

Zusammenfassung

Die Signalübertragung durch extrazelluläre Nukleotide und Nucleoside ist ein weit verbreitetes System zur Anpassung an physiologische oder pathophysiologische Zustände in den unterschiedlichsten Geweben oder Organen. Die ‚Signalempfänger‘ auf zellulärer Ebene können, sowohl ionotrope Rezeptoren, als auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sein und werden als purinerge Rezeptoren zusammengefasst. Die metabotropen Rezeptoren gliedern sich weiterhin in die Nucleosid-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) und die Nucleotid-Rezeptoren (P2-Rezeptoren). Die Familie der G-Protein-gekoppelten Nucleotid-Rezeptoren (P2Y) ist sehr komplex. Bisher wurden acht verschiedene Rezeptor-Subtypen identifiziert, welche diverse Funktionen im menschlichen Körper übernehmen. Die gezielte Aktivierung oder Inhibition einzelner Rezeptor-Subtypen im Zuge einer therapeutischen Intervention benötigt daher spezifische Agonisten bzw. Antagonisten. Die Selektivität der P2Y-Rezeptor Subtypen für einzelne Nucleotide ist teilweise sehr divers, kann sich andererseits aber auch nur geringfügig unterscheiden. Die P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren bevorzugen beide Adenin-Nucleotide, wobei der P2Y₁-Rezeptor stärker durch Diphosphate (ADP) und der P2Y₁₁-Rezeptor mehr durch Triphosphate (ATP) aktiviert wird. Zahlreiche Studien und die daraus resultierenden Erkenntnisse haben bereits zur Entwicklung von P2Y₁-Rezeptor-spezifischen Liganden geführt, welche keine Affinität am P2Y₁₁-Rezeptor oder an anderen Subtypen haben. Allerdings konnten für den P2Y₁₁-Rezeptor bisher keine selektiven Liganden entwickelt werden, da sich die Strukturmerkmale der bekannten Agonisten an diesem Rezeptor meist mit denen der P2Y₁-Rezeptor-Agonisten decken.

In der Absicht feinste Unterschiede in der Ligandenerkennung zwischen dem P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptor aufzudecken, untersuchten wir die Stereoselektivität des Letzteren. Die bereits beschriebene stereoselektive Präferenz des P2Y₁-Rezeptors wurde nun in dieser Arbeit mit der Präferenz des P2Y₁₁-Rezeptors verglichen. Dafür haben wir den P2Y₁₁-Rezeptor als GFP Fusionsprotein stabil in 1321N1 Astrozytomzellen exprimiert, welche endogen keine funktionellen P2-Rezeptoren aufweisen. In Einzelzell-Kalziummessungen wurden die Zellen mit ATP Analoga, bei denen ein Sauerstoffatom am P_α durch Bor (ATP-α-B) oder Schwefel (ATP-α-S) substituiert war, stimuliert. Die Substitution am P_α schafft ein neues chirales Zentrum im Molekül. Die beiden resultierenden Diastereoisomere (A- und B-Isomere) testeten wir auf Aktivität am P2Y₁₁-Rezeptor. Wir identifizierten die Stereoselektivität des P2Y₁₁-Rezeptors und stellten fest, dass der Rezeptor die B-Isomere der jeweiligen ATP-α-B/S Derivate bevorzugt.

Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der bereits bekannten Stereoselektivität des P2Y₁ Rezeptors, welcher die A-Isomere bevorzugt. Weiterhin fanden wir heraus, dass die Substitution am P_α zu einem klaren Potenzgewinn der ATP Derivate am P2Y₁₁-Rezeptor führt. Da die getesteten ATP- α -B/S Analoga nahezu keine Aktivität am P2Y₂-Rezeptor (ein weiterer ‘ATP-Rezeptor’) aufweisen, stellen die B-Isomere wichtige Leitstrukturen für die Entwicklung eines selektiven P2Y₁₁ Rezeptor Agonisten dar. Diese könnten dann zum Beispiel als Adjuvantien in Impfstoffen eingesetzt werden, um deren Effizienz zu verbessern.

Das rationale Ligandendesign verwendet heutzutage computergestützte Modelle der therapeutischen Targets (z.B. Rezeptorproteine). Die berechneten Modelle sind allerdings ohne zusätzliche Information aus Mutagenese-Studien nicht genügend validiert. Wir haben die Ligandenbindungstasche des P2Y₁₁-Rezeptors mittels Computer-Modelling (in Kooperation mit der Bar-Ilan Universität, Israel) und zielgerichteter Mutagenese charakterisiert. Wie erwartet, ähneln sich die Nukleotidbindungstaschen des P2Y₁₁- und P2Y₁-Rezeptors sehr. Drei positiv geladene Aminosäuren im P2Y₁₁-Rezeptor (Arg106, Arg268, Arg307) koordinieren die Phosphatkette eines gebundenen ATP Moleküls und sind somit für die Nukleotidbindung essentiell. Die zweite extrazelluläre Schleife (EL2) ist auch beim P2Y₁₁-Rezeptor wie beim P2Y₁-Rezeptor an der Ligandenerkennung beteiligt. Wir entdeckten in der EL2 des P2Y₁₁ Rezeptors einen Glutamarest (Glu186), welcher die Potenz von ATP am Rezeptor deutlich mitbestimmt. Die Interaktion des Adeninrings mit der aromatischen Aminosäure Phe109 scheint nur eine schwache Wechselwirkung zu sein. Uns wurde klar, dass im Gegensatz zum P2Y₁-Rezeptor der P2Y₁₁-Rezeptor nur geringfügige Interaktionen mit dem Adeninring von gebundenem ATP zeigt. Weiterhin erhielten wir bei der Analyse der Mutanten erste Hinweise auf die mögliche molekulare Ursache der Diastereoselektivität des Rezeptors. Nach Mutation des Arginins Arg268 in der Transmembrandomäne 6 zu Alanin verloren die B-Isomere der ATP- α -S Analoga ihre verstärkte Potenz gegenüber den A-Isomeren.

Der Einsatz von P2Y₁₁-Rezeptor selektiven Agonisten zu therapeutischen Zwecken verlangt ausreichend Kenntnis über die Desensibilisierung des Rezeptors und eine sich daraus möglicherweise entwickelnde Toleranz gegenüber dem Therapeutikum. Daher haben wir die Agonist-induzierte Internalisierung des P2Y₁₁GFP Rezeptors untersucht. Bei diesen Experimenten wurde deutlich, dass der P2Y₁₁-Rezeptor allein nicht zur Endozytose fähig ist. Interessanterweise war die Internalisierung des Rezeptors eindeutig abhängig von der Präsenz des P2Y₁-Rezeptors. In weiteren Experimenten stellte wir fest, dass beide Rezeptoren interagieren und in den Zellen ein Hetero-Oligomer bilden.

Die Hetero-Oligomerisierung der P2Y₁- und P2Y₁₁-Rezeptoren wurde durch ‘Pull-down’-Experimente und Immunopräzipitation nachgewiesen. Wir zeigten, dass die Interaktion mit dem P2Y₁-Rezeptor nicht nur Einfluß auf die Desensibilisierung des P2Y₁₁-Rezeptors, sondern auch auf dessen Pharmakologie hat. Der spezifische P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonist NF157 zeigte keinerlei Affinität am Hetero-Oligomer. Dagegen war der P2Y₁-Rezeptor-Antagonist MRS2179 in der Lage sowohl die Internalisierung des P2Y₁₁-Rezeptors, als auch die rezeptorvermittelte Calcium-Antwort zu inhibieren.

Letztendlich läßt sich sagen, dass die Erkenntnisse des gesamten Projektes sowohl Einblicke in die Stereoselektivität, als auch die Struktur des P2Y₁₁-Rezeptors geben und die Existenz von P2Y₁-P2Y₁₁-Rezeptor Oligomeren eindeutig nachweisen.