

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Chemische Genetik und Wirkstoffentwicklung	1
1.2	Werkzeuge für „chemical genetics“ und Wirkstoff-Entwicklung	3
1.2.1	Chemische Bibliotheken	3
1.2.2	Testsysteme	4
1.3	Chemische Genetik und P2Y-Rezeptoren	5
1.4	„Reverse chemical genetics“: I. Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	8
1.5	„Reverse chemical genetics“: II. Fluoreszenz-basierte Calcium-Assays	9
1.6	Aufgabenstellung	11
2	CHARAKTERISIERUNG VON P2Y₁₂-REZEPTOREN MIT HILFE DES NEUEN, SELEKTIVEN RADIOLIGANDEN [³H]PSB-0413	15
2.1	Einleitung	15
2.1.1	Blutplättchenaggregation und ADP	15
2.1.2	Kurze Historie der drei purinergen Thrombozyten-Rezeptoren	16
2.1.3	Klonierung und erste Charakterisierung des P2Y ₁₂ -Rezeptors	18
2.1.4	Signaltransduktionswege	18
2.1.5	P2Y ₁₂ -Rezeptor-Antagonisten.....	19
2.2	Entwicklung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an P2Y ₁₂ -Rezeptoren humaner Thrombozyten – Teil 1	25
2.2.1	[³ H]PSB-0413	25
2.2.2	Vorversuche an humanen Thrombozytenmembranen	26
2.3	Kinetikexperimente an humanen P2Y ₁₂ -Rezeptoren.....	27
2.4	Sättigungsexperimente an humanen P2Y ₁₂ -Rezeptoren	29
2.5	Charakterisierung verschiedener Standardliganden	31
2.6	GTP-Shift-Experimente	40

2.7	Entwicklung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen P2Y₁₂-Rezeptoren von Thrombozyten – Teil 2.....	43
2.7.1	Zusammenfassung und Diskussion der Entwicklung von [³ H]PSB-0413-Bindungsstudien an humanen Thrombozyten.....	45
2.8	Screening verschiedener Verbindungsklassen als potentielle P2Y₁₂-Rezeptorliganden	46
2.8.1	Anthrachinone.....	46
2.8.2	Flavonoide	56
2.8.3	Nukleotid-Mimetika.....	63
2.8.4	4-Benzo[1,3]dioxol-3-cyanopyridine, -pyridazopyrazolotriazine und -thieno[2,3-b]pyridine	69
2.8.5	Purin-6,8-(di)one, Oxazolo[5,4-d]pyrimidine, Triazolopyrimidine und 9-Benzylpurin-8-one	73
2.8.6	Thiazole und Thiophene.....	74
2.8.7	Diazepinopurine.....	76
2.8.8	[1,2,4]-Triazolo[1,5-c]chinazoline	77
2.8.9	Strukturell diverse Verbindungen	78
2.8.10	Xanthine	87
2.8.11	Nicht-steroidale Antirheumatika	87
2.8.12	Verschiedene Arzneistoffe	88
2.8.13	Naturstoffe aus Pilzen, marinen Schwämmen und diversen Bakterien	90
2.9	GTP-Shift-Experimente	93
2.10	Zusammenfassung und Diskussion	95
2.11	Entwicklung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an rekombinanten P2Y₁₂-Rezeptoren exprimiert in hP2Y₁₂-1321N1-Astrozytomzellen.....	99
2.11.1	Einfluss der Inkubationstemperatur.....	100
2.11.2	Einfluss von verschiedenen Inkubationspuffern – Versuche mit Mischklonen von hP2Y ₁₂ -1321N1-Astrozytomzellen	102
2.11.3	Einfluss von verschiedenen Inkubationspuffern - Versuche mit Monoklonen von hP2Y ₁₂ -1321N1-Astrozytomzellen	104
2.11.4	Einfluss von IDP, NECA und UMP	107
2.11.5	Einfluss von Digitoxin	107
2.11.6	Inkubation unter Zusatz von Natriumpyrophosphat und α,β -Methylen-ATP	108
2.11.7	Einfluss von Apyrase	110
2.12	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen zur metabolischen Stabilität von [³H]PSB-0413 in verschiedenen Proteinsuspensionen	111
2.13	Zusammenfassung und Diskussion	114
2.14	Entwicklung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen P2Y₁₂-Rezeptoren exprimiert in CHO-Zellen	119
2.14.1	Null-CHO-Zellen und ADP-Effekt	119

2.14.2	Einfluss von AMP und Adenosin.....	121
2.14.3	Einfluss verschiedener Inkubationspuffer.....	122
2.15	Zusammenfassung und Diskussion	123
2.16	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an P2Y₁₂-Rezeptoren von Rattenstriatum und – cortex	126
2.17	Homologe Sättigungsexperimente.....	127
2.17.1	Homologe Konkurrenz an Rattencortex-Membranen	128
2.17.2	Homologe Konkurrenz an Rattenstriatum-Membranen	129
2.18	Charakterisierung verschiedener Standardliganden	131
2.19	Charakterisierung ausgewählter Verbindungen als P2Y₁₂-Rezeptorliganden an Rattenhirnmembranpräparationen	133
2.20	Zusammenfassung und Diskussion	134
2.21	Entwicklung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an P2Y₁₂-Rezeptoren von intakten PC12-Zellen und -Zellmembranen.....	135
2.21.1	Etablierung von Bindungsexperimenten an PC12-Zellmembranen	135
2.21.2	Etablierung von Bindungsexperimenten an intakten PC12-Zellen	136
2.22	Charakterisierung verschiedener Standardliganden an intakten PC12-Zellen und – Zellmembranen	138
2.23	Charakterisierung ausgewählter Verbindungen als P2Y₁₂-Rezeptorliganden an intakten PC12-Zellen	139
2.24	Zusammenfassung und Diskussion	141
2.25	Autoradiographie-Studien mit [³H]PSB-0413 an Rattenhirnschnitten	144
2.26	Zusammenfassung und Ausblick	148
3	CHARAKTERISIERUNG NEUER LEITSTRUKTUREN FÜR DIE ENTWICKLUNG PYRIMIDINERGER P2-REZEPTOR-LIGANDEN	155
3.1	Testung von Standardnukleotiden an transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen	155
3.1.1	Agonismus von ADP am P2Y ₁ -Rezeptor	156
3.1.2	Agonismus von UTP an humanen und Ratten-P2Y ₂ -Rezeptor.....	159
3.1.3	Agonismus von UTP am humanen P2Y ₄ -Rezeptor	161
3.1.4	Agonismus von UDP am Ratten-P2Y ₆ -Rezeptor.....	163
3.1.5	Agonismus von ATP an den P2X-Rezeptorsubtypen P2X ₁ (Maus) und P2X ₄ (Ratte)	165

3.2	Zusammenfassung	166
3.3	Testung strukturell diverser Verbindungen als potentielle Antagonisten an tP2Y₁-, hP2Y₄- und rP2Y₆-Rezeptoren.....	168
3.3.1	Screening strukturell diverser Verbindungen an tP2Y ₁ -, hP2Y ₄ - und rP2Y ₆ -Astrozytomzellen	169
3.3.2	Weiterführende funktionelle Charakterisierung von Cyclopiazonsäure	181
3.4	Zusammenfassung und Diskussion	184
4	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER CB₁-CANNABINOID-REZEPTOR-LIGANDEN.....	187
4.1	Einleitung	187
4.2	Sättigungsexperimente an Rattenhirncortex-Membranen.....	194
4.3	Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an CB₁-Rezeptoren in Rattenhirncortex-Membranen.....	196
4.3.1	4-Benzo[1,3]dioxol-3-cyanopyridine, -pyridazopyrazolotriazine und -thieno[2,3-b]pyridine....	196
4.3.2	Disubstituierte Diphenylimidazothiazolone, monosubstituierte Imidazoimidazoldione, Imidazothiazinone und Imidazothiazepinone	200
4.3.3	Imidazolidindione (Hydantoine)	206
4.4	Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen CB₁-Rezeptoren	209
4.5	Kompetitive Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien an humanen CB₂-Rezeptoren	211
4.6	Zusammenfassung und Diskussion	215
5	CHARAKTERISIERUNG NATIVER ENDOTHELIN-ET_A-REZEPTOREN	221
5.1	Einleitung	221
5.2	Etablierung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit [³H]BQ-123 an 1321N1-Astrozytomzellmembranen	224
5.3	Sättigungsexperimente an 1321 N1-Astrozytomzellmembranen.....	226
5.4	Etablierung von kompetitiven Bindungsstudien an 1321N1-Astrozytomzellmembranen.....	227
5.5	Zusammenfassung und Diskussion	232

6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	235
7	EXPERIMENTELLER TEIL	243
7.1	Geräte und Materialien.....	243
7.2	Substanzen und Reagenzien	244
7.2.1	Kommerziell bezogene Chemikalien.....	244
7.2.2	Nicht-kommerziell bezogene Chemikalien.....	246
7.2.3	Rattenhirne.....	247
7.2.4	Radioliganden	248
7.2.5	Zellkultur und Nährmedien.....	248
7.2.6	Kultivierte Zelllinien	249
7.3	Pufferlösungen	249
7.3.1	50 mM Tris-Puffer, pH 7.4 (bezogen auf 1 l)	249
7.3.2	0,32 M Sucrose-Lösung (bezogen auf 1 l).....	250
7.3.3	KRH-Puffer, 5-fach-/ 1-fach-konzentriert, pH 7.4 (bezogen auf 500 ml)	250
7.3.4	PBS-Puffer, pH 7.2 (bezogen auf 1 l).....	251
7.3.5	Inkubationspuffer für [³ H]PSB-0413-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l).....	251
7.3.6	Inkubationspuffer für [³ H]CP55,940-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l).....	254
7.3.7	Waschpuffer für [³ H]CP55,940-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l)	254
7.3.8	Inkubationspuffer für [³ H]Diazepam-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l)	254
7.3.9	Inkubationspuffer für [³ H]BQ-123-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l)	254
7.3.10	Waschpuffer für [³ H]BQ-123-Bindungsstudien (bezogen auf 1 l).....	254
7.3.11	Puffer für die Membranpräparation von Rattencortex und -striatum (bezogen auf 1 l) ..	255
7.3.12	Puffer für die Membranpräparation von Null-1321N1-Astrozytom- und NG108-15-Zellen (bezogen auf 1 l)	255
7.3.13	Puffer für die Membranpräparation von humanen Thrombozyten (bezogen auf 1 l).....	256
7.3.14	Puffer für die Membranpräparation von CHO-Zellen, PC12- und transfizierten 1321N1- Astrozytomzellen (bezogen auf 1 l)	256
7.4	Zellkultur	257
7.4.1	Auftauen von Zellen	257
7.4.2	Splitten von Zellen.....	257
7.4.3	Einfrieren von Zellen – Herstellung von Backups.....	258
7.4.4	Membranpräparation.....	259
7.4.5	Nährmedien der Zelllinien	259
7.5	Membranpräparation von humanen Thrombozyten	261
7.6	Präparation von Rattenhirngewebe.....	262
7.7	Bestimmung des Proteingehaltes.....	263

7.8	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	265
7.9	Untersuchungen zum Abbau von [³H]PSB-0413.....	274
7.10	Autoradiographie am Rattenhirn mit [³H]PSB-0413	275
7.11	Calcium-Assays an intakten mP2X₁-, tP2Y₁-, hP2Y₄- und rP2Y₆-1321N1-Astrozytomzellen, sowie an NG108-15-Zellen	276
7.11.1	Parameter FLUOStar Galaxy	276
7.11.2	Herstellung der Stammlösung von Oregon Green.....	277
7.11.3	Herstellung der Pluronic F-127-Lösung	277
7.11.4	Validierung des Testsystems	277
7.11.5	Messung der intrazellulären Calcium-Freisetzung	278
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	281
9	LITERATURVERZEICHNIS	287