCTCAACAG
rnu22830	AGGGTTTATG	CCACCTATCA	GGTAACAAGA	GGTCTAGCAA	GTCTCAACAG
	951				1000
p2y1ges	CTGTGTGGAC	CCCATTCTTT	ATTTCTTGGC	TGGAGATACA	TTCAGAAGGA
p2y1gfp	CTGTGTGGAC	CCCATTCTTT	ATTTCTTGGC	TGGAGATACA	TTCAGAAGGA
rnu22830	CTGTGTGGAC	CCCATTCTTT	ATTTCTTGGC	TGGAGATACA	TTCAGAAGGA
	1001				1050
p2y1ges	GACTGTCCCG	AGCCACCAGG	AAAGCTTCCA	GGAGGAGTGA	GGCCAATTTA
p2y1gfp	GACTGTCCCG	AGCCACCAGG	AAAGCTTCCA	GGAGGAGTGA	GGCCAATTTA
rnu22830	GACTGTCCCG	AGCCACCAGG	AAAGCTTCCA	GGAGGAGTGA	GGCCAATTTA
	1051				1100
p2y1ges	CAATCCAAGA	GTGAAGAAAT	GACTCTCAAC	ATTTTGTCTG	AGTTCAAGCA
p2y1gfp	CAATCCAAGA	GTGAAGAAAT	GACTCTCAAC	ATTTTGTCTG	AGTTCAAGCA
rnu22830	CAATCCAAGA	GTGAAGAAAT	GACTCTCAAC	ATTTTGTCTG	AGTTCAAGCA
	1101		1128		
p2y1ges	GAATGGCGAC	ACCACCTTG	TGA~~~	→STOP~~~	
p2y1gfp	GAATGGCGAC	ACCACCTTG	GCT~~~	→eGFP~~~	
rnu22830	GAACGGAGAC	ACAAGTTTG	TGA~~~	→STOP~~~	

**Abbildung 9: Homologievergleich der rekombinanten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorsequenzen aus der Ratte**  
 Darstellung (alignment) der Nukleotidsequenz des cDNA-Klons des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aus Rattenhirn (p2y1ges) und des C-terminal modifizierten rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Konstrukts zur heterologen Expression des GFP-Fusionsproteins (p2y1gfp), im Vergleich zur veröffentlichten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorsequenz aus Ratte (rnu22830; von Tokuyama et al. 1995 [32]). Unterschiede in den Nukleotidsequenzen und die Modifikationen im 3'-Endbereich der Nukleotidsequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben. Ebenfalls in



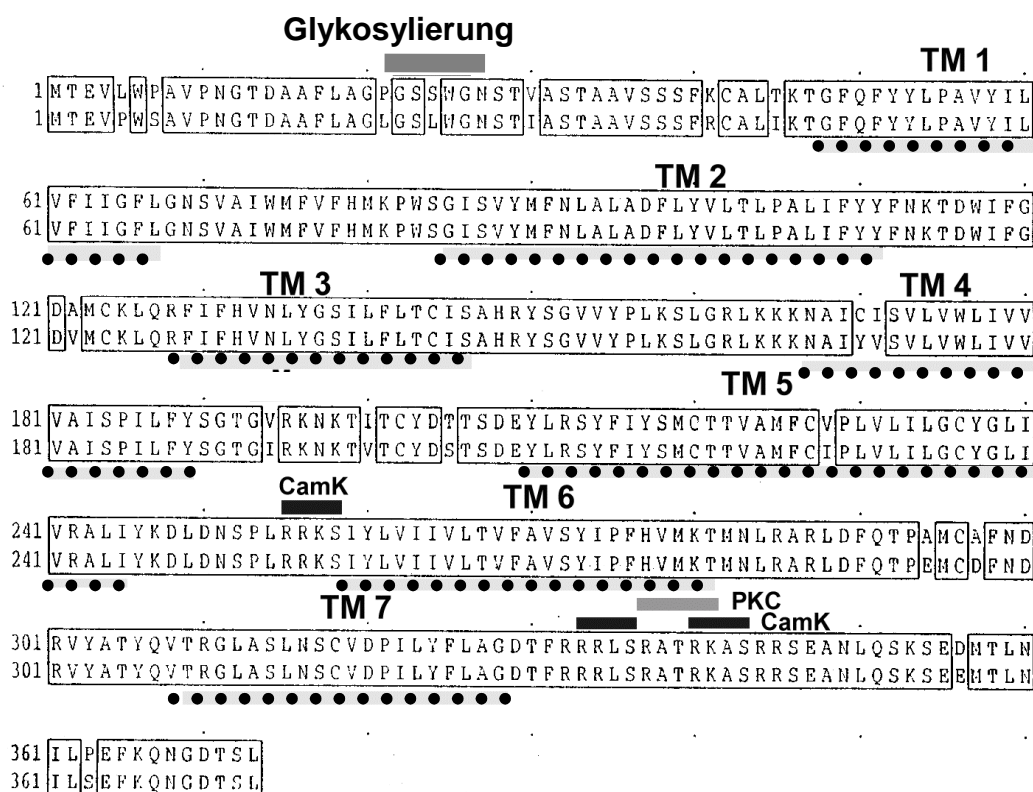
Fettdruck sind die TGA/STOP-Codons bzw. die eingeführte Mutation (TGA→GCT/Alanin), die zum GFP-Fusionsprotein führt (→ eGFP).

Zur Identifikation und Charakterisierung des cDNA-Klons des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aus Rattenhirn wurden nicht-radioaktive Sequenzierreaktionen durchgeführt. Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in Abbildung 9 dargestellt und mit „p2y1ges“ bezeichnet. Der Vergleich dieser Nukleotidsequenz mit der von Tokuyama et al. 1995 [32] veröffentlichten Sequenz (Abbildung 9 mit „rnu22830“ bezeichnet) zeigt die Identität beider Sequenzen. Die Nukleotidsequenz des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Konstrukts wurde ebenfalls überprüft, die erhaltene Sequenz ist mit „p2y1gfp“ bezeichnet. Um ein Rezeptorkonstrukt zu erzeugen das C-terminal mit Green Fluorescent Protein (GFP) fusioniert ist (p2y1gfp), wurde mittels PCR eine Mutation in die Nukleotidsequenz des rP2Y<sub>1</sub>-cDNA Klons (p2y1ges) eingeführt. Durch die Verwendung eines entsprechend modifizierten Primeroligonukleotids wurde das Nukleotidtriplett TGA (Original-Stopcodon) in GCT (kodiert für Alanin) verändert.

Die PCR-Fragmente, die zur Subklonierung des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors bzw. zur Erzeugung des GFP-Expressionskonstrukts verwendet wurden, wurden mit Hilfe des Primerpaars „TM3f/TM7r“ überprüft, das an einigen Stellen in seiner Sequenz degeneriert ist (Abbildung 4). Die Sequenz dieses Primerpaares wurde so ausgewählt, daß auch homologe P2Y<sub>1</sub>-Sequenzen aus anderen Vertebraten bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorsequenzen in der PCR amplifiziert werden können. Die Unterschiede zwischen Sequenzen für p2yges bzw. p2y1gfp und der veröffentlichten P2Y<sub>1</sub>-Sequenz (rnu22830) im N- bzw.C-terminalen Bereich, ergeben sich auf Grund der abgeleiteten Sequenz der eingesetzten Primeroligonukleotide. Aus den Nukleotidsequenzen lassen sich für den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor eine Peptidsequenz von 374 Aminosäuren und für das GFP-Fusionskonstrukt von 631 Aminosäuren Länge ableiten. Das entspricht einer berechneten molaren Masse von ca. 42 kDa. bzw. 69 kDa.

### 3.3 Sequenzmotive in der Aminosäuresequenz der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren

Die schnell anwachsende Verfügbarkeit von Sequenzinformation für einzelne Gene bzw. ganze Genome erlaubt die systematische Analyse dieser Sequenzen, um Sequenzmotifen spezielle Funktionen zuzuordnen: z.B. Phosphorylierungsstellen, Orte der Protein-Protein-Interaktion oder mögliche Bindungsstellen in Proteinen für bestimmte Pharmaka. Für die Sequenzanalysen werden Computer-unterstützte Rechenmodelle eingesetzt, die zur Identifikation von Sequenzhomologien, funktionell bedeutsamen Sequenzmotifen und Proteinprofilen dienen. In Abbildung 10 ist das Ergebnis einer solchen Sequenzanalyse dargestellt. Die typische strukturelle Eigenschaft von GPCR ist die Existenz von 7 Transmembrandomänen (TM1-TM7), deren vermutliche Lage für den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor der über der Aminosäuresequenz in Abbildung 10 angegeben ist. Daneben sind die identifizierten Sequenzabschnitte gekennzeichnet, die potentiell glykosyliert werden bzw. mögliche Erkennungsstellen von Proteinkinasen (CamK oder PKC) darstellen.



**Abbildung 10: Analyse der Aminosäuresequenz der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aus Ratte und Mensch**

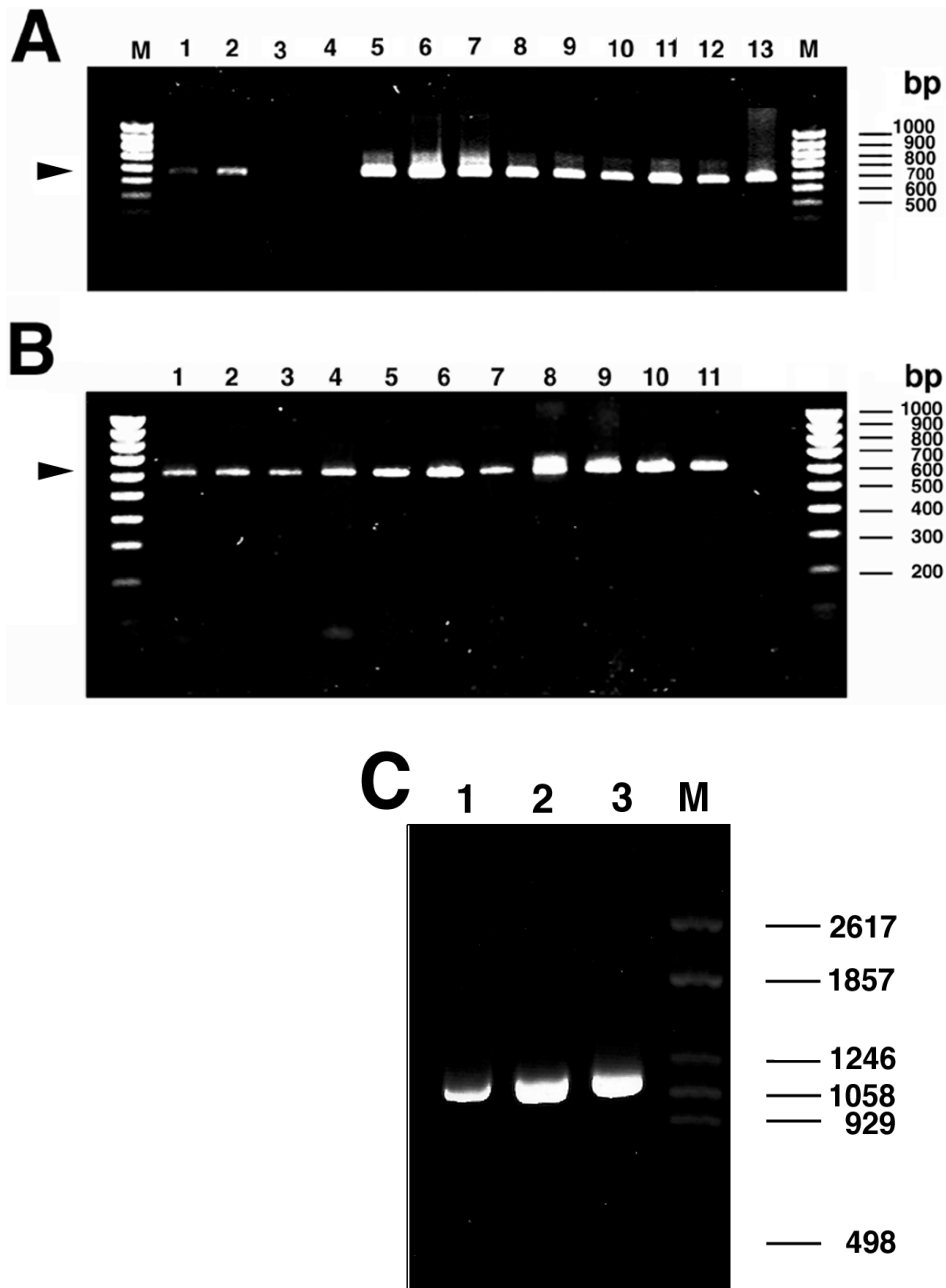
Zu Ermittlung möglicher struktureller Eigenschaften der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren wurden die Aminosäuresequenzen einer Analyse unterzogen. In der Abbildung sind neben der vermutlichen Lage der 7 Transmembrandomänen – durch Unterstreichen (•••••) und die Bezeichnung TM1-TM7 über der Sequenz – auch die Positionen einiger Sequenzmotife gekennzeichnet, die potentiell glykosyliert

werden können. Mögliche Erkennungsstellen von Proteinkinasen (CamK oder PKC) sind durch Beschriftung und Linien markiert.

### 3.4 RT-PCR: Gewebsverteilung der rP2Y<sub>1</sub> Rezeptoren in der Ratte

Die gewebespezifische Verteilung der metabotropen P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren wurde untersucht. Dazu wurden in der Gesamt-RNA, die aus unterschiedlichen Geweben der Ratte isoliert wurde, die Transkripte für P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren mittels RT-PCR nachgewiesen. Gesamt-RNA wurde zunächst mit Hilfe Reverser-Transkriptase (RT) und oligo d(T)-Primeroligonukleotid in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize in PCR-Experimenten verwendet wurde. Genspezifische Primeroligonukleotide wurden so ausgewählt, daß die PCR zu Amplifikation von Produkten führte, die Teilbereichen von P2Y<sub>1</sub> bzw P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren entsprechen. Die verwendeten Primeroligonukleotiden (TM3f: 5'- GAA TTC YTS TTC CTC ACC TGC ATM AG -3', TM7r: 5- GAA TTC AYR GGG TCA ACG CAR CTG TT-3'; Abbildung 4) umschließen den Genabschnitt der P2Y-Rezeptoren, der zwischen den hochkonservierten Transmembranregionen (TM 3 und TM 7) liegt.

P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren lassen sich in vielen nicht-neuronalen Geweben (Abbildung 11), in neuronalem Gewebe (Abbildung 11A) und ebenfalls in der astrozytären C6-4-2 Gliomzelllinie (Abbildung 11C) [127,116] nachweisen. Die PCR-Produkte in Abbildung 11A weisen eine Größe von ca. 600 bp auf und repräsentieren die P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren, die in den verschiedenen Geweben exprimiert werden. Die Intensität der einzelnen DNA-Banden belegt die unterschiedlich hohe Expressionsrate der P2Y-Rezeptoren in den verschiedenen Geweben. Obwohl in alle Spuren der gleiche Anteil des jeweiligen PCR-Ansatzes aufgetragen wurde, sind einige Gelspuren (z.B. 5,6 und 7 in Abbildung 11 A) mit DNA überladen, d.h. in der RT-PCR wurde aus diesen RNA-Proben soviel P2Y-Rezeptorspezifische DNA amplifiziert, daß die Trennkapazität des Gels überschritten wurde und scheinbar Doppelbanden zu sehen sind. Zwar weisen die PCR-Produkte des P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren, die durch das TM3f / TM7r Primerpaar (Abbildung 4) amplifiziert werden unterschiedliche Größen auf (Abbildung 12), jedoch lassen sich diese geringen Unterschiede in diesem Gelsystem nicht darstellen. Aus Gesamt-RNA und genomischer DNA der C6-4-2 Gliomzelllinie, sowie aus Plasmid-DNA des rP2Y<sub>1</sub>-cDNA Klons konnten PCR-Produkte erzeugt werden (Abbildung 11C), die der kompletten CDS des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors entsprechen.



**Abbildung 11 : PCR Experimente zur gewebespezifischen Verteilung der P2Y<sub>1</sub> bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren**

A) Agarosegel-Analyse von RT-PCR Produkten zum Nachweis der Transkripte für P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in der RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte. Die durch ▶ markierten Banden besitzen eine Länge von ca. 600 bp. Aufgetragen wurden jeweils 7 µl der PCR-Produkte eines 50 µl Ansatzes. Die Spuren entsprechen in der Abfolge Cortex (1), Cerebellum (2), Rückenmark (3), „Resthirn“ (4) - entspricht Hirn ohne Cortex und Cerebellum-, Herz (5), Leber (6), Niere (7), Lunge (8), Testes der Ratte (9), cDNA aus C6-4-2 Zell-RNA (10), Primärkulturzellen einer Hirnpräparation in der Astrozyten (11) angereichert wurden, genomische DNA aus C6-4-2 Zellen (12) und rP2Y<sub>1</sub>-Plasmid (13), als Positivkontrolle.

B) PCR-Reaktionen die mit Primeroligonukleotiden durchgeführt wurden, die spezifisch für Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GAPDH) sind. Die Reaktion wurde mit den identischen cDNA-Präparationen wie in 11A durchgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte haben eine Länge von 650 bp (Lage ist durch ▶ markiert), Die Auftragsmenge und -abfolge entsprechen 11A.

C) Gelanalyse der PCR-Produkte (1136 bp), die mit dem Primerpaar „P2Y<sub>1</sub>gesamt“ aus cDNA C6-4-2 (Spur 1), genomischer DNA aus C6-4-2 (Spur 2) und der Positivkontrolle mit dem P2Y<sub>1</sub>-haltigen Plasmid-DNA (Spur 3) erhalten wurden. „M“ bezeichnet jeweils einen DNA-Längenstandard, die DNA-Fragmentgrößen sind in der Abbildung angegeben.

Die PCR-Produkte in Abbildung 11C weisen eine identische Größe von ca. 1.2 kb auf, woraus sich ableiten läßt, daß der in dieser Arbeit untersuchte rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor auch in astrozytären Zellen des Rattenhirns exprimiert wird.

### 3.5 Erzeugung stabil transfizierter Zelllinien

Hochaufgereinigte, sterile Plasmid-DNA der Expressionsvektorkonstrukte rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP wurde verwendet, um HEK293-Zellen mit einem Lipofektionsreagenz zu transfizieren. Die entsprechende Plasmid-DNA wurde linearisiert, mit Lipofektionsreagenz vermischt und die HEK293- Zellen mit dieser Mixtur behandelt. Durch Resistenzselektion mit dem Antibiotikum Geneticin (G418) wurden Einzelzellklone isoliert, deren Expression der rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren mit Hilfe von Fura-2 Imaging-Experimenten und oder der GFP-Fluoreszenz untersucht wurde, um stabil- exprimierende Zellklone zu identifizieren. Die Ergebnisse dieses Selektionsprozesses sind in Tabelle 6 dargestellt.

#### Tabelle 6: Ausbeute der Selektion auf stabil transfizierten Zellklonen

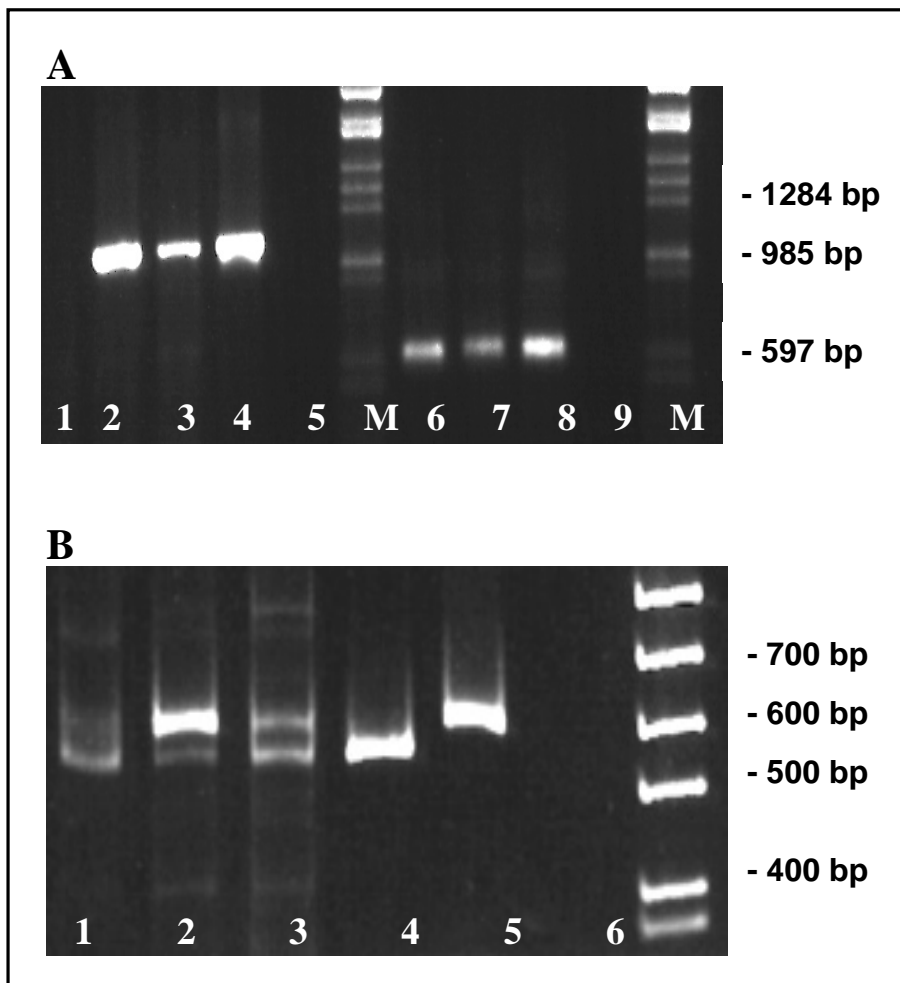
Angegeben ist die Anzahl der isolierten, stabil transformierten Zellklone für die beiden HEK-Zelllinien nach der 2. Selektionsrunde (s. Seite 44). Aus den identifizierten, rekombinanten Zellklonen wurde jeweils ein Klon zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Der Stern (\*) markiert, die durch Fluoreszenzmikroskopie bei 488 nm identifizierte Klone.

Zelllinie	isolierte Zellklone	davon in Ca <sup>2+</sup> -Experimenten getestet
HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	25	7
HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	12*	2

### 3.6 PCR Analyse der Gesamt-RNA aus stabil-transfizierter HEK293 Zelllinien

Die spezifische, heterologe Expression der P2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren in den stabil transfizierten HEK293-Zelllinien wurde mittels RT-PCR überprüft. Mit den rP2Y<sub>1</sub>-spezifischen Primern („P2Yges“; Abbildung 12A) konnte aus Gesamt-RNA der rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen ein 1.1 kb PCR-Produkt amplifiziert werden, das der vollständigen CDS des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors entspricht. Mit RNA der nicht-transfizierten HEK 293 Zellen konnte dieses PCR-Produkt nicht erhalten werden (Abbildung 12A). Dieses

Ergebnis belegt die spezifische Expression des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in den transfizierten HEK293 Zellen.



**Abbildung 12: Untersuchung der rP2Y<sub>1</sub>- und hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptorexpression in HEK293 Zellen mittels RT-PCR**

Zur cDNA-Synthese wurde die Gesamt-RNA aus untransfizierten HEK293 Zellen und stabil transfizierten HEK293-Zelllinien eingesetzt, d.h. Zellen die mit dem unveränderten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor aus Ratte (rP2Y<sub>1</sub>-wt) bzw. dem GFP-Konstrukt dieses Rezeptors (rP2Y<sub>1</sub>-eGFP), transfiziert wurden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Experimenten erhalten.

**A)** Nachweis der erfolgreichen Transfektion der HEK293 -Zelllinien mit den Vektorkonstrukten rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP. Das Primerpaar führt spezifisch zur Amplifikation der kompletten codierenden Sequenz (ca. 1.1 kb) des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aus der Ratte, nicht jedoch des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors beim Menschen. Das Gel zeigt die Auftrennung der RT-PCR Produkte von HEK293 Zellen (Spur 1), HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt Zellen (Spur 2), HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen (Spur 3) und eine Positivkontrolle (Spur 4) die dem PCR-Produkt entspricht, das mit rP2Y<sub>1</sub>-Vektorplasmid erzeugt wurde. In entsprechender Abfolge sind in die Spuren 6-8 die RT-PCR Produkte aufgetragen, die mit einem GAPDH-spezifischen Primerpaar erzeugt wurden, um die Qualität und Menge der synthetisierten cDNA zu überprüfen. Die Spuren 5 und 9 entsprechen Kontaminationskontrollen. Als DNA-Größenstandard wurde EcoRI/HindIII behandelte  $\lambda$ -Phagen DNA aufgetragen, die Fragmentgrößen sind angegeben.

**B)** Mit dem Oligonukleotidprimerpaar TM3f/ TM7r (s.a. Abb. 4A) wurden P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptorsequenzen aus Ratte und Mensch amplifiziert. Die Analyse wurde als native PAGE durchgeführt. Aufgetragen sind RT-PCR-Produkte aus HEK293 Zellen (Spur 1), aus rP2Y<sub>1</sub>-wt Zellen (Spur 2) bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen (Spur 3) und PCR-Produkte, die mit Plasmid-DNA erzeugt wurden. Die eingesetzten Plasmide codieren den hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor (Spur 4) oder den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (Spur 5). Die Konta-

minationskontrolle ist in Spur 6 aufgetragen, der DNA Längenstandard ist mit M bezeichnet (die Position der Banden ist verzerrt).

Um die Spezifität des Primerpaars „P2Y<sub>1</sub>ges“ zu überprüfen und die Expression der endogenen hP2Y<sub>1</sub>- und hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in den HEK293 Zelllinien zu untersuchen, wurden Primeroligonukleotide eingesetzt (TM3f/TM7r; Abb.4), die spezifisch für hochkonservierte Bereiche (TMR 3 und TMR 7) der P2Y-Rezeptoren sind. Mit diesem Primerpaar konnten aus Gesamt-RNA der stabil-transformierten HEK Zelllinien zwei PCR-Produkte ähnlicher Größe (ca. 500 - 600 bp; Abbildung 12B, Spuren 2 und 3) amplifiziert werden. Zur Identifikation dieser DNA-Banden wurden PCR-Experimente mit Vektor-DNA durchgeführt (Abbildung 12B), die entweder die cDNA für den hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor (Spur 4) oder für den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor (Spur 5) enthalten. Auf diesem Weg konnte die größere Bande (560 bp) dem rP2Y<sub>1</sub>-, die kleinere Bande (540 bp) dem hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor zugeordnet werden.

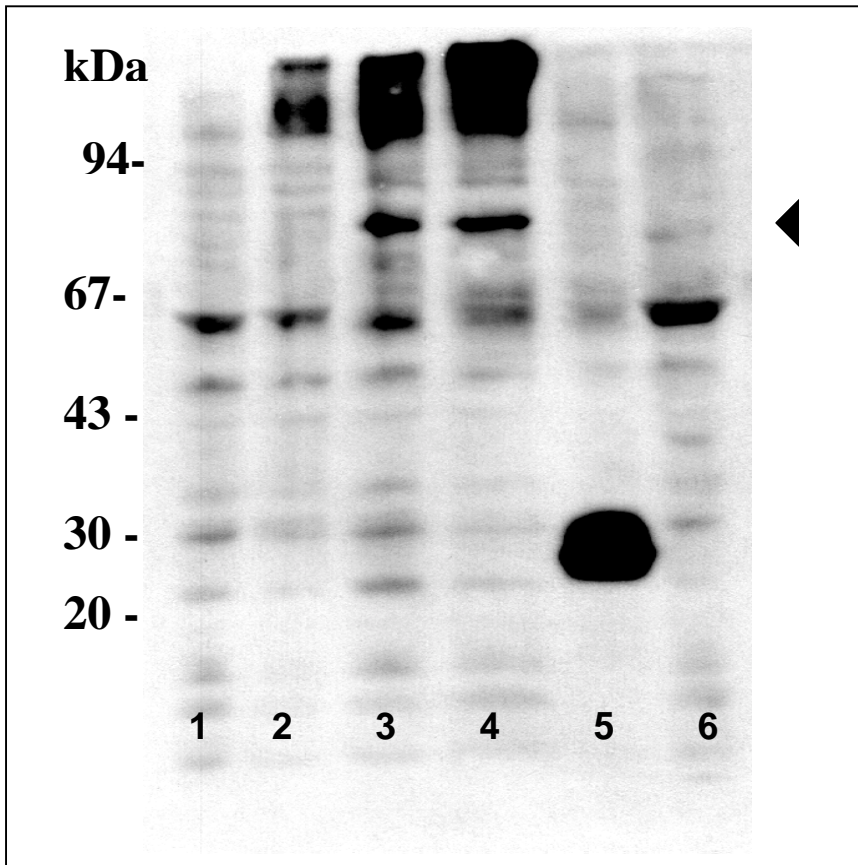
Die größere, dem rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor entsprechende Bande (Abbildung 12B) konnte in einer cDNA-Präparation der rP2Y<sub>1</sub>-wt exprimierenden Zellen (Spur 2) mit starker Intensität nachgewiesen werden. Aus cDNA der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP exprimierenden Zellen (Spur 3) wurde diese Bande mit schwächerer Intensität ebenfalls amplifiziert. Die unterschiedliche Intensität dieser DNA-Banden in Spur 2 bzw. Spur 3 spricht für unterschiedlich hohe Transkriptmengen für den rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. den P2Y<sub>1</sub>-eGFP in den stabil-transfizierten Zellen. Transkriptgröße und Integrationsort der Konstrukte im Genom sind Faktoren die bei der heterologen Expression zur unterschiedlichen Regulation der Gentranskription und zur unterschiedlich hohen Transkriptionseffizienz führen können. Im Allgemeinen wird eine hohe Transkriptionsrate für heterolog exprimierte Proteine nur durch die Integration mehrerer Plasmidkonstrukte im Genom erreicht, d.h. je größer das zu insertierende DNA-Fragment ist, desto weniger wahrscheinlich ist dieses Ereignis. Ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedliche Bandenintensität liegt in der RT-PCR-Methodik selbst, die vorhandene Unterschiede in der Transkriptmenge zusätzlich verstärkt.

Bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen (Spur 1; Abbildung 12B) lag die Intensität der dem hP2Y<sub>1</sub> entsprechenden Bande an der Detektionsgrenze, was auf eine sehr schwache Expression des endogenen hP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors hindeutet. Die kleinere, dem endogenen P2Y<sub>2</sub> Rezeptor entsprechende Bande war in den cDNA-Präparationen aller Zelllinien (Spur 1-3; Abbildung 12B) mit vergleichbarer Intensität zu erzeugen und belegt die Expression des endogenen hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptors.

### 3.7 Immunodetektion des P2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors in HEK293 Zellen

#### 3.7.1 Lokalisation des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Fusionsproteins

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen ließen eine deutliche GFP-Fluoreszenz, die an der Plasmamembran lokalisiert war erkennen. Zur Absicherung dieses Befundes wurde ein polyklonales  $\alpha$ -GFP Antiserum eingesetzt, um in subzellulären Proteinfractionen die Verteilung des Fusionsproteins zu untersuchen.



**Abbildung 13: Immunodetektion des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptorkonstrukts in subzellulären Fraktionen (Western Blotting)**

Proteine subzellulärer Fraktionen von HEK293 Zellen (Spur 1), HEK P2Y<sub>1</sub>-eGFP-Zellen (Spuren 2-4 und 6) und HEK-pEGFPN (Spur 5), wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die GFP-Fusionsproteine bzw. GFP alleine wurden mit Hilfe eines polyklonalen  $\alpha$ -GFP Antiserums detektiert. In Spur 1 und 2 sind Zellhomogenate (40  $\mu$ g Protein), in Spur 3 aufgereinigte Plasmamembranen (30  $\mu$ g Protein), in Spur 4 mit Igepal solubilisierte Plasmamembranproteine (30  $\mu$ g) und in Spur 5 bzw. 6 zytosolische Proteine von HEK293-pEGFPN2 bzw. HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP (15 bzw. 30  $\mu$ g Protein) transfizierten Zellen aufgetragen. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei unabhängigen Experimenten erhalten.

Eine Bande mit einer scheinbaren molaren Masse von 82 kDa (Abbildung 13) wurde als einziges Protein der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Proteinfraction spezifisch durch das  $\alpha$ -GFP Antiserum erkannt. Diese Bande wurde in der Plasmamembranfraktion und dem detergentlöslichen



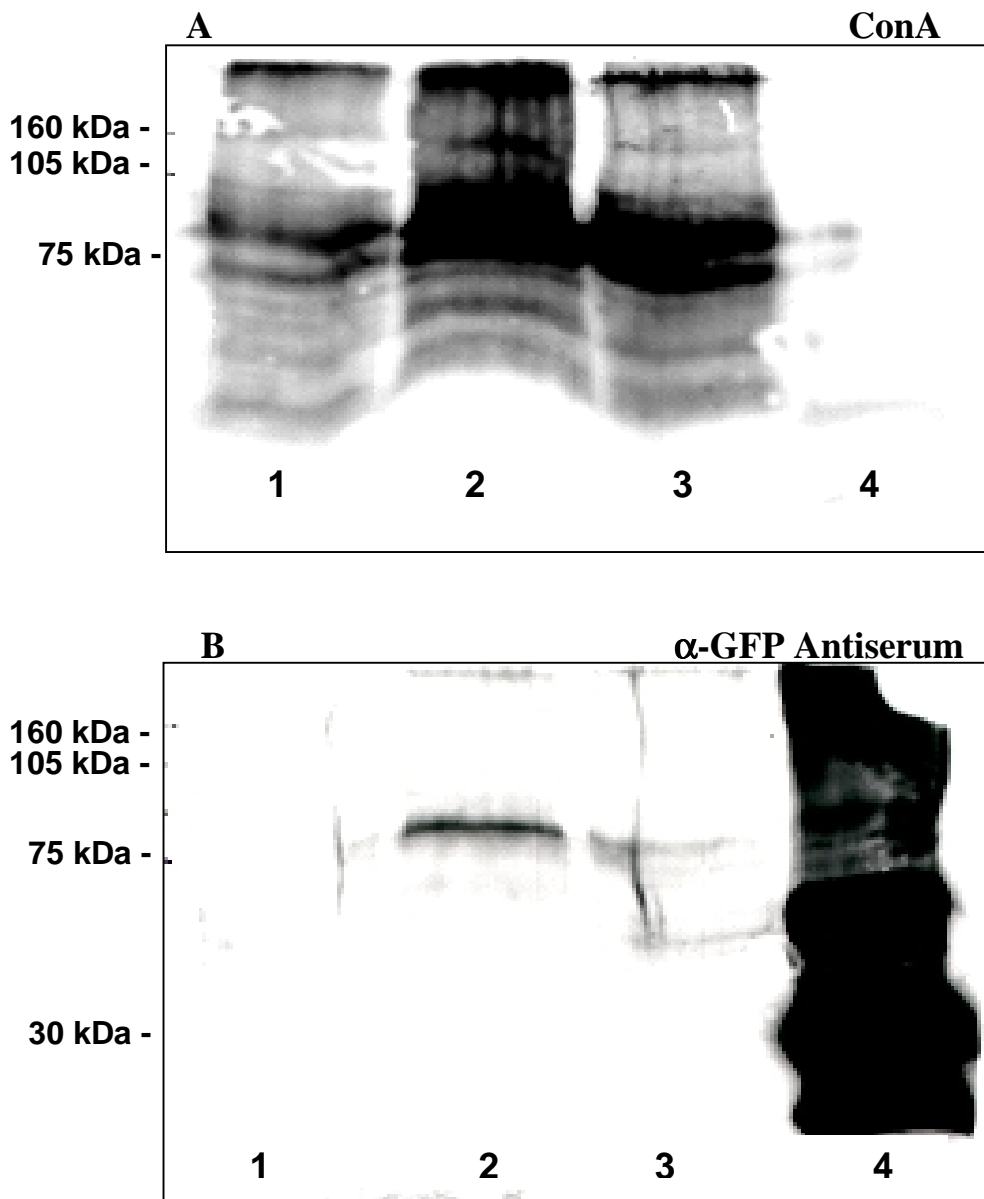
Proteinanteil der Plasmamembranfraktion detektiert. Ebenfalls – allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß – wurde diese Bande in ER-, Golgi- und mikrosomalen Fraktionen dieser Zellen durch das Antiserum detektiert. In der Fraktion der mitochondrialen Proteine und der Kernfraktionen war diese Bande jedoch nicht zu finden (in Abbildung 13 nicht dargestellt). Durch das  $\alpha$ -GFP-Antiserum wurde eine zusätzliche Proteinbande (scheinbare molare Masse ca. 64 kDa) in der Zytosol- bzw. der Plasmamembranfraktion der beiden transfizierten Zelllinien erkannt. Darüber hinaus wurden einige Banden mit einer scheinbaren molaren Masse von mehr als 100 kDa unspezifisch markiert. Die intensive Immunofärbung am oberen Rand des Proteingels könnte möglicherweise aggregiertes rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptorprotein darstellen (Spuren 1-3). Die Proteinbande bei 82 kDa ist sehr wahrscheinlich das posttranslational modifizierte (glykosylierte) GFP-Rezeptorfusionsprotein, denn aus der Sequenz des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Konstrukts wäre ein Protein von etwa 70 kDa Größe zu erwarten.

### **3.7.2 Untersuchung der glykosylierten Membranproteine stabil-transfizierter HEK293 rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen**

Häufig unterliegen Rezeptorproteine posttranslationalen Modifikation wie z.B. der Glykosylierung [128]. Auf Grund der Existenz potentieller Glykosylierungsstellen im N-terminalen Anteil der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptorsequenz wurde der Glykosylierungszustand des in HEK293 Zellen heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors untersucht. Dazu wurde Concanavalin A (Con A), ein pflanzliches Lektin, eingesetzt. Proteinfraktionen (PEF) von nicht-transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 14 A/B, Spur1) und HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen (Abbildung 14 A/B, Spur3) in denen Plasmamembranen angereichert waren, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit Hilfe eines Digoxigenin-ConcanavalinA Konjugats (ConA-Dig) [129] in einer ECL-Western-Blot Prozedur detektiert. Zusätzlich wurden HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Membranproteine solubilisiert (Triton X-100) und mittels ConA-Sepharose partiell aufgereinigt. Glykosylierte Proteine wurden mit 0.2 M Mannosid vom Sepharosematerial eluiert und durch Methanol/ HAC-Fällung ankonzentriert (Abbildung 14 A/B, Spur2).

Ein Vergleich der Proteinspuren, die durch Lektinmarkierung ConA (Abbildung 14 A) bzw. durch  $\alpha$ -GFP Antikörpermarkierung (Abbildung 14 B) detektiert wurden, zeigt eine deutliche Kolokalisation beider Anfärbungen für ein Protein mit einer scheinbaren molaren Masse von ca. 80-85 kDa (▲) in Spur 2 und ebenso (mit schwächerer Intensität) in Spur 3. Dieser Befund belegt die Glykosylierung des GFP-Rezeptorfusionsproteins (rP2Y<sub>1</sub>-eGFP),

das sich durch den Einsatz von ConA-Sepharose (Spur 2) aus Plasmamembranfraktionen (Spur 3) anreichern läßt.



**Abbildung 14: Lektinfärbung von Plasmamembranfraktionen der HEK 293 Zelllinien - untransfizierte HEK293 Zellen und HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen im Vergleich.**

Die ConA-Dig Färbung (A) und die Anfärbung mit polyklonalem  $\alpha$ -GFP Antiserum (B) von Proteinfraktionen (PEF) der HEK293 Zelllinien, in denen Plasmamembranen angereichert wurden. PEF der nicht-transfizierten HEK293 Zellen (Spur 1), ConA-gereinigte PEF der HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP (Spur 2), PEF der HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP (Spur 3), sowie ein SDS-Lysat eines eGFP exprimierenden E.coli-Klons (Spur 4) als Kontrolle. Das Experiment wurde mit identisch hergestellten Blots durchgeführt, pro Spur wurden 15 – 60  $\mu$ g Protein aufgetragen.

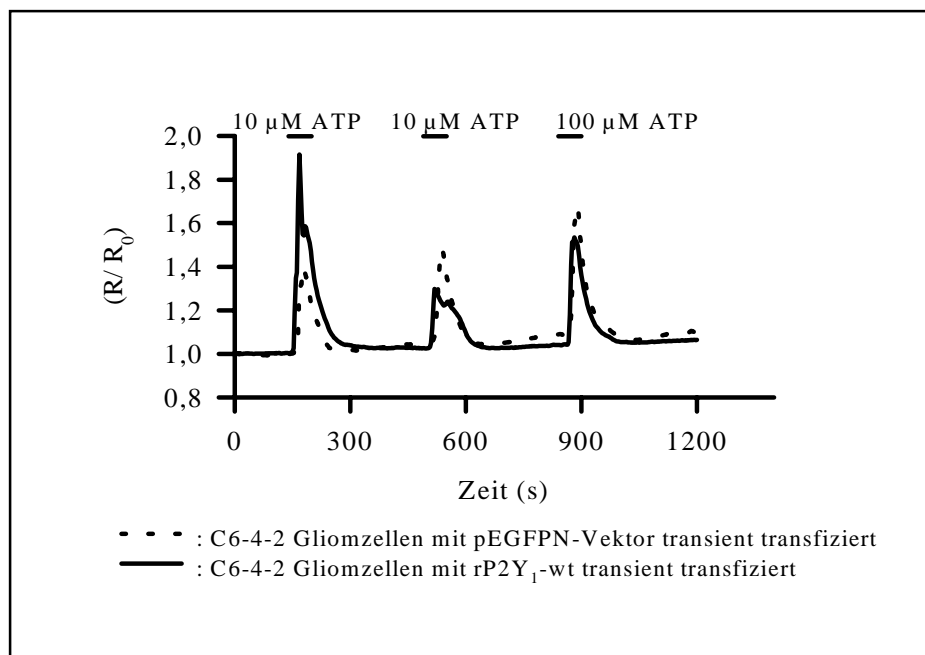
Wie erwartet werden viele glykosylierte Membranproteine (Abbildung 14 A) unterschiedlicher Größe in den Plasmamembranfraktionen (Spuren 1-3) intensiv durch ConA angefärbt, nicht jedoch die bakteriellen Proteine (Spur 4), was die Spezifität der ConA-Färbung belegt. In Abbildung 14 B lassen sich nur in den HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Proteinpräparationen (Spuren 2 und 3) und in der bakteriellen Positivkontrolle (Spur 4) Proteine durch das  $\alpha$ -GFP Antiserum detektieren. In Spur 4 ist erheblich zuviel Protein aufgetragen und die Solubilisierung der bakteriellen Proteine bzw. deren Auftrennung ist deshalb nicht vollständig. Die "GFP-Überladung" in Spur 4 beruht auf der sehr effizienten bakteriellen Überexpression des GFP-Proteins und der Tatsache, daß die Proteinmenge im Bakterien-solubilisat nur abgeschätzt werden konnte. Die Anfärbung mit dem  $\alpha$ -GFP Antiserum detektiert in Spur 4 eine Bande mit einer scheinbaren molaren Masse von ca. 30 kDa, was der erwarteten Größe des GFP-Proteins entspricht. Weitere Banden bei ca. 50-60 kDa bzw. über 100 kDa, stellen möglicherweise aggregiertes GFP-Protein dar.

### **3.8 Transiente Expression des rP2Y<sub>1</sub>-wt Konstrukts in C-6-4-2 Gliom- und HEK293 Zellen**

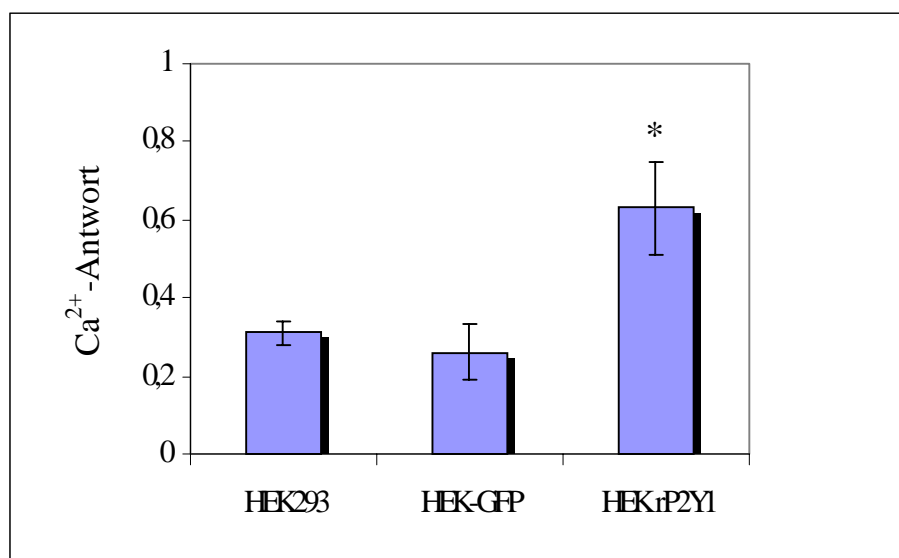
C6-4-2 Gliomzellen und HEK293 Zellen wurden mit dem rP2Y<sub>1</sub>-wt-Konstrukt bzw. mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFPN allein mittels Elektroporation transient transfiziert. Ziel dieser Transfektion war die Überprüfung der funktionellen Expression des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors mit Hilfe von Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Experimenten. Die Zellen wurden nach der Transfektion unterschiedlich lange kultiviert (2 - 4 Tage) bevor sie mit Fura-2/AM beladen und in die Ca<sup>2+</sup>-Messungen eingesetzt wurden. Wie Abbildung 15 zeigt induziert die kurzzeitige Zugabe von ATP in C6-Gliomzellen eine transiente Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Die durch 10  $\mu$ M ATP ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Antwort in rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen (durchgezogene Linie) war gegenüber der Antwort, die in pEGFPN-Vektor (nur GFP) transfizierten Zellen (gepunktete Linie) ausgelöst werden konnte, deutlich erhöht. Diese erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung wurde als Indiz für die erfolgreiche funktionelle Expression des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in den C6-4-2 Gliomzellen gewertet. In gleichartigen Experimenten wurden nicht-transfizierte HEK293 Zellen, mit pEGFPN-Vektor transient transfizierte HEK293 Zellen und transient mit rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten HEK293 Zellen untersucht.

Die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort, die durch 10  $\mu$ M ATP in den verschiedenen transient transfizierten HEK293 Zellen induziert wurden, sind in Abbildung 16 dargestellt. Die in HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt gefundene erhöhte Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort gegenüber den

Kontrollzellen (HEK293) belegt die funktionelle Expression des rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptors in diesen Zelllinien. Die Tatsache, daß die Amplituden der induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten der pEGFPN transfizierten HEK Zellen und die Antworten der nicht-transfizierten Zellen praktisch identisch sind (Abbildung 16), zeigt, daß die Transfektion des Vektors allein bzw. die GFP-Expression nicht mit der Signaltransduktion der endogen exprimierten P2Y-Rezeptoren interferiert. Weitere Messungen ergaben ein Expressionsmaximum für den rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor zwischen dem 3. und 4. Tag nach der Transfektion (Ergebnisse nicht dargestellt).



**Abbildung 15: ATP-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Antworten in transient transfizierter C6-4-2 Gliomzellen**  
 Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration mit Hilfe des Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2. Die aufgetragenen Kurven zeigen die Änderungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, die durch wiederholte ATP-Gabe in C6-4-2 Gliomzellen induziert wurden. Die Ca<sup>2+</sup>-Antwort der Zellen, die mit dem pEGFPN-Vektor transfiziert wurden, sind als gepunktete Linie eingezeichnet, die Antwort der rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen als durchgezogene Linie. Dargestellt ist die relative Veränderung des Verhältnisses (R) F340 nm / F380 nm in Bezug zum basalen Ruhewert (R<sub>0</sub>), der entsprechenden C6-4-2 Gliomzellen. Die Konzentrationen und die Dauer der ATP-Zugabe sind durch die einzelnen Balken angegeben. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus 19 (pEGFPN transfizierte Zellen) bzw. 22 rP2Y<sub>1</sub>-wt –Rezeptor transfizierte Zellen) Einzelzellen, die in 2 Experimenten 3 Tage nach der Transfektion gemessen wurden.



**Abbildung 16: ATP-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Antworten in transient mit rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten HEK293 Zellen**

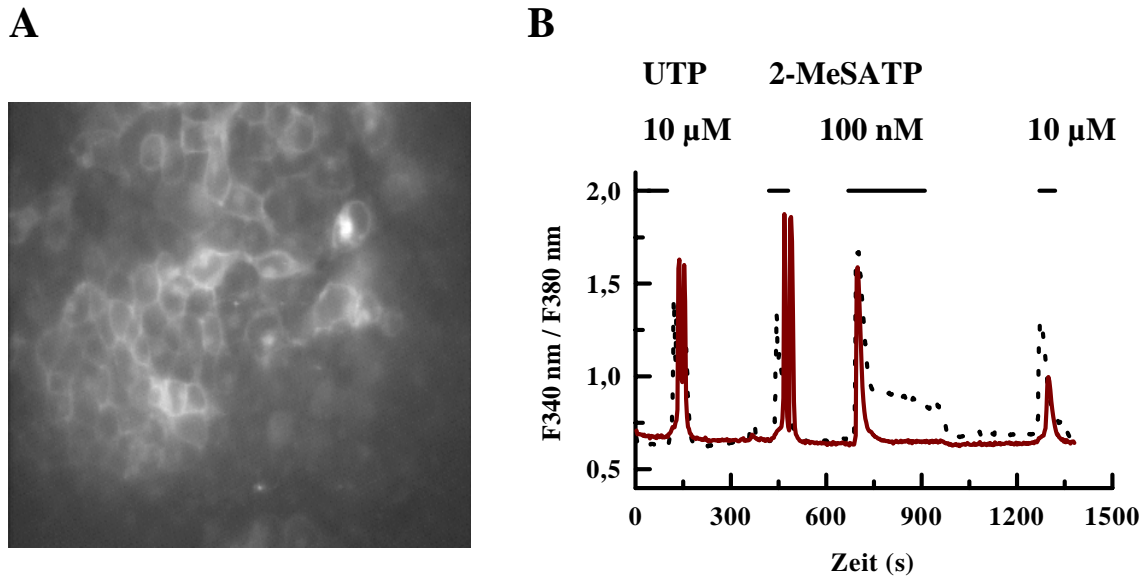
Abgebildet sind die durch 10 μM ATP evozierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten bei nicht-transfizierten HEK 293 Zellen (HEK293), mit Vektor pEGFPN transient transfizierten HEK293 Zellen (HEK-GFP) und mit rP2Y1-wt transient transfizierten HEK293 Zellen (HEK rP2Y1-wt). Die Ca<sup>2+</sup>-Antworten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM der Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort (R–R<sub>0</sub>), die aus jeweils N > 40 Einzelzellen gebildet wurden. Die Gesamtzahl der Einzelzellen wurde in 7, 3 bzw. 6 Experimenten gemessen. Die Experimente wurden mit Zellen durchgeführt, die nach der Transfektion noch 3 Tage kultiviert wurden. \* kennzeichnet die Signifikanz der Änderung (p > 0.05)

### 3.9 Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

#### 3.9.1 Variabilität der Ca<sup>2+</sup>-Antworten bei HEK293-Zellen am Beispiel der stabil transfizierten Zelllinie rP2Y<sub>1</sub>-eGFP

Zellen im Gewebeverband durchlaufen normalerweise in ihrer Entwicklung unterschiedliche Phasen, die durch ganz bestimmte Proteinexpressionsmuster gekennzeichnet sind, d.h. Wachstum, Ausdifferenzierung, Teilung, Alterung und andere physiologische Abläufe sind durch unterschiedliche Genexpression reguliert. Auch Zellen einer permanenten Zelllinie haben einen Lebenszyklus in dem sie unterschiedliche Phasen, die z.B. durch unterschiedlich hohe Stoffwechselaktivität gekennzeichnet sind, durchlaufen. Gentranskription und – translation werden in Abhängigkeit zum physiologischen Zustand der Zelle reguliert und dieser Regulation sind auch heterolog exprimierte Gene zu einem gewissen Grad unterworfen. Hierauf beruht die Variabilität bezüglich eines gemeinsamen Merkmals die auch in einer klonalen Zellpopulation zu beobachten ist. Abbildung 17 verdeutlicht die Variabilität der

Einzelzellen der stabil transfizierten, klonalen rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zelllinie bezüglich der Expressionsstärke des GFP-Fusionsproteins (Abbildung 17 A), sowie der Charakteristik der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung, die durch die Stimulierung des heterolog exprimierten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors ausgelöst wird (Abbildung.17B).



**Abbildung 17: Videobild von P2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen im mikroskopischen Bild der Fura-2 Imaging Apparatur und die Originalspuren der Ca<sup>2+</sup>-Antwort von zwei Einzelzellen**

Originalvideobild Fura-2 beladener Zellen der stabil transfizierten HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zelllinie. 17A zeigt die eGFP-Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. 17B zeigt die Originalspuren der Ca<sup>2+</sup>-Antworten von zwei typischen Zellen. Zeitpunkt und Dauer der Agonistzugabe (von links nach rechts: 10 µM UTP, 100 pM 2-MeSATP, 10 µM 2-MeSATP) sind durch Linien angegeben.

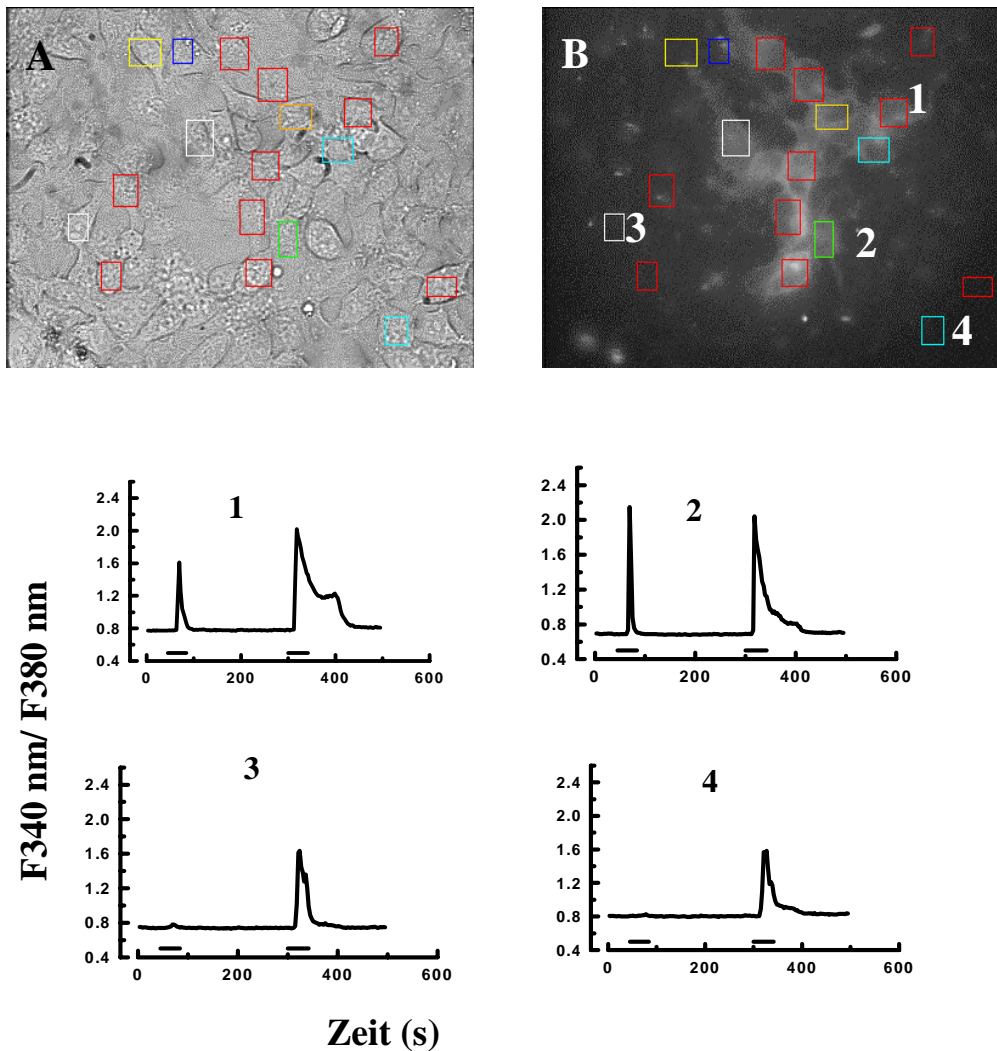
In Abbildung 17 A ist deutlich zu erkennen, daß die GFP-Fluoreszenz der einzelnen Zellen unterschiedlich stark ist, d.h. obwohl die Expression des P2Y<sub>1</sub>-GFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle eines starken viralen Promotors steht, wird in den einzelnen Zellen der Zelllinie unterschiedlich viel Rezeptorprotein produziert. Die Originalspuren in Abbildung 17 B, zeigen die typische Bandbreite der Reaktionen von Einzelzellen, die durch unterschiedliche Konzentration und Einwirkdauer der Agonisten ausgelöst werden. Die unterschiedliche Sensitivität der Zellen gegenüber P2Y<sub>1</sub>- (2-MeSATP) bzw. P2Y<sub>2</sub>-spezifischen (UTP) Agonisten und die Veränderung der Amplitudengröße der Ca<sup>2+</sup>-Antworten, die durch wiederholte Agonistengabe (10 µM 2-MeSATP) auftritt, sind ebenfalls zu erkennen.

### 3.10 Zusammenhang zwischen der Intensität der GFP-Fluoreszenz und der 2-MeSADP Sensivität bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen

Transfizierte HEK293 Zellen, die den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptor exprimieren, lassen sich auf Grund der GFP-Fluoreszenz relativ einfach identifizieren. Werden rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren in diesen Zellen funktionell exprimiert und sind korrekt in die Signltransduktion eingebunden ist zu erwarten, daß diese Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen eine veränderte Sensitivität gegenüber P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten aufweisen.

Um diesen Zusammenhang zu überprüfen wurden HEK293 Zellen nach der Transfektion mit rP2Y<sub>1</sub>-eGFP für 14 Tage mittels G418 selektioniert und die isolierten Zellklone in Ca<sup>2+</sup>-Messungen eingesetzt. Diese Zellklone enthalten nach nur einer Selektionsrunde noch viele Zellen die keine GFP-Fluoreszenz aufweisen und die den Rezeptor vermutlich nicht oder nur in vernachlässigbarem Umfang exprimieren. Vor der eigentlichen Messung wurden deshalb Zellen mit GFP-Fluoreszenz - und solche ohne - identifiziert und zur Auswertung im Experiment markiert (Abbildung 18 A,B; Auswertefenster um die Zellen). Im Experiment wurden Fura-2 beladene Zellen mit zwei Pulsen des P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten 2-MeSADP mit steigender Konzentration ( 0.01 µM und 10 µM) stimuliert. Die Originalspuren der Ca<sup>2+</sup>-Antworten wurden den einzelnen Zellen zugeordnet, die Diagramme sind in Abbildung 18 mit 1-4 durchnummeriert und repräsentieren typische Reaktionen.

Die Diagramme 1 und 2 zeigen die Ca<sup>2+</sup>-Antworten von Zellen mit deutlicher GFP-Fluoreszenz (vergl. Abbildung 18 B: 1 und 2). Diese Zellen reagieren bereits auf eine 2-MeSADP Konzentration von 0.01 µM mit einer transienten Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, bei der die Zellen ohne GFP-Fluoreszenz (Abbildung 18 B: 3 und 4) praktisch nicht reagieren. Alle Zellen zeigen eine Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf den Stimulus mit 10 µM 2-MeSADP, jedoch ist die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort der Zellen mit GFP-Fluoreszenz erhöht und zeigt z.T. eine ausgeprägte Schulter (Abbildung 18: Diagramm1). Die erhöhte Sensitivität der rP2Y<sub>1</sub>-transfizierten Zellen mit GFP-Fluoreszenz gegenüber dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischen Agonisten 2-MeSADP belegt die funktionelle Expression des Rezeptor-GFP Fusionsproteins in transfizierten HEK293-Zellen.



**Abbildung 18** Licht- und GFP-Fluoreszenzbild rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierter HEK Zellen und die dazugehörigen Originalspuren der 2-MeADP induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort einzelner Zellen.

Fura-2 beladene, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK293 Zellen wurden wiederholt mit 2-MeSADP in ansteigender Konzentration (0,01 µM und 10 µM) stimuliert und die Ca<sup>2+</sup>-Antworten (F340 nm/F380 nm) aufgezeichnet. Die Ca<sup>2+</sup>-Antworten konnten einzelnen Zellen zugeordnet werden, die unterschiedlich intensive GFP-Fluoreszenz aufwiesen. 18A zeigt eine Durchlichtaufnahme der gemessenen Zellen, 18B die entsprechende Aufnahme der GFP-Fluoreszenz. Die Diagramme 1-4 zeigen die Originalspuren der Ca<sup>2+</sup>-Antworten der entsprechend in 18A bzw. 18B gekennzeichneten Zellen. Die Linienmarkierungen in den Diagrammen geben Zugabezeitpunkt und -dauer des Agonisten an.

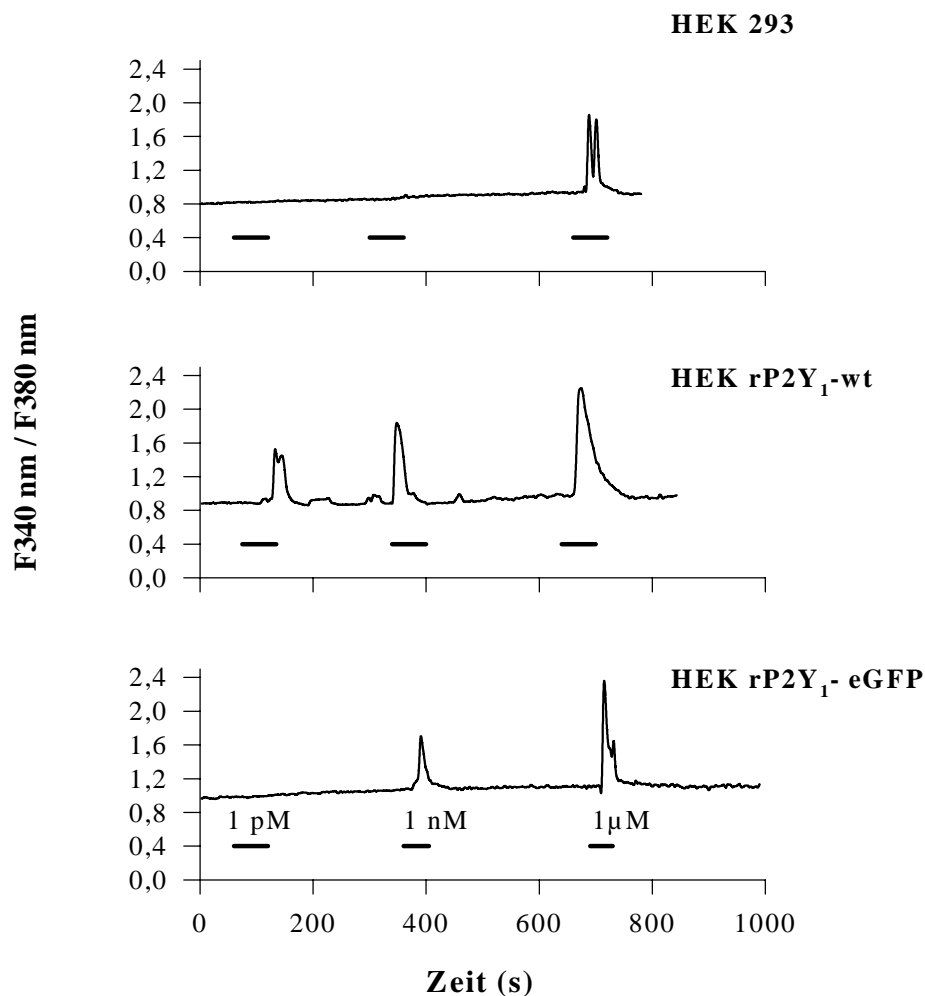
### 3.11 Ca<sup>2+</sup>-Messungen an stabil-transfizierten HEK293 Zelllinien

Um die Funktionalität der heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren (rP2Y<sub>1</sub>-eGFP bzw. rP2Y<sub>1</sub>-wt) zu untersuchen, wurde an Fura-2 beladenen Zellen die Veränderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> bestimmt, die durch kurzzeitige Stimulation (1 min) mit P2Y<sub>1</sub>-selektiven Nukleotidagonisten hervorgerufen wurde.

In Abbildung 19 sind die Ca<sup>2+</sup>-Antworten dargestellt, die durch kurze 2-MeSADP Pulse in den Konzentrationen 1 pM, 1 nM und 1 µM ausgelöst wurden. Nicht-transfizierte



HEK Zellen (HEK293) zeigen erst bei einer Agonistkonzentration von 1 µM eine Antwort. Im Gegensatz dazu reagieren rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte Zellen auf 1 nM und die rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen besitzen eine noch größere Sensitivität und zeigen eine vergleichbare Reaktion schon bei 1 pM 2-MeSADP. Der Vergleich der Ca<sup>2+</sup>-Antworten, die mit verschiedenen P2Y<sub>1</sub>-Agonisten im Konzentrationsbereich von 10 nM – 10 µM<sup>1</sup> ausgelöst wurden, wird deutlich, daß 2-MeSADP in den transfizierten Zelllinien statistisch signifikant größere Veränderungen in der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> hervorruft als bei den nicht transfizierten HEK293 Zellen.



**Abbildung 19: Vergleich der durch 2-MeSADP evozierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten in transfizierten und nicht-transfizierten HEK293-Zelllinien**

Nicht-transfizierte HEK 293 – Zellen (HEK 293) und Zellen der stabil transfizierten HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt und HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zelllinien wurden mit Fura-2/AM beladen. Die Zellen wurden wiederholt mit ansteigender Konzentration mit 2-MeSADP stimuliert. Konzentration, Zugabezeitpunkt und –dauer sind durch die Markierungen und entsprechende Beschriftung angegeben. Die gezeigten

<sup>1</sup>In diesem Konzentrationsbereich führen die Agonisten bei HEK 293 Zellen und anderen Zelllinien zu einer Erhöhung der Inositol 1,4,5 trisphosphat Konzentration [36, 165]

Originalspuren repräsentieren typische Antworten von Einzelzellen, wie sie für die unterschiedlichen Zelllinien gefunden wurden.

Bei niedrigen Agonistenkonzentrationen wird die unterschiedliche Sensitivität der drei Zelllinien besonders deutlich: werden rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierte Zellen mit 2-MeSATP bzw. 2-MeSADP in einer Konzentration von 10 nM stimuliert, reagieren 100 % aller Zellen auf die P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten mit nahezu der maximalen Antwortamplitude. Bei den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen reagieren unter diesen Bedingungen nur etwa 70 –80 % aller Zellen mit einer Ca<sup>2+</sup>-Antwort. Nicht-transfizierte HEK293 Zellen reagieren nur auf einem sehr niedrigen Niveau (ca. 20% der Maximalantwort) und zu einem geringen Anteil ( 5-30 % der Zellen) auf diese Agonistkonzentration. Entsprechend der Rangfolge der Agonistwirkung an P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren besitzt ADP bei den transfizierten Zelllinien eine vergleichsweise höhere Effektivität Ca<sup>2+</sup>-Antworten auszulösen als ATP. Vergleicht man den 10 nM-Effekt von ADP bei den rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen mit dem Effekt von 2-MeSATP bzw. 2-MeSADP, lassen sich keine Unterschiede erkennen, bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP exprimierenden Zellen ist ADP jedoch weniger wirksam (Ergebnisse nicht dargestellt).

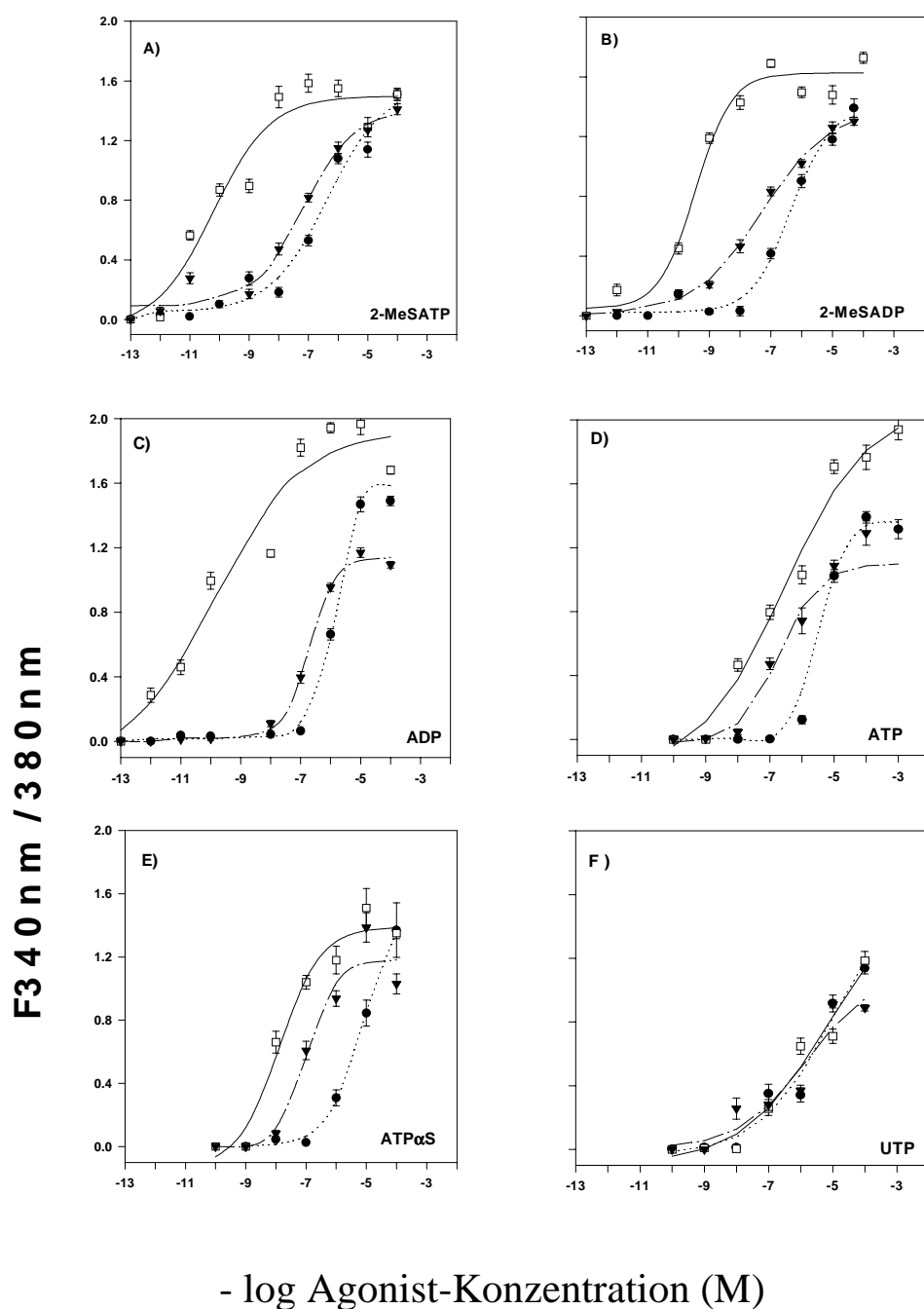
### **3.12 Konzentrations-Effekt Kurven der verschiedenen Nukleotidagonisten an den HEK293 Zelllinien**

Beide P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aus der Ratte (rP2Y<sub>1</sub>-wt und rP2Y<sub>1</sub>-eGFP) weisen die identische Agonistenselektivität auf. Werden die Agonisten nach ihrer Fähigkeit die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> zu erhöhen geordnet, ergibt sich folgendes Bild: 2-MeSADP ≅ 2-MeSATP >ADP> ATαP> ATP >>UTP (vergl. Abbildung 20). Diese Rangfolge ist typisch für die Ligandenselektivität von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren. Setzt man die unvermeidliche, statistische Ungenauigkeit bei der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven voraus, scheinen die 2-Methylthio-substituierten Nukleotidderivate equipotent zu sein. Sowohl in den transfizierten Zelllinien als auch in den nicht-transfizierten Zellen wurden durch UTP identische Maximalantworten ausgelöst und praktisch identische EC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Die heterologe Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren interferiert mit der Signaltransduktion der endogenen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren also offensichtlich nicht, was durch die RT-PCR-Experimente (Abbildung 12), die ein vergleichbar hohes Expressionsniveau der P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in allen drei HEK Zelllinien nahelegen, unterstützt wird.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß die Wirksamkeit von 2-MeSADP bzw. 2-MeSATP bei der Aktivierung der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in den transfizierten Zelllinien nahezu identisch ist. Die

## Ergebnisse: Konzentrations-Effekt Kurven

EC<sub>50</sub>-Werte für diese Agonisten liegen bei den rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor transfizierten Zellen im hohen picomolaren Bereich (60- 350 pM) und die rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren werden von 2-MeSADP bzw. 2-MeSATP im nanomolaren Konzentrationsbereich halbmaximal stimuliert (50 – 70 nM). Die Affinität des GFP-modifizierten Rezeptors ist gegenüber dem Wildtyp des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors zwar erniedrigt, jedoch ist die Affinität der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in nicht-transfizierten HEK293 Zellen noch niedriger, denn deren EC<sub>50</sub> Werte liegen im mikromolaren Bereich. Vergleicht man die Affinitäten für ATP und ADP, zeigt sich, daß ATP eine geringere Affinität zu den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu haben scheint als ADP.



**Abbildung 20: Konzentrations-Effekt Kurven für die durch Nukleotidstimulation ausgelöste Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in HEK 293 Zellen**

Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  wurde in Fura-2 beladenen Zellen gemessen. Nicht-transfizierte HEK293 Zellen ( ), rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte Zellen ( ), oder rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierte Zellen ( ) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der P2Y<sub>1</sub>-selektiven Agonisten 2-MeSATP (A), 2-MeSADP (B), ADP (C) oder ATP (D) bzw. ATP $\alpha$ S (E) und dem P2Y<sub>2</sub>-selektiven Agonisten UTP (F) stimuliert und die maximale Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (F340 nm/ F380 nm) ausgewertet. Die Messpunkte der Einzelkurven repräsentieren jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM von N > 60 Einzelzellen (aus 3-5 Experimenten).

**Tabelle 7: Affinität der unterschiedlichen P2Y<sub>1</sub>-selektiven Agonisten für die transfizierten Zelllinien im Vergleich zu nicht transfizierten HEK293 Zellen.**

Die EC<sub>50</sub>-Werte wurden aus den nicht linearen Regressionen für die sigmoidalen Konzentrations-Effekt Kurven berechnet (Abbildung 20), die Ergebnis eines „logistic fit“ sind.

Zelllinie	Nukleotidagonisten					
	2-MeSATP	2-MeSADP	ADP	ATP	ATP $\alpha$ S	UTP
	EC <sub>50</sub> (nM)					
HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	69	51	200	640	110	1,500
HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	0,06	0,35	0,13	43	13	6,600
HEK293 control	450	450	1,200	6,200	8,400	8,700

Tabelle 7 vergleicht die Ca<sup>2+</sup>-Antworten die durch 2-MeSADP und andere P2Y<sub>1</sub>-spezifische Agonisten bei den verschiedenen HEK293 Zelllinien ausgelöst wurden. Wurden diese Agonisten in physiologisch relevanten Konzentrationen (10 nM - 10  $\mu$ M) eingesetzt, war ihre Fähigkeit eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auszulösen bei den transfizierten HEK293 Zellen deutlich höher als bei den nicht-transfizierten Zellen. Die unterschiedliche Sensitivität der HEK293-Zelllinien zeigt sich besonders deutlich bei niedrigen Agonistkonzentrationen (Tabelle 8). Während die Stimulation der Zellen mit den P2Y<sub>1</sub>-selektiven Agonisten 2-MeSADP und 2-MeSATP in einer 10 nM Konzentration bei nahezu 100% der Zellen der rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zelllinie zu einer Ca<sup>2+</sup>-Antwort führte, löste sie bei der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zelllinie noch bei 70-80% der Zellen eine Ca<sup>2+</sup>-Antwort aus und bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen nur bei 5 bzw. 30% der gemessenen Zellen. Die hohe Sensitivität der heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren wird durch die Tatsache bestätigt, daß 2-MeSATP bzw. 2-MeSADP in Konzentrationen von 10 nM bzw. 100 nM bei nahezu 100% der transfizierten Zellen zu einer fast maximalen Ca<sup>2+</sup>-Antwort führten, während für diesen Effekt bei den nicht-transfizierten HEK293 Zellen eine Agonistkonzentration von 1  $\mu$ M nötig war.

Die Wirksamkeit von ATP $\alpha$ S (Tabelle 7) an P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren wurde untersucht, weil

dieses Nukleotid in Rezeptorbindungsstudien eingesetzt wurde. Motivation dieser Experimente war die Identifikation von P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren in Plasmamembranen [130, 131,130]. Bei den stabil-transfizierten Zelllinien (rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw rP2Y<sub>1</sub>-eGFP) wurden durch ATP $\alpha$ S (100 nM) größere Ca<sup>2+</sup>-Antworten ausgelöst als durch ATP in identischer Konzentration, d.h. die Sensitivität dieser Zelllinien gegenüber ATP $\alpha$ S ist im Vergleich mit ATP erhöht. ATP $\alpha$ S-Konzentrationen von 100 nM – 1  $\mu$ M lösen bei HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen generell eine Reaktion aus. Nicht-transfizierte HEK293 Zellen zeigten bei 100 nM ATP $\alpha$ S keine Ca<sup>2+</sup>-Antwort.

Vergleicht man die Maximalantworten, lassen sich bei den transfizierten Zelllinien zwischen ATP $\alpha$ S und 2-MeSADP bzw. 2-MeSATP keine signifikanten Unterschiede erkennen, jedoch sind diese niedriger als die maximalen, durch ATP evozierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten. In der Kombination unterstützen diese Befunde die Einstufung von ATP $\alpha$ S als „Vollagonist“, mit einer Präferenz für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren.

**Tabelle 8: Sensitivität der rP2Y<sub>1</sub>-wt, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten und nicht-transfizierten HEK293 Zelllinien**

In der Tabelle sind die durch verschiedene Agonisten ausgelösten Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340\text{ nm}}/F_{380\text{ nm}}$ ) in den unterschiedlichen Zelllinien aufgetragen. Die Agonistsubstanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM - 10  $\mu$ M) zur Messung eingesetzt. Neben der Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Antworten wurde der Prozentsatz der antwortenden Zellen (% resp.) aller gemessenen Zellen bei der jeweiligen Agonistkonzentration für jede Zelllinie bestimmt.

Nukleotide	Zelltyp	Konzentration											
		10 nM			0.1 $\mu$ M			1 $\mu$ M			10 $\mu$ M		
		$\Delta F_{340/380}$	% resp.	n	$\Delta F_{340/380}$	% resp.	n	$\Delta F_{340/380}$	% resp.	n	$\Delta F_{340/380}$	% resp.	n
2-MeSATP	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	1.49	98	95	1.58	100	125	1.85	100	93	1.29	100	20
	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	0.47	78	119	0.81	96	289	0.86	100	233	1.27	100	152
	HEK control	0.18	31	133	0.55	71	266	0.91	98	341	1.03	100	114
2-MeSADP	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	1.43	100	64	1.69	100	143	1.49	100	106	1.48	100	66
	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	0.47	71	109	0.83	98	156	1.02	100	171	1.26	100	110
	HEK control	0.03	5	72	0.42	63	146	0.90	100	145	1.18	100	116
ATP	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	0.47	70	117	0.79	78	174	1.03	84	133	1.70	100	112
	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	0.05	15	67	0.47	88	75	0.74	99	105	1.08	100	118
	HEK control	0	0	46	0	0	95	0.12	23	125	1.02	97	101
ADP	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	1.16	100	203	1.82	100	56	1.94	100	128	1.96	100	38
	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	0.11	36	88	0.39	74	101	0.95	96	199	1.17	100	101
	HEK control	0	0	86	0.06	34	102	0.66	77	188	1.46	100	102
ATP $\alpha$ S	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	0.66	66	71	1.04	100	81	1.18	100	68	1.51	100	28
	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	0.08	29	37	0.61	90	43	0.94	100	41	1.38	100	32
	HEK control	0	0	46	0	0	64	0.31	74	35	0.84	97	34

### 3.13 Inhibition P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor abhängiger Ca<sup>2+</sup>-Antworten in HEK293

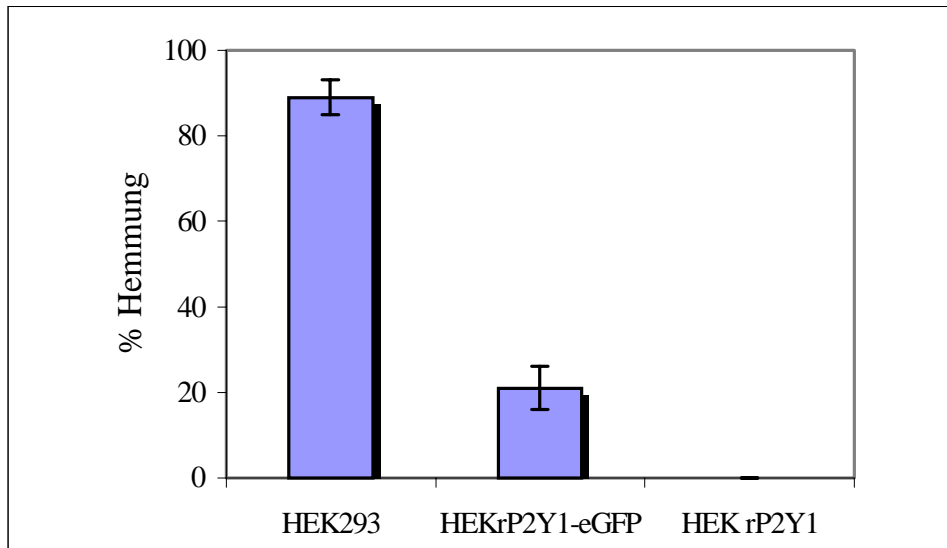
#### Zellen

Auf der Suche nach Antagonisten für P2-Rezeptoren wurden bis jetzt eine ganze Reihe von Substanzen untersucht (zur Übersicht [2]). Ein Problem dieser Substanzen mit antagonistischer Wirkung ist ihre mangelhafte Selektivität. Zu den gebräuchlichsten Antagonisten an P2-Rezeptoren gehören Suramin, NF279 (ein Suraminderivat), *Reactive Blue*, *Evans Blue* und PPADS (Pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure). PPADS ist ein nicht-selektiver - jedoch kein universeller -, kompetitiver, reversibler Antagonist an P2-Rezeptoren. Im Allgemeinen blockiert PPADS die Aktivierung endogener P2Y<sub>1</sub>-ähnlicher und rekombinanter P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die an PLC gekoppelt sind [36,132,133,63]. P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die an Adenylatzyklase gekoppelt sind, werden jedoch nicht inhibiert [66, 63].

In Abbildung 21 ist die hemmende Wirkung von 0.4 mM PPADS auf die Ca<sup>2+</sup>-Antwort dargestellt, die bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen bzw. transfizierten Zelllinien durch 0.1 µM 2-MeSATP ausgelöst wird. Die Abhängigkeit zwischen beobachtetem PPADS-Effekt und der halbmaximalen Wirkkonzentration (EC<sub>50</sub>-Wert) von 2-MeSATP bei den jeweiligen Zellen wird hier sehr deutlich: je höher die Sensitivität der Zellen gegenüber 2-MeSATP ist, desto niedriger ist der zu beobachtende Hemmeffekt. Die Sensitivität gegenüber 2-MeSATP ist bei den transfizierten Zelllinien (rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP) höher als bei den nicht-transfizierten HEK293 Zellen und damit auch die Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Antwort deutlich niedriger (Abbildung 20).

Auf Grund der Arbeit von Schachter et al. [134], in der PPADS-Effekte an nicht-transfizierten HEK293 Zellen beschrieben sind (Abbildung 21C), wurden Dosis-Wirkungskurven für die PPADS-Hemmung an den heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren erstellt. Dazu wurden die Ca<sup>2+</sup>-Antworten, die durch eine konstante 2-MeSADP bzw. 2-MeSATP Konzentration ausgelöst wurden, mit steigenden PPADS-Konzentrationen inhibiert (Abbildung 21A, B,C). Da die PPADS-Hemmung an P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren kompetitiver Natur ist, die Zelllinien aber stark unterschiedliche Sensitivität gegenüber den verschiedenen Agonistsubstanzen aufweisen (vgl. Abbildung 20 bzw. Tabelle 7 und 8), lassen sich vergleichbare Kurven für die PPADS-Hemmung nur dann erhalten, wenn Agonistkonzentrationen eingesetzt werden die vergleichbare physiologische Effekte (Ca<sup>2+</sup>-Antworten) bei den einzelnen Zelllinien hervorrufen. Deshalb wurden Agonistkonzentrationen im Bereich der EC<sub>50</sub>-Werte von 2-MeSADP bzw. 2-MeSATP eingesetzt, d.h. 30 pM bzw. 30 nM 2-MeSADP bei rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen und 1 µM 2-MeSATP bei nicht-

transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 21). Die scheinbare Wirkungslosigkeit von PPADS bei den transfizierten Zelllinien in Abbildung 21 beruht genau auf diesem Zusammenhang und unterstreicht sehr anschaulich die unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien gegenüber dem P2Y<sub>1</sub>-selektiven Agonist 2-MeSATP.

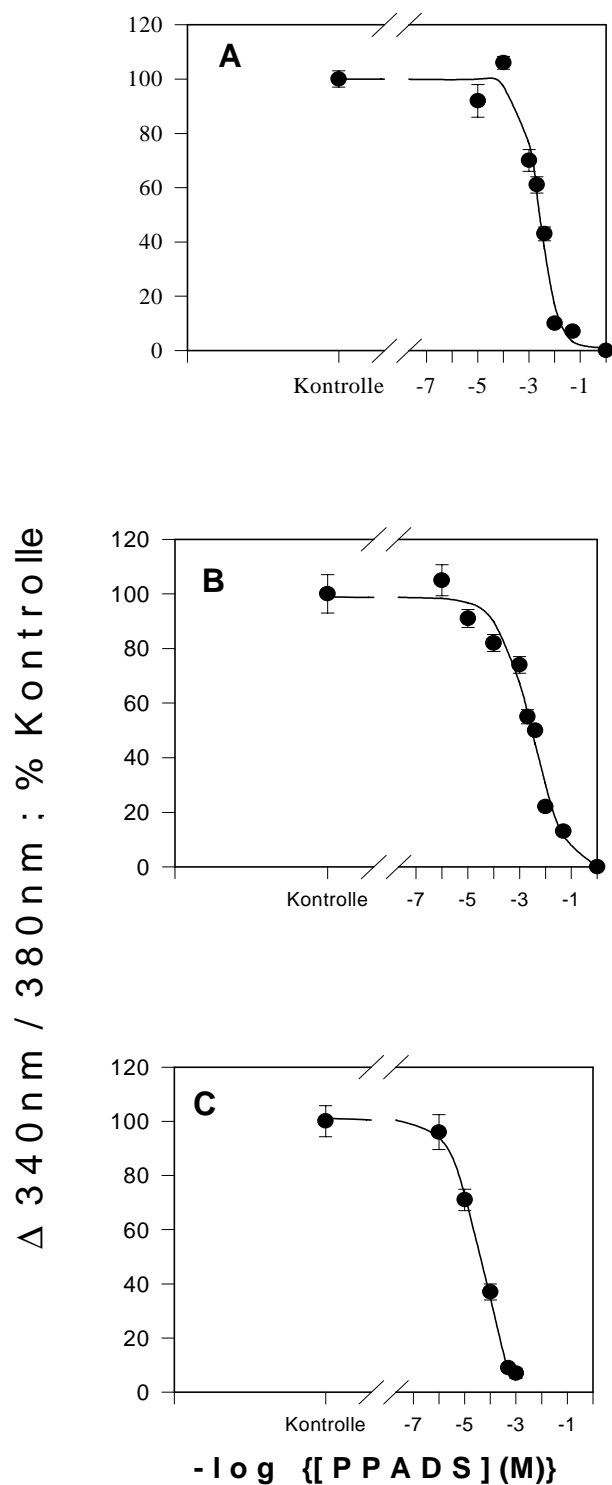


**Abbildung 21: Inhibition der 2-MeSATP induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch PPADS**

Im Diagramm ist die Reduktion der Ca<sup>2+</sup>-Antwortamplituden durch PPADS aufgetragen. Zur Ermittlung des PPADS-Hemmeffekts wurden mit PPADS (400 µM) vorbehandelte HEK 293 Zellen und nicht behandelte Zellen (Kontrollwert (100%)) mit 0.1 µM 2-MeSATP stimuliert. Die Antwortamplitude der vorbehandelten Zellen wurde auf den Kontrollwert normiert (% Kontrolle). Die Differenz zwischen Kontrollwert und normierter Ca<sup>2+</sup>-Antwort repräsentiert das Ausmaß der Hemmung von PPADS auf die durch 2-MeSATP ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Antwort und ist in der Abbildung als „% Hemmung“ aufgetragen. Die Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM, die aus Stichproben von > 40 Einzelzellen aus 2 Experimenten ermittelt wurden.

In Abbildung 22 sind die gemessenen Dosis-Wirkungskurven der transfizierten Zelllinien aufgetragen, aus denen sich vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte ableiten lassen (rP2Y<sub>1</sub>-wt : 250 µM bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP: 430 µM). Zur Erstellung der PPADS Dosis-Wirkungskurve der nicht-transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 22 C), wurde die Ca<sup>2+</sup>-Antwort der Zellen auf 1 µM 2-MeSATP, (EC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 450 nM) durch PPADS inhibiert. Der IC<sub>50</sub>-Wert für diese Hemmung liegt bei 3.8 µM und ist wesentlich niedriger, als bei den transfizierten Zellen. Dieser Unterschied spiegelt vermutlich eine unterschiedliche PPADS-Sensitivität der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aus Ratte und Mensch wieder.





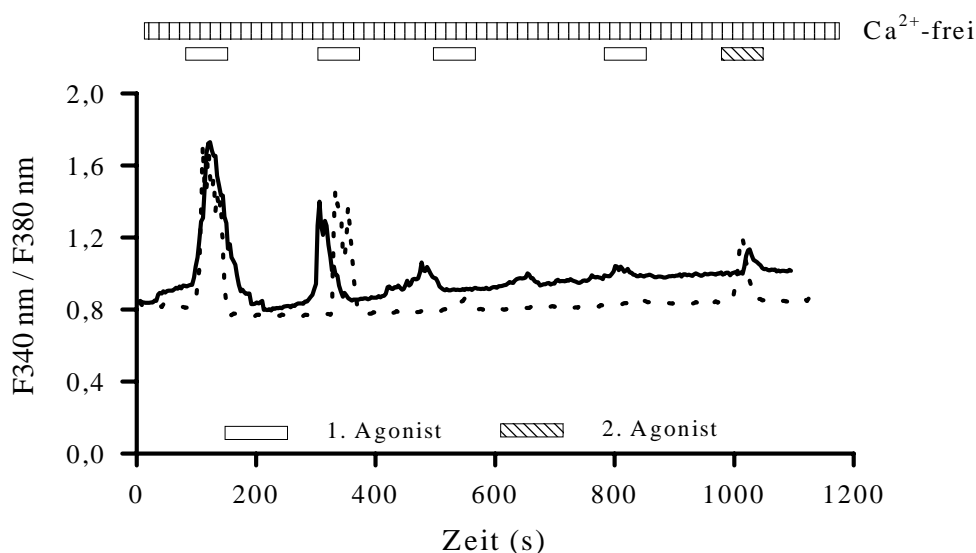
**Abbildung 22: Hemmung der durch P2Y<sub>1</sub>- Rezeptor Stimulation induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten mittels PPADS**

HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt (A), HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP (B) und nicht-transfizierte HEK293 Zellen (C), wurden mit 30 pM (A) oder 30 nM (B) 2-MeSADP bzw. 1  $\mu\text{M}$  2-MeSATP (C) in Gegenwart steigender PPADS-Konzentration stimuliert. Die Amplitude der induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort wurde analysiert und zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte in Prozent (%) zur Kontrolle (maximale Antwortamplitude ohne PPADS) gegen die PPADS-Konzentration aufgetragen.

### 3.14 Mechanismen der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )

#### 3.14.1 Erfolgt die durch P2Y-Agonisten evozierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung für P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> aus denselben Speichern?

Unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Versuchsbedingungen wurden nicht-transfizierte und P2Y<sub>1</sub>-eGFP-transfizierte HEK293 Zellen wiederholt mit P2Y<sub>1</sub>- (2-MeSATP) bzw. mit P2Y<sub>2</sub>- (UTP) spezifischen Agonisten stimuliert (Abbildung 23). Waren die Stimuli dieses Nukleotidagonisten nicht mehr in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten bei den Zellen auszulösen, wurden die Zellen mit dem „2. Agonisten“ stimuliert, d.h. UTP folgte auf 2-MeSATP bzw. 2-MeSATP folgte auf UTP.



**Abbildung 23: Die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren führt zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus denselben intrazellulären Speichern**

Unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Versuchsbedingungen wurden Fura-2 beladene, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK293 Zellen wiederholt mit dem P2Y<sub>2</sub>-spezifischen Agonisten UTP in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  (gestrichelte Linie) bzw. 100  $\mu\text{M}$  (durchgezogene Linie) stimuliert. Waren diese Stimuli nicht mehr in der Lage  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten auszulösen, wurden die Zellen mit dem P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten 2-MeSATP in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  stimuliert. Zugabezeitpunkt und Länge der Zugabe sind durch Balken und entsprechende Beschriftung angegeben.

Abhängig von der Agonistenkonzentration findet die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern in unterschiedlichem Ausmaß statt, was in Abbildung 23 an der Fläche unter den transienten Gipfeln („peaks“) der Originalspuren zu erkennen ist. Vom Ausmaß der Speicherentleerung durch die wiederholte Gabe des 1. Nukleotidagonisten wird die abschliessende  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, die durch den 2-MeSATP Stimulus induziert werden kann, direkt

beeinflußt. So ist der 10 µM 2-MeSATP-Stimulus nach der Speicherentleerung durch 100 µM UTP, im Vergleich zur Situation nach 10 µM UTP, nicht mehr in der Lage die gleiche Menge Ca<sup>2+</sup> aus internen Speichern freizusetzen. Dieser Befund belegt, daß P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren Ca<sup>2+</sup> aus denselben, internen Speichern freisetzen können. Jedoch können die Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch UTP (100 µM) nicht so weit entleert werden, daß 2-MeSATP (10 µM) keine Ca<sup>2+</sup>-Antwort mehr auslösen kann. Das spricht dafür, daß die internen Ca<sup>2+</sup>-Speicher die von P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren angesprochen werden, nicht völlig identisch sind.

Da ADP unter den physiologisch relevanten Nukleotiden neben ATP die höchste Spezifität für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren besitzt wurden Experimente des gleichen Ablaufs mit 100µM UTP und 10µM ADP durchgeführt. Tabelle 9 vergleicht die Antwortamplituden des 2. Agonisten (in Prozent der maximalen Antwortamplitude dieses Agonisten). Es fällt auf, daß die UTP-vermittelte Speicherentleerung bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen (3,5%) zu einer stärkeren Reduktion der ADP-Antwort führt als bei HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen (26%). Dieser Befund spricht für eine effizientere Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch ADP (10 µM) bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen aus internen Speichern nach UTP induzierter Speicherentleerung als es bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen der Fall ist.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Speicherentleerungsversuche mit UTP/ADP**  
Ausgewertet wurden die Antwortamplituden, die unter nominell Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen bei nicht-transfizierten HEK293 bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen ausgelöst werden konnten. Die Amplituden, die durch den 2. Agonisten ausgelöst wurden, wurden auf die maximalen Antwortamplituden dieses Agonisten normiert. Angegeben sind die Mittelwerte der Ca<sup>2+</sup>-Antwortamplituden ±SEM aus der Stichprobe N, die aus 2-3 Experimenten entstammt.

Zelllinie Agonist	nicht-transfizierte HEK293		HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	
	ADP nach UTP	UTP nach ADP	ADP nach UTP	UTP nach ADP
Δ (F340 nm / F380 nm)	0.045 (±0.01)	0.2 (±0.02)	0.23 (±0.02)	0.051 (±0.01)
N	74	60	78	35
Antwort in % der max. Ca <sup>2+</sup> -Amplitude	<b>3.5 %</b>	<b>22 %</b>	<b>26%</b>	<b>5.2%</b>

Für die Speicherentleerung durch ADP gilt Entsprechendes: die Reduktion der UTP-Antwortamplitude nach ADP-Stimulation ist bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen größer (5,2%), als bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen (22%). Identische ADP-Konzentrationen sind bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen in der Lage die internen Ca<sup>2+</sup>-Speicher stärker zu entleeren als bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen. Dieses Verhalten der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen spricht für eine veränderte Rezeptorstöchiometrie zwischen endogenen

P2Y<sub>2</sub>- und (r)P2Y<sub>1</sub>- Rezeptoren. Ein derart verändertes Verhältnis der Rezeptortypen zueinander, ist auf Grund der zusätzlichen Expression des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors durch die stabile Transfektion der HEK293 Zellen zu erwarten und belegt die funktionelle Expression des Rezeptor-GFP Fusionsproteins.

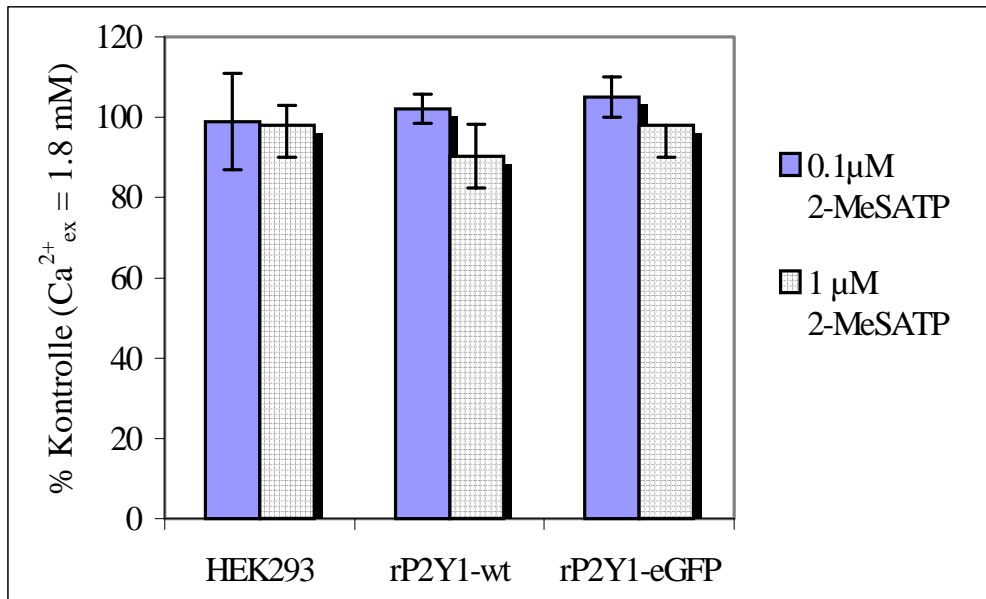
### 3.14.2 Anteil von extrazellulärem $\text{Ca}^{2+}$ an der durch 2-MeSATP induzierten

#### $[\text{Ca}^{2+}]_i$ –Erhöhung

Prinzipiell können verschiedene Mechanismen zur nukleotid-induzierten Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beitragen, dazu gehören u.a. die PLC/InsP<sub>3</sub> vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Raum durch die sogenannten ROCC (receptor operated calcium entry channel) bzw. SOCC (store operated calcium entry channel). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromkomponente kann z.B. durch die direkte Aktivierung von nicht-selektiven Kationenkanälen (P2X-Rezeptoren), bzw. durch die Gβγ-vermittelte Aktivierung von Ionenkanälen geschehen und spielt bei Phänomenen wie den Agonist-induzierten Kalziumoszillationen eine wichtige Rolle [135].

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung einer KalziumEinstromkomponente bei der P2Y<sub>1</sub>-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden Fura-2 beladene Zellen zunächst unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen (1.8 mM) Bedingungen mit 2-MeSATP stimuliert. Nach einer Waschperiode zur Speicherwiederbefüllung wurde das extrazelluläre Kalzium durch Superfusion mit nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien NaHBS-Medium entfernt und die Zellen erneut mit 2-MeSATP stimuliert.

Aus Abbildung 24 wird ersichtlich, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den durch 2-MeSATP induzierten Antwortamplituden besteht, die unter „nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien“ bzw. unter „ $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen“ Bedingungen gemessen wurden. Bei HEK293 Zellen spielt bei kurzzeitiger (1 min) Stimulation mit 2-MeSATP der Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  keine Rolle für die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



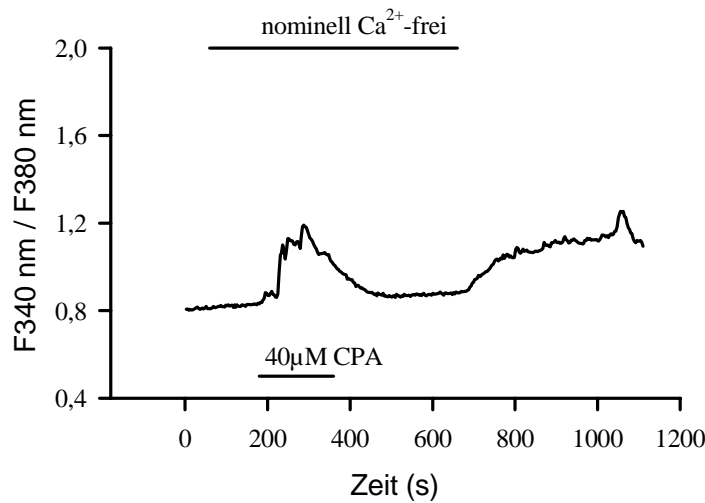
**Abbildung 24: Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen bzw. nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen bei HEK293 Zellen**

Fura-2 beladene nicht-transfizierte HEK293 Zellen bzw. stabil-transfizierte rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK293 Zelllinien wurden unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen mit 0.1  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$  2-MeSATP stimuliert und die Amplitude der induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort bestimmt. Die Werte sind in Prozent (%) der Kontrolle dargestellt, die unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen (1.8 mM) Bedingungen gemessen wurde. Die Meßwerte stammen aus je 2-5 unabhängigen Experimenten (Probenumfang N [0.1 / 1  $\mu\text{M}$ ] entspricht für nicht-transfizierte HEK293 57/47; HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP 110/21; HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt 138/23).

### 3.14.3 Kapazitiver $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei HEK293 Zellen

Ein Mechanismus zur Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist der kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Dieser Regulationsweg sorgt für einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytoplasma, der durch die Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher aktiviert wird (Übersicht in [136,137]).

Zur Untersuchung des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms wurden Fura-2 beladene, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-transfizierte HEK293 Zellen unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen mit CPA stimuliert (Abbildung 25). Die transiente Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist eine Folge der durch CPA vermittelten Hemmung der ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe im ER (SERCA) und repräsentiert einen passiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Austrom aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern. Nachdem die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erneut ihren Ruhewert erreichte, wurde auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiges NaHBS-Medium gewechselt und die Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  weiter beobachtet, wobei der beobachtete Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als Maß für den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gewertet wird.



**Abbildung 25: Kapazitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen.**

Die Originalspur wurde an Fura-2 beladenen, rP2Y<sub>1</sub>-transfizierten HEK293 Zellen aufgenommen. Dazu wurden die Zellen unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen 3 min mit 40  $\mu\text{M}$  CPA stimuliert und anschließend weiter mit nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium superfundiert, bis die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  der Zellen erneut den Ruhewert erreicht hatten. Zum Schluß wurde auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiges NaHBS-Medium gewechselt. Der Verlauf dieser Kurve ist typisch und wurde in 2 vergleichbaren Experimenten an > 80 Zellen beobachtet.

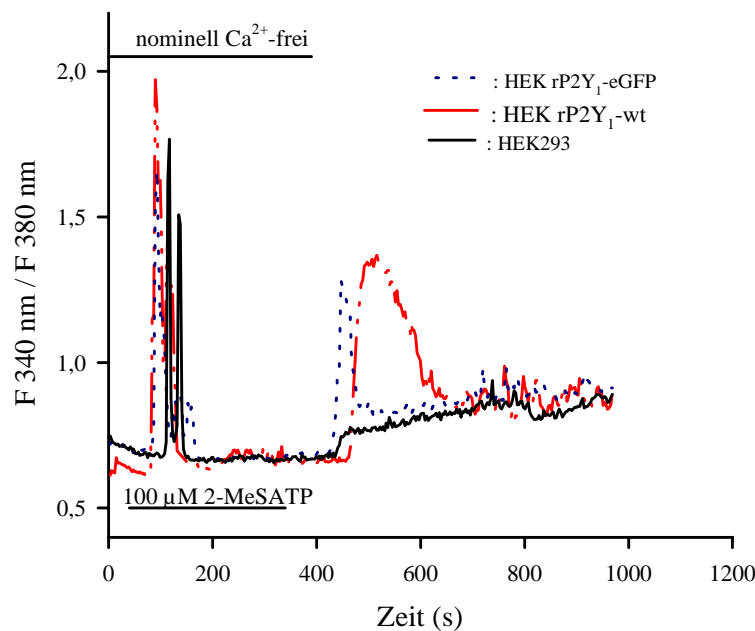
Um den Einfluß einer P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Speicherentleerung auf den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu untersuchen (Abbildung 26), wurden die Zellen mit einem länger anhaltenden 2-MeSATP-Puls (5 min, 100  $\mu\text{M}$ ) unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen stimuliert und anschließend mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium superfundiert, wobei die dadurch induzierte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erneut als kapazitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom interpretiert wurde.

Tabelle 10 vergleicht die durch 2-MeSATP mobilisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge (Fläche unter den Gipfeln der Antwortamplitude) bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen und rP2Y<sub>1</sub>-eGFP bzw. rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor transfizierten Zellen, sowie den durch diese Speicherentleerung induzierten kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Es läßt sich feststellen, daß ein identischer Stimulus bei den transfizierten Zellen zu einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speichern führt, als bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen. Damit korreliert das Ausmaß des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms, das direkt vom Entleerungsgrad der intrazellulären Speicher abhängt. Eine naheliegende Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten ist die erhöhte Expressionsrate bzw. P2Y<sub>1</sub>-Rezeptordichte der transfizierten Zellen im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle.

**Tabelle 10: Vergleich der freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen**

Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge (Fläche unter der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude), die bei den einzelnen Zelllinien durch  $100 \mu\text{M}$  2-MeSATP aus internen Speichern freigesetzt wurde bzw. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge des nachfolgenden kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (Abbildung 25). Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$ SEM der Probenmenge  $N > 40$  aus jeweils 2 Experimenten.

Zelllinie	2-MeSATP	kapazitiver Einstrom
	Mittelwerte der Fläche	
HEK293	$12.1 \pm 0.8$	$5.1 \pm 1.1$
HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	$21.9 \pm 1.1$	$37 \pm 3.3$
HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	$19.4 \pm 0.7$	$53.6 \pm 2.7$



**Abbildung 26: Einfluß der 2-MeSATP induzierten Speicherentleerung auf den kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei den Zelllinien HEK293, HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt und HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP**

Unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen wurden Fura-2 beladene Zellen mit 2-MeSATP (5 min,  $100 \mu\text{M}$ ) stimuliert. Nachdem der induzierte  $\text{Ca}^{2+}$  Transient die basale  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erreichte, wurde auf  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiges ( $1.8 \text{ mM}$ ) Medium gewechselt und der einsetzende kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom beobachtet. Die gezeigten Originalkurven zeigen den zelltypische Verlauf und wurden an  $N > 35$  Zellen in 2 Experimenten pro Zelllinie beobachtet.

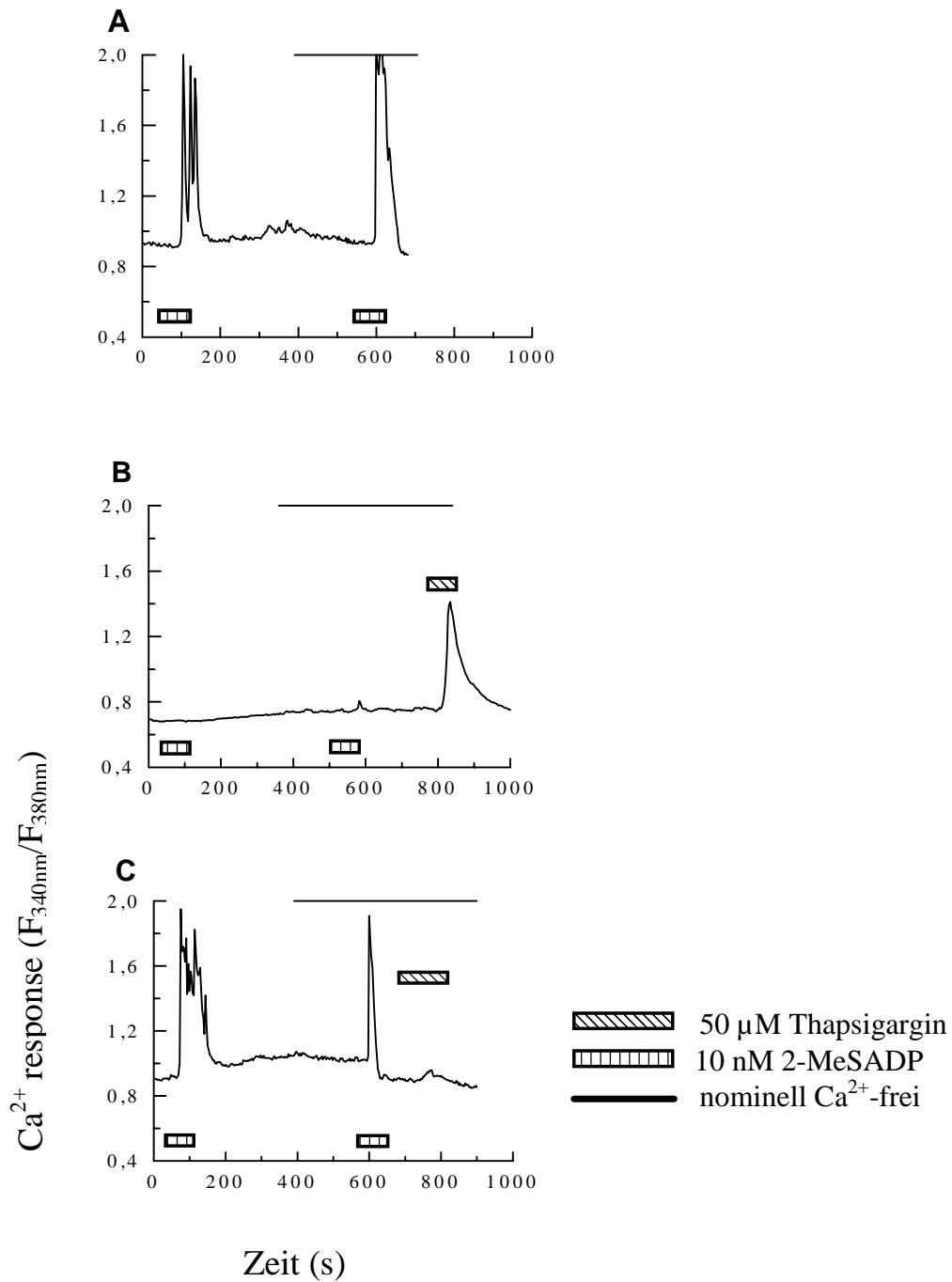
### 3.15 Phospholipase C (PLC) –Kopplung der in HEK293 Zellen exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren

Die PLC/InsP<sub>3</sub>-Kopplung der endogenen, purinergen Rezeptoren in HEK293 Zellen wurde bereits von Schachter et al. 1996 [36] gezeigt. Der Kontrolle und Charakterisierung der Signaltransduktionskaskade heterolog exprimierter GPCR kommt bei der Etablierung klonaler Zelllinien eine besondere Bedeutung zu [138,4], deshalb wurde die korrekte PLC-Kopplung der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren in den transfizierten HEK Zellen in Experimenten mit Heparin und U73122 überprüft.

Heparin ist ein nicht-membranpermeables Protein mit einem MW von 13,5 – 15 kDa und wirkt als InsP<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist, U73122 {1-[6-((17β-3-Methoxyöstra-,1,3,5, (10)-trien-17-yl) amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion]} hemmt Aktivierung der PLCβ (IC<sub>50</sub> im niedrigen μM-Bereich). Zur Beladung der Zellen mit Heparin (200 μg/ml) wurden auf Deckgläschen kultivierte, P2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK Zellen einer Elektroporation [118] unterzogen. Um Zellen identifizieren zu können die Heparin aufgenommen hatten, wurde die eingesetzte Heparinverdünnung mit Texas-Red® konjugiertem Dextran (Verhältnis 1:5) gemischt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen mit Fura-2 beladen und in die Ca<sup>2+</sup>-Messungen eingesetzt. In Abbildung 26 ist der Einfluß von Heparin auf die durch 10 nM 2-MeSADP induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten in rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen dargestellt. Im Gegensatz zur durch 2-MeSADP ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-Antwort un behandelter Zellen (Abbildung 27A) konnte in mit Heparin behandelten Zellen durch 2-MeSADP keine Ca<sup>2+</sup>-Antwort ausgelöst werden (Abbildung 27B). Thapsigargin, ein Inhibitor der SERCA, war jedoch in der Lage die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient zu erhöhen. Diese Befunde zeigen, daß die ausbleibende Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf den 2-MeSADP-Stimulus nicht auf leere Ca<sup>2+</sup>-Speicher zurückzuführen ist, sondern auf die antagonistische Wirkung von Heparin am InsP<sub>3</sub>-Rezeptor.

Um eine Hemmung der durch Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch die Elektroporation allein auszuschließen, wurden zusätzlich Zellen nur mit Texas-Red konjugiertem Dextran beladen und stimuliert. Wie Abbildung 27 zeigt, war die durch 2-MeSADP ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-Antworten gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert. Die quantitative Auswertung dieser Experimente ist in Tabelle 11 zusammengefasst.





**Abbildung 27: Hemmung der durch 2-MeSADP-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antwort durch Heparin**

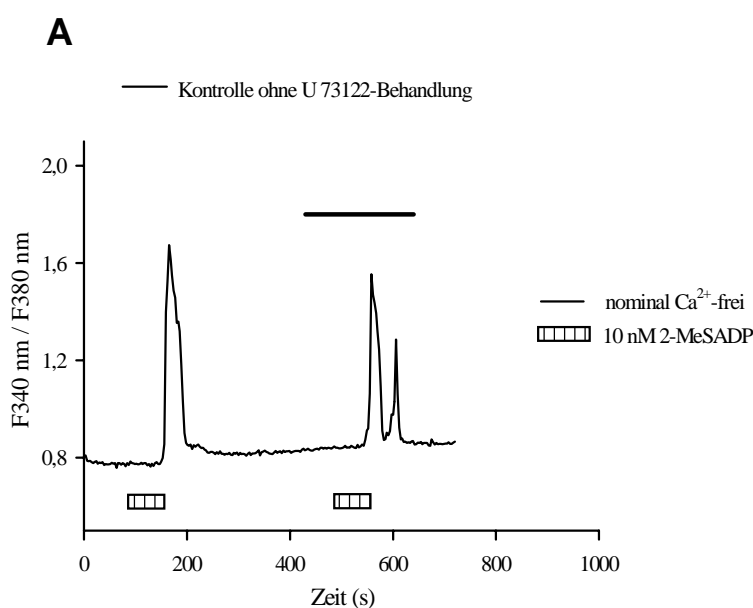
A) Unbehandelte HEK293 rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen wurden unter Ca<sup>2+</sup>-haltigen und Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen für jeweils 1 min mit 2-MeSADP stimuliert. B) mit Heparin durch Elektroporation beladene HEK293 rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen bei identischen Stimulationsbedingungen und Kontrolle der Ca<sup>2+</sup>-Speicherfüllung durch Thapsigargin C) Stimulation von HEK 293 rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen, die nur mit TexasRed Dextran als Kontrolle der Elektroporationsbedingungen beladen wurden. Die Linienmarkierungen in A, B und C geben Zugabezeitpunkt und –dauer der entsprechend bezeichneten Substanzen an.

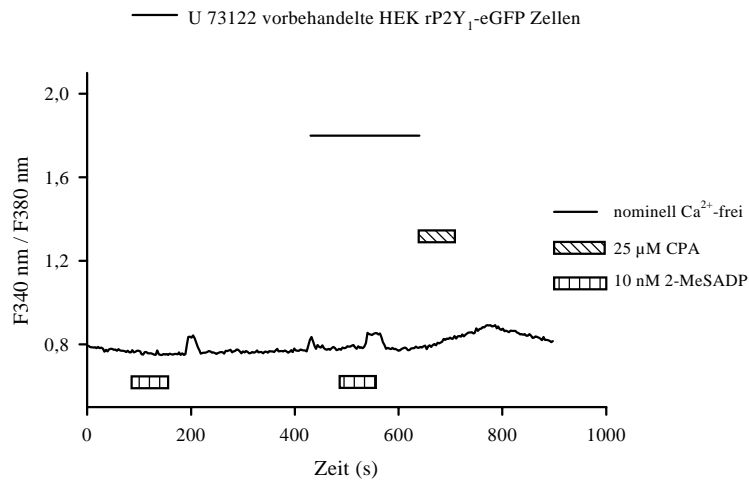
**Tabelle 11: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Heparinexperimente mit HEK293 rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen**

Unbehandelte (A) und Heparin (B) und/oder nur Dextran TexasRed Konjugat (C) beladene rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK Zellen wurden mit 10 nM 2-MeSADP in Ca<sup>2+</sup>-haltigem (1.8 mM) Medium stimuliert. Ausgewertet wurden die Antwortamplituden und als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Der Stichprobenumfang N wurde in 2-3 Einzelexperimenten erhoben.

	unbehandelte Kontrolle A	Heparin 200 µg/ml B	Elektroporations- Kontrolle C
Ca <sup>2+</sup> -Antwort Δ(F <sub>340 nm</sub> /F <sub>380 nm</sub> ) ±SEM	0.528 ±0.05	0.05 ±0.01	0.68 ±0.04
Reagierende Zellen	86%	9.5%	90.5%
Exp	2	3	3
N	66	96	138

Um die Beteiligung der PLCβ am Signaltransduktionsprozeß direkt zu zeigen wurden rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK293 Zellen mit 2-MeSADP ohne (Kontrolle) und nach einer Vorbehandlung (30 min, 37°C ) mit U 73122 (10 µM) stimuliert. Die Messungen erfolgten unter Ca<sup>2+</sup>-haltigen und nominell Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen. Die Ca<sup>2+</sup>-Antworten die bei vorbehandelten Zellen (Abbildung 27B) durch 2-MeSADP ausgelöst werden konnten sind im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 28 A) nahezu verschwunden. Analog zu den Heparin-Experimenten induzierte der SERCA-Inhibitor CPA (Cyklopiazon Säure) bei U 73122 behandelten Zellen eine transiente Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Abbildung 28 B).



**B****Abbildung 28: Hemmung der 2-MeSADP induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort durch U 73122**

Die Originalspuren in A und B zeigen  $\text{rP2Y}_1$ -eGFP HEK293 Zellen, die unter nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien bzw.  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Bedingungen mit 10 nM 2-MeSADP stimuliert wurden. A zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten un behandelter Zellen, B die Antworten der mit U 73122 behandelten Zellen, wobei der Füllungszustand der internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch CPA überprüft wurde. Die Linienmarkierungen und die entsprechende Beschriftung geben Zeitpunkt und Art der Zugabe an. Der Kurvenverlauf ist typisch und wurde vergleichbar an  $N > 30$  Zellen in je 2 Experimenten beobachtet.

### 3.16 Wirksamkeit verschiedener strukturanaloger ATP-Verbindungen an den $\text{P2Y}_1$ -Rezeptoren

Bestimmte ATP-Derivate, wie z.B. 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP (Bz-ATP) [139] besitzen strukturelle Eigenschaften, die zum Nachweis von  $\text{P2Y}$ -Rezeptoren verwendet werden können. In der Absicht weitere ATP-Derivate zu identifizieren, die z.B. während einer  $\text{P2Y}_1$ -Aufreinigungsprozedur zur Affinitätschromatographie oder zur Photoaffinitätsmarkierung eingesetzt werden können, wurden verschiedene Verbindungen auf ihre agonistische Wirksamkeit an den in den HEK293-Zelllinien exprimierten  $\text{rP2Y}_1$ -Rezeptoren getestet. In Betracht kommen hier vor allem ATP-Derivate, die durch ihre Modifikation Fluoreszenzeigenschaften (z.B. Ethenoderivate) erhalten bzw. durch eine reaktive Gruppe an das Rezeptorprotein kovalent gekoppelt werden können (Azidoderivate). Eine weitere sehr interessante Modifikation beruht auf der Wechselwirkung von Biotin und Avidin, die häufig in Immunoassays, in der Affinitätschromatographie und anderen bioanalytischen Detektionssystemen ausgenutzt wird. 2-Azido- $\epsilon$ -ATP und 2-Az/Biotin-ATP sind Derivate der

ATP-Verbindung 1,N 6-Ethenoadenosin 5'-triphosphate ( $\epsilon$ -ATP), die an der 2- Stellung des Purinrings modifiziert sind (zur Nummerierung im Purinring s.a. Abbildung 2).

**Tabelle 12: Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$  Antwortenamplituden die durch verschiedene Agonisten (10  $\mu\text{M}$ ) der P2Y Rezeptoren ausgelöst wurden.**

Vergleich der agonistischen Wirksamkeit verschiedener Nukleotide bzw. verschiedener strukturanaloger Verbindungen (Konzentration 10  $\mu\text{M}$ ) an P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die durch die verschiedenen Substanzen ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$  Antworten wurden an Fura-2 beladenen Zellen der nicht-transfizierten HEK293, rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten und rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zelllinien gemessen. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  SEM der Amplituden der ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten. Der Probenumfang N ist in Klammern angegeben und resultiert aus insgesamt 2 Experimenten.

Agonist	HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	HEK293
2-MeSADP	1.26 $\pm$ 0.04 (110)	1.48 $\pm$ 0.06 (66)	1.18 $\pm$ 0.04 (116)
ATP	1.08 $\pm$ 0.03 (70)	1.71 $\pm$ 0.04 (112)	1.02 $\pm$ 0.04 (98)
$\epsilon$ ATP	0.65 $\pm$ 0.03 (72)	1.49 $\pm$ 0.05 (50)	0.68 $\pm$ 0.05 (68)
Az $\epsilon$ ATP	0.57 $\pm$ 0.04 (23)	0.7 $\pm$ 0.04 (26)	0.54 $\pm$ 0.04 (26)
UTP	0.91 $\pm$ 0.02 (218)	0.71 $\pm$ 0.04 (40)	0.91 $\pm$ 0.05 (25)

Werden ATP, 2-MeSADP bzw. Derivate  $\epsilon$ -ATP und Az- $\epsilon$ ATP in identischer Konzentration eingesetzt, zeigt sich daß die Derivate in den Zelllinien deutlich niedrigere  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplituden auslösen. (Tabelle 12). Bei rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen induzieren 2-MeSADP und  $\epsilon$ -ATP nahezu identische  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten, während die durch 10  $\mu\text{M}$  Az- $\epsilon$ -ATP induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort ungefähr der eines 10  $\mu\text{M}$  UTP Stimulus entspricht. Die getesteten ATP-Derivate besitzen damit die Fähigkeit P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen zu stimulieren, jedoch mit einer geringeren Effizienz als 2-MeSADP bzw. ATP. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die physiologische Wirkung eines 2-Az-8-Biotin-ATP Derivats bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen und bei Bronchialepithelzellen (HBE-Zellen) [140,141] untersucht. Unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus Fura-2 Messungen an HBE-Zellen zeigen, daß in dieser Zelllinie vor allem P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimiert werden. P2Y<sub>1</sub>-spezifische Agonisten (z.B. 2-MeSADP) lösen praktisch keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort aus (Tabelle 13). Vergleicht man die in Tabelle 13 dargestellten Meßwerte ( $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplituden) für 2-MeSADP (10  $\mu\text{M}$ ) und UTP (1  $\mu\text{M}$ ) bei HBE-Zellen, sprechen die Werte für eine niedrige P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorexpression im Vergleich zur vorhandenen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptormenge. Diese Eigenschaft der HBE-Zellen wurde ausgenutzt, um die Rezeptorspezifität des 2-Az-8-Biotin-ATP Derivats zu untersuchen.

**Tabelle 13: Vergleich der 2-Az/Biotin-ATP Wirkung auf HBE und rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK Zellen**

Fura-2 beladene HBE-Zellen bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierte HEK Zellen wurden mit 2-MeSADP, UTP oder 2-Az/Biotin-ATP stimuliert. Aufgetragen sind die erhaltenen Mittelwerte  $\pm$  SEM der Ca<sup>2+</sup>-Antwortamplituden. Die Mittelwerte wurden aus jeweils insgesamt > 40 Zellen aus 2-3 Experimenten ermittelt.

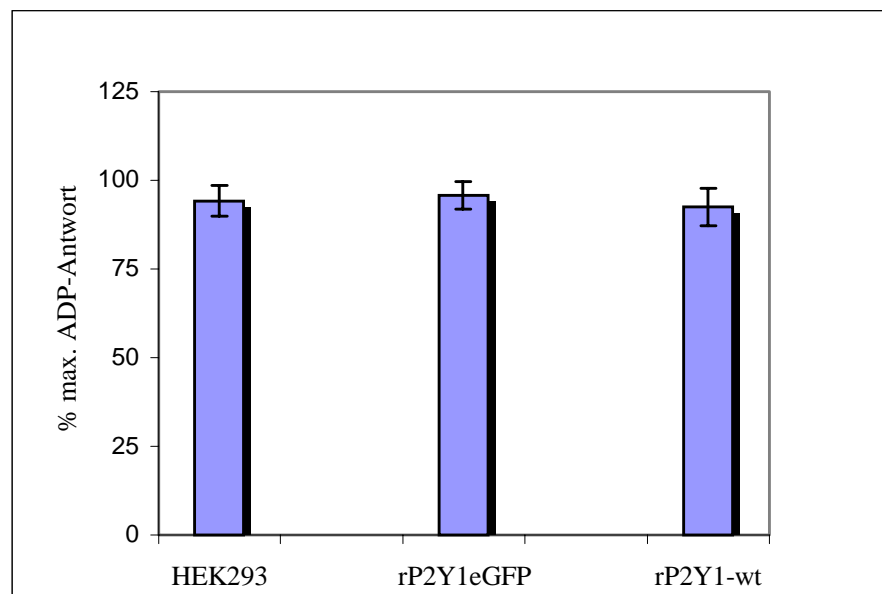
Zelllinie	2-MeSADP		UTP	2-Az/Biotin-ATP
	30 nM	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	1 $\mu$ M
HBE		0.21 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.04
rP2Y <sub>1</sub> - eGFP HEK293	0.62 $\pm$ 0.02		0.37 $\pm$ 0.1	0.51 $\pm$ 0.01

Der durch 2-Az/Biotin-ATP ausgelöste Effekt ist bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK293 Zellen konzentrationsabhängig (nicht dargestellt) und erreicht bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M einen Wert der größer ist als die durch 1  $\mu$ M UTP ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Antwort (Tabelle 13). Bei HBE-Zellen ist die durch 2-Az/Biotin-ATP (1  $\mu$ M) ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Antwort signifikant kleiner als die durch 1 $\mu$ M UTP induzierte Antwort. Der Vergleich der Amplitudengröße der Ca<sup>2+</sup>-Antworten, die durch 2-Az/Biotin-ATP (1  $\mu$ M) bei HBE-Zellen bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen ausgelöst werden, deutet eine Präferenz von 2-Az/Biotin-ATP für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren an. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von Fura-2 Messungen unterstützt, die von Mitarbeitern (M. Ritzmann [142] und G. Zündorf) an unserem Institut mit unterschiedlichen 2- bzw. 8-substituierten ATP-Derivaten durchgeführt wurden. Auch hier zeigen 2-substituierte ATP-Derivate eine gewisse Präferenz für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren gegenüber P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren.

Festzuhalten bleibt, daß die getesteten ATP-Derivate bei den HEK293 Zelllinien in physiologisch relevanten Konzentrationen spezifische Effekte auslösen. 2-Az/Biotin-ATP ist auf Grund seiner physiologischen Wirksamkeit und biochemischen Eigenschaften eine interessante Substanz für den Einsatz in affinitätschromatographischen Schritten zur Aufreinigung von P2Y-Rezeptoren.

### 3.17 Beteiligung von $G_{q/11}$ -Protein an der Signaltransduktion der $rP2Y_1$ -Rezeptoren in HEK293 Zellen

Die heterologe GPCR-Expression führt in den Wirtszellen oft zu einer stark erhöhten Rezeptorproduktion, die u.a. die Bindung untypischer G-Proteine an die GPCR bewirken kann. Die Aktivierung der GPCR führt dann zu Aktivierung von G-Proteinen, die normalerweise an der rezeptoreigenen Signaltransduktion nicht beteiligt sind [143,138]. Pertussis Toxin (PTX) aus *Bordetella pertussis*, ein Endotoxin das die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen der Klassen  $G_i$ ,  $G_o$  und  $G_t$  katalysiert, besteht aus zwei Untereinheiten und wird aktiv in die Zelle aufgenommen. Üblicherweise werden in PTX-Experimenten die Zellen für 12-24 h mit PTX (100 ng/ml) vorbehandelt. In Abbildung 29 sind die Mittelwerte der  $Ca^{2+}$ -Antwortamplituden dargestellt, die durch einen 10  $\mu$ M ADP-Stimulus in Zellen nach PTX-Vorbehandlung ausgelöst werden konnten. Diese Mittelwerte sind in Prozent der Maximalantwort angegeben, die 10  $\mu$ M ADP bei den jeweiligen Zellen ohne PTX-Behandlung auslösen kann. Bei keiner der Zelllinien führte die PTX-Behandlung zur signifikanten Reduktion der  $Ca^{2+}$  Antworten.



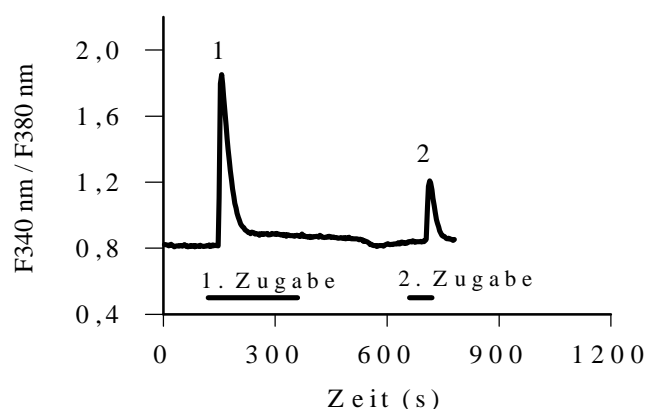
**Abbildung 29: PTX-Wirkung auf die durch ADP induzierte  $Ca^{2+}$ -Antwort**

Um die Beteiligung anderer G-Proteine als der zu erwartenden  $G_{q/11}$ -Proteine an der Signaltransduktion der  $P2Y_1$ -Rezeptoren in HEK293 zu untersuchen, wurden Fura-2 beladene Zellen mit 10  $\mu$ M ADP stimuliert (1 min). Die Zellen wurden mit PTX-Vorbehandlung (100 ng/ml; für 24h) oder ohne Vorbehandlung (Kontrolle) in die Experimente eingesetzt. Die ADP-Antworten sind in Prozent der ADP-Maximalantworten (Kontrolle) angegeben. Die Mittelwerte der Antwortamplituden  $\pm$ SEM wurden aus der Stichprobenmenge  $N > 45$  Zellen aus 2 Experimenten ermittelt.

Dieser Befund belegt, daß an der Signaltransduktion der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in den HEK293 Zelllinien keine durch PTX hemmbaren G-Proteine beteiligt sind, d.h. sehr wahrscheinlich gehören die beteiligten G-Proteine also der Klasse G<sub>q/11</sub> an. Die heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren – ebenso wie die endogen vorhandenen hP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren – der transfizierten bzw. nicht-transfizierten Zellen koppeln an G<sub>q/11</sub> und die Überexpression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen führt offensichtlich nicht zur Rekrutierung von G-Proteinen anderer Klassen.

### 3.18 Experimente zum Desensitisierungsverhalten des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in den verschiedenen HEK293 Zelllinien

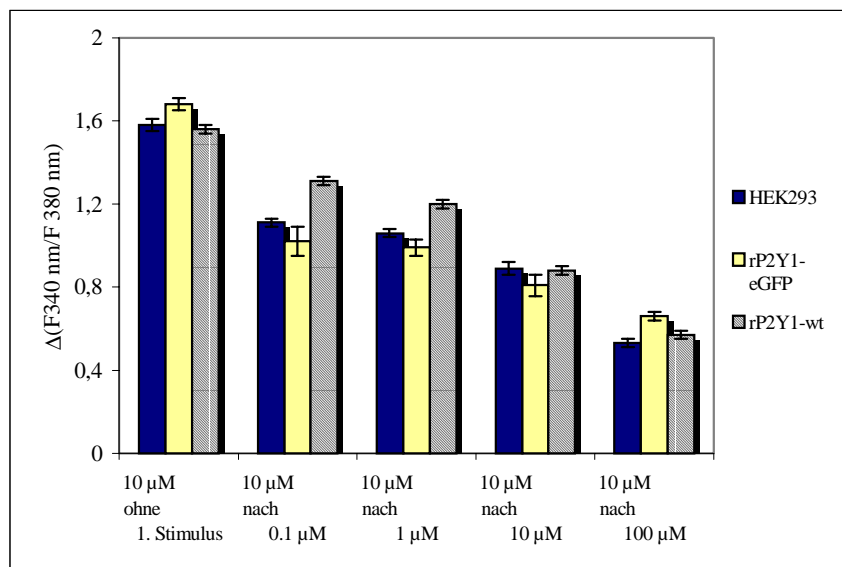
Die Expression und der funktionelle Zustand von GPCR sind stark reguliert. Über Genaktivierung bzw. -repression und posttranskriptionelle Mechanismen (z.B. Destabilisierung der mRNA) wird das Expressionsniveau der GPCR kontrolliert. Die posttranslationale Regulation der GPCR wird von Proteinphosphorylierungsvorgängen dominiert. Dabei sind die GPCR Substrate verschiedener Proteinkinasen wie z.B. PKA, PKC, GRKs und RTKs [144]. Phosphorylierte Rezeptoren unterliegen bei ihrer Regulation bestimmten Transportvorgängen zu denen u.a. die Internalisierung und das Rezeptorrecycling zählen [145]. Als „homolog“ wird die Desensitisierung bezeichnet, wenn GPCR in Folge ihrer Aktivierung durch Agonisten inaktiviert werden. Von der „homologen“ wird die „heterologe Desensitisierung“ unterschieden, der auch nicht-aktivierte GPCR unterworfen werden.



**Abbildung 30: Beispielkurve zur Durchführung der Desensitisierungsexperimente**

Fura-2 beladene Zellen wurden insgesamt zweimal mit 2-MeSATP stimuliert und die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antworten bestimmt. Die 1. Agonistzugabe erfolgte, um eine Rezeptordesensitisierung zu initialisieren. Mit der 2. Zugabe wurde das Ausmaß des Desensitisierungseffekts bestimmt. (Näheres siehe Text).

Zur Untersuchung der homologen Desensibilisierung wurden die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten in den unterschiedlichen HEK Zelllinien gemessen, die durch die sequentielle, zweimalige Zugabe von 2-MeSATP induziert wurden (Abbildung 30). Zwischen erster und zweiter Agonistzugabe wurden die Zellen für 5 min mit NaHBS umspült (Flußrate 2 ml/min), um eine Wiederfüllung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu gewährleisten. Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit des Desensibilisierungseffekts wurde bei der ersten Stimulation die Agonistkonzentration variiert (Abbildung 31), während die zweite Zugabe mit einer konstanten ( $10 \mu\text{M}$ ) Agonistkonzentration erfolgte. Ausgewertet wurden die Amplituden der zweiten - durch  $10 \mu\text{M}$  2-MeSATP induzierten -  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in Abhängigkeit von der 2-MeSATP Konzentration des ersten Stimulus in den verschiedenen HEK Zelllinien. Aus Abbildung 31 wird deutlich, daß in den drei verschiedenen HEK293 Zelllinien die Amplitude einer nachfolgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in Abhängigkeit von der Agonistkonzentration des ersten Stimulus abnimmt, d.h. desensibilisiert. Ferner wurde untersucht, in wieweit die Desensibilisierung von der Dauer des initialen Stimulus abhängig ist. Hierfür wurden die Zellen wiederholt mit  $10 \mu\text{M}$  2-MeSATP stimuliert, wobei die Zeitdauer der initialen Stimulation zwischen 1 und 15 min variiert wurde. Zwischen den beiden Stimulationen wurden die Zellen für 5 min mit NaHBS gewaschen. Abbildung 32 zeigt die in HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen beobachtete Reduktion der zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer des ersten Stimulus. Vergleichbare Ergebnisse wurden sowohl für nicht-transfizierte HEK293 Zellen als auch für HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt Zellen gefunden (Daten nicht dargestellt).

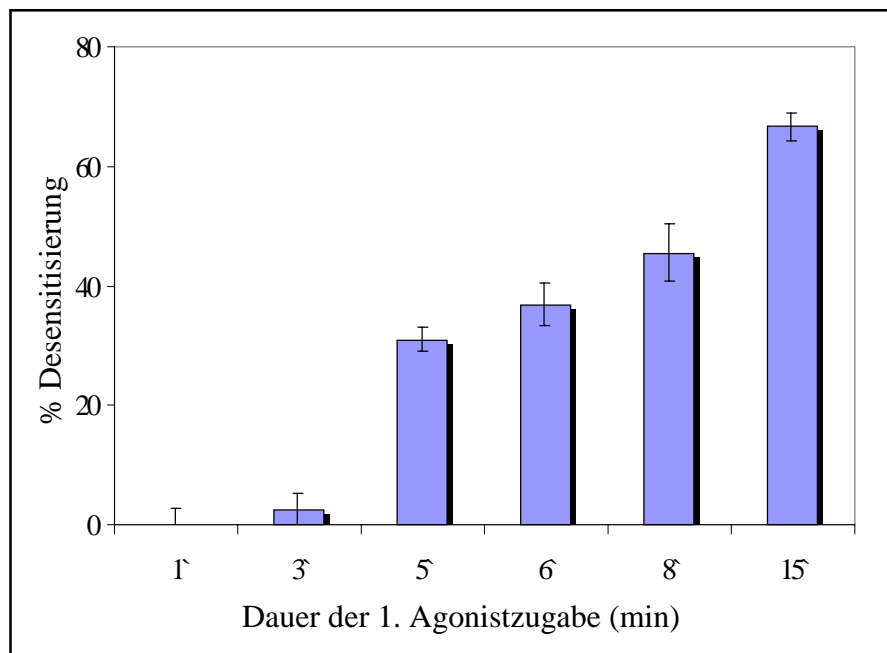


**Abbildung 31: Konzentrationsabhängigkeit der agonist-induzierten Desensibilisierung**

Das Ergebnis einer Serie von  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen, bei der ansteigende Agonistkonzentrationen zur Desensibilisierung eingesetzt wurden, ist in dieser Abbildung für die drei HEK Zelllinien zusammengestellt. Dargestellt sind die Amplituden der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten ( $\text{F}340 \text{ nm}/\text{F}380 \text{ nm}$ ), die durch einen  $10 \mu\text{M}$  2-MeSATP Puls ausgelöst wurden. Diesem Stimulus ging eine 2-MeSATP Stimulation (3 min) voraus, die mit unterschiedlichen 2-MeSATP Konzentrationen ( $0.1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$ ) durchgeführt wurde, um den Einfluß der Agonistkonzentration auf den Grad der Rezeptordesensibilisierung zu überprüfen. Der Stichumfang N pro Bedingung > 70 Zellen, in 2-5 Experimenten gemessen.



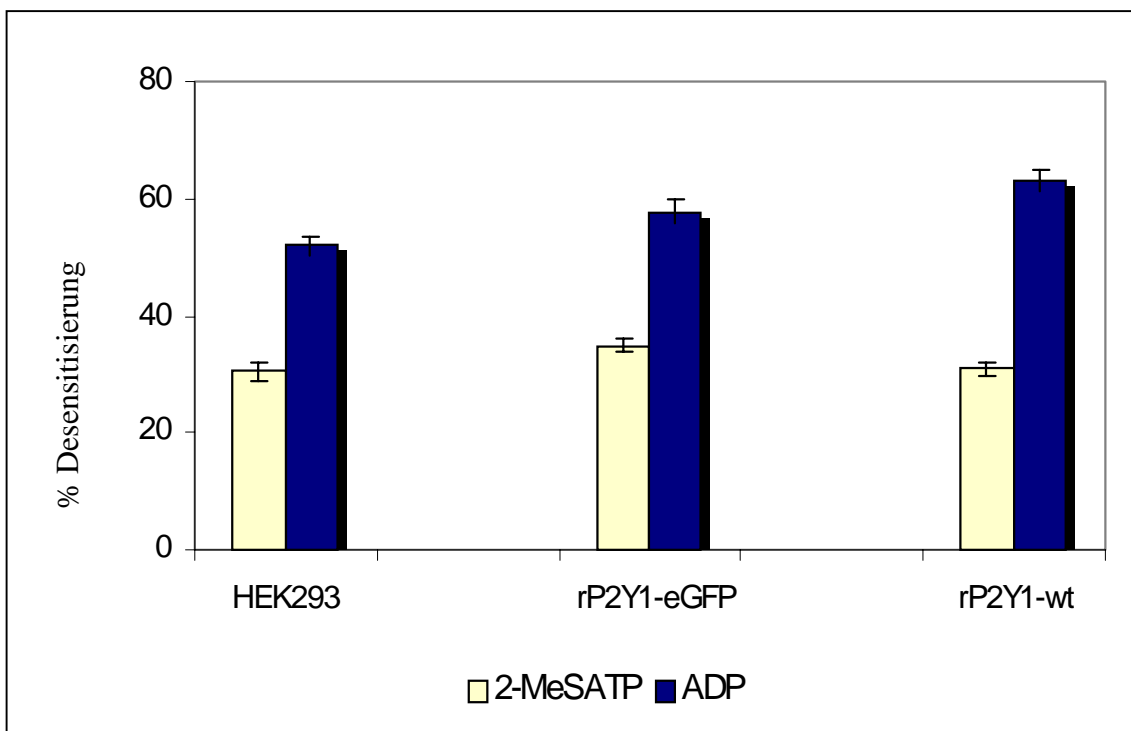
Die maximale, durch 2-MeSATP-induzierte Desensibilisierung wurde nach einer Stimulationsdauer von 15 min erreicht. Die Kinetik des Desensibilisierungsprozesses flacht nach etwa 5 min Dauer ab, d.h. möglicherweise gliedern die unterschiedlichen, am Desensibilisierungsprozess beteiligten Komponenten den Vorgang in zwei Phasen: einer „schnellen“ (z.B. Phosphorylierung) und einer „langsamen“ Phase, die zur weiteren Desensibilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort führt.



**Abbildung 32: Einfluß der Stimulationsdauer auf das Ausmaß der agonist-induzierten Desensibilisierung**

Dargestellt ist die Agonist-induzierte Desensibilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude, die bei HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen durch 2-MeSATP ausgelöst wurde. Dazu wurden die HEK Zellen mit zwei aufeinanderfolgenden Pulsen 2-MeSATP stimuliert. 2-MeSATP wurde jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt und zwischen erstem und zweitem Puls erfolgt eine Waschphase von 5 min. Der erste, zur Rezeptordesensibilisierung eingesetzte 2-MeSATP Stimulus wurde in seiner Zeitdauer variiert (1-15 min). Die entsprechende Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde als maximal auslösbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (100 %) gewertet. Die Amplitude der zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort wurde auf diesen Kontrollwert (100 %) normiert. Die Differenz zwischen Kontrollwert und der normierten zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort (% der Kontrolle) repräsentiert die Reduktion der zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude gegenüber der Amplitude des ersten Stimulus. Aus diesem Grund kann diese Differenz als Maß für die Agonist-induzierte Rezeptordesensibilisierung (% Desensibilisierung) gewertet werden. Im Diagramm ist die prozentuale Reduktion der zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude (% Desensibilisierung) in Abhängigkeit von der Zeitdauer des ersten 2-MeSATP Stimulus aufgetragen. Der Stichprobenumfang N entspricht pro Bedingung > 70 Einzelzellen, die in jeweils 2-5 Experimenten gemessen und zur Ermittlung der dargestellten Mittelwerte  $\pm$  SEM herangezogen wurden.

Um die Spezifität der beobachteten Desensibilisierungseffekte zu überprüfen, wurden zusätzlich Experimente mit Cyclopiazonsäure (CPA ; 20 bzw 40  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Mit diesen Versuchen sollte ausgeschlossen werden, daß die beobachtete Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplituden auf der experimentell erzeugten Entleerung bzw. dem veränderten Füllungszustand der internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher beruht. Hierfür wurde die Fläche des Transienten der CPA-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten verglichen, der mit oder ohne vorhergehende 2-MeS-ATP Stimulation und der anschließenden Waschphase auslöst wurde. Bei den nicht-transfizierten HEK293 und den HEK P2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen lag die durch CPA freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge nach einem 2-MeSATP-Stimulus (100  $\mu\text{M}$ ) zwischen 80 und 100% der durch CPA allein freisetzbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge. Bei HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt konnten dagegen nach einer Stimulation nur noch ca. 60% der maximal durch CPA freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge aus den Speichern freigesetzt werden (nicht dargestellt).



**Abbildung 33: Vergleich des durch 10  $\mu\text{M}$  ADP bzw. 10  $\mu\text{M}$  2-MeSATP-induzierten Desensibilisierungseffekts bei den HEK293 Zelllinien**

Im Diagramm ist die Reduktion der durch ADP bzw. 2-MeSATP ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude der Zweitantwort aufgetragen (% Desensibilisierung; analog zu Darstellung in Abbildung 32), die durch eine vorhergehende Stimulation der Zellen induziert wurde. Die Experimente wurden mit den Zelllinien HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP, HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt und nicht-transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt. Die dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  SEM, die aus dem Stichprobenumfang  $N > 100$  Einzelzellen pro Bedingung (aus 2-5 Experimenten) berechnet wurden.

Wurden ADP und 2-MeSATP in gleicher Konzentration zur Desensibilisierung eingesetzt (Abbildung 33), war der durch die ADP-Stimulation induzierte Desensibilisierungseffekt bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort der einzelnen HEK Zelllinien größer als der durch 2-MeSATP ausgelöste. Bei den transfizierten Zelllinien HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP und HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt war der durch den P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten ADP induzierte Desensibilisierungseffekt jedoch nicht signifikant größer als bei den nicht-transfizierten HEK293 Zellen.

**Tabelle 14: Füllung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher nach ADP-Stimulation**

Die durch CPA freisetzbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern wurde ohne vorhergehende Stimulation (Kontrolle) bzw. nach Stimulation mit ADP bestimmt. Dazu wurden Fura-2 beladenen Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  ADP (4 min) stimuliert und einer Waschphase zur Wiederbefüllung der Speicher unterzogen und dann mit 40  $\mu\text{M}$  CPA (3 min) superfundiert. Die Fläche des Transienten, der durch den CPA-Puls nach ADP-Stimulus ausgelöst wurde, wurden auf die Fläche des CPA-Pulses der Kontrolle normiert und ist Prozentangabe in der Tabelle angegeben.

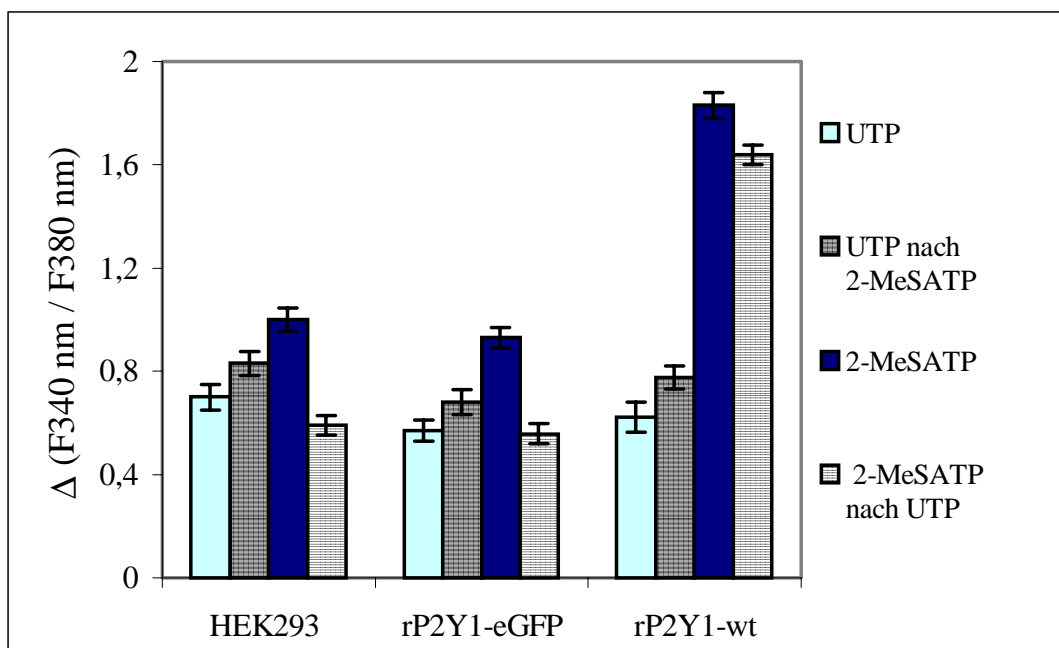
Zelllinie/ Fläche <sup>2</sup>	%
HEK 293	108
HEK rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	89
HEK rP2Y <sub>1</sub> -wt	112

Der durch CPA (40  $\mu\text{M}$ , 3 min) freisetzbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Anteil aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern nach dem ADP-Stimulus beträgt bei allen Zelllinien ca. 90 –110 % der  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, die ohne vorhergehenden ADP-Stimulus durch CPA freigesetzt werden kann (Tabelle 14). Die beobachtete Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwortamplitude des 2. Stimulus beruht unter den eingesetzten Versuchsbedingungen daher nicht auf einer Entleerung der Speicher, sondern auf der agonist-induzierten Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren.

<sup>2</sup> Es wurde die Fläche unter dem transienten „Amplitudengipfel“ (peak) der Kurve ( $F_{340\text{ nm}}/F_{340\text{ nm}}$ ) ausgewertet. Diese Fläche korreliert mit der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die durch die CPA-Gabe ausgelöst wurde. Die Flächeneinheiten sind relative Einheiten.

### 3.19 Heterologe Desensibilisierung zwischen P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zelllinien

Die Messungen wurden in Anlehnung an die Desensibilisierungsexperimente (Abbildung 30) durchgeführt. Zur heterologen Desensibilisierung wurden die Agonisten 2-MeSATP (1  $\mu$ M) bzw. UTP (10  $\mu$ M) eingesetzt. Mit der ersten Agonistzugabe (3 min) wurde die Rezeptordesensibilisierung eingeleitet, die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher durch eine Waschperiode (5 min) wiederbefüllt und der Desensibilisierungseffekt mit der zweiten Agonistzugabe (3 min) überprüft. UTP und 2-MeSATP wurden immer kombiniert eingesetzt. Dies bedeutet: bei Zellen die zuerst mit UTP zur Rezeptordesensibilisierung stimuliert wurden, erfolgte die Überprüfung des Desensibilisierungseffekts durch 2-MeSATP. Wurde umgekehrt mit 2-MeSATP desensibilisiert, erfolgte die Überprüfung der heterologen Desensibilisierung mit UTP. Ausgewertet wurden die Antwortamplituden, die durch die einzelnen Agonistzugaben ausgelöst wurden. Die Werte der Antwortamplituden sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM für die einzelnen Zelllinien angegeben



**Abbildung 34 : Heterologe Desensibilisierung der P2Y-Rezeptoren in HEK293 Zelllinien**

Fura-2 beladene Zellen der nicht-transfizierten HEK293 Zellen und der transfizierten Zelllinien rP2Y<sub>1</sub>-eGFP bzw. rP2Y<sub>1</sub>-wt wurden mit UTP (10  $\mu$ M) und 2-MeSATP (1  $\mu$ M) stimuliert und die Amplituden der induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten gemessen. UTP und 2-MeSATP wurden jeweils kombiniert als erster bzw. zweiter Agonist eingesetzt. Angegeben sind die initialen Ca<sup>2+</sup>-Antworten durch UTP und 2-MeSATP bzw. die Agonist-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten nach vorausgehender Desensibilisierung. Diese Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM der gemessenen Antwortamplituden aufgetragen, die aus der Stichprobenmenge N >40 Einzelzellen pro Bedingung aus 2-3 Experimenten ermittelt wurden.

Bei den untersuchten HEK293 Zelllinien ist die Amplitude der 2-MeSATP Antwort nach einer Stimulation mit UTP reduziert. Die Amplitude der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort einer Stimulation mit UTP, die einer 2-MeSATP Stimulation der Zellen folgte, war jedoch nicht reduziert (Abbildung 34). Dieser Effekt ist am deutlichsten bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen zu beobachten, bei den transfizierten Zelllinien HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP und HEK rP2Y<sub>1</sub>-wt ist dieser Effekt weitaus geringer. Die UTP-Antwortamplitude ist bei allen Zelllinien vergleichbar groß, während die 2-MeSATP-Antwortamplitude bei den rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen deutlich größer ist als die bei HEK293 oder rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen.

Identische Experimente in denen ADP (1  $\mu\text{M}$ ) an Stelle von 2-MeSATP eingesetzt wurde bestätigen diese Ergebnisse (nicht dargestellt).

### **3.20 Proteinphosphorylierung und P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorregulation**

Viele Rezeptoren können und werden über ihren Phosphorylierungszustand in ihrer Aktivität reguliert. Es hat sich herausgestellt, daß eine länger anhaltende Aktivierung der Rezeptoren zur Phosphorylierung dieser Rezeptoren führen und eine Rezeptordesensitisierung induzieren kann. Diese Phosphorylierung erfolgt zum einen durch spezielle G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen GRK [20,146,147], kann aber auch durch „second messenger“ Kinasen, wie z.B. CamK oder PKC erfolgen. [148,149,150].

#### **3.20.1 Beteiligung von Proteinkinase C (PKC) und Calmodulin aktivierter**

##### **Kinase (CamK) an der Regulation von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293-Zellen**

Das Ergebnis der Proteinsequenzanalyse des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors legt die Beteiligung von PKC und CamK an der Regulation des Rezeptors nahe, da Sequenzmotive für potentielle Erkennungsbereiche im C-terminalen bzw. den intrazellulären Schleifen des Rezeptors (s.a. Abbildung 10) liegen. Das C-terminale Ende und die dritte intrazelluläre Schleife sind bei GPCR allgemein funktionell wichtige Bereiche, die z.B. bei der G-Protein Bindung eine Rolle spielen [151,152].

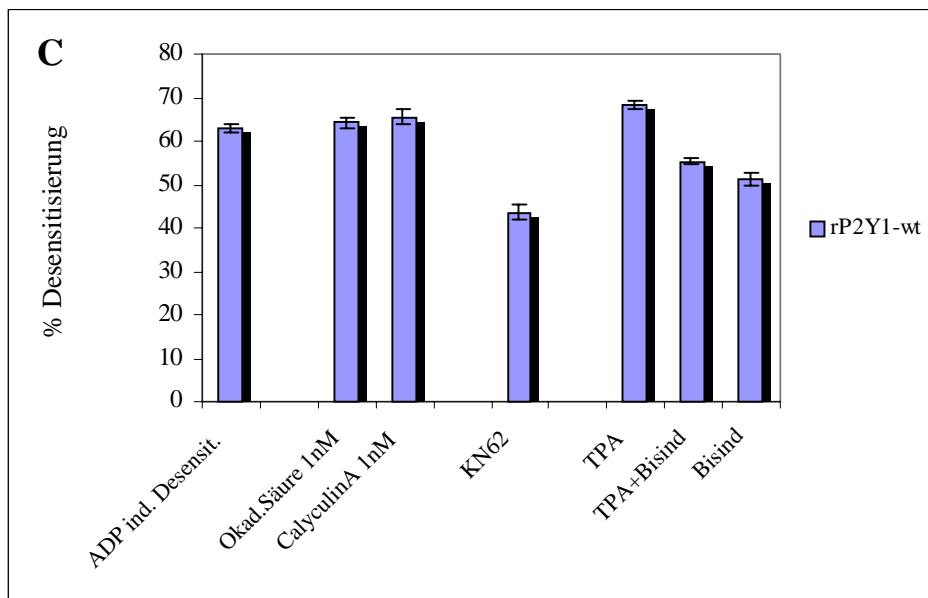
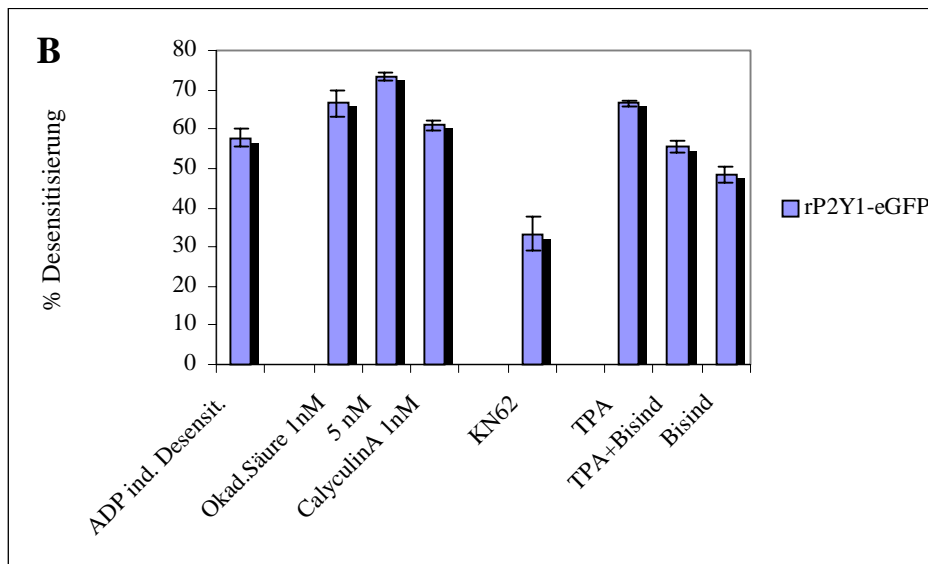
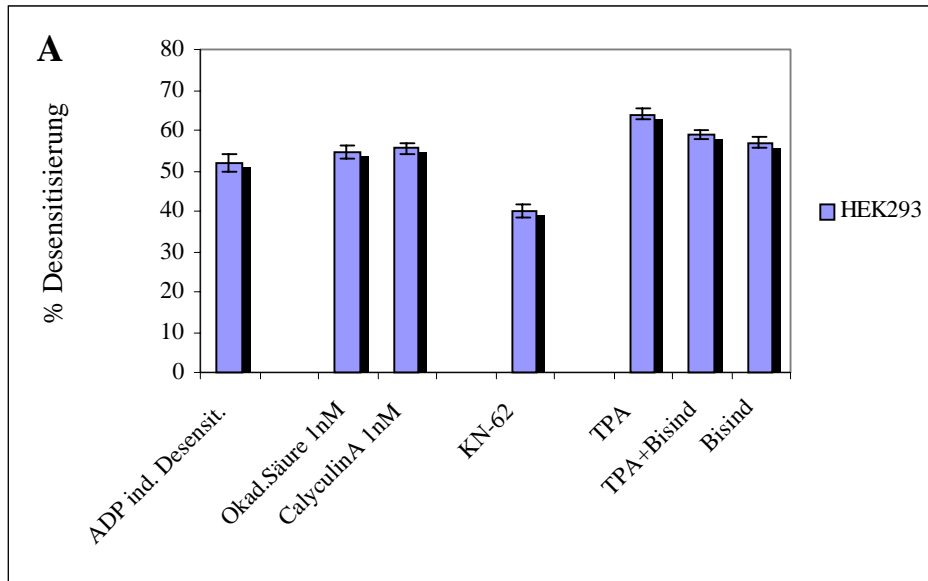
Um die Beteiligung der PKC an der Regulation der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu untersuchen (Abbildung 35) wurde in HEK293 Zellen eine homologe Rezeptordesensitisierung durch ADP induziert (3.18) und der Einfluß der PKC-Aktivierung durch TPA (Phorbol-12-myristyl-13-Acetat) auf die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor induzierte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  untersucht. Um die Spezifität der gemessenen TPA-Effekte zu verifizieren wurde die PKC durch Bisindolylmaleimid { 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol -3-yl]-maleimid} bei unterschiedlichen Stimulationsbedingungen spezifisch gehemmt. Ob CamKII an der Rezeptordesensitisierung

beteiligt ist, wurde mit Hilfe des spezifischen, membranpermeablen CamKII-Inhibitors „KN-62“ ( $\{1-[N,O\text{-bis}(5\text{-Isoquinolinsulfonyl})\text{-N-Methyl-L-tyrosyl}]\text{-4-phenylpiperazin}\}$ ) untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse (s.u.) sprechen für eine Beteiligung der beiden untersuchten Proteinkinasen am Desensitisierungsprozeß der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen.

### **3.20.2 Beteiligung von Proteinphosphatasen an der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-regulation**

Neben der Phosphorylierung spielt auch die Dephosphorylierung von Proteinen eine entscheidende Funktion bei der Regulation einer Fülle von zellulären Funktionen. Das Wechselspiel von Kinase- und Phosphatasewirkung an einem Zielprotein reguliert dessen Aktivitätszustand und unterliegt deshalb selbst einer strikten Kontrolle. Wichtige Vertreter der zellulären Phosphatasen sind die PP1 und PP2A. Es gibt gute Hinweise für die Regulation so wichtiger zellulärer Proteinkinasefamilien wie die PKB, PKC, p70 S6-Kinase, CamK, MAPK und IκB-Kinasen durch PPA2 [153]. Die Wirkung von Phosphatasen auf die an der Regulation der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen beteiligten Kinasen, sollte mit Hilfe von zwei sehr wirksamen Phosphataseinhibitoren (Calyculin A und Okadain-Säure) aufgeklärt werden. Abbildung 35 faßt die Ergebnisse der Experimente zusammen, in denen der Einfluß zellulärer Proteinkinasen und Phosphatasen auf die durch ADP-induzierten Desensitierung bei nicht-transfizierten HEK293 (A), bei rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten (B) bzw. rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen (C) untersucht wurde. Für diese Experimente wurden Fura-2 beladene Zellen zweimal mit 10 µM ADP stimuliert und die Amplituden der Ca<sup>2+</sup>-Antworten bestimmt. Der erste zur Rezeptordesensitierung eingesetzte Stimulus hatte eine Dauer von 4 min und wurde als die jeweilige Maximalantwort (Kontrollwert) des ADP-Stimulus gewertet. Die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort, die durch den zweiten ADP-Puls ausgelöst wurde, wurde auf diese Maximalantwort normiert („% Kontrolle“). Der so ermittelte durch ADP induzierte Desensitierungseffekt („Agonist-induzierte Desensitierung“ in Abbildung 35) wird mit den Desensitierungseffekten verglichen, die nach Vorbehandlung der Zellen mit den entsprechenden Pharmaka noch durch ADP ausgelöst werden konnten. Dieser Vergleich ist für die verschiedenen HEK293 Zelllinien in Abbildung 35 (analog zur Abbildung 32, in „% Desensitierung“) dargestellt.

# Ergebnisse: Rezeptorregulation



**Abbildung 35: Einfluß der Aktivierung bzw. Hemmung von Proteinkinase C, CamK und PP2A auf die durch ADP induzierte Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren bei HEK293 Zellen.**

Nicht-transfiziert HEK293 Zellen (A), HEK rP2Y<sub>1</sub>-eGFP (B) und rP2Y<sub>1</sub>-wt (C) wurden mit Fura-2 beladen und einer durch ADP induzierten Desensibilisierung unterzogen. Dazu wurden die Zellen zweimal nacheinander mit ADP (10 µM) stimuliert und die induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten gemessen. Die beiden Stimuli waren durch eine Waschphase von 5 min voneinander getrennt. Um den Einfluß von PPA2 auf die Agonist-induzierte Desensibilisierung zu untersuchen, wurden die Zellen vor der initialen ADP-Stimulation mit Okadain-Säure bzw. Calyculin A für 30 min vorbehandelt. Eine Vorbehandlung mit KN62 (30 min) erfolgte, um den Einfluß der CamKII zu bestimmen. Die kurzzeitige (2 min) Vorbehandlung mit TPA bzw. Bisindolylmaleimid (30 min) vor der Stimulation der Zellen mit ADP erfolgte, um den Einfluß der PKC auf die Rezeptordesensibilisierung durch ADP zu untersuchen. Dargestellt ist die prozentuale Reduktion der Amplituden der 2. Ca<sup>2+</sup>-Antworten im Vergleich zur maximal auslösbaren Ca<sup>2+</sup>-Antwort, analog zur Darstellung der Werte in Abbildung 32 („% Desensibilisierung“). Die Werte entsprechen Mittelwerten ± SEM, zu deren Berechnung die Stichprobenmenge N von > 80 Einzelzellen aus jeweils 2-5 Experimenten pro Bedingung herangezogen wurde.

Zellen die mit den Phosphataseinhibitoren Calyculin A bzw. Okadain-Säure vorbehandelt wurden („+ Okad.Säure“ bzw. „+ Calyculin“ in Abbildung 35) wiesen einen, wenn auch nur gering verstärkten ADP-Desensibilisierungseffekt der Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf. Diese Verstärkung könnte auf einer reduzierten Dephosphorylierung der beteiligten Proteinkinasen oder der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren selbst beruhen. Zellen die vor der durch ADP induzierten Desensibilisierung mit 20 µM KN-62 („+ KN 62“ in Abbildung 35 A, B, C) vorbehandelt wurden, weisen im Vergleich zu nicht-vorbehandelten Zellen eine erhöhte Amplitude der zweiten Ca<sup>2+</sup>-Antwort auf. Die Vorbehandlung der Zellen mit KN-62 bewirkt eine deutliche Abschwächung der ADP-induzierten Rezeptordesensibilisierung. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung der Cam KII an der homologen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptordesensibilisierung. KN62 alleine hatte keinen Einfluß auf die Amplitude der Ca<sup>2+</sup>-Antwort, die durch 10 µM ADP ausgelöst wurde, denn die Antwortamplitude des ersten 10 µM ADP-Pulses von KN62-vorbehandelten Zellen und nicht-vorbehandelten Zellen waren praktisch identisch (nicht dargestellt). Die Aktivierung der PKC durch die kurzfristige (2 min) Vorbehandlung mit TPA („+ TPA“ in Abbildung 35 A, B, C) induzierte bei allen drei Zelllinien eine verstärkte Desensibilisierung. Dieser TPA-vermittelte Effekt läßt sich durch den gleichzeitigen Einsatz des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid („+ TPA + Bisind.“ in Abbildung 35 A, B, C) aufheben. Die Unterdrückung der TPA-Wirkung durch Bisindolylmaleimid ist bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen, im Gegensatz zu den transfizierten Zelllinien, nicht vollständig. Die Umkehrbarkeit des TPA-Effekts durch Bisindolylmaleimid belegt, daß eine PKC-induzierte Phosphorylierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorpopulation in den Zellen, die Rezeptoren desensibilisieren kann. Es ist bekannt, daß eine generelle Aktivierung der PKC (z.B. durch TPA) zur unspezifischen Phosphorylierung von Rezeptoren führen kann [149,150]. Um diese Frage zu



klären wurden die Zellen mit Bisindolylmaleimid allein vorbehandelt. Vergleicht man die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort nach PKC-Hemmung („+ Bisind.“ in Abbildung 35 A, B, C) läßt sich bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen keine signifikante Veränderung erkennen. Im Gegensatz dazu, führt die Inhibition der PKC bei den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor transfizierten Zelllinien zu einer Verminderung der Rezeptordesensibilisierung.

Die Ergebnisse dieser Experimente sprechen für eine Beteiligung der PKC an der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptorregulation, zumindest was die mit rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor transfizierten Zellen betrifft. Der zu beobachtende Unterschied im Desensibilisierungsverhalten der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen, könnte seine Ursache in einer unterschiedlichen PKC-Sensitivität der beiden P2Y<sub>1</sub>-Rezeptortypen aus Ratte bzw. Mensch haben.

### **3.21 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten HEK293 Zellen**

Mit Hilfe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingexperimente wurde bereits gezeigt, daß der in HEK293 Zellen exprimierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-Rezeptor die typischen pharmakologischen Eigenschaften eines P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aufweist. Ebenso wurde die Rezeptordesensibilisierung mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen untersucht und die Rezeptorlokalisierung in Western-Blot Experimenten überprüft. Um diese Befunde mit bildgebenden Verfahren nachzuvollziehen, die intrazellulären Kompartimente der Rezeptorlokalisierung zu identifizieren und die Rezeptorverteilung nach länger andauernder Agonisteinwirkung zu untersuchen, wurden immunohistochemische und fluoreszenzmikroskopische Methoden eingesetzt.

In Abbildung 36 sind die digitalisierten, mikroskopischen Epifluoreszenzbilder unterschiedlich behandelter Proben von HEK293 Zellen zusammengestellt. Abbildung 36-1 zeigt die typische Zellform nicht-transfizierter HEK293-Zellen im Phasenkontrastbild. Abbildung 36-2 zeigt das Fluoreszenzbild von HEK293 Zellen, die mit GFP allein transfiziert wurden, bei Anregungslicht einer Wellenlänge von 488 nm. Die GFP-Fluoreszenz ist, wie bei einem im Zytosol lokalisierten Protein zu erwarten, gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt, die typische Zellform ist erhalten. Abbildung 36-3A und Abbildung 36-3B sind Bilder der identischen Probe von rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen. Die Zellen sind fixiert und permeabilisiert und wurden einer Immunofärbung mit einem polyklonalen  $\alpha$ -GFP Antiserum unterzogen. Das  $\alpha$ -GFP Antiserum ( $\alpha$ -GFP AS) wurde zur Fluoreszenzdetektion mit einem Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Kaninchenantikörper (Cy3- $\alpha$ -Rab) markiert. Abbildung 36-3B zeigt die rote Fluoreszenz des Cy3-Konjugats, Abbildung 36-3A zeigt die entsprechende GFP-Fluoreszenz bei 488 nm

Anregungswellenlänge. Zu erkennen ist, daß die Fluoreszenz in beiden Bildern identisch, d.h. an der Plasmamembran und in intrazellulären Kompartimenten, verteilt ist. Neben intensiv angefärbten Zellen sind vorallem in Abbildung 36-3B schwach angefärbte Zellen zu erkennen. Dies belegt die Spezifität der Antikörperfärbung, da nur die Zellen mit intensiver GFP-Fluoreszenz auch Immunofluoreszenz aufweisen. Die Spezifität des Cy3- $\alpha$ -Rab Konjugats wurde in fixierten und permeabilisierten rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen getestet, die nur mit dem Cy3- $\alpha$ -Rab Konjugat angefärbt wurden. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild konnte kein deutliches Fluoreszenzsignal des Cy3-Konjugats identifiziert werden (nicht dargestellt).

Abbildung 36-4 zeigt fixierte und permeabilisierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen, die mit Texas Red®-konjugiertem Lektin (WGA) behandelt wurden. Lektine erkennen spezifisch glykosylierte Proteine. Die Überlagerung von Texas-Red und GFP führt zu einer gelben Fluoreszenz und macht die Kollokalisierung von GFP-rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren (grüne Fluoreszenz) und glykosylierter Proteine (rot) deutlich. Während in der Zellperipherie die GFP-Fluoreszenz deutlich zu sehen ist, sind im Inneren der Zellen mit starker GFP-GPCR-Expression neben dem Randbereich des Zellkerns vermutlich der Golgi-Apparat bzw. das ER angefärbt. Diese Kompartimente sind an der Synthese von glykosylierten Proteinen beteiligt, die später in die Plasmamembran inseriert oder sekretiert werden. Die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz entspricht also den bei der GPCR-Synthese beteiligten Kompartimenten und ist nicht artifiziell verändert. Abbildung 36-5 zeigt fixierte und permeabilisierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen, die einer Immunofärbung mit  $\alpha$ -GFP AS /Cy3- $\alpha$ -Rab unterzogen wurden. Vor der Immunofärbung wurden die Zellen einem 2-MeSATP Dauerstimulus (100  $\mu$ M, 2h, 37°C, 60  $\mu$ M Monensin) ausgesetzt, um die P2Y-Rezeptorinternalisierung zu induzieren. Die Überlagerung der Cy3/ GFP-Fluoreszenz läßt eine deutlich veränderte GFP-Lokalisation erkennen, die Plasmamembran weist eine weniger intensive GFP-Fluoreszenz auf und im Zellinneren sind deutlich punktförmige „GFP-spots“ zu erkennen, die möglicherweise internalisiertes Rezeptor- GFP Fusionsprotein repräsentieren.

Abbildung 36-6 zeigt Zellen die entsprechend der Zellen in Abbildung 36-5 behandelt wurden, jedoch wurden die Zellen vor der Immunofärbung nicht mit 2-MeSATP stimuliert. Im Unterschied zur Fluoreszenzverteilung in Abbildung 36-5 ist hier die Plasmamembranlokalisation der GFP-Fluoreszenz noch deutlich zu erkennen. In Abbildung 36-7A und Abbildung 36-7B ist die GFP-Fluoreszenzverteilung in lebenden rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen dargestellt. Abbildung 36-7A zeigt nicht-behandelte Zellen, in denen die GFP-Fluoreszenz eine deutliche Plasmamembranlokalisation aufweist. Abbildung 36-7B zeigt Zellen, die für

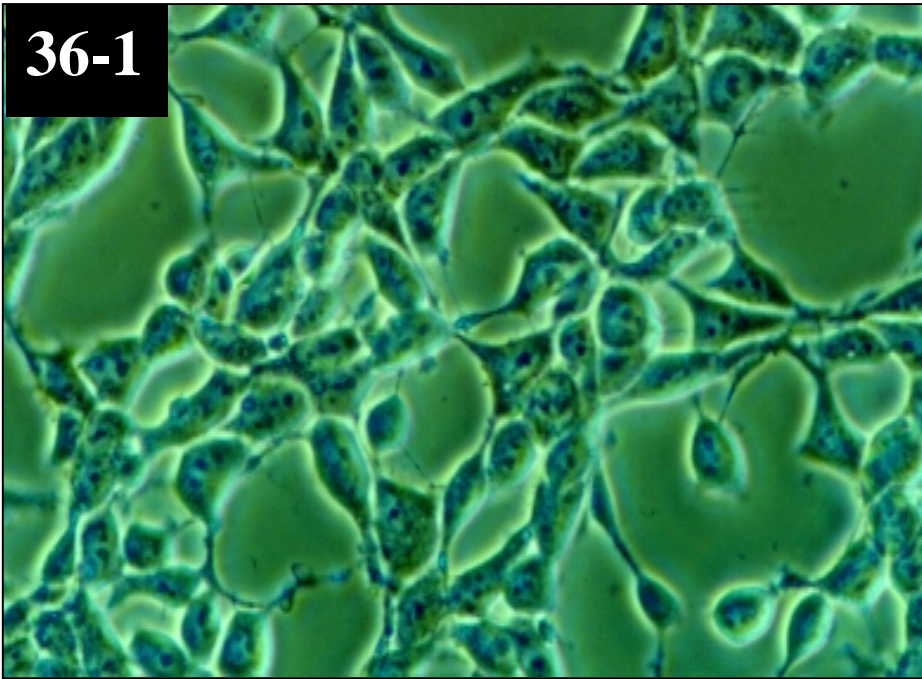
1h bei 37°C mit 60 µM ADP/30 µM Monensin behandelt wurden, um eine Rezeptorinternalisierung zu induzieren. Die GFP-Fluoreszenz ist durch die ADP-Stimulation aus der Plasmamembran in intrazelluläre Vesikel transloziert, was auf eine agonist-induzierte Internalisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren hindeutet.

---

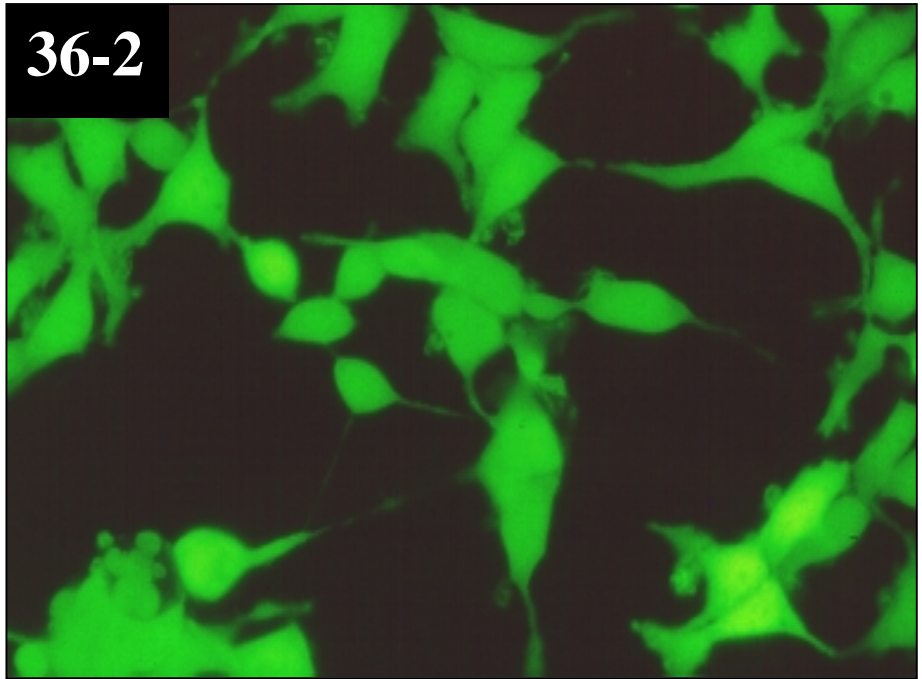
**Abbildung 36: Digitalisierte fluoreszenzmikroskopische Bilder unterschiedlich behandelte HEK Zellen**

Die gezeigten Epifluoreszenzbilder wurden an unterschiedlich behandelten Proben von HEK293 Zellen gewonnen. Die entwickelten Dia-Positive wurden über einen Flachbettscanner digitalisiert und z.T. elektronisch nachvergrößert, deshalb ist nur der mikroskopische Vergrößerungsfaktor der Originalbilder in Klammern angegeben. 36-1 (400-fach) zeigt die typische Zellform nicht-transfizierter HEK293-Zellen. Abbildung 36-2 (400-fach) zeigt HEK293 Zellen, die mit GFP allein transfiziert wurden, bei Anregungslicht einer Wellenlänge von 488 nm. Abbildung 36-3A und Abbildung 36-3B (beide 400-fach) sind Bilder der identischen, fixierten und permeabilisierten rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen (Pfeile markieren identische Zellen). Durch Anfärbung mit α-GFP Antiserum/ Cy3-α-Kaninchenantikörper Konjugat wurde das Rezeptor-GFP Fusionsprotein in der Immunofluoreszenz sichtbar gemacht: Abbildung 36-3B die rote Fluoreszenz des Cy3-Konjugats, Abbildung 36-3A die GFP-Fluoreszenz bei 488 nm. Abbildung 36-4 zeigt fixierte und permeabilisierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen, die mit Texas Red® -konjugiertem Lektin (WGA) behandelt wurden. Die Überlagerung von Texas-Red und GFP führt zu einer gelben Fluoreszenz und macht die Kolo-kalisation von GFP-rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren (grüne Fluoreszenz) und glykosylierter Proteine (rot) deutlich. Abbildung 36-5 (600-fach) zeigt fixierte und permeabilisierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK Zellen, die vor der Immunofärbung mit α-GFP AS /Cy3-α-Rab einer 2-MeSATP induzierten Rezeptorinternalisierung unterzogen wurden. Die Überlagerung der Cy3/ GFP-Fluoreszenz läßt eine Verlagerung der GFP-Fluoreszenz von der Plasmamembran weg ins Zellinnere (punktförmige „GFP-spots“) erkennen. Abbildung 36-6 (600-fach) zeigt Zellen, die entsprechend der Zellen in Abbildung 36-5 prozessiert wurden, jedoch ohne 2-MeSATP Stimulation. In Abbildung 36-7A und Abbildung 36-7B (beide 1000-fach) ist die GFP-Fluoreszenzverteilung in lebenden rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Zellen dargestellt. Abbildung 36-7A zeigt nicht-behandelte Zellen, 36-7B Zellen, die für 1 h bei 37°C mit 60 µM ADP/ 30 µM Monensin behandelt wurden, um eine Rezeptorinternalisierung zu induzieren.

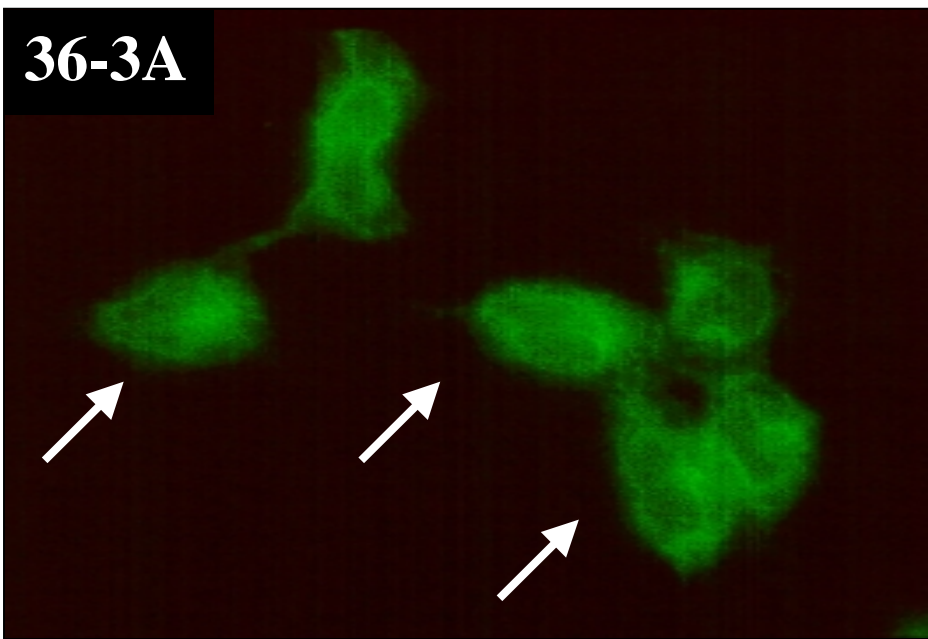
**36-1**



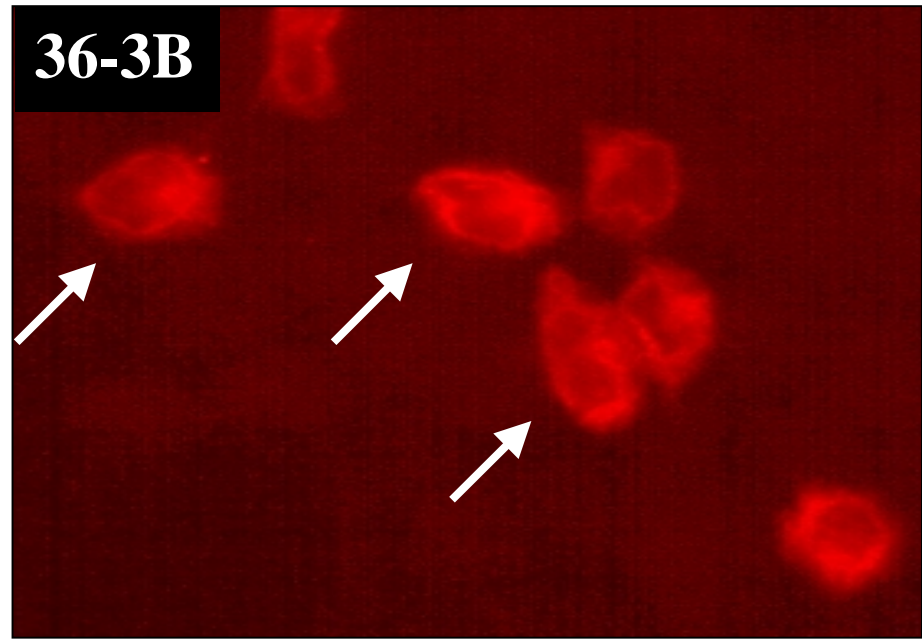
**36-2**



**36-3A**



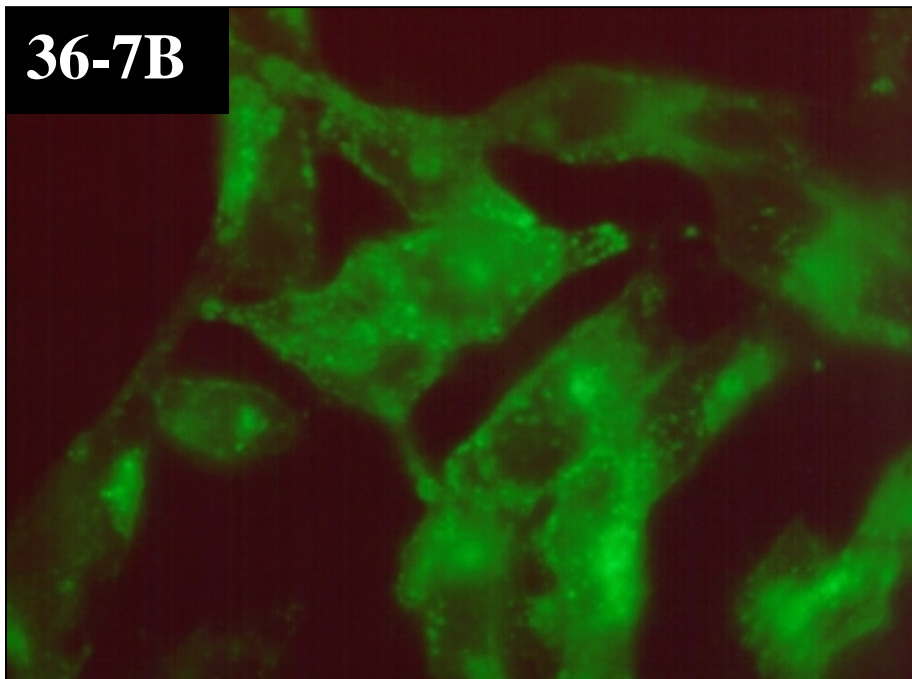
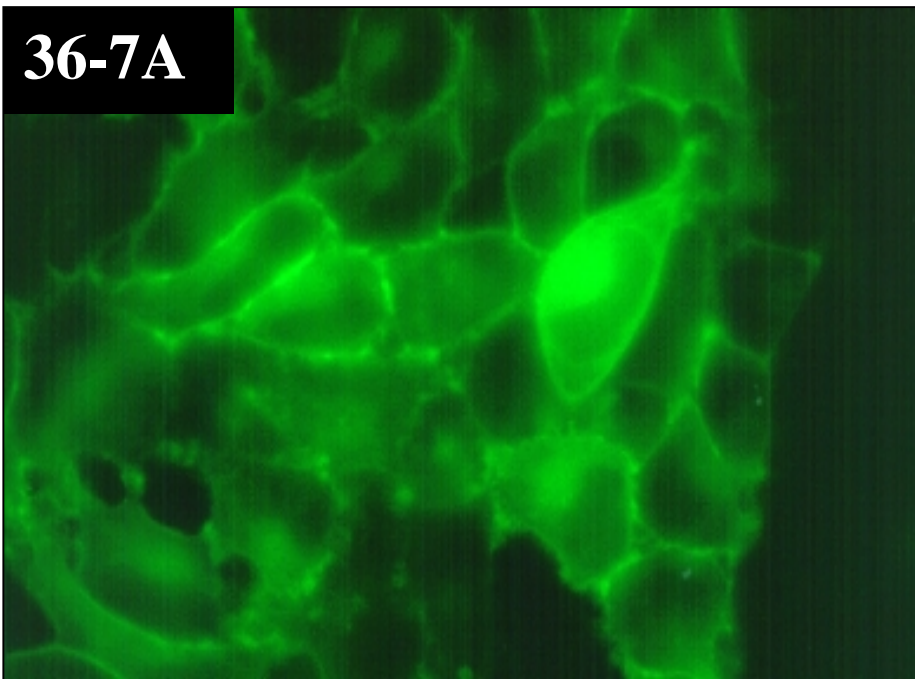
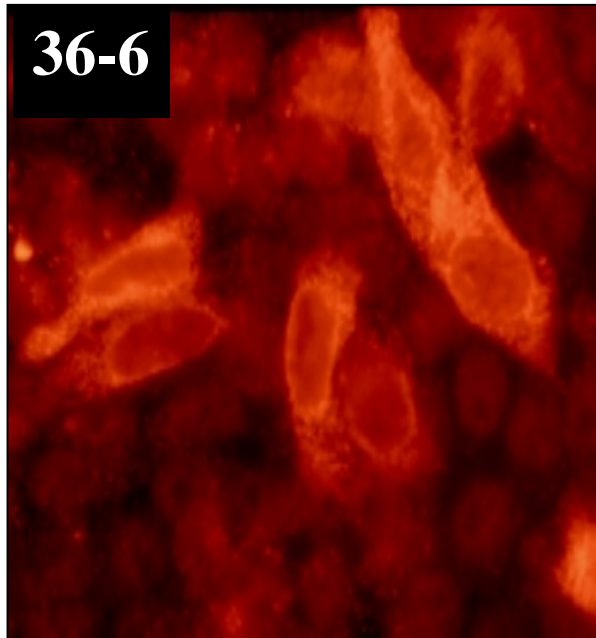
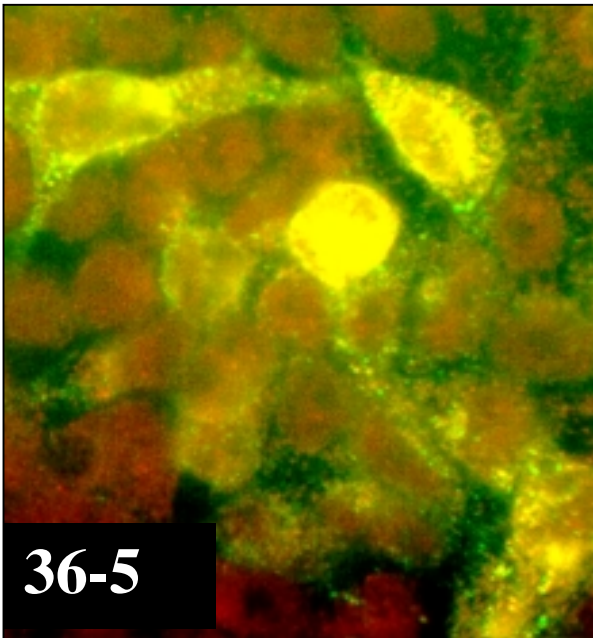
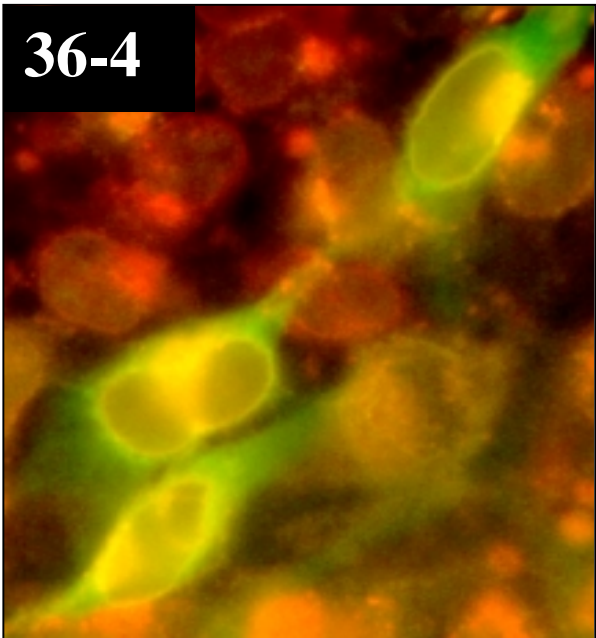
**36-3B**



Ergebnisse: Fluoreszenzmikroskopie







## 4 Diskussion

P2Y-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie werden durch extrazelluläre Nukleotid Di- und Triphosphate aktiviert, die an der Regulation der unterschiedlichsten physiologischen Prozesse beteiligt sind. Die codierenden Sequenzen vieler Mitglieder dieser Rezeptorfamilie wurden mittlerweile kloniert und in Säugerzelllinien exprimiert. Die Mehrzahl der P2Y-Rezeptoren entfalten ihre zelluläre Wirkung durch die Aktivierung der Phospholipase C, die zur  $\text{InsP}_3$ -Bildung und nachfolgend zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) führt.

Hohe, langanhaltende, intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhungen sind zytotoxisch, deshalb sind Signaltransduktionsprozesse, die in der Zelle zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen, sehr genau und auf mehreren Ebenen kontrolliert. Die durch GPCR-Aktivierung induzierten zellulären Reaktionen werden normalerweise schnell abgeschwächt. Dieser Signalabschwächung liegen Mechanismen zur Beseitigung des Liganden aus dem extrazellulären Milieu, der Rezeptordesensibilisierung durch Phosphorylierung, Endozytose der Rezeptoren und der Herunterregulation der Rezeptoranzahl in der Zelle zu Grunde. Die extrazelluläre Agonistkonzentration wird durch Verdünnungseffekte, die aktive Aufnahme der Agonisten über Transporter in die Zelle und enzymatische Degradation abgesenkt. Die Aktivität von Enzymen wie z. B. Peptidasen oder Ectonukleotidasen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, führt zum Abbau von Neuropeptiden und extrazellulären Nukleotiden und terminiert damit deren biologische Aktivität. GRK (G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen) und „second messenger“ Kinasen wie z.B. PKC, PKA und CamK führen zur Phosphorylierung der GPCR und leiten damit die Interaktion der Rezeptoren mit Arrestin-Proteinen ein, was zur Abkopplung der G-Proteine und zur Desensibilisierung der Rezeptoren führt. Die durch Agonistwirkung initiierte Endozytose (Internalisierung) der GPCR trägt zum Desensibilisierungsgeschehen bei, indem hochaffine Rezeptorproteine von der Zelloberfläche verschwinden und damit für ihre Liganden unzugänglich werden. Das Recycling internalisierter Rezeptoren sorgt für die erneute Aktivierbarkeit (Resensibilisierung) dieser Rezeptoren und damit des von ihnen benützten Signaltransduktionswegs. Die Herunterregulierung von GPCR ist eine Form der Desensibilisierung, die in der Zelle durch die lang-andauernde, kontinuierliche Einwirkung von Rezeptoragonisten ausgelöst wird. Charakterisiert ist diese Form der Desensibilisierung durch die Absenkung der zellulären Rezeptormenge, die durch Veränderungen der Degradations- bzw. Syntheserate des entsprechenden Rezeptortyps bewerkstelligt wird [144,156,157,158].

Intrazelluläre Transportvorgänge und die subzelluläre Lokalisation von Proteinen können mittlerweile durch den Einsatz von fluoreszierenden Proteinen - wie GFP - sehr effizient sichtbar gemacht werden. Dazu werden die rekombinanten Proteinsequenzen von z.B. GPCR mit GFP fusioniert und diese Rezeptor-GFP Fusionsproteine dann in Säugerzellen exprimiert [4,101,102,150,159,160,161].

Da bis jetzt nur sehr wenig über die Regulation dieser P2Y-Rezeptoren und die damit verbundenen Prozesse von Desensibilisierung, Internalisierung und Recycling bekannt ist, wurde ein P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor cDNA-Klon aus dem Hirn der Ratte (rP2Y<sub>1</sub>), am C-Terminus durch GFP modifiziert (rP2Y<sub>1</sub>-eGFP). Das entstandene GFP-Fusionsprotein und der „Wildtyp“ rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor wurden in HEK293 Zellen stabil exprimiert. HEK293 Zellen sind eine sehr gut etablierte Zelllinie, die sehr häufig zur Expression rekombinanter GPCR verwendet werden. Sie weisen endogene P2Y-Rezeptoren auf und besitzen deshalb alle Signaltransduktionskomponenten die zur erfolgreichen Expression funktioneller heterologer P2Y-Rezeptoren erforderlich sind.

Zur Überprüfung der funktionellen Expression rekombinanter P2Y-Rezeptoren werden die exprimierten Rezeptoren pharmakologisch charakterisiert. Dazu wurde überwiegend die durch die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren induzierte Bildung von Inositolphosphaten (v.a. InsP<sub>3</sub>) bestimmt, die als indirektes Maß für die Aktivierung der PLC verwendet werden (z.B. [38;30, 31;162;36;163;164;165]). Eine andere Möglichkeit, die Aktivierung der PLC in Folge der Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu untersuchen, bietet die Messung der Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Durch die Wirkung von InsP<sub>3</sub> am InsP<sub>3</sub>-Rezeptor wird Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern freigesetzt und damit die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration verändert. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zur Charakterisierung der funktionellen Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren neben biochemischen Untersuchungen die P2Y<sub>1</sub> vermittelte Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Einzelzellmessungen bestimmt (z.B. [116]). Dieser funktionelle Assay bietet in Verbindung mit der GFP-Modifikation gegenüber der Inositolphosphatbestimmung den Vorteil, daß spezifische Veränderungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP exprimierenden Zellen direkt mit der GFP-Fluoreszenz korreliert werden können.



## 4.1 Nachweis der funktionellen Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293

### 4.1.1 Biochemische Charakterisierung

Die Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in stabil-transfizierte rP2Y<sub>1</sub>-eGFP HEK293 Zellen wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Größe des detektierten Rezeptor-GFP Fusionsproteins, die Anreicherung des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Signals in Plasmamembranfraktionen und die Glykosylierung des Rezeptors sind charakteristisch für ein voll-prozessiertes, funktionelles GPCR Rezeptorprotein. Dieser biochemische Befund wird durch die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen unterstützt. Hier konnte die Rezeptorlokalisierung immunohistochemisch und durch die GFP-Fluoreszenz an lebenden Zellen gezeigt werden. Im Unterschied zur gleichmäßigen Verteilung der GFP-Fluoreszenz in Zellen die mit GFP allein transfiziert wurden, läßt sich die GFP-Fluoreszenz in rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten zuordnen, die an der Synthese integraler Membranproteine beteiligt sind. Die Untersuchung der korrekten Rezeptorlokalisierung ist unumgänglich, da eine stark erhöhte Expression von Rezeptorproteinen zur artifiziellen Veränderung der Lokalisation [4] und Regulation [138] der GPCR führen kann.

Die Überexpression des CCK<sub>A</sub>-Rezeptors, der ebenfalls am C-terminalen Ende durch GFP modifiziert wurde, führte beispielsweise zum Einbau des rekombinanten Rezeptors in alle intrazellulären Membranen (Endosomen, Mitochondrien, Kernmembran usw.), wogegen die Fusion der GFP-Markierung an das N-terminale Ende der Rezeptors die Insertion des Rezeptorprodukts in die Plasmamembran unterbindet [102]. Alle bisher erfolgreich als GFP-Fusionsproteine exprimierte GPCR wurden deshalb auch am C-terminus modifiziert (Übersicht [4,166]). Darunter befindet sich auch der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor, der allgemein als Prototyp der GPCR gilt und für dessen Regulation bei Weitem die meisten Daten vorliegen [144]. Die erfolgreiche Expression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor-GFP Fusionsproteins gehört mit zu den ersten Berichten dieser Art und ermöglichte es den Autoren die durch Agonisteinwirkung induzierte Internalisierung des Rezeptors an lebenden Zellen in Echtzeit zu verfolgen [167].

Lektine gehören schon geraume Zeit zum Instrumentarium, das in glykobiologischen Untersuchungen eingesetzt wird [129,168]. Lektine sind bakterielle oder pflanzliche Proteine, die spezifische Oligosaccharidmuster erkennen und deshalb als Sonden zu Untersuchung der Struktur von Zelloberflächen eingesetzt werden können. Daneben werden Lektinproteine auch

zur Aufreinigung von Membranproteinen [169,170,171] verwendet. Zur Signalamplifikation und Erweiterung des Spektrums der Detektionstechniken, werden Lectinkonjugate, wie z.B., Digoxigenin konjugiertes Concanavalin A (ConA) oder Texas-Red konjugiertes Weizenkeimagglutinin (WGA), in Blotverfahren oder der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt [129,172]. Fluoreszenz-markierte Lektine, wie z.B. das WGA (Weizenkeimagglutinin) können eingesetzt werden, um in permeabilisierten Zellen Strukturen wie das ER und den Golgi-Apparat anzufärben [173,174]. Beide Kompartimente sind an der Synthese von integralen Membranproteinen und Proteinen, die zur Sekretion bestimmt sind, beteiligt und führen die vollprozessierten, posttranslational modifizierten Proteine exocytotischen Prozessen zu.

### 4.1.2 Pharmakologische Charakterisierung

Die stabile Expression des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Fusionsproteins bzw. des rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptors in HEK293 Zellen führt zu einer stark erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen P2Y-Rezeptor spezifischen Nukleotidagonisten. Für die agonistische Wirkung dieser Liganden an den rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, konnte ein pharmakologisches Profil festgestellt werden, das P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren aus den unterschiedlichsten Zellen gemeinsam ist (Übersicht in [2]).

Die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischen Agonisten 2-MeSADP und 2-MeSATP aktivieren den heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptor mit einer ähnlichen Effektivität, wie sie für andere stabil exprimierte P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren - hP2Y<sub>1</sub> (Mensch ) und tp2Y<sub>1</sub> (Truthahn) - publiziert wurde [36]. Im Gegensatz dazu wird der in HEK293 Zellen stabil exprimierte „wild-typische“ rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor bereits durch Agonistkonzentrationen aktiviert, die im Bereich unter 1 nM liegen. Die heterolog exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptoren weisen damit, unter allen bis jetzt veröffentlichten rekombinanten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die höchste Sensitivität gegenüber diesen Agonisten auf. D.h. im Vergleich zu den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die z.B. aus Mensch und Truthahn isoliert und in der Astrozytomzelllinie 1321N1 [36] exprimiert wurden, zeigen die rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptoren eine 100-fach höhere Sensitivität gegenüber den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor spezifischen Liganden. Bei den rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten HEK293 Zellen scheint für die Rezeptoren eine drastische Steigerung der Affinität gegenüber 2-MeSATP bzw. 2-MeSADP zu bestehen. Dieses Phänomen kann mit der Existenz einer sogenannten Rezeptorreserve erklärt werden.

In der klassischen Rezeptortheorie [138,175,176] führt eine erhöhte Rezeptorexpression zur Ausbildung einer Rezeptorreserve, die zur augenscheinlichen Erhöhung der Wirksamkeit der Agonisten bei der Aktivierung des Rezeptors führt. Davon unberührt bleibt

jedoch die Größe des maximalen Effekts, der durch die Aktivierung der Rezeptoren in den Zellen ausgelöst wird. Experimentelle Befunde, die das theoretische Konzept zum funktionellen Zusammenhang, zwischen dem Niveau der Rezeptorexpression und dem, durch die Rezeptoraktivierung ausgelösten zellulären Effekt, unterstützen, wurden von Hermans et al. [177] präsentiert.

Die Untersuchungen wurden an mGlu1 $\alpha$ -Rezeptor transfizierten CHO-Zellen durchgeführt, wobei unterschiedlich hohe Rezeptormengen über ein durch IPTG-induzierbares Expressionssystem erzielt werden konnten. Charakterisiert wurden Effekte, die durch unterschiedliche agonistisch bzw. antagonistisch wirkende Substanzen in CHO-Zellen ausgelöst wurden, die ihrerseits mGlu1 $\alpha$ -Rezeptoren in unterschiedlicher Menge exprimierten. Die erhaltenen Ergebnisse demonstrieren, daß sowohl die Wirksamkeit als auch die Effizienz der mGlu1 $\alpha$ -Rezeptor Agonisten durch das Expressionsniveau beeinflusst werden. Die erhöhte Wirksamkeit spezifischer P2Y<sub>1</sub>-Agonisten, die bei der rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten HEK Zelllinie festgestellt wurde, findet eine überzeugende Erklärung, wenn ein erhöhtes rP2Y<sub>1</sub>-wt Expressionsniveau in den Zellen vorliegt. Die Interpretation der Daten in dieser Richtung wird auch durch die Ergebnisse der RT-PCR Experimente (Abbildung 12) unterstützt. Die Intensität, mit der DNA-Banden in einem Agarosegel sichtbar sind, korreliert mit der DNA-Menge, die sie repräsentieren. Die Fluoreszenzintensität von DNA-Banden, die mit Ethidiumbromid angefärbt wurden, erlaubt einen Rückschluß auf die vorhandene DNA-Menge. Für RT-PCR Produkte bedeutet das, daß die Intensität der DNA-Bande als Maß für die Transkriptmenge eines bestimmten Gens – hier des rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptors – verwendet werden kann. Wird dieser Zusammenhang für die Mengenabschätzung von RT-PCR Produkten ausgenutzt, um einen Rückschluß auf die ursprünglich in der RNA vorhandene Transkriptmenge zu ziehen, muß berücksichtigt werden, daß die DNA-Vervielfachung in der PCR-Reaktion einem nicht-linearen Prinzip unterliegt. Daraus folgt, daß die ersten Zyklen der PCR-Reaktion von entscheidender Bedeutung für Qualität und Quantität des entstehenden Produkts sind. Werden wie in der vorliegenden Arbeit Primeroligonukleotide eingesetzt, die homologe Sequenzen verschiedener Matrizen amplifizieren können, wird die Abschätzung der ursprünglich vorliegenden Transkriptmenge kompliziert.

Welches PCR-Produkt in welcher Menge amplifiziert wird hängt in diesem Fall davon ab, wie erfolgreich die möglichen Matrizensequenzen in den ersten PCR-Zyklen um die vorhandenen Primermoleküle konkurrieren können. Es ist also zu erwarten, daß vorhandene Unterschiede in der Transkriptmenge unter diesen Bedingungen weiter verstärkt werden. Für

die Interpretation der Intensität der DNA-Bande, die dem PCR-Produkt des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors in Abbildung 12B (Spur 2) entspricht, bedeutet dies, daß die P2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zellen nicht unbedingt weniger hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren als z.B. HEK293 Zellen (Spur 1), sondern viel mehr, daß sie in erheblich höherem Maß die rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimieren. Sinngemäß läßt sich aus der „fehlenden“ P2Y<sub>1</sub>-Produktbande bei HEK293 Zellen (Spur 1) nicht automatisch folgern, daß hier keine hP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren exprimiert werden. Eine quantitativ vergleichende Auswertung von PCR-Produkten läßt sich deshalb nur unter den Bedingungen der „quantitativen PCR“ durchführen. Trotz der geschilderten Einschränkungen belegt die deutlich stärkere Intensität der „rP2Y<sub>1</sub>-wt-Bande“ eine stark erhöhte Expressionsrate des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors in der entsprechenden Zelllinie.

Die Attraktivität des Konzepts einer Rezeptorreserve bei der Erklärung erhöhter Sensitivität von Agonisten, die bei der Expression rekombinanter Rezeptoren in stabil transfizierten Zelllinien gefunden wird, wird durch weitere Veröffentlichungen deutlich. Für den stabil exprimierten hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor [165] und den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor aus Truthahn [36] wird eine entsprechende Rezeptorreserve diskutiert, um die Effekte, die bei der Aktivierung durch die subtypspezifischen Agonisten UTP bzw. 2-MeSATP/ 2-MeSADP auftreten, zu erklären. Ein weiteres Ergebnis aus der von Hermans et al. 1999 veröffentlichten Arbeit macht ebenfalls klar, daß der beschriebene Zusammenhang zwischen Expressionshöhe und Rezeptoraktivierung nur für Agonisten (bzw. kompetitive Antagonisten) existiert, während die Aktivität nicht-kompetitiver (mGlu1 $\alpha$ -Rezeptor) Antagonisten unabhängig von der Stärke der (mGlu1 $\alpha$ -) Rezeptorexpression ist. Der kausale Zusammenhang zwischen erhöhter Agonistensensitivität und erhöhter Expressionsrate des entsprechenden Rezeptors kann nur über quantitative Charakterisierung der Rezeptoren in der Zelle nachgewiesen werden. Für eine solche Charakterisierung ist aber die Verfügbarkeit eines Rezeptor-selektiven, irreversiblen Antagonisten unumgängliche Voraussetzung. Dieser ist für P2Y<sub>1</sub> jedoch noch nicht verfügbar.

Der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-Rezeptor wird durch die selektiven Agonisten 2-MeSADP und 2-MeSATP in nanomolaren Konzentrationen aktiviert und löst in den Zellen eine physiologische Ca<sup>2+</sup>-Antwort aus. Es ist bekannt, daß 2-MeSATP auch aktivierende Wirkung auf den hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor haben kann, jedoch tritt dieser Effekt von 2-MeSATP an P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren erst bei Konzentrationen auf, die jenseits von 10  $\mu$ M liegen [165]. Zwar werden in HEK293 Zellen hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren endogen exprimiert, nanomolare Konzentrationen der 2-Methylthioderivate sind jedoch nicht in der Lage über hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren zur Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern beizutragen. D.h. das Ca<sup>2+</sup>-Signal, das bei den trans-

fizierten HEK293-Zelllinien durch 2-MeSATP bzw. 2-MeSADP (in nanomolarer Konzentration) ausgelöst wird, ist auf die Aktivierung der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zurückzuführen.

Die Wirkung von ATP auf rekombinante P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und endogene P2Y<sub>1</sub>-ähnliche Rezeptoren wurde unterschiedlich charakterisiert, d.h. neben den Berichten, die die agonistische Wirkung belegen, wurde ATP die Wirkung eines partiellen Agonisten bzw. Antagonisten zugewiesen [2]. Endogene P2Y<sub>1</sub>-ähnliche Rezeptoren arterieller Endothelzellen des Intestinaltrakts reagieren z.B. nicht auf ATP [68] und auch für den P2Y-Rezeptor aus Blutplättchen ist die antagonistische ATP-Wirkung belegt [178]. Die partielle agonistische Wirkung scheint insbesondere für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren zu gelten, die in Geweben und Zellen exprimiert werden in denen ebenfalls P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimiert werden. Eine Kolokalisation der P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren in einer Zelle vorausgesetzt, erscheint eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber ATP sinnvoll. Wir konnten in den von uns durchgeführten Experimenten jedoch keine Beweise für eine antagonistische bzw. partiell-agonistische Wirkung von ATP an den rekombinanten rP2Y<sub>1</sub>-wt bzw. rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-Rezeptoren finden. An den von uns etablierten transfizierten HEK293 Zelllinien war ATP in der Lage, eine nahezu identische maximale Ca<sup>2+</sup>-Antwort auszulösen wie wir sie für 2-MeSADP, 2-MeSATP oder ATP $\alpha$ S messen konnten, obwohl dazu höhere ATP-Konzentrationen nötig waren. Diese Befunde sprechen für die volle agonistische Wirkung von ATP am rekombinant exprimierten rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor, die ebenfalls für den stabil exprimierten humanen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor gefunden werden konnte [36].

Diese Schlußfolgerung wird ebenfalls durch die Veröffentlichung von Palmer et al. 1998 [179] unterstützt, in der wie in der vorliegenden Arbeit Ca<sup>2+</sup>-Antworten einzelner Zellen analysiert wurden, die durch 2-MeSATP und ATP induziert wurden. Die von uns verwendete Meßanlage gewährleistet einen kontinuierlichen und schnellen Medienaustausch in der Meßkammer, in der nur eine geringe Anzahl von Zellen plaziert sind. Die relativ große Menge Medium im Verhältnis zur Zellanzahl macht es unwahrscheinlich, daß die durch ATP induzierten Ca<sup>2+</sup>-Antworten in Wirklichkeit auf ATP-Abbauprodukte, die durch die Wirkung von Ectonukleosidasen entstehen könnten, zurückzuführen sind.

Für die Stimulation der drei Zelllinien mit 10  $\mu$ M UTP konnten wir maximale Ca<sup>2+</sup>-Antworten von vergleichbarer Größe ermitteln und nahezu identische Werte für die halbmaximale UTP-Wirkkonzentration. Diese Befunde belegen, daß die heterologe Expression der rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen nicht mit der Signaltransduktion der endogenen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren interferiert. Ebenso beweisen diese Ergebnisse, daß UTP keine Wirkung auf

die heterolog exprimierte rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren entfaltet und die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch UTP einzig auf die Aktivierung der endogenen P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren zurückzuführen ist.

Ein Vergleich der Maximalantworten, die durch die P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-spezifischen Agonisten 2-MeSADP bzw. UTP bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen induziert werden, deutet an, daß die endogenen P2Y-Rezeptoren jeweils in einer solchen Anzahl vorliegen, daß sie bei maximaler Stimulation ähnliche physiologische Antworten induzieren. Diese Gleichwertigkeit der endogenen P2Y-Rezeptoren auf funktioneller Seite ist allerdings nicht notwendigerweise deckungsgleich mit den mRNA-Mengen, die durch die RT-PCR Experimente für die einzelnen Rezeptorsubtypen abgeschätzt werden können. Schachter et al. 1997 [134] konnten auf Grund der Bestimmung der maximalen Inositolphosphatproduktion, die durch 2-MeSADP bzw. UTP ausgelöst wurde, bei nicht-transfizierten HEK293 Zellen ein funktionelles Verhältnis von P2Y<sub>1</sub>- zu P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren von 2:1 feststellen. Das zeigt, daß Schlußfolgerungen über das numerische Verhältnis von P2Y-Rezeptoren zueinander, die auf Grund funktioneller Studien oder der Abschätzung der unterschiedlichen mRNA-Mengen erfolgen, nicht unbedingt übereinstimmen müssen. Diese Tatsache unterstreicht, daß die Verfügbarkeit subtyp-spezifischer Antikörper oder radioaktiv-markierter, selektiver Agonisten unumgängliche Voraussetzung für eine quantitative Analyse der aktuell exprimierten, funktionellen P2Y-Rezeptoren einer Zellpopulation sind.

### 4.1.3 G-Protein-Kopplung

Am Beginn der Signaltransduktionskaskade der meisten rekombinanten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und endogenen P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren steht die Aktivierung der PLC. Durch Untersuchungen am P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor aus Truthahnerythrozyten konnten die beteiligten G-Proteine der Klasse G<sub>q/11</sub> zugeordnet werden. Diese G-Proteine sind nicht sensitiv gegenüber Pertussis Toxin (PTX) und Cholera Toxin (CTX) und aktivieren PLCβ Isoenzyme durch ihre α-Untereinheit (Maurice et al. 1993 in [2]). Die Unempfindlichkeit gegenüber PTX ist charakteristisch für die meisten an PLC gekoppelten P2Y<sub>1</sub>-like Rezeptoren und wird als Hinweis auf die G<sub>q/11</sub>-Protein Kopplung gewertet. Die Kopplung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren an G-Proteine der Klasse G<sub>q/11</sub> ist durch die induzierte Signaltransduktion und die PTX-Insensitivität zwar sehr wahrscheinlich, aber bisher nicht direkt bewiesen. Da für GPCR eine gewisse Promiskuität gegenüber G-Proteinen verschiedener Klassen bekannt ist, könnten theoretisch auch G-Proteine anderer Klassen (z.B. G<sub>α12</sub> oder G<sub>α16</sub>), die die gleiche Signaltransduktion vermitteln wie die G<sub>q/11</sub> an der Signaltransduktion der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren beteiligt sein. Bei-

spiele der geschilderten Promiskuität der GPCR gegenüber verschiedenen G-Proteinen sind auch für purinerge Rezeptoren bekannt. Die Kopplung von rekombinanten Rezeptoren an verschiedene Signaltransduktionswege, in Abhängigkeit vom Zellsystem, in dem dieser Rezeptor exprimiert wird, sind für den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor aus der Ratte [66], den P2Y<sub>11</sub>-Rezeptor [105] und den tp2y-Rezeptor [180] bekannt. Diese wechselnde G-Protein-Kopplung führt z.T. sogar dazu, daß sich komplett andere pharmakologische Charakteristika für den entsprechenden Rezeptor ergeben [181].

Neben der Aktivierung der PLC durch P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren gibt es auch P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, deren Aktivierung zur Inhibition der Adenylatzyklase (AC) führt. Diese sind in der Regel an G<sub>i</sub>-Proteine gekoppelt, was sich an der Hemmbarkeit ihrer Wirkung durch PTX zeigen läßt (Boyer et al. 95, Bert-Mattera et al. 1996, Webb et al. 1996c in [2]). Bei der heterologen Expression von GPCR in Säugerzellen besteht immer die Möglichkeit, daß die funktionell exprimierten Rezeptoren auf Grund ihrer Überexpression mit Signaltransduktionskomponenten interagieren, die nicht zu ihrer natürlichen Signaltransduktionskaskade gehören [138]. Zu diesen „falschen“ Interaktionspartnern gehören bei GPCR vor allem G-Proteine anderer Klassen, zumal eine gewisse Promiskuität von GPCR in dieser Richtung besteht [66]. Aus diesem Grund wurde von uns der Einfluß von PTX auf die agonist-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung an den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP transfizierten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Überexpression des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors die Rekrutierung von G-Proteinen nicht artifiziell verändert. Am Signaltransduktionsprozeß, der durch die Aktivierung des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors ausgelöst wird, sind deshalb vermutlich nur G-Proteine der Klasse G<sub>q/11</sub> involviert. Diese G-Protein Kopplung liegt ebenfalls für die P2Y<sub>1</sub>-Aktivierung in nicht-transfizierten HEK293 Zellen vor [134].

Die beschriebene Aktivierbarkeit, die Ergebnisse der PTX-Experimente, sowie die Ergebnisse der Experimente mit Heparin bzw. U73122 belegen die reguläre G-Protein Kopplung am rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-Rezeptor. Zumindest theoretisch könnte der GFP-Fusionsanteil auf Grund seiner Größe und Position die Zugänglichkeit des Rezeptors für G-Proteine vermindern. Aus den Ca<sup>2+</sup>-Messungen mit unterschiedlichen Nukleotidagonisten ergeben sich aber keine Hinweise für eine Behinderung der G-Protein Kopplung durch den GFP-Anteil. Die Möglichkeit aber, daß die GFP-Modifikation zu konformationellen Veränderungen in der Proteinstruktur führt, die die Sensitivität des Rezeptors gegenüber den P2Y-selektiven Agonisten beeinflussen können, ist nicht völlig auszuschließen.

Die stark erhöhte Sensitivität der rP2Y<sub>1</sub>-wt transfizierten Zelllinie gegenüber P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten im Vergleich zur Sensitivität von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, die in anderen

Zellsystemen exprimiert wurden, setzt eine hoch effiziente Kopplung an die in HEK293 vorhandenen G-Proteine (vermutlich  $G_{q/11}$ ) voraus, denn GPCR können nur dann einen hochaffinen Zustand gegenüber ihren Liganden aufweisen, wenn sie an die entsprechenden G-Proteine gekoppelt sind [138,181].

Die Eigenschaften, die der in HEK293 Zellen stabil exprimierte  $P2Y_1$ -eGFP Rezeptor bzgl. seiner G-Protein Kopplung aufweist, machen die Zelllinie für Untersuchungen der Rezeptorregulation oder witerführender Interaktionen des Rezeptors auf der Ebene der G-Proteine geeignet, denn es liegen keine Hinweise auf eine unphysiologische Wechselwirkung (i.e. Kopplung an untypische G-Protein Kopplung) zwischen dem endogen exprimierten  $hP2Y_2$ -Rezeptor und dem heterolog exprimierten  $rP2Y_1$ -eGFP-Rezeptor vor.

#### 4.1.4 Kapazitiver $Ca^{2+}$ -Einstrom

$Ca^{2+}$  ist ein ubiquitär verbreitetes Signalmolekül. Die strikte Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist für die Zelle von entscheidender Bedeutung, da auch kleinste Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  Einfluß auf die unterschiedlichsten zellulären Prozesse nehmen können. Eine Komponente dieser Regulation ist der Mechanismus, durch den der kapazitive  $Ca^{2+}$ -Einstrom bewerkstelligt wird. Dieser Regulationsweg sorgt für einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom ins Zytoplasma, der durch die Entleerung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher aktiviert wird (Übersicht in [136,137]).

In den meisten nicht-erregbaren Zellen ist die Erhöhung der intrazellulären  $[Ca^{2+}]_i$ , die durch physiologische Stimuli ausgelöst wird, von  $InsP_3$ -sensitiven, intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern abhängig und deshalb kann dort auch regelmäßig ein „klassischer“ kapazitiver  $Ca^{2+}$ -Einstrom nachgewiesen werden. Erregbare Zellen scheinen diese Art kapazitiven Einstroms nicht zu besitzen, möglicherweise weil dort spannungsabhängige Ionenkanäle für den nötigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom während der Stimulation sorgen.

Durch  $Ca^{2+}$ -Messungen konnte bei HEK293 Zellen die Existenz eines kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstroms nachgewiesen werden. Durch die Aktivierung der  $P2Y_1$ -Rezeptoren werden ebenfalls intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher entleert, was zu Aktivierung des kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstroms durch „store operated calcium entry channel“ (SOCC) führt [182]. Die molekulare Identität der  $Ca^{2+}$ -Kanäle und ihr Aktivierungsmechanismus sind schon geraume Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Dabei wurden generell zwei Mechanismen, die zur Aktivierung der SOCC führen, diskutiert: zum einen die Beteiligung eines frei diffusiblen Botenstoffs, zum anderen eine direkte Interaktion dieser Kanäle mit dem ER- bzw. den in der ER-Membran vorhandenen  $InsP_3$ -Rezeptoren [136]. Boulay et al. 1999 [183] konnten



überzeugende Hinweise für die Beteiligung von TRP (transient receptor potential) Kanälen bei der Aktivierung des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms präsentieren. Dabei wird eine Domäne dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle postuliert, die direkt mit Domänen des  $\text{InsP}_3$ -Rezeptors interagiert. Dem  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor kommt damit eine zweifache Funktion zu: die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern und die Aktivierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zelle in Abhängigkeit von ansteigenden  $\text{InsP}_3$ -Konzentrationen oder absinkender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern. GPCR, die ihre Wirkung durch die Aktivierung der PLC entfalten, führen zur Produktion von  $\text{InsP}_3$  und damit zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus internen Speichern. Diese Speicherentleerung induziert möglicherweise konformationelle Veränderungen im  $\text{InsP}_3$ -Rezeptor, der dadurch mit einer TRP-Struktur des SOCC interagiert und diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal dadurch öffnet.

Über den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wird eine ganze Reihe zellulärer Funktionen reguliert. Dazu zählen z.B. Adhäsion, Motilität, Genexpression und Proliferation.  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in den Zellen können unterschiedliche Ausprägungen haben: einzelne transiente Erhöhungen, wiederholte Oszillationen oder länger anhaltende, erhöhte Plateaus.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen wurden häufig in nicht-erregbaren Zellen wie Hepatocyten [184], Endothelzellen [185] und Astrocyten [135] gemessen. Der Mechanismus der zur Entstehung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen führt ist vom Zelltyp abhängig. Jedoch können  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom,  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus internen,  $\text{InsP}_3$ -sensitiven Speichern – der damit verbundene kapazitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom- und die Wechselwirkungen mit dem Membranpotential eine Rolle spielen. Die unterschiedlichen Ausprägungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale scheinen eine gewisse Spezifität der zellulären Antwort zu codieren, d.h. Amplitude und Dauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort können zu einer differentiellen Aktivierung verschiedener Transkriptionsregulatoren (z.B. NF- $\kappa$ B, JNK, NFAT) führen [186,187,188]. Die differentielle Aktivierung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren beruht auf der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und der unterschiedlichen Dynamik der entsprechenden Signaltransduktionswege. Über diese Codierungsstrategie,  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bzgl. ihrer Amplitudengröße und -dauer zu variieren, wird es der Zelle möglich, eine hohe Spezifität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale zu gewährleisten. In welcher Weise purinerge Rezeptoren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, ist in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, die Beteiligung von metabotropen purinergen Rezeptoren an der Aktivierung unterschiedlicher Gene ist jedoch bekannt [2,14,59,189]. Ob purinerge Rezeptoren Einfluß auf die Codierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen nehmen können, um eine Genaktivierung, die z.B. zu trophischen oder apoptotischen Effekten in Zellen führt, auszulösen ist eine interessante Fragestellung, die in einer weiteren Studie an den transfizierten Zellen untersucht werden könnte.

## 4.2 Rezeptorregulation

Proteinphosphorylierung ist einer der wichtigsten molekularen Mechanismen, über den extrazelluläre Signale ihren biologischen Effekt in Zellen auslösen. Die Aktivierung von Proteinkinasen spielt deshalb auch eine zentrale Rolle in Signaltransduktionsprozessen. Proteinphosphorylierungssysteme bestehen aus a) den Phosphoproteinen, deren Aktivität über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung reguliert wird, b) den Proteinkinasen und c) den Proteinphosphatasen, die das Phosphorylierungssystem wieder in seinen Grundzustand bringen [158,190]. Viele Rezeptoren sind Zielproteine von Proteinkinasen und werden über ihren Phosphorylierungszustand in ihrer Aktivität reguliert. Diese Regulation ist, was die GPCR betrifft, am besten beim  $\beta$ -adrenergen Rezeptor untersucht. Es hat sich herausgestellt, daß eine länger anhaltende Aktivierung der Rezeptoren zur Phosphorylierung dieser Rezeptoren führt und eine Rezeptordesensibilisierung induzieren kann. Diese Phosphorylierung erfolgt zum einen durch spezielle G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) [20,24,146,147], kann aber auch durch „second messenger“ Kinasen, wie z.B. PKC oder CamKII erfolgen [148,149,150].  $[Ca^{2+}]_i$  regulierte, intrazelluläre Effekte werden häufig durch  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängige Proteinkinasen (CamKII) vermittelt. CamKII ist ein multifunktionales Protein, das in hoher Konzentration im Nervensystem (z.B. Synapsen) vorkommt und funktional an Lernprozessen und Gedächtnisbildung beteiligt ist. Durch die Bindung von Calmodulin/ $Ca^{2+}$  wird die CamK aktiviert. Dabei wird die Blockierung der katalytischen Domänen des Enzyms, die durch eine Interaktion mit inhibitorischen Domänen bewirkt wird, durch Phosphorylierung der inhibitorischen Domänen aufgehoben.

Über die Regulation der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren ist auf Grund fehlender molekularbiologischer Werkzeuge wie Antikörper oder subtypspezifische Agonisten bzw. Antagonisten nahezu nichts bekannt. Lediglich der für GPCR im Allgemeinen akzeptierte Desensibilisierungsablauf und ein relativ langsam einsetzender Desensibilisierungseffekt sind berichtet. Homologe Desensibilisierung ist ebenfalls durch die Abschwächung der InsP<sub>3</sub>-Bildung nach Vorstimulation mit dem entsprechenden Agonisten für P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>2</sub>-ähnliche Rezeptoren berichtet. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit zur Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durchgeführten  $Ca^{2+}$ -Messungen decken sich mit diesen Berichten, denn ein deutlicher Effekt bei der homologen Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren läßt sich erst nach einer Stimulationsdauer von ca. 5 min und einer Agonistkonzentration von 10  $\mu$ M erkennen. Was die heterologe Desensibilisierung der P2Y-Rezeptoren betrifft, wurde eine von PKC und  $Ca^{2+}$  unabhängige Desensibilisierung an Erythrozytenmembranen festgestellt und eine partielle

Desensibilisierung der physiologischen 2-MeSATP-Wirkung an Endothelzellen durch UTP [2]. Bei den hier untersuchten HEK Zelllinien konnte von uns ebenfalls eine partielle Desensibilisierung der durch ADP bzw. 2-MeSATP induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort durch UTP gezeigt werden. P2Y<sub>1</sub>-spezifische Agonisten scheinen dagegen nicht in der Lage zu sein, die durch UTP induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort in den HEK293 Zellen zu inhibieren. Dieses Verhalten könnte einen Mechanismus zur differentiellen Regulation verschiedener, in einer Zelle exprimierter P2Y-Rezeptoren darstellen.

Darüber hinaus wurde die Agonist-induzierte Internalisierung des hP2Y<sub>2</sub>-Rezeptor mit Hilfe eines gentechnisch markierten („tagging“) Rezeptorkonstrukt gezeigt [94]. Eine Agonist-induzierte Internalisierung konnte von uns für den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptor ebenfalls im fluoreszenzmikroskopischen Bild gezeigt werden. Eine deutliche Verlagerung der GFP-Fluoreszenz von der Plasmamembran ins Zellinnere konnte nach längeranhaltender (ca. 1h) Stimulation mit P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Agonisten beobachtet werden. Prozesse, die zur Rezeptor-desensibilisierung und Internalisierung führen, sind eng mit der regulierenden Aktivität von Kinasen an den Rezeptoren verbunden.

Neben anderen beschreiben z.B. Chen et al. 1999 [191] eine negative „feed back“ – Regulation der PKC $\beta$  auf die Inositolphosphatbildung, die durch die Aktivierung endogener P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> -ähnlicher Rezeptoren in Endothelzellen induziert wird. Diese Veröffentlichung steht in der Folge von zwei weiteren, Chen et al 1996 [148] und 1997 [192], in denen ebenfalls von Regulationsmechanismen bestimmter PKC-Isoformen auf den durch P2Y<sub>1</sub>- bzw. P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren stimulierten Inositolphosphatmetabolismus berichtet wird. Der Angriffspunkt dieser Regulation scheint zumindest bei Neuro 2A Zellen das beteiligte G-Protein der Klasse G<sub>q</sub> zu sein [192]. Dabei scheint die Stimulation der PKC durch kurzzeitige TPA-Gabe einen stärkeren Effekt auf die P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten zellulären Effekte zu haben als auf die durch den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelten [193,194,195].

Eine genaue Zuordnung des Zielproteins für die PKC erlauben diese Untersuchungen nicht, jedoch legt das Ergebnis der Proteinsequenzanalyse des rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptors die Beteiligung der PKC an der Regulation des Rezeptors nahe, da ein Sequenzmotif für eine potentielle PKC-Erkennungssequenz im C-terminalen, intrazellulären Bereich des Rezeptors (s.a. Abb.2) liegt. Das C-terminale Ende und die dritte intrazelluläre Schleife sind bei GPCR allgemein funktionell wichtige Bereiche, die bei der G-Protein Bindung und der Regulation durch Proteinkinasen eine Rolle spielen [151,152].

Die Aktivierung der PKC führte in den von uns durchgeführten Experimenten zur Rezeptorregulation zu einem spezifischen Desensibilisierungseffekt, der sich in der Agonist-

induzierten Reduktion der durch ADP ausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort äußert. Diese Reduktion ist bei den transfizierten Zelllinien deutlicher ausgeprägt als bei den nicht-transfizierten Zellen und könnte seine Ursache in einer unterschiedlichen PKC-Sensitivität der beiden  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptortypen aus Ratte bzw. Mensch haben. Die Identifikation der PKC-Effektoren kann durch radioaktive Markierung mit  $\gamma$ -Phosphat erfolgen, wurde in der vorliegenden Studie aber nicht durchgeführt. Aus diesem Grund kommen als Zielproteine der PKC-Wirkung sowohl die  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptoren direkt (Rezeptorphosphorylierung) als auch andere Signaltransduktionskomponenten in Frage, d.h. daß die PKC beispielsweise im bereits erwähnten negativen „feedback“-Regulationsmechanismus an der Rezeptorregulation beteiligt ist. Eine andere Möglichkeit, die PKC-Interaktionspartner zu identifizieren bieten die Fluoreszenzeigenschaften des r $\text{P2Y}_1$ -eGFP Rezeptors. Sie ermöglichen physiologische Untersuchungen an transfizierten Zellen, bei denen die Western Blottechnik zur Klärung der PKC-vermittelten Phosphorylierung des  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptors (über Antikörper) und die Beobachtung der Translokation der desensitisierten Rezeptoren mittels konfokaler Laserscannmikroskopie kombiniert werden können.

Neben möglichen Phosphorylierungsstellen für die PKC sind in der Aminosäuresequenz der  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptoren auch potentielle Erkennungsstellen für CamKII vorhanden (Abbildung 10). Die direkte Beteiligung der CamKII an der Signaltransduktion von GPCR [196,197] ist nachgewiesen, außerdem werden NMDA-Rezeptoren direkt von der CamKII phosphoryliert [198,199]. Aus diesem Grund wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an den HEK293-Zelllinien mit dem spezifischen CamKII-Inhibitor KN62 durchgeführt. Die Inhibition der CamKII führte zu einer deutlichen Reduktion des agonist-induzierten Desensitisierungseffekts (Abbildung 33). Die Ergebnisse dieser Messungen (Abbildung 35) sprechen für eine Beteiligung der Cam KII an der  $\text{P2Y}_1$ -Rezeptorregulation, wobei das eigentliche Zielprotein der CamK von uns ebenfalls noch nicht genau identifiziert ist (s.o. bei PKC). Die direkte oder indirekte Beteiligung unterschiedlicher Proteinkinasen, wie z.B. PKC und CamKII, an der Regulation der Rezeptoraktivität erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der zellulären Koexpression unterschiedlicher purinerge Rezeptoren sinnvoll. Die endogene Expression von  $\text{P2Y}_1$ - und  $\text{P2Y}_2$ -Rezeptoren in HEK 293-Zellen gibt dafür ein Beispiel. Beide Rezeptortypen haben ganz ähnliche Signaltransduktionskaskaden und können darüber hinaus –obwohl in sehr unterschiedlichem Maß - von ATP aktiviert werden. Bei der Feinabstimmung der Rezeptorwirkung spielt möglicherweise die unterschiedliche Sensitivität der Rezeptoren gegenüber PKC, die ebenfalls ein wichtiger negativer feedback“-Regulator der PLC Aktivität

ist, in Kooperation mit Faktoren, die die Aktivität der CamKII beeinflussen, eine entscheidende Rolle [2].

Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen, die in Signaltransduktionsprozessen involviert sind, wird eine Fülle von zellulären Funktionen gesteuert. Dazu gehört z.B. die posttranslationale Regulation von GPCR, die von Proteinphosphorylierungsprozessen dominiert wird. GPCR sind dabei nicht nur die Substrate von PKA, PKC und Rezeptor-spezifischen Kinasen (GRK), sondern ebenfalls von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität [144,200]. Die Zielproteine werden von Kinasen an bestimmten Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten phosphoryliert, für die Entfernung dieser Phosphatgruppen ist die Aktivität bestimmter Proteinphosphatasen erforderlich. Das Wechselspiel von Kinase- und Phosphatasewirkung an einem Zielprotein reguliert dessen Aktivitätszustand und unterliegt deshalb selbst einer strikten Kontrolle.

Wichtige Vertreter der Proteinphosphatasen sind die PP1 und PP2A, die katalytische Untereinheit von PP1 ist an regulatorische Untereinheiten gebunden, die neben der Enzymaktivität auch die subzelluläre Lokalisation der PP1 bestimmen. Die PP2A wird durch transiente Tyrosinphosphorylierung inaktiviert. Die Aktivität der PP2B (Calcineurin), die aus katalytischer und regulatorischer Untereinheit zusammengesetzt ist, hängt von der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin ab. Daneben sind mehr als 40 Tyrosinphosphatasen bekannt und eine weitere Gruppe von Phosphatasen, die duale Substratspezifität aufweisen (z.B. Serin/Threonin und Tyrosin). Diese Phosphatasen sind an der Aktivierung Zyklin-abhängiger Kinasen und der Inhibition von MAPK beteiligt. Mittlerweile ist gut belegt, daß Proteinphosphatasen nicht nur als Gegenspieler der Kinasewirkung an Phosphoproteinen fungieren, sondern wichtige Regulatoren der Proteinkinaseaktivität sind: PP2A scheint die wichtigste Kinasephosphatase in eukaryotischen Zellen zu sein, die zur Abschaltung aktivierter Proteinkinasen führt.

Es gibt gute Hinweise für die Regulation so wichtiger zellulärer Proteinkinasefamilien wie die PKB, PKC, p70 S6-Kinase, CamK, MAPK und I $\kappa$ B-Kinasen durch PPA2 [153]. Um die Wirkung der PP2A auf die an der Regulation der in den HEK293 Zelllinien exprimierten P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren beteiligten Kinasen zu untersuchen, wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen zwei sehr wirksame Phosphataseinhibitoren eingesetzt: Calyculin A und Okadaic Acid. Die eingesetzten Konzentrationen sind für die spezifische Hemmung der PPA2 geeignet. Die Ergebnisse dieser Messungen sprechen für eine Wechselwirkung der PPA2 mit Proteinkinasen, die an der durch ADP-Stimulation induzierten Rezeptordesensibilisierung in HEK293 Zellen beteiligt sind. Die gemessenen Effekte können sich z.B. durch die Verlängerung der Aktivitätsdauer bestimmter

Kinasen (z.B. PKC und CamKII ) erklären lassen. Die Unterdrückung der Desphosphorylierung der Kinasen durch die Hemmung von Phosphatasen (z.B. der PPA2) führt zu einer solchen verlängerten Aktivierung der Kinasen. Es kommt zur verstärkten Phosphorylierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren, also zu einer verstärkten Desensitisierung der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Antwort. Daneben gibt es auch Arbeiten, die darauf hinweisen, daß die Hemmung von Phosphatasen nicht die Desensitisierung der Rezeptoren, sondern die Resensitisierung dieser Rezeptoren beeinflussen. Die Hemmung von Phosphatasen führt in diesem Fall zu einem verminderten Rezeptorrecycling und deshalb zu einer verminderten („desensitisierten“) zellulären Antwort auf die Agoniststimulation. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Beleg für die Beteiligung von Proteinkinasen an der Regulation der Aktivität von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren in HEK293 Zellen und geben einen Hinweis darauf, daß möglicherweise auch in HEK293 Zellen die Phosphatase A2 (PPA2) eine Rolle bei der Regulation von Proteinkinasekaskaden spielt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das in dieser Arbeit beschriebene Rezeptor GFP Fusionsprotein das erste veröffentlichte P2Y-eGFP Rezeptorkonstrukt ist. Der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptor wurde stabil in HEK293 Zellen exprimiert und ist funktionell an die Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> gekoppelt. Die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung erfolgt aus InsP<sub>3</sub>-sensitiven, internen Ca<sup>2+</sup>-Speichern in Folge einer Rezeptoraktivierung, die durch Agonisteinwirkung hervorgerufen wird. Die Kopplung der Rezeptoren an PLC erfolgt vermutlich durch durch G-Proteine der Klasse G<sub>q/11</sub>, Anzeichen für eine artifiziell veränderte G-Protein-Kopplung konnten nicht gefunden werden. Die korrekte Rezeptorlokalisierung und seine Glykosylierung konnten biochemisch und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die pharmakologischen Eigenschaften des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP-Rezeptors sind mit den Eigenschaften des Wildtyprezeptors vergleichbar, der ebenfalls in HEK293 Zellen exprimiert wurde. Die exprimierten Rezeptoren sind durch P2Y<sub>1</sub>-spezifische Nukleotidagonisten in nanomolaren Konzentrationen aktivierbar und die Aktivierung beider Rezeptoren läßt sich durch PPADS kompetitiv hemmen.

Die Aktivierung der Rezeptoren durch P2Y<sub>1</sub>-spezifische Agonisten induziert eine konzentrations- und zeitabhängige homologe Desensitisierung, an der möglicherweise PKC und CamKII beteiligt sind. Diese durch sekundäre Botenstoffe aktivierten („second messenger“) Kinasen könnten durch die Phosphatase PPA2 reguliert sein und es gibt Hinweise auf eine heterologe Desensitisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren durch die Aktivität von P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoren. Durch länger andauernde Stimulation der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren konnte an lebenden Zellen der transfizierten Zelllinie eine Translokation der GFP-Fluoreszenz

induziert werden, die auf die spezifische Internalisierung der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptoren schließen läßt.

Aus diesem Grund ist die mit dem rP2Y<sub>1</sub>-eGFP stabil transfizierte Zelllinie geeignet, um die physiologische Bedeutung der Rezeptortranslokation (z.B. Internalisierung und Recycling) in der P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Signaltransduktion zu untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Nukleotide wie z.B. ATP und ihre Abbauprodukte - ADP und Adenosin - besitzen eine wichtige Funktion als extrazelluläre Signalmoleküle. Diese sind an der Signalweiterleitung zwischen Zellen beteiligt und entfalten ihre Wirkung durch die Aktivierung von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren sind ubiquitär verbreitet und gehören zu den P1- oder P2-Rezeptoren. In den letzten Jahren wurde für eine ganze Reihe ATP- und UTP-sensitiver Rezeptoren die cDNA kloniert. Einige Vertreter dieser Rezeptoren gehören zur Klasse der Liganden-aktivierten Ionenkanäle (P2X), andere zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (P2Y). Bei den P2Y-Rezeptoren sind mittlerweile eine ganze Reihe von Rezeptorsubtypen pharmakologisch charakterisiert und in ihrer Nukleotidsequenz bekannt. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt zumeist die Aktivierung der PLC $\beta$ , was zur Bildung von InsP<sub>3</sub> und Diacylglycerol führt und eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zur Folge hat. Neben diesen kurzfristigen Effekten kann die Rezeptoraktivierung aber auch länger andauernde, proliferative Effekte haben, die z.B. über die Aktivierung der MAPK Kaskade vermittelt werden.

In der Absicht die Signaltransduktion der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors aus Ratte (rP2Y<sub>1</sub>), die Rezeptorlokalisierung und Phänomene wie die Desensibilisierung, die Internalisierung und das Rezeptorrecycling untersuchen zu können, konstruierten wir ein Fusionsprotein, das sich aus dem metabotropen rP2Y<sub>1</sub>-Rezeptor und GFP (green fluorescent protein) zusammensetzt. Die Untersuchungen wurden an stabil transfizierten HEK293 Zelllinien durchgeführt, die entweder den rP2Y<sub>1</sub> Wildtyprezeptor (P2Y<sub>1</sub>-wt) oder den rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptor, der am C terminalen Ende mit GFP modifiziert wurde, exprimieren. Für beide Rezeptoren wurde die funktionelle Expression mittels Ca<sup>2+</sup>-Messungen an Einzelzellen bewiesen, wobei der Ca<sup>2+</sup>-sensitive Farbstoff Fura-2 verwendet wurde. Der rP2Y<sub>1</sub>-eGFP ist genau wie der rP2Y<sub>1</sub>-wt Rezeptor an die durch PLC-Aktivierung vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Speichern gekoppelt. Dieses wurde in Experimenten mit Heparin, einem spezifischem Antagonisten des InsP<sub>3</sub>-Rezeptors, und U 73122, einem spezifischen Hemmstoff der PLC, gezeigt. Die P2Y<sub>1</sub>-selektiven Agonisten 2-MeSADP und 2-MeSATP waren die Liganden mit der höchsten Wirksamkeit (EC<sub>50</sub> im nanomolaren Bereich) an den heterolog exprimierten Rezeptoren. Für beide heterolog exprimierte Rezeptoren wurde die identische, für P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren typische Ligandenselektivität nachgewiesen: 2-MeSADP = 2-MeSATP > ADP > ATP $\alpha$ S, ATP >> UTP. In Western-Blot Experimenten und mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde die korrekte Lokalisation, sowie die durch Agonistwirkung induzierte Internalisierung des rP2Y<sub>1</sub>-eGFP Rezeptors bestätigt.

Auf Grund dieser Befunde ist die mit dem rP2Y<sub>1</sub>-eGFP stabil transfizierte Zelllinie geeignet weitergehende Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der Rezeptortranslokation (z.B. Internalisierung und Recycling) in der P2Y<sub>1</sub>-spezifischen Signaltransduktion durchzuführen.



## 6 Literatur

1. Yang, S., D.J. Cheek, D.P. Westfall, and I.L. Buxton, *Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells.* *Circ Res*, 1994. **74**: 401-407.
2. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines.* *Pharmacol Rev*, 1998. **50**: 413-492.
3. Jiang, Q., D. Guo, B.X. Lee, A.M. Van Rhee, Y.C. Kim, R.A. Nicholas, J.B. Schachter, T.K. Harden, and K.A. Jacobson, *A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y<sub>1</sub> receptor.* *Mol Pharmacol*, 1997. **52**: 499-507.
4. Milligan, G., *Exploring the dynamics of regulation of G protein-coupled receptors using green fluorescent protein.* *Br J Pharmacol*, 1999. **128**: 501-510.
5. Van Rhee, A.M., B. Fischer, P.J. Van Galen, and K.A. Jacobson, *Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template.* *Drug Des Discov*, 1995. **13**: 133-154.
6. Nicke, A., H.G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler, and G. Schmalzing, *P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels.* *Embo J*, 1998. **17**: 3016-3028.
7. Evans, R.J., C. Lewis, C. Virginio, K. Lundstrom, G. Buell, A. Surprenant, and R.A. North, *Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells.* *J Physiol (Lond)*, 1996. **497**: 413-422.
8. Helmreich, E.J. and K.P. Hofmann, *Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer.* *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1286**: 285-322.
9. Iiri, T., P. Herzmark, J.M. Nakamoto, C. van Dop, and H.R. Bourne, *Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function.* *Nature*, 1994. **371**: 164-168.
10. Meij, J.T., *Regulation of G protein function: implications for heart disease.* *Mol Cell Biochem*, 1996. **157**: 31-38.
11. Igishi, T., S. Fukuhara, V. Patel, B.Z. Katz, K.M. Yamada, and J.S. Gutkind, *Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-Jun NH(2)-terminal kinase activation.* *J Biol Chem*, 1999. **274**: 30738-30746.
12. Rudolph, M.G., C. Weise, S. Mirolid, B. Hillenbrand, B. Bader, A. Wittinghofer, and W.D. Hardt, *Biochemical analysis of SopE from Salmonella typhimurium, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for RhoGTPases.* *J Biol Chem*, 1999. **274**: 30501-30509.
13. Tian, J. and M. Karin, *Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin).* *J Biol Chem*, 1999. **274**: 15173-15180.
14. Neary, J.T., Y. Kang, Y. Bu, E. Yu, K. Akong, and C.M. Peters, *Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway.* *J Neurosci*, 1999. **19**: 4211-4220.
15. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**: 211-218.
16. Luttrell, L.M., G.J. Della Rocca, T. van Biesen, D.K. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, *Gbg subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation.* *J Biol Chem*, 1997. **272**: 4637-4644.
17. Luttrell, L., *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors.*, D. Y and L. R.J. Editors. 1999, *Curr Opin Cell Biol*: 177-183.
18. Leurs, R., M.J. Smit, A.E. Alewijnse, and H. Timmerman, *Agonist-independent regulation of constitutively active G-protein-coupled receptors.* *Trends Biochem Sci*, 1998. **23**: 418-422.
19. Bunemann, M., K.B. Lee, R. Pals-Rylaarsdam, A.G. Roseberry, and M.M. Hosey, *Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system.* *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: 169-192.

20. Ferguson, S., Z. J, B. LS, and C. MG, *Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization.*, 1998, Life Sci: 1561-1565.
21. Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, and M.G. Caron, *Association of b-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization.* J Biol Chem, 1999. **274**: 32248-32257.
22. Cao, T.T., R.W. Mays, and M. von Zastrow, *Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits.* J Biol Chem, 1998. **273**: 24592-24602.
23. Roettger, B.F., R.U. Rentsch, D. Pinon, E. Holicky, E. Hadac, J.M. Larkin, and L.J. Miller, *Dual pathways of internalization of the cholecystikinin receptor.* J Cell Biol, 1995. **128**: 1029-1041.
24. Aragay, A., A. Ruiz-Gomez, P. Penela, S. Sarnago, A. Elorza, M. Jimenez-Sainz, and j.F. Mayor, *G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions.* 1998, FEBS Lett: :37-40.
25. Malapert, M., H. Guizouarn, B. Fievet, R. Jahns, F. Garcia-Romeu, R. Motais, and F. Borgese, *Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in trout red blood cells.* J Exp Biol, 1997. **200**: 353-560.
26. Laubinger, W. and G. Reiser, *Evidence for a G protein-coupled diadenosine-5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) receptor binding site in lung membranes from rat.* Eur J Pharmacol, 1999. **366**: 93-100.
27. Zimmermann, H., N. Braun, B. Kegel, and P. Heine, *New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system.* Neurochem Int, 1998. **32**: 421-425.
28. Kunapuli, S.P., *Multiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function.* Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**: 391-394.
29. Barnard, E.A., J. Simon, and T.E. Webb, *Nucleotide receptors in the nervous system. An abundant component using diverse transduction mechanisms.* Mol Neurobiol, 1997. **15**: 103-129.
30. Webb, T.E., J. Simon, B.J. Krishek, A.N. Bateson, T.G. Smart, B.F. King, G. Burnstock, and E.A. Barnard, *Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor.* FEBS Lett, 1993. **324**: 219-225.
31. Filtz, T.M., Q. Li, J.L. Boyer, R.A. Nicholas, and T.K. Harden, *Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C.* Mol Pharmacol, 1994. **46**: 8-14.
32. Tokuyama, Y., M. Hara, E.M. Jones, Z. Fan, and G.I. Bell, *Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **211**: 211-218.
33. Henderson, D.J., D.G. Elliot, G.M. Smith, T.E. Webb, and I.A. Dainty, *Cloning and characterisation of a bovine P2Y receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **212**: 648-656.
34. Ayyanathan, K., S.L. Naylor, and S.P. Kunapuli, *Structural characterization and fine chromosomal mapping of the human P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor gene (P2RY1).* Somat Cell Mol Genet, 1996. **22**: 419-424.
35. Leon, C., C. Vial, J.P. Cazenave, and C. Gachet, *Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y<sub>1</sub> purinoceptor.* Gene, 1996. **171**: 295-297.
36. Schachter, J.B., Q. Li, J.L. Boyer, R.A. Nicholas, and T.K. Harden, *Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y<sub>1</sub>-purinoceptor.* Br J Pharmacol, 1996. **118**: 167-173.
37. Janssens, R., D. Communi, S. Piroton, M. Samson, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning and tissue distribution of the human P2Y<sub>1</sub> receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **221**: 588-593.
38. Lustig, K.D., A.K. Shiau, A.J. Brake, and D. Julius, *Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: 5113-5117.
39. Parr, C.E., D.M. Sullivan, A.M. Paradiso, E.R. Lazarowski, L.H. Burch, J.C. Olsen, L. Erb, G.A. Weisman, R.C. Boucher, and J.T. Turner, *Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: 3275-3279.
40. Rice, W.R., F.M. Burton, and D.T. Fiedeldej, *Cloning and expression of the alveolar type II cell P2u-purinergic receptor.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1995. **12**: 27-32.

41. Chen, Z.P., N. Krull, S. Xu, A. Levy, and S.L. Lightman, *Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor*. *Endocrinology*, 1996. **137**: 1833-1840.
42. Enomoto, K., K. Furuya, R.C. Moore, S. Yamagishi, T. Oka, and T. Maeno, *Expression cloning and signal transduction pathway of P2U receptor in mammary tumor cells*. *Biol Signals*, 1996. **5**: 9-21.
43. Bowler, W.B., M.A. Birch, J.A. Gallagher, and G. Bilbe, *Identification and cloning of human P2U purinoceptor present in osteoclastoma, bone, and osteoblasts*. *J Bone Miner Res*, 1995. **10**: 1137-1145.
44. Godecke, S., U.K. Decking, A. Godecke, and J. Schrader, *Cloning of the rat P2u receptor and its potential role in coronary vasodilation*. *Am J Physiol*, 1996. **270**: C570-577.
45. Seye, C.I., A.P. Gadeau, D. Daret, F. Dupuch, P. Alzieu, L. Capron, and C. Desgranges, *Overexpression of P2Y<sub>2</sub> purinoceptor in intimal lesions of the rat aorta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**: 3602-3610.
46. Poulsen, C.R., K. Bokvist, H.L. Olsen, M. Hoy, K. Capito, P. Gilon, and J. Gromada, *Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic b-cells*. *Diabetes*, 1999. **48**: 2171-2181.
47. Fischer, B., A. Chulkin, J.L. Boyer, K.T. Harden, F.P. Gendron, A.R. Beaudoin, J. Chapal, D. Hillaire-Buys, and P. Petit, *2-thioether 5'-O-(1-thiotriphosphate)adenosine derivatives as new insulin secretagogues acting through P2Y-Receptors*. *J Med Chem*, 1999. **42**: 3636-3646.
48. Marriott, I., E.W. Inscho, and K.L. Bost, *Extracellular uridine nucleotides initiate cytokine production by murine dendritic cells*. *Cell Immunol*, 1999. **195**: 147-156.
49. Weisman, G.A., J.T. Turner, and J.S. Fedan, *Structure and function of P2 purinoceptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **277**: 1-9.
50. McCoy, D.E., A.L. Taylor, B.A. Kudlow, K. Karlson, M.J. Slattery, L.M. Schwiebert, E.M. Schwiebert, and B.A. Stanton, *Nucleotides regulate NaCl transport in mIMCD-K2 cells via P2X and P2Y purinergic receptors*. *Am J Physiol*, 1999. **277**: F552-559.
51. Inglis, S.K., A. Collett, H.L. McAlroy, S.M. Wilson, and R.E. Olver, *Effect of luminal nucleotides on Cl<sup>-</sup> secretion and Na<sup>+</sup> absorption in distal bronchi*. *Pflugers Arch*, 1999. **438**: 621-627.
52. Fredholm, B.B., *Purinoceptors in the nervous system*. *Pharmacol Toxicol*, 1995. **76**: 228-239.
53. Pintor, J. and M.T. Miras-Portugal, *A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes*. *Br J Pharmacol*, 1995. **115**: 895-902.
54. Osipchuk, Y. and M. Cahalan, *Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells*. *Nature*, 1992. **359**: 241-244.
55. Enomoto, K., K. Furuya, S. Yamagishi, T. Oka, and T. Maeno, *The increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration induced by mechanical stimulation is propagated via release of pyrophosphorylated nucleotides in mammary epithelial cells*. *Pflugers Arch*, 1994. **427**: 533-542.
56. Ferguson, D.R., I. Kennedy, and T.J. Burton, *ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?* *J Physiol*. 1997. **505**: 503-511.
57. Lazarowski, E.R., L. Homolya, R.C. Boucher, and T.K. Harden, *Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 24348-24354.
58. Anderson, C.M. and F.E. Parkinson, *Potential signalling roles for UTP and UDP: sources, regulation and release of uracil nucleotides*. *Trends Pharmacol Sci*, 1997. **18**: 387-392.
59. Neary, J.T., *Trophic actions of extracellular ATP on astrocytes, synergistic interactions with fibroblast growth factors and underlying signal transduction mechanisms*. *Ciba Found Symp*, 1996. **198**: 130-139; discussion 139-141.
60. Neary, J.T., S.R. Whittemore, Q. Zhu, and M.D. Norenberg, *Synergistic activation of DNA synthesis in astrocytes by fibroblast growth factors and extracellular ATP*. *J Neurochem*, 1994. **63**: 490-494.

61. Feolde, E., P. Vigne, J.P. Breittmayer, and C. Frelin, *ATP, a partial agonist of atypical P2Y purinoceptors in rat brain microvascular endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1995. **115**: 1199-1203.
62. Boyer, J.L., E.R. Lazarowski, X.H. Chen, and T.K. Harden, *Identification of a P2Y-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **267**: 1140-1146.
63. Boyer, J.L., I.E. Zohn, K.A. Jacobson, and T.K. Harden, *Differential effects of P2-purinoceptor antagonists on phospholipase C- and adenylyl cyclase-coupled P2Y-purinoceptors*. Br J Pharmacol, 1994. **113**: 614-620.
64. Ikeuchi, Y. and T. Nishizaki, *The P2Y purinoceptor-operated potassium channel is possibly regulated by the  $\beta$  subunits of a pertussis toxin-insensitive G-protein in cultured rat inferior colliculus neurons*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**: 589-596.
65. Ikeuchi, Y., T. Nishizaki, M. Mori, and Y. Okada, *Adenosine activates the  $K^+$  channel and enhances cytosolic  $Ca^{2+}$  release via a P2Y purinoceptor in hippocampal neurons*. Eur J Pharmacol, 1996. **304**: 191-199.
66. Webb, T.E., E. Feolde, P. Vigne, J.T. Neary, A. Runberg, C. Frelin, and E.A. Barnard, *The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylyl cyclase*. Br J Pharmacol, 1996. **119**: 1385-1392.
67. Dixon, C.J., P.H. Cobbold, and A.K. Green, *Actions of ADP, but not ATP, on cytosolic free  $Ca^{2+}$  in single rat hepatocytes mimicked by 2-methylthioATP*. Br J Pharmacol, 1995. **116**: 1979-1984.
68. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Discrimination by PPADS between endothelial P2Y- and P2U-purinoceptors in the rat isolated mesenteric arterial bed*. Br J Pharmacol, 1996. **118**: 428-434.
69. Webb, T.E., M.G. Kaplan, and E.A. Barnard, *Identification of 6H1 as a P2Y purinoceptor: P2Y<sub>5</sub>*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **219**: 105-110.
70. Fernando, K.C., C.E. Gargett, and J.S. Wiley, *Activation of the P2Z/P2X7 receptor in human lymphocytes produces a delayed permeability lesion: involvement of phospholipase D*. Arch Biochem Biophys, 1999. **362**: 197-202.
71. Milella, M., A. Gismondi, P. Roncaioli, G. Palmieri, S. Morrone, M. Piccoli, L. Frati, M.G. Cifone, and A. Santoni, *Beta 1 integrin cross-linking inhibits CD16-induced phospholipase D and secretory phospholipase A2 activity and granule exocytosis in human NK cells: role of phospholipase D in CD16-triggered degranulation*. J Immunol, 1999. **162**: 2064-2072.
72. Czarny, M., Y. Lavie, G. Fiucci, and M. Liscovitch, *Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101*. J Biol Chem, 1999. **274**: 2717-2724.
73. Lennartz, M.R., *Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**: 415-430.
74. Blackwood, R.A., J.E. Smolen, A. Transue, R.J. Hessler, D.M. Harsh, R.C. Brower, and S. French, *Phospholipase D activity facilitates  $Ca^{2+}$ -induced aggregation and fusion of complex liposomes*. Am J Physiol, 1997. **272**: C1279-1285.
75. Klinker, J.F., K. Wenzel-Seifert, and R. Seifert, *G-protein-coupled receptors in HL-60 human leukemia cells*. Gen Pharmacol, 1996. **27**: 33-54.
76. el-Moatassim, C. and G.R. Dubyak, *A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages*. J Biol Chem, 1992. **267**: 23664-23673.
77. Fabre, J.E., M. Nguyen, A. Latour, J.A. Keifer, L.P. Audoly, T.M. Coffman, and B.H. Koller, *Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y<sub>1</sub>-deficient mice*. Nat Med, 1999. **5**: 1199-1202.
78. Cressman, V.L., E. Lazarowski, L. Homolya, R.C. Boucher, B.H. Koller, and B.R. Grubb, *Effect of loss of P2Y<sub>2</sub> receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl<sup>-</sup> transport*. J Biol Chem, 1999. **274**: 26461-26468.
79. Homolya, L., W.C. Watt, E.R. Lazarowski, B.H. Koller, and R.C. Boucher, *Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y<sub>2</sub> receptor (-/-) mice*. J Biol Chem, 1999. **274**: 26454-26460.
80. Patel, V., C. Brown, A. Goodwin, N. Wilkie, and M.R. Boarder, *Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production*. Biochem J, 1996. **320**: 221-226.

81. Yu, S.M., S.F. Chen, Y.T. Lau, C.M. Yang, and J.C. Chen, *Mechanism of extracellular ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**: 1000-1009.
82. Huwiler, A., G. van Rossum, M. Wartmann, and J. Pfeilschifter, *Stimulation by extracellular ATP and UTP of the stress-activated protein kinase cascade in rat renal mesangial cells*. *Br J Pharmacol*, 1997. **120**: 807-812.
83. Hiruma, H. and C.W. Bourque, *P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro*. *J Physiol*, 1995. **489**: 805-811.
84. Filippov, A.K., T.E. Webb, E.A. Barnard, and D.A. Brown, *Inhibition by heterologously-expressed P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptors of N-type calcium currents in rat sympathetic neurones*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**: 849-851.
85. Schulze-Lohoff, E., M. Bitzer, A. Ogilvie, and R.B. Sterzel, *P2U-purinergergic receptor activation mediates inhibition of cAMP accumulation in cultured renal mesangial cells*. *Ren Physiol Biochem*, 1995. **18**: 219-230.
86. Post, S.R., J.P. Jacobson, and P.A. Insel, *P2 purinergergic receptor agonists enhance cAMP production in Madin-Darby canine kidney epithelial cells via an autocrine/paracrine mechanism*. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 2029-2032.
87. Boyer, J.L., J.W. O'Tuel, B. Fischer, K.A. Jacobson, and T.K. Harden, *Potent agonist action of 2-thioether derivatives of adenine nucleotides at adenylyl cyclase-linked P2Y-purinoceptors*. *Br J Pharmacol*, 1995. **116**: 2611-2616.
88. Boyer, J.L., T. Romero-Avila, J.B. Schachter, and T.K. Harden, *Identification of competitive antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor*. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**: 1323-1329.
89. Harden, T.K., J.L. Boyer, and R.A. Nicholas, *P2-purinergergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995. **35**: 541-579.
90. Hourani, S.M., C.R. Johnson, and S.J. Bailey, *Desensitization of the P2-purinoceptors on the rat colon muscularis mucosae*. *Br J Pharmacol*, 1993. **110**: 501-505.
91. Ziganshin, A.U., C.H. Hoyle, G. Lambrecht, E. Mutschler, H.G. Bumert, and G. Burnstock, *Selective antagonism by PPADS at P2X-purinoceptors in rabbit isolated blood vessels*. *Br J Pharmacol*, 1994. **111**: 923-929.
92. Wilkinson, G.F., J.R. Purkiss, and M.R. Boarder, *Differential heterologous and homologous desensitization of two receptors for ATP (P2y purinoceptors and nucleotide receptors) coexisting on endothelial cells*. *Mol Pharmacol*, 1994. **45**: 731-736.
93. Garrad, R.C., M.A. Otero, L. Erb, P.M. Theiss, L.L. Clarke, F.A. Gonzalez, J.T. Turner, and G.A. Weisman, *Structural basis of agonist-induced desensitization and sequestration of the P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor. Consequences of truncation of the C terminus*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 29437-29444.
94. Sromek, S.M. and T.K. Harden, *Agonist-induced internalization of the P2Y<sub>2</sub> receptor*. *Mol Pharmacol*, 1998. **54**: 485-494.
95. Martin, K.A., S.B. Kertesy, and G.R. Dubyak, *Down-regulation of P2U-purinergergic nucleotide receptor messenger RNA expression during in vitro differentiation of human myeloid leukocytes by phorbol esters or inflammatory activators*. *Mol Pharmacol*, 1997. **51**: 97-108.
96. Daly, C.J., C.M. Milligan, G. Milligan, J.F. Mackenzie, and J.C. McGrath, *Cellular localization and pharmacological characterization of functioning alpha-1 adrenoceptors by fluorescent ligand binding and image analysis reveals identical binding properties of clustered and diffuse populations of receptors*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **286**: 984-990.
97. McGrath, J.C., S. Arribas, and C.J. Daly, *Fluorescent ligands for the study of receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 1996. **17**: 393-399.
98. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: 509-544.
99. Ferrer, J.C., S. Baque, and J.J. Guinovart, *Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose*. *FEBS Lett*, 1997. **415**: 249-252.
100. Wang, S. and T. Hazelrigg, *Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis*. *Nature*, 1994. **369**: 400-403.
101. Barak, L.S., S.S. Ferguson, J. Zhang, C. Martenson, T. Meyer, and M.G. Caron, *Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact b2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate*. *Mol Pharmacol*, 1997. **51**: 177-184.

102. Tarasova, N.I., R.H. Stauber, J.K. Choi, E.A. Hudson, G. Czerwinski, J.L. Miller, G.N. Pavlakis, C.J. Michejda, and S.A. Wank, *Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green fluorescent protein. Endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A*. J Biol Chem, 1997. **272**: 14817-14824.
103. Gama, L. and G.E. Breitwieser, *A carboxyl-terminal domain controls the cooperativity for extracellular Ca<sup>2+</sup> activation of the human calcium sensing receptor. A study with receptor-green fluorescent protein fusions*. J Biol Chem, 1998. **273**: 29712-29718.
104. Agteresch, H.J., P.C. Dagnelie, J.W. van den Berg, and J.H. Wilson, *Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications*. Drugs, 1999. **58**: 211-232.
105. Communi, D., C. Govaerts, M. Parmentier, and J.M. Boeynaems, *Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase*. J Biol Chem, 1997. **272**: 31969-31973.
106. Erb, L., K.D. Lustig, D.M. Sullivan, J.T. Turner, and G.A. Weisman, *Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: 10449-10453.
107. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**: 1513-1523.
108. Brown, T.A., *Essential Molecular Biology, Vol I/II; A practical approach*. Oxford University Press, 1990.
109. Sharp PA, S.B., Sambrook J, *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis*. Biochemistry, 1973. **12**: 3055-3063.
110. Mullis K, F.F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. Biotechnology, 1992. **24**: 17-27.
111. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. Biotechnology, 1992. **24**: 104-108.
112. Sambrook, J., Fritsch EF, Maniatis T, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989. **2nd ed**.
113. Dagert, M. and S.D. Ehrlich, *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells*. Gene, 1979. **6**: 23-28.
114. Taketo, A., *Properties of electroporation-mediated DNA transfer in Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo), 1989. **105**: 813-817.
115. Huff, J.P., B.J. Grant, C.A. Penning, and K.F. Sullivan, *Optimization of routine transformation of Escherichia coli with plasmid DNA*. Biotechniques, 1990. **9**: 570-572, 574, 576-577.
116. Ubl, J.J., C. Vohringer, and G. Reiser, *Co-existence of two types of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-inducing protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) in rat astrocytes and C6 glioma cells*. Neuroscience, 1998. **86**: 597-609.
117. Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen, *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**: 7413-7417.
118. Boitano, S., E.R. Dirksen, and M.J. Sanderson, *Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate*. Science, 1992. **258**: 292-295.
119. Southern, P.J. and P. Berg, *Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter*. J Mol Appl Genet, 1982. **1**: 327-341.
120. Wilson, C.M., *An update on protein stains: amido black, coomassie blue G, and coomassie blue R*. Biotech Histochem, 1992. **67**: 224-234.
121. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: 248-254.
122. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: 680-685.
123. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. J Biochem Biophys Methods, 1984. **10**: 203-209.

124. Bright, G.R., G.W. Fisher, J. Rogowska, and D.L. Taylor, *Fluorescence ratio imaging microscopy*. Methods Cell Biol, 1989. **30**: 157-192.
125. Heiple, J.M. and D.L. Taylor, *An optical technique for measurement of intracellular pH in single living cells*. Kroc Found Ser, 1981. **15**: 21-54.
126. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**: 3440-3450.
127. Czubyko, U. and G. Reiser, *P2U nucleotide receptor activation in rat glial cell line induces  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations which depend on cytosolic pH*. Glia, 1996. **16**: 108-116.
128. Danguy, A., *Perspectives in modern glycohistochemistry*. Eur J Histochem, 1995. **39**: 5-14.
129. Haselbeck, A. and W. Hosel, *Immunological detection of glycoproteins on blots based on labeling with digoxigenin*. Methods Mol Biol, 1993. **14**: 161-173.
130. Schäfer, R. and G. Reiser, *ATPaS is a ligand for P2Y receptors in synaptosomal membranes: solubilization of  $[^{35}S]$ ATPaS binding proteins associated with G-proteins*. Neurochem Int, 1999. **34**: 303-317.
131. Schäfer, R. and G. Reiser, *Characterization of  $[^{35}S]$ -ATP a S and  $[^3H]$ -a b-MeATP binding sites in rat brain cortical synaptosomes: regulation of ligand binding by divalent cations*. Br J Pharmacol, 1997. **121**: 913-922.
132. Charlton, S.J., C.A. Brown, G.A. Weisman, J.T. Turner, L. Erb, and M.R. Boarder, *PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors*. Br J Pharmacol, 1996. **118**: 704-710.
133. Brown, C., B. Tanna, and M.R. Boarder, *PPADS: an antagonist at endothelial P2Y-purinoceptors but not P2U-purinoceptors*. Br J Pharmacol, 1995. **116**: 2413-2416.
134. Schachter, J.B., S.M. Sromek, R.A. Nicholas, and T.K. Harden, *HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors*. Neuropharmacology, 1997. **36**: 1181-1187.
135. Reetz, G. and G. Reiser,  *$[Ca^{2+}]_i$  oscillations induced by bradykinin in rat glioma cells associated with  $Ca^{2+}$  store-dependent  $Ca^{2+}$  influx are controlled by cell volume and by membrane potential*. Cell Calcium, 1996. **19**: 143-156.
136. Berridge, M.J., *Capacitative calcium entry*. Biochem J, 1995. **312**: 1-11.
137. Putney, J.W., Jr., *Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry*. Cell Calcium, 1997. **21**: 257-261.
138. Kenakin, T., *Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**: 456-464.
139. Boyer, J.L., C.L. Cooper, and T.K. Harden,  *$[^{32}P]$ 3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP as a photoaffinity label for a phospholipase C-coupled P2Y-purinergeric receptor*. J Biol Chem, 1990. **265**: 13515-13520.
140. Lange, R.W., B.W. Day, R. Lemus, V.A. Tyurin, V.E. Kagan, and M.H. Karol, *Intracellular S-glutathionyl adducts in murine lung and human bronchoepithelial cells after exposure to diisocyanatotoluene*. Chem Res Toxicol, 1999. **12**: 931-936.
141. Aoki, Y., G. Zhao, D. Qiu, L. Shi, and P.N. Kao, *CsA-sensitive purine-box transcriptional regulator in bronchial epithelial cells contains NF45, NF90, and Ku*. Am J Physiol, 1998. **275**: L1164-1172.
142. Halbfinger, E., D.T. Major, M. Ritzmann, J. Ubl, G. Reiser, J.L. Boyer, K.T. Harden, and B. Fischer, *Molecular recognition of modified adenine nucleotides by the P2Y<sub>1</sub>-receptor. I. A synthetic, biochemical, and NMR approach*. J Med Chem, 1999. **42**: 5325-5337.
143. Kenakin, T., *The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems*. Pharmacol Rev, 1996. **48**: 413-463.
144. Karoor, V., M. Shih, B. Tholanikunnel, and C.C. Malbon, *Regulating expression and function of G-protein-linked receptors*. Prog Neurobiol, 1996. **48**: 555-568.
145. Karoor, V., L. Wang, H.Y. Wang, and C.C. Malbon, *Insulin stimulates sequestration of b-adrenergic receptors and enhanced association of b-adrenergic receptors with Grb2 via tyrosine 350*. J Biol Chem, 1998. **273**: 33035-33041.
146. Iacovelli, L., S. M., M. S., and d.B. A., *Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins.*, 1999, FASEB J. 1-8.

147. Bunemann, M. and M.M. Hosey, *G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling*. J Physiol, 1999. **517**: 5-23.
148. Chen, C.C. and W.C. Chen, *ATP-evoked inositol phosphates formation through activation of P2U purinergic receptors in cultured astrocytes: regulation by PKC subtypes  $\alpha$  and  $\delta$* . Glia, 1996. **17**: 63-71.
149. Geras-Raaka, E., L. Arvanitakis, C. Bais, E. Cesarman, E.A. Mesri, and M.C. Gershengorn, *Inhibition of constitutive signaling of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor by protein kinases in mammalian cells in culture*. J Exp Med, 1998. **187**: 801-806.
150. Barak, L.S., K. Warabi, X. Feng, M.G. Caron, and M.M. Kwatra, *Real-time visualization of the cellular redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and b-arrestin 2 during homologous desensitization of the substance P receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**: 7565-7569.
151. Wess, J., N. Blin, E. Mutschler, and K. Bluml, *Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling*. Life Sci, 1995. **56**: 915-922.
152. Tobin, A.B., *Phosphorylation of phospholipase C-coupled receptors*. Pharmacol Ther, 1997. **75**: 135-151.
153. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**: 186-191.
154. Brass, L.F., *Homologous desensitization of HEL cell thrombin receptors. Distinguishable roles for proteolysis and phosphorylation*. J Biol Chem, 1992. **267**: 6044-6050.
155. Yan, W., C. Tiruppathi, H. Lum, R. Qiao, and A.B. Malik, *Protein kinase C  $\beta$  regulates heterologous desensitization of thrombin receptor (PAR-1) in endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**: C387-395.
156. Grady, E.F., S.K. Bohm, and N.W. Bunnett, *Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol, 1997. **273**: G586-601.
157. Bohm, S.K., E.F. Grady, and N.W. Bunnett, *Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors*. Biochem J, 1997. **322**: 1-18.
158. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: 453-508.
159. Bevan, N., T. Palmer, T. Drmota, A. Wise, J. Coote, G. Milligan, and S. Rees, *Functional analysis of a human A(1) adenosine receptor/green fluorescent protein/G<sub>i</sub> a fusion protein following stable expression in CHO cells*. FEBS Lett, 1999. **462**: 61-65.
160. Awaji, T., A. Hirasawa, M. Kataoka, H. Shinoura, Y. Nakayama, T. Sugawara, S. Izumi, and G. Tsujimoto, *Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of a 1b-adrenoceptor with green fluorescent protein*. Mol Endocrinol, 1998. **12**: 1099-1111.
161. Schulein, R., D. Lorenz, A. Oksche, B. Wiesner, R. Hermosilla, J. Ebert, and W. Rosenthal, *Polarized cell surface expression of the green fluorescent protein-tagged vasopressin V2 receptor in Madin Darby canine kidney cells*. FEBS Lett, 1998. **441**: 170-176.
162. Nicholas, R.A., E.R. Lazarowski, W.C. Watt, Q. Li, J. Boyer, and T.K. Harden, *Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors*. J Auton Pharmacol, 1996. **16**: 319-323.
163. Communi, D., S. Motte, J.M. Boeynaems, and S. Piroton, *Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>4</sub> receptor*. Eur J Pharmacol, 1996. **317**: 383-389.
164. Chang, K., K. Hanaoka, M. Kumada, and Y. Takuwa, *Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor*. J Biol Chem, 1995. **270**: 26152-26158.
165. Lazarowski, E.R., W.C. Watt, M.J. Stutts, R.C. Boucher, and T.K. Harden, *Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate*. Br J Pharmacol, 1995. **116**: 1619-1627.
166. Doherty, A.J., V. Coutinho, G.L. Collingridge, and J.M. Henley, *Rapid internalization and surface expression of a functional, fluorescently tagged G-protein-coupled glutamate receptor*. Biochem J, 1999. **341**: 415-422.
167. Kallal, L., A.W. Gagnon, R.B. Penn, and J.L. Benovic, *Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged b2-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**: 322-328.



168. Lee, K.B., D. Loganathan, Z.M. Merchant, and R.J. Linhardt, *Carbohydrate analysis of glycoproteins. A review*. Appl Biochem Biotechnol, 1990. **23**: 53-80.
169. Zhou, B., J.A. Oka, A. Singh, and P.H. Weigel, *Purification and subunit characterization of the rat liver endocytic hyaluronan receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**: 33831-33834.
170. Copic, A., N. Vucemilo, F. Gubensek, and I. Krizaj, *Identification and purification of a novel receptor for secretory phospholipase A(2) in porcine cerebral cortex*. J Biol Chem, 1999. **274**: 26315-26320.
171. Hill, I.E., C.P. Selkirk, R.B. Hawkes, and P.W. Beesley, *Characterization of novel glycoprotein components of synaptic membranes and postsynaptic densities, gp65 and gp55, with a monoclonal antibody*. Brain Res, 1988. **461**: 27-43.
172. Wagner, M., *Light and electron microscopic lectin histochemistry using fluorochromes and ferritin as labels*. Acta Histochem Suppl, 1988. **36**: 115-123.
173. Parkkinen, J.J., M.J. Lammi, U. Agren, M. Tammi, T.A. Keinanen, T. Hyvonen, and T.O. Eloranta, *Polyamine-dependent alterations in the structure of microfilaments, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, and proteoglycan synthesis in BHK cells*. J Cell Biochem, 1997. **66**: 165-174.
174. Wood, J.G., F.I. Byrd, and J.W. Gurd, *Lectin cytochemistry of carbohydrates on cell membranes of rat cerebellum*. J Neurocytol, 1981. **10**: 149-159.
175. Kenakin, T., *Are receptors promiscuous? Intrinsic efficacy as a transduction phenomenon*. Life Sci, 1988. **43**: 1095-1101.
176. Weiss, J.M., P.H. Morgan, M.W. Lutz, and T.P. Kenakin, *The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy*. J Theor Biol, 1996. **181**: 381-397.
177. Hermans, E., R.A. Challiss, and S.R. Nahorski, *Effects of varying the expression level of recombinant human mGlu1a receptors on the pharmacological properties of agonists and antagonists*. Br J Pharmacol, 1999. **126**: 873-882.
178. Leon, C., B. Hechler, C. Vial, C. Leray, J.P. Cazenave, and C. Gachet, *The P2Y<sub>1</sub> receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells*. FEBS Lett, 1997. **403**: 26-30.
179. Palmer, R.K., J.L. Boyer, J.B. Schachter, R.A. Nicholas, and T.K. Harden, *Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y<sub>1</sub> receptor*. Mol Pharmacol, 1998. **54**: 1118-1123.
180. Boyer, J.L., G.L. Waldo, and T.K. Harden, *Molecular cloning and expression of an avian G protein-coupled P2Y receptor*. Mol Pharmacol, 1997. **52**: 928-934.
181. Kenakin, T., *Efficacy in drug receptor theory: outdated concept or under-valued tool?* Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**: 400-405.
182. Putney, J.W., Jr., *A model for receptor-regulated calcium entry*. Cell Calcium, 1986. **7**: 1-12.
183. Boulay, G., D.M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M.X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, and L. Birnbaumer, *Modulation of Ca<sup>2+</sup> entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5- trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP<sub>3</sub>R in store depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry*. Proc Natl Acad Sci, 1999. **96**: 14955-14960.
184. Woods, N.M., K.S. Cuthbertson, and P.H. Cobbold, *Agonist-induced oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in single rat hepatocytes*. Cell Calcium, 1987. **8**: 79-100.
185. Jacob, R., J.E. Merritt, T.J. Hallam, and T.J. Rink, *Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells*. Nature, 1988. **335**: 40-45.
186. Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, and J.I. Healy, *Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration*. Nature, 1997. **386**: 855-858.
187. Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis, *Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression*. Nature, 1998. **392**: 933-936.
188. Li, W., J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik, and R.Y. Tsien, *Cell-permeant caged InsP<sub>3</sub> ester shows that Ca<sup>2+</sup> spike frequency can optimize gene expression*. Nature, 1998. **392**: 936-941.
189. Neary, J.T., M. McCarthy, Y. Kang, and S. Zuniga, *Mitogenic signaling from P1 and P2 purinergic receptors to mitogen- activated protein kinase in human fetal astrocyte cultures*. Neurosci Lett, 1998. **242**: 159-162.

- 
190. Coghlan, V.M., B.A. Perrino, M. Howard, L.K. Langeberg, J.B. Hicks, W.M. Gallatin, and J.D. Scott, *Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein*. *Science*, 1995. **267**: 108-111.
  191. Chen, B.C. and W.W. Lin, *PKC $\beta$ 1 mediates the inhibition of P2Y receptor-induced inositol phosphate formation in endothelial cells*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**: 1908-1914.
  192. Chen, C.C. and W.C. Chen, *P2Y receptor linked to phospholipase C: stimulation of neuro 2A cells by UTP and ATP and possible regulation by protein kinase C subtype epsilon*. *J Neurochem*, 1997. **69**: 1409-1416.
  193. Purkiss, J.R., G.F. Wilkinson, and M.R. Boarder, *Differential regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate by co-existing P2Y-purinoreceptors and nucleotide receptors on bovine aortic endothelial cells*. *Br J Pharmacol*, 1994. **111**: 723-728.
  194. Gallinaro, B.J., W.J. Reimer, and S.J. Dixon, *Activation of protein kinase C inhibits ATP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in rat osteoblastic cells: selective effects on P2Y and P2U signaling pathways*. *J Cell Physiol*, 1995. **162**: 305-314.
  195. Communi, D., E. Raspe, S. Piroton, and J.M. Boeynaems, *Coexpression of P2Y and P2U receptors on aortic endothelial cells. Comparison of cell localization and signaling pathways*. *Circ Res*, 1995. **76**: 191-198.
  196. Lou, L., T. Zhou, P. Wang, and G. Pei, *Modulation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms*. *Mol Pharmacol*, 1999. **55**: 557-563.
  197. Qiao, L.Y. and Y.C. Du, *Involvement of a putative G-protein-coupled receptor and a branching pathway in argipressin (4-8) signal transduction in rat hippocampus*. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*, 1998. **19**: 15-20.
  198. Leonard, A.S., I.A. Lim, D.E. Hemsworth, M.C. Horne, and J.W. Hell, *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**: 3239-3244.
  199. Caputi, A., F. Gardoni, M. Cimino, L. Pastorino, F. Cattabeni, and M. Di Luca, *CaMKII-dependent phosphorylation of NR2A and NR2B is decreased in animals characterized by hippocampal damage and impaired LTP*. *Eur J Neurosci*, 1999. **11**: 141-148.
  200. Baltensperger, K., V. Karoor, H. Paul, A. Ruoho, M.P. Czech, and C.C. Malbon, *The  $\beta$ -adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 1061-1064.

## 7 Abkürzungen

∅	Durchmesser
(v/v)	Volumen/Volumen (bei Prozentangaben)
(w/v)	Gewicht/Volumen (bei Prozentangaben)
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Kalziumkonzentration
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
10 x	10-fach, 10 mal
10%(w/v)	entspricht 10 g Substanz pro 100 ml Lösungsmittel
2-MeSADP	2 Methylthioadenosin 5'-diphosphat
2-MeSATP	2 Methylthioadenosin 5'-triphosphat
4dNTP	Mix aus den Nukleotiden dGTP, dCTP, dATP, dTTP
AC	Adenylatcyclase
AK/AS	Antikörper/ -serum
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	AMP responsive nuclear factor
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
ATP S	Adenosin 5'-O- (1-thiotriphosphat)
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxy-
cAMP	cyclic Adenosinmonophosphat
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA; Produkt der reversen Transkription
CDS	Protein codierender Bereich der Nukleotidsequenz eines Gens
c-fos/c-jun	Transkriptionsfaktoren bilden mit anderen AP1-Komplex
c-myc	Protoonkogen (Hauptregulator für Zellwachstum und -differenzierung)
ConA	Lektin; Concanavalin A
CRE	Promotorregion cAMP regulierter Gene an die CREB bindet
CREB	cAMP responsive element binding factor
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
CTX	Cholera-Toxin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
ddNTP	Dideoxy-Nukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EC <sub>50</sub>	Konzentration des Liganden/Agonisten, die den halbmaximalen Effekt hervorruft
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor
EGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1 bzw 2
FAB-Fragmente	variable Region der IgG
FAK	fokale adhäsions Kinase
FCS	fötale Kälberserum
Fura-2/AM	Fura-2 /Acetoxymethyl Ester
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEF	GTP Austauschfaktor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb2/Shc	Adapterproteine zu Aktivierung „kleiner G-Proteine“ (z.B. Ras, Rac)
GRK	GPCR- Kinase

## Abkürzungen

---

GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HAc	Eisessig
IC <sub>50</sub>	Konzentration des Liganden/Antagonisten, die den halbmaximalen Hemmeffekt hervorruft
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5) trisphosphat
JNK	Kinase für Transkriptionfaktor jun (bindet mit c-fos in AP1-Komplex)
LB-Medium	Luria Bertani Medium (Kulturmedium für E.coli)
M	Molarität (Mol/l)
mA	Milliampere; Einheit elektrischer Stromstärke
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MOS	Protoonkogen
mRNA	(messenger RNA); Boten-Ribonukleinsäure
N	Anzahl; Stichprobenmenge
NOS	Stickstoffmonoxid (NO) synthetase
NTRK	nicht Rezeptortyrosinkinase
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge x
P2Y <sub>1</sub>	metabotroper, purinerger Rezeptor; gehört zu einer Unterfamilie der P2-Rezeptoren (Nukleotidrezeptoren)
P2Y <sub>2</sub>	metabotroper, purinerger Rezeptor; gehört zu einer Unterfamilie der P2-Rezeptoren (Nukleotidrezeptoren)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEF	Proteinfraction aus einer Zellfraktionierung, in der Plasmamembranen angereichert wurden
PI <sub>3</sub> K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA/ PKC	Proteinkinase A / Proteinkinase C
PLA, PLC, PLD	Isoformen der Phospholipase
POD	Meerrettichperoxidase
PTX	Pertussis-Toxin
r.p.m	Umdrehungen pro Minute
Raf	Serin/Threonin Kinase
RGS	Regulatorproteine der G-Protein Signaltransduktion
RNA (RNase)	Ribonukleinsäure (Ribonuklease)
ROCC	receptor operated calcium entry channel
rP2Y <sub>1</sub> -eGFP	metabotroper, purinerger Rezeptor aus der Ratte, der mit eGFP modifiziert wurde
rP2Y <sub>1</sub> -wt	metabotroper, purinerger Rezeptor P2Y <sub>1</sub> aus der Ratte
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
Ser/Thr	Serin/Threonin
SOCC	store operated calcium entry channel
Src	Tyrosinkinase, z.B. an der Aktivierung der MAPK beteiligt
SRE/SRF	"serum response element /-factor"
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD/TMR	Transmembrandomäne /- region
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit (Internationale Einheit für Enzymmengen)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht, d.h. mehr als 12 Stunden
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volt; Einheit elektrischer Spannung
VSV	vesicular stomatitis virus
WGA	Lektin; Weizenkeimagglutinin
wt	Wildtyp

## **LEBENS LAUF**

Name: Christian Vöhringer  
Anschrift: Wichmannstr.1, 39120 Magdeburg  
Telefon: 0391-6228111  
geboren: 11.04.1964 in Reutlingen (BaWü)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

09.1970 bis 06.1975 GHS-Lichtenstein  
08.06.1984 Abitur am Friedrich-Schiller-Gymnasium in  
72793 Pfullingen

### **Dienst- und Arbeitszeiten**

10.1984 bis 12.1985 Ableistung des allg. Grundwehrdienstes  
bis Okt. 1986 Übergangstätigkeit in der Firma Gebr. Vöhringer, 72818  
Trochtelfingen und Firma Bosch GmbH Reutlingen

### **Studium**

01.10.1986 Biochemiestudium an der Universität Hannover  
bis 07.09.1987  
18.09.1987 Studienwechsel und Aufnahme meines Biologiestudiums an der  
Universität Tübingen  
23.11.1989 Diplom-Vorprüfung im Studiengang Biologie  
02.1993 bis 05.1994 Diplomarbeit mit dem Thema „ Ausarbeitung der Methoden zur  
Klonierung der cDNA für CNPase aus Schwein“ am  
Physiologischen Institut Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr.  
G. Reiser  
10.08.1994 Abschluß: Diplom-Biologe  
01.09.94 bis 03.1995 wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. G. Reiser am Institut  
für Neurobiochemie, Universitätsklinikum der Otto-von-  
Guericke Universität Magdeburg  
03.1995 bis 03.2000 Dissertation „Charakterisierung des heterolog exprimierten  
metabotropen purinergen rP2Y<sub>1</sub> Rezeptors aus dem Hirn der  
Ratte als GFP („green fluorescent protein“) Fusionsprotein in  
HEK293-Zellen" am Institut für Neurobiochemie,  
Universitätsklinikum der Otto-von-Guericke Universität  
Magdeburg  
04.96 bis 09.1998 Mitglied im Graduiertenkolleg "Biologische Grundlagen  
neuronaler Erkrankungen" am Universitätsklinikum der Otto-  
von-Guericke Universität Magdeburg