

Pharmakologische Charakterisierung von Antagonisten an nativen P2-Rezeptoren

Vergleichende pharmakologische Untersuchungen von PPADS- und
Suraminanaloge an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe und humaner
Thrombozyten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Susanne Horner
aus Würzburg, Bayern

Frankfurt am Main 2005
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Lambrecht

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schmalzing

Datum der Disputation: 06.05.2005

*All denen, die diese Arbeit ermöglicht haben
- Kollegen, Freunden und Familie*

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Dissertation wurde ich von vielen hilfsbereiten Menschen unterstützt, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und bei denen ich mich hiermit ganz herzlich bedanken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Professor Dr. Günter Lambrecht für die Überlassung des Promotionsthemas, für die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit, für die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Kongressen und ganz besonders für sein Verständnis bei Problemen und seine Bereitschaft, die für alle bestmögliche Lösung zu finden.

Irma Bozyk für die liebevolle Pflege der Tiere.

Dr. Matthias Kassack und Dr. H. G. Bäumert für die Bereitstellung der Substanzen sowie Prof. Dr. Günther Schmalzing und seinem Team für die erfolgreiche Kooperation.

Prof. Dr. T. Dingermann für die Leihgabe des Aggregometers.

Prof. Dr. Sebastian Harder und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Jochen Graff, für die Blutabnahmen und die unermüdliche Suche nach Spendern im Institut für Klinische Pharmakologie, ohne die die Thrombozytenversuche an unserem Institut nicht möglich gewesen wären.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. D. Steinhilber für die Bereitstellung und Aufbearbeitung des Buffy Coat Bluts.

Meiner Mutter, Dr. Katrin Schüssel und Dr. Matthias Ganso für das rasche Korrekturlesen und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts für die gute Zusammenarbeit in freundschaftlicher und fröhlicher Atmosphäre, was es mir ermöglicht hat, Probleme im Labor leichter zu überwinden. Besonders gerne denke ich an die beiden Seminarwochen im Kleinwalsertal, gemeinsame Grillaktionen und diverse Geburtstagsfeiern zurück.

Meinen Laborkollegen Kai Kreuzmann, Dr. Matthias Ganso, Dr. Kirsten Menke und Dr. Matthias Linder für die freundschaftliche und lustige Atmosphäre in unserem Labor, die ich nach ihrem Weggang schmerzlich vermisst habe. Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei Dr. Kirsten Menke und Dr. Matthias Ganso für die hervorragende Einarbeitung ins Labor sowie ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und

Unterstützung bei allen möglichen Fragen und Problemen, für aufmunternde Worte und gute Tipps.

Stefan Bodora, der bei allen computertechnischen Notfallsituationen stets mit Rat und Tat zur Stelle war und mich so einige Male vor der Verzweiflung rettete.

Caren Hildebrandt für die Unterstützung bei Literaturrecherchen, für die Durchführung der Apyraseversuche, für ein stets offenes Ohr, hilfreiche Ratschläge und amüsante Gespräche.

Uli Hermanni (Hebbes) und Ina Henke für computertechnische Unterstützung sowie für ihre Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft den stetig wechselnden Doktoranden gegenüber.

Cornelia Franke, Dr. Matthias Ganso, Dr. Uta Keil, Dr. Sabine Kressmann, Dr. Matthias Linder, Dr. Kirsten Menke, Steffi Schmitt-Schillig, Kathrin Schulz, Dr. Katrin Schüssel, Kristina Treiber und Claudia Weber (CCW), mit denen mich über die berufliche Zusammenarbeit hinaus viele gemeinsame Freizeitaktivitäten, wie Skiurlaube, Reise durch Australien, Wanderwochenenden, Unisport, Joggen, Chase Lauf, Kinobesuche, lustige Abende, wilde Doppelkopfpartien, amüsante Tennisspiele und vieles mehr, verbindet, an die ich sehr gerne zurückdenke und die hoffentlich auch nach der Doktorandenzeit weiterhin stattfinden werden.

Meinem „Neustadter Kreis“ Birgit Blumenstiel, Mareike Grün, Sandra Grohe, Annette Bender sowie Marion und Melanie Baldauf, die mir während Studium und Promotion immer wieder zeigten, dass es ein Leben neben der Pharmazie gibt und mich trotz meines nun schon jahrelangen „Exils“ stets in Freizeitaktivitäten miteinbezogen haben.

Markus Vogt für ein stets offenes Ohr und seine moralische Unterstützung.

Meinen Eltern, für ihre unermüdliche moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT	1
1.1. Einleitung.....	2
1.1.1. P2-Rezeptoren.....	2
1.1.1.1. P2X-Rezeptoren	3
1.1.1.1.1. P2X ₁ -Rezeptoren	8
1.1.1.1.2. P2X ₃ -Rezeptoren	11
1.1.1.2. P2Y-Rezeptoren	12
1.1.1.2.1. P2Y ₁ -Rezeptoren	15
1.1.1.2.2. P2Y ₁₂ -Rezeptoren	17
1.1.2. P2-Rezeptor-Liganden.....	18
1.1.2.1. Agonisten und Nukleotidmetabolismus.....	19
1.1.2.2. Antagonisten.....	23
1.1.3. Glattmuskuläre Organe.....	33
1.1.3.1. Das Ratten-Vas-deferens als Modell für den P2X ₁ -Rezeptor	33
1.1.3.2. Das Meerschweinchen-Ileum als Modell für den P2X ₃ -Rezeptor	34
1.1.3.3. Das Meerschweinchen-Ileum als Modell für den P2Y ₁ -Rezeptor	36
1.1.4. Humane Thrombozyten	38
1.1.4.1. P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten	38
1.1.4.1.1. P2X ₁ -Rezeptoren	40
1.1.4.1.2. P2Y ₁ -Rezeptoren	43
1.1.4.1.3. P2Y ₁₂ -Rezeptoren	45
1.1.4.2. Interaktion von P2-Rezeptoren mit anderen Transduktionswegen	46
1.1.4.3. Nukleotidabbau im Blut.....	47
1.2. Ziel der Arbeit	49
1.2.1. Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten.....	49
1.2.2. Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen.....	50
1.2.3. PPADS- und PPNDS-Analoga (siehe, 8.1).....	50
1.2.4. Suraminanaloga (siehe, 8.2).....	51

INHALTSVERZEICHNIS

2. MATERIAL UND METHODEN	53
2.1. Material	54
2.1.1. Substanzen.....	54
2.1.1.1. Kommerziell erhältliche Substanzen.....	54
2.1.1.2. Zur Verfügung gestellte Substanzen	55
2.1.2. Puffer und Lösungen	56
2.1.3. Tiere	57
2.1.4. Thrombozyten.....	57
2.2. Methoden.....	60
2.2.1. Glattemuskuläre Organe.....	60
2.2.1.1. Isoliertes Vas deferens der Ratte	60
2.2.1.1.1. Modell des P2X ₁ -Rezeptors	61
2.2.1.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum	62
2.2.1.2.1. Modell des P2X ₃ -Rezeptors	63
2.2.1.2.2. Modell des P2Y ₁ -Rezeptors	64
2.2.2. Ekto-Nukleotidasen von der Kartoffel (Apyrase Grade VII).....	65
2.2.3. UV-Vis-Spektroskopie verschiedener Antagonisten	65
2.2.4. Humane Thrombozyten	66
2.2.4.1. Fluoreszenzspektroskopische Methoden	66
2.2.4.1.1. Modell des P2X ₁ -vermittelten [Ca ²⁺] _i -Anstiegs	68
2.2.4.1.2. Modell des P2Y ₁ -vermittelten [Ca ²⁺] _i -Anstiegs	68
2.2.4.1.3. Modell des 5-HT _{2A} -vermittelten [Ca ²⁺] _i -Anstiegs.....	69
2.2.4.2. Turbidimetrische Methoden	69
2.2.4.2.1. Modell des P2Y ₁ -vermittelten „shape change“	70
2.2.4.2.2. Modell des P2X ₁ -vermittelten „shape change“	72
2.2.4.2.3. Modell der ADP-vermittelten Aggregation	73
2.3. Auswertung	75
2.3.1. Ermittlung von pIC ₅₀ -Werten.....	75
2.3.2. Ermittlung von EC ₅₀ - und pA ₂ -Werten.....	75
2.4. Statistik	78

INHALTSVERZEICHNIS

3. ERGEBNISSE	79
3.1. Untersuchungen an nativen P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe.....	80
3.1.1. MRS2179.....	80
3.1.1.1. Rezeptorselektivität an purinergen Rezeptoren.....	80
3.1.1.2. Stabilität von MRS2179 in Gegenwart des Ratten-Vas-deferens	81
3.1.1.3. Kinetik am P2Y ₁ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum.....	82
3.1.2. PPADS- und PPNDS-Analoga.....	84
3.1.2.1. Untersuchungen am P2X ₁ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens.....	85
3.1.2.1.1. Hemmkurven der $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens	85
3.1.2.1.2. Schild-Analyse der $\alpha\beta$ meATP-vermittelten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens von MRS2159 und NAC	87
3.1.2.1.3. Kinetik von NAC am P2X ₁ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens	90
3.1.2.2. Untersuchungen am P2X ₃ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum	91
3.1.2.2.1. Hemmkurven der $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum.....	91
3.1.2.3. Untersuchungen am P2Y ₁ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum	93
3.1.2.3.1. Hemmkurven der ADP β S (1 bzw. 10 μ M)-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum.....	93
3.1.2.3.2. Schild-Analyse der ADP β S-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum von NAC	95
3.1.2.3.3. Kinetik von NAC am P2Y ₁ -Rezeptor des Meerschweinchen- Ileum	97
3.2. Untersuchungen an der Kartoffel-Apyrase (Grade VII)	98
3.3. Untersuchungen an nativen P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten	100
3.3.1. Methodenetablierung	100
3.3.1.1. Untersuchung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs	101
3.3.1.2. Untersuchung des ADP _{HEX} -induzierten intrazellulären Calciumanstiegs	103
3.3.1.3. Untersuchung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“	105
3.3.1.4. Untersuchung des ADP-induzierten „shape change“	106

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1.4.1.	Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP _{HEX}	106
3.3.1.4.2.	Einfluss von pHMBS und 2-meSAMP auf den ADP-induzierten „shape change“	107
3.3.1.4.3.	Bestimmung des pA ₂ -Wertes der P2Y ₁ -Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P	108
3.3.1.5.	Untersuchung der ADP-induzierten Aggregation.....	111
3.3.1.5.1.	Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP _{HEX}	111
3.3.1.5.2.	Bestimmung des pA ₂ -Wertes der P2Y ₁ -Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P	112
3.3.1.5.3.	Bestimmung des pA ₂ -Wertes des P2Y ₁₂ -Antagonisten 2-meSAMP und von pHMBS	114
3.3.2.	PPADS- und PPNDS-Analoga.....	116
3.3.2.1.	Hemmkurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration.....	116
3.3.2.2.	Hemmkurven des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration	118
3.3.2.3.	Untersuchung des optischen Einflusses der Analoga auf die Calciummessungen	121
3.3.2.3.1.	UV-Vis-Spektroskopie verschiedener Antagonisten	122
3.3.2.3.2.	Untersuchung des Einflusses der Antagonisten auf die Messkurven der Fluoreszenzfarbstoffe	123
3.3.2.3.3.	Untersuchung des Einflusses der Antagonisten auf 5-HT-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	125
3.3.2.3.4.	Untersuchung des ADP β S-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration.....	128
3.3.2.3.5.	Einfluss von SB9 auf die Hemmwirkung von MRS2179 gegen ADP _{HEX} -induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	131
3.3.2.4.	Schild-Analyse des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“	132
3.3.2.5.	Schild-Analyse des ADP-induzierten „shape change“	134
3.3.2.6.	Schild-Analyse der ADP-induzierten Aggregation	137
3.3.3.	Suraminanaloga.....	140

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.3.1. Hemmung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration	142
3.3.3.2. Hemmkurven des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration	145
3.3.3.3. Schild-Analyse des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“	147
3.3.3.4. Schild-Analyse des ADP-induzierten „shape change“	152
3.3.3.5. Schild-Analyse der ADP-induzierten Aggregation	157
4. DISKUSSION	163
4.1. Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten	164
4.1.1. Untersuchung des ADP-induzierten Calciumanstiegs	164
4.1.2. Untersuchungen der ADP-induzierten Aggregation	165
4.1.3. Untersuchungen des ADP-induzierten „shape change“	169
4.1.4. Untersuchungen des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“	171
4.1.5. Untersuchungen an Ekto-Nukleotidasen der Kartoffel (Apyrase grade VII)	172
4.2. Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen.....	173
4.2.1. Rezeptorselektivität an nativen P2-Rezeptoren	173
4.2.2. Stabilität von MRS2179 in Gegenwart des Ratten-Vas-deferens	174
4.2.3. Kinetik am P2Y ₁ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum.....	175
4.3. PPADS- und PPNDS-Analoga.....	176
4.3.1. Charakterisierung von PPADS- und PPNDS-Analoga an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe.....	176
4.3.2. Charakterisierung von PPADS- und PPNDS-Analoga an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten	184
4.4. Suraminanaloga.....	190
4.4.1. Charakterisierung von Suraminanaloga an humanen Thrombozyten ...	191
4.4.2. Effekte von Suraminanaloga an weiteren nativen und rekombinanten Rezeptoren	200

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.	Korrelationen zwischen den Parametern Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$, „shape change“ und Aggregation.....	203
4.6.	Korrelationen zwischen Ergebnissen an humanen Thrombozyten und an isolierten Organen.....	208
4.7.	Korrelationen zwischen Ergebnissen an nativen und rekombinanten Rezeptoren	212
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	217
5.1.	Ziel der Arbeit	218
5.2.	Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten	218
5.3.	Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen.....	219
5.4.	PPADS- und PPNDS-Analoga.....	219
5.5.	Suraminanaloga.....	220
5.6.	Korrelationen zwischen Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$, „shape change“ und Aggregation in humanen Thrombozyten	221
5.7.	Korrelationen zwischen Ergebnissen an humanen Thrombozyten und an isolierten Organen.....	222
5.8.	Korrelationen zwischen Ergebnissen an nativen und rekombinanten Rezeptoren	223
6.	LITERATURVERZEICHNIS	225
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	245
8.	FORMELVERZEICHNIS	249
8.1.	PPADS-Analoga	250

INHALTSVERZEICHNIS

8.2.	Suraminanaloga.....	251
8.3.	Nukleotidanaloga	254
9.	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSTEILNAHMEN.....	255
9.1.	Publikationen	256
9.2.	Vorträge	256
9.3.	Posterpräsentationen.....	256
10.	LEBENS LAUF	259

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

1.1. Einleitung

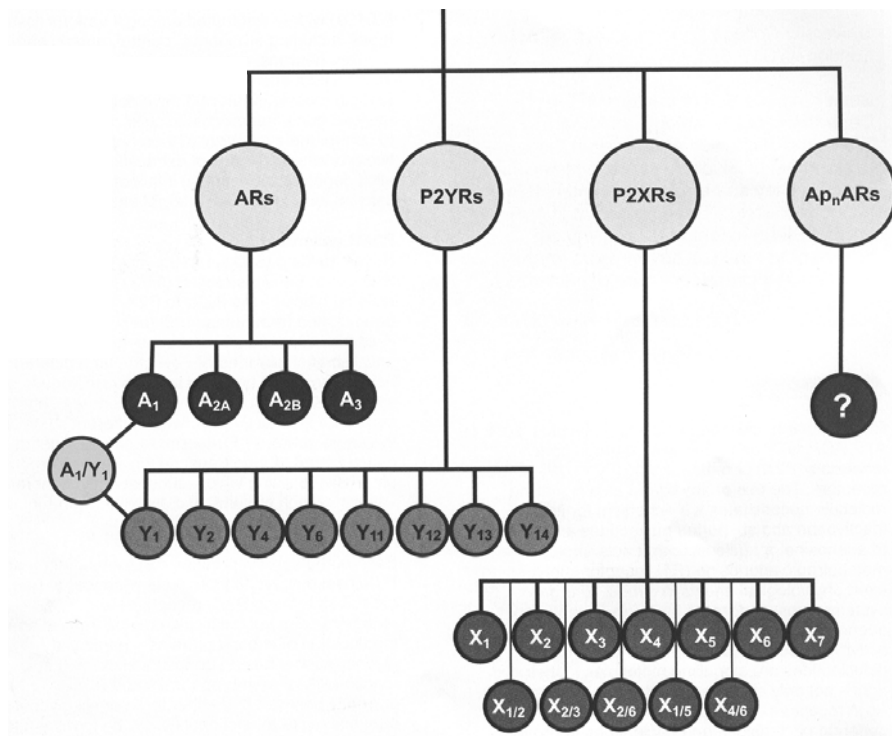


Abbildung 1.1: Die Familie der Nucleosid- und Nucleotidrezeptoren.

Die Familie der Nucleosid- und Nucleotidrezeptoren setzt sich nach dem derzeitigen Stand der Forschung aus 4 strukturell und pharmakologisch unterschiedlichen Gruppen zusammen. Dies sind die Gruppen der Adenosinrezeptoren (ARs), der metabotropen Nucleotidrezeptoren (P2YRs), der ionotropen Nucleotidrezeptoren (P2XRs), die in homomerer und heteromerer Form auftreten, und die Gruppe der Dinucleotidrezeptoren (Ap_nARs). Es scheint so, als würden Mitglieder der Adenosinrezeptoren- und der metabotropen Nucleotidrezeptorengruppe heteromerisieren, da ein A₁/P2Y₁-Komplex in nativem Gewebe nachgewiesen wurde (North und Barnard, 1997; Ralevic und Burnstock, 1998; Khak et al., 2001a; Jacobson et al., 2002; Lambrecht et al., 2002; North, 2002; Barnard et al., 2003; Abbracchio et al.; 2003).

1.1.1. P2-Rezeptoren

Seit den frühen siebziger Jahren ist bekannt, dass es sich beim Adenosin, ATP und anderen Nucleotiden um extrazelluläre Signalmoleküle handelt (Burnstock, 1972). Man unterscheidet zwischen den Nucleosidrezeptoren (P1-Rezeptoren) und den Nucleotidrezeptoren (P2-Rezeptoren) (Burnstock, 1978). Die Nucleotidrezeptoren werden nochmals unterteilt in die P2X- und die P2Y-Rezeptoren (Burnstock und Kennedy, 1985). Daneben gibt es noch die Gruppe der Dinucleotidrezeptoren (Abbildung 1.1). Ursprünglich wurde diese Einteilung aufgrund von Agonistenselektivitäten vorgenommen. Später konnte gezeigt werden, dass sich die

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

beiden P2-Rezeptorfamilien grundsätzlich in ihrer molekularen Struktur unterscheiden; bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ligandgesteuerte Ionenkanäle (North, 1996), wohingegen die P2Y-Rezeptoren zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören (North und Barnard, 1997).

1.1.1.1. P2X-Rezeptoren

Bei den P2X-Rezeptoren handelt es sich um ligandgesteuerte Ionenkanäle, die durch ATP innerhalb weniger Millisekunden geöffnet werden, wodurch der Rezeptor permeabel für Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Ionen wird (North und Surprenant, 2000). Der P2X₇-Rezeptor zeigt eine Besonderheit; in Folge längerer Agonistenexposition bildet sich eine Pore aus, durch die Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton passieren können (Ralevic und Burnstock, 1998). Mittlerweile ist bekannt, dass auch rekombinante P2X₂-, P2X₄- und P2X_{2/3}-Rezeptoren in der Lage sind, solche Poren auszubilden (Lambrecht et al., 2002).

Die erste cDNA für einen P2X-Rezeptor (P2X₁) wurde 1994 isoliert (Valera et al., 1994). Mittlerweile sind 7 P2X-Rezeptor-Untereinheiten bekannt und kloniert. Diese Rezeptoren zeigen eine Übereinstimmung der Sequenz von 27 % bis 48 % und variieren in ihrer Größe zwischen 379 und 595 Aminosäuren (Lambrecht et al., 2002). Die längste Aminosäuresequenz ist beim P2X₇-Rezeptor zu finden, die kürzeste beim P2X₆-Rezeptor (Khak et al., 2001a).

Die P2X-Rezeptoren zeigen eine große Heterogenität, was die Identifizierung und die Zuordnung von physiologischen Effekten erschwert. Mit Ausnahme des P2X₆-Rezeptors können funktionstüchtige homomere Ionenkanäle ausgebildet werden, Heteromerisierung ist von P2X_{4/6}, P2X_{1/5}, P2X_{2/3}, P2X_{2/6} und P2X_{1/2} beschrieben (Jacobson et al., 2002). Bei den heteromeren Rezeptoren ist die stöchiometrische Zusammensetzung weitgehend unbekannt, und auch die Frage, wie die Eigenschaften der unterschiedlichen P2X-Untereinheiten den Phänotyp des heteromeren Rezeptors beeinflussen, ist noch nicht geklärt.

Darüber hinaus wird auch von verschiedenen Splicevarianten berichtet (Dhulipala et al., 1998; Troyanovskaya und Wackym, 1998; Carpenter et al., 1999). Beim P2X₇-Rezeptor wurden verschiedene Polymorphismen gefunden, die pharmakologisch relevant sind. So wird ein Schutzmechanismus gegen Mykobakterien mit einem Polymorphismus im P2X₇-Rezeptor von humanen Macrophagen in Verbindung

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

gebracht (Li et al., 2002). Zusätzlich unterliegen P2X-Rezeptoren auch aktivierungsabhängigen Modifikationen wie zellulärer Internalisierung des P2X₁-Rezeptors (Dutton et al., 2000). P2X-Rezeptoren kommen in vielen Zellen wie Neuronen, Epithelzellen, Blutzellen, Glia und glatten Muskelzellen vor. Die Depolarisierung, die aus der Aktivierung der P2X-Rezeptoren resultiert, kann zur Öffnung von spannungsabhängigen Ionenkanälen, L-Typ-Ca²⁺-Kanälen und zur Aktivierung Ca²⁺-stimulierten Thyrosinkinase führen, die MAP-Kinasen wie ERK1 und ERK2 (extrazelluläre Rezeptor-Kinase) aktivieren, was zu einer Modulation der Transkription führt (Swanson et al., 1998).

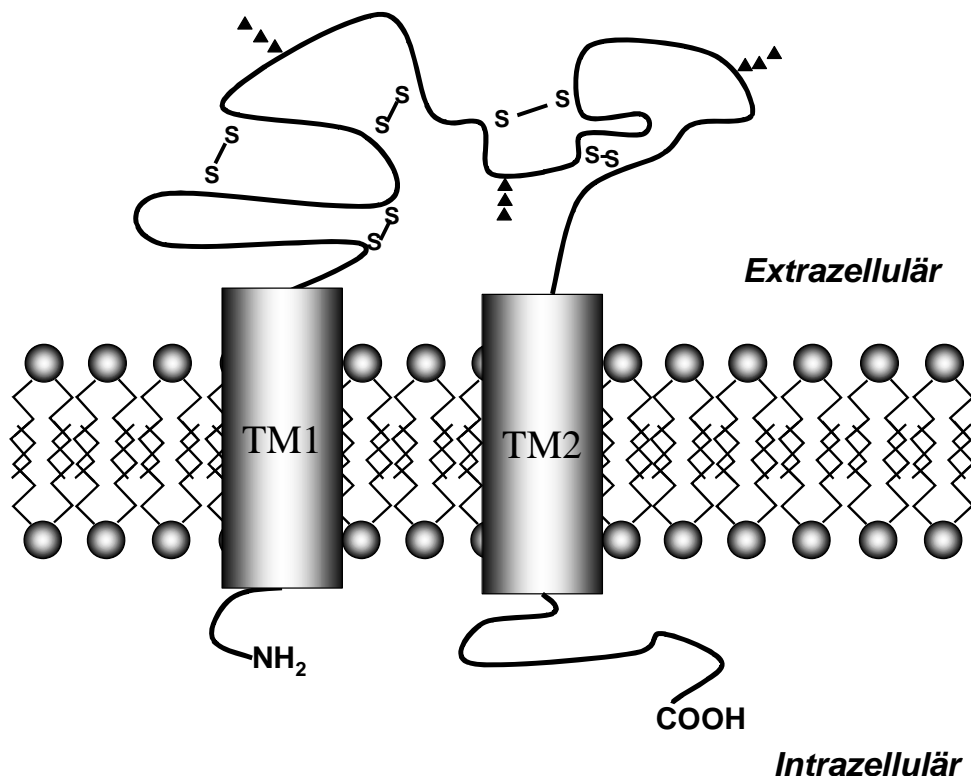


Abbildung 1.2: Modell einer P2X-Rezeptor-Untereinheit.

Die P2X-Untereinheit besitzt 2 Transmembrandomänen (TM), N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär. An der extrazellulären Schleife befinden sich mehrere Disulfidbrücken von Cysteinresten (S-S) und mehrere Glykosylketten (Dreiecke).

Mit anderen ligandengesteuerten Ionenkanälen gibt es nur wenig strukturelle Übereinstimmung, allerdings sind auch bei den P2X-Rezeptoren generelle Prinzipien des Ionentransports durch transmembranäre Kanäle zu erkennen. Wie alle ligandengesteuerten Ionenkanäle besitzen sie eine charakteristische Untereinheiten-Stöchiometrie, weisen Selektivitäten für bestimmte Ionen auf und das Gleichgewicht

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

zwischen offenen und geschlossenen Kanälen wird durch spezifische Agonisten reguliert (Egan et al., 2004).

Die P2X-Rezeptoren scheinen eine eigene Gruppe der durch Neurotransmitter gesteuerten Kanäle darzustellen. Die Untereinheiten des P2X-Rezeptors besitzen 2 Transmembrandomänen (TM) im Gegensatz zu 3 oder 4 TM, wie sie bei anderen Ionenkanälen zu finden sind. Die N- und C-Termini der Rezeptoren befinden sich intrazellulär, extrazellulär liegt eine cysteinreiche Schleife, die verschiedene Motive für N-gebundene Glycosylierung trägt (Abbildung 1.2) (Torres et al., 1998; Newbolt et al., 1998). Strukturelle Ähnlichkeiten sind zum Beispiel mit dem Amilorid-sensitiven epithelialen Natriumkanal gegeben (Egan et al., 2004).

Um Poren zu bilden, die groß genug sind für die Kationenpassage, bestehen die meisten Kanäle aus mehreren Untereinheiten. Untersuchungen ergaben eine Stöchiometrie von 4 oder 5 Untereinheiten für eine Reihe von ligand- und spannungsabhängigen Kanälen (Devillers-Thiery et al., 1993; Laube et al., 1998). Die Stöchiometrie der P2X-Rezeptoren ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings lassen funktionelle Untersuchungen an concatameren Rezeptoren (Stoop et al., 1999) und biochemisches Cross-linking (Nicke et al., 1998) vermuten, dass es sich entweder um Trimere oder um Vielfache von Trimeren handelt. Die definitive Antwort könnte durch kristallographische Untersuchungen gefunden werden.

Die Polymerisierung der Untereinheiten findet intrazellulär statt und nicht erst in der Zellmembran. Der P2X₆-Rezeptor ist nicht in der Lage homomere funktionstüchtige Rezeptoren auszubilden. Das heißt, werden nun ausschließlich P2X₆-Rezeptoren in HEK-Zellen exprimiert, können an der Zelloberfläche keine P2X₆-Proteine gefunden werden. Bei zusätzlicher Expressierung von P2X₂-Rezeptoren kommt es zu einer Assemblierung, und auf der Oberfläche können beide Untereinheiten nachgewiesen werden (Egan et al., 2004).

Biochemische und funktionelle Studien haben gezeigt, dass die Assemblierung von P2X-Untereinheiten zu oligomeren Komplexen in einer festgelegten Art und Weise erfolgt. Nur bestimmte Kombinationen von Untereinheiten scheinen sich zusammenzulagern, was dafür spricht, dass Domänen existieren, die für diese zielgerichteten Interaktionen verantwortlich sind. Untersuchungen an chimären Rezeptoren haben ergeben, dass die zweite Transmembrandomäne der P2X-Rezeptoren essentiell für die Assemblierung der Untereinheiten ist (Torres et al.,

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

1999b). Es wird allerdings vermutet, dass auch die erste TM eine Rolle bei der Assemblierung spielt (Egan et al., 2004).

Durch Bindung eines Agonisten kommt es zu einer Änderung der Konformation der kanalbildenden Untereinheiten und zur Ausbildung einer wassergefüllten Pore, die den Ionenstrom ermöglicht. Wenn man annimmt, dass der Rezeptor aus 3 Untereinheiten aufgebaut ist, stünden theoretisch 6 TMs für die Ausbildung einer Pore zur Verfügung. Ob allerdings alle 6 oder nur bestimmte TMs an der Porenbildung beteiligt sind, ist noch unklar. Untersuchungen haben gezeigt, dass die TM2 eine wichtige Rolle bei der Bildung der Pore spielt (Rassendren et al., 1997). In dieser Domäne befindet sich ein Glycin-Rest, von dem angenommen wird, dass er das Kanaltor bildet, da er von beiden Seiten zugänglich ist (Egan et al., 1998). Aber auch die C-Termini scheinen an der Kontrolle der Membranpermeabilität beteiligt zu sein (Eickhorst et al., 2002).

Die extrazelluläre Domäne enthält Bindungsstellen für Nukleotide und Antagonisten, bei denen Lysinreste eine wichtige Rolle spielen (Jiang et al., 2000). Wahrscheinlich befinden sich auch die Orte für die allosterische Modulation durch H^+ , Ca^{2+} und Zn^{2+} in der extrazellulären Domäne, da die ATP-vermittelten Ionenströme durch unterschiedliche Konzentrationen dieser Ionen im Extrazellularraum beeinflusst werden (Egan et al., 2004).

Da es sich bei P2X-Rezeptoren um Oligomere handelt, gibt es die gängige Meinung, dass jede Untereinheit eine Bindungsstelle für ATP besitzt. Allerdings wäre es auch möglich, dass ATP an die Verbindungsstellen benachbarter Einheiten bindet. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Rezeptorkomplex mehr als eine Bindungsstelle für ATP aufweist, wahrscheinlich 2 oder 3. Erstens sind die Steigungen der Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP an homomeren Rezeptoren größer als 1 (North und Surprenant et al., 2000). Zweitens weisen kinetische Analysen von Einzelkanalmessungen darauf hin, dass die Bindung mehrerer ATP-Moleküle notwendig ist, um den Rezeptor zu aktivieren (Ding und Sachs, 1999). Es wird vermutet, dass die negativ geladenen Phosphatgruppen von ATP mit positiv geladenen Aminosäuregruppen der extrazellulären Schleife interagieren (Egan et al., 2004).

Über den Angriffspunkt von Antagonisten an P2X-Rezeptoren ist wenig bekannt. Untersuchungen mit PPADS (siehe 8.1) ergaben, dass es sich um einen nichtkompetitiven Antagonisten an einigen ($P2X_1$, $P2X_2$, $P2X_3$ und $P2X_5$) aber nicht

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

an allen (P2X₄) P2X-Rezeptoren der Ratte handelt. Mit Ausnahme des P2X₃-Rezeptors setzt die Blockade erst langsam ein und ist nur teilweise reversibel (Egan et al., 2004). Der Grund für den irreversiblen Mechanismus ist eine Bildung von Schiff'schen Basen zwischen der Aldehydgruppe des Antagonisten und Lysinresten in der extrazellulären Schleife des Rezeptors (Nicke et al., 1998). Diese Hypothese wurde durch Austausch des positiv geladenen Lysins durch negativ geladenes Glutamat bestätigt. Der Antagonismus von PPADS war weiterhin gegeben, allerdings war dieser nun reversibel (Buell et al., 1996). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass PPADS mindestens an 2 Stellen der extrazellulären Domäne bindet.

Alle 7 P2X-Untereinheiten besitzen relativ kurze N-Termini, die aus rund 25 Aminosäuren bestehen. Es befindet sich hier eine übereinstimmende Region für Proteinkinase-C-Phosphorylierung. Der N-Terminus ist auch an der Desensibilisierung des Rezeptors beteiligt (Boue-Grabot et al., 2000; Ennion und Evans, 2002). Es wird vermutet, dass die Rezeptorkinetik durch den Phosphorylierungsstatus beeinflusst wird.

Im C-Terminus sind die größten Unterschiede bei den einzelnen P2X-Untereinheiten festzustellen. Die Länge variiert zwischen 30 Aminosäuren im P2X₆- und 217 Aminosäuren im P2X₇-Rezeptor. Auch diese Region hat einen Einfluss auf die Kinetik der Desensibilisierung, da Verkürzung des C-Terminus die Desensibilisierung verstärkt (Werner et al., 1996).

Aufgrund ihres kinetischen Verhaltens werden die P2X-Rezeptoren in 3 Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe wird schnell durch Agonisten aktiviert (0,01 – 0,1 Sekunden), worauf eine rasche Inaktivierung und Desensibilisierung (0,1 - 10 Sekunden) bei längerer Agonistenexposition folgt. Diese Eigenschaften zeigen die P2X₁- und P2X₃-Homomere. Gruppe 2 umfasst P2X₂, P2X_{2/3}, P2X_{2/6}- und P2X₅-Rezeptoren, deren Verhalten durch eine rasche Aktivierung (0,1 - 1 Sekunde) und eine langsam einsetzende Inaktivierung bzw. Desensibilisierung (10 – 100 Sekunden) charakterisiert ist. Die Rezeptoren der Gruppe 3 (P2X_{1/5}-, P2X₄-, P2X_{4/6}- und P2X₇-Rezeptoren) werden ebenfalls rasch aktiviert (0,1 – 1 Sekunden), die Inaktivierung aber kann in eine schnelle und in eine langsame Phase unterteilt werden (Jacobson et al., 2002).

Die einzelnen P2X-Rezeptoren werden durch unterschiedliche Konzentrationen von ATP aktiviert. Vergleicht man die EC₅₀-Werte, so erhält man folgende Reihenfolge für

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

die Wirkstärke von ATP: $P2X_1 = P2X_3 > P2X_2 > P2X_4 = P2X_5 > P2X_6 \gg P2X_7$ (Zemkova et al., 2004).

Es wird vermutet, dass das Desensibilisierungsverhalten der Rezeptoren mit dem Ablösen des ATP-Moleküls vom Rezeptor zusammenhängt. Rezeptoren, die sehr ATP-sensitiv sind wie z. B. der $P2X_1$ -Rezeptor, zeigen ein langsames Ablösen des Agonisten und eine schnell einsetzende, anhaltende Desensibilisierung, die hier zur schnellen Terminierung der $P2X$ -Rezeptoraktivierung dient. Dagegen zeigen $P2X$ -Rezeptoren die weniger ATP-sensitiv sind, eine schnelle Ablösung des Agonisten vom Rezeptor und eine nur langsam einsetzende Desensibilisierung (Rettinger und Schmalzing, 2004).

Die $P2X$ -Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem und in der Peripherie weit verbreitet, wo sie in die verschiedensten biologischen Prozesse involviert sind, wie zum Beispiel Muskelkontraktion, Steuerung des kardiovaskulären und des respiratorischen Systems, Immunmodulation, Entzündung und Apoptose, Schmerzübertragung sowie Modulation der Transmitterfreisetzung.

Die Funktionen der $P2X$ -Rezeptoren in nativem Gewebe wurden mit Hilfe von Knock-out-Mäusen untersucht. Es gibt $P2X_1$ -, $P2X_3$ - und $P2X_7$ -Knock-out-Mäuse, und Mäuse, die den $P2X_1$ -Rezeptor überexprimieren (Mulryan et al., 2000; Cockayne et al., 2000; Solle et al., 2001; Oury et al., 2003).

Im folgenden soll nun näher auf die $P2X$ -Rezeptoren eingegangen werden, die eine wichtige Rolle in dieser Arbeit spielen.

1.1.1.1.1. $P2X_1$ -Rezeptoren

$P2X_1$ -Untereinheiten von Mensch, Ratte und Maus wurden ursprünglich aus dem Samenleiter (Valera et al., 1994) und der Harnblase kloniert (Valera et al., 1995) und bestehen aus 399 Aminosäuren.

Bei $P2X_1$ -Rezeptoren handelt es sich um nichtselektive Kationenkanäle, die eine viermal größere Permeabilität für Calcium als für monovalente Kationen zeigen (Valera et al., 1994). Durch den Kationeneinstrom kommt es zu einer Depolarisation. Der $P2X_1$ -Rezeptor gehört zur Gruppe 1 der schnell aktivierten und rasch desensibilisierenden Rezeptoren. Die Desensibilisierung setzt hier bei maximaler Aktivierung nach ca. 300 Millisekunden ein und hält für 10 – 30 Minuten an (North und Surprenant, 2000). Durch endogen freigesetzte Nukleotide kann es zu einer Desensibilisierung des $P2X_1$ -Rezeptors kommen, wodurch die Charakterisierung der

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

physiologischen Funktionen des P2X₁-Rezeptors erschwert wird. Ein Beispiel ist der P2X₁-Rezeptor auf humanen Thrombozyten. Lange Zeit wurde fälschlicherweise angenommen, dass er keine Rolle bei der Plättchenaktivierung spielt. Der Grund hierfür war aber, dass er unter den gewählten Versuchsbedingungen im desensibilisierten Zustand vorlag. Mit Hilfe des nukleotidsplattendes Enzyms Apyrase kann diese Desensibilisierung verhindert werden. Für eine Desensibilisierung des P2X₁-Rezeptors reichen schon nanomolare Konzentrationen an ATP aus (Rettinger und Schmalzing, 2003). Es wird vermutet, dass die Desensibilisierung nur nach Öffnung des Kanals erfolgt, was durch ein dreistufiges Modell für den Rezeptorzustand beschrieben werden kann: geschlossen – geöffnet – desensibilisiert (Rettinger und Schmalzing, 2004).

Die Desensibilisierung kann durch Austausch der ersten 47 Aminosäuren durch die des P2X₂-Rezeptors, was dem N-Terminus und nahezu der gesamten ersten Transmembrandomäne entspricht, vollständig verhindert werden (Werner et al., 1996). Da sich diese Regionen alle intrazellulär befinden und die Agonisten nur an die Ektodomäne binden, müsste diese P2X₂/P2X₁-Chimäre identische ATP-Bindungseigenschaften wie ein reiner P2X₁-Rezeptor aufweisen. Dafür spricht, dass die P2X₂/P2X₁-Chimäre durch $\alpha\beta$ meATP aktiviert werden kann, was unwirksam am P2X₂-Rezeptor ist. Außerdem wurde für das Suraminanalogon NF279 der gleiche pIC₅₀-Wert an der Chimäre wie am reinen P2X₁-Rezeptor ermittelt (Rettinger und Schmalzing, 2004).

Neben Desensibilisierung wurde auch Internalisierung des P2X₁-Rezeptors beobachtet. Untersuchungen mit sogenannten „green fluorescent protein“-Chimären (Chimäre aus einem Grün-fluoreszierenden Protein und dem P2X₁-Rezeptor) haben gezeigt, dass P2X₁-Rezeptoren nach Anwesenheit von $\alpha\beta$ meATP für 10 - 20 Minuten von der Zelloberfläche verschwunden sind und wahrscheinlich in saure Endosome aufgenommen werden (Dutton et al., 2000).

Die Reihenfolge der Agonistenaktivitäten (EC₅₀-Werte) am klonierten humanen P2X₁-Rezeptor ist folgendermaßen (Guile et al., 2001): Benzoyl-ATP (1,8 nM) > 2meSATP (54 nM) = ATP (56 nM) > AP₄A (180 nM) = $\alpha\beta$ meATP (200 nM) > AP₅A (280 nM) > AP₆A (1,1 μ M) > ADP β S (2,5 μ M) > ADP (10 μ M). Da die einzelnen Agonisten unterschiedliche Stabilitäten gegenüber Ekto-Nukleotidasen aufweisen, ergeben sich in nativen Geweben andere Reihenfolgen der agonistischen Wirkung (Jacobson et al., 2002; Lambrecht et al. 2002).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Für die Blockade des P2X₁-Rezeptors wurden zahlreiche Antagonisten entwickelt, wie z.B. NF023, NF279, NF449, PPNDS und MRS2159, die in Kapitel 1.1.2.2 besprochen werden. Der potenteste Inhibitor des humanen rekombinanten P2X₁-Rezeptors ist zur Zeit NF449 mit einem pA₂-Wert von 10,7 (Hülsmann et al., 2003).

Durch Erhöhung der H⁺-Konzentration im Medium kommt es auch zu einer Hemmung des rekombinanten P2X₁-Rezeptors (Dunn et al., 2001).

Mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation konnte herausgefunden werden, dass P2X₁-Rezeptoren Heteromere bilden mit P2X₂-, P2X₃-, P2X₅- und P2X₆-Untereinheiten (Torres et al., 1999a).

mRNA für P2X₁-Untereinheiten wurden in der Harnblase, in der glatten Muskelschicht von kleinen Arterien und Arteriolen, im Samenleiter, in Lunge und Milz, im N. Trigemini und in vegetativen Ganglien, im Rückenmark und im Gehirn gefunden sowie in Thrombozyten und Megakaryozyten (Jacobson et al., 2002). Der P2X₁-Rezeptor wurde auf der glatten Muskulatur von Samenleiter, Blase und Blutgefäßen auch mit Hilfe von Antikörpern identifiziert, wo infolge von P2X₁-Rezeptoraktivierung eine Kontraktion ausgelöst wird. Die Bedeutung des P2X₁-Rezeptors auf humanen Thrombozyten wird unter 1.1.4.1.1 beschrieben.

P2X₁-Knock-out-Mäuse zeigten einen leicht erhöhten Blutdruck, erwiesen sich aber ansonsten als gesund (Dunn, 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass P2X₁-Antagonisten zur Behandlung von erhöhtem Blutdruck nützlich sein könnten. Untersuchungen an männlichen P2X₁-Knock-out-Mäusen zeigten kontraktile Dysfunktionen des Samenleiters, reduzierte Spermienzahl und daraus resultierend eine 90%ige Reduktion der Fertilität, wobei die Spermatogenese und die erektile Funktion erhalten blieben (Mulryan et al., 2000). Deshalb wurde vermutet, dass P2X₁-Antagonisten als Kontrazeptiva für den Mann eingesetzt werden könnten. Allerdings ist unklar, ob der P2X₁-Rezeptor beim Menschen eine ähnlich wichtige Rolle im Vas deferens spielt wie bei Mäusen (Dunn, 2000).

Der P2X₁-Rezeptor ist auch stark an Nukleotid-induzierten Effekten an der glatten Muskulatur der Harnblase beteiligt. Möglicherweise könnten in Zukunft P2X₁-Antagonisten zur Behandlung von Inkontinenz, die auf einer hyperreaktiven Blase beruht, eingesetzt werden (O'Reilly et al., 2001).

1.1.1.1.2. P2X₃-Rezeptoren

Es handelt sich bei dem P2X₃-Rezeptor um einen kationenselektiven Ionenkanal, dessen Permeabilität für Calcium und Natrium ungefähr gleich ist (North, 2002).

Der homomere P2X₃-Rezeptor zeigt bei niedrigen ATP-Konzentrationen kaum eine Desensibilisierung, sie tritt erst bei voller Aktivierung auf, dann allerdings sehr rasch (ca. 100 Millisekunden) und dauert ungefähr 15 Minuten an (North und Surprenant, 2000). Durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer beschleunigten Resensibilisierung (Cook et al., 1998). Wie auch beim P2X₁-Rezeptor ist eine Hemmung des rekombinanten P2X₃-Rezeptors der Ratte durch Erhöhung der H⁺-Ionenkonzentration zu beobachten (Dunn et al., 2001). Im intakten Gewebe wurden homomere P2X₃- und heteromere P2X_{2/3}-Rezeptoren nachgewiesen (Jarvis et al., 2002). Diese beiden Rezeptoren zeigen ein ähnliches pharmakologisches Profil, unterscheiden sich allerdings in ihrem Desensibilisierungsverhalten (Burgard et al., 1999; Jarvis et al., 2002; Jarvis et al., 2004). Im Gegensatz zum homomeren P2X₃-Rezeptor ist beim P2X_{2/3}-Rezeptor eine langsam einsetzende Desensibilisierung zu beobachten (North, 2002).

Es gibt eine Reihe von Antagonisten, die die P2X₃- und P2X_{2/3}-Rezeptoren blockieren. Die potentesten Verbindungen sind A-317491 und TNP-ATP, die K_i-Werte um 10 nM aufweisen (Jarvis et al., 2004). Im Gegensatz zu TNP-ATP, das eine vergleichbare Aktivität am P2X₁-Rezeptor zeigt, handelt es sich bei A-317491 um einen selektiven P2X₃- und P2X_{2/3}-Antagonisten, der an diesen Rezeptoren mehr als 100-fach potenter ist als an anderen P2X-Rezeptoren (Jarvis et al., 2002). Mittlerweile existiert A-317491 auch als Radioligand (Jarvis et al., 2004). Untersuchungen mit diesem Radioliganden an humanen homomeren P2X₃-Rezeptoren ergaben folgende Reihenfolge der Affinitäten (K_i-Werte, nM) für Agonisten (Jarvis et al., 2004): 2-meSATP (8,2) = BzATP (7,7) = αβmeATP (9,0) > ATP (14,6) > ADP (406). Am P2X_{2/3}-Rezeptor wurden vergleichbare Agonistenaffinitäten gefunden.

Der P2X₃-Rezeptor scheint nur eine limitierte Verbreitung zu haben. Er wurde auf sensorischen Neuronen wie N. trigeminus und DRG-Neuronen („dorsal root ganglia“) sowie im Herzen nachgewiesen (Guile et al., 2001; Jacobson et al., 2002). Mit Hilfe von immunohistochemischen Untersuchungen konnte der P2X₃-Rezeptor auf Nervenfasern der Harnblase nachgewiesen werden. P2X₃-Knock-out-Mäuse zeigen eine reduzierte Entleerungsfrequenz und eine erhöhte Blasenkapazität bei

gleichbleibendem Blasendruck. P2X₃-Antagonisten könnten somit ein mögliches Therapeutikum bei Blasenschwäche oder überaktiver Blase darstellen (Cockayne et al., 2000).

In der Nozizeption spielt der P2X₃-Rezeptor eine wichtige Rolle. Homomere P2X₃-Rezeptoren wie auch heteromere P2X_{2/3}-Rezeptoren befinden sich auf sensorischen afferenten Nervenfasern (Jarvis et al., 2002). Es kommt zu einer verstärkten Expression von P2X₃-Rezeptoren in sensorischen Afferenzen und im Rückenmark infolge einer Schädigung peripherer sensorischer Fasern (Williams und Jarvis, 2000). Untersuchungen an P2X₃-Knock-out-Mäusen ergaben ein vermindertes Schmerzverhalten nach Injektion von ATP oder Formalin (Cockayne et al., 2000). Diese Tiere weisen darüber hinaus normale sensorische Funktionen und normales Schmerzverhalten gegenüber mechanischen Stimuli, aber verändertes Verhalten gegenüber thermischen Stimuli auf (Souslova et al., 2000). Untersuchungen mit dem potenten und selektiven P2X₃-und P2X_{2/3}-Antagonisten A-317491 an Mäusen zeigten reduzierte Nozizeption in neuropathischen und inflammatorischen Schmerzmodellen, dagegen war kaum ein Effekt auf den akuten viszeralen Schmerz festzustellen (Jarvis et al., 2002).

1.1.1.2. P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die eine heptahelikale Struktur mit sieben hydrophoben Transmembrandomänen (TM) aufweisen. Der extrazelluläre N-Terminus enthält verschiedene übereinstimmende Glykosylierungssequenzen, die mit Stickstoff verknüpft sind. In den intrazellulären Domänen befinden sich mögliche Phosphorylierungsorte für Proteinkinasen, die eventuell an der Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren beteiligt sind (Lambrecht et al., 2002).

Es bestehen Sequenzhomologien zu Angiotensin- und Thrombinrezeptoren, weshalb es zu Spekulationen kam, dass es eventuell einen endogenen Peptidliganden für die P2Y-Rezeptoren geben könnte (Jacobson et al., 2002).

Zur Zeit kennt man 8 P2Y-Rezeptorsubtypen, die aus Säugetiergewebe (Mensch, Maus und Ratte) kloniert wurden: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ (Abbildung 1.1). Bei den fehlenden Subtypnummern handelt es sich entweder um Spezieshomologe, die bei Nichtsäugern vorkommen, wie z. B. P2Y₃, der aus

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Hühnern kloniert wurde und wahrscheinlich die Vogelvariante des humanen P2Y₆-Rezeptors darstellt (Li et al., 1998), oder um Rezeptoren, die fälschlicherweise den P2-Rezeptoren zugeordnet wurden. Ein Beispiel dafür ist der P2Y₇-Rezeptor, der sich als Leukotrien-B₄-Rezeptor entpuppt hat (Yokomizo et al., 1997).

Die endgültige Anzahl der P2Y-Rezeptoren wird wahrscheinlich um einiges höher sein. Zum einen wurde über pathophysiologische Vorgänge berichtet, die über P2Y-ähnliche Rezeptoren vermittelt werden, deren pharmakologisches Profil mit keinem bekannten rekombinanten P2Y-Rezeptor übereinstimmt (Brambilla et al., 1999), zum anderen gibt es eine Reihe von „orphan“ GPCRs (G-Protein-gekoppelten Rezeptoren), die eine signifikante Übereinstimmung der Sequenz mit einigen P2Y-Rezeptoren zeigen. Bei den P2Y₁₃- und P2Y₁₄-Rezeptoren handelte es sich um solche „orphan“ Rezeptoren (Zhang et al., 2002; Abbraccio et al., 2003).

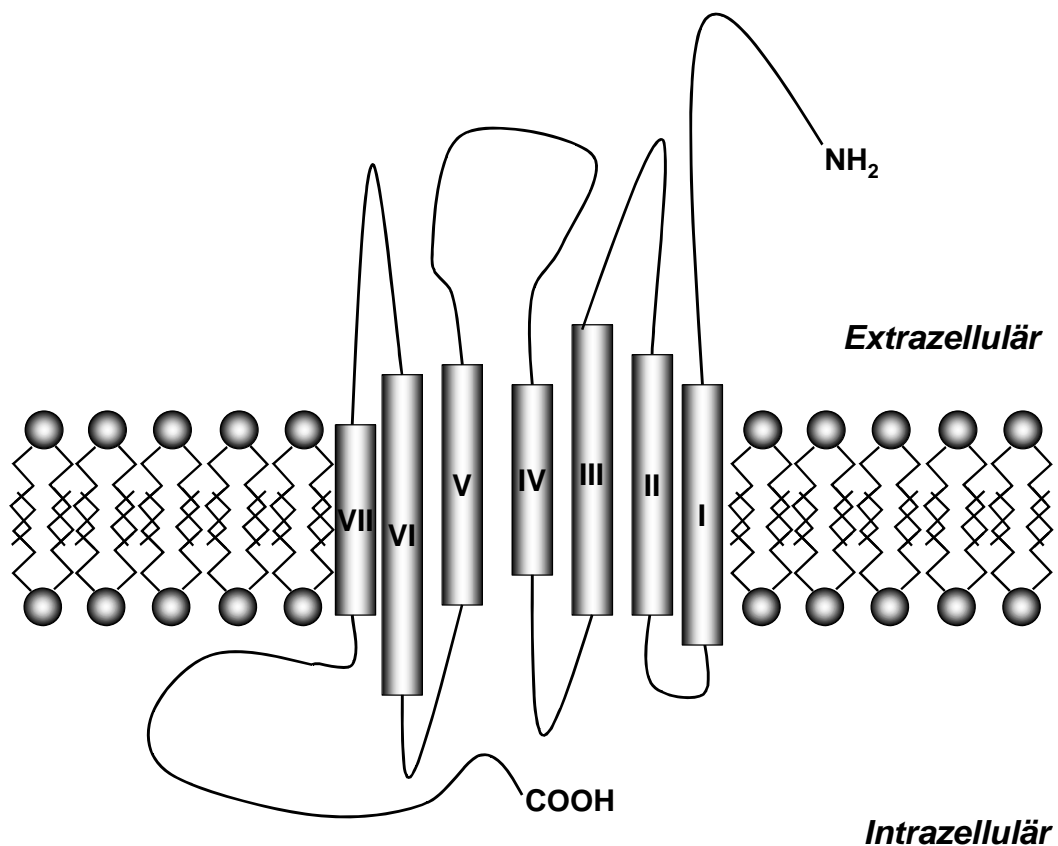


Abbildung 1.3: Modell des P2Y-Rezeptors.

G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen (I-VII).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Auch kann es zum Auftreten von Polymorphismen kommen. So wurde zum Beispiel über einen Polymorphismus des humanen P2Y₂-Rezeptors berichtet (Janssens et al., 1999). Auch bei dem P2Y₁₂-Rezeptor gibt es verschiedene Polymorphismen, die einen Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregation und somit auf das Risiko, an einer Atherothrombose zu erkranken, besitzen (Fontana et al., 2003).

Die humanen Subtypen der P2Y-Rezeptoren zeigen eine Übereinstimmung der Sequenz von 19 - 55% und ihre Größe variiert zwischen 328 und 377 Aminosäuren (Lambrecht et al., 2002). Vom phylogenetischen und strukturellen Standpunkt aus kann man die P2Y-Rezeptoren in 2 Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst die P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆- und P2Y₁₁-Rezeptoren, die zweite die P2Y₁₂-, P2Y₁₃- und P2Y₁₄-Rezeptoren (Abbracchio et al. 2003).

Positiv geladene Aminosäurereste in den Transmembrandomänen sind möglicherweise an der Bindung von Liganden durch elektrostatische Interaktionen mit den Phosphatgruppen der Nukleotide beteiligt. Alle klonierten P2Y-Rezeptoren zeigen eine übereinstimmende Sequenz in TM6, die essentiell für die Agonistenaktivität ist. Für die erste phylogenetische Gruppe der Rezeptoren wurde in TM7 eine übereinstimmende Sequenz gefunden, bei der ebenfalls vermutet wird, dass diese an der Ligandenbindung beteiligt ist (Abbracchio et al., 2003). Punktmutationen im P2Y₂-Rezeptor lassen vermuten, dass His262 und Arg265 in TM6 sowie Arg292 in TM7 wahrscheinliche Kandidaten für diese Interaktionen sind (Erb et al., 1995). Im Gegensatz dazu sind die wichtigsten Stellen für die Bindung der Nukleotide an den humanen P2Y₁-Rezeptor TM3 (Arg128), TM5 (Thr222), TM6 (Lys280) und TM7 (Arg310). Es wird angenommen, dass sich ATP so anlagert, dass TM6 und TM7 nahe am Adeninring, TM3 und TM6 nahe an der Ribose und TM3, TM6 und TM7 nahe bei der Triphosphatkette liegen (Jiang et al., 1997; Moro et al., 1998).

Aktiviert werden P2Y-Rezeptoren sowohl von Purinen (ATP, ADP) wie auch von Pyrimidinen (UTP, UDP). Man kann sie unterteilen in Rezeptoren, die hauptsächlich von ADP und ATP aktiviert werden (P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃), Rezeptoren, die Uracilnukleotide bevorzugen (P2Y₄ und P2Y₆) und Rezeptoren, die sowohl von Uracil- als auch von Adenosinnukleotiden aktiviert werden (P2Y₂ und P2Y₄ von Nagetieren). Agonisten für den P2Y₁₄-Rezeptor sind Zuckernukleotide wie UDP-Glucose, UDP-Galaktose und UDP-N-acetylglucosamin (Abbracchio et al., 2003).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

P2Y_{1,2,4,6,11}-Rezeptoren stimulieren über G_q-Proteine die Phospholipase C, was zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat und zu einer Mobilisierung von intrazellulärem Calcium führt. Die P2Y₁₂- und P2Y₁₃-Rezeptoren hemmen über G_i-Proteine die Adenylatcyclase. (Lambrecht et al., 2002). Der P2Y₁₁-Rezeptor ist einmalig unter den P2Y-Rezeptoren, da er sowohl an den Phosphatidylinositol- als auch an den Adenylatcyclase-Signalweg gekoppelt ist (Communi et al., 1997). Der Signalweg des P2Y₁₄-Rezeptors ist noch nicht bekannt. In manchen Systemen interagieren P2Y-Rezeptoren mit anderen Transduktionswegen durch Aktivierung von Phospholipase A₂ oder Phospholipase D, Aktivierung von Kaliumkanälen oder Hemmung von Calciumkanälen (Lambrecht et al., 2002).

Knock-out-Mäuse sind gut dazu geeignet, die funktionellen Funktionen der P2Y-Rezeptoren in nativem Gewebe zu untersuchen. Es gibt mittlerweile Mäuse, denen der P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄- oder P2Y₁₂-Rezeptor fehlt (Leon et al., 1999; Fabre et al., 1999; Homolya et al., 1999; Foster et al., 2001; Robaye et al., 2003) und Mäuse, die den P2Y₁-Rezeptor überexprimieren (Hechler et al., 2003b).

1.1.1.2.1. P2Y₁-Rezeptoren

Der P2Y₁-Rezeptor war der erste metabotrope Nukleotidrezeptor, der 1993 aus dem Hirn von embryonalen Hühnern kloniert wurde (Webb et al., 1993).

Er ist an G_q-Proteine gekoppelt, die die Phospholipase C aktivieren, was zu einer Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. Inositoltriphosphat induziert die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Der P2Y₁-Rezeptor beeinflusst auch die Ras-ERK-Kaskade, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI₃-Kinase) und die stressaktivierte Proteinkinase (Barnard et al., 2003). Es wurde eine Heteromerisierung des P2Y₁-Rezeptors mit dem A₁-Rezeptor beschrieben (Nakata et al., 2003). An diesem Rezeptor wirkt ADPβS als Agonist, wohingegen MRS2179 als Antagonist unwirksam ist.

Durch Expression eines hexahistidinmarkierten P2Y₁-Rezeptors in Sf9-Insektenzellen konnte ein gereinigter humaner P2Y₁-Rezeptor hergestellt werden (Waldo und Harden, 2004), was es ermöglichte, die Effekte von Agonisten an diesem Rezeptor zu untersuchen ohne einen Einfluss von Enzymen, die Nukleotide ab- oder aufbauen. Es wurde folgende Agonistenreihenfolge (K_i-Werte, μM) gefunden: 2-meSADP (0,099) > ADP (0,92) > 2-meSATP (1,87) = ADPβS (2,42) > ATP (17,7). Somit konnte endlich die vieldiskutierte Frage geklärt werden, inwiefern ATP

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

agonistische Wirkungen am P2Y₁-Rezeptor entfaltet. Es zeigte sich, dass es sich bei ATP um einen partiellen Agonisten des P2Y₁-Rezeptors handelt. Dieser Befund bestätigt die Beobachtung von verschiedenen Arbeitsgruppen, die berichteten, dass es sich bei ATP um einen Agonisten oder einen Antagonisten handeln kann, abhängig von der Anzahl der P2Y₁-Rezeptoren, die exprimiert werden (Waldo und Harden, 2004).

In Gegenwart von 10 µM ADP kommt es bei P2Y₁-Rezeptoren auf Thrombozyten sowie bei in Astrozytomazellen transfizierten P2Y₁-Rezeptoren zu einer raschen Desensibilisierung und Clathrin-abhängigen Internalisierung der Rezeptoren, die mit Hilfe des „green fluorescent protein“ (GFP) nachgewiesen werden konnte (Baurand et al., 2004).

Es wurden eine Reihe von P2Y₁-selektiven Antagonisten entwickelt, wie z.B. SB9, A3P5P, MRS2179 und MRS2279 die in Kapitel 1.1.2.2 besprochen werden. Einer der potentesten derzeit bekannten Antagonisten ist MRS2279, der mittlerweile auch als Radioligand synthetisiert wurde (Waldo et al., 2002).

Unter anderem wurde der P2Y₁-Rezeptor im Gehirn, auf Gefäßendothelzellen und in Thrombozyten gefunden (Jacobson et al., 2002).

Der P2Y₁-Rezeptor auf Thrombozyten ist wichtig für die Plättchenaktivierung (Kapitel 1.1.4.1.2).

P2Y₁-Knock-out-Mäuse zeigen keine Besonderheiten hinsichtlich Entwicklung, Lebenserwartung, Fortpflanzung oder Thrombozytenmorphologie. Auch die Anzahl der Thrombozyten entspricht der, die in Wildtypmäusen gefunden wurde. Allerdings aggregieren die Plättchen erst bei höheren ADP-Konzentrationen (Leon et al., 1999). Mäuse, die den P2Y₁-Rezeptor überexprimieren, zeigen eine verkürzte Blutungszeit und eine erhöhte Aggregationsneigung in-vivo nach Kollagen- und Epinephrininfusion (Hechler et al., 2003b). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des P2Y₁-Rezeptors bei der Hämostase und die mögliche Chance für den Einsatz eines P2Y₁-Antagonisten als Antithrombotikum.

P2Y₁-Rezeptoren spielen eine Rolle bei der glucoseabhängigen Freisetzung von Insulin aus dem Pankreas, weshalb P2Y₁-Agonisten eventuell zur Behandlung von Diabetes eingesetzt werden könnten (Williams und Jarvis, 2000).

1.1.1.2.2. P2Y₁₂-Rezeptoren

Der P2Y₁₂-Rezeptor wurde 2001 kloniert (Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2001) und erwies sich als der lange gesuchte P_{2T}-Rezeptor auf Thrombozyten. Lange Zeit wurde angenommen, dass der P2Y₁₂-Rezeptor außerhalb der Thrombozyten nur noch im Gehirn zu finden ist. Große Mengen an mRNA des P2Y₁₂-Rezeptors wurden in der Substantia nigra, im Thalamus und im temporalen Cortex nachgewiesen (Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2001). Allerdings wurde kürzlich darüber berichtet, dass der P2Y₁₂-Rezeptor in vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird (Wihlborg et al., 2004). Weiterhin kommen sie in PC12-Zellen und in C6-Gliomazellen vor (Moskvina et al., 2003; Van Kolen und Slegers, 2004).

Zwischen dem P2Y₁- und dem P2Y₁₂-Rezeptor besteht lediglich 17% Sequenzübereinstimmung (Barnard und Simon, 2001).

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist an G_{αi}-Proteine gekoppelt, was zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und dem damit verbundenen Absinken der cAMP-Konzentration führt (Barnard und Simon, 2001).

Hinsichtlich seines Desensibilisierungs- und Internalisierungsverhalten unterscheidet sich der P2Y₁₂-Rezeptor deutlich vom P2Y₁-Rezeptor. Untersuchungen mit dem an den P2Y₁₂-Rezeptor fusionierten „green fluorescent protein“ zeigten eine rasche Internalisierung einiger P2Y₁₂-Rezeptoren über einen Clathrin-unabhängigen Weg, allerdings ist der größte Teil der P2Y₁₂-Rezeptoren auch bei Dauerstimulation durch 10 μM ADP auf der Plasmamembran von Thrombozyten und Astrozytomazellen nachzuweisen. Auch bei der ADP-induzierten cAMP-Bildung ist keine Desensibilisierung zu beobachten (Baurand et al., 2004).

Analog zum P2Y₁-Rezeptor gelang es auch, den P2Y₁₂-Rezeptor nach Expression in Sf9-Insektenzellen aufzureinigen (Bodor et al., 2003). Untersuchungen an diesem gereinigten Rezeptor ergaben, dass 2-meSADP (EC₅₀: 0,6 nM) der potenteste Agonist am P2Y₁₂-Rezeptor ist. Der physiologische Agonist ADP (EC₅₀: 2,4 μM) zeigte eine um den Faktor 1000 geringere agonistische Wirkung. ADPβS stimulierte den P2Y₁₂-Rezeptor nur schwach, αβmeADP, αβmeATP und ATPβS erwiesen sich als wirkungslos. Überraschend waren die Ergebnisse von ATP. Im Gegensatz zu Untersuchungen an rekombinanten P2Y₁₂-Rezeptoren, die in Zellsystemen exprimiert wurden und eine agonistische Wirkung von ATP zeigten, erwies sich ATP als schwacher Antagonist am gereinigten P2Y₁₂-Rezeptor ohne agonistische

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Wirkung bis zu einer Konzentration von 300 μM . Darin unterscheidet sich der P2Y₁₂-Rezeptor vom P2Y₁-Rezeptor, da dort ATP partiell agonistische Wirkungen entfaltet. Es gibt eine Reihe von potenten und selektiven Antagonisten, wie z.B. die Nukleotidanaloga ARL-66096 und 2-meSAMP die unter 1.1.2.2 besprochen werden. Daneben hemmen quecksilberhaltige Substanzen wie z.B. p-Chloromercuriphenylsulfonsäure (pCMPS) den P2Y₁₂-Rezeptor irreversibel durch Interaktion mit freien SH-Gruppen von Cysteinresten ohne einen Effekt auf den P2Y₁-Rezeptor auszuüben (Ding et al., 2003).

Darüber hinaus gibt es zwei P2Y₁₂-Antagonisten, die schon seit mehreren Jahren als antithrombotische Therapeutika auf dem Markt sind, Clopidogrel und Ticlopidin. Bei den beiden Substanzen handelt es sich um Pro-Pharmaka, die erst im Körper zu den eigentlichen Wirkstoffen metabolisiert werden. Diese enthalten freie SH-Gruppen, die mit den SH-Gruppen des P2Y₁₂-Rezeptors Disulfidbrücken ausbilden und somit den Rezeptor irreversibel hemmen (Savi et al., 2000; Savi et al., 2001; Dogne et al., 2002).

P2Y₁₂-knock-out-Mäuse zeigen außer einer verlängerten Blutungszeit und einer reduzierten Aggregation keine Besonderheiten (Foster et al., 2001).

1.1.2. P2-Rezeptor-Liganden

Eine große Herausforderung auf dem Feld der P2-Forschung ist die Entwicklung von potenten Liganden, die selektiv für die einzelnen Rezeptorsubtypen sind.

1.1.2.1. Agonisten und Nukleotidmetabolismus

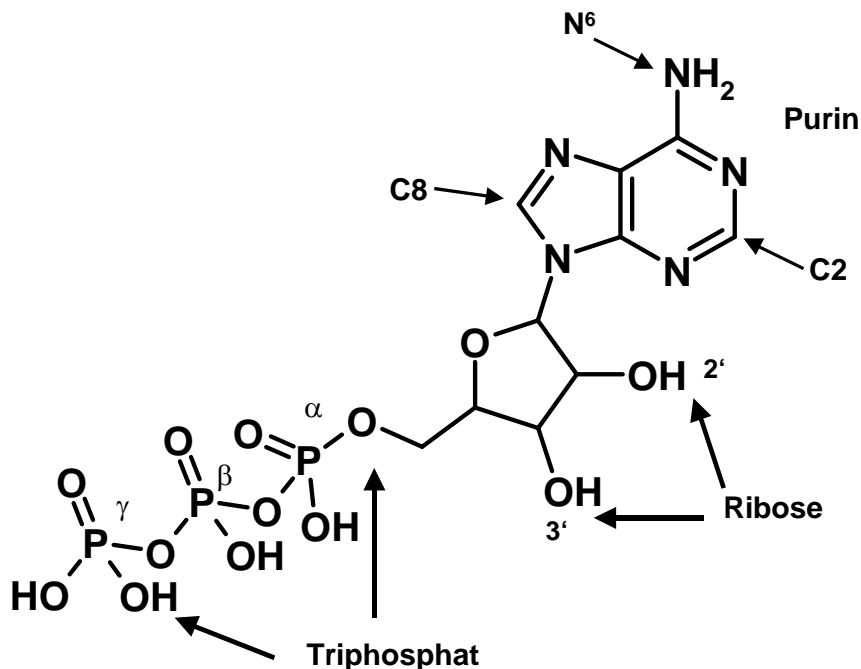


Abbildung 1.4: Strukturformel von ATP und Variationsmöglichkeiten.

Die Pfeile kennzeichnen die Teile des Moleküls, an denen strukturelle Variationen durchgeführt wurden. Abbildung modifiziert nach Lambrecht (2000).

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von potenten, metabolisch stabilen Agonisten entwickelt. Mit Ausnahme einer Reihe von Theobromin- und Theophyllinanaloga (Fischer et al., 1999) handelt es sich um Strukturabwandlungen des Leitmoleküls ATP (Abbildung 1.4).

Die physiologischen Agonisten der P2-Rezeptoren wie ATP, ADP, UTP, UDP und eine Reihe von Diadenosinpolyphosphaten werden in Geweben rasch inaktiviert, um die Aktivierung der P2-Rezeptoren zu beenden. Die Nukleotide werden durch eine extrazelluläre Hydrolysekaskade abgebaut, wobei Nucleoside und anorganisches Phosphat gebildet werden. Adenosin wiederum ist der physiologische Agonist für die P1-Rezeptoren, die oft andere Effekte als die P2-Rezeptoren vermitteln.

Es sind eine Reihe von Ekto-Nukleotidasen bekannt, wie Ekto-Nucleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDase-Familie), Ekto-Nucleotid-Pyrophosphatasen / Phosphodiesterasen (E-NPP-Familie), alkalische Phosphatasen und Ekto-5'-Nucleotidasen, die in sehr vielen Geweben anzutreffen sind (Zimmermann, 2000). Bei den Ekto-Nucleotidasen handelt es sich um membranständige Enzyme, deren katalytisches Zentrum sich auf der extrazellulären Seite befindet. Allerdings gibt es

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

einige lösliche extrazellulär vorkommende Isoformen, die man als „Exonukleotidasen“ bezeichnen müsste. Die Aktivität der Enzyme ist abhängig von der Anwesenheit von divalenten Kationen wie Magnesium oder Calcium.

ENTPDase-Familie

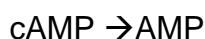
Zur Zeit sind sieben Mitglieder dieser Familie bekannt (Zimmermann, 2000; Bigonnesse et al., 2004), die alle 5 konservierte Sequenzdomänen besitzen („apyrase conserved regions“).

Diese Enzyme spalten Nukleosid-5'-triphosphate (NTP) und Nukleosid-5'-diphosphate (NDP) zu Nukleosid-5'-monophosphaten (NMP), allerdings mit unterschiedlicher Substratspezifität.



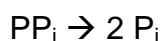
E-NPP-Familie

Die E-NPP- und die ENTPDase-Familie zeigen phylogenetische Verwandtschaft. Es handelt sich um Membranproteine vom Typ II, die eine einzelne Transmembrandomäne aufweisen, wobei sich der N-Terminus intrazellulär befindet. Die Mitglieder dieser Familie besitzen ein extrem breites Substratspektrum, da sie die Eigenschaften von alkalischer Phosphodiesterase und Nukleotidpyrophosphatase zeigen (Zimmermann, 2000).



Alkalische Phosphatasen

Es handelt sich hierbei um unspezifische Ekto-Phosphomonoesterasen mit einem breiten Substratspektrum. Ein einzelnes Enzym kann somit die Hydrolyse eines Nukleosidtriphosphats zum Nukleosid katalysieren (Zimmermann, 2000).



EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Ekto-5'-nukleotidasen

Diese Enzyme katalysieren den letzten Schritt des extrazellulären Nukleotidabbaus vom Nukleotid-5'-monophosphat zum Nukleosid.

Im folgenden sollen nun die beiden metabolisch stabilen Agonisten $\alpha\beta$ meATP und ADP β S (Abbildung 1.5) vorgestellt werden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. EC₅₀-Werte für diese beiden Substanzen, sowie für ATP und ADP sind in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

$\alpha\beta$ meATP

Elektrophysiologische Untersuchungen an rekombinanten P2X-Rezeptoren haben gezeigt, dass es sich bei $\alpha\beta$ meATP um einen potenten Agonisten für P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren sowie für heteromere P2X_{2/3}- und P2X_{1/5}-Rezeptoren handelt (EC₅₀ \approx 1 μ M; Dunn et al., 2001). An homomeren P2X₂- und P2X₄₋₇- sowie am heteromeren P2X_{4/6}-Rezeptor ist $\alpha\beta$ meATP ein schwacher partieller Agonist (EC₅₀ > 10 μ M) oder inaktiv. Am P2X₄-Rezeptor sind deutliche Speziesunterschiede bei der Ansprechbarkeit auf $\alpha\beta$ meATP festzustellen. Am humanen und am Maus-P2X₄-Rezeptor zeigt die Substanz partiell agonistische Eigenschaften mit EC₅₀-Werten um 10 μ M. Am P2X₄-Rezeptor der Ratte verhält sich $\alpha\beta$ meATP dagegen als Antagonist mit einem IC₅₀-Wert von 4,6 μ M. Untersuchungen an den entsprechenden P2X-Rezeptoren in nativem Gewebe bestätigten die Ergebnisse, die an rekombinanten Rezeptoren gewonnen wurden (Lambrecht, 2000). Am P2Y₁- und am P2Y₁₂-Rezeptor erwies sich $\alpha\beta$ meATP als vollkommen wirkungslos (siehe Tabelle 1.1).

Im Gegensatz zu ATP ist $\alpha\beta$ meATP aufgrund der nicht hydrolysierbaren Methylengruppe stabil gegenüber enzymatischem Abbau (Humphrey et al., 1995; Kennedy und Leff, 1995) und ist somit sehr gut geeignet um P2X-Rezeptoren im nativen Gewebe zu identifizieren.

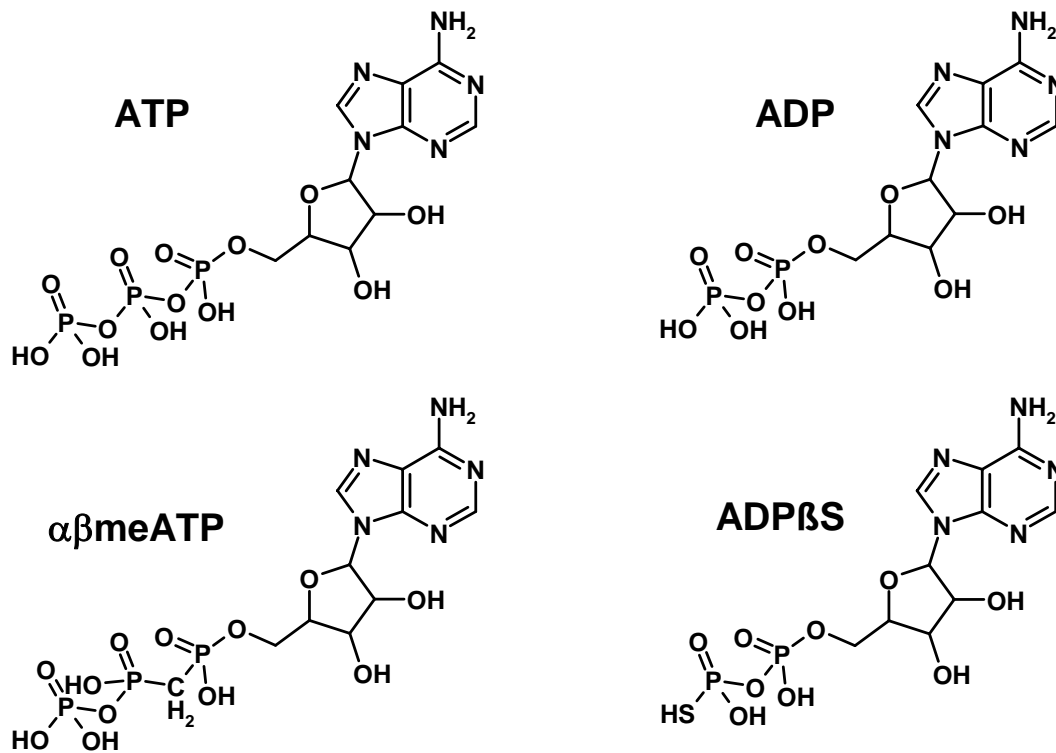


Abbildung 1.5: Strukturformeln von Nukleotid-Agonisten.

ADP β S

ADP β S ist ein potenter Agonist an P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren mit einem EC₅₀-Wert um 0,1 μM . Am P2X₁- und P2X₃-Rezeptor weist ADP β S einen EC₅₀-Wert zwischen 1 und 10 μM und am P2X₂-, P2X₄- und P2Y₁₁-Rezeptor zwischen 10 und 100 μM auf (siehe Tabelle 1.1).

Durch die Thiosubstitution an der terminalen Phosphatgruppe ist ADP β S stabil gegenüber enzymatischem Abbau (Jacobson et al., 2002), wodurch die Substanz sehr gut für Untersuchungen im nativen Gewebe geeignet ist.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Tabelle 1.1: EC₅₀-Werte (in nM) von Agonisten an rekombinanten humanen oder Ratten-P2X- und P2Y-Rezeptoren exprimiert in Xenopus-Oozyten (North und Surprenant, 2000; Jacobson et al., 2002; Abbraccio et al. 2003; Marteau et al., 2003; Ganso, 2004

Rezeptor	ATP	ADP	ADPβS	αβmeATP
P2X ₁	56	10.000	2.500	200
P2X ₂	1.400	> 100.000	100.000	100.000
P2X ₃	340	> 100.000	8.800	740
P2X ₄	500	28.000	25.000	33.000
P2X ₅	1000	18.000		> 7.000
P2X ₆	1.000	11.000		> 8.000
P2X ₇	780.000	>> 300.000		> 100.000
P2Y ₁	2.800	8.000	96	> 100.000
P2Y ₂	230	> 100.000		n.s.r.
P2Y ₄	43.000	n.s.r.		
P2Y ₆	> 100.000			
P2Y ₁₁	17.000		30.000	
P2Y ₁₂	3.190	69	82	> 100.000
P2Y ₁₃	4289	308	1871	
P2Y ₁₄	n.s.r.	n.s.r.		

n.s.r.: no significant response

1.1.2.2. Antagonisten

Selektive Antagonisten sind besser als Agonisten dazu geeignet, P2-Rezeptorsubtypen zu identifizieren. Obwohl in den letzten Jahren einige Fortschritte in der Entwicklung von potenten und selektiven P2-Antagonisten erzielt wurden, ist der Einsatz vieler Substanzen aufgrund der Kinetik des Antagonismus, ihrer Rezeptoraffinität, Subtypselektivität oder P2-Rezeptorspezifität limitiert. Einige Substanzen erwiesen sich auch als Substrate oder Inhibitoren von Ekto-Nukleotidasen, was ihren Einsatz zusätzlich erschwert (Fagura et al., 2000). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen bekannten P2-Antagonisten sind

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

kaum zu erkennen, weshalb pharmakophore Molekülfragmente für die Bindung von Antagonisten an P2-Rezeptoren schwer zu identifizieren sind. Prinzipiell müsste jeder P2-Antagonist im Hinblick auf seine Aktivität an Ekto-Nukleotidasen, seine P2-Rezeptorspezifität und seine Selektivität gegenüber allen bekannten Subtypen der P2X- und P2Y-Rezeptoren untersucht werden. Leider erfolgte dies bis jetzt nur für Suramin und PPADS (Lambrecht et al., 2002).

PPADS und Analoga

Bei dem vom Pyridoxal-5-phosphat abgeleiteten **PPADS** (Abbildung 1.6) handelt es sich um einen der ersten spezifischen Antagonisten für P2-Rezeptoren (Lambrecht et al., 1992). PPADS wurde an einer Reihe von Geweben und Zellen untersucht, wie zum Beispiel glatter Muskulatur, Epithelzellen und Neuronen, wie auch an rekombinanten P2X- und P2Y-Rezeptoren. Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass PPADS ein selektiver Antagonist für native P2X₁-Rezeptoren wäre, weiss man heute, dass es sich um einen nichtselektiven aber um keinen universellen P2-Antagonisten handelt, der eine gewisse Präferenz für den P2X₁-Rezeptor aufweist (Lambrecht et al., 2002). PPADS hemmt die Aktivierung von rekombinanten homomeren P2X₁-, P2X₂-, P2X₃- und P2X₅-Rezeptoren sowie von heteromeren P2X_{2/3}- und P2X_{1/5}-Rezeptoren (IC₅₀ = 0,1 – 5 µM) und P2Y₁-Rezeptoren (pA₂-Wert ca. 6,0) mit vergleichbarer Wirkstärke, ist aber nur schwach antagonistisch wirksam (IC₅₀ ≥ 10 µM) an homomeren P2X₄-, P2X₆- und P2X₇-Rezeptoren, am heteromeren P2X_{4/6}-Rezeptor und an P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆-, P2Y₁₁-, P2Y₁₂- und P2Y₁₃-Rezeptoren (Lambrecht et al., 2002; Marteau et al., 2003). Die P2-Rezeptorspezifität von PPADS ist sehr hoch. Bis 100 µM wurde keine Interaktion mit den adrenergen α₁- und α₂-, histaminergen H₁-, muskarinergen M₁-, M₂- oder M₃-Rezeptoren beobachtet. PPADS wird nicht von Ekto-Nukleotidasen abgebaut und hemmt diese nur in geringem Maße (Lambrecht et al., 2002). In Konzentrationen von 1 – 10 µM werden die PPADS-sensitiven P2-Rezeptoren blockiert ohne nennenswerte Hemmung der Ekto-Nukleotidasen.

Die Synthesestufe von PPADS, das Pyridoxal-5-phosphat, ist ein nichtselektiver Antagonist für native und rekombinante P2X- und P2Y-Rezeptoren mit einer um den Faktor 10 geringeren Wirkstärke als PPADS (Lambrecht, 1996).

Die Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats ist essentiell für die P2-antagonistische Wirkung, da dihydro-PPADS vollkommen wirkungslos ist (Lambrecht et al., 2002).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Um die antagonistische Wirkstärke und die Selektivität von PPADS zu erhöhen, wurden eine Reihe von Strukturmodifikationen vorgenommen und die Substanzen an nativen und rekombinanten P2-Rezeptoren untersucht (Lambrecht et al., 2002).

Eine Erhöhung der P2X₁-antagonistischen Wirkung wurde mit dem Naphthylazo-Derivat **PPNDS** (Abbildung 1.6) erreicht, was sich als 6 – 7-fach potenter als PPADS an nativen P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens (pK_B: 7,43) und an in *Xenopus-Oozyten* exprimierten rekombinanten P2X₁-Rezeptoren der Ratte (pK_B: 7,84) erwies. Im Gegensatz zu PPADS zeigt PPNDS eine deutlich stärkere Wirkung (20-fach) am P2X₁-Rezeptor der Ratte als am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchens (Lambrecht et al., 2000b).

Eine weitere Strukturabwandlung des PPADS stellt **MR2159** (Abbildung 1.6) dar, bei dem die beiden Sulfonsäuregruppen durch eine para-ständige Carbonsäuregruppe ersetzt wurden. MRS2159 erwies sich mit einem pIC₅₀-Wert von 8,0 als nahezu äquipotent am rekombinanten P2X₁-Rezeptor der Ratte im Vergleich zu PPNDS, wohingegen die Wirkstärke am P2Y₁-Rezeptor von Truthahnerythrozyten mit einem pIC₅₀-Wert von ca. 4,0 schwächer ist (Kim et al., 2001).

Durch Verknüpfung von Pyridoxal-5-phosphat mit einem Suraminmonomer erhält man das Heterodimer **SB9** (Abbildung 1.6). Das Suraminmonomer alleine erwies sich als wirkungslos (Lambrecht et al., 2002). Im Gegensatz zu PPNDS und MRS2159 zeigt SB9 eine 10-fach größere Wirkstärke am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (pA₂-Wert = 6,98) als am P2X₁-Rezeptor der Ratte (pA₂-Wert = 6,05), was die Substanz einmalig in der Gruppe der PPADS-Analoga macht (Lambrecht et al., 2000a). Mit einem pA₂-Wert von rund 7 ist SB9 an nativen P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum potenter als der P2Y₁-Standardantagonist MRS2179 (Horner et al., 2002). An Ekto-Nukleotidasen von *Xenopus-Oozyten* erwies sich SB9 mit einem pIC₅₀-Wert von 4,3 als schwacher Inhibitor (Lambrecht et al., 2000a).

Aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften der PPADS-Analoga als P2-Antagonisten wurden im Rahmen dieser Dissertation ausgedehnte Studien solcher Substanzen an nativen Rezeptoren glattmuskulärer Organe und humaner Thrombozyten durchgeführt.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

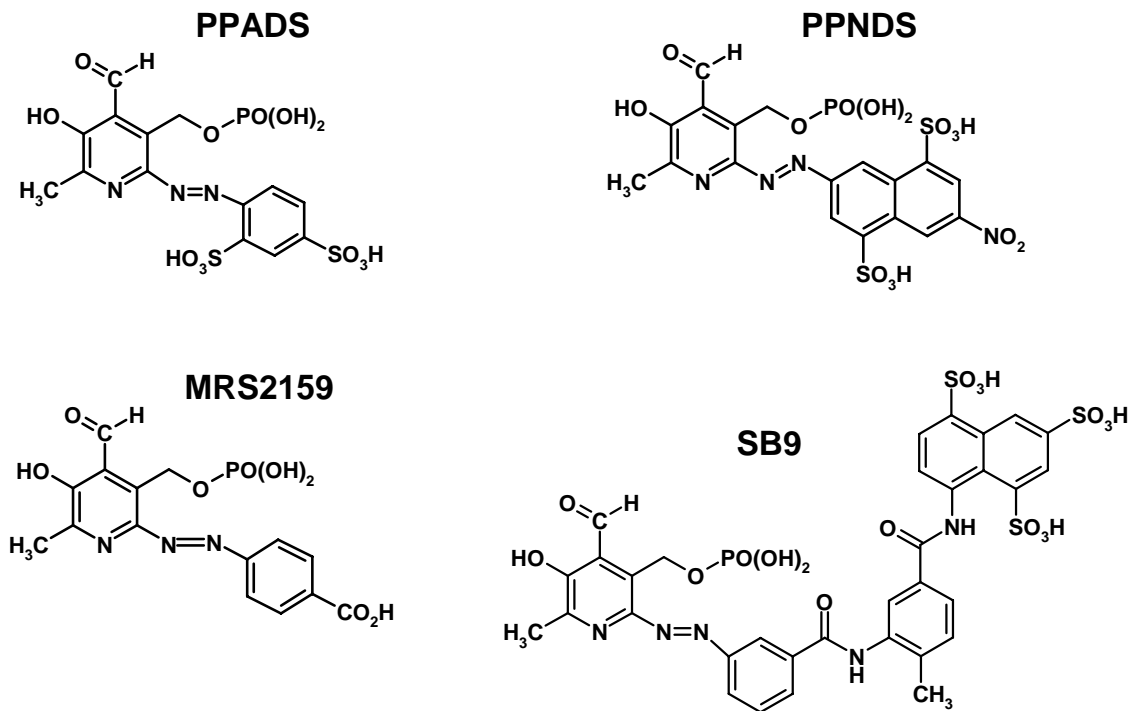


Abbildung 1.6: Strukturformeln von PPADS und -Analoga.

Suramin und -Analoga

Bei **Suramin** (Abbildung 1.7) handelt es sich um eine sehr alte Substanz, die schon seit 1922 bekannt ist und ursprünglich für die Behandlung der Schlafkrankheit und gegen Filarien eingesetzt wurde. Später gewann Suramin als potentielles Mittel gegen die Infektion mit HIV bzw. Hepatitis-B-Viren und gegen Karzinome klinisches Interesse (Lambrecht et al., 2002). Suramin weist eine extrem lange Plasma-Halbwertszeit (44 - 92 Tage) und eine hohe Bindungsaffinität zu humanem Serumalbumin und Bindegewebe auf. Die Bindung erfolgt möglicherweise über Proteoglykane (Chijioke et al., 1998; McNally et al., 2000). Weiterhin interagiert Suramin mit einer ganzen Reihe von Proteinen wie Interleukin-, Glutamat-, Nikotin-, Serotonin- und GABA-Rezeptoren, verschiedene Proteasen, Na^+/K^+ -ATPasen, Ektokleotidasen, G-proteingekoppelten Rezeptorkinasen, G-Proteinuntereinheiten und reverser Transkriptase, im Konzentrationsbereich, der für eine Blockade von P2-Rezeptoren benötigt wird (Lambrecht et al., 2002). Bei Suramin und seinen Analoga handelt es sich um hochpolare Strukturen, die die Zellmembran nicht überwinden können, weshalb eine Interaktion der Substanzen mit G-Proteinen im nativen Gewebe und in intakten isolierten Zellen unwahrscheinlich ist.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Diese pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von Suramin zeigen die begrenzte Einsetzbarkeit dieser Substanz zur Charakterisierung von P2-Rezeptoren auf.

Dunn und Blakely (1988) zeigten zum ersten Mal, dass Suramin P2X₁-ähnliche Rezeptoren hemmt. Zahlreiche weitere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei Suramin um einen nichtselektiven Antagonisten an nativen P2X- und P2Y-Rezeptoren mit relativ geringer Wirkstärke (pA₂-Wert ca. 5 – 5,5) und einem nichtkompetitiven Mechanismus handelt. Auch an rekombinanten Rezeptoren erweist sich Suramin als nichtselektiver Antagonist. So inhibiert es homomere P2X₁-, P2X₂-, P2X₃- und P2X₅-Rezeptoren, heteromere P2X_{2/3}- und P2X_{1/5}-Rezeptoren (IC₅₀: 1 – 15 µM) sowie P2Y₁-, P2Y₁₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren (pA₂-Werte: 5,4 – 6) mit vergleichbarer Wirkstärke, ist aber nur schwach wirksam an homomeren P2X₄-, P2X₆- und P2X₇-Rezeptoren, heteromeren P2X_{4/6}-Rezeptoren sowie an P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren (Lambrecht et al., 2002).

Durch gezielte Struktur-Wirkungs-Analysen konnten selektive und potente Antagonisten entwickelt werden. Durch Verkürzung der Benzoyl-Harnstoffbrücke zwischen den Naphthalinringen von Suramin erhielt man die sogenannten „kleinen Harnstoffe“. Ein Vertreter dieser Gruppe ist **NF023** (Abbildung 1.7), das sich als spezifischer P2-Antagonist mit P2X₁-Selektivität in glattmuskulären Präparationen (pA₂-Wert: 5,5 – 6,0; Lambrecht et al., 2002) erwies. Am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum war NF023 deutlich schwächer wirksam (pA₂: 4,45; Lambrecht et al., 1999). Diese P2X₁-versus P2X₃-Selektivität bestätigte sich auch bei Untersuchungen an rekombinanten, in *Xenopus-Oozyten* exprimierten Rezeptoren, wo am P2X₁-Rezeptor der Ratte und des Menschen IC₅₀-Werte von 0,24 bzw. 0,21 µM gefunden wurden im Vergleich zu IC₅₀-Werten an P2X₃-Rezeptoren von 8,5 µM (Ratte) und 28,9 µM (Mensch) (Soto et al., 1999). Am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum erzielte NF023 einen pA₂-Wert von 4,74 (Lambrecht et al., 2002). Wie die Muttersubstanz Suramin hemmt auch NF023 Ekto-Nukleotidasen, wobei die Hemmung der P2X₁-Rezeptoren bei deutlich geringeren Konzentrationen erfolgt (Lambrecht et al., 2002).

Ausgehend von Suramin wurden weitere Strukturabwandlungen durchgeführt. Durch Veränderung des Verknüpfungsmusters der Phenylringe von der meta- zur para-Stellung erhielt man die 2. Generation der Suraminanaloga. Ein Vertreter dieser Klasse ist **NF279** (Abbildung 1.7), das im Vergleich zu seinen Vorgängern Suramin

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

und NF023 eine höhere P2X₁-Selektivität aufweist. Verglichen mit NF023 wurde die Wirkstärke am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (pIC₅₀-Wert = 5,71; Damer et al., 1998) um den Faktor 6 gesteigert. An rekombinanten Rezeptoren exprimiert in *Xenopus-Oozyten* erwies sich NF279 als hochpotenter P2X₁-selektiver Antagonist (IC₅₀ = 0,02 µM). Es wurde folgendes Rezeptorprofil gefunden: P2X₁ > P2X₂ ≥ P2X₃ ≥ P2X₇ >> P2X₄ (Rettinger et al., 2000; Klapperstück et al., 2000).

Am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum zeigte sich NF279 als schwacher Antagonist (pA₂-Wert = 4,97), was in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen an rekombinanten P2Y₁-Rezeptoren (pIC₅₀: 4,6) steht. An rekombinanten P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren war NF279 bis zu einer Konzentration von 100 µM wirkungslos (Lambrecht et al., 2002).

Der nächste Schritt bei der Entwicklung von potenten und subtypselektiven Antagonisten bestand in der Synthese von tetravalenten Verbindungen, den sogenannten „Schmetterlingsverbindungen“, die zusätzliche Sulfonsäuregruppen enthalten, die mit dem Rezeptor interagieren können. Die Substanz **NF449** (Abbildung 1.7) ist der potenteste Antagonist des P2X₁-Rezeptors im Ratten-Vas-deferens, der zur Zeit zur Verfügung steht (pA₂-Wert: 7,15; Braun et al., 2001). gegenüber NF023 konnte eine Steigerung der Affinität am P2X₁-Rezeptor um den Faktor 40 erzielt werden. Am P2X₃-Rezeptor (pIC₅₀: 5,04) und am P2Y₁-Rezeptor (pIC₅₀: 4,85) des Meerschweinchen-Ileum, sowie am P2Y₂-Rezeptor (pIC₅₀: 4,47) und am P2Y₁₁-Rezeptor (pIC₅₀: < 4) in HEK-293-Zellen erwies sich NF449 als schwacher Antagonist (Braun et al., 2001; Kassack et al., 2004).

Untersuchungen an rekombinanten Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus-Oozyten* ergaben eine extrem hohe Affinität für den P2X₁-Rezeptor der Ratte (pIC₅₀: 9,54; Braun et al., 2001) und des Menschen (pA₂: 10,7, Hülsmann et al., 2003).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

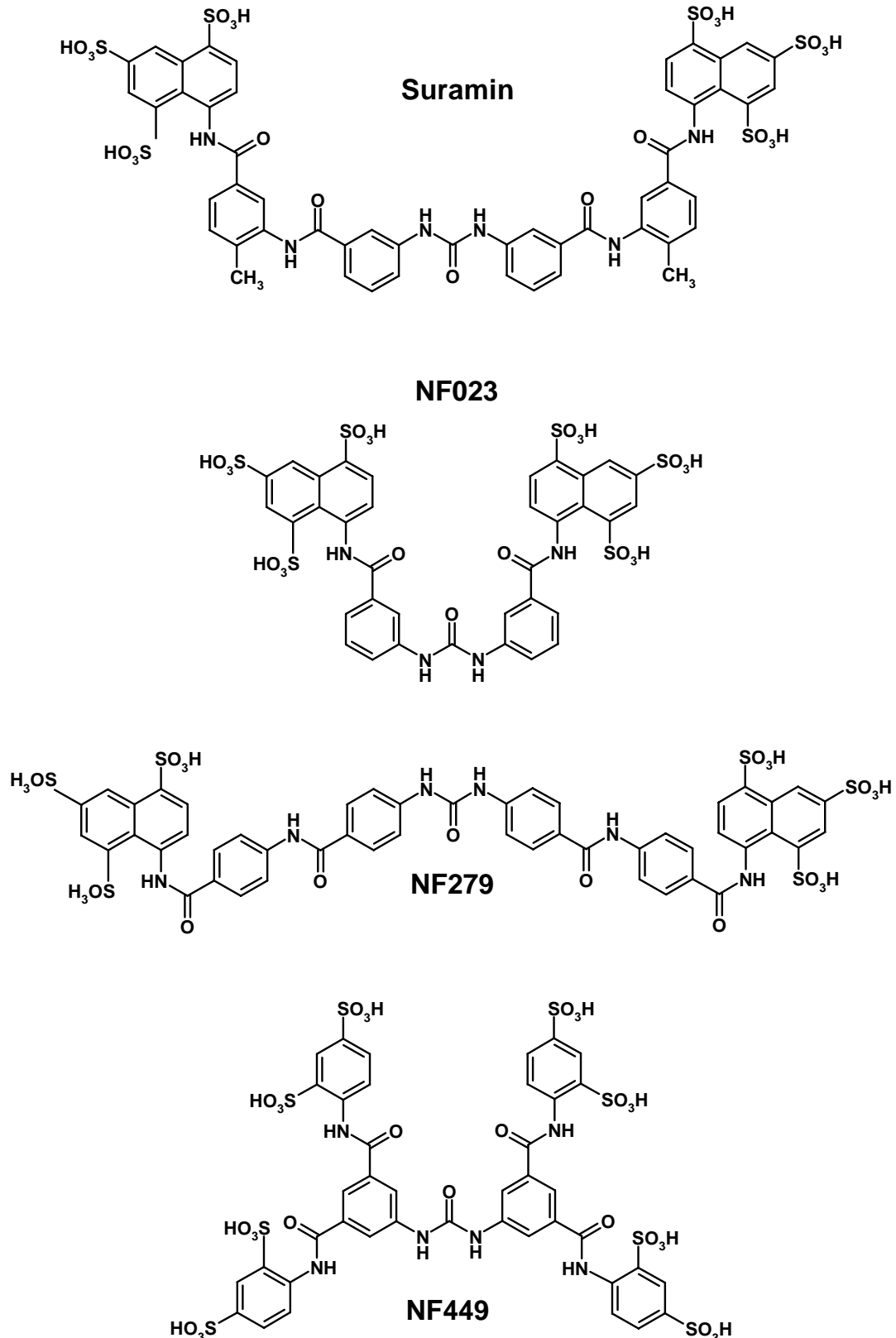


Abbildung 1.7: Strukturformeln von Suramin und –Analoga.

Am rekombinanten P2X₃-Rezeptor der Ratte (pIC₅₀: ~5,6; Braun et al., 2001) weist NF449 eine ähnliche Affinität wie am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

auf. Die Untersuchungen an rekombinanten Rezeptoren ergaben somit eine fast 10.000-fache P2X₁-versus P2X₃-Selektivität. Es handelt sich also bei NF449 um einen hochpotenten und subtypselektiven Antagonisten des P2X₁-Rezeptors.

Aufgrund der sehr vielversprechenden Eigenschaften der Suraminanaloga wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausführliche Untersuchungen von unterschiedlichen Analoga an humanen Thrombozyten durchgeführt.

Nukleotidanaloga

Seit langer Zeit werden Nukleotidanaloga zur Hemmung ATP-induzierter Effekte eingesetzt. So kann z. B. der Agonist $\alpha\beta$ meATP (Kapitel 1.1.2.1) zur Hemmung P2X-vermittelter Effekte durch Desensibilisierung verwendet werden. Andere Nukleotidanaloga antagonisieren die P2-Rezeptoren in kompetitiver Weise.

Eine Reihe von ATP-Analoga wurden entwickelt, die potent den P2Y₁₂-Rezeptor blockieren (Kunapuli et al., 2003). Die Substanz **ARL-66096** (AR-C66096, FPL66096 (Abbildung 1.8)) zeigte sich an humanen Thrombozyten als selektiver und potenter P2Y₁₂-Antagonist ($K_i = 1,8 \text{ nM}$) und als partieller Agonist an P2Y₁-Rezeptoren ($K_i = 0,9 \text{ }\mu\text{M}$) (Baurand et al., 2000). In Untersuchungen an Thrombozyten von Mäusen war bis zu einer Konzentration von 300 nM ARL-66096 kein Einfluss auf den ADP-induzierten „shape change“ zu erkennen (Kim et al., 1999).

Auch bei **2-meSAMP** (Abbildung 1.8) handelt es sich um ein Nukleotidanalogen mit inhibitorischen Eigenschaften am P2Y₁₂-Rezeptor. Messungen der cAMP-Spiegel ergab einen IC₅₀-Wert von 0,57 μM für die Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors. Auf den ADP-induzierten „shape change“ hat die Substanz keinen Einfluss (Jantzen et al., 1999). Zu ähnlichen Befunden kam auch die Arbeitsgruppe um Kubista (Kubista et al., 2003), die einen pA₂-Wert von 6,1 für 2-meSAMP am P2Y₁₂-Rezeptor von PC12-Zellen ermittelte. Für die Hemmung der P2Y₁-vermittelten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wurde für 2-meSAMP ein IC₅₀-Wert $> 100 \text{ }\mu\text{M}$ ermittelt (Takasaki et al., 2001). Es handelt sich somit bei 2-meSAMP um einen selektiven P2Y₁₂-Antagonisten, der keinen Einfluss auf den P2Y₁-Rezeptor ausübt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde 2-meSAMP als Referenzsubstanz für Untersuchungen an humanen Thrombozyten verwendet.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

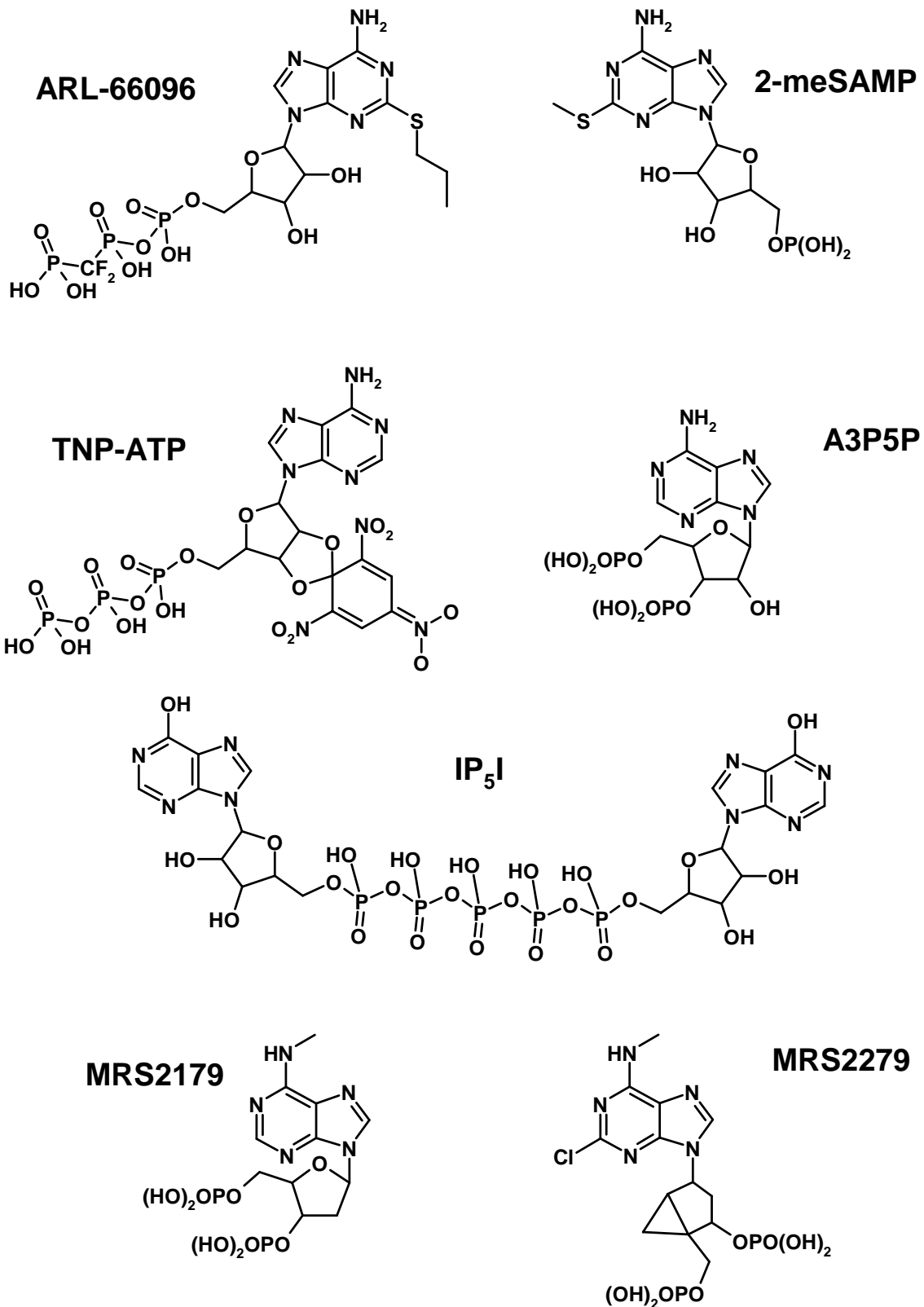


Abbildung 1.8: Strukturformel von nukleotidischen P₂-Antagonisten.

Andere ATP-Analoga weisen eine Selektivität für die P₂X₁- bzw. P₂X₃-Rezeptoren auf. So hemmt Trinitrophenyl-ATP (**TNP-ATP**; Abbildung 1.8) rekombinante P₂X₁-,

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

P2X₃- und P2X_{2/3}-Rezeptoren im nanomolaren Konzentrationsbereich (Virginio et al., 1998). Allerdings wird TNP-ATP von Ekto-Nukleotidasen abgebaut, was ein Grund für die wesentlich geringere Aktivität in nativem Gewebe sein könnte (Lewis et al., 1998). An rekombinanten P2X₂-, P2X₄-, P2X₇- und P2X_{1/5}-Rezeptoren erwies sich TNP als schwacher Antagonist (Virginio et al., 1998; Haines et al., 1999).

Bei dem Inositolpolyphosphat **IP₅I** (Abbildung 1.8) handelt es sich um einen potenten und selektiven P2X₁-Antagonisten (IC₅₀ = 3 nM), der den P2X₃-Rezeptor erst mit rund 1000-fach höheren Konzentrationen hemmt und wirkungslos am P2X₂-Rezeptor ist. Am P2X₄-Rezeptor wird die Wirkung von Agonisten reversibel potenziert. In nativem Gewebe wird der Einsatz von IP₅I durch seine Instabilität gegenüber Ekto-Nukleotidasen limitiert (Lambrecht, 2000; Jacobson et al., 2002).

Das natürlich vorkommende Bisphosphonat **A3P5P** (Abbildung 1.8) zeigte sich als selektiver und kompetitiver Antagonist am rekombinanten humanen P2Y₁-Rezeptor (pK_B: 6,05; Boyer et al., 1996).

Darauf aufbauend wurde durch Einführung einer N⁶-Methylierung der kompetitive Antagonist **MRS2179** (Abbildung 1.8) entwickelt, der im Vergleich zu A3P5P eine höhere Wirkstärke am P2Y₁-Rezeptor entfaltet. Messungen am P2Y₁-Rezeptor von Truthahnerythrozyten ergaben einen pK_B-Wert von 6,99. An den humanen P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren sowie am P2Y₆-Rezeptor der Ratte erwies sich MRS2179 als inaktiv (Boyer et al., 1998). Auch der P2Y₁₂-Rezeptor wird durch MRS2179 nicht beeinflusst (Baurand et al., 2001). Allerdings erwies sich MRS2179 als Antagonist an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren der Ratte, die mit einem IC₅₀-Wert um 1 µM gehemmt wurden (Brown et al., 2000). Ersetzt man die Methylgruppe am N⁶-Atom von MRS2179 durch eine Propylgruppe, so werden die antagonistischen Eigenschaften am P2Y₁-Rezeptor aufgehoben. Daraus kann man schließen, dass die N⁶-Bindungsregion im P2Y₁-Rezeptor eine kleine hydrophobe Tasche enthält (Jacobson et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen mit MRS2179 an glattmuskulären Organen durchgeführt, um Aufschlüsse über die Verwendbarkeit von MRS2179 in nativem Gewebe zu erhalten.

Durch Einführung eines Cyclopropylrestes in den Purinring bei der Substanz **MRS2279** (Abbildung 1.8) wird die Flexibilität des Moleküls eingeschränkt, was zu einer gesteigerten antagonistischen Wirkung führt (Jacobson et al., 2002). MRS2279 erwies sich als potenter Antagonist am rekombinanten humanen P2Y₁-Rezeptor (pK_B-Wert: 8,10; Boyer et al., 2002), mit einer um den Faktor 100 bzw. den Faktor 10

höheren Affinität am P2Y₁-Rezeptor als A3P5P bzw. MRS2179. Kürzlich wurde [³H]MRS2279 als Radioligand entwickelt (Waldo et al., 2002). P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆-, P2Y₁₁- und P2Y₁₂-vermittelte Effekte werden durch MRS2279 nicht gehemmt. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob MRS2279 einen antagonistischen Einfluss auf P2X-Rezeptoren zeigt.

Aufgrund der umfassenden Charakterisierung ihrer Eigenschaften an Thrombozyten wurden A3P5P und MRS2179 in dieser Arbeit als Referenzsubstanzen für die Untersuchungen an humanen Thrombozyten verwendet.

1.1.3. Glattmuskuläre Organe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an glattmuskulären Organen durchgeführt. Dabei diente das Ratten-Vas-deferens als Modell für den P2X₁-Rezeptor und das Meerschweinchen-Ileum als Modell für den P2X₃- und den P2Y₁-Rezeptor (Abbildung 1.9).

1.1.3.1. Das Ratten-Vas-deferens als Modell für den P2X₁-Rezeptor

Es gibt sehr eindeutige Hinweise dafür, dass es sich bei der durch Applikation von $\alpha\beta$ meATP ausgelösten Kontraktion des Samenleiters der Ratte um einen P2X₁-vermittelten Effekt handelt. Zum einen wurde der P2X₁-Rezeptor aus dem Ratten-Vas-deferens kloniert (Valera et al., 1994), und weiterhin entspricht die Reihenfolge der agonistischen Wirkung von $\alpha\beta$ meATP > $\beta\gamma$ meATP > ATP γ S > ADP β S der an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren gefundenen Hierarchie (Menke, 2003). Die Reihenfolge der Wirkstärke von Antagonisten gegen die $\alpha\beta$ meATP-vermittelte Kontraktion des Ratten-Vas-deferens korreliert außerdem recht gut mit den an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren ermittelten Hemmwerten (siehe Tabelle 1.2).

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Tabelle 1.2: pIC_{50} -Werte von Standardantagonisten, ermittelt am Ratten-Vas-deferens (RVD) und an rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptoren (r $P2X_1$) exprimiert in *Xenopus*-Oozyten.

Antagonist	pIC_{50} (RVD) ¹⁾	pIC_{50} (r $P2X_1$) ²⁾
Suramin	4,68 ^{a)}	> 5,0 ^{c)}
NF023	4,93 ^{a)}	6,6 ^{c)}
NF279	5,72 ^{a)}	7,7 ^{c)}
NF449	6,31 ^{e)}	9,6 ^{e)}
PPADS	5,36 ^{b)}	7,0 ^{d)}

¹⁾ Hemmung der durch 10 μ M $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktion des Ratten-Vas-deferens.

²⁾ Hemmung der durch 1 μ M ATP vermittelten Einwärtsströme in *Xenopus*-Oozyten, die rekombinante $P2X_1$ -Rezeptoren exprimieren.

^{a)} Lambrecht et al., 1999

^{b)} Lambrecht et al., 2000a

^{c)} Lambrecht, 2000

^{d)} Lambrecht et al., 2002

^{e)} Braun et al., 2001

Immunohistochemische Befunde sprechen für eine hohe Dichte von $P2X_1$ -Rezeptoren in glatten Muskelzellen des Ratten-Vas-deferens (Lee et al., 2000). Außerdem wurde festgestellt, dass $\alpha\beta$ meATP am Samenleiter von $P2X_1$ -Knock-out-Mäusen keine Kontraktion mehr hervorruft (Mulryan et al., 2000).

Alle diese Befunde lassen darauf schließen, dass die $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens ein geeignetes Modell für den $P2X_1$ -Rezeptor darstellen. Ob es sich allerdings um einen homomeren $P2X_1$ -Rezeptor handelt, muss noch geklärt werden.

1.1.3.2. Das Meerschweinchen-Ileum als Modell für den $P2X_3$ -Rezeptor

Bereits 1988 wurde festgestellt, dass die Applikation von $\alpha\beta$ meATP zu einer Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum führt (Wiklund und Gustafsson, 1988). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass sich ein $P2X$ -ähnlicher Rezeptor auf cholinergen Neuronen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum befinden (Kennedy und Humphrey, 1994). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass sich die $\alpha\beta$ meATP-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum durch die Zugabe des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin hemmen lassen, woraus geschlossen werden kann, dass es sich um einen neuronalen $P2X$ -Rezeptor handelt. Auch die Zugabe des Muskarinrezeptorantagonisten Atropin hemmte die

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

P2X-vermittelten Kontraktionen, was bedeutet, dass der P2X-Rezeptor seine Wirkung über die Freisetzung von Acetylcholin, das an postsynaptische Muskarinrezeptoren vom M3-Typ bindet, entfaltet (Czeche, 2001; Abbildung 1.9).

Mit Hilfe von immunochemischen Untersuchungen konnten P2X₃-Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum nachgewiesen werden (Nassauw et al., 2002).

Auch die Reihenfolge der antagonistischen Potenz verschiedener Standardantagonisten gegen die $\alpha\beta$ meATP-vermittelte Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum korreliert recht gut mit der an rekombinanten P2X₃-Rezeptoren gefundenen Hemmung (siehe Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: pA_2 - und pIC_{50} -Werte von Standardantagonisten ermittelt am Meerschweinchen-Ileum (GPI) und an rekombinanten P2X₃-Rezeptoren (rP2X₃) exprimiert in *Xenopus*-Oozyten.

Antagonist	pA_2 (GPI) ¹⁾	pIC_{50} (rP2X ₃) ²⁾
Suramin	4,89 ^{a)}	5,5 ^{b)}
NF023	4,45 ^{a)}	5,1 ^{b)}
NF279	5,95 ^{a)}	5,8 ^{b)}
NF449	5,04 ^{d)}	5,7 ^{d)}
PPADS	6,3 ^{a)}	6,6 ^{c)}

¹⁾ pA_2 -Wert ermittelt gegen die $\alpha\beta$ meATP-vermittelte Kontraktion am Meerschweinchen-Ileum.

²⁾ Hemmung der durch ATP vermittelten Einwärtsströme in *Xenopus*-Oozyten, die rekombinante P2X₃-Rezeptoren exprimieren.

^{a)} Lambrecht et al., 1999

^{b)} Lambrecht, 2000

^{c)} Lambrecht et al., 2002

^{d)} Braun et al., 2001

Ob es sich allerdings um einen homomeren P2X₃-Rezeptor im Meerschweinchen-Ileum handelt (Abbildung 1.9), ist unklar. Neben dem P2X₃-Rezeptor wurde auch der P2X₂-Rezeptor immunochemisch im Meerschweinchen-Ileum nachgewiesen (Castelucci et al., 2002). Es wird vermutet, dass die beiden Untereinheiten als heteromere P2X_{2/3}-Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum vorkommen (Poole et al., 2002). Galligan berichtet darüber, dass es sich bei dem P2X_{2/3}-Rezeptor eventuell um einen Mechanosensor handelt, der auf ATP anspricht, das aus der Schleimhaut in Folge mechanischer Stimulation freigesetzt wird (Galligan und North, 2004).

1.1.3.3. Das Meerschweinchen-Ileum als Modell für den P2Y₁-Rezeptor

In Folge der Applikation von ADPβS kommt es zu einer Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum. Diese Kontraktion kann teilweise durch Tetrodotoxin (1 μM: 32 % Inhibition) und Atropin (300 nM: 45 % Inhibition) gehemmt werden. Dies bedeutet, dass ADPβS an verschiedenen P2-Rezeptoren angreift, zum einen an einem präsynaptischen Rezeptor, der sich auf cholinergen Neuronen befindet und zum anderen an einem postsynaptischen P2-Rezeptor auf der glatten Muskulatur. Durch Zugabe von 300 nM Atropin konnte bis zu einer Konzentration von 10 μM αβmeATP keine Kontraktion hervorgerufen werden, was bedeutet, dass der P2X₃-Rezeptor blockiert war (Lambrecht et al., 1999). Die pharmakologischen Eigenschaften des postsynaptischen kontraktionsvermittelnden P2-Rezeptors sind den nativen und rekombinanten P2Y₁-Rezeptoren sehr ähnlich (Abbildung 1.9). Der an rekombinanten P2Y₁-Rezeptoren kompetitive und selektive Antagonist MRS2179 blockiert die ADPβS-vermittelte Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum. Vergleicht man die antagonistische Wirkstärke von MRS2179 an rekombinanten P2Y₁-Rezeptoren (pA₂-Wert: 6,99; Boyer et al., 1998) mit der am Meerschweinchen-Ileum (pA₂-Wert: 6,21 – 6,75; Horner et al., 2002) so findet man vergleichbare pA₂-Werte. Allerdings zeigt MRS2179 einen nichtkompetitiven Antagonismus am Meerschweinchen-Ileum. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wäre das Vorkommen eines weiteren P2Y-Rezeptors im Ileum. Immunochemische Untersuchungen am Maus-Ileum ergaben eine Immunoreaktivität für den P2Y₁-Rezeptor und für den P2Y₂-Rezeptor auf der Longitudinalmuskulatur, wobei die Immunoreaktivität für den P2Y₁-Rezeptor deutlich stärker ausgeprägt war (Giaroni et al., 2002).

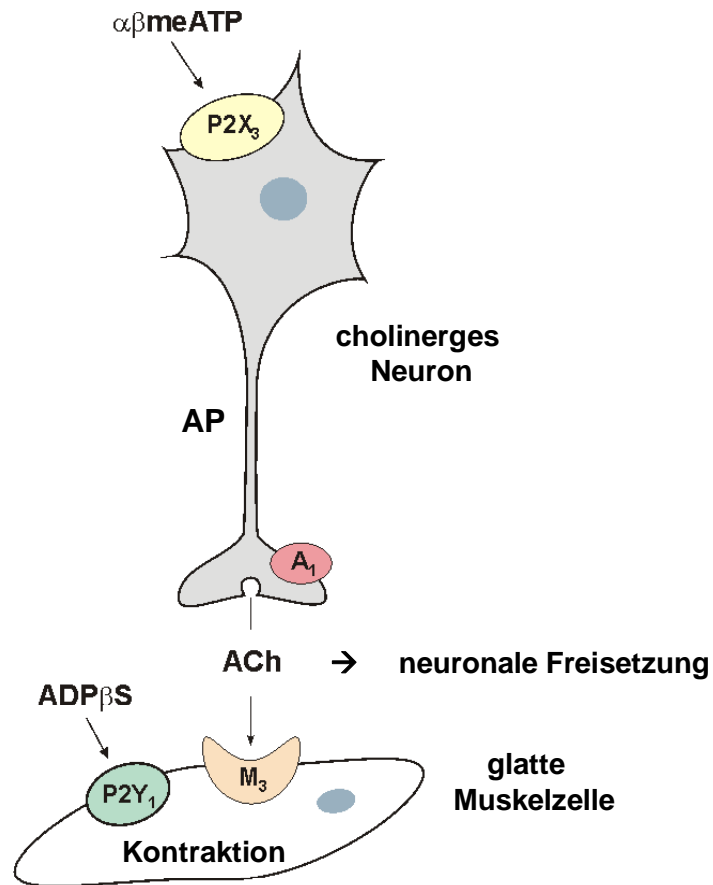


Abbildung 1.9: P2-Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum.

P2-Agonisten führen zu einer Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum über 2 verschiedene Rezeptoren. Der P2X₃-Rezeptor befindet sich im somato-dendritischen Bereich cholinerges Neuronen des Plexus myentericus und wird durch $\alpha\beta\text{meATP}$ stimuliert, was indirekt über postsynaptische M₃-Rezeptoren zu einer Kontraktion führt. Der P2Y₁-Rezeptor befindet sich postsynaptisch und wird durch ADP β S stimuliert. Abbildung modifiziert nach Lambrecht et al., 1999. AP = Aktionspotential. ACh = Acetylcholin.

1.1.4. Humane Thrombozyten

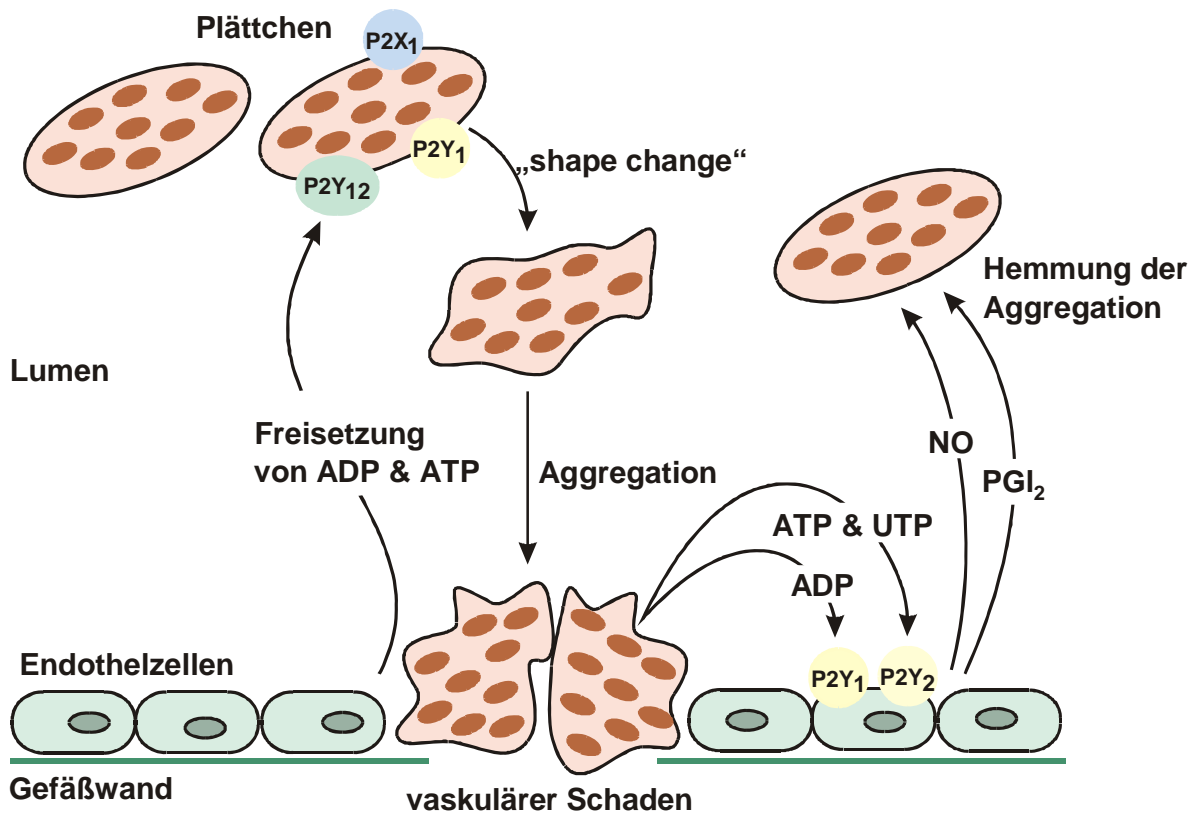


Abbildung 1.10: Rolle der P2-Rezeptoren bei der Hämostase.

Infolge eines Gefäßschadens kommt es zu einer Freisetzung von ATP und ADP in den Extrazellularraum, wodurch die Plättchen aktiviert werden und dabei eine Formänderung, den „shape change“, vollziehen. Die aktivierten Plättchen lagern sich an der geschädigten Stelle an und aggregieren dort. Es kommt zur weiteren Ausschüttung von Nucleotiden, die P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptoren auf den Endothelzellen aktivieren. Durch Ausschüttung von aggregationshemmenden Substanzen wie NO und PGI₂ wird eine übermäßige Aggregation verhindert und ein normaler Blutfluss durch das Gefäß gewährleistet.

1.1.4.1. P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten

Seit mehr als 40 Jahren ist bekannt, dass extrazelluläres ADP die Aggregation von Thrombozyten induzieren kann (Born, 1962). Die Aufklärung der Anzahl und des Mechanismus der Nucleotidrezeptoren gestaltete sich schwierig. Mit Hilfe von Klonierung und Knock-out-Studien konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten 3 verschiedene P2-Rezeptoren exprimieren, die durch Adenosinnucleotide aktiviert werden. Es handelt sich hierbei um den ionotropen P2X₁-Rezeptor und die beiden metabotropen P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren (Daniel et al., 1998; Geiger et al., 1998;

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Kunapuli, 1998b) (Abbildung 1.10). Mit Hilfe von RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion) wurde gezeigt, dass neben dem P2X₁-Rezeptor keine weiteren P2X-Rezeptoren von Thrombozyten exprimiert werden (Sun et al., 1998; Wang et al., 2003). Diese Ergebnisse wurden dadurch bestätigt, dass bei Megakaryozyten, isoliert aus P2X₁-Knock-out-Mäusen kein ATP-induzierter Ioneneinstrom messbar war (Vial et al., 2002). Durch RT-PCR-Messungen wurde auch die Existenz weiterer P2Y-Rezeptoren auf Thrombozyten ausgeschlossen (Wang et al., 2003). Ein Übersichtsschema der 3 Rezeptoren und ihrer physiologischen Funktionen ist in Abbildung 1.11 dargestellt.

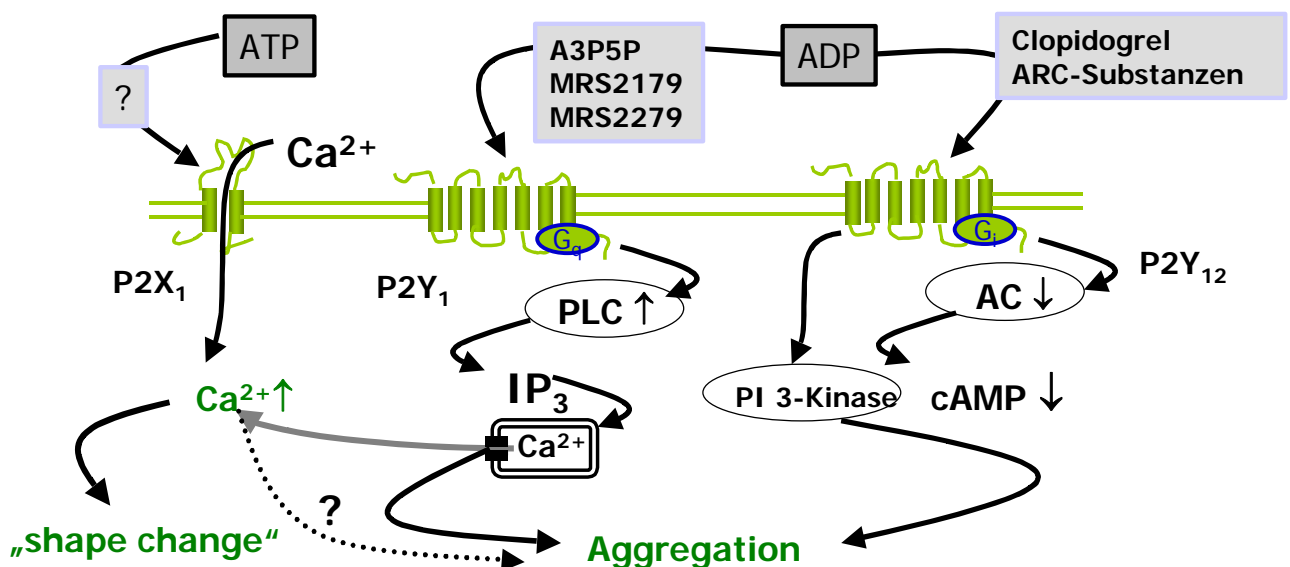


Abbildung 1.11: Model der P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten.

Aktivierung des ionotropen P2X₁-Rezeptors durch ATP führt zu einem Einstrom von Calcium und einem calciumabhängigen „shape change“. ADP aktiviert die metabotropen P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren. Durch Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors kommt es zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern, zum „shape change“ und zum Start der Aggregation. Für eine vollständige ADP-induzierte Aggregation ist allerdings die gleichzeitige Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors notwendig. Für die Blockade der metabotropen Rezeptoren sind mit A3P5P, MRS2179 und MRS2279 für den P2Y₁-Rezeptor sowie mit Clopidogrel und einigen ARC-Substanzen für den P2Y₁₂-Rezeptor selektive und potente Antagonisten verfügbar. Die Entwicklung von selektiven Antagonisten für den P2X₁-Rezeptor von Thrombozyten war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Die Identifizierung verschiedener purinergere Rezeptoren und die Entwicklung spezifischer Antagonisten haben gezeigt, dass Adenosinnukleotide und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Physiologie der Thrombozyten (Storey et al., 2001), der Pathophysiologie einiger Plättchenerkrankungen (Holmsen und Weiss, 1970) und in der Entwicklung antithrombotischer Medikamente spielen (Ingall et al.,

1999; Savi et al., 2001). Mit der Aggregation der Thrombozyten sind 3 weitere physiologische Vorgänge verbunden. Aus den dichten Granula wird der Inhalt freigesetzt, was zur autokrinen Stimulation, gefolgt vom „shape change“, führt. Eine übermäßige Aggregation wird durch das Einsetzen einer aktiven Deaggregation verhindert (Maayani et al., 2003a) (Abbildung 1.10).

In vivo stammen die extrazellulären Nukleotide aus Thrombozyten und aus den Endothelzellen verletzter Blutgefäße (McClure et al., 1988).

1.1.4.1.1. P2X₁-Rezeptoren

Bei dem P2X₁-Rezeptor handelt es sich um den einzigen ionotropen Rezeptor humaner Thrombozyten, der bis jetzt entdeckt wurde (Mahaut-Smith et al., 2004). 1990 konnte durch elektrophysiologische Messungen ein Kationenkanal in der Membran von Thrombozyten nachgewiesen werden, durch den Calcium- und Natriumionen in den Intrazellularraum strömen (Mahaut-Smith et al., 1990). Vial et al. (1997) zeigten die Anwesenheit von mRNA des P2X₁-Rezeptors in Plättchen, was von verschiedenen Arbeitsgruppen durch Nachweis des P2X₁-Rezeptors auf Proteinebene bestätigt wurde (Clifford et al., 1998; Scase et al., 1998; Sun et al., 1998).

Greco et al. (2001) fanden einen P2X_{1del}-Rezeptor, der 17 Aminosäuren weniger in der extrazellulären Ligandenbindungsschleife besitzt und der durch ADP aktiviert werden kann. Weitergehende Untersuchungen ergaben allerdings, dass der P2X_{1del}-Rezeptor nicht in der Lage ist, funktionstüchtige Ionenkanäle auszubilden, und dass ADP nicht an den P2X₁-vermittelten Effekten in Thrombozyten beteiligt ist (Vial et al., 2003).

Interessanterweise wurden die ersten Versuche am P2X₁-Rezeptor von Thrombozyten mit ADP durchgeführt. Mittlerweile weiß man, dass die Aktivierung durch ATP-Kontaminationen, die in dem kommerziell erhältlichen ADP vorhanden waren, hervorgerufen wurde (Mahaut-Smith et al., 2000). ADP selbst ist kein Agonist am P2X₁-Rezeptor (Rosa, 2003). Der physiologische Agonist für P2X₁-Rezeptoren von Thrombozyten ist ATP, das innerhalb der dichten Granula in einer Konzentration von 0,5 M vorliegt (Mahaut-Smith et al., 2004). Bei einer durch Thrombin induzierten Aggregation werden 40 % davon ausgeschüttet (D'Souza und Glueck, 1977), was zu einer extrazellulären Konzentration von ca. 1 bis 25 µM ATP führt (Meyers et al., 1982). Die Konzentration an ATP im Cytosol von Endothelzellen beträgt 3 bis 5 mM,

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

was bei einer Zerstörung der Zelle freigesetzt wird (Mahaut-Smith et al., 2004). Bei einer Gefäßverletzung (Abbildung 1.10) beträgt die ATP-Konzentration im Blut um den Verletzungsherd ca. 20 μM (Born und Kratzer, 1984), wird aber direkt am Ort des Gefäßschadens größer sein.

Neben ATP können auch eine Reihe von Diadenosinpolyphosphaten (AP_nA) und Adenosinpolyphosphoguanosinen (AP_nG) den P2X_1 -Rezeptor aktivieren. Da diese Verbindungen ebenfalls in Plättchen-Granula gespeichert und bei einer Aktivierung freigesetzt werden, handelt es sich hierbei um potente physiologische Aktivatoren des P2X_1 -Rezeptors (Ogilvie et al., 1996; Schlüter et al., 1998). Allerdings ist noch unklar, welche Rolle die Diadenosinpolyphosphate bei der Plättchenaktivierung spielen (Mahaut-Smith et al., 2004), da sie in wesentlich geringeren Konzentrationen als ATP in Thrombozyten vorliegen. Das Verhältnis von AP_nA zu ATP beträgt je nach AP_nA -Spezies zwischen 1:20 und 1:500 (Mahaut-Smith et al., 2004). AP_4A wird im Plasma durch Phosphodiesterasen zu ATP und AMP abgebaut (Luthje und Ogilvie, 1988).

Lange Zeit konnten keine P2X_1 -vermittelten Effekte in Thrombozyten nachgewiesen werden. Grund dafür war, dass die Rezeptoren unter den gegebenen Versuchsbedingungen vollkommen desensibilisiert vorlagen. Führt man aber die Untersuchungen in Gegenwart des Enzyms Apyrase durch, das Tri- und Diphosphate zu Monophosphaten abbaut, so ist ein rasch einsetzender transients Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten. Der P2X_1 -vermittelte Calciumeinstrom läuft innerhalb von Millisekunden ab und stellt den schnellsten rezeptorvermittelten Vorgang in Thrombozyten dar (Sage und Rink, 1987). Neben dem Calciumeinstrom wurde auch ein schnell einsetzender transients P2X_1 -vermittelter „shape change“ beobachtet, wobei das maximale Ausmaß 82 % des durch ADP vermittelten „shape change“ betrug (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Es handelt sich somit beim P2X_1 -vermittelten „shape change“ um einen calciumabhängigen Mechanismus, der in calciumfreier Umgebung nicht abläuft (Rolf et al., 2001). Unter dem Elektronenmikroskop werden deutliche Unterschiede zwischen dem P2X_1 - und P2Y_1 -vermittelten „shape change“ sichtbar. Über eine P2X_1 -Aktivierung kommt es zu einer Wandlung der Thrombozyten von der diskoidalen zur sphärischen Form, allerdings werden keine langen Zellfortsätze wie bei P2Y_1 -Aktivierung ausgebildet.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Zusätzlich wurde eine Zentralisierung von Granula beobachtet, aber keine Freisetzung von Mediatoren daraus (Toth-Zsomboki et al., 2003). Die Bewegung der Granula spielt höchst wahrscheinlich eine Rolle bei der Stimulierung des Kollagenrezeptors, was zu einer gesteigerten Sekretion und Aggregation führt (Oury et al., 2001, 2002). Kürzlich wurde über eine Bildung von Mikroaggregaten nach P2X₁-Stimulation berichtet (Erhardt et al., 2003), die nicht durch normale turbidimetrische Messungen erfasst werden können.

Bei allen beschriebenen Phänomenen handelt es sich um in-vitro-Effekte. In vivo sind durch wiederholte autokrine Stimulation von P2X₁-Rezeptoren eventuell weitere funktionelle Konsequenzen denkbar.

Die Ansprechbarkeit der P2X₁-Rezeptoren scheint variabel zu sein. Bei Untersuchungen in 1 mM Calcium enthaltendem-Medium war bei ca. 40 % der Plättchen nach supramaximaler $\alpha\beta$ meATP-Gabe ein „shape change“ zu beobachten. Durch Steigerung der externen Calciumkonzentration wurde bei nahezu allen Thrombozyten ein „shape change“ induziert (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen des P2X₁-vermittelten „shape change“ in der vorliegenden Arbeit bei einer Calciumkonzentration von 10 mM durchgeführt. Ein Grund für die unterschiedliche Ansprechbarkeit könnten Desensibilisierungserscheinungen der P2X₁-Rezeptoren auf manchen Thrombozyten sein. Außerdem wird vermutet, dass jüngere Thrombozyten aufgrund einer unterschiedlichen Rate des mRNA-Abbaus (Wang et al., 2003) eine größere Anzahl von P2X₁-Rezeptoren im Vergleich zu anderen P2-Rezeptoren aufweisen.

Es wurde ein synergistischer Effekt auf die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei Co-Stimulierung von P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren beobachtet. Der Grund dafür könnte eine Erhöhung der Aktivität der Phospholipase C oder der IP₃-Rezeptoren durch den schnellen P2X₁-vermittelten Calciumeinstrom sein (Vial et al., 2002). Dagegen wurde kein synergistischer Effekt bei Co-Stimulation von P2X₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren gefunden (Rolf und Mahaut-Smith, 2002).

Bei der Aktivierung des P2X₁-Rezeptors kommt es auch zu einem Einstrom von Natriumionen in die Thrombozyten. Die Auswirkungen dieses intrazellulären Natriumanstiegs sind allerdings noch nicht bekannt. Der Austausch des externen Na⁺ durch das impermeable Kation N-Methyl-D-glucamin hatte keinen signifikanten Einfluss auf den durch P2X₁-Stimulation hervorgerufenen „shape change“ (Mahaut-Smith et al., 2004).

Durch den Kationeneinstrom bei P2X₁-Aktivierung kommt es zu einer Depolarisation der Membran. Thrombozyten besitzen allerdings keine spannungsabhängigen Calciumkanäle (Mahaut-Smith et al., 1999), weshalb die Funktion einer Depolarisation unklar ist. Interessanterweise wird die Calciumfreisetzung durch G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Megakaryozyten von Maus und Ratte durch Depolarisation gesteigert (Mahaut-Smith et al., 1999; Martinez-Pinna et al., 2004), was einen möglichen Mechanismus für den Einfluss der P2X₁-Rezeptoraktivierung auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren darstellt.

Aufgrund der schnellen Desensibilisierung des P2X₁-Rezeptors wurde vermutet, dass der Rezeptor in vivo eine größere Rolle spielt als die Effekte, die sich durch in-vitro-Untersuchungen nachweisen lassen. Untersuchungen an P2X₁-Knock-out-Mäusen ergaben keine spontane Blutungsneigung und keine durchschnittlich verlängerte Blutungszeit, wobei hier eine große Streuung der Messwerte beobachtet wurde (Mahaut-Smith et al., 2004). Überexprimierung des P2X₁-Rezeptors führt zu einer gesteigerten Mortalität nach Co-Injektion von Kollagen und Adrenalin (Oury et al., 2003). Auf der anderen Seite war bei P2X₁-Knock-out-Mäusen das Risiko geringer, nach Adrenalin- und Kollageninjektion eine Thrombose auszubilden. Der P2X₁-Rezeptor scheint also an der Ausbildung von Thromben, vor allem in den Arterien wo große Scherkräfte vorliegen, beteiligt zu sein (Hechler et al., 2003a).

In der Literatur wird über einen Patienten berichtet, der einen modifizierten P2X₁-Rezeptor exprimiert und unter einer verstärkten Blutungsneigung leidet. Wird dieser modifizierte P2X₁-Rezeptor in HEK-Zellen exprimiert, so bildet sich ein funktionsunfähiger Kanal aus. Da sonstige Parameter, die an der Hämostase beteiligt sind, nicht beeinträchtigt waren, wurde die verstärkte Blutungsneigung auf den defekten P2X₁-Rezeptor zurückgeführt (Oury et al., 2000).

1.1.4.1.2. P2Y₁-Rezeptoren

Der G_{α_q}-gekoppelte P2Y₁-Rezeptor wurde durch PCR in humanen Thrombozyten nachgewiesen (Leon et al., 1997). Untersuchungen des P2Y₁-cDNA-Klons aus Thrombozyten ergaben, dass es sich hierbei weder um die lange noch um die kurze Form des humanen P2Y₁-Rezeptors handelt, die in anderen Geweben gefunden wurden, sondern um eine andere Variante, die noch in keinen andern Strukturen nachgewiesen wurde (Jin et al., 1998). Der physiologische Agonist für den P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten ist ADP, das in einer Konzentration von 0,5 M in

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

dichten Granula vorliegt (Mahaut-Smith et al., 2004). Bei einer durch Thrombin induzierten Aggregation wird ca. 50 % des ADP freigesetzt (D'Souza und Glueck, 1977). Nach maximaler Stimulierung der Thrombozyten beträgt die ADP-Konzentration im Extrazellularraum ca. 1 bis 11 μM (Meyers et al., 1982).

Durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über den P2Y_1 -Rezeptor kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), was die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern und eine rasch einsetzende Aktivierung der Thrombozyten („shape change“) induziert (Jin et al., 1998). Der ADP-induzierte „shape change“ wird ausschließlich über den P2Y_1 -Rezeptor vermittelt (Daniel et al., 1998; Maayani et al., 2003b), da ADP den P2X_1 -Rezeptor nicht aktiviert und der P2Y_{12} -Rezeptor keinen „shape change“ vermittelt. Um eine Aktivierung des P2X_1 -vermittelten „shape change“ über Kontaminationen des ADP mit ATP auszuschließen, erfolgte eine Aufreinigung mit Hexokinase (Kapitel 2.2.3.1.2.). Der ADP-induzierte und P2Y_1 -vermittelte „shape change“ wird mit einer Aktivierung des Rho/Rho-Kinase Signalwegs in Verbindung gebracht (Bauer et al., 1999; Wilde et al., 2000). Auch am ADP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist der P2Y_{12} -Rezeptor nicht beteiligt (Jin et al., 1998). Allerdings wird vermutet, dass TRPC-Kanäle („transient receptor potential channels“, nichtselektive Kationenkanäle) durch P2Y_1 -Rezeptoren über die PLC und DAG (Diacylglycerol) aktiviert werden (Trebak et al., 2003), wodurch Calcium aus dem Extrazellularraum in die Thrombozyten einströmt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um den TRPC6. Durch zunehmende Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern kommt es zusätzlich zum Einstrom von Calcium-Ionen aus dem Extrazellularraum über speicherabhängige Kanäle (SOCE: store operated calcium entry) (Hassock et al., 2002). Um einen Einfluss auf den ADP-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg durch Calciumeinstrom auszuschließen, wurden in dieser Arbeit die Messungen in nominell calciumfreiem Medium durchgeführt.

Der P2Y_1 -Rezeptor ist zusätzlich an der ADP-vermittelten Aggregation beteiligt; allerdings ist für eine vollständige Aggregation die gleichzeitige Aktivierung des P2Y_{12} -Rezeptors notwendig (Hechler et al., 1998a; Jin und Kunapuli, 1998; Jantzen et al., 1999). Der Mechanismus für diesen Synergismus ist noch nicht aufgeklärt, aber er scheint zumindest teilweise über die erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen abzulaufen, da hohe Konzentrationen des Chelators BAPTA ihn unterbinden können (Paul et al., 1999a). Die selektive Stimulierung des P2Y_1 -Rezeptors führt zu einer transienten Aggregation, deren Ausmaß geringer ist als bei

Co-Aktivierung beider P2Y-Rezeptoren (Jarvis et al., 2000; Maayani et al., 2003a). Dass aber auch der P2Y₁-Rezeptor essentiell für eine vollständige ADP-induzierte Aggregation ist, zeigen Untersuchungen an Thrombozyten von P2Y₁-Knock-out-Mäusen. Erst bei sehr hohen ADP-Konzentrationen wurde eine partielle Aggregation beobachtet (Fabre et al., 1999; Leon et al., 1999). Diese Knock-out-Tiere erwiesen sich auch als resistenter gegenüber der Bildung akuter Thrombosen, die durch intravenöse Gabe von ADP oder Kollagen und Adrenalin sowie durch Gewebefaktoren hervorgerufen wurden (Leon et al., 2001; Kunapuli et al., 2003). Somit erfasst man bei der Messung der ADP-induzierten Aggregation einen kombinierten Effekt aus P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor-Aktivierung.

Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass die heptahelikalen G-protein-gekoppelten Rezeptoren auch an nicht G-Protein-vermittelte Signale, wie die Aktivierung von MAP-Kinasen und Thyrosinkinasen, gekoppelt sind (Hall et al., 1999; Marinissen et al., 2001). Die EC₅₀-Werte von ADP für die P2Y₁-vermittelten physiologischen Vorgänge „shape change“ und Aggregation unterscheiden sich um mehr als eine Zehnerpotenz. Außerdem kommt es bei der Aggregation, nicht aber beim „shape change“ zu einer Desensibilisierung bei wiederholter ADP-Gabe. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Eigenschaften könnte die Aktivierung über unterschiedliche Signaltransduktionswege sein (Maayani et al., 2003a).

1.1.4.1.3. P2Y₁₂-Rezeptoren

Durch Klonierung konnte der P2Y₁₂-Rezeptor auf Thrombozyten identifiziert werden (Hollopeter et al., 2001; Savi et al., 2001). Die Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors führt zu einer Potenzierung und Amplifizierung der ADP-induzierten Aggregation und zur Freisetzung von aggregationsfördernden Mediatoren (Kunapuli et al., 2003). Außerdem wird die Deaggregation gehemmt, wodurch eine stärkere, andauernde Aggregation ermöglicht wird (Maayani et al., 2001).

Es handelt sich beim P2Y₁₂-Subtyp um einen G_{α_i}-gekoppelten Rezeptor, der die Stimulation der Adenylatcyclase (AC) hemmt (Ohlmann et al., 1995). Dieser Transduktionsweg spielt allerdings für die ADP-induzierte Aggregation keine Rolle (Daniel et al., 1999; Yang et al., 2002). Für die „irreversible Aggregation“ wird die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase γ (PI3-Kinase γ) verantwortlich gemacht, die durch den P2Y₁₂-Rezeptor vermittelt wird (Payraastre et al., 2000). Allerdings zeigten Mäuse, denen die PI3-Kinase fehlte, zwar eine geringere

Empfindlichkeit für thromboembolische Ereignisse, aber es wurde keine signifikante Hemmung der durch hohe Konzentrationen von ADP induzierten Aggregation beobachtet (Hirsch et al., 2001). Interessanterweise ist die PI3-Kinase ein wichtiger Effektor der P2Y₁₂-vermittelten Potenzierung der Ausschüttung von Mediatoren aus Granula („dense granule release“) der Thrombozyten (Dangelmaier et al., 2001).

Patienten mit einem P2Y₁₂-Rezeptor-Gendefekt bildeten unter erhöhten Scherbedingungen zwar einen Thrombus aus, dieser war allerdings kleiner und nicht so kompakt wie der von Kontrollpatienten (Remijn et al., 2002). Außerdem zeigten diese Patienten eine gesteigerte Blutungsneigung (Cattaneo et al., 1992).

1.1.4.2. Interaktion von P2-Rezeptoren mit anderen Transduktionswegen

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aktivierung des P2Y₁- als auch die des P2Y₁₂-Rezeptors essentiell für die Adhäsion von Plättchen an Fibrinogen unter physiologischen Fließeigenschaften ist (Remijn et al., 2002). Die kombinierte Blockade des P2Y₁- und des P2Y₁₂-Rezeptors hemmt die durch Scherströmung induzierte Aggregation (Turner et al., 2001). Blockade des P2Y₁-Rezeptors hemmt die Aggregation bei niedrigen Konzentrationen von Kollagen, wohingegen die Aggregation, die durch höhere Konzentrationen an Kollagen ausgelöst wird, unbeeinflusst bleibt (Mangin et al., 2004). Auch der P2Y₁₂-Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei der durch Kollagen induzierten Aggregation (Ohlmann et al., 2000; Jung und Moroi, 2001). Der P2Y₁₂-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Thromboxan A₂- und in der ADP-induzierten Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (Paul et al., 1999b; Dangelmaier et al., 2001). Für die agonistinduzierte Fibrinogenrezeptoraktivierung in Plättchen wurden PKC-sensitive oder calciumsensitive Signaltransduktionswege gefunden, und der P2Y₁₂-Rezeptor kann mit beiden interagieren (Quinton et al., 2002). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass gleichzeitige Stimulierung von G_{12/13} und P2Y₁₂-Rezeptoren eine Fibrinogenrezeptoraktivierung induzieren kann (Dorsam et al., 2002; Nieswandt et al., 2002). Die Ausbildung von P-Selectin auf aktivierten Plättchen, die ausschlaggebend für eine kombinierte Beteiligung von Plättchen und Leukozyten an einer arteriellen Thrombose und Atherosklerose ist, wird durch P2Y₁₂-Aktivierung ermöglicht (Zhao et al., 2001; Storey et al., 2002). P2X₁-Aktivierung führt zu einer Stimulation von Glykoprotein VI Kollagen-Rezeptoren, was zu einer verstärkten

Sekretion und Aggregation führt (Oury et al., 2001, 2002). Es wird vermutet, dass der zugrunde liegende Mechanismus eine ERK2- (extrazelluläre Rezeptor-Kinase-2) Phosphorylierung ist (Oury et al., 2002). Bei Co-Applikation von $\alpha\beta$ meATP, Adrenalin und Thrombopoietin wurde eine verstärkte reversible Aggregation beobachtet (Erhardt et al., 2003) und P2X₁-Stimulation in heparinisiertem Blut kann eine Aggregation induzieren (Erhardt et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht geklärt, allerdings ist bekannt, dass Heparin die Aktivierung der Plättchen durch eine Reihe von Agonisten verstärkt (Westwick et al., 1986).

1.1.4.3. Nukleotidabbau im Blut

Auf den Endothelzellen der Blutgefäße befindet sich die NTPDase 1, CD39. Es handelt sich dabei um eine ATP-Diphosphohydrolase (Zimmermann, 2000). Auch auf der Thrombozytenmembran wurde die CD39 nachgewiesen (Koziak et al., 1999). Die CD39 baut ATP und ADP zu AMP ab und wirkt somit antiaggregatorisch. Das AMP wird anschließend von der Ekto-5'-Nukleotidase, die sich ebenfalls auf Endothelzellen befindet, zum antiaggregatorischen Adenosin abgebaut (Marcus et al., 2003). Adenosin hemmt die Aggregation in vitro. Ob dieser Prozess auch in vivo von Bedeutung ist, wird kontrovers diskutiert, da es sehr schnell in Zellen aufgenommen oder durch die Adenosindeaminase abgebaut wird (Kawashima et al., 2000). Es wurde auch von einer Ekto-5'-Nukleotidase berichtet, die sich direkt auf der Membran der Thrombozyten befindet (Bergamini und Grazi, 1980).

Neben der membrangebundenen Form gibt es auch eine lösliche Ekto-5'-Nukleotidase, die aus der Membran von Hepatozyten freigesetzt wird (Yegutkin et al., 2003). Somit verhindert die CD39 ein unkontrolliertes Anlagern von Thrombozyten an Verletzungsstellen von Blutgefäßen und ist dadurch für die Aufrechterhaltung des Blutflusses verantwortlich. Lösliche Formen der CD39 könnten somit ein wirksames antithrombotisches Therapeutikum darstellen. Untersuchungen an Mäusen haben ergeben, dass die Applikation der löslichen CD39 protektiv gegen Schlaganfall wirksam ist (Pinsky et al., 2002). Transgene Mäuse, die die CD39 überexprimieren, weisen eine verlängerte Blutungszeit auf. Interessanterweise ist eine verlängerte Blutungszeit auch bei CD39-Knock-out-Mäusen zu beobachten, die hier auf einer Desensibilisierung der Nukleotidrezeptoren beruht (Dwyer et al., 2004). Vergleicht man die CD39 mit der Kartoffelapyrase, so ist eine Übereinstimmung der

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Aminosäuresequenz von 25 % und eine Homologie der Aminosäure von 48 % gegeben (Marcus et al., 2003). Zusätzlich gibt es im Plasma auch eine lösliche Nukleotidase, die ATP direkt zu AMP abbaut, ohne die Zwischenstufe des ADP (Birk et al., 2002). Diese lösliche Nukleotidase hat die Aufgabe, den Plasmaspiegel an ADP und ATP niedrig zu halten, um eine unnötige Aktivierung der Plättchen zu verhindern.

1.2. Ziel der Arbeit

Eine große Herausforderung auf dem Forschungsgebiet der P2-Rezeptoren stellt die Entwicklung von potenten und selektiven Antagonisten für die einzelnen Rezeptorsubtypen dar, um die P2-Rezeptoren in nativen Geweben zu identifizieren und ihre physiologische und pathophysiologische Funktion aufzuklären. Obwohl in den letzten Jahren eine Reihe von P2-Antagonisten entwickelt wurden, sind viele dieser Substanzen aufgrund ihrer Kinetik, Rezeptoraffinität, Subtypselektivität oder P2-Spezifität nicht ideal. Außerdem bleibt die Frage der Übertragbarkeit pharmakologischer Eigenschaften von Antagonisten, die an rekombinanten Rezeptoren ermittelt wurden, auf native Rezeptoren weiterhin offen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, potente und subtypselektive P2-Antagonisten zu entwickeln und zum anderen die pharmakologischen Befunde, die an glattmuskulären Organen von Versuchstieren sowie an humanen Thrombozyten ermittelt wurden, mit Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren zu vergleichen und somit Aussagen über P2-Rezeptoren verschiedener Spezies sowie nativer und rekombinanter P2-Rezeptoren treffen zu können. Vor diesem Hintergrund werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Beitrag der Grundlagenforschung betrachtet, mit dem Fernziel der Entwicklung von neuartigen Arzneistoffen, die bei Störungen der Nukleotid-Signaltransmission beim Menschen als Therapeutika eingesetzt werden können.

1.2.1. Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten

Auf humanen Thrombozyten sind 3 verschiedene P2-Rezeptoren zu finden: P2X₁, P2Y₁ und P2Y₁₂. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf den ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-vermittelten intrazellulären Calciumanstieg, den ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-vermittelten „shape change“ sowie die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Ziel war es zunächst zu ermitteln, welche Rezeptoren an den einzelnen physiologischen Vorgängen beteiligt sind.

Über den ADP-induzierten „shape change“ gibt es widersprüchliche Berichte. Um Gewissheit zu erhalten, welche P2-Rezeptoren daran beteiligt sind, wurde der Einfluss der P2Y₁-Antagonisten A3P5P und MRS2179 sowie der P2Y₁₂-Antagonisten

2-meSAMP (siehe 8.3) und pHMBS auf den ADP-induzierten „shape change“ untersucht.

Um eine Beteiligung des P2Y₁-Rezeptors am $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ auszuschließen, wurden Untersuchungen in Anwesenheit von MRS2179 durchgeführt.

An der ADP-vermittelten Aggregation sind sowohl P2Y₁- wie auch P2Y₁₂-Rezeptoren beteiligt (Kunapuli, 1998a). Um nun herauszufinden, ob auch bei Thrombozyten, die in Puffer suspendiert wurden, bei vollständiger P2Y₁₂-Blockade eine Aggregation durch ADP erfolgen kann, wurden Versuche mit den P2Y₁-Antagonisten A3P5P und MRS2179 sowie den P2Y₁₂-Antagonisten 2-meSAMP und pHMBS durchgeführt. Ziel war es, durch vollständige Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors mit Hilfe der Aggregationsmessung eine isolierte Aussage über das pharmakologische Verhalten von Antagonisten am P2Y₁-Rezeptor zu erhalten.

1.2.2. Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen

Bei MRS2179 handelt es sich um einen selektiven und kompetitiven Antagonisten für rekombinante und native P2Y₁-Rezeptoren isolierter Zellen (siehe Kapitel 1.1.2.2.). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MRS2179 rekombinante P2X₁-Rezeptoren der Ratte mit einem IC₅₀-Wert von ca. 1 μ M und rekombinante P2X₃-Rezeptoren mit einem IC₅₀-Wert von ca. 10 μ M blockiert (Brown et al., 2000). Ziel war es nun, die pharmakologischen Eigenschaften von MRS2179 an nativen Rezeptoren zu untersuchen. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei MRS2179 um einen potenten, allerdings nichtkompetitiven Antagonisten an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum handelt (Horner et al., 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun die Kinetik von MRS2179 am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum bestimmt sowie die Rezeptorselektivität von MRS2179 an P2X₃-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum und an P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens ermittelt.

1.2.3. PPADS- und PPNDS-Analoga (siehe, 8.1)

Ausgehend von der Leitsubstanz PPADS wurden verschiedene Strukturmodifikationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die antagonistische Wirkstärke an P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens, P2Y₁- und P2X₃-

Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum sowie P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht. Von interessanten Verbindungen wurden zusätzlich der antagonistische Mechanismus mittels Schild-Analyse sowie die Kinetik ermittelt.

Bei den Verbindungen handelte es sich um die Muttersubstanz PPADS (Lambrecht et al., 1992), das Carbonsäurederivat MRS2159, was sich an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren als potenter Inhibitor erwies (Kim et al., 2001), das Homodimer von MRS2159, CLII, was einen effektiven „cross-linker“ zur Herstellung von rekombinanten P2X-Rezeptortrimeren darstellt, den potenten P2X₁-Antagonisten PPNDS (Lambrecht et al., 2000b), bei dem der Phenylring von PPADS durch einen Naphthylring ersetzt wurde, sowie das Heterodimer aus PPADS und Suramin, SB9, bei dem es sich um einen potenten Antagonisten an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum handelt (Lambrecht et al., 2000a). Weiterhin wurden zwei Verbindungen untersucht, bei denen die Nitrogruppe von PPNDS zur Aminogruppe reduziert wurde und mit Essigsäure (NAC) bzw. Buttersäure (N-Butyl) amidiert vorliegt.

Ziel war es aufzuklären, welche Molekülstrukturen für die P2-antagonistischen Wirkungen an glattmuskulären Organen und humanen Thrombozyten verantwortlich sind, weiterhin wurde das kinetische Verhalten und der antagonistische Mechanismus der Verbindungen an den einzelnen P2-Rezeptoren untersucht.

1.2.4. Suraminanaloga (siehe, 8.2)

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es sich bei bestimmten Suraminanaloga um potente und selektive P2-Antagonisten an glattmuskulären Organen und an rekombinanten P2-Rezeptoren handelt. Deshalb wurden eine Reihe von bivalenten und tetravalenten Verbindungen hinsichtlich ihres Antagonismus an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht. Es handelte sich bei den bivalenten Verbindungen um die Muttersubstanz Suramin und den P2X₁-selektiven Antagonisten NF023 (Soto et al., 1999), der im Gegensatz zu Suramin zur Gruppe der sogenannten „kleinen Harnstoffe“ gehört. Weiterhin wurden die pharmakologischen Eigenschaften von N97/66 und N98/33, zwei Vorstufen von NF449, charakterisiert.

EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Bei den tetravalenten Verbindungen wurde der potente P2X₁-Antagonist NF449 (Braun et al., 2001), der P2X₃-selektive Antagonist NF110 sowie NF864, das an glattmuskulären Organen eine P2Y₁- versus P2X₁-Präferenz aufweist (Kassack et al., 2004), ausgewählt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Methoden der [Ca²⁺]_i-Messungen sowie der Aggregations- und „shape change“-Messungen an humanen Thrombozyten etabliert wurden um die Befunde von Antagonisten, die an P2-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens und des Meerschweinchen-Ileum ermittelt wurden, mit Ergebnissen an humanen P2-Rezeptoren vergleichen zu können. So konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen verschiedener P2-Antagonisten an nativen Rezeptoren unterschiedlicher Spezies aufgestellt und miteinander verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Substanzen

2.1.1.1. Kommerziell erhältliche Substanzen

2-Methylthio-adenosin-5'-O-monophosphat (2-meSAMP; Biolog, Bremen, Deutschland)

5-Hydroxytryptaminhydrochlorid (Serotonin; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

α,β -Methylenadenosin-5'-triphosphat-dilithiumsalz ($\alpha\beta$ meATP; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Adenosin-3',5'-bisphosphat (A3P5P; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Aceylsalicylsäure (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland)

Adenosin-5'-diphosphat-dinatriumsalz (ADP; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Adenosin-5'-O-(2-thiodisulfat)-dilithiumsalz (ADP β S; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Apyrase Grade VII (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Atropinsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Fibrinogen (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Fiske & Subarow Reduktionsmittel (Zusammensetzung: 1-Amino-2-naphthyl-4-sulfonsäure, Natriumsulfit und Natriumbisulfit; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2/AM; Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Hexokinase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Indomethacin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Ketanserintartrat (Tocris, Köln, Deutschland)

L-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Mangan-(II)-chlorid-tetrahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Natriumsalz (HEPES; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

N⁶-Methyl-2'-deoxyadenosin-2',5'-bisphosphat (MRS2179; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

MATERIAL UND METHODEN

Oregon green ® 488 BAPTA-1-acetoxymethylester (Oregon green 488 BAPTA-1/AM; Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

p-Hydroxymercuribenzolsulfonsäure (pHMBS; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Physostigmin krist. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Pyridoxal-5'-phosphat-6-azophenyl-4'-carbonsäure (MRS2159; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Suramin (Germanin ®; Bayer, Leverkusen, Deutschland)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Alle anderen anorganischen bzw. organischen Substanzen wurden als handelsübliche Chemikalien mit dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad verwendet.

2.1.1.2. Zur Verfügung gestellte Substanzen

PPADS, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl, SB9 (synthetisiert von Herrn Dr. H. G. Bäumert und Mitarbeitern, Institut für Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Deutschland).

NF-Substanzen, N97/66 und N98/33 (synthetisiert von Herrn Prof. Dr. P. Nickel und Mitarbeitern, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn, Bonn, Deutschland).

2.1.2. Puffer und Lösungen

Die Testsubstanzen wurden im Allgemeinen in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9% m/v) gelöst und verdünnt. Indomethacin-Stammlösungen wurden in 96%-igem Ethanol hergestellt. Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen wurden in wasserfreiem DMSO hergestellt. Es wurde in allen Fällen experimentell ausgeschlossen, dass die höchste Lösungsmittelkonzentration allein einen pharmakologischen Effekt auf die Versuche ausübt.

Glattmuskuläre Organe:

Die Versuche an glattmuskulären Organen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung durchgeführt (in mM: CaCl₂: 1,3; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄: 0,6; NaCl 118,0; NaHCO₃: 25,0; Glukose 11,1) die einen pH-Wert von 7,4 hatte. Für die einzelnen Modelle wurden verschiedene Substanzen zugesetzt:

- P2X₁-Rezeptor am Ratten-Vas-deferens:
Zugabe von 6 µM Indomethacin um die Bildung von Prostaglandinen zu hemmen (Khakh et al., 1994).
- P2X₃-Rezeptor am Meerschweinchen-Ileum:
Zugabe von 70 nM Physostigmin um den Abbau von Acetylcholin durch Hemmung der Acetylcholinesterase zu vermindern und somit die Acetylcholin-vermittelten Kontraktionen zu verstärken (Lambrecht et al., 1999).
- P2Y₁-Rezeptor am Meerschweinchen-Ileum:
Zugabe von 300 nM Atropin, um postsynaptische muskarinerge M₃-Rezeptoren zu blockieren (Lambrecht et al., 1999).

Humane Thrombozyten:

Für die Blutabnahme wurde ein Citrat-Antikoagulans (in mM: 78,0 Zitronensäure; 85,0 Trinatriumcitrat; 111,0 Glucose) verwendet.

Die Aufarbeitung für die Untersuchungen an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten wurden in einem nominell calciumfreien Puffer (in mM: 5,0 KCl; 1,0 MgCl₂; 145,0 NaCl; 10,0 Glucose; mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt) durchgeführt. Um eine Desensibilisierung der P2-Rezeptoren durch endogen freigesetzte Nukleotide zu verhindern, wurden dem Puffer 0,32 U/ml (0,6 U/ml bei

Untersuchungen des P2X₁-vermittelten „shape change“) Apyrase-Grade-VII zugesetzt (Rolf und Mahaut-Smith, 2002).

Die Versuche am 5-HT_{2A}-Rezeptor humaner Thrombozyten wurden in einem Krebs-Puffer-System (in mM: NaCl 120,0 ; KCl 4,0; MgSO₄ 1,2; NaH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; Glucose 5,6; Carbogen-Begasung > 20 Minuten, pH: 7,8) durchgeführt. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu den Untersuchungen an den P2-Rezeptoren zu haben, wurde auch hier dem Puffer 0,32 U/ml Apyrase zugesetzt.

2.1.3. Tiere

Alle Versuchstiere waren in einem Tierstall mit definierter Temperatur (22° C), Luftfeuchtigkeit (50 %) und einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus (12 h) untergebracht. Die Tiere wurden mit Altromin[®] 3022 (Meerschweine) oder Altromin[®] 1324 (Ratten), erhältlich bei Altromin GmbH (Lage), gefüttert und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Männliche Meerschweine (Auszucht Meerschweine, Dunkin Hartley, Zuchtlinie: Hsd.Poc:DH, 250 g – 450 g Körpergewicht) und Ratten (Auszucht Ratten, Sprague Dawley, Zuchtlinie: Hsd SD, 250 g – 450 g Körpergewicht) wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borken) bezogen.

2.1.4. Thrombozyten

Frischblut:

Die Blutabnahme erfolgte in Zusammenarbeit mit Ärzten des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. S. Harder im Zentrum für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt. Das Blut wurde von freiwilligen, gesunden männlichen und weiblichen Probanden gespendet, die für mindestens 1 Woche keine Arzneimittel (Ausnahme: orale Kontrazeptiva) eingenommen hatten. Die Blutabnahme sowie die Aufbereitung der Thrombozyten erfolgte nach der Methode von Rolf und Mahaut-Smith (2002). Es wurde ein Butterfly-Infusionsset mit 19 G Nadel und 30 cm Schlauch (Venofix[®], Braun, Melsungen, Deutschland) zur Blutabnahme aus Venen der Armbeuge verwendet. In eine 50-ml-Einwegspritze (Injektomat[®]-Spritze, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) wurden 7 ml Citrat-Antikoagulans (Zusammensetzung Kapitel 2.1.2) vorgelegt und anschließend Blut durch langsamen Zug bis zur Messmarke abgenommen, so dass das Blut mit

MATERIAL UND METHODEN

dem Antikoagulans im Verhältnis von ca. 6:1 (v/v) vorlag. Durch vorsichtiges Umkippen der Spritze erfolgte eine homogene Durchmischung von Blut und Antikoagulans. Anschließend wurde das Blut auf vier 15-ml-Falcons aliquotiert und zum Biozentrum Niederursel transportiert (Fahrzeit ca. 30 Minuten). Das Blut wurde für 7 Minuten bei 700 g in einer Beckmann-Allegria 6 R-Zentrifuge bei Raumtemperatur mit niedriger Bremsleistung zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) im Überstand wurde vorsichtig mit einer Plastik-Pasteurpipette abgenommen und in zwei 15-ml-Falcons überführt unter Zugabe von Apyrase Grade VII (Endkonzentration: 0,32 U/ml) und Acetylsalicylsäure (Endkonzentration 100 µM), um eine Desensibilisierung der P2-Rezeptoren durch endogen freigesetzte Nukleotide zu vermeiden, sowie die Aggregation der Thrombozyten über Aktivierung des Cyclooxygenase-Systems zu verhindern.

Die Falcons lagerten bis zu der Weiterverarbeitung des PRP (maximal ca. 4 Stunden nach Blutabnahme) in einem Schüttelwasserbad bei 25°C.

Buffy Coat Blut:

Humane Thrombozyten wurden aus Leukozytenkonzentraten (Buffy Coats) des Zentrallaboratoriums des St. Markus-Krankenhauses in Frankfurt isoliert. Die Buffy Coats wurden nach Zentrifugation und anschließendem Abpressen des Plasmas aus dem Blut männlicher und weiblicher Spender erhalten und bestanden im wesentlichen aus Leukozyten, Thrombozyten und wenigen Erythrozyten. Mehrere Buffy Coats wurden in einem Becherglas vereinigt und mit PBS-Puffer (Zusammensetzung für 1l in mg: NaCl 8000; KCl 200; Na₂HPO₄ 1150; KH₂PO₄ 200. Bezogen von Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg, Deutschland) in einem Verhältnis von 2:1 verdünnt. Anschließend wurde eine Dextran-Sedimentation (fünfprozentige Dextranlösung) durchgeführt, um die Erythrozyten zu entfernen. Nach 30-40 Minuten wurden die Überstände vereinigt und im Verhältnis 4:1 mit Trennlösung Lymphoprep 1,077 (Nycomed) überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 800 g ohne Bremse bei Raumtemperatur in einer Varifuge 3.ORS von Hereaus. Diese Aufarbeitungsschritte wurden von Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Dr. D. Steinhilber durchgeführt. Im gelblichen Überstand befanden sich die Thrombozyten, die mit Hilfe einer Plastik-Pasteurpipette vorsichtig direkt über der Grenzschicht abgenommen wurden. Analog zu den Thrombozyten aus Frischblut wurden der Plättchensuspension Apyrase

MATERIAL UND METHODEN

Grade VII (Endkonzentration 0,32 U/ml) und ASS (Endkonzentration 100 µM) zugesetzt. Auch hier wurden die Thrombozyten bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 25°C im Schüttelwasserbad gelagert.

2.2. Methoden

2.2.1. Glattmuskuläre Organe

Die funktionell-pharmakologischen Modelle des isolierten Vas deferens der Ratte und der isolierten Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum wurden von Frau Dr. S. Damer bzw. Frau Dr. S. Czeche in unserem Labor etabliert und validiert (Czeche, 2001; Damer, 2002). Weitere Validierungen wurden von Frau Dr. K. Menke und Herrn Dr. M. Ganso durchgeführt (Menke, 2003; Ganso, 2004).

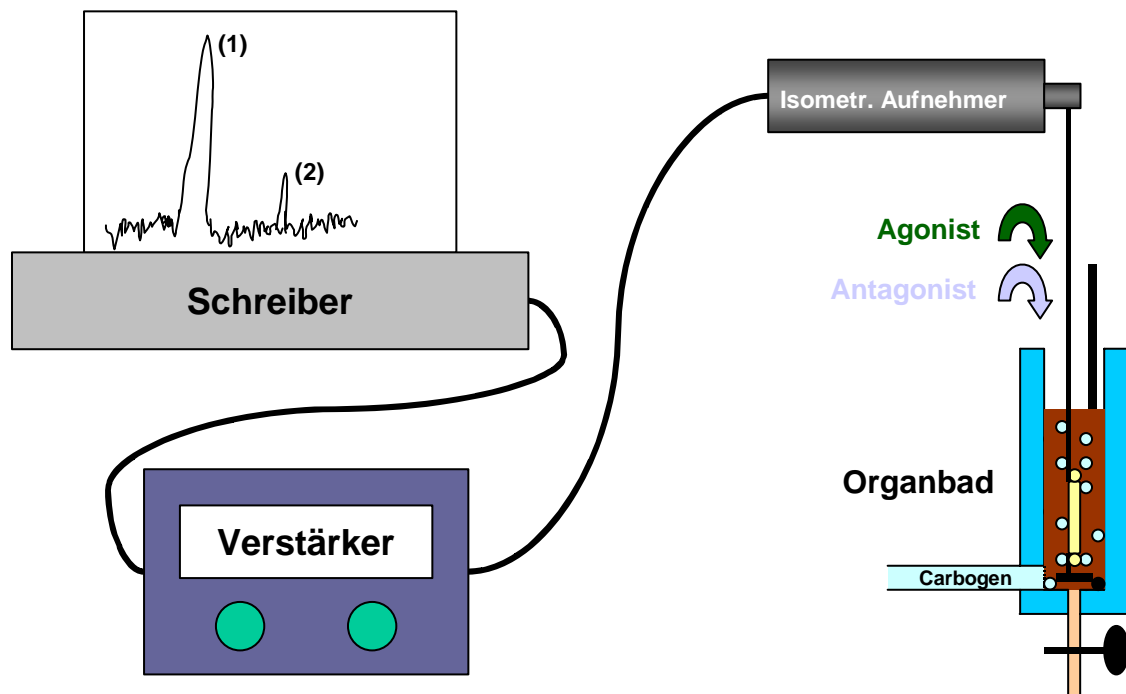


Abbildung 2.1: Allgemeiner Versuchsaufbau zur Untersuchung von Antagonisten an glattmuskulären Organen.

In einem 6 ml fassenden Organbad, das auf 37°C temperiert ist und eine mit Carbogen begaste Pufferflüssigkeit enthält, werden 1,5 cm lange Präparate an isometrischen Aufnehmern mit einer bestimmten Vorlast befestigt. Die durch Agonisten hervorgerufene Kontraktion (1) wird über einen Verstärker an einen Schreiber weitergeleitet, der die Analog-Signale aufzeichnet. Durch Antagonisten wird der Agonist-Effekt reduziert (2).

2.2.1.1. Isoliertes Vas deferens der Ratte

Präparation:

Sprague-Dawley Ratten wurden durch Begasung mit CO₂ und anschließender Dekapitation getötet. Nachdem der Bauchraum nach der Methode von Khakh et al.

(1994) eröffnet war, wurden die Vasa deferentia zügig entnommen und in eine begaste Krebs-Henseleit-Lösung (Zusammensetzung Kapitel 2.1.2) gegeben, wo das umgebende Bindegewebe in einer Mikropräparation entfernt wurde. 1,5 cm lange prostatistische Segmente wurden in Organbäder überführt, die 6 ml einer mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begasten, auf 37 °C temperierten Krebs-Henseleit-Lösung enthielten. Die Organe wurden mit Baumwollfäden an isometrischen Aufnehmern (TF6V5, W. Fleck, Mainz, Deutschland) mit einer Vorlast von 750 mg befestigt und für eine Stunde an die Bedingungen adaptiert. Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die Pufferflüssigkeit viertelstündlich ausgetauscht.

2.2.1.1.1. Modell des P2X₁-Rezeptors

Allgemeine Bedingungen:

Im Anschluss an die Adaptationsphase wurden durch Einzelgaben von 1 bzw. 10 µM αβmeATP Kontraktionen ausgelöst, die mit Hilfe eines DMS DC-Verstärkers (W. Fleck, Mainz, Deutschland) von einem Schreiber (Rikadenki, Hellige, Freiburg, Deutschland) aufgezeichnet wurden (Abbildung 2.1). Dies wurde so oft durchgeführt, bis die Kontraktionsantwort konstant blieb (Konditionierung). Nachdem das Maximum der Kontraktion erreicht war, wurde die Pufferflüssigkeit jeweils ausgetauscht, um ein Desensibilisieren der P2X₁-Rezeptoren zu verhindern. Aus diesem Grund wurde auch ein Abstand von 30 Minuten zwischen den Agonistengaben gewählt.

Die untersuchten Antagonisten wurden jeweils mindestens 60 Minuten vorinkubiert. Dazu wurde im Anschluss an jeden Spülgang der Antagonist erneut zugesetzt.

Während des gesamten Versuchsablaufs diente jeweils 1 Organ als Kontrolle, um mögliche zeitabhängige Veränderungen der Kontraktionsantwort auf den Agonisten zu ermitteln.

Am Ende des Versuchs wurden die einzelnen Apparaturen mit verschiedenen Gewichten geeicht, um die Signale, die der Schreiber aufgezeichnet hatte, in mg Zug umrechnen zu können. Wenn nichts anderes vermerkt, wurden die Messungen an 3 Organen von verschiedenen Tieren wiederholt.

Erstellung von Inhibitionskurven:

Nach erfolgter Konditionierung und Inkubation des Antagonisten für 60 Minuten, wurde erneut 1 bzw. 10 µM αβmeATP appliziert, um die Hemmung der Kontraktion zu bestimmen. Als Referenz diente dabei jeweils die Kontraktion vor

MATERIAL UND METHODEN

Antagonistengabe am selben Organ. Im Anschluss erfolgte bei reversiblen Antagonisten eine mindestens einstündige Auswaschphase, in der im Abstand von 30 Minuten $\alpha\beta$ meATP zugegeben wurde. Erreichte die Kontraktion wieder den Zug des Organs nach der Konditionierung ($\pm 10\%$), so wurde erneut eine um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Konzentration des gleichen Antagonisten inkubiert.

Aus den Hemmwerten wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression pIC_{50} -Werte ermittelt (Kapitel 2.3.1.).

Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven:

Nach erfolgter Konditionierung wurden steigende Konzentrationen von $\alpha\beta$ meATP (0,1-100 μ M) in Form von Einzelgaben in das Organbad gegeben. Aufgrund der schnellen Desensibilisierung des P2X₁-Rezeptors wurden mit zunehmender Konzentration längere Regenerationsphasen vor der Agonistengabe eingehalten (0,1-10 μ M: 15 Minuten; 30 μ M: 30 Minuten; 100 μ M: 45 Minuten und bei Inkubationskurven 300 μ M: 60 Minuten). Nach der durch 100 μ M $\alpha\beta$ meATP ausgelösten Kontraktion wurde der Antagonist für 60 Minuten inkubiert. Danach erfolgte erneut eine Applikation steigender Agonistenkonzentrationen (bis 300 μ M) in Form von Einzelgaben in Anwesenheit des Antagonisten.

Aus den Kontraktionen wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und pEC_{50} -Werte für die Referenz- und Inkubationskurven ermittelt (Kapitel 2.3.2.). Für die Berechnung der „dose ratio“ und der pA_2 -Werte wurden pEC_{50} -Werte der Referenz- und der Inkubationskurve des selben Organs verwendet.

2.2.1.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum

Dunkin-Hartley-Meerschweinchen wurden durch Begasung mit CO₂ und anschließender Dekapitation getötet. Nach der Methode von Kennedy und Humphrey (1994) wurde der Bauchraum geöffnet und ausgehend vom Caecum das umgebende Mesenterium auf den ersten 5-10 cm vom Ileum entfernt. Mit gleichmäßigem Zug in vertikale Richtung wurde das Ileum herausgezogen und in eine mit Carbogen begaste Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Mit Hilfe eines mit Puffer getränkten Wattebauschs wurde das Ileum auf eine gut befeuchtete 1-ml-Pipette aufgezogen und ständig befeuchtet. Es wurde ein Längsschnitt durchgeführt, so dass mit Hilfe des nassen Wattebauschs die Längsmuskulatur von der Ringmuskulatur

abgewaschen werden konnte. Die Longitudinalmuskulatur wurde in Form von 1,5 cm langen Präparaten in die Organbäder überführt, die mit 6 ml 37°C warmer, mit Carbogen begaster Krebs-Henseleit-Lösung gefüllt waren.

Allgemeine Bedingungen:

Die Organe wurden mit Baumwollfäden an isometrischen Aufnehmern (TF6V5, W. Fleck, Mainz, Deutschland) mit einer Vorlast von 1000 mg befestigt und für eine Stunde an die Bedingungen adaptiert. Während des gesamten Versuchsablaufs wurde die Pufferflüssigkeit viertelstündlich ausgetauscht. Im Anschluss an die Adaptionphase wurden die Organe durch Einzelgabe von 100 μM $\alpha\beta\text{meATP}$ (P2X₃-Modell) bzw. 100 μM ADP βS (P2Y₁-Modell) zur vollständigen Kontraktion gebracht (Priming). Es folgte eine Equilibrierungsphase von einer Stunde. Danach wurden die Organe durch Einzelgaben von 1 μM $\alpha\beta\text{meATP}$ (P2X₃-Modell) oder 1 bzw. 10 μM ADP βS (P2Y₁-Modell) konditioniert, bis das Ausmaß der Kontraktionen konstant war. Nachdem das Maximum der Kontraktion erreicht war, wurde die Pufferflüssigkeit jeweils ausgetauscht, um ein Desensibilisieren der P2-Rezeptoren zu verhindern. Die untersuchten Antagonisten wurden jeweils mindestens 60 Minuten vorinkubiert. Dazu wurde im Anschluss an jeden Spülgang der Antagonist erneut zugesetzt. Während des gesamten Versuchsablaufs diente jeweils 1 Organ als Kontrolle, um mögliche zeitabhängige Veränderungen der Kontraktionsantwort auf den Agonisten zu ermitteln.

Am Ende des Versuchs wurden die einzelnen Apparaturen mit verschiedenen Gewichten geeicht, um die Signale, die der Schreiber aufgezeichnet hatte, in mg Zug umrechnen zu können. Wenn nichts anderes vermerkt, wurden die Messungen an 3 Organen von verschiedenen Tieren wiederholt.

2.2.1.2.1. Modell des P2X₃-Rezeptors

Erstellung von Inhibitionskurven:

Nach erfolgter Konditionierung und Inkubation des Antagonisten für 60 Minuten, wurde erneut 1 μM $\alpha\beta\text{meATP}$ appliziert und die Hemmung der Kontraktion bestimmt. Als Referenz diente dabei jeweils die Kontraktion vor Antagonistengabe am selben Organ. Im Anschluss erfolgte bei reversiblen Antagonisten eine mindestens einstündige Auswaschphase, in der im Abstand von 30 Minuten $\alpha\beta\text{meATP}$ -Applikation erfolgte. Erreichte die Kontraktion wieder den Zug des Organs nach der

Konditionierung ($\pm 10\%$) so wurde erneut eine um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Konzentration des gleichen Antagonisten inkubiert.

Aus den Hemmwerten wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression pIC_{50} -Werte ermittelt (Kapitel 2.3.1.).

2.2.1.2.2. Modell des P2Y₁-Rezeptors

Erstellung von Inhibitionskurven:

Nach erfolgter Konditionierung und Inkubation des Antagonisten für 60 Minuten, wurde erneut 1 bzw. 10 μM ADP βS appliziert und die Hemmung der Kontraktion bestimmt. Als Referenz diente dabei jeweils die Kontraktion vor Antagonistengabe am selben Organ. Im Anschluss erfolgte bei reversiblen Antagonisten eine mindestens einstündige Auswaschphase, in der im Abstand von 15 Minuten ADP βS -Applikation erfolgte. Erreichte die Kontraktion wieder den Zug des Organs nach der Konditionierung ($\pm 10\%$) so wurde erneut eine um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Konzentration des gleichen Antagonisten inkubiert.

Aus den Hemmwerten wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression pIC_{50} -Werte ermittelt (Kapitel 2.3.1.).

Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven:

Nach erfolgter Konditionierung wurden steigende Konzentrationen von ADP βS (0,1-100 μM) in Form von Einzelgaben im Abstand von 15 Minuten in das Organbad gegeben. Nach der durch 100 μM ADP βS ausgelösten Kontraktion wurde der Antagonist für 60 Minuten inkubiert. Danach erfolgte erneut eine Applikation steigender Agonistenkonzentrationen (bis 300 μM) in Form von Einzelgaben in Anwesenheit des Antagonisten.

Aus den Kontraktionen wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und pEC_{50} -Werte für die Referenz- und Inkubationskurven ermittelt (Kapitel 2.3.2.). Für die Berechnung der „dose ratio“ wurden, falls nicht anderes gekennzeichnet, pEC_{50} -Werte der Referenz- und der Inkubationskurve des selben Organs verwendet.

2.2.2. Ekto-Nukleotidasen von der Kartoffel (Apyrase Grade VII)

Die Hemmung der Apyrase durch die Antagonisten wurde mittels Messung der Phosphatmenge bestimmt, die bei dem enzymatischen Abbau von ATP durch die Apyrase in Gegenwart und Abwesenheit von Antagonisten produziert wurde (Kettlun et al., 1992).

Dazu wurden 0,04 U/ml Apyrase Grade VII in Puffer (100 mM Dinatriumsuccinat, 5 mM CaCl_2 ; mit HCl auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt) gelöst und mit 100 μM ATP und 300 μM Antagonist versetzt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 250 μl pro Teströhrchen ergab. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Schüttelwasserbad bei 30 °C wurde 1 ml SDS-Lösung (2,5% Natriumdodecylsulfat in Wasser) zugesetzt, um die Produktion von anorganischem Phosphat (P_i) aus dem enzymatischen Abbau von ATP zu stoppen. Um das P_i zu bestimmen, wurde 1 ml Ammoniummolybdat-Lösung (1,25% in 2 M HCl) und 0,1 ml des Reduktionsmittels Fiske-Subbarow-Reducer (16%) zugesetzt (Fiske und Subbarow, 1925). Die so behandelten Lösungen wurden in Küvetten überführt und 30 Minuten später spektrophotometrisch bei 700 nm in einem Spectronic Genesis 5 Spektrophotometer vermessen. KH_2PO_4 diente als Phosphatstandard für die Erstellung der Eichgerade. Die Menge an produzierten P_i in Gegenwart eines Antagonisten wurde als Prozent der Menge an P_i berechnet, die in Abwesenheit des Agonisten (Kontrolle) gebildet wurde.

2.2.3. UV-Vis-Spektroskopie verschiedener Antagonisten

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und in Küvetten überführt. Die spektrophotometrische Messung erfolgte in einem Spectronic Genesis 5 Spektralphotometer bei unterschiedlichen Wellenlängen.

2.2.4. Humane Thrombozyten

2.2.4.1. Fluoreszenzspektroskopische Methoden

Grundlagen:

Die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 und Oregon green ® 488 BAPTA-1 werden in Form von lipophilen Acetoxymethylestern (AM), die zellmembranpermeabel und insensitive für Ionen sind, appliziert. Im Zytosol der Thrombozyten wird der Ester durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch die freie Säure der Fluoreszenzfarbstoffe gebildet wird, die ionensensitiv und nicht mehr zellmembranpermeabel ist.

Bei Fura-2 handelt es sich um einen sogenannten ratio-Farbstoff, was bedeutet, dass die calciumgebundene Form (340 nm) und die calciumfreie Form (380 nm) bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Die Emission beider Formen wird bei 510 nm gemessen. Eventuelle Fehlerquellen, wie z.B. Unterschiede in der Farbstoffkonzentration oder -verteilung innerhalb der Zellen, Ausbleichen oder Ausströmen des Farbstoffs werden mit Hilfe der ratio-Messung eliminiert (Abbildung 2.2).

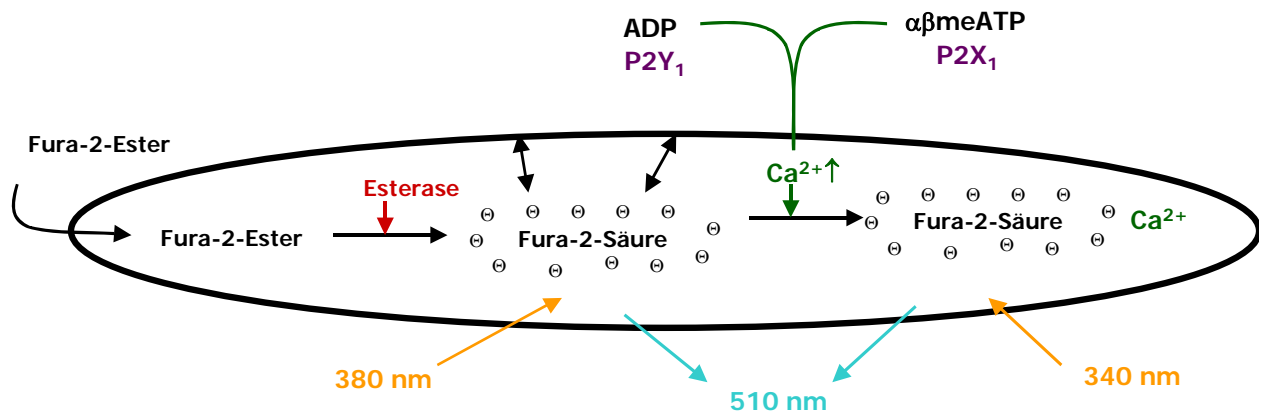


Abbildung 2.2: Prinzip des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2:

Der Ester Fura-2/AM ist zellmembranpermeabel und wird in den Thrombozyten durch Esterasen zur Säure gespalten, die Calcium binden kann. Die calciumfreie und die calciumhaltige Fura-Säure werden durch Licht der Wellenlänge 380 bzw. 340 nm angeregt, die Emission beider Formen wird bei 510 nm gemessen.

Oregon green ® 488 BAPTA-1 ist ein Einwellenlängenfarbstoff. Die calciumfreie und die calciumgebundene Form werden durch die gleiche Wellenlänge angeregt (494

MATERIAL UND METHODEN

nm), wobei die Emission der calciumgebundenen Form bei einer Wellenlänge von 523 nm 14-mal stärker ist als die der calciumfreien Form.

Versuchsdesign:

Die Methode der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung des P2X₁- und P2Y₁-vermittelten [Ca²⁺]_i-Anstiegs wurde von Frau Dr. K. Menke in unserem Labor etabliert und validiert (Menke, 2003).

Das ASS- und Apyrase-enhaltende plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit 2 µM Fura-2/AM bzw. 1 µM Oregon green ® 488 BAPTA-1/AM versetzt und 45 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten in einer Beckmann-Allegria 6 R Zentrifuge 20 Minuten bei Raumtemperatur und 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in nominell calciumfreiem Puffer resuspendiert, der 0,32 U/ml Apyrase enthielt (Zusammensetzung Kapitel 2.1.2.). Dabei entsprach das Puffervolumen dem Volumen des verworfenen Überstands, was zu einer Thrombozytenkonzentration von ca. 10⁸ Zellen/ml führte. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer nach Verdünnen mit Methylblau (1:10 (v/v)) bestimmt.

Alle Experimente wurden in einem Aminco Bowman Fluoreszenzspektrometer (Luminescence Spectrometer Series 2, SLM-Aminco, Spectronic Instruments, Rochester/NY, USA) bei 37°C durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Halbmikro-Quarzküvetten (Hellma ®-Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil ®, Deutschland) unter kontinuierlichem Rühren. Die Substanzen wurden mit Hilfe einer Hamilton Spritze (Bonaduz, Schweiz) durch ein Septum im Deckel der Messkammer während der Messungen zugespritzt. Das Messvolumen betrug 1 ml. Die Zellsuspension wurde vor Beginn der Messung auf 37°C temperiert. Die Antagonisten wurden mindestens 15 Minuten lang vorinkubiert. Fura-2 wurde bei 340 nm (calciumgebundene Form) sowie bei 380 nm (calciumfreie Form) angeregt, die Emission wurde bei 510 nm gemessen. Oregon green ® 488 BAPTA-1 wurde bei 494 nm angeregt, die Emission wurde bei 523 nm gemessen. Messungen waren nur bis maximal 1 Stunde nach Resuspendierung der Thrombozyten im Puffer möglich.

Die Auswertung erfolgte bei Untersuchungen mit Fura-2/AM über die Maximalamplitude der ratio-Messkurve, d.h. der Messkurve die das Verhältnis von calciumgebundener zu calciumfreier Fura-Säure angibt. Bei Messungen mit Oregon green ® 488 BAPTA-1 wurde die Maximalamplitude der Messkurve ausgewertet, die

die Fluoreszenzintensität der calciumgebundenen Farbstoffform widerspiegelt. Um das zeitabhängige Nachlassen der Ansprechbarkeit der Rezeptoren aufgrund von Desensibilisierung zu berücksichtigen, wurde jede 2. Küvette als Kontrolle ohne Antagonist vermessen. Es wurde eine lineare Regression über den Zeitabfall erstellt, worauf die Signale der Inkubationsproben normalisiert wurden. Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism.

Aus den Hemmwerten wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression pIC_{50} -Werte ermittelt (Kapitel 2.3.1.).

2.2.4.1.1. Modell des P2X₁-vermittelten [Ca²⁺]_i-Anstiegs

Zu Beginn der Messung wurden jeder Küvette 2 mM CaCl₂ zugesetzt. Als Agonist wurde 1 μ M $\alpha\beta$ meATP verwendet. Untersuchungen am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wurden ausschließlich mit Frischblut durchgeführt.

2.2.4.1.2. Modell des P2Y₁-vermittelten [Ca²⁺]_i-Anstiegs

Zu Beginn der Messung wurde jeder Küvette 2 mM MgCl₂ als osmotische Kontrolle zugesetzt. Es wurde hier nominell calciumfrei gearbeitet, um ein Einströmen von Calcium durch eventuelle Aktivierung des P2X₁-Rezeptors aus dem Extrazellularraum zu vermeiden. Für die Erstellung von Inhibitionskurven wurden ADP (1 μ M) und ADP β S (1 μ M) als Agonisten verwendet. Beide Substanzen wurden zunächst aufgereinigt. Die Thrombozyten wurden sowohl aus Frischblut wie auch aus Buffy-Coat-Blut isoliert, wobei ca. 2/3 der Versuche an Plättchen aus Frischblut durchgeführt wurden.

Aufreinigung von ADP:

Kommerzielles ADP wurde mit Hilfe des Enzyms Hexokinase von eventuellen Verunreinigungen mit ATP befreit. Der zugrunde liegende Mechanismus ist der Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf Glucose, so dass aus dem ATP ADP gebildet wird. 10 mM ADP wurden in Puffer (in mM: NaCl: 150,0; KCl: 2,5; CaCl₂: 2,5; MgCl₂: 1,0; HEPES: 10,0; Glucose 22; pH-Wert: 8,0) gelöst. Nach Zugabe von 3 U/ml Hexokinase folgte eine Inkubation von 1 Stunde im Schüttelwasserbad bei 37°C. Das ATP-freie ADP wurde bei -20°C gelagert.

Aufreinigung von ADP β S:

Kommerzielles ADP β S wurde mit Hilfe des Enzyms Apyrase Grade VII von eventuellen Verunreinigungen mit ADP befreit. Apyrase katalysiert den Abbau von ATP und ADP zu AMP, was keine Wirkung am P2Y₁-Rezeptor zeigt. 10 mM ADP β S wurden in dem Puffer gelöst, in dem auch die Thrombozyten resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 0,32 U/ml Apyrase wurde 1 Stunde lang im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Das ADP-freie ADP β S wurde bei –20°C gelagert.

2.2.4.1.3. Modell des 5-HT_{2A}-vermittelten [Ca²⁺]_i-Anstiegs

Die Versuchsdurchführung entsprach der der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an P2-Rezeptoren.

Abweichend davon wurden die Thrombozyten in einem Puffer anderer Zusammensetzung (Kapitel 2.1.2.) resuspendiert. Auch hier wurde dem Puffer 0,32 U/ml Apyrase Grade VII zugesetzt. Als Agonist für die Erstellung der Hemmkurven wurde 5-HT (1 μ M) verwendet.

2.2.4.2. Turbidimetrische Methoden

Allgemeine Grundlagen:

Bei Aktivierung der Thrombozyten, durch beispielsweise ADP, kommt es zunächst zu einer Umwandlung der im Ruhezustand in diskoidaler Form vorliegenden Plättchen, wobei Fortsätze, sogenannte Pseudopodien, ausgebildet werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als „shape change“. Kommt es zur Aggregation, so lagern sich viele aktivierte Thrombozyten zu einem Konglomerat zusammen. Diese geschilderten Vorgänge gehen mit einer Änderung der Oberfläche einher; beim „shape change“ vergrößert sich die Gesamtoberfläche der Thrombozyten und bei der Aggregation verringert sie sich (Abbildung 2.3). Diese Veränderungen können durch turbidimetrische Messungen erfasst werden. Dazu wird ein Lichtstrahl einer bestimmten Wellenlänge im Infrarotbereich durch die Plättchensuspension geleitet und die Lichttransmission gemessen. Bei den „shape-change“-Untersuchungen ist eine Abnahme, bei der Aggregation eine Zunahme der Transmission zu beobachten. Kalibriert wurde zu Beginn jeder Messung. Die Lichttransmission durch reine Pufferlösung entspricht 90%, die durch nichtaktivierte Plättchen zu Versuchsbeginn 10%.

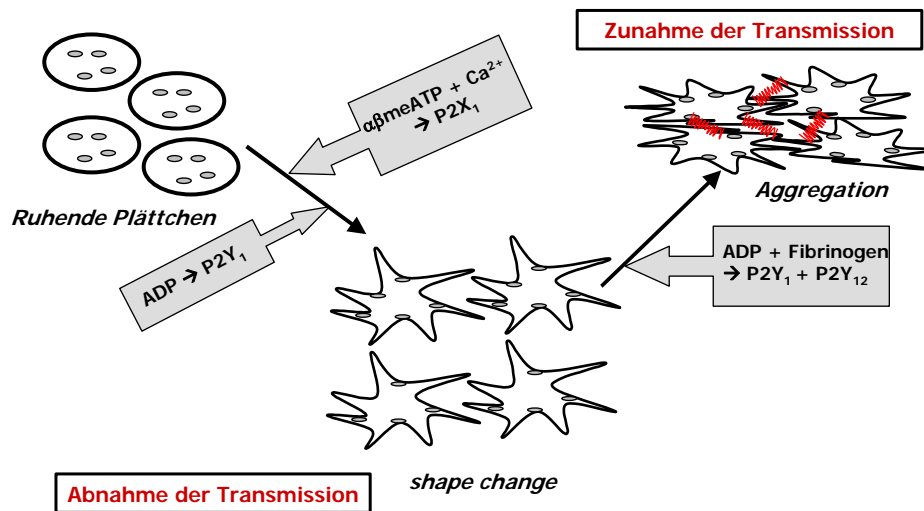


Abbildung 2.3: Prinzip der turbidimetrischen Untersuchungen.

Plättchen im Ruhezustand können durch ADP oder $\alpha\beta\text{meATP}$ aktiviert werden, wodurch es zu einer Formänderung der Thrombozyten kommt („shape change“). Unter dem Einfluss von ADP in Gegenwart von Fibrinogen lagern sich die aktivierten Plättchen zu Agglomeraten zusammen (Aggregation). Der „shape change“ kann über eine Abnahme, die Aggregation über eine Zunahme der Transmission detektiert werden.

Die Untersuchungen wurden in einem Chrono-log Aggregometer Modell 490 (Nobis-Labordiagnostica, Havertown, USA) bei 37°C unter kontinuierlichem Rühren durchgeführt. Vermessen wurden Volumina von 250 μl in beschichteten Glasküvetten (Probe & go, Labordiagnostica, Edingen, Deutschland). Die Messungen liefen über einen Zeitraum von ca. 3 Minuten und wurden mit Hilfe des Computerprogramms Aggro / link control software (Version 4.0) aufgezeichnet. Agonisten, CaCl_2 und Fibrinogen wurden während der Messung mit Hilfe von Eppendorff-Pipetten zugegeben. Vor Messbeginn wurden die Proben ca. 3-6 Minuten auf 37°C vortemperiert. Die Antagonisten wurden mindestens 6 Minuten vor dem Start der Messung zugesetzt. Für die aggregometrischen Untersuchungen wurden die Thrombozyten aus Frischblut wie auch aus Buffy-Coat-Blut isoliert, wobei $\frac{3}{4}$ der Versuche an Plättchen aus Frischblut durchgeführt wurden. Für die „shape-change“-Untersuchungen wurden ausschließlich Thrombozyten aus Frischblut verwendet.

2.2.4.2.1. Modell des P2Y_1 -vermittelten „shape change“

Allgemeine Bedingungen:

Das ASS- und Apyrase- enthaltende plättchenreiche Plasma (PRP) wurde in einer Beckmann-Allegra 6 R Zentrifuge 20 Minuten bei Raumtemperatur und 350 g

MATERIAL UND METHODEN

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in nominell calciumfreiem Puffer resuspendiert, der 0,32 U/ml Apyrase enthielt (Kapitel 2.1.2.). Dabei entsprach das Puffervolumen dem dreifachen Volumen des verworfenen Überstands, was zu einer Thrombozytenkonzentration von ca. $3 \cdot 10^7$ Zellen/ml führte. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer nach Verdünnen mit Methylenblau (1:10 (v/v)) bestimmt. Unmittelbar zu Messbeginn vor der Kalibration wurde der Probe 2 mM CaCl_2 zugesetzt. Der Agonist ADP_{HEX} (aufgereinigtes ADP, siehe Kapitel 2.2.3.1.2.) wurde ca. 30 Sekunden nach Messbeginn zugegeben.

Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven:

In zufälliger Reihenfolge wurden Agonistenkonzentrationen von 0,03 bis 100 μM vermessen. Da es sich bei dem Aggregometer um ein Zweikanal Messgerät handelt, wurden parallel Proben in Gegenwart und Abwesenheit von Antagonisten mit der gleichen Agonistenkonzentration untersucht. Somit wurde jeweils parallel eine Referenz- und eine Inkubations-Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt.

Ausgewertet wurde die Steigung der „shape-change“-Signale. Dazu wurden die erhaltenen Daten in das Computerprogramm Graph Pad Prism exportiert. Mittels linearer Regression wurde eine Tangente an die steilste Stelle des Kurvenverlaufs angelegt (Abbildung 2.4). Die Steigung der Tangente an das durch 100 μM ADP induzierte „shape-change“-Signal in der Kontrollmessung wurde als 100% gesetzt. Alle Messwerte der Referenz- und Inkubationsproben wurden darauf normalisiert.

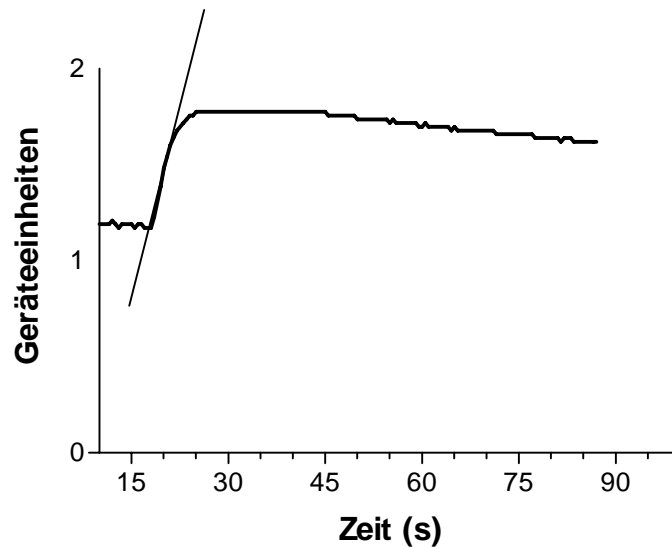


Abbildung 2.4: „shape change“-Signal induziert durch 1 μM ADP. Ausgewertet wurde die Steigung der Tangenten an den steilsten Kurvenverlauf der „shape-change“-Signale.

Aus den normalisierten Werten wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und pEC_{50} -Werte für die Referenz- und Inkubationskurve ermittelt (Kapitel 2.3.2.). Für die Berechnung der „dose ratio“ und pA_2 -Werte wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, pEC_{50} -Werte der zeitgleich ermittelten Referenz- und der Inkubationskurve verwendet.

2.2.4.2.2. Modell des P2X_1 -vermittelten „shape change“

Allgemeine Bedingungen:

Das Versuchsprotokoll entsprach dem der Untersuchungen des P2Y_1 -vermittelten „shape change“. Abweichend davon wurden die Thrombozyten in Puffer resuspendiert, der 0,6 U/ml Apyrase Grade VII enthielt. Dabei entsprach das Puffervolumen dem doppelten Volumen des verworfenen Überstands, was zu einer Thrombozytenkonzentration von ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen/ml führte. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer nach Verdünnen mit Methylenblau (1:10 (v/v)) bestimmt. Unmittelbar zu Messbeginn vor der Kalibration wurde der Probe 10 mM CaCl_2 zugesetzt. Als Agonist wurde $\alpha\beta\text{meATP}$ verwendet.

Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven:

Die Untersuchungen und Auswertungen erfolgten analog denen des P2Y₁-vermittelten „shape change“. Es wurden Agonistenkonzentrationen von 0,3 bis 300 µM verwendet.

2.2.4.2.3. Modell der ADP-vermittelten Aggregation

Allgemeine Bedingungen:

Das ASS- und Apyrase-enhaltende plättchenreiche Plasma (PRP) wurde in einer Beckmann-Allegra 6 R Zentrifuge 20 Minuten bei Raumtemperatur und 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in nominell calciumfreiem Puffer resuspendiert, der 0,32 U/ml Apyrase enthielt (Kapitel 2.1.2.). Dabei entsprach das Puffervolumen dem Volumen des verworfenen Überstands, was zu einer Thrombozytenkonzentration von ca. 10^8 Zellen/ml führte. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer nach Verdünnen mit Methylenblau (1:10 (v/v)) bestimmt. Unmittelbar vor Messbeginn wurden der Probe 2 mM CaCl₂ und 0,8 mg/ml Fibrinogen zugesetzt. Der Agonist ADP_{HEX} (aufgereinigtes ADP siehe Kapitel 2.2.3.1.2.) wurde ca. 60 Sekunden nach Messbeginn zugegeben.

Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven:

In zufälliger Reihenfolge wurden Agonistenkonzentrationen von 0,3 bis 300 µM vermessen. Da es sich bei dem Aggregometer um ein Zweikanal Messgerät handelt, wurden parallel Proben in Gegenwart und Abwesenheit von Antagonisten mit der gleichen Agonistenkonzentration vermessen. Somit wurde jeweils parallel eine Referenz- und eine Inkubations-Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt.

Ausgewertet wurde die Steigung der Aggregationssignale mit Hilfe des Computerprogramms Aggro / link control software (Version 4.0) durch Anlegen einer Tangente an den steilsten Punkt der Aggregationskurve (Abbildung 2.5). Die Steigung der Tangente an das durch 300 µM ADP induzierte Signal in der Kontrollmessung wurde als 100% gesetzt. Alle Messwerte der Referenz- und Inkubationsproben wurden darauf normalisiert.

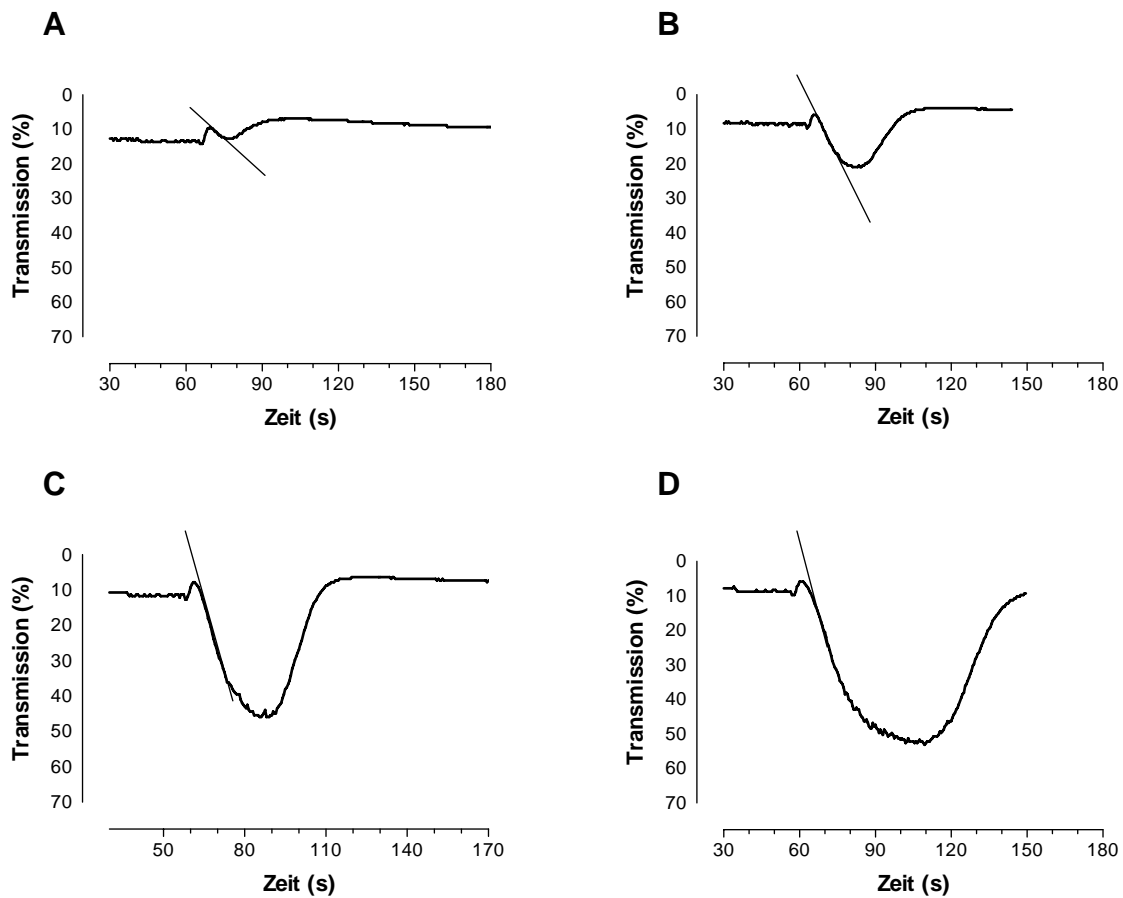


Abbildung 2.5: Aggregation induziert durch (A) 1 μM ADP; (B) 3 μM ADP, (C) 10 μM ADP und (D) 30 μM ADP. Die Auswertung erfolgte über die Steigung der Tangente, die an den steilsten Punkt der Messkurve angelegt wurde.

Aus den normalisierten Steigungen wurden mit Hilfe nichtlinearer Regression Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und pEC_{50} -Werte für die Referenz- und Inkubationskurve ermittelt (Kapitel 2.3.2.). Für die Berechnung der „dose ratio“ und der pA_2 -Werte wurden, falls nicht anderes gekennzeichnet, pEC_{50} -Werte der zeitgleich ermittelten Referenz- und der Inkubationskurve verwendet.

2.3. Auswertung

2.3.1. Ermittlung von pIC_{50} -Werten

Unter dem IC_{50} -Wert versteht man die molare Konzentration eines Antagonisten, die nötig ist, um die Wirkung, verursacht durch eine definierte, konstante Konzentration eines Agonisten, halbmaximal zu hemmen. Zunächst wurde die prozentuale Hemmung jeder Antagonistenkonzentration bezogen auf den Referenzeffekt bestimmt. Die arithmetischen Mittelwerte der Hemmungen für die jeweiligen Antagonistenkonzentrationen wurden einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Regression (Gleichung 1) mit variabler Steigung unterzogen (Graphpad Software inc. 1996, Graphpad Prism 3.03). Diese Gleichung basiert auf sigmoidalen Funktionen zur mathematischen Beschreibung der Wirkung eines Agonisten (siehe unten) nach Parker und Waud (1971).

$$(1) \quad E_B = E_{\max} \times [B]^p / ([B]^p + IC_{50}^p)$$

E_B = Effekt bei einer bestimmten Konzentration des Antagonisten

E_{\max} = maximal erreichbarer inhibitorischer Effekt

$[B]$ = Konzentration des Antagonisten

p = Steigung der Dosis-Inhibitions-Kurve

IC_{50} = molare Konzentration des Antagonisten, die zur halbmaximalen Hemmung eines Effektes nötig ist

Die pIC_{50} -Werte wurden gemäß Gleichung (2) ermittelt:

$$(2) \quad pIC_{50} = -\log IC_{50}$$

2.3.2. Ermittlung von EC_{50} - und pA_2 -Werten

Unter dem EC_{50} -Wert versteht man die Agonistenkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt auslöst. Es wurde der prozentuale Effekt bezogen auf den durch die höchste Agonistenkonzentration ohne Antagonist ermittelt.

MATERIAL UND METHODEN

Die arithmetischen Mittelwerte der Effekte für die jeweiligen Agonistenkonzentrationen wurden einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Regression (Gleichung 3) mit variabler Steigung unterzogen (Graphpad Software inc. 1996, Graphpad Prism 3.03). Diese Gleichung basiert auf sigmoidalen Funktionen zur mathematischen Beschreibung der Wirkung eines Agonisten (siehe unten) nach Parker und Waud (1971).

$$(3) \quad E_A = E_{\max} \times [A]^p / ([A]^p + EC_{50}^p)$$

E_A	=	Effekt bei einer bestimmten Konzentration des Agonisten
E_{\max}	=	maximal erreichbarer Effekt
$[A]$	=	Konzentration des Agonisten
p	=	Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve
EC_{50}	=	molare Konzentration des Agonisten, die für den halbmaximalen Effekt notwendig ist

Die pEC_{50} -Werte wurden gemäß Gleichung (4) ermittelt:

$$(4) \quad pEC_{50} = -\log EC_{50}$$

Unter dem pA_2 -Wert versteht man den negativ dekadischen Logarithmus der Antagonistenkonzentration, die notwendig ist, um die Dosis-Wirkungs-Kurve des Agonisten um den Faktor 2 nach rechts zu verschieben.

Zum Zwecke der Ermittlung von pA_2 -Werten erfolgte die Bestimmung von pEC_{50} -Werten (siehe Gleichung 3 und 4) des Agonisten in Abwesenheit und in Anwesenheit des Antagonisten. Um Agonist-Konzentrations-Verhältnisse („dose ratio“) zu ermitteln wurden die erhaltenen EC_{50} -Werte in die Gleichung (5) eingesetzt, woraus der absolute Betrag (dr, für „dose ratio“) resultiert:

$$(5) \quad \log (dr) = pEC_{50} [A] - pEC_{50} [a].$$

$pEC_{50} [A]$ = Agonist-Konzentration in Anwesenheit eines Antagonisten [B], die nötig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen.

MATERIAL UND METHODEN

pEC_{50} [a] = Agonist-Konzentration die nötig ist, um den halbmaximalen Effekt in Abwesenheit des Antagonisten zu erreichen.

Nach Arunlakshana und Schild (1959) ergibt sich Gleichung (6).

$$(6) \quad dr = 1 + [B] / K_B.$$

[B] = Konzentration des Antagonisten

K_B = Dissoziationskonstante des Antagonisten

Anschließend erfolgte die logarithmische Umformung der Gleichung (6) zu Gleichung (7).

$$(7) \quad \log (dr - 1) = \log [B] - \log (K_B) \quad \rightarrow \quad \log (K_B) = \log (dr - 1) - \log [B].$$

Einzelne pA_2 -Werte wurden gemäß Gleichung (7) und (8) ermittelt:

$$(8) \quad pA_2 = -\log (K_B)$$

Wurden 3 oder mehr Konzentrationen eines Antagonisten getestet, erfolgte die Bestimmung der pA_2 -Werte durch die sogenannte Schild-Analyse (Arunlakshana und Schild, 1959).

Dazu wurde der Term $\log (dr - 1)$ gegen $\log [B]$ graphisch dargestellt. Es wurde eine lineare Regression nach Gleichung (9) durchgeführt (Tallarida und Murray, 1986).

$$(9) \quad \log (dr - 1) = m \times \log [B] - \log (K_B).$$

m = Steigung der Regressionsgeraden

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse, das heißt der negative dekadische Logarithmus derjenigen Antagonistenkonzentration bei der $\log (dr - 1) = 0$ ist, wurde als pA_2 -Wert bezeichnet (Gleichung (7) – (9)).

Der Antagonismus wurde als rein kompetitiv betrachtet, wenn die Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten parallel nach rechts verschoben wurden und die Steigung der

Regressionsgeraden in der Schild-Analyse nicht signifikant von 1 verschieden war ($p < 0,05$). War dies der Fall, wurde bei der Schild-Analyse in einem zweiten Berechnungsschritt die Steigung in Gleichung (9) durch das Computerprogramm gleich 1 gesetzt.

2.4. Statistik

Die Angaben experimentell ermittelter Daten erfolgte in Form von Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) für die Anzahl (n) der durchgeführten Versuche. Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden auf statistische Signifikanz mittels Student-t-Test (Graph Pad Prism) und Newman-Keuls-Test (Tallarida und Murray, 1986) geprüft und als signifikant betrachtet, wenn der Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 0,05 war. Lineare Regressionen wurden mit Hilfe des Programms PHARM/PCS (Version 4.1, Pharmacological Calculation System, Tallarida und Murray, 1986) und mit dem Programm Graph Pad Prism (Graphpad Software inc, 1986) durchgeführt. Die nicht-lineare Regression wurde unter Verwendung der logistischen 4-Parameter-Funktion nach Parker und Waud (1971) mit Hilfe von Graph Pad Prism ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen an nativen P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe

3.1.1. MRS2179

3.1.1.1. Rezeptorselektivität an purinergen Rezeptoren

Bei MRS2179 (Strukturformel Abbildung 3.12) handelt es sich um einen selektiven kompetitiven Antagonisten an rekombinanten P2Y₁-Rezeptoren (Boyer et al., 1998). Ziel unserer Untersuchungen war es, zu ermitteln, wie sich MRS2179 an nativen Geweben verhält. K. Menke konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass MRS2179 ein nichtkompetitiven Antagonist am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum ist ($pA_2 = 6,2 - 6,8$) (Menke, 2003). Daran anknüpfend wurden Untersuchungen hinsichtlich der Rezeptorselektivität von MRS2179 am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum und am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens durchgeführt (Abbildung 3.1).

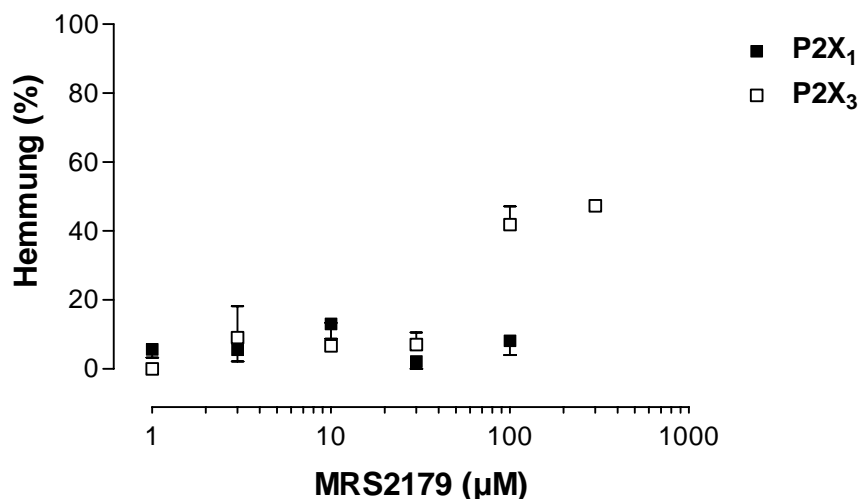


Abbildung 3.1: Einfluss von MRS2179 am Meerschweinchen-Ileum gegen $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelte Kontraktionen (P2X₃) und am Ratten-Vas-deferens gegen $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelte Kontraktionen (P2X₁). Die Daten sind Mittelwerte aus 2-5 Einzelexperimenten.

Die Gabe von 1 μ M $\alpha\beta$ meATP führte zu schnellen, transienten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum (durchschnittlicher Zug \pm S.E.M.: 771 ± 74 mg, n = 23). Erst

ERGEBNISSE

100 μM MRS2179 zeigte eine signifikante Hemmung der Kontraktionen von $42 \pm 5,2$ % (Abbildung 3.1).

Am Ratten-Vas-deferens führte die Gabe von 1 μM $\alpha\beta\text{meATP}$ ebenfalls zu schnellen, transienten Kontraktionen (durchschnittlicher Zug \pm S.E.M.: 565 ± 57 mg). 1 - 100 μM MRS2179 zeigten keine signifikante Hemmung der Kontraktionen. MRS2179 erwies sich somit am P2X_1 -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens als völlig wirkungslos.

3.1.1.2. Stabilität von MRS2179 in Gegenwart des Ratten-Vas-deferens

Zur Aufklärung der Diskrepanz zwischen der antagonistischen Potenz an rekombinanten P2X_1 -Rezeptoren und der an P2X_1 -Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens wurden Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität von MRS2179 am Ratten-Vas-deferens durchgeführt.

Eine Überlegung war, dass MRS2179 von Enzymen des Ratten-Vas-deferens abgebaut wird. Durch das Versuchsdesign zur Bestimmung des pIC_{50} am Ratten-Vas-deferens gegen $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 μM) ergibt sich, dass sich MRS2179 zum Zeitpunkt der Agonistenzugabe 15 Minuten im Organbad befindet.

Deshalb wurde die Inkubationszeit von MRS2179 zwischen Koapplikation und Vorinkubation von 15 Minuten variiert.

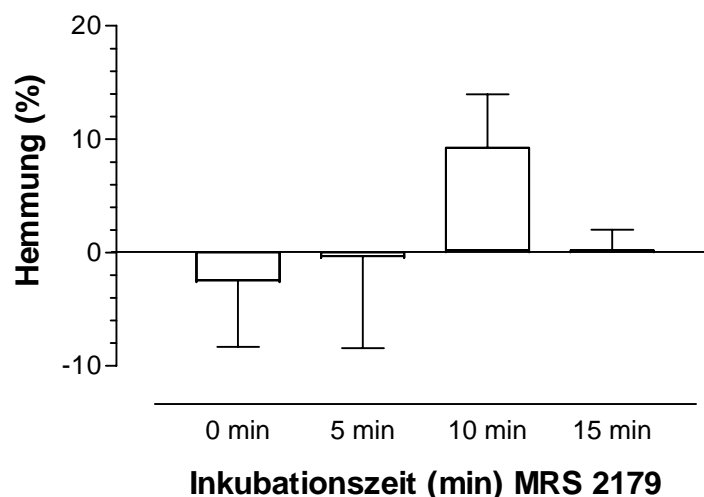


Abbildung 3.2: Hemmung von MRS2179 (100 μM) am Ratten-Vas-deferens gegen $\alpha\beta\text{meATP}$ (1 μM)-vermittelte Kontraktionen nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Der Versuch zeigte, dass bei keiner der gewählten Inkubationszeiten von MRS2179 eine signifikante Hemmung $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelter Kontraktionen am Ratten-Vas-deferens festzustellen war (Abbildung 3.2).

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität von MRS2179 am Ratten-Vas-deferens wurde die Hemmwirkung von MRS2179 (10 μ M) am Meerschweinchen-Ileum gegen ADP β S (10 μ M)-vermittelte Kontraktionen in An- und Abwesenheit von Ratten-Vas-deferens untersucht. Dazu befanden sich 1,5 cm lange Stücke Ratten-Vas-deferens von Versuchsbeginn an im Organbad der Meerschweinchen-Ileum-Organe.

Ziel war es herauszufinden, ob MRS2179 von Enzymen des Ratten-Vas-deferens zu Metaboliten abgebaut wird, die am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum unwirksam sind.

Tabelle 3.1.: Hemmwirkung von 10 μ M MRS2179 auf ADP β S (10 μ M)-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum in An- und Abwesenheit von Ratten-Vas-deferens

Inkubation	Hemmung (%)	S.E.M.	n
MRS2179 (10 μ M)	86,2	2,4	11
MRS2179 (10 μ M) + Ratten-Vas-deferens	70,3	4,6	11

Die Versuche ergaben keinen signifikanten Unterschied der Hemmwirkung von 10 μ M MRS2179 gegen ADP β S-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum in An- oder Abwesenheit vom Ratten-Vas-deferens (Tabelle 3.1). Daraus kann man schließen, dass MRS2179 vom Ratten-Vas-deferens nicht zu Metaboliten abgebaut wird, die am P2Y₁-Rezeptor unwirksam sind.

3.1.1.3. Kinetik am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

Zur weiteren Charakterisierung der Substanz wurde die Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 3 μ M MRS2179 gegen ADP β S (10 μ M)-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum bestimmt. Die Untersuchung zeigte, dass nach 15 Minuten die Kontraktion auf 51 % gehemmt wurde und nach 30 Minuten die maximale Hemmung auf 42 % der Referenz erreicht war. Beim Auswaschen wurde innerhalb von 15 Minuten die Kontraktilität des Organs vollständig wiederhergestellt

ERGEBNISSE

(Abbildung 3.3). Es handelt sich bei MRS2179 somit um einen Antagonisten, der am P2Y₁-Rezeptor schnell anflutet und sich rasch und vollständig Auswaschen lässt.

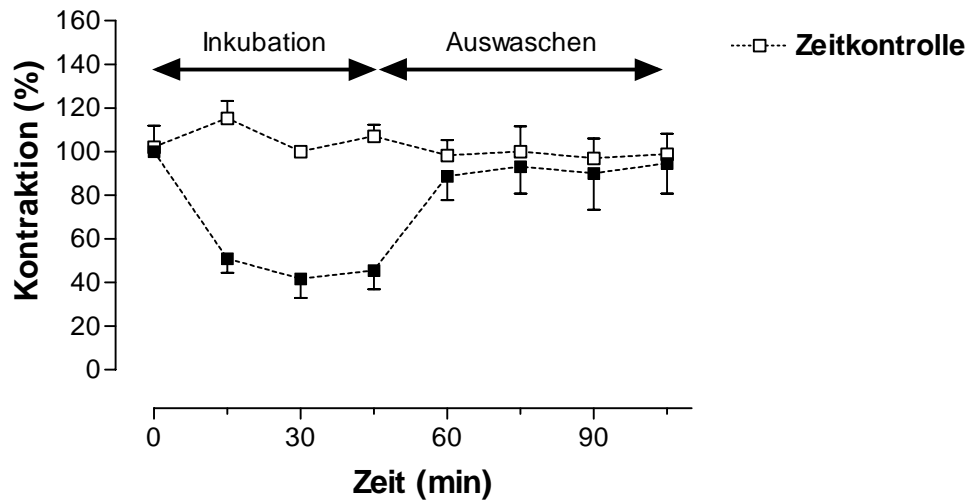


Abbildung 3.3: Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 3 µM MRS2179 gegen ADPβS (10 µM)-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum. Als 100 % wurde die Kontraktion eines Referenzorgans zum Zeitpunkt 0 (= Zugabe des Antagonisten) gewählt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelexperimenten ± S.E.M..

3.1.2. PPADS- und PPNDS-Analoga

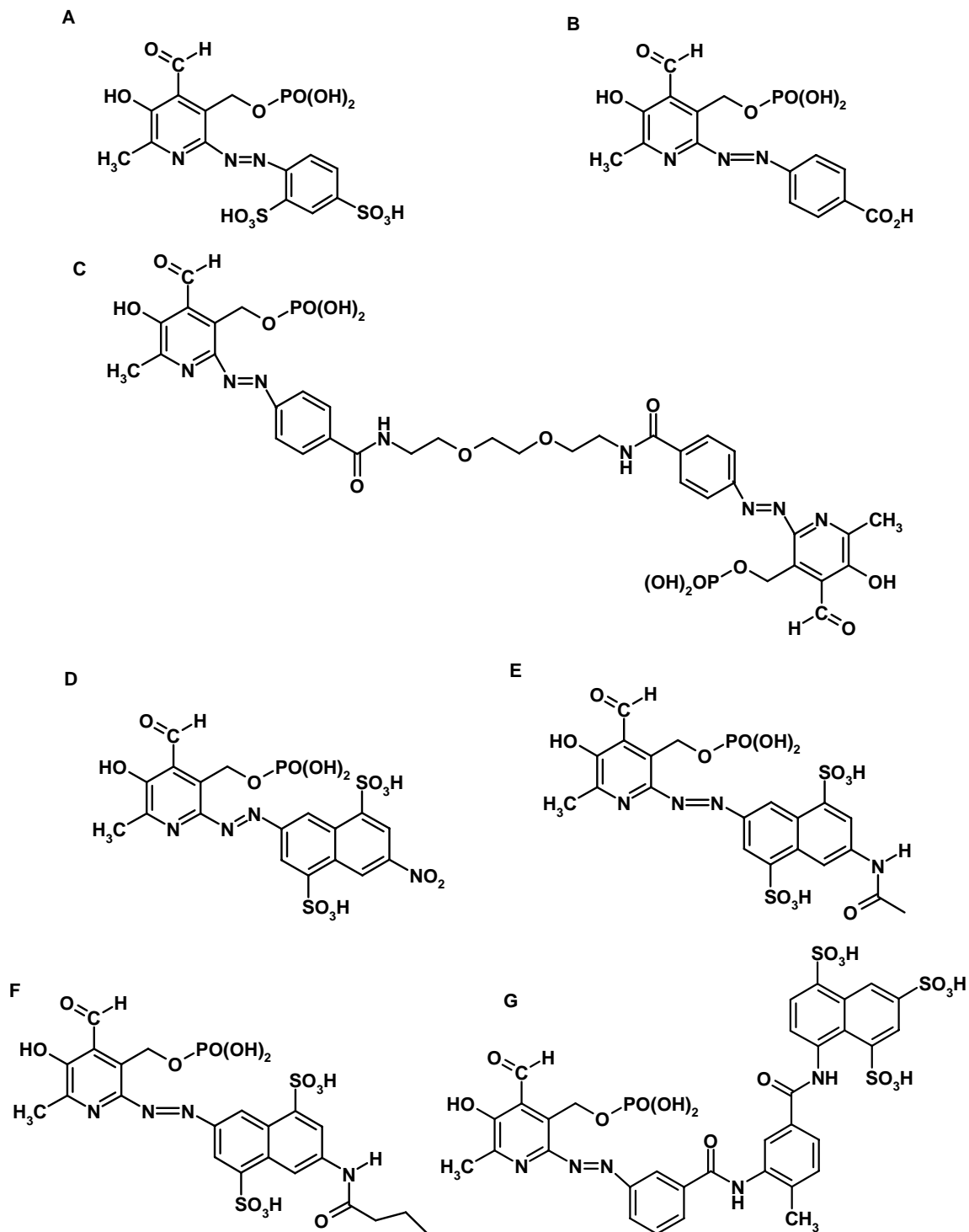


Abbildung 3.4: Strukturformel von (A) PPADS, (B) MRS2159, (C) CLII, (D) PPNDS, (E) NAC, (F) N-Butyl und (G) SB9.

Ausgehend von den Leitstrukturen PPADS und PPNDS wurden einige Strukturanaloga hinsichtlich ihrer P2-antagonistischen Wirkung an isolierten Organen

ERGEBNISSE

untersucht. Die Strukturvariationen wurden am Phenylring von PPADS durchgeführt, wo der Einfluss des Austauschs von Sulfonsäure- durch Carbonsäure-Reste (MRS2159), eine Dimerisierung des Moleküls (CLII), Ersatz des Phenylrings durch eine Naphthylsulfonsäuregruppe mit para-ständiger Nitrogruppe (PPNDS), Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe und Amidierung (NAC, N-Butyl) sowie Heterodimerisierung von PPADS- und Suramin-Strukturfragmenten (SB9) auf den P2-Antagonismus untersucht wurden (Abbildung 3.4).

3.1.2.1. Untersuchungen am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens

3.1.2.1.1. Hemmkurven der $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens

1 μ M $\alpha\beta$ meATP löste schnell einsetzende transiente Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens aus (durchschnittlicher Zug \pm S.E.M.: 382 ± 15 mg, n = 69), die durch die Substanzen PPADS, MRS2159, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl und SB9 konzentrationsabhängig gehemmt wurden. Nichtlineare Regression der Daten ergab die in Abbildung 3.5 abgebildeten Inhibitionskurven und die in Tabelle 3.2 aufgeführten pIC₅₀-Werte.

Im Vergleich zu PPADS führte der Ersatz der beiden Sulfonsäuregruppen durch eine Carbonsäuregruppe am Phenylring bei MRS2159 zu einer Steigerung der Hemmwirkung am P2X₁-Rezeptor gegenüber PPADS um den Faktor 14. Dimerisierung von MRS2159 zu CLII ergab keine geänderte P2X₁-antagonistische Wirkung im Vergleich zum Monomer.

Auch der Ersatz der Phenylsulfonsäuregruppe beim PPADS durch eine nitrierte Naphthylsulfonsäuregruppe beim PPNDS zeigte eine Steigerung der inhibitorischen Eigenschaften am P2X₁-Rezeptor um den Faktor 9. Die Reduktion der Nitrogruppe von PPNDS zur Aminogruppe und Acetylierung beim NAC machte sich in einer geringen Abschwächung (Faktor 2) der P2X₁-antagonistischen Wirkung bemerkbar. Der Austausch der Acetylgruppe durch eine Butyrylgruppe beim N-Butyl zeigte keinen Einfluss auf die Hemmwirkung am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens.

Bei dem Heterodimer SB9 war eine leichte Steigerung (Faktor 3) der antagonistischen Wirkstärke am P2X₁-Rezeptor im Vergleich zu PPADS zu erkennen.

ERGEBNISSE

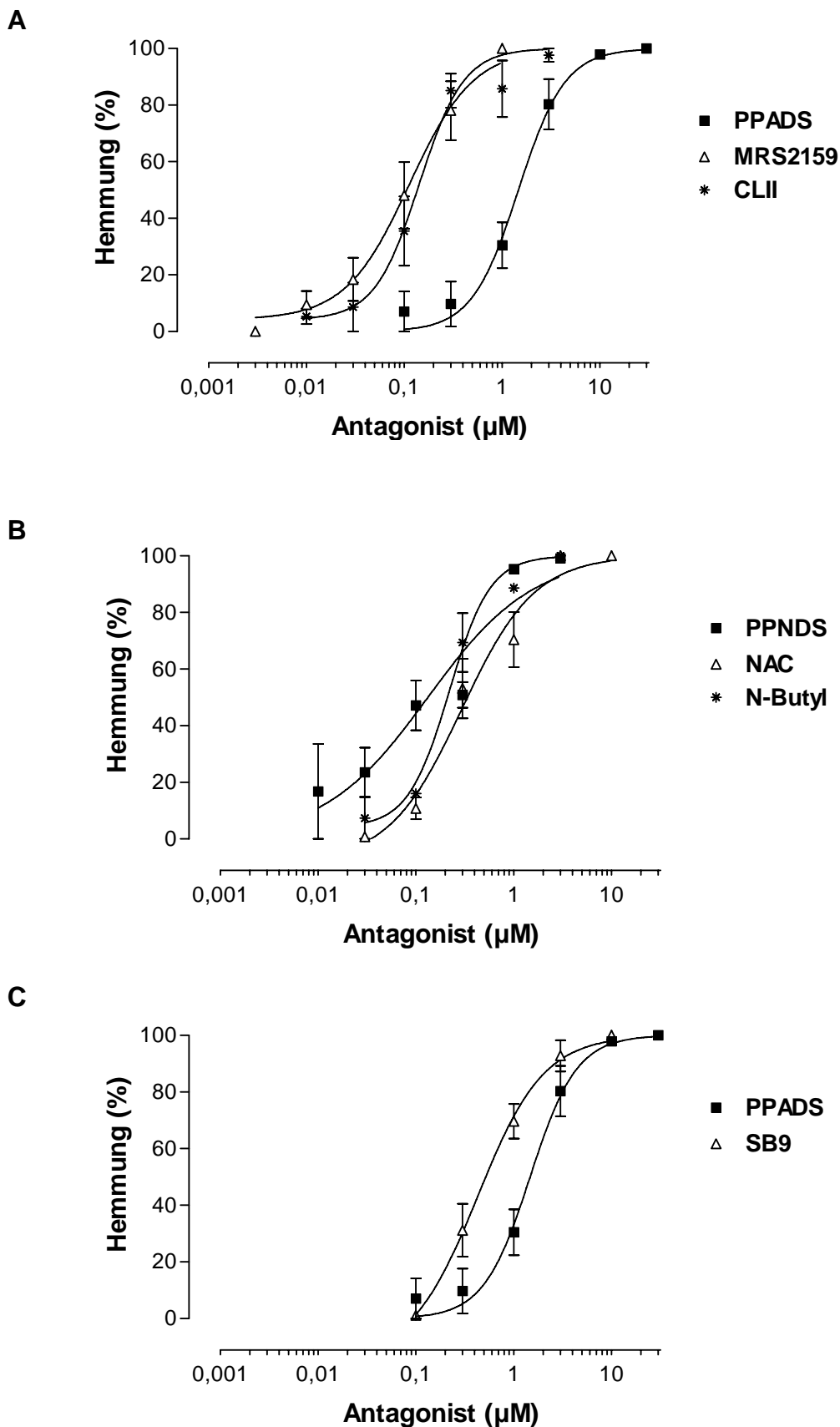


Abbildung 3.5: Inhibitionskurven von (A) PPADS, MRS2159 und CLII, (B) PPNDS, NAC und N-Butyl sowie (C) PPADS und SB9 gegen $\alpha\beta$ meATP ($1 \mu\text{M}$)-vermittelte Kontraktionen am Ratten-Vasdeferens. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Es ergibt sich folgende Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens:

MRS2159 ≥ CLII ≥ PPNDS ≥ N-Butyl ≥ NAC > SB9 > PPADS.

Tabelle 3.2: pIC₅₀-Werte + S.E.M. der PPADS- und PPNDS-Analoga gegen αβmeATP (1 μM)-vermittelte Kontraktionen am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens.

PPADS	MRS2159	CLII	PPNDS	NAC	N-Butyl	SB9
5,83 ± 0,04	6,99 ± 0,04	6,87 ± 0,05	6,79 ± 0,08	6,46 ± 0,08	6,66 ± 0,05	6,26 ± 0,05

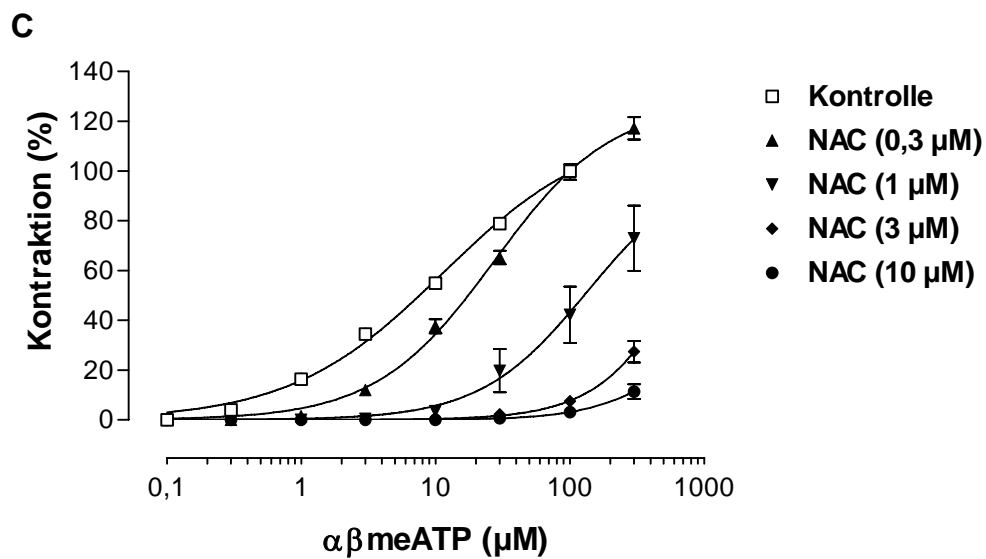
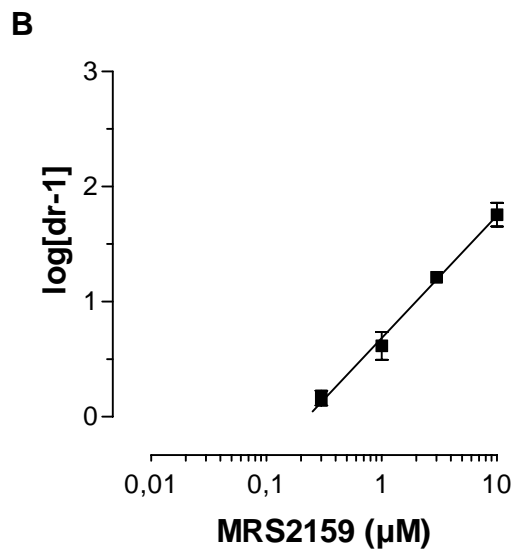
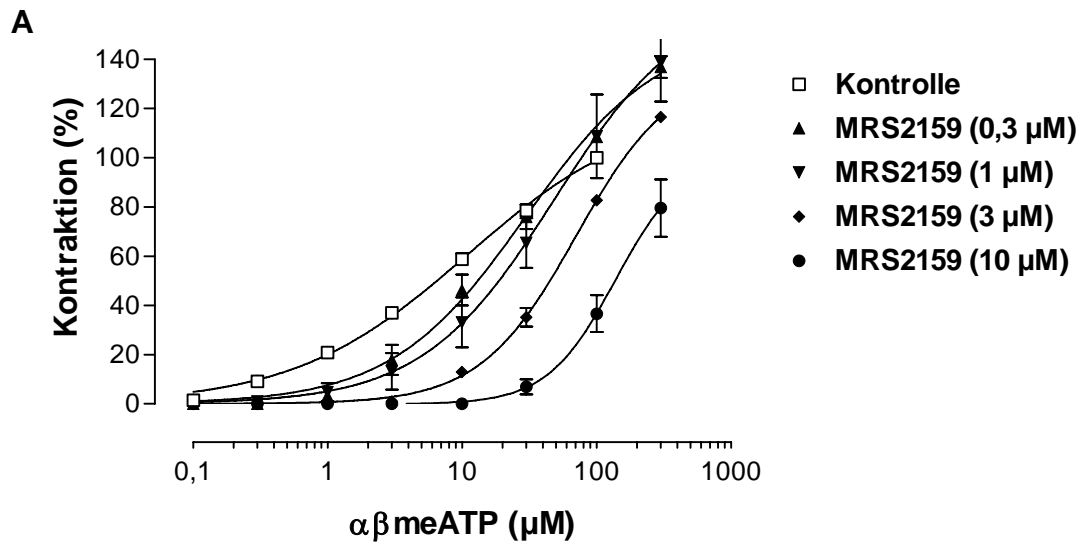
3.1.2.1.2. Schild-Analyse der αβmeATP-vermittelten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens von MRS2159 und NAC

Zur genaueren Untersuchung der Inhibition am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens wurden Schild-Analysen von einigen Substanzen erstellt. Schild-Analysen der Substanzen PPADS, CLII, PPNDS und SB9 existierten bereits und waren in der Literatur beschrieben (Lambrecht et al., 2000A, 2000B, 2002).

Zur Bestimmung der antagonistischen Potenz von MRS2159 und NAC wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von αβmeATP in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Antagonisten erstellt (Abbildung 3.6). Anhand der Schild-Analysen wurden pA₂-Werte ermittelt.

Durch steigende Einzelgaben von αβmeATP kam es zu zunehmenden Kontraktionen der Ratten-Vasa-deferentia, die allerdings kein klar definiertes Maximum erreichten (Zug bei 100 μM αβmeATP: 2321 ± 103 mg; n = 32). Die Zeitkontrollen waren nahezu deckungsgleich mit der Referenzkurve (Daten nicht gezeigt), woraus man schließen kann, dass keine zeitabhängigen Veränderungen an den Organen festzustellen waren, was eine Korrektur nicht notwendig machte. Da die Kontrollkurven kein definiertes Maximum erreichten kann nur ein scheinbarer pEC₅₀-Wert von αβmeATP von 5,25 ± 0,05 (n = 16); MRS2159 bzw. 5,17 ± 0,05 (n = 15); NAC angegeben werden, bei dem die Kontraktion, die 100 μM αβmeATP auslöste, als 100 % gesetzt wurde.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

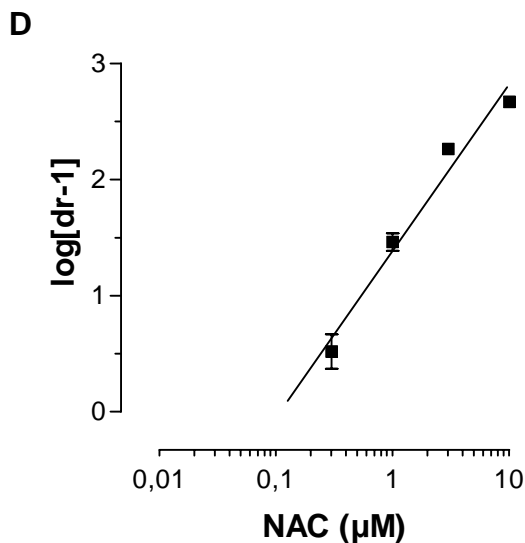


Abbildung 3.6: Antagonismus von MRS2159 und NAC auf die $\alpha\beta$ meATP-induzierte Kontraktion am Ratten-Vas-deferens. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-16 Einzelexperimenten \pm S.E.M.. **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurve der $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktion des Ratten-Vas-deferens in An- und Abwesenheit von MRS2159. **(B)** Schild-Regression von MRS2159 am Ratten-Vas-deferens. Die „dose ratio“ wurde mit Hilfe von EC_{20} -Werten ermittelt. **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve der $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktion am Ratten-Vas-deferens in An- und Abwesenheit von NAC. **(D)** Schild-Regression von NAC am Ratten-Vas-deferens. Die „dose ratio“ wurde mit Hilfe von EC_{20} -Werten (0,3-3 μ M NAC) bzw. EC_{10} -Werten (10 μ M NAC) ermittelt.

MRS2159 (0,3 – 10 μ M) und NAC (0,3 – 10 μ M) zeigten keinen agonistischen Effekt am Vas deferens der Ratte, aber bewirkten eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der $\alpha\beta$ meATP-induzierten Dosis-Wirkungs-Kurve.

Allerdings wurde in Anwesenheit der Antagonisten unabhängig von der Konzentration eine Kurvenversteilung beobachtet, weshalb die „dose ratio“ mit Hilfe von EC_{20} -Werten ermittelt wurde, da bei 20 % Effekt ein paralleler Kurvenverlauf gegeben war. Einzel- pA_2 -Werte wurden mit Hilfe der Schild-Gleichung bei den einzelnen Antagonistenkonzentrationen berechnet (Tabelle 3.3).

Im Falle von MRS2159 waren die Einzel- pA_2 -Werte nicht signifikant voneinander verschieden. Die Schild-Analyse ergab eine Gerade mit der Steigung $1,07 \pm 0,08$, die nicht signifikant von 1 abwich, was für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Zur Ermittlung des Gesamt- pA_2 -Wertes wurde deshalb die Steigung der Regressionsgeraden gleich 1 gesetzt, was einen pA_2 -Wert von $6,69 \pm 0,04$ ergab.

Im Gegensatz dazu nahmen die Einzel- pA_2 -Werte von NAC mit zunehmender Antagonistenkonzentration zu (Tabelle 3.3). Die Schild-Analyse von NAC ergab eine Gerade mit der Steigung $1,56 \pm 0,12$, die signifikant von 1 verschieden war, was auf

ERGEBNISSE

einen nichtkompetitiven Mechanismus schließen lässt. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergab einen pA_2 -Wert von $6,91 \pm 0,09$.

Tabelle 3.3: Einzel- pA_2 -Werte (\pm S.E.M.) für die einzelnen Antagonistenkonzentrationen gegen $\alpha\beta meATP$ -induzierte Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{20} -Werten ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 – 4 Einzelerperimenten \pm S.E.M..

	0,3 μM	1 μM	3 μM	10 μM
MRS2159	$6,68 \pm 0,11$	$6,62 \pm 0,24$	$6,73 \pm 0,04$	$6,76 \pm 0,18$
NAC	$6,98 \pm 0,23$	$7,38 \pm 0,19$	$7,76 \pm 0,12$	$8,07 \pm 0,40$

3.1.2.1.3. Kinetik von NAC am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens

Zur weiteren Charakterisierung der Substanz NAC wurde die Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 1 μM NAC gegen $\alpha\beta meATP$ (10 μM)-vermittelte Kontraktionen am Ratten-Vas-deferens bestimmt (Abbildung 3.7).

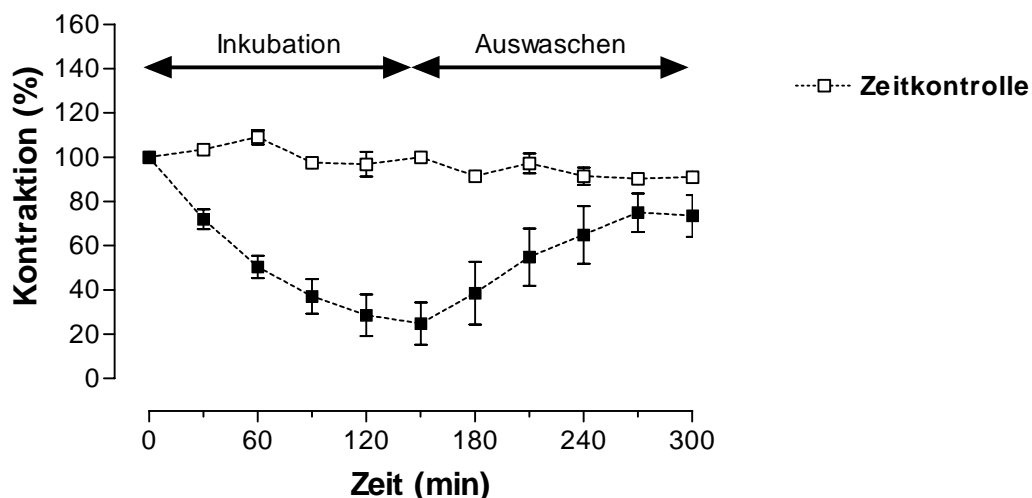


Abbildung 3.7: Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 1 μM NAC gegen $\alpha\beta meATP$ (10 μM)-vermittelte Kontraktionen am Ratten-Vas-deferens. Als 100 % wurde die Kontraktion eines Referenzorgans zum Zeitpunkt 0 (= Zugabe des Antagonisten) gewählt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelerperimenten \pm S.E.M..

Die Versuche zeigten, dass NAC am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens langsam anflutet, da die maximale antagonistische Wirkstärke erst nach 120 - 150 Minuten erreicht wurde. Der Antagonismus von NAC am Ratten-Vas-deferens ist reversibel, wobei das Auswaschen vergleichbar langsam vonstatten geht. Erst nach 120 Minuten Auswaschen erzielte das Organ wieder eine vergleichbare Kontraktion wie das Kontrollorgan. Es handelt sich bei NAC somit um einen reversiblen

Antagonisten am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens der langsam an- und abflutet.

3.1.2.2. Untersuchungen am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

3.1.2.2.1. Hemmkurven der $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum

1 μ M $\alpha\beta$ meATP löste schnell einsetzende transiente Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum aus (durchschnittlicher Zug \pm S.E.M.: 665 \pm 24 mg, n = 126), die durch die Substanzen PPADS, MRS2159, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl und SB9 konzentrationsabhängig gehemmt wurden. Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven (Abbildung 3.8) ergab die in Tabelle 3.4 aufgeführten pIC₅₀-Werte. Ausgehend von PPADS führte der Austausch der Sulfonsäuregruppen durch die Carbonsäuregruppe beim MRS2159 zu einer Steigerung der antagonistischen Wirkstärke am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum um den Faktor 4. Dimerisierung von MRS2159 zum CLII ergab eine weitere Linksverschiebung der Inhibitionskurve um den Faktor 3. Dagegen machte sich der Austausch der Phenylgruppe durch einen Naphthylrest beim PPNDS durch keine veränderten antagonistischen Eigenschaften am P2X₃-Rezeptor im Vergleich zu PPADS bemerkbar. Die Reduktion der Nitrogruppe zur Acyl-Aminogruppe im NAC und N-Butyl erhöhte die antagonistische Wirkstärke am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum um den Faktor 3 bis 4.

Das Heterodimer SB9 zeigte eine vergleichbare antagonistische Wirkstärke wie MRS2159 am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum und ist somit um etwa eine halbe Zehnerpotenz stärker wirksam im Vergleich zu Suramin und PPADS.

So ergibt sich folgende Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum:

CLII > NAC > N-Butyl \geq MRS2159 = SB9 > PPNDS \geq Suramin \geq PPADS

ERGEBNISSE

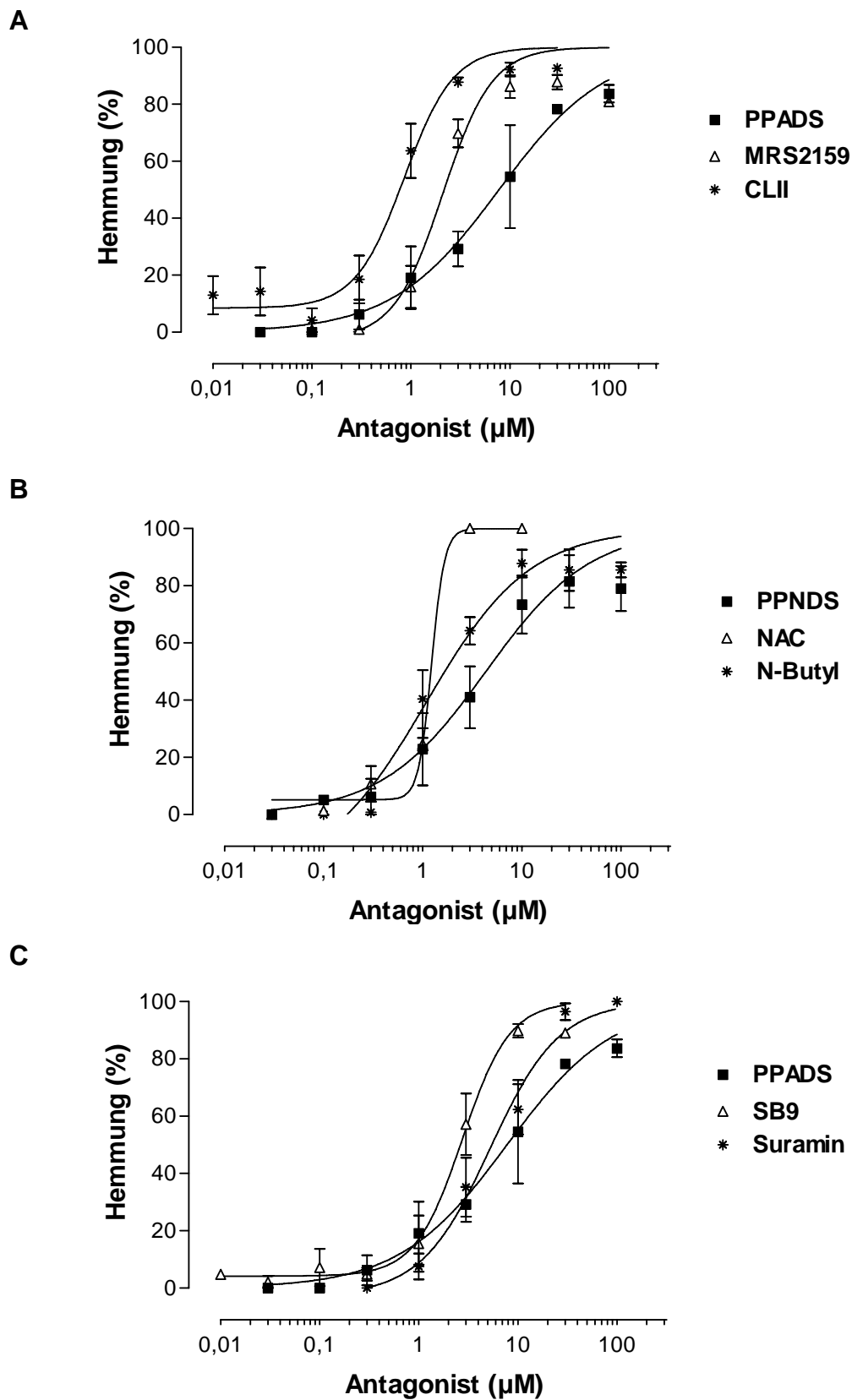


Abbildung 3.8 Inhibitionskurven von **(A)** PPADS, MRS2159 und CLII, **(B)** PPNDS, NAC und N-Butyl sowie **(C)** PPADS, SB9 und Suramin gegen $\alpha\beta\text{meATP}$ ($1 \mu\text{M}$)-vermittelte Kontraktion am Meerschweinchen-Ileum. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 6 Einzelexperimenten \pm S.E.M.. Nichtlineare Regression ergab die in Tabelle 3.4 aufgeführten pIC_{50} -Werte.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.4: pIC_{50} -Werte \pm S.E.M. der PPADS- und PPNDS-Analoga gegen $\alpha\beta meATP$ ($1 \mu M$)-vermittelte Kontraktionen am $P2X_3$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum.

PPADS	MRS2159	CLII	PPNDS	NAC	N-Butyl	SB9	Suramin
5,11 \pm 0,04	5,66 \pm 0,07	6,13 \pm 0,03	5,36 \pm 0,07	5,91 \pm 0,08	5,75 \pm 0,09	5,59 \pm 0,05	5,28 \pm 0,09

3.1.2.3. Untersuchungen am $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

3.1.2.3.1. Hemmkurven der $ADP\beta S$ (1 bzw. 10 μM)-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum

1 bzw. 10 μM $ADP\beta S$ lösten schnell einsetzende transiente Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum aus (durchschnittlicher Zug \pm S.E.M.: 1143 \pm 162 mg, n = 70 für 10 μM $ADP\beta S$ und 459 \pm 46 mg, n = 30 für 1 μM $ADP\beta S$), die durch die Substanzen MRS2159, CLII, NAC, N-Butyl, SB9 und Suramin konzentrationsabhängig gehemmt wurden. Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven (Abbildung 3.9) ergab die in Tabelle 3.5 aufgelisteten pIC_{50} -Werte.

PPADS, CLII und PPNDS wiesen ein nahezu identisches antagonistisches Verhalten am $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum auf. Die Reduktion der Nitrogruppe vom PPNDS und Acylierung zu den Analoga NAC und N-Butyl führte zu einer Steigerung der $P2Y_1$ -antagonistischen Wirkung um den Faktor 3. Bei MRS2159 zeigte sich ein biphasischer Kurvenverlauf. Die stärkste $P2Y_1$ -antagonistische Wirkung wurde bei dem Heterodimer SB9 beobachtet. Somit wurde durch Dimerisierung der Strukturelemente von PPADS und Suramin eine Wirksteigerung um den Faktor 5 bzw. 50 im Vergleich zu PPADS bzw. Suramin am $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum erzielt.

So ergibt sich folgende Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke am $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum:

$$SB9 \geq NAC \geq N\text{-Butyl} \approx MRS2159 > PPNDS = CLII = PPADS > Suramin$$

ERGEBNISSE

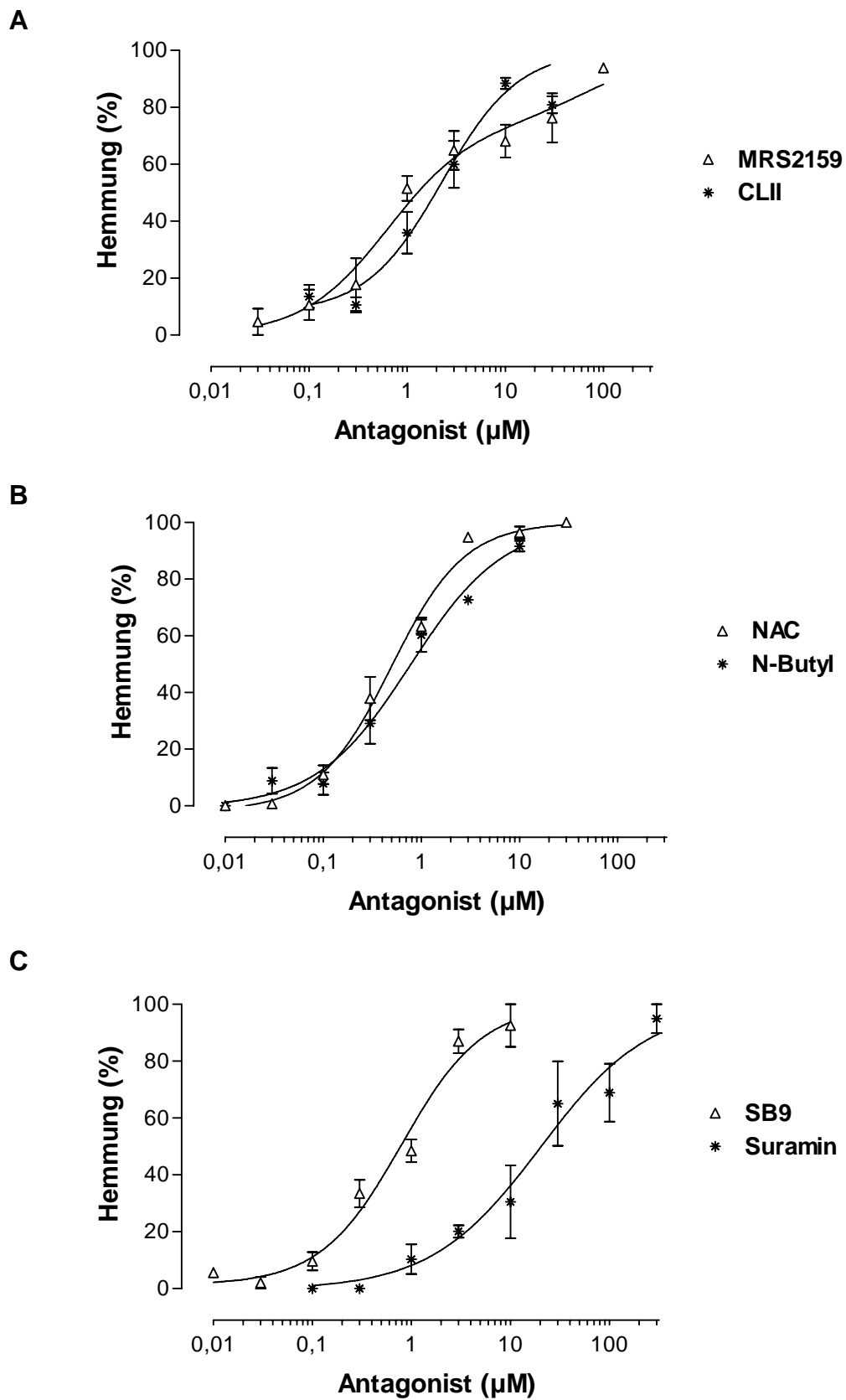


Abbildung 3.9: Inhibitionskurven von (A) MRS2159 und CLII, (B) NAC und N-Butyl sowie (C) Suramin gegen ADP β S (10 μM)-vermittelte und (C) SB9 gegen ADP β S (1 μM)-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 – 5 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.5.: pIC_{50} -Werte \pm S.E.M. der PPADS- und PPNDS-Analoga gegen ADP β S ($10 \mu M$)^{a)} bzw. ADP β S ($1 \mu M$)^{b)} -vermittelte Kontraktionen am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum.

PPADS	MRS2159	CLII	PPNDS	NAC	N-Butyl	SB9	Suramin
$5,66 \pm 0,07$ ^{a) 1)}	Biph.:	$5,74 \pm 0,08$ ^{a)}	$5,78$ ^{a) 2)}	$6,29 \pm 0,04$ ^{a)}	$6,10 \pm 0,05$ ^{a)}	$6,12 \pm 0,05$ ^{b)}	$4,69 \pm 0,12$
	$6,27 \pm 0,16$ ^{a)}					$6,37 \pm 0,05$ ^{1) a)}	
	$4,33 \pm 0,36$ ^{a)}						

¹⁾ Lambrecht et al., 2000a

²⁾ persönliche Mitteilung Prof. Lambrecht
Biph. = Biphasisch

3.1.2.3.2. Schild-Analyse der ADP β S-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum von NAC

Zur genaueren Untersuchung der Inhibition am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum wurde eine Schild-Analyse von NAC erstellt. Schild-Analysen der Substanzen PPADS, PPNDS und SB9 existierten bereits und sind in der Literatur beschrieben (Lambrecht et al., 2000A, 2000B, 2002).

Steigende Einzelgaben von ADP β S führten zu zunehmenden Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum (Abbildung 3.10). Der durch $100 \mu M$ ADP β S erreichte Zug betrug 1397 ± 86 mg ($n = 28$). Nichtlineare Regression der Dosis-Wirkungs-Kurven ergab einen pEC_{50} -Wert von $5,04 \pm 0,03$ ($n = 25-27$).

Die Zeitkontrollen waren nahezu deckungsgleich mit der Referenzkurve (Daten nicht gezeigt), woraus man schließen kann, dass keine zeitabhängigen Veränderungen an den Organen festzustellen waren, was eine Korrektur nicht notwendig machte.

Steigende Konzentrationen von NAC führten zu einer zunehmenden Hemmung, was sich in einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven bemerkbar machte (Abbildung 3.10). Es wurde jeweils auf den durch $100 \mu M$ ADP β S in der Kontrollkurve erzielten Zug normalisiert, der als 100% gesetzt wurde. Zur Ermittlung der „dose ratio“ wurde die EC_{20} herangezogen, also die Agonistenkonzentration, die 20 % des durch $100 \mu M$ induzierten Zugs auslöste, da die Dosis-Wirkungs-Kurven in diesem Bereich parallel verliefen.

ERGEBNISSE

Die mit Hilfe der Schild-Gleichung ermittelten pA_2 -Werte (0,1 μM NAC: $7,62 \pm 0,12$; 0,3 μM NAC: $7,25 \pm 0,27$; 1 μM NAC: $7,41 \pm 0,36$; 3 μM NAC: $7,55 \pm 0,49$) waren nicht signifikant voneinander verschieden. Die Schild-Analyse ergab eine Gerade mit der Steigung $1,10 \pm 0,18$, die nicht signifikant von 1 abwich, was auf einen kompetitiven Antagonismus hindeutet. Der Gesamt- pA_2 -Wert war $7,38 \pm 0,08$.

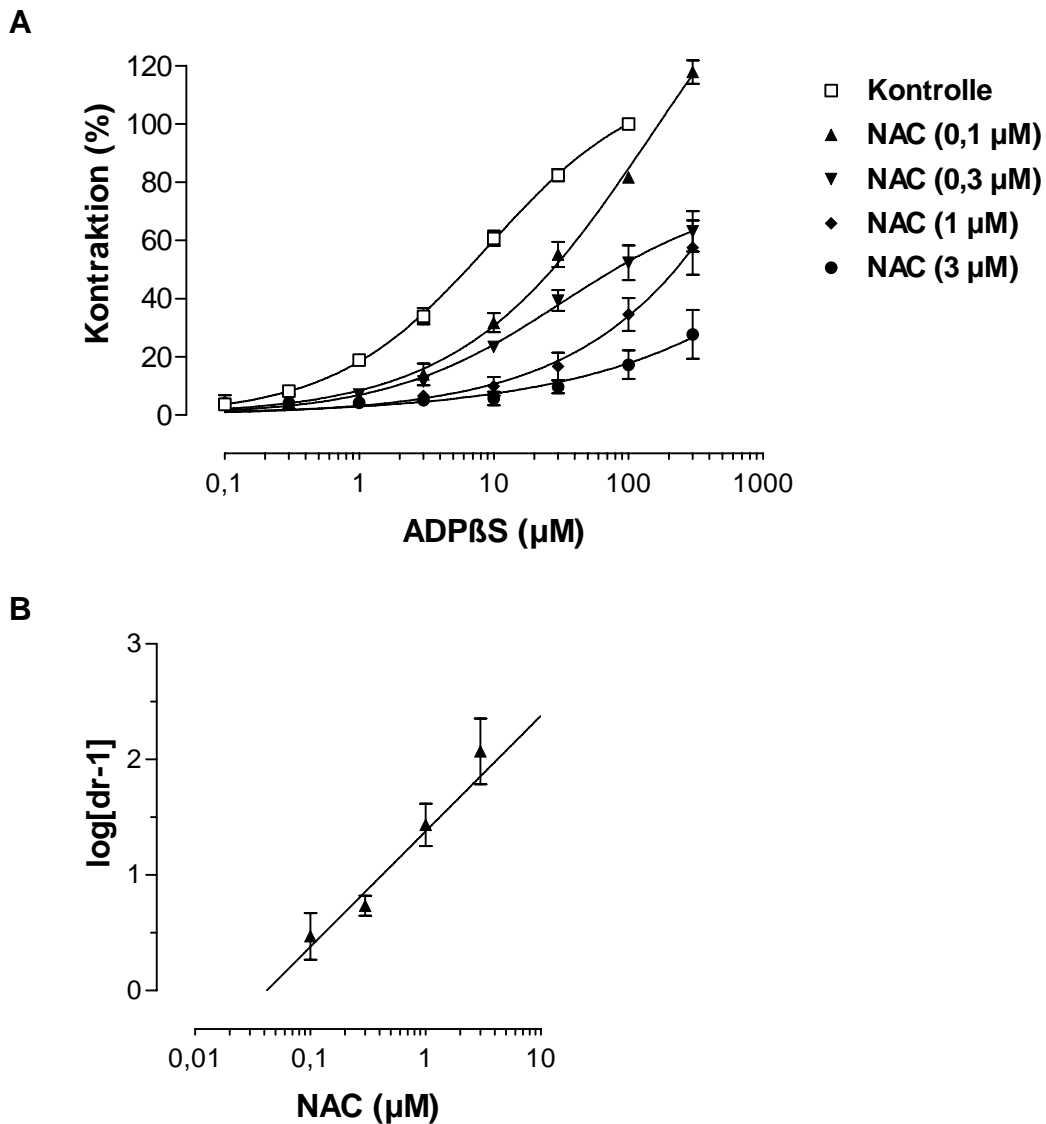


Abbildung 3.10: Antagonismus von NAC auf die ADP β S-induzierte Kontraktion am Meerschweinchen-Ileum. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 27 Einzelexperimenten \pm S.E.M.. **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP β S-induzierten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum in An- und Abwesenheit von NAC. **(B)** Schild-Regression von NAC am Meerschweinchen-Ileum. Die „dose ratio“ wurde mit Hilfe von EC_{20} -Werten ermittelt.

ERGEBNISSE

3.1.2.3.3. Kinetik von NAC am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

Zur weiteren Charakterisierung des Antagonismus von NAC am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum wurde die Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 1 μ M NAC gegen ADP β S (10 μ M)-vermittelte Kontraktionen bestimmt (Abbildung 3.11).

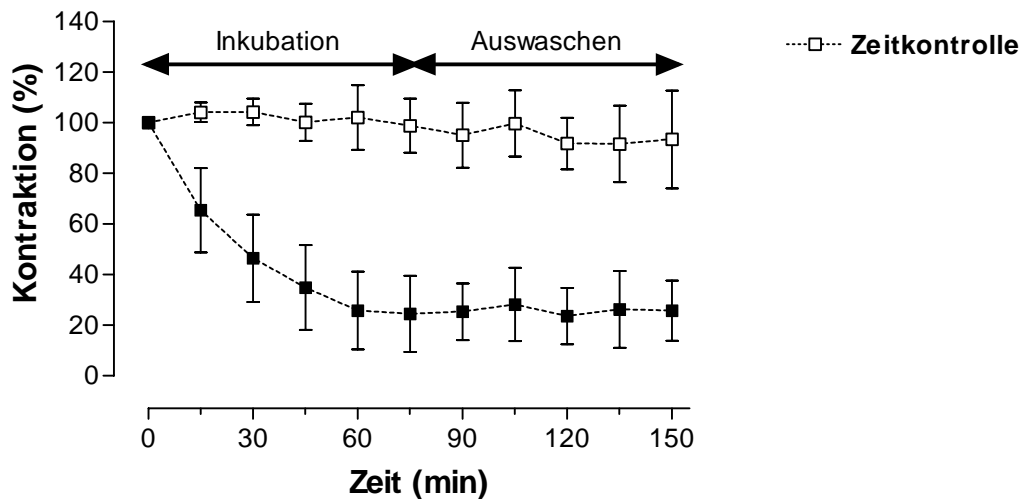


Abbildung 3.11: Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 1 μ M NAC gegen ADP β S (10 μ M)-vermittelte Kontraktionen am Meerschweinchen-Ileum. Als 100 % wurde die Kontraktion eines Referenzorgans zum Zeitpunkt 0 (= Zugabe des Antagonisten) gewählt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

Die Untersuchungen zeigten, dass NAC langsam im Rezeptorkompartiment anflutet, da erst nach 60 Minuten Inkubationszeit die maximale Hemmwirkung erreicht wurde. Die Hemmung der Kontraktion ließ auch nach einer Auswaschzeit von 90 Minuten nicht nach, was auf einen pseudoirreversiblen Mechanismus hindeutet. Die ADP β S (10 μ M)-induzierte Kontraktion der Zeitkontrolle blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant.

3.2. Untersuchungen an der Kartoffel-Apyrase (Grade VII)

Alle Untersuchungen an humanen Thrombozyten (siehe 3.3) wurden in Gegenwart von Apyrase Grade VII durchgeführt, um die P2-Rezeptoren vor Desensibilisierung durch endogen ausgeschüttete Nukleotide zu schützen. Um auszuschließen, dass die Apyrase durch die Antagonisten gehemmt und somit unwirksam wird, wurde der inhibitorische Effekt der Antagonisten auf die Apyrase in Zusammenarbeit mit C. Hildebrandt bestimmt. Die Hemmung der Apyrase (0,04 U/ml) wurde durch die Messung der Produktion von anorganischem Phosphat (P_i) aus dem enzymatischen Abbau von 100 μ M ATP in Gegenwart und Abwesenheit der Antagonisten (300 μ M) erfasst. Die Hemmwerte sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Es zeigte sich, dass keiner der untersuchten Antagonisten die Apyrase mit hoher Potenz hemmt. Außerdem ist zu beachten, dass die Apyrasekonzentration bei den Untersuchungen an Thrombozyten um den Faktor 8 höher liegt, wohingegen die maximale Antagonistenkonzentration dort 100 μ M beträgt. Eine Hemmung der Apyrase durch die Antagonisten und dadurch resultierende Desensibilisierung der Thrombozyten ist somit auszuschließen.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.6: Hemmung der Produktion von anorganischem Phosphat (P_i) aus dem enzymatischen Abbau von 100 μM ATP durch 0,04 U/ml Apyrase-Grade-VII in Gegenwart verschiedener Antagonisten (300 μM). Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelwerten \pm S.E.M..

Substanz	Hemmung des ATP-Abbaus (%) \pm S.E.M.
PPADS	24,61 \pm 2,79
MRS2159	16,92 \pm 2,18
CLII	13,95 \pm 0,61
PPNDS	50,69 \pm 0,20
NAC	14,33 \pm 2,19
N-Butyl	14,87 \pm 2,28
SB9	47,91 \pm 3,92
pHMBS	15,56 \pm 4,58 ¹⁾
2-meSAMP	17,69 \pm 2,20
MRS2179	22,47 \pm 4,17
A3P5P	15,95 \pm 1,70
Suramin	36,65 \pm 2,82
NF023	22,55 \pm 3,21
N98/33	22,75 \pm 0,94
N97/66	22,53 \pm 2,79
NF449	28,08 \pm 6,45
NF110	12,25 \pm 3,77
NF864	14,10 \pm 3,14

¹⁾ 100 μM Antagonist

3.3. Untersuchungen an nativen P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten

3.3.1. Methodenetablierung

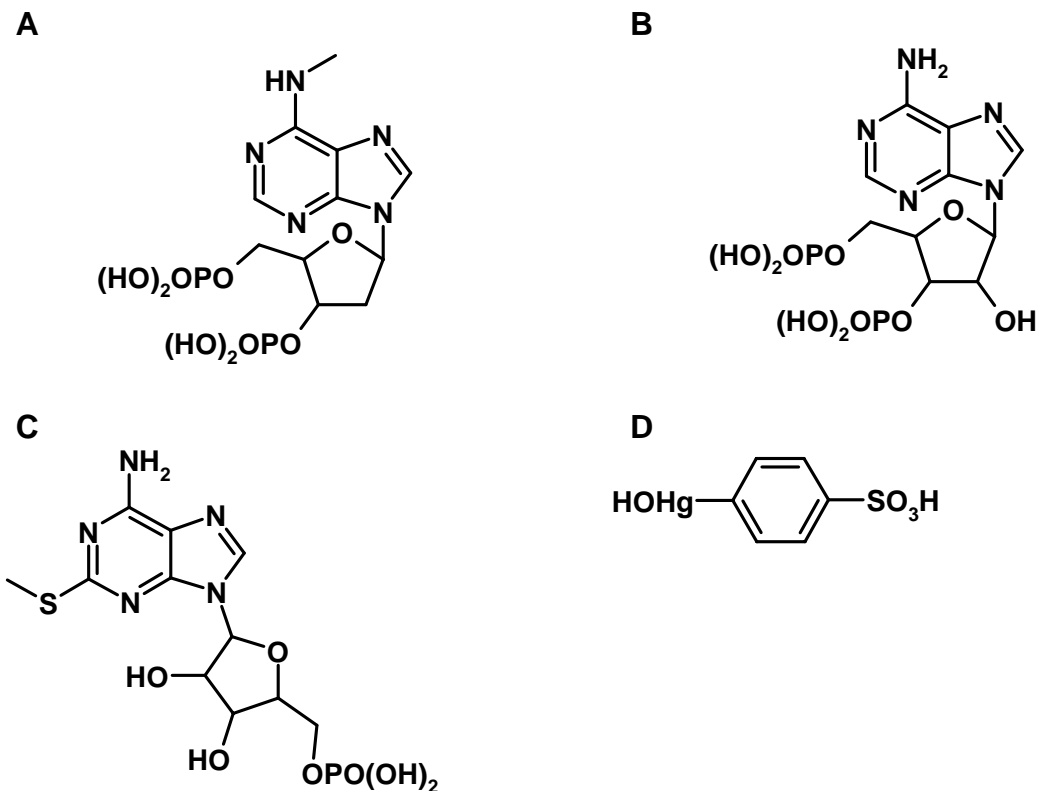


Abbildung 3.12: Strukturformeln von (A) MRS2179, (B) A3P5P, (C) 2-meSAMP und (D) pHMBS.

Im Rahmen der Methodenetablierung wurde der Einfluss literaturbekannter Standardantagonisten, wie der P2Y₁-selektiven Substanzen MRS2179 und A3P5P sowie der P2Y₁₂-selektiven Substanz 2-meSAMP (siehe 1.1.2.2) auf den $\alpha\beta$ mATP- bzw. ADP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und den „shape change“ sowie auf die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Ziel dabei war es unsere Messmethoden zu validieren und zu untersuchen, welche Rezeptoren an den einzelnen physiologischen Reaktionen der Thrombozyten beteiligt sind. In diese Untersuchungen wurde das Sulfhydryl-Reagenz pHMBS (Frolenkov et al.; 1998) einbezogen. Diese Substanz ist chemisch mit dem entsprechenden p-Chlormercuri-Derivat (pCMBS) sehr nahe verwandt, das als selektiver P2Y₁₂-Antagonist bekannt ist (Hollopeter et al., 2001). Leider war pCMBS zum Zeitpunkt der vorliegenden

ERGEBNISSE

Untersuchungen kommerziell nicht mehr erhältlich. Die Strukturformeln der Substanzen sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

3.3.1.1. Untersuchung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs

Die Methode zur Untersuchung der P2X₁-vermittelten, $\alpha\beta$ meATP-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration war bereits in unserem Labor etabliert. K. Menke (2003) erstellte eine Dosis-Wirkungs-Kurve des $\alpha\beta$ meATP-vermittelten Calciumeinstroms (Abbildung 3.13) und fand einen pEC₅₀-Wert von 6,02 ± 0,05.

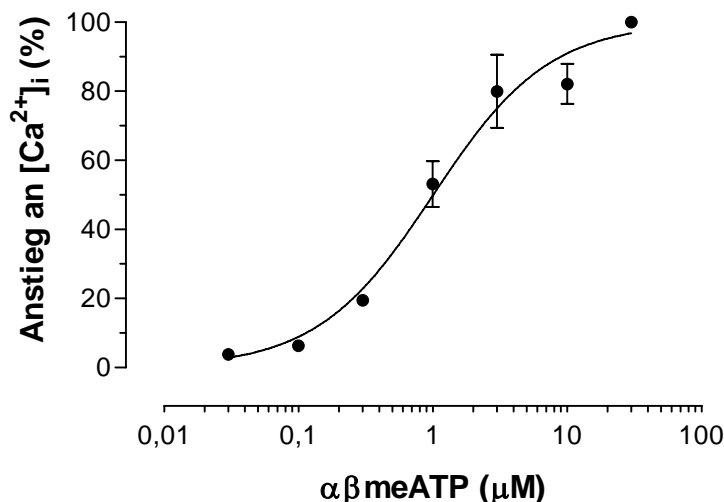


Abbildung 3.13: Dosis-Wirkungs-Kurve des intrazellulären Calciumanstiegs [Ca²⁺]_i in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch $\alpha\beta$ meATP. Der Anstieg an [Ca²⁺]_i wurde mittels Fura-2/AM-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus 4 - 6 Experimenten ± S.E.M.. Der resultierende pEC₅₀-Wert beträgt 6,02 ± 0,05 (Menke, 2003).

Für die Erstellung von Hemmkurven der Antagonisten A3P5P, 2-meSAMP und pHMBS wurde mit 1 µM $\alpha\beta$ meATP eine Agonistenkonzentration im Bereich der EC₅₀ gewählt (Abbildung 3.13). 1 µM $\alpha\beta$ meATP führte zu einem rasch einsetzenden, transienten Calciumeinstrom in die humanen Thrombozyten, der mit Hilfe der Fluoreszenzintensität der Farbstoffe Fura-2/AM und Oregon green 488 BAPTA-1/AM detektiert und quantifiziert wurde. A3P5P hemmte den P2X₁-vermittelten Calciumeinstrom konzentrationsabhängig; nichtlineare Regression der Inhibitionskurve ergab einen pEC₅₀-Wert von 3,74 ± 0,001 (n = 3). 2-meSAMP und pHMBS zeigten in den Inkubationskonzentrationen 3 – 30 µM keine signifikante

ERGEBNISSE

Hemmung des P2X₁-Rezeptors humaner Thrombozyten (Abbildung 3.14). Die Inhibition von MRS2179 auf den P2X₁-vermittelten Calciumeinstrom in humane Thrombozyten wurde bereits von K. Menke (2003) untersucht. Sie fand bis zu einer Inkubationskonzentration von 300 μM MRS2179 keine Hemmung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

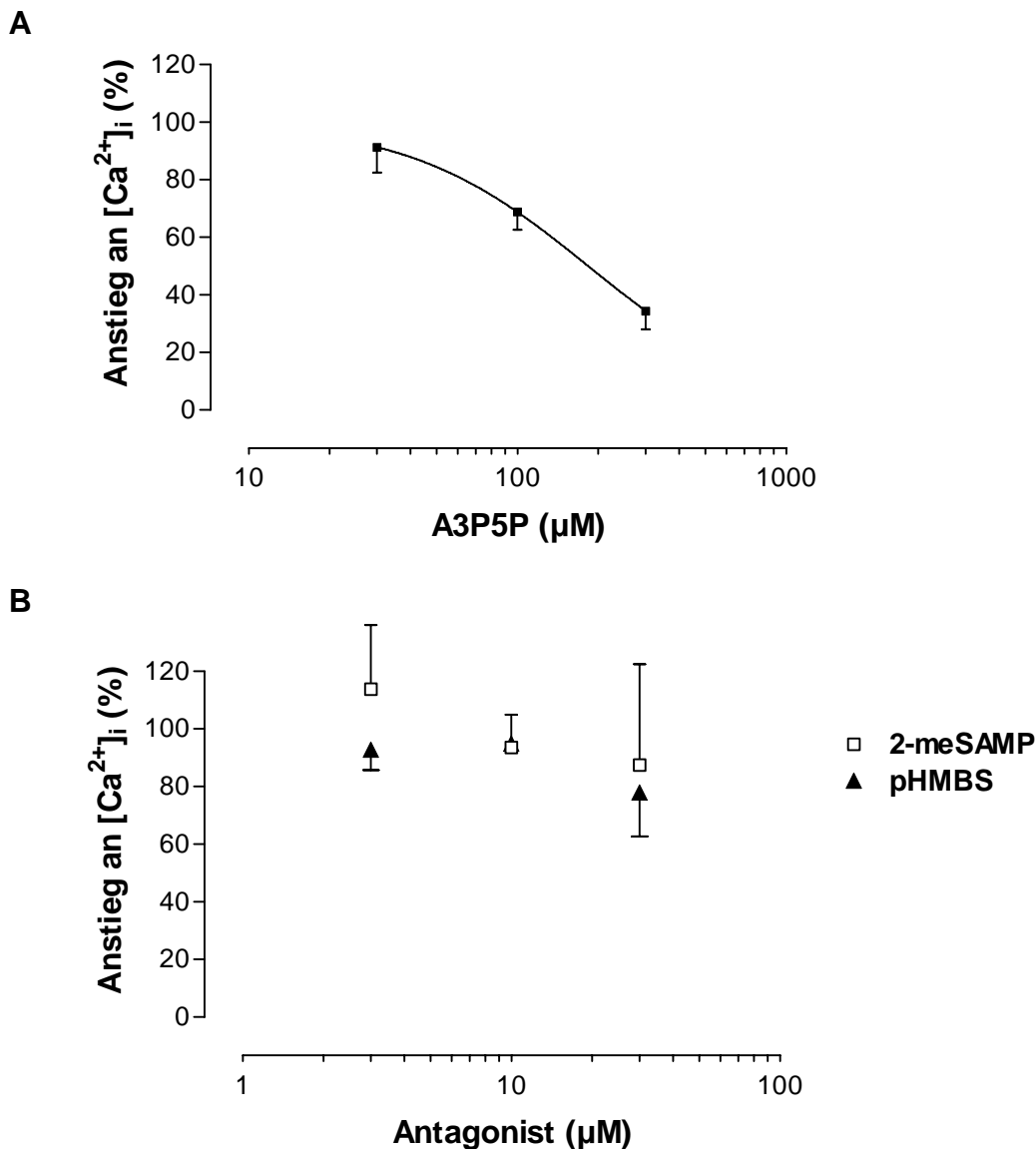


Abbildung 3.14: Einfluss von (A) A3P5P und (B) 2-meSAMP und pHMBS auf die $\alpha\beta\text{meATP}$ ($1 \mu\text{M}$)-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.7: pIC_{50} -Werte von Standardantagonisten und pHMBS gegen die $\alpha\beta meATP$ ($1 \mu M$)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	Fluoreszenzfarbstoff
MRS2179	$< 3,5$ ¹⁾	Fura-2
A3P5P	$3,74 \pm 0,001$	Fura-2
2-meSAMP	$< 4,5$	Fura-2
pHMBS	$< 4,5$	Fura-2

¹⁾ Dissertation K. Menke, 2003

3.3.1.2. Untersuchung des ADP_{HEX} -induzierten intrazellulären Calciumanstiegs

Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von hexokinasegereinigtem ADP (ADP_{HEX}) an in Puffer resuspendierten Thrombozyten erstellt (Abbildung 3.15). Die Vorbehandlung mit Hexokinase wurde durchgeführt um mögliche Verunreinigungen mit ATP zu entfernen. Die Thrombozyten wurden zum einen aus Frischblut, zum anderen aus Thrombozytenkonzentrat (Buffy-Coat-Blut) isoliert. ADP_{HEX} erwies sich an Thrombozyten aus Buffy-Coat-Blut als äquipotent zu denen aus Frischblut. Deshalb wurde in den Folgeversuchen neben Frischblut auch Buffy-Coat-Blut verwendet; die Ergebnisse wurden gepoolt.

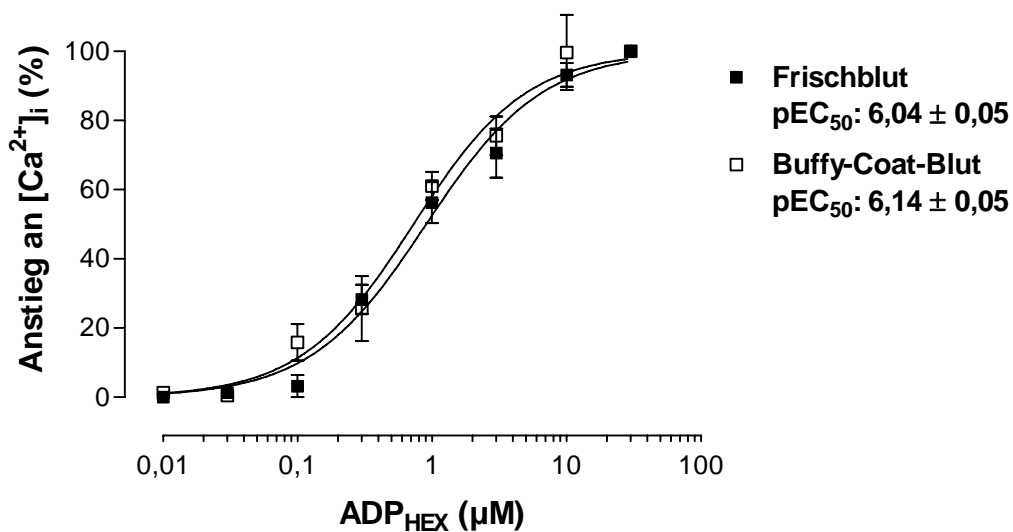


Abbildung 3.15: Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP_{HEX} -induziertem intrazellulären Calciumanstieg in Thrombozyten isoliert aus Frischblut und Buffy-Coat-Blut. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde mittels Fura-2/AM-Fluoreszenz ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Für die Bestimmung der pIC_{50} -Werte von MRS2179, A3P5P, 2-meSAMP und pHMBS wurde mit $1 \mu\text{M}$ ADP eine Konzentration im Bereich der EC_{50} ausgewählt (Abbildung 3.15). Die Gabe von ADP führte zu einer rasch einsetzenden transienten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die über die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs Fura-2 gemessen wurde. MRS2179 und A3P5P hemmten die ADP-induzierte Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern konzentrationsabhängig, wohingegen 2-meSAMP und pHMBS in einem Konzentrationsbereich von $3 - 30 \mu\text{M}$ keine signifikante Hemmung zeigten (Abbildung 3.16). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

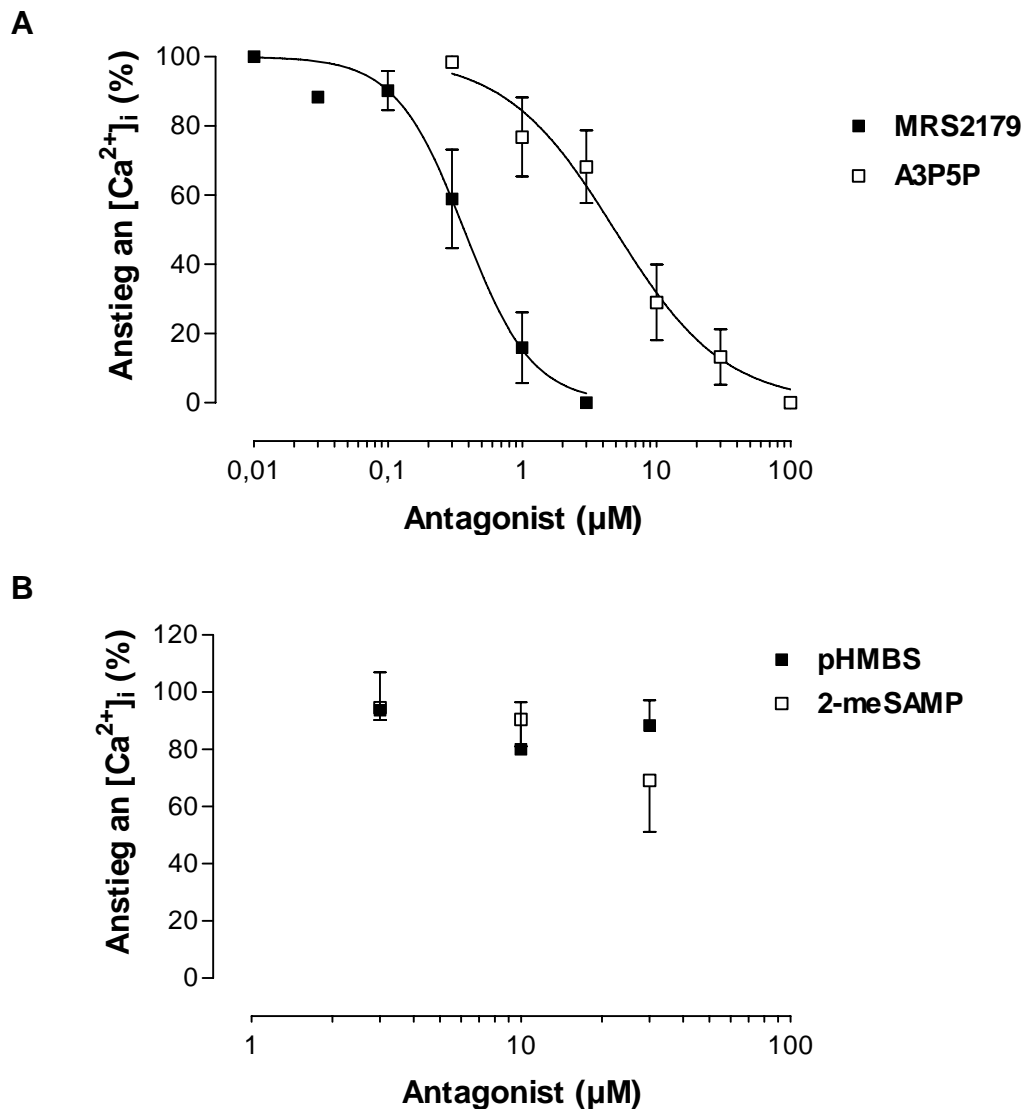


Abbildung 3.16: Einfluss von (A) MRS2179 und A3P5P sowie von (B) 2-meSAMP und pHMBS auf die ADP ($1 \mu\text{M}$)-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Daten sind Mittelwerte aus 1 - 4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.8: pIC_{50} -Werte von Standardantagonisten und pHMBS gegen die ADP ($1 \mu M$)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	Fluoreszenzfarbstoff
MRS2179	$6,43 \pm 0,03$	Fura-2
A3P5P	$5,31 \pm 0,05$	Fura-2
2-meSAMP	$< 4,5$	Fura-2
pHMBS	$< 4,5$	Fura-2

3.3.1.3. Untersuchung des $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape change“

Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape change“ wurden an in Puffer suspendierten Thrombozyten in Gegenwart von 10 mM Calcium und 0,6 U/ml Apyrase erstellt (Abbildung 3.17). Steigende Konzentrationen von $\alpha\beta meATP$ führten zu einem rasch einsetzenden, transienten „shape change“, der über Transmissionsabnahme mit Hilfe eines Aggregometers erfasst wurde. Normalisiert wurde auf die Steigung der „shape-change“-Signale bei $10 \mu M$ $\alpha\beta meATP$. Nichtlineare Regressionsanalyse ergab eine extrem steil verlaufende Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer Steigung von $11,3 \pm 1,82$ und einem pEC_{50} -Wert von $6,42 \pm 0,06$.

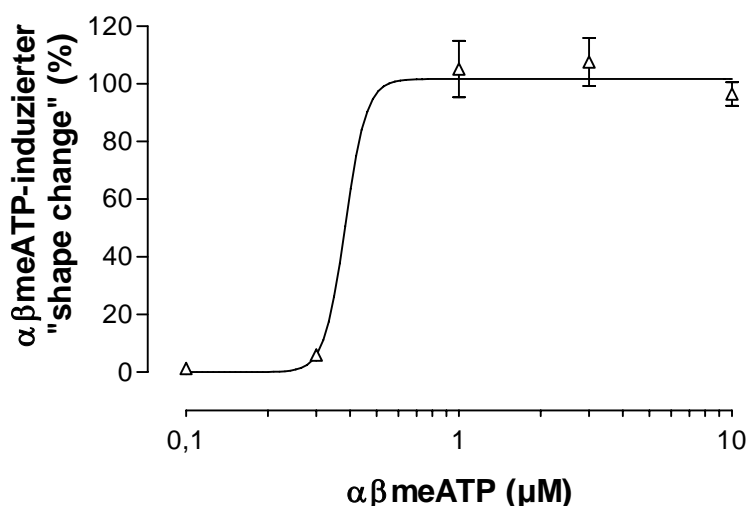


Abbildung 3.17: Dosis-Wirkungs-Kurve des $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape change“. Ausgewertet wurde die Steigung der Signale. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 15 Einzelerperimenten $\pm S.E.M.$. Es wurde ein pEC_{50} -Wert von $6,42 \pm 0,06$ ermittelt.

ERGEBNISSE

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten „shape change“ um keinen P2Y_1 -vermittelten Effekt handelt, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von $30\ \mu\text{M}$ MRS2179 ermittelt (Abbildung 3.18).

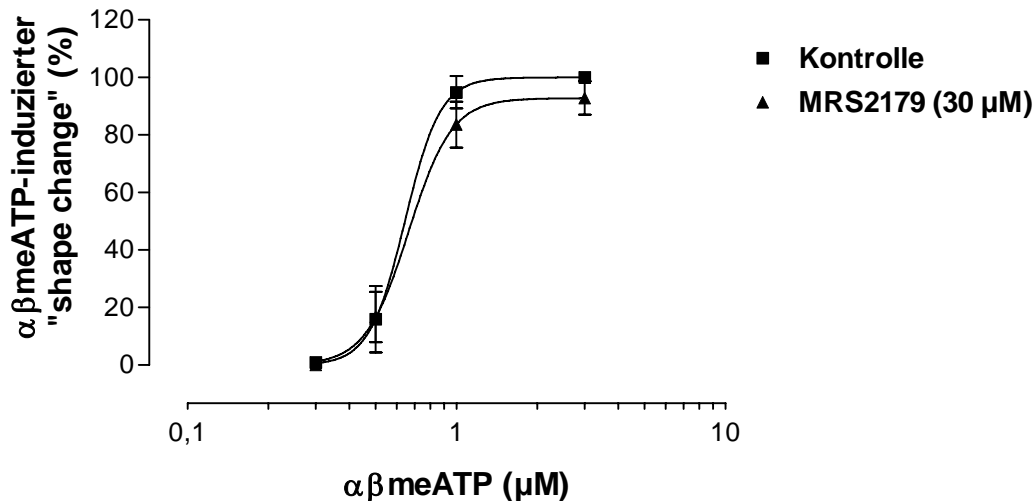


Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungs-Kurve des $\alpha\beta\text{meATP}$ -vermittelten „shape change“ in Ab- und Anwesenheit von $30\ \mu\text{M}$ MRS2179. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 - 3 Einzelerperimenten \pm S.E.M..

Die Inkubationskurve in Gegenwart von $30\ \mu\text{M}$ MRS2179 war mit einem pEC_{50} -Wert von $6,18 \pm 0,01$ deckungsgleich mit der Kontrollkurve, die einen pEC_{50} -Wert von $6,19 \pm 0,001$ ergab. Somit hat der P2Y_1 -selektive Antagonist MRS2179 keinen Einfluss auf den $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten „shape change“.

3.3.1.4. Untersuchung des ADP-induzierten „shape change“

3.3.1.4.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP_{HEX}

Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ von in Puffer suspendierten Plättchen wurden in Gegenwart von $2\ \text{mM}$ Calcium erstellt. Die Gabe steigender Konzentrationen von ADP führte zu einer rasch einsetzenden Abnahme der Transmission, bedingt durch den „shape change“ der Thrombozyten. Normalisiert wurde auf die Steigung der „shape change“-Signale bei $3\ \mu\text{M}$ ADP. Nichtlineare Regressionsanalyse ergab einen pEC_{50} -Wert von $6,90 \pm 0,001$ (Abbildung 3.19).

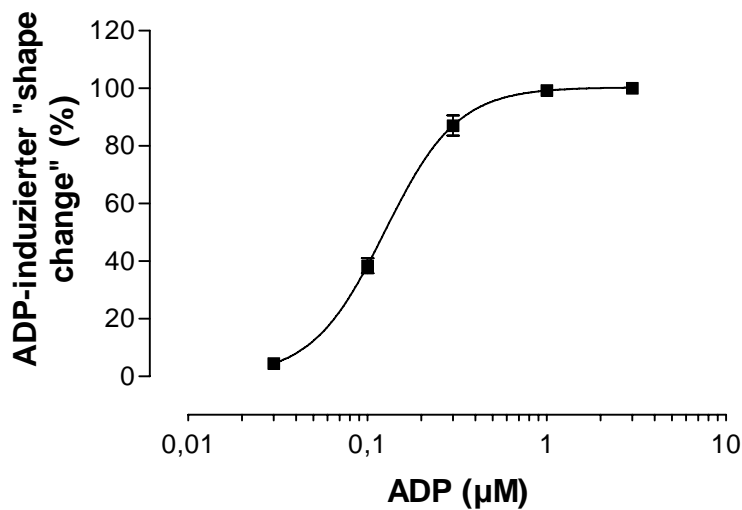


Abbildung 3.19: Dosis-Wirkungs-Kurve des ADP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten. Ausgewertet wurde die Steigung der Signale. Die Daten sind Mittelwerte aus 5-20 Einzelexperimenten \pm S.E.M.. Nichtlineare Regression ergab einen pEC_{50} -Wert von $6,90 \pm 0,001$.

3.3.1.4.2. Einfluss von pHMBS und 2-meSAMP auf den ADP-induzierten „shape change“

Zunächst wurde der Einfluss von 2-meSAMP und pHMBS auf den ADP-induzierten „shape change“ untersucht. Die Dosis-Wirkungs-Kurven bei den verschiedenen Inkubationskonzentrationen von 2-meSAMP und pHMBS verliefen nahezu deckungsgleich mit den Kontrollkurven (Abbildung 3.20). Das bedeutet, dass die beiden Substanzen in diesem Experiment weitgehend unwirksam waren.

ERGEBNISSE

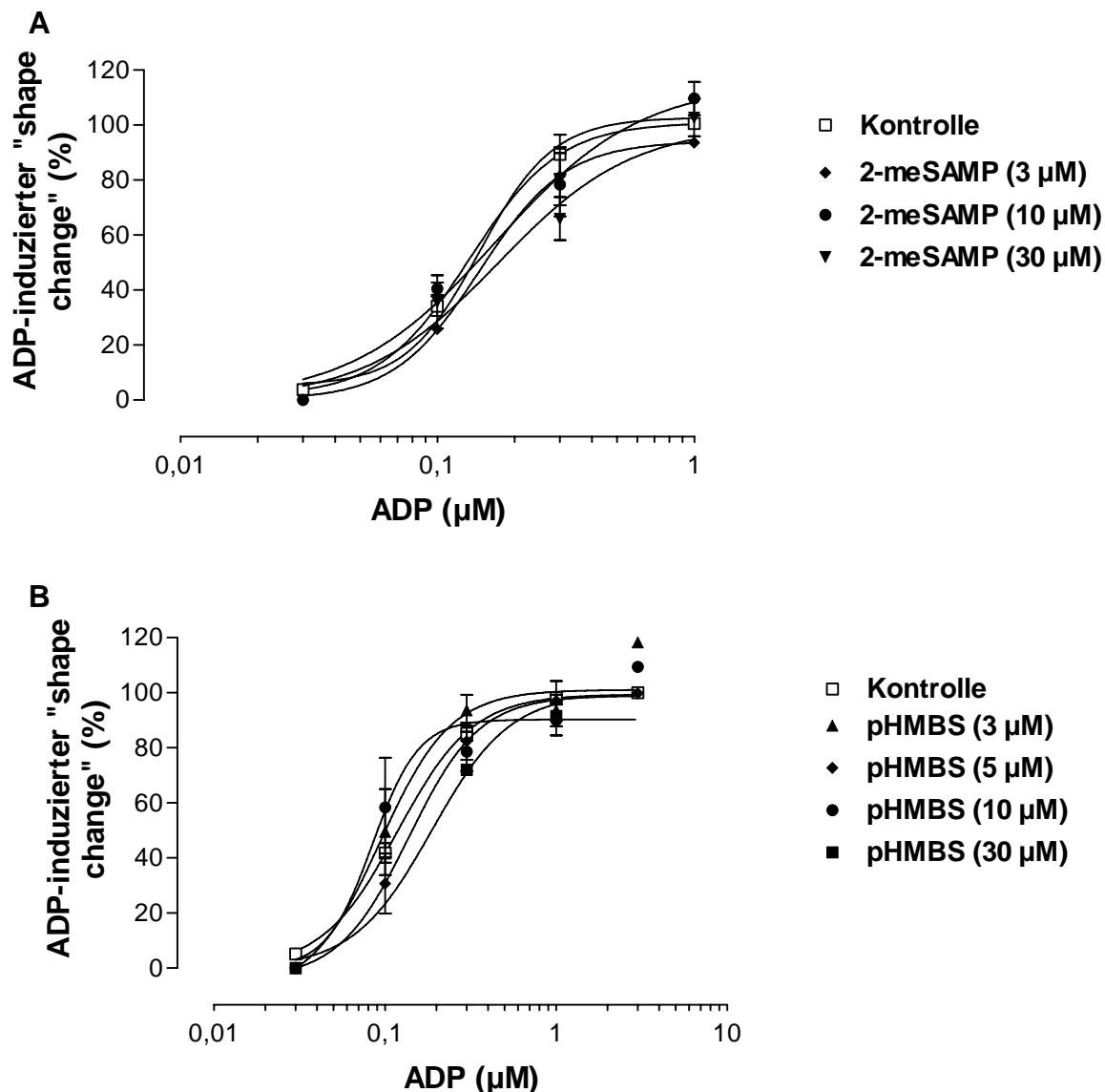


Abbildung 3.20: Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an (A) 2-meSAMP bzw. (B) pHMBS. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 (Inkubationskurven) bzw. 9 - 11 (Kontrollkurve) Einzelexperimenten \pm S.E.M..

3.3.1.4.3. Bestimmung des pA_2 -Wertes der $P2Y_1$ -Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P

Zur Methodenetablierung wurde der pA_2 -Wert von den Standard- $P2Y_1$ -Antagonisten MRS2179 und A3P5P über die Steigung der „shape-change“-Signale ermittelt.

In Anwesenheit von MRS2179 und A3P5P kam es dosisabhängig zu einer parallelen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven ohne Abfall des Maximaleffektes von ADP (Abbildung 3.21, Abbildung 3.22).

ERGEBNISSE

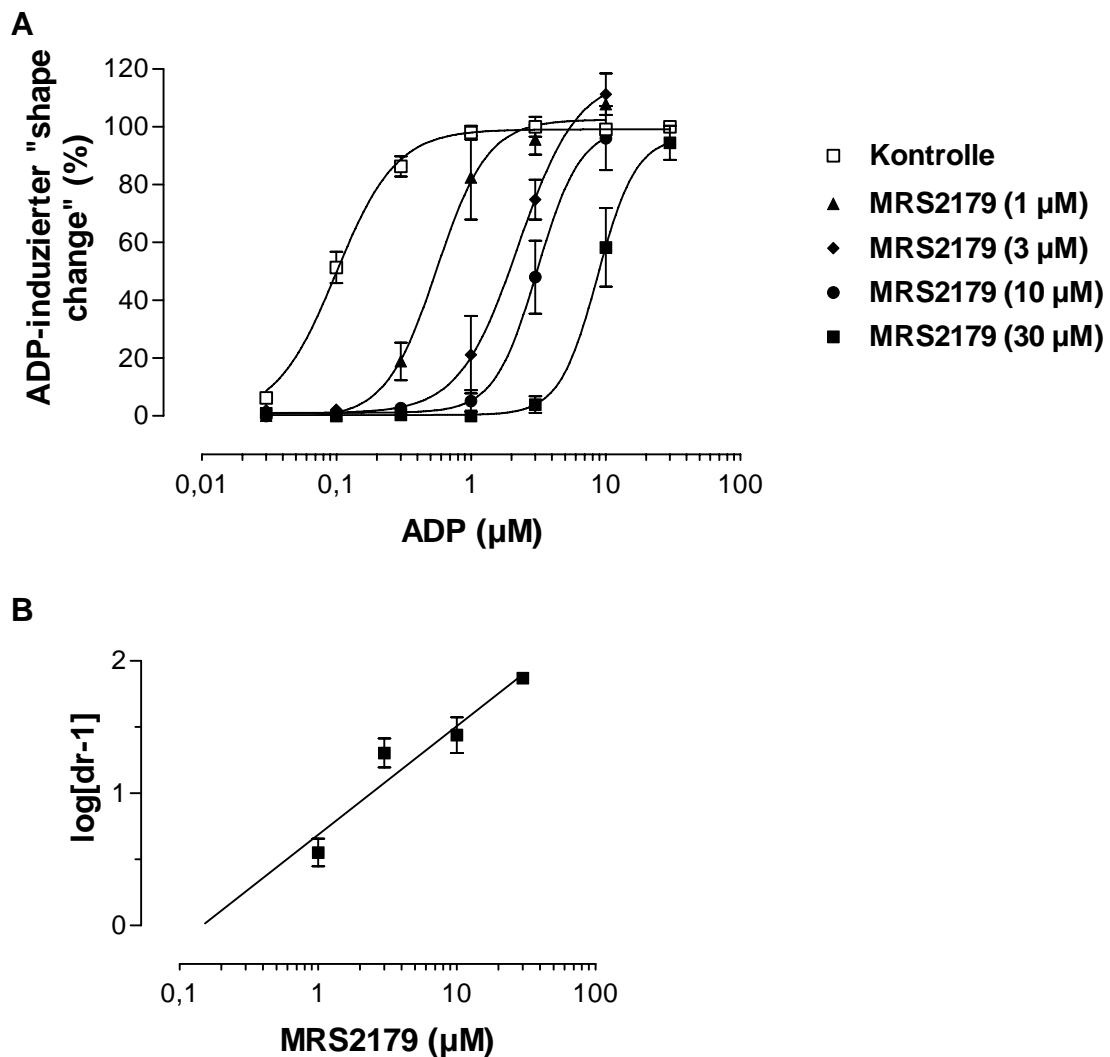


Abbildung 3.21: **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an MRS2179. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 4 (Inkubationskurven) bzw. 6 - 16 (Referenzkurve) Einzelexperimenten \pm S.E.M.. **(B)** Schild-Analyse von MRS2179. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Steigung der Regressionsgerade war mit $0,82 \pm 0,17$ nicht signifikant von 1 verschieden. Es wurde ein pA_2 -Wert von $6,55 \pm 0,06$ bestimmt (Steigung = 1).

Die Auswertung der Schild-Regression von MRS2179 ergab eine Gerade mit der Steigung $0,82 \pm 0,17$. Da die Steigung nicht signifikant von 1 verschieden war wurde die Steigung der Regressionsgeraden gleich 1 gesetzt, so dass ein pA_2 -Wert von $6,55 \pm 0,06$ ermittelt wurde. Somit zeigte sich MRS2179 als kompetitiver Antagonist des ADP-induzierten „shape change“.

ERGEBNISSE

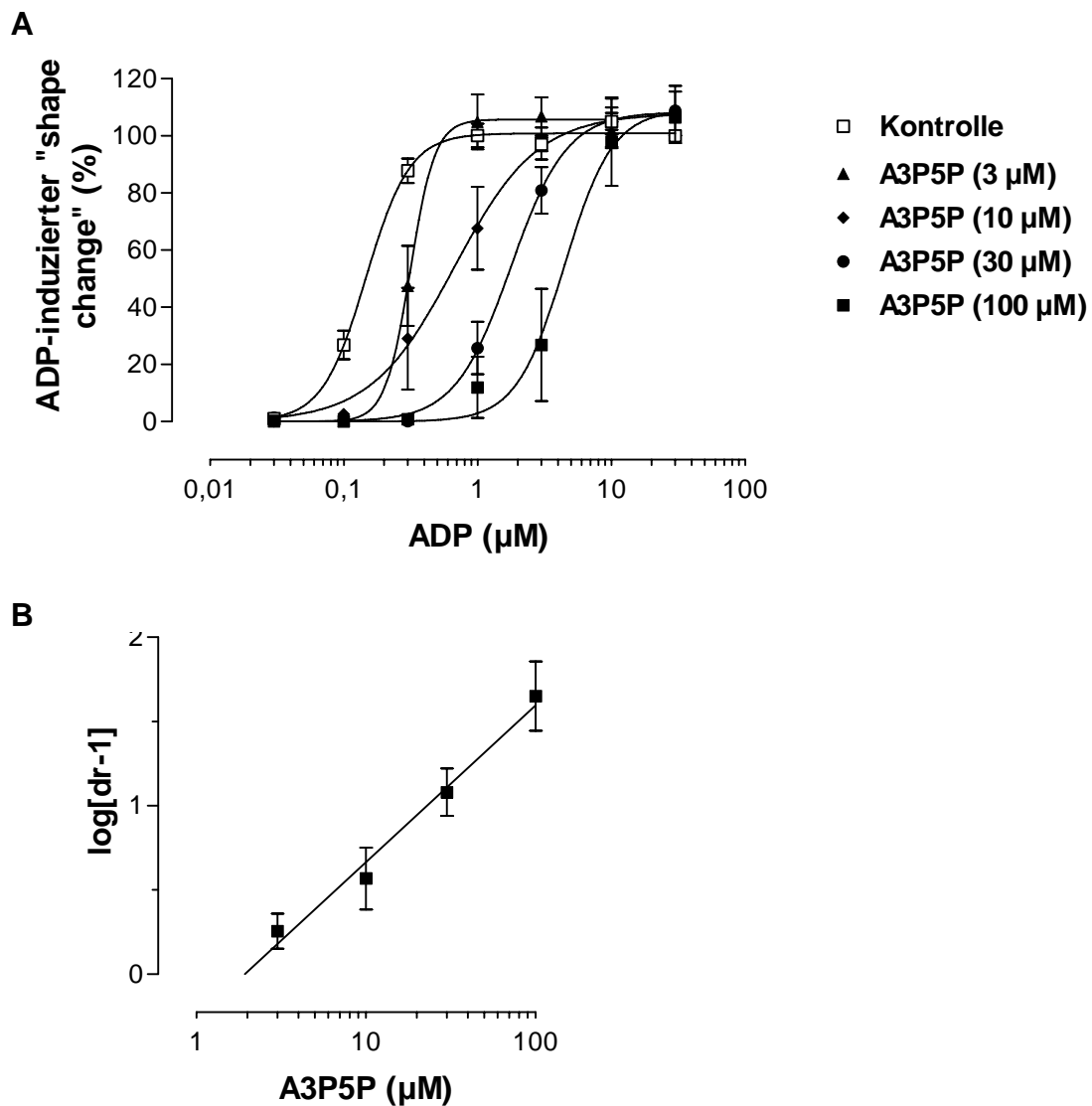


Abbildung 3.22: **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an A3P5P. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 - 4 (Inkubationskurven) bzw. 8 - 14 (Kontrollkurven) Einzelexperimenten \pm S.E.M. **(B)** Schild-Regression von A3P5P. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Steigung der Regressionsgerade war mit $0,92 \pm 0,14$ nicht signifikant von 1 verschieden. Es wurde ein pA_2 -Wert von $5,65 \pm 0,06$ ermittelt (Steigung = 1).

Die Schild-Analyse von A3P5P ergab eine Gerade mit der Steigung $0,92 \pm 0,14$, die nicht signifikant von 1 verschieden war. Die Steigung der Regressionsgerade wurde gleich 1 gesetzt, was einen pA_2 -Wert von $5,65 \pm 0,06$ ergab. Diese Daten zeigen, dass A3P5P, wie MRS2179, ein rein kompetitiver Antagonist des ADP-induzierten „shape change“ ist.

3.3.1.5. Untersuchung der ADP-induzierten Aggregation

3.3.1.5.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP_{HEX}

Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation an Thrombozyten isoliert aus Frischblut und Buffy-Coat-Blut erstellt (Abbildung 3.23). Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu den fluoreszenzspektrometrischen Messungen zu haben, wurde das Versuchsdesign der Calciummessungen weitgehend beibehalten (identische Isolierung und Aufarbeitung der Thrombozyten, identische Puffer). Auch hier wurde der Plättchensuspension 0,32 U/ml Apyrase zugesetzt, um die P2-Rezeptoren vor Desensibilisierung zu schützen.

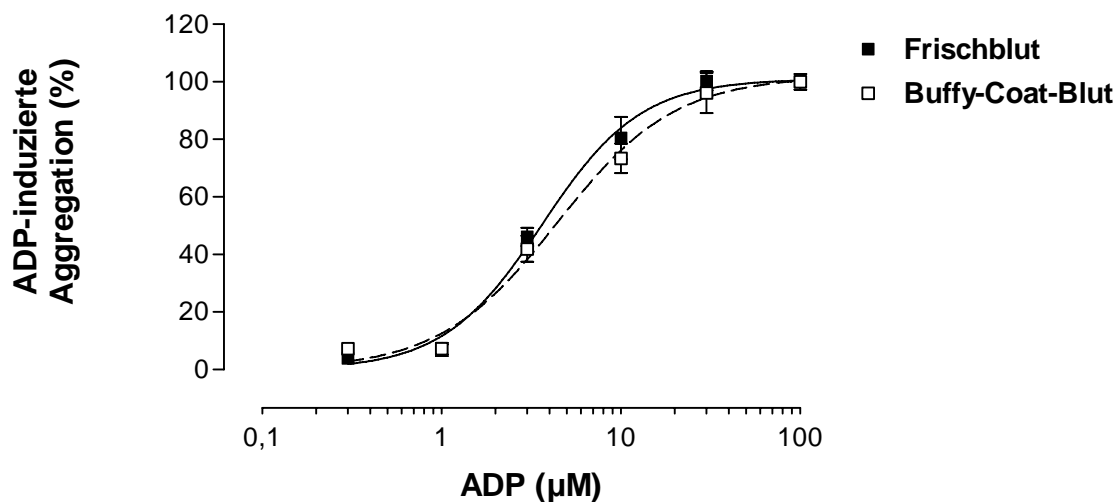


Abbildung 3.23: Dosis-Wirkungs-Kurve der ADP-induzierten Aggregation von humanen Thrombozyten isoliert aus Frischblut bzw. aus Buffy-Coat-Blut. Ausgewertet wurde die Steigung des Aggregationsverlaufs normalisiert auf die Steigung der Aggregation ausgelöst durch 100 µM ADP. Die Daten sind Mittelwerte aus 7-9 Einzelwerten \pm S.E.M..

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.23) von ADP ergab sich für Thrombozyten isoliert aus Frischblut ein pEC_{50} -Wert von $5,44 \pm 0,03$, bei einer Steigung von $1,60 \pm 0,15$ ($n = 9 - 10$). Ausgewertet wurde die Steigung der Aggregationssignale. Messungen an Thrombozyten isoliert aus Buffy-Coat-Blut zeigten einen nahezu deckungsgleichen Kurvenverlauf (pEC_{50} : $5,36 \pm 0,07$; Steigung: $1,32 \pm 0,22$; $n = 7$). Deshalb wurden bei den Folgeversuchen Thrombozyten isoliert aus Frischblut und aus Buffy-Coat-Blut verwendet. Die Ergebnisse wurden gepoolt.

ERGEBNISSE

3.3.1.5.2. Bestimmung des pA_2 -Wertes der $P2Y_1$ -Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P

Zur Methodenetablierung wurde der pA_2 -Wert von MRS2179 ermittelt. In Anwesenheit von MRS2179 kam es konzentrationsabhängig zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.24). Die Schild-Analyse ergab eine Gerade mit der Steigung $0,76 \pm 0,10$, die signifikant von 1 verschieden war. Es wurde ein pA_2 -Wert von $6,00 \pm 0,10$ ermittelt (= Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse).

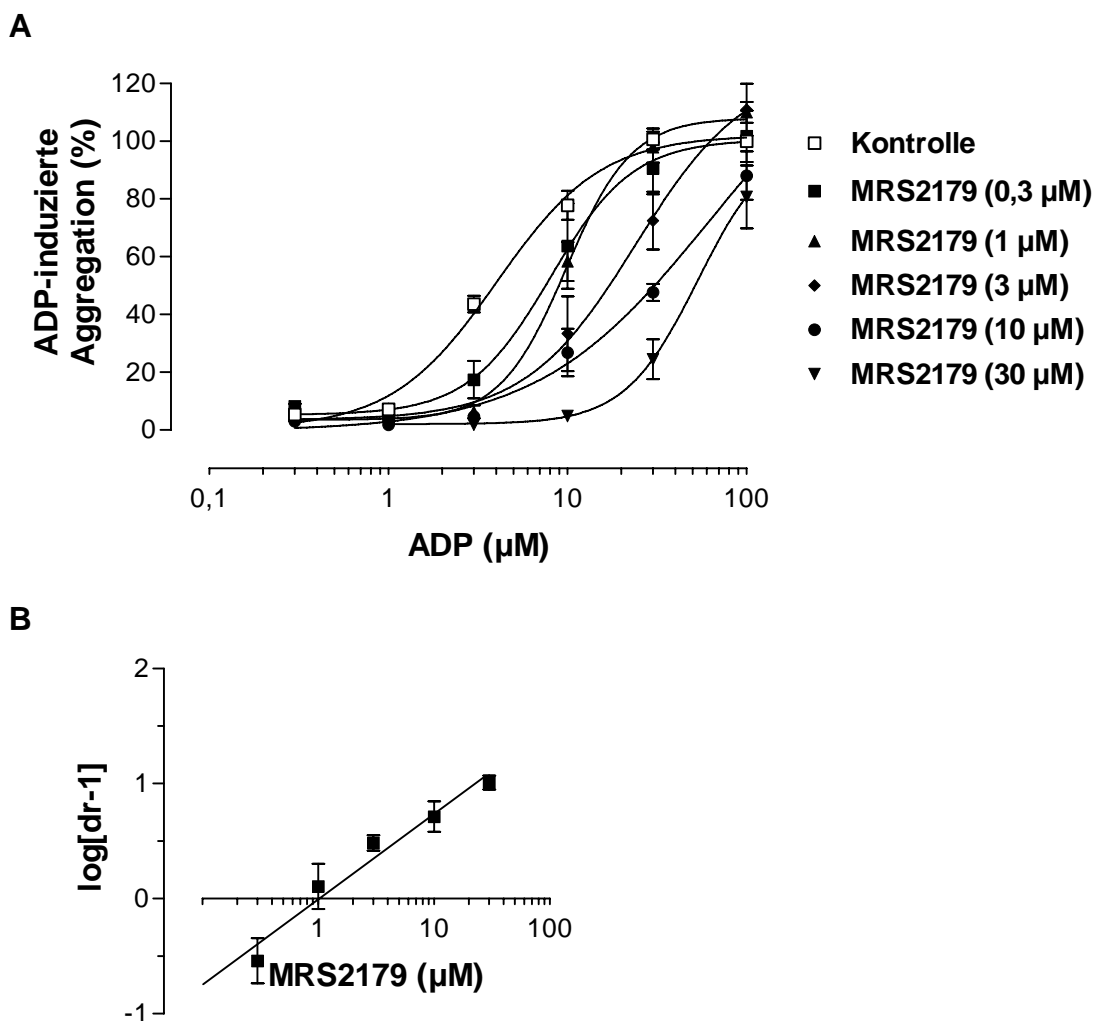
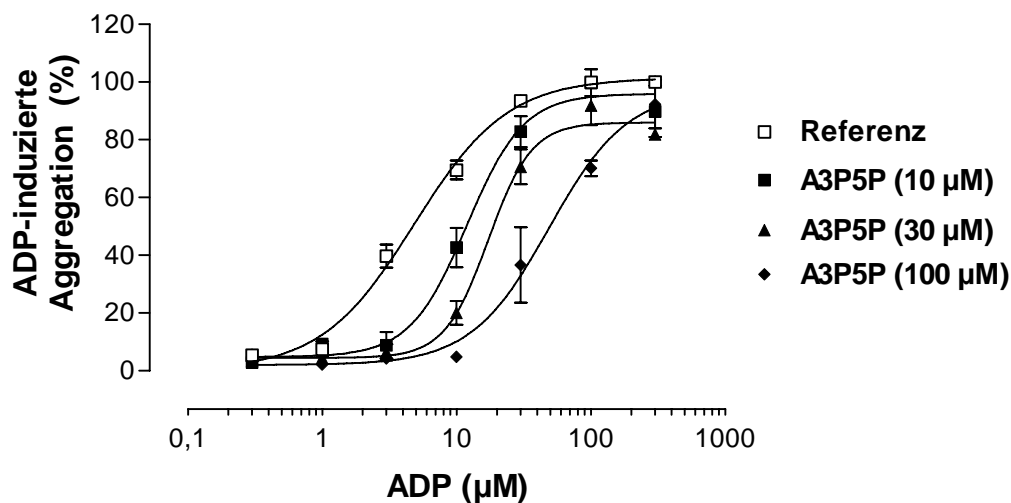


Abbildung 3.24: **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurve ADP-induzierter Aggregation von in Puffer (0,32 U/ml Apyrase) suspendierten Thrombozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an MRS2179. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 - 4 (Inkubationskurven) bzw. 13 - 15 (Kontrollkurve) Einzelexperimenten \pm S.E.M. . **(B)** Schild-Analyse von MRS2179. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Steigung der Regressionsgerade war mit $0,76 \pm 0,10$ signifikant von 1 verschieden. Der Schnittpunkt des Schild-Plots mit der Abszisse ergab einen pA_2 -Wert von $6,00 \pm 0,10$.

ERGEBNISSE

Neben MRS2179 wurde der pA_2 -Wert von A3P5P, einem weiteren in der Literatur gut charakterisierten $P2Y_1$ -Standardantagonisten, ermittelt. In Anwesenheit des Antagonisten A3P5P kam es konzentrationsabhängig zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.25). Die Auswertung der Schild-Analyse ergab eine Gerade mit der Steigung $0,79 \pm 0,08$ die signifikant von 1 abwich. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse führte zu einem pA_2 -Wert von $5,16 \pm 0,08$.

A



B

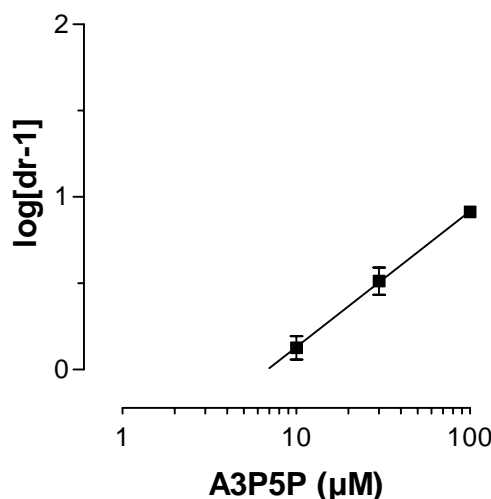


Abbildung 3.25: **(A)** Dosis-Wirkungs-Kurve ADP-induzierter Aggregation humaner Thrombozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an A3P5P. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 (Inkubationskurven) bzw. 9 (Referenzkurve) Einzelexperimenten. **(B)** Schild-Analyse von A3P5P. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Steigung der Regressionsgerade war mit $0,79 \pm 0,08$ signifikant von 1 verschieden. Der Schnittpunkt des Schild Plots mit der Abszisse ergab einen pA_2 -Wert von $5,16 \pm 0,08$.

ERGEBNISSE

3.3.1.5.3. Bestimmung des pA_2 -Wertes des $P2Y_{12}$ -Antagonisten 2-meSAMP und von pHMBS

Bei der Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Kurven zeigte sich in Anwesenheit von 2-meSAMP eine konzentrationsabhängige parallele Rechtsverschiebung (Abbildung 3.26). Die Auswertung durch Schild-Regression ergab eine Gerade mit der Steigung von $1,09 \pm 0,31$, die nicht signifikant von 1 verschieden war, was auf einen kompetitiven Mechanismus schließen lässt. Der entsprechende pA_2 -Wert betrug $5,79 \pm 0,12$ (Steigung = 1).

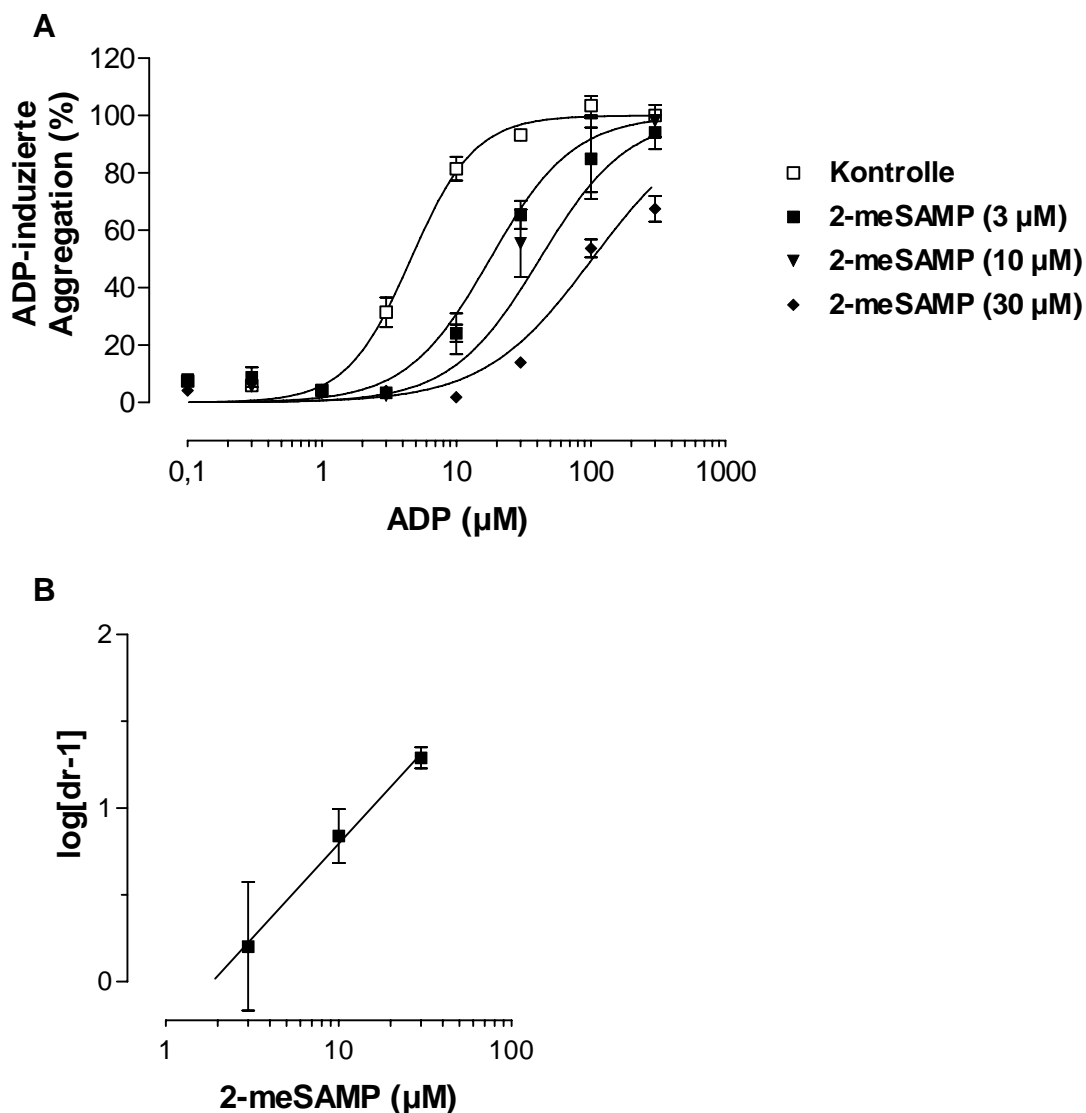


Abbildung 3.26: (A) Dosis-Wirkungs-Kurven ADP-induzierter Aggregation von in Puffer (0,32 U/ml Apyrase) suspendierten Thrombozyten in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an 2-meSAMP. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 (Inkubationskurven) bzw. 9 (Kontrollkurve) Einzelexperimenten. (B) Schild-Analyse von 2-meSAMP. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Steigung der Regressionsgerade war mit $1,09 \pm 0,31$ nicht signifikant von 1 verschieden. Es wurde ein pA_2 -Wert von $5,79 \pm 0,12$ ermittelt (Steigung = 1).

ERGEBNISSE

Im Falle von pHMBS (3-30 μM) wurde konzentrationsabhängig eine Hemmung der Aggregation beobachtet (Abbildung 3.27). Allerdings handelt es sich dabei um keine reine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, vielmehr war gleichzeitig eine Abnahme der Kurvensteigung (3 μM : $1,83 \pm 0,22$; 10 μM : $0,67 \pm 0,10$) und eine Abnahme der Maximalaggregation festzustellen. In Anwesenheit von 30 μM pHMBS kam es zu einer vollständigen Hemmung der Aggregation. Diese Daten deuten auf eine irreversible Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors durch das Thiolreagenz pHMBS hin (siehe Diskussion).

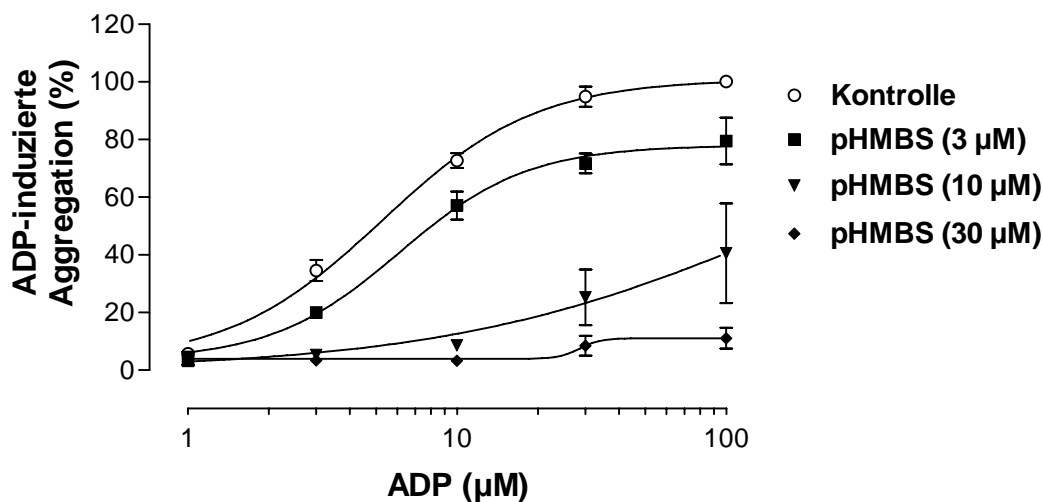


Abbildung 3.27: Dosis-Wirkungs-Kurven ADP-induzierter Aggregation in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an pHMBS. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 (Inkubationskurven) bzw. 13 (Kontrollkurven) Einzelexperimenten \pm S.E.M..

3.3.2. PPADS- und PPNDS-Analoga

PPADS, MRS2159, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl und SB9 (Strukturformeln Abbildung 3.4) erwiesen sich als potente Antagonisten an P2-Rezeptoren isolierter Organe (Kapitel 3.1.2.). Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung der Substanzen wurden Untersuchungen an den P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten durchgeführt.

3.3.2.1. Hemmkurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration

Die durch 1 μ M $\alpha\beta$ meATP-induzierte Zunahme des Anstiegs an $[Ca^{2+}]_i$ wurde durch die Antagonisten NAC, N-Butyl, CLII und SB9 konzentrationsabhängig gehemmt. (Abbildung 3.28). Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 3.9 aufgeführten pIC_{50} -Werte. Da MRS2159, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl und SB9 Wellenlängen um 350 nm absorbiert, wurde für die Bestimmung der Hemmkurven der Einwellenlängenfarbstoff Oregon green verwendet, da die spektralen Eigenschaften von Oregon green durch die Antagonisten nicht signifikant beeinflusst werden.

Die Hemmkurven von PPADS, MRS2159 und PPNDS wurden von K. Menke (2003) erstellt. Die entsprechenden pIC_{50} -Werte sind ebenfalls in Tabelle 3.9 aufgeführt.

ERGEBNISSE

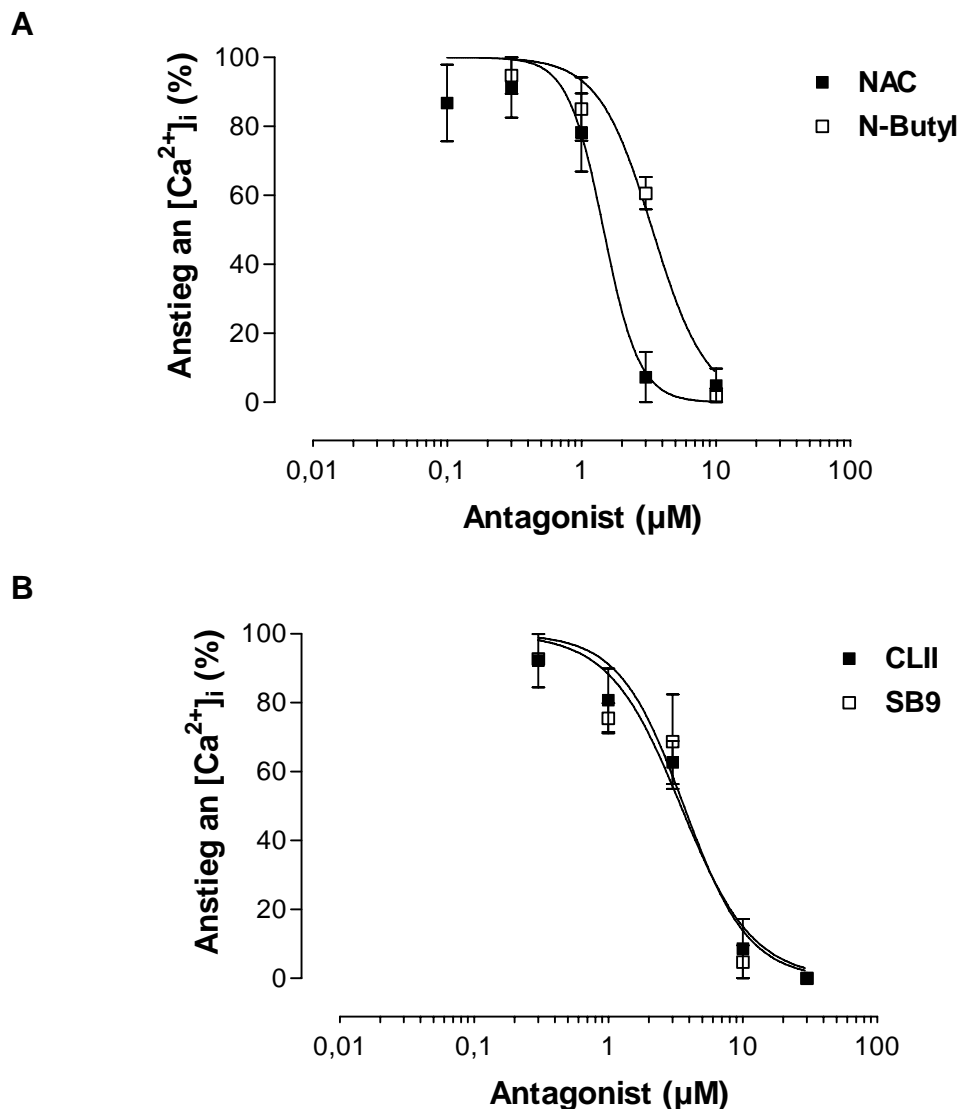


Abbildung 3.28: Inhibitionskurven von (A) NAC und N-Butyl sowie (B) CLII und SB9 gegen $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten, der mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Oregon green 488 BAPTA-1 erfasst wurde. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

CLII, SB9 und N-Butyl ergaben nahezu deckungsgleiche Inhibitionskurven. Auffallend bei allen Substanzen ist der steile Verlauf der Inhibitionskurven.

Auch PPADS, MRS2159 und NAC zeigten nahezu identische P2X₁-antagonistische Wirkungen gegen den Calciumeinstrom in humane Thrombozyten; die Inhibitionskurven dieser Substanzen waren im Vergleich zu denen von CLII, SB9 und N-Butyl um den Faktor 2,5 nach links verschoben. Es ergab sich folgende Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke gegen den $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration:

MRS2159 \geq PPADS = NAC > CLII = PPNDS = N-Butyl = SB9.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.9: pIC_{50} -Werte der PPADS- und PPNDS-Analoga gegen die $\alpha\beta meATP$ ($1 \mu M$)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	Steigung $\pm S.E.M.$	Farbstoff
PPADS	5,90 ¹⁾	1,39	Fura
MRS2159	6,04 ¹⁾	1,85	Fura
	6,12 ¹⁾	2,75	Oregon
CLII	5,56 \pm 0,07	1,63 \pm 0,39	Oregon
PPNDS	5,52 ¹⁾	3,05	Fura
	5,51 ¹⁾	2,76	Oregon
NAC	5,84 \pm 0,08	3,28 \pm 1,40	Oregon
N-Butyl	5,47 \pm 0,07	2,17 \pm 0,75	Oregon
SB9	5,44 \pm 0,10	1,81 \pm 0,71	Oregon

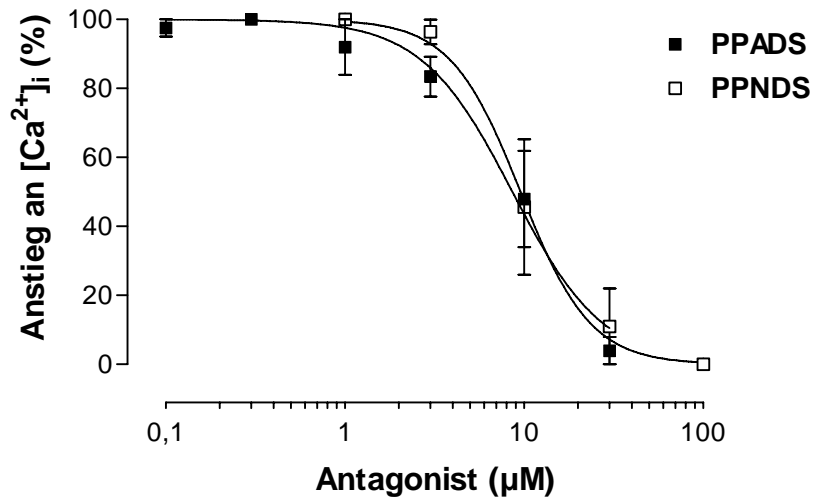
¹⁾ Werte aus Dissertation K. Menke (2003)

3.3.2.2. Hemmkurven des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration

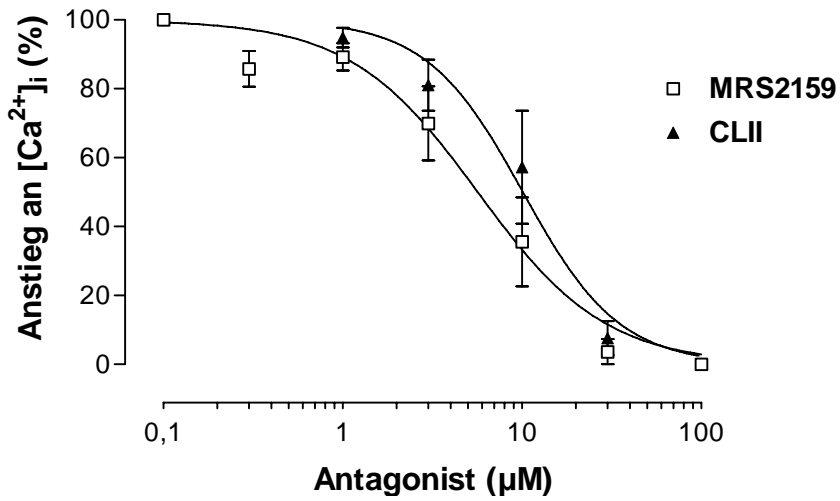
Die Substanzen PPADS, MRS2159, CLII, PPNDS, NAC, N-Butyl und SB9 hemmten den durch $1 \mu M$ ADP ausgelösten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg konzentrationsabhängig (Abbildung 3.29). Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 3.10 aufgeführten pIC_{50} -Werte.

ERGEBNISSE

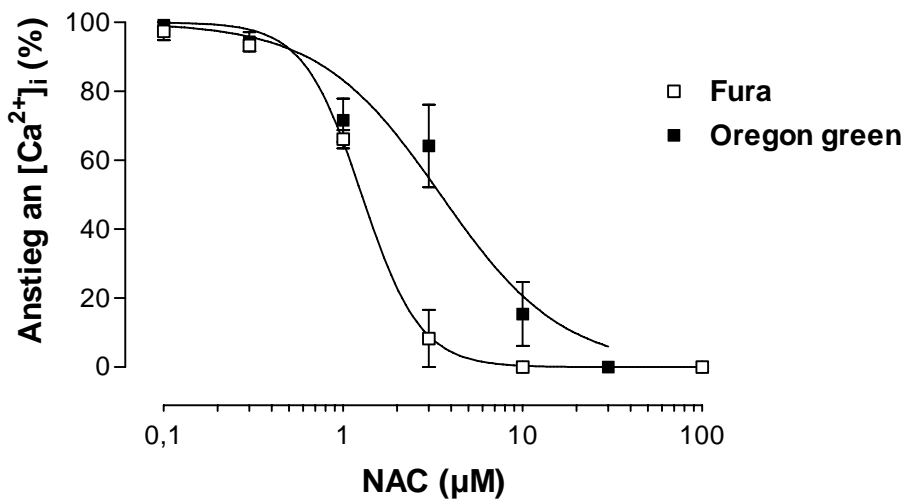
A



B



C



ERGEBNISSE

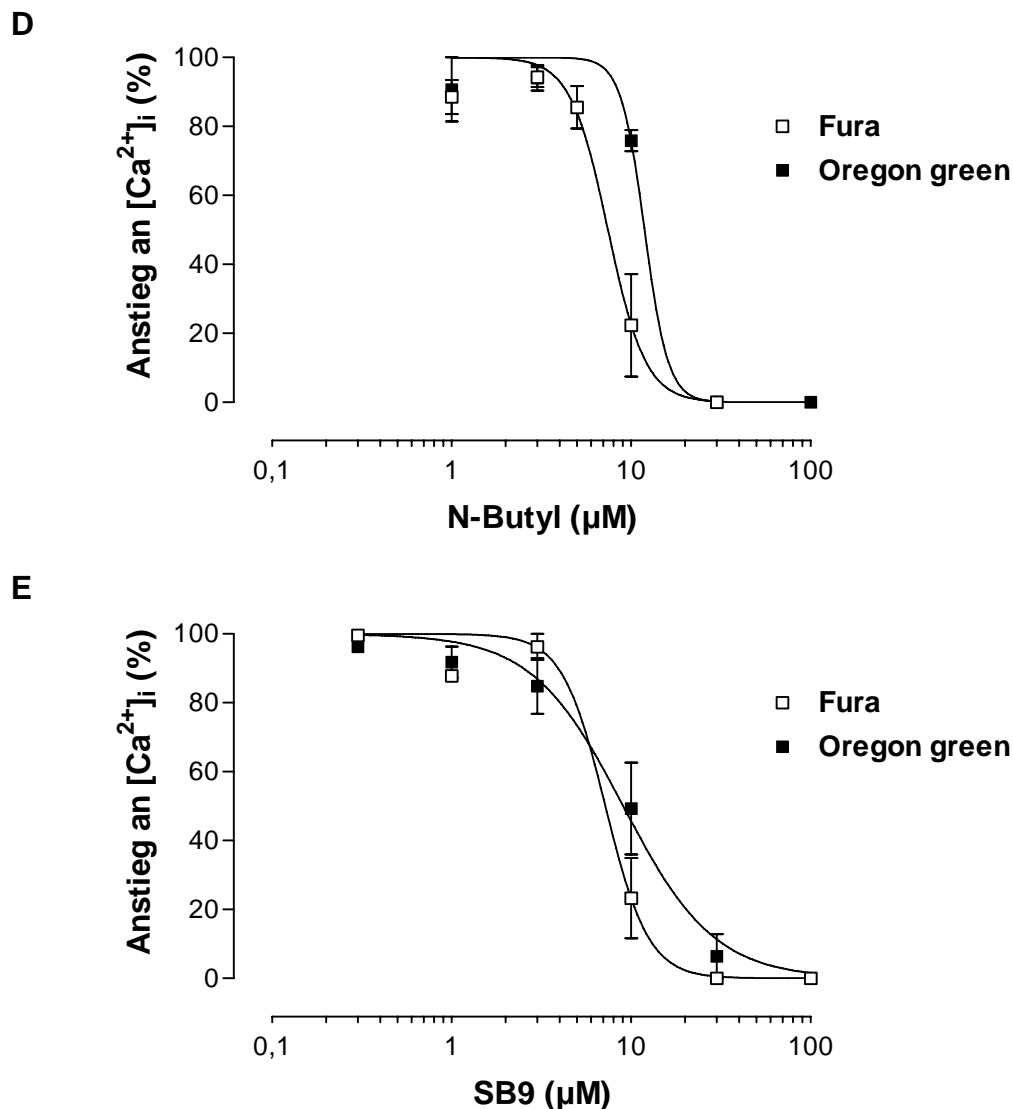


Abbildung 3.29: Hemmkurven von (A) PPADS, PPNDs (Fluoreszenzfarbstoff: Fura), (B) MRS2159 (Fura), CLII (Oregon), (C) NAC (Fura und Oregon), (D) N-Butyl (Fura und Oregon) und (E) SB9 (Fura und Oregon) gegen ADP (1 μM)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-7 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

Wie auch schon bei den Untersuchungen mit $\alpha\beta meATP$ weisen die Inhibitionskurven eine sehr große Steigung auf. Bei NAC, N-Butyl und SB9 wurden für die Erstellung der Inhibitionskurven sowohl Fura-2 (Exzitation: 340 und 380 nm; Emission: 510 nm) als auch Oregon green 488 BAPTA-1/AM (Exzitation: 494 nm; Emission: 523 nm) zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität verwendet, um einen optischen Einfluss der Antagonisten auf die Fluoreszenzmessung zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die pIC_{50} -Werte, die mit Hilfe von Oregon green 488 BAPTA-1 bestimmt wurden, etwas niedriger ausfallen als die mit Fura-2. Am deutlichsten ist dieser Unterschied bei NAC, wo sich die beiden Werte um eine halbe Zehnerpotenz unterscheiden. Mit Ausnahme von NAC zeigen alle untersuchten Substanzen eine nahezu identische

ERGEBNISSE

antagonistische Wirkstärke gegenüber ADP-induzierter Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Die Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke gegen den ADP-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration humaner Thrombozyten ist:

$$\text{NAC} > \text{MRS2159} = \text{PPADS} = \text{SB9} = \text{N-Butyl} \geq \text{PPNDS} = \text{CLII}.$$

Tabelle 3.10: pIC_{50} -Werte der Analoga gegen den ADP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten.

Substanz	$pIC_{50} \pm \text{S.E.M.}$	Steigung $\pm \text{S.E.M.}$	Farbstoff
PPADS	$5,15 \pm 0,06$	$1,72 \pm 0,28$	Fura
MRS2159	$5,19 \pm 0,06$	$2,23 \pm 0,29$	Fura
CLII	$4,99 \pm 0,06$	$1,22 \pm 0,21$	Oregon
PPNDS	$5,02 \pm 0,02$	$1,62 \pm 0,36$	Fura
NAC	$5,93 \pm 0,02$	$2,68 \pm 0,25$	Fura
	$5,51 \pm 0,08$	$1,28 \pm 0,29$	Oregon
N-Butyl	$5,13 \pm 0,04$	$4,16 \pm 1,02$	Fura
	$4,93 \pm 0,24$	$6,61 \pm 21,11$	Oregon
SB9	$5,14 \pm 0,07$	$3,63 \pm 1,09$	Fura
	$5,04 \pm 0,04$	$1,72 \pm 0,24$	Oregon

3.3.2.3. Untersuchung des optischen Einflusses der Analoga auf die Calciummessungen

Aufgrund der starken Abweichung der antagonistischen Wirkstärke von PPADS- und PPNDS-Analoga auf den $P2X_1$ - und $P2Y_1$ -vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Thrombozyten im Vergleich zu den an isolierten Organen erhaltenen Werten (Tabelle 3.2, 3.5) kam der Verdacht auf, dass die Substanzen einen Einfluss auf die fluoreszenzspektrometrische Messung haben könnten.

ERGEBNISSE

3.3.2.3.1. UV-Vis-Spektroskopie verschiedener Antagonisten

Es wurde untersucht, ob die PPADS- und PPNDS-Analoga bei den für die Fluoreszenzmessung verwendeten Wellenlängen absorbieren. Dafür wurden mit PPADS, MRS2159, SB9 und N-Butyl vier Substanzen ausgewählt, deren antagonistische Wirkstärke an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten sich deutlich von den Ergebnissen unterscheidet, die an P2-Rezeptoren isolierter Organe ermittelt wurden. Die Absorption mehrerer Konzentrationen der Antagonisten wurde bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt.

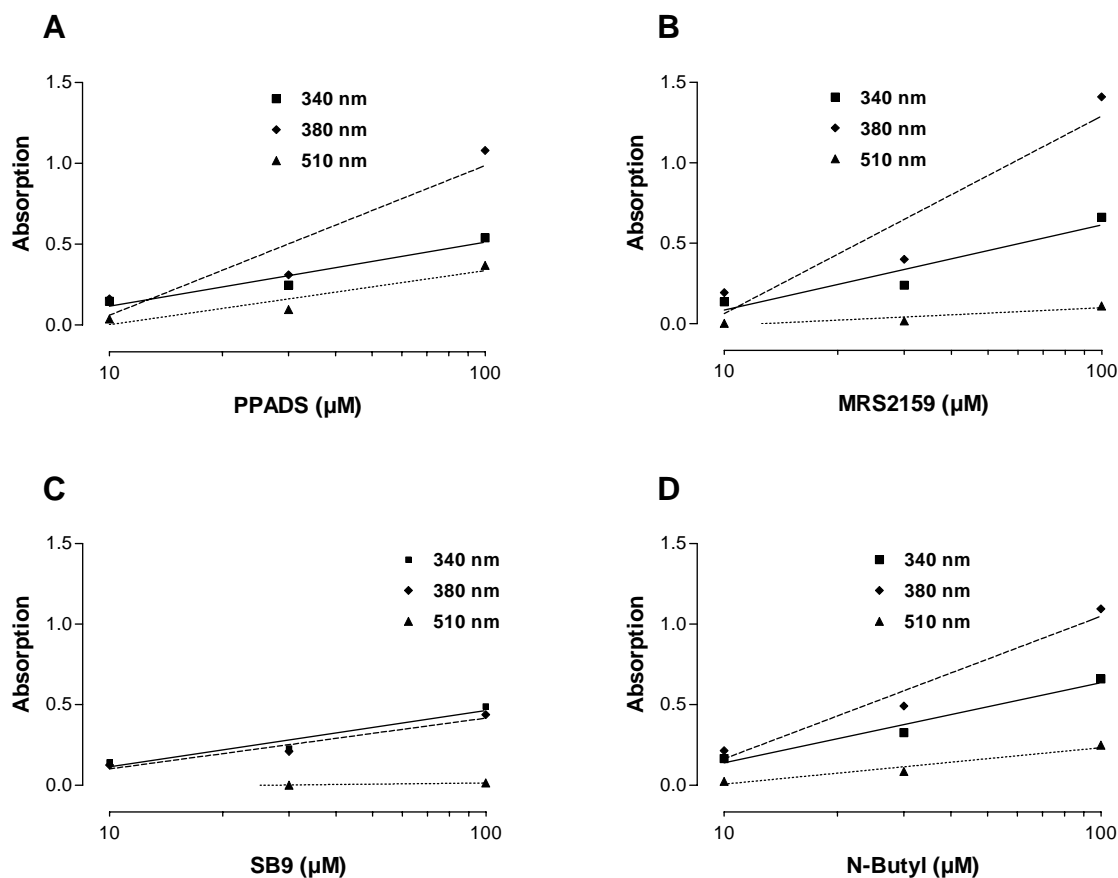


Abbildung 3.30: Absorption von (A) PPADS, (B) MRS2159, (C) SB9 und (D) N-Butyl in Wasser bei 340, 380 und 510 nm. Die Daten stammen aus Einzelexperimenten.

Bei Fura-2 handelt es sich um einen sogenannten ratio-Farbstoff, der in der calciumfreien Form ein Absorptionsmaximum bei 363 nm besitzt. Durch Calciumbindung an den Farbstoff verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum hin zu 335 nm. Das Emissionsmaximum beider Formen liegt bei ca. 500 nm. Bei der ratio-Messung wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensität (510 nm) bei den Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm ermittelt.

ERGEBNISSE

Deshalb wurde die Absorption der Antagonisten bei diesen 3 Wellenlängen gemessen.

Die Messung der UV-Vis-Absorption ergab, dass die Substanzen PPADS, MRS2159 und N-Butyl jeweils bei 380 nm eine stärkere Absorption als bei 340 nm aufweisen. Es könnte also sein, dass bei diesen Substanzen weniger Licht für die Anregung der calciumfreien Form von Fura-2 zur Verfügung steht und somit deren Emission bei 510 nm geringer ausfällt. Dies würde dazu führen, dass der ratio-Wert erhöht wird und somit eine höhere intrazelluläre Calciumkonzentration vorgetäuscht wird.

Da die Absorption der Antagonisten bei einer Konzentration von 10 μM allerdings noch sehr gering ist, bei der Ermittlung der Hemmkurven bei dieser Antagonistenkonzentration aber schon mehr als 50 % Hemmung erfolgte (Tabelle 3.9, 3.10), dürfte die Absorption des Antagonisten keinen großen Einfluss auf die pIC_{50} -Werte haben.

SB9 zeigt bei 340 und 380 nm eine nahezu identische Absorption, wodurch die ratio-Werte nicht beeinflusst werden dürften. Die Absorption der Antagonisten war bei 510 nm insgesamt sehr gering (Abbildung 3.30).

3.3.2.3.2. Untersuchung des Einflusses der Antagonisten auf die Messkurven der Fluoreszenzfarbstoffe

Es wurde untersucht, ob die PPADS- und PPNDS-Analoga bzw. A3P5P einen optischen Einfluss auf die Messung der basalen Calciumwerte gewaschener Thrombozyten zeigen. Aufgrund der sehr ähnlichen antagonistischen Eigenschaften der Substanzen wurden hier alle in 3.3.2.1 und 3.3.3.2 verwendeten PPADS- und PPNDS-Analoga vermessen. Dazu wurden die Messkurven vor Agonistenzugabe in Gegenwart von Fura-2 bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und Emission von 510 nm (= calciumgebundenes Fura-2) sowie bei 380 / 510 nm (calciumfreies Fura-2) registriert und die ratio-Werte der beiden Messungen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der Antagonisten bestimmt. Als 100% wurden die entsprechenden Werte der Referenzmessung ohne Antagonist gesetzt.

ERGEBNISSE

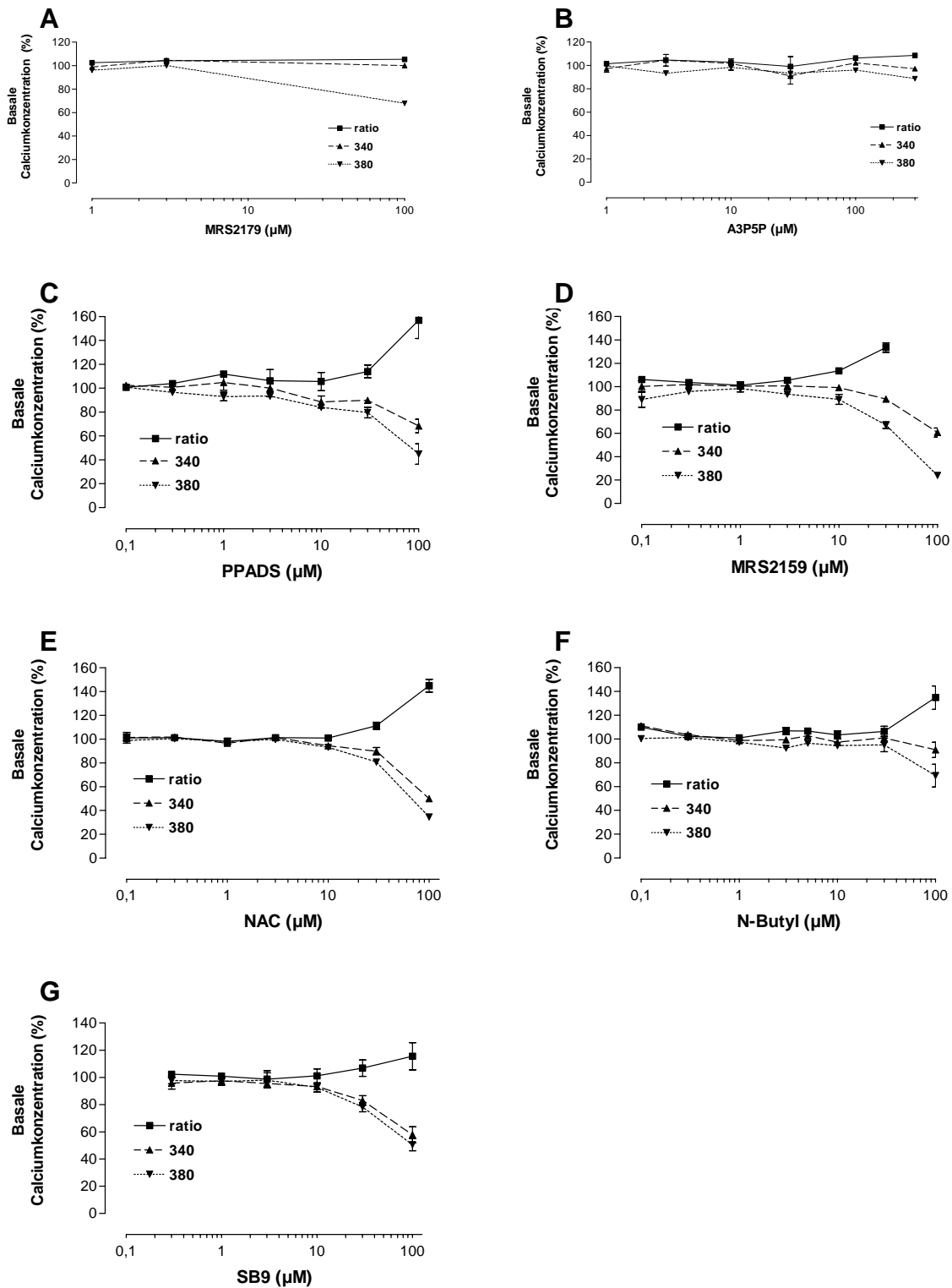


Abbildung 3.31: Optischer Einfluss von (A) MRS2179, (B) A3P5P, (C) PPADS, (D) MRS2159, (E) NAC, (F) N-Butyl und (G) SB9 auf die basalen Messkurven vor Agonistenzugabe. Als 100 % wurden jeweils die basalen Messkurven einer Referenz gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-7 Einzelwerten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Es zeigte sich (Abbildung 3.31), dass bis zu einer Konzentration von 3 μM bei MRS2179 und bis 100 μM bei A3P5P kein Einfluss der Antagonisten auf die Grundlinie im Vergleich zur Referenz zu erkennen war. Da bei diesen Konzentrationen jeweils schon eine vollständige Hemmung des ADP (1 μM)-induzierten Calciumsignals gegeben war, kann man einen optischen Einfluss der Antagonisten auf die pIC_{50} -Werte ausschließen (Abbildung 3.16).

Auch bei NAC, SB9 und N-Butyl kam es erst ab einer Konzentration von 30 μM bzw. 100 μM zu einer Verschiebung der Grundlinie, Konzentrationen bei denen ebenfalls schon vollständige Hemmung des ADP (1 μM)-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs vorhanden ist.

Bei MRS2159 und bei PPADS war bereits bei Konzentrationen von 3 bis 10 μM ein Einfluss auf die Grundlinie zu erkennen, der allerdings bei diesen Konzentrationen noch gering ausfiel.

3.3.2.3.3. Untersuchung des Einflusses der Antagonisten auf 5-HT-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration

In einem weiteren Versuch zur Klärung des optischen Einflusses der Antagonisten auf die Messung der Calciumsignale wurde 5-HT (1 μM) als Agonist zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration verwendet, die mit Hilfe von Fura-2 erfasst wurde.

1 μM 5-HT führte zu einer rasch einsetzenden, transienten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die vergleichbar dem Calciumanstieg durch 1 μM ADP war.

Zur Validierung der Messung der 5-HT-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde der pIC_{50} -Wert von Ketanserin gegen 1 μM 5-HT bestimmt (Abbildung 3.32). Bei Ketanserin handelt es sich um einen gut untersuchten Standardantagonisten des 5-HT_{2A}-Rezeptors (Kagaya et al., 1990).

Die Messungen ergaben einen IC_{50} -Wert für Ketanserin von $16 \text{ nM} \pm 0,21$ bei einer Steigung von $0,70 \pm 0,22$.

ERGEBNISSE

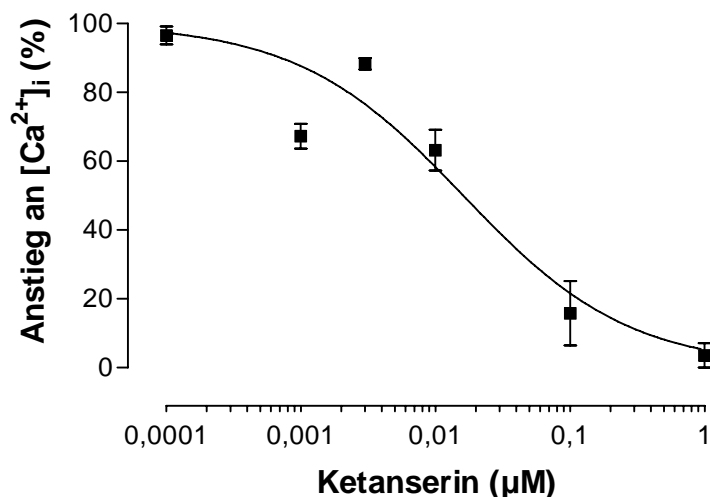


Abbildung 3.32: Hemmkurve von Ketanserin gegen 5-HT (1 µM)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten. Die Daten sind Mittelwerte aus 3 Einzelexperimenten ± S.E.M..

100 µM MRS2179 hemmte die 5-HT (1 µM)-induzierten Calciumsignale auf 76 % der Referenzsignale. Weiterhin wurde die konzentrationsabhängige Inhibition von PPADS, MRS2159, SB9, NAC und N-Butyl auf die 5-HT-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration untersucht (Abbildung 3.33). Die Hemmwerte und die pIC₅₀-Werte der nichtlinearen Regression sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Die Untersuchungen zeigten, dass MRS2179, PPADS und SB9 selbst in hohen Konzentrationen kaum einen Einfluss auf die 5-HT-induzierten Calciumsignale ausübten. 30 µM PPADS und SB9 bewirkten jeweils nahezu 100%-ige Blockade der ADP (1 µM)-vermittelten Calciumsignale und hemmten die 5-HT-induzierten Calciumsignale um 10% bzw. 35%. Im Bereich des IC₅₀-Werte von ca. 10 µM der Antagonisten am P2Y₁-Rezeptor (Tabelle 3.9) kommt es bei beiden Substanzen zu keiner signifikanten Hemmung der 5-HT-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration.

Auch bei MRS2159 ist bei einer Konzentration von 10 µM noch kein signifikanter Einfluss auf die 5-HT-induzierten Calciumsignale zu erkennen. Bei höheren Konzentrationen von 30 bzw. 100 µM MRS2159 zeigten sich gegläufige Effekte.

NAC und N-Butyl erwiesen sich als volle Antagonisten gegenüber dem 5-HT-induzierten Anstieg von [Ca²⁺]_i mit einem pIC₅₀-Wert von 5,60 (NAC) bzw. 4,48 (N-Butyl).

ERGEBNISSE

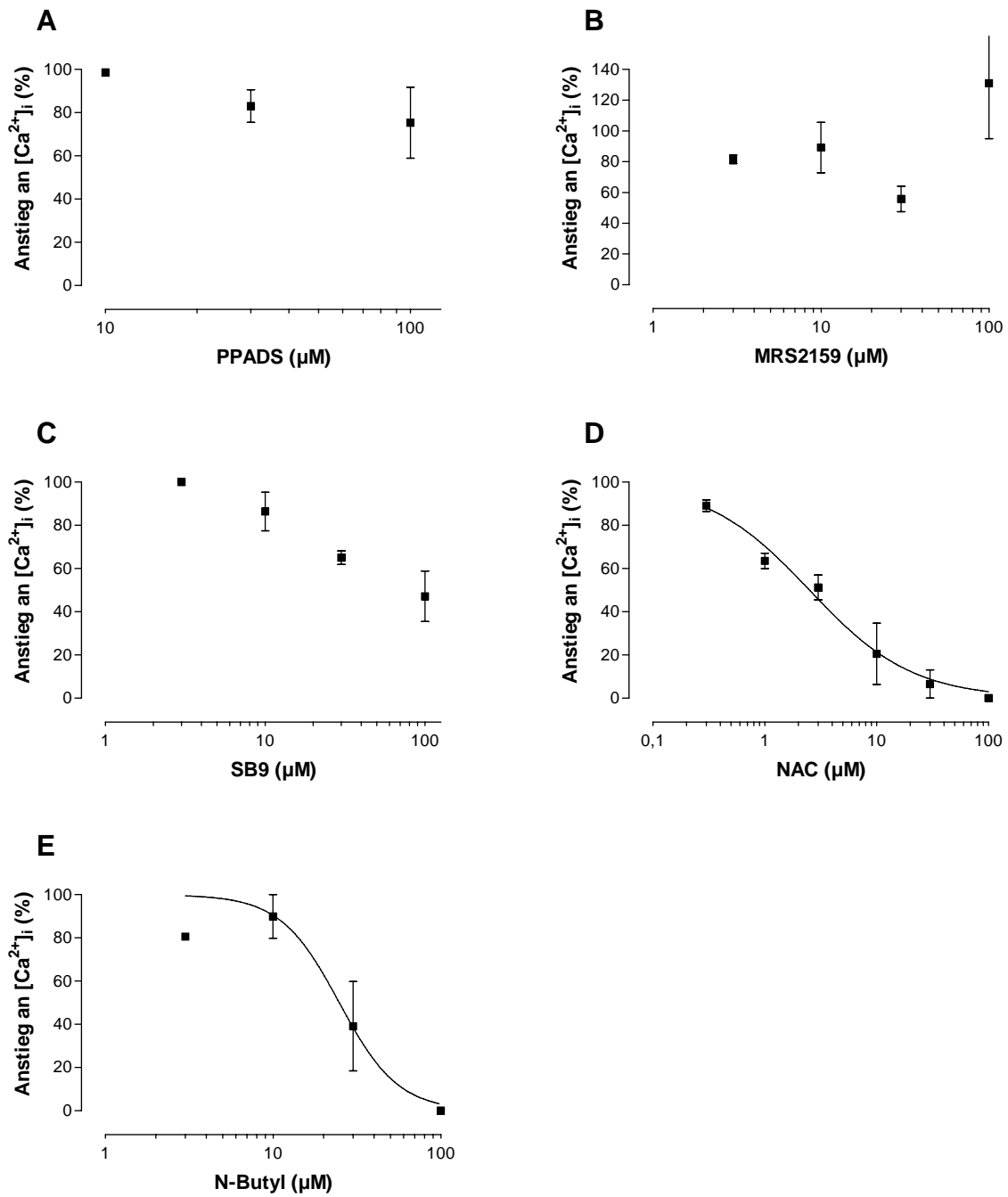


Abbildung 3.33: Einfluss von (A) PPADS, (B) MRS2159, (C) SB9, (D) NAC und (E) N-Butyl auf die 5-HT (1 µM)-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-4 Einzelexperimenten ± S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.11: Einfluss von MRS2179, PPADS, MRS2159, SB9, NAC und N-Butyl auf die 5-HT (1 μ M)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten.

Substanz	[Ca ²⁺] _i -Anstieg (%) ¹⁾	pIC ₅₀ ± S.E.M.	Steigung ± S.E.M.
MRS2179	76,0 ± 8,0	---	---
PPADS	75,4 ± 16,4	---	---
MRS2159	131 ± 36	---	---
SB9	47,2 ± 11,6	---	---
NAC	0	5,60 ± 0,05	0,94 ± 0,10
N-Butyl	0	4,48 ± 0,07	2,93 ± 1,85

¹⁾ [Ca²⁺]_i -Anstieg in Gegenwart von 100 μ M Antagonist bezogen auf Referenzuntersuchungen ohne Antagonist.

3.3.2.3.4. Untersuchung des ADP β S-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration

Um einen Einfluss des verwendeten Agonisten auf die unterschiedlichen Messergebnisse an isolierten Organen und Thrombozyten auszuschließen, wurden Untersuchungen mit dem apyrasestabilen ADP β S durchgeführt, das auch für die Untersuchungen am Meerschweinchen-Ileum verwendet wurde (siehe 3.1). ADP β S wurde mit Apyrase vorbehandelt, um mögliche ADP-Verunreinigungen zu entfernen. ADP β S induzierte konzentrationsabhängig eine rasch einsetzende transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Oregon green 488 BAPTA-1 gemessen wurde (Abbildung 3.34). Die Messungen ergaben einen pEC₅₀-Wert von 5,98 ± 0,08 für ADP β S, das somit die gleiche agonistische Wirkstärke wie ADP (Abbildung 3.15) am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten zeigt. Für die Bestimmung von pIC₅₀-Werten von Antagonisten wurde deshalb ebenfalls eine Konzentration von 1 μ M ADP β S verwendet.

ERGEBNISSE

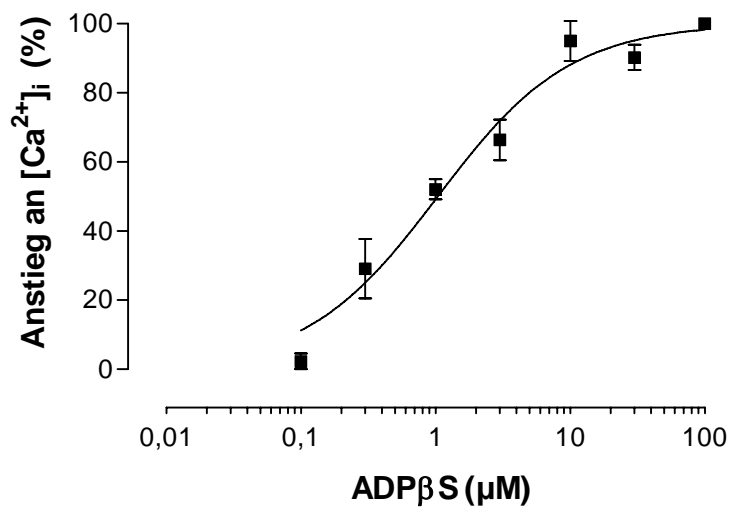


Abbildung 3.34: Dosis-Wirkungs-Kurve der ADP β S-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in Thrombozyten. Der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg wurde mit Hilfe von Oregon-green ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-4 Einzelwerten \pm S.E.M..

Es wurden Hemmkurven von MRS2179 und SB9 gegen ADP β S (1 μ M) erstellt (Abbildung 3.35). Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Oregon-green (SB9) und Fura-2 (MRS2179) erfasst. Die erhaltenen Daten wurden mit denen verglichen, die mit dem Agonisten ADP erhalten wurden (Abbildung 3.16, Tabelle 3.8; Abbildung 3.29, Tabelle 3.10).

ERGEBNISSE

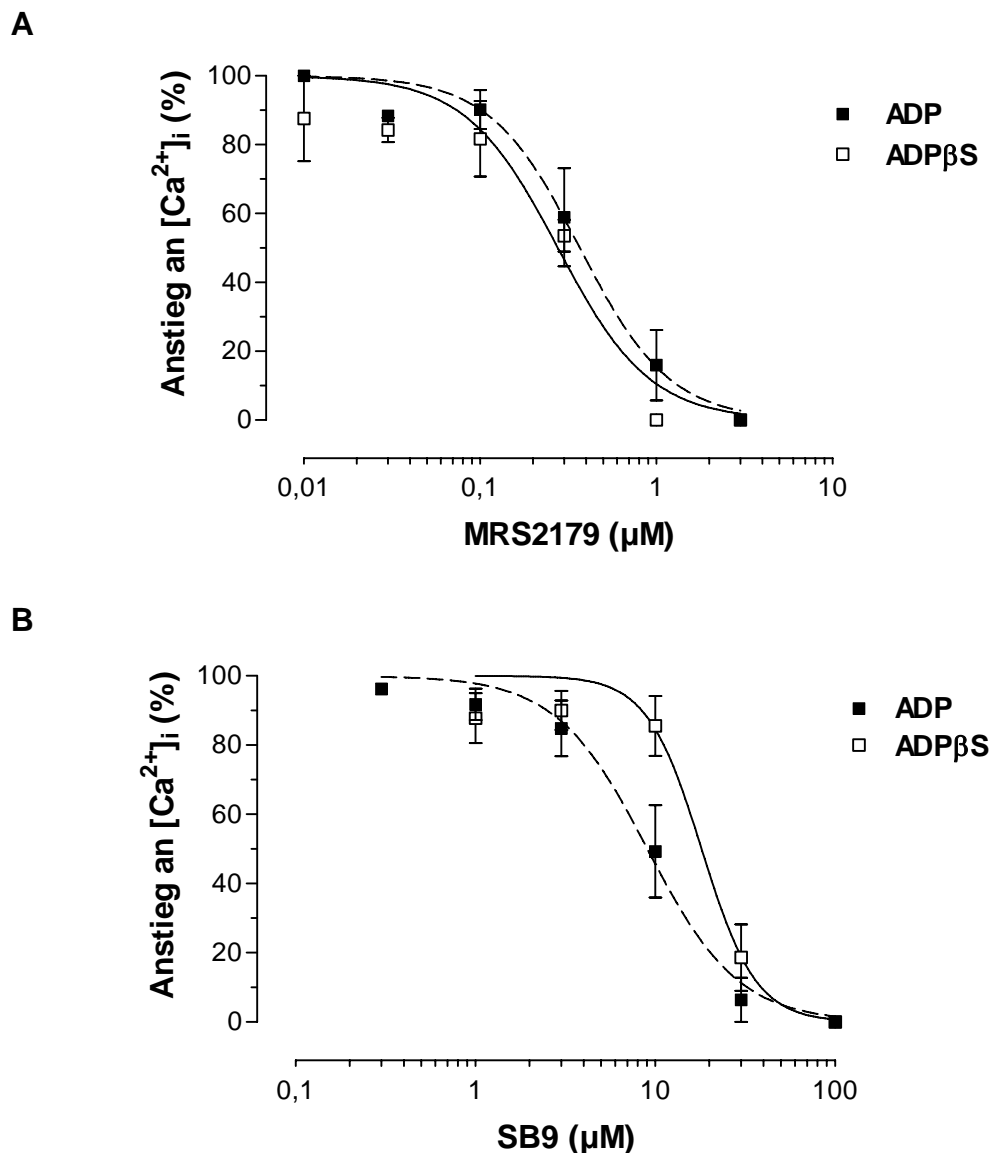


Abbildung 3.35: Hemmkurven von (A) MRS2179 und (B) SB9 gegen ADP β S (1 μ M)- und ADP (1 μ M)-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten. Die Daten sind Mittelwerte aus 1-4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

MRS2179 ergab gegen 1 μ M ADP β S-induzierte Calciumsignale eine nahezu deckungsgleiche Hemmkurve wie gegen ADP (1 μ M). SB9 zeigte gegen ADP β S eine um den Faktor 2 schwächere antagonistische Potenz als gegen ADP. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.12: pIC_{50} -Werte von MRS2179 und SB9 gegen ADP ($1 \mu M$)- und ADP βS ($1 \mu M$)-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	$pIC_{50} \pm S.E.M.$
	Agonist = ADP	Agonist = ADP βS
MRS2179	$6,43 \pm 0,03$	$6,56 \pm 0,09$
	(Fura)	(Fura)
SB9	$5,04 \pm 0,04$	$4,74 \pm 0,07$
	(Oregon)	(Oregon)

3.3.2.3.5. Einfluss von SB9 auf die Hemmwirkung von MRS2179 gegen ADP_{HEX}-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration

Auffallend war die große Diskrepanz von mehr als einer Zehnerpotenz zwischen der antagonistischen Wirkstärke von SB9 am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchenlleum und dem an Thrombozyten bei den Calciummessungen (Tabelle 3.5 und 3.10). Um nun einen optischen Effekt von SB9 auszuschließen, der die antagonistische Wirkstärke verschleiert, wurde die Hemmwirkung von MRS2179 ($0,3 \mu M$ und $1 \mu M$) gegen ADP ($1 \mu M$)-induzierte Calciumsignale in An- und Abwesenheit von $1 \mu M$ SB9 untersucht (Abbildung 3.36).

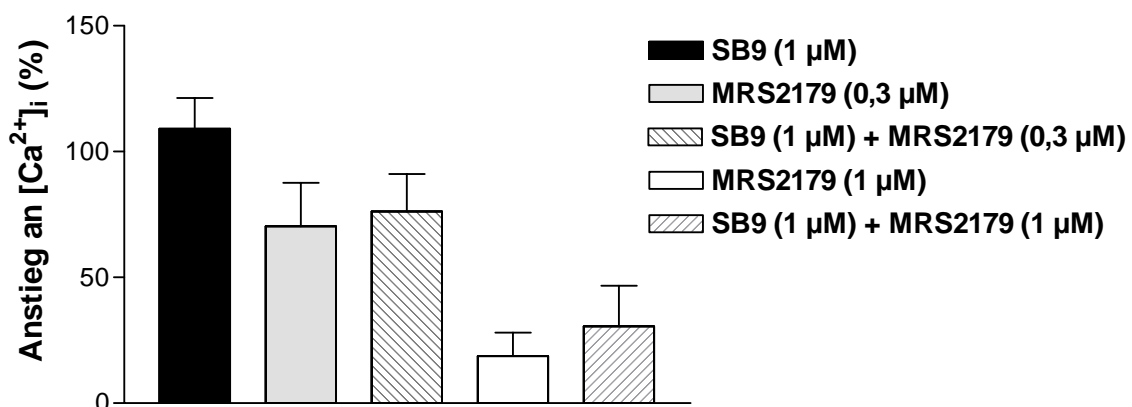


Abbildung 3.36: Einfluss von SB9 und MRS2179 (allein und in Kombination) auf die ADP ($1 \mu M$)-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-6 Einzelexperimenten $\pm S.E.M.$.

ERGEBNISSE

Die Versuche zeigten, dass SB9 in einer Konzentration von 1 μM keine Hemmwirkung auf ADP (1 μM)-induzierte Calciumsignale ausübt. Inkubation von MRS2179 (0,3 μM) reduziert den intrazellulären Calciumanstieg auf 70,3 % (S.E.M.: 17,3; n = 3). Wird zusätzlich zu den 0,3 μM MRS2179 1 μM SB9 inkubiert, kommt es zu einem Calciumsignal, das $76,2 \pm 14,9$ % (n = 3) der Referenz entspricht.

1 μM MRS2179 reduziert den ADP (1 μM)-vermittelten Calciumanstieg auf $18,7 \pm 9,4$ % (n = 3); durch zusätzliche Inkubation von 1 μM SB9 kommt es zu einem Calciumsignal, das $30,5 \pm 16,2$ % (n = 3) der Referenz entspricht.

Es kam also durch 1 μM SB9 zu keiner signifikanten Hemmung der antagonistischen Wirkung von MRS2179.

3.3.2.4. Schild-Analyse des $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten „shape change“

Zur weiteren Charakterisierung der P2X_1 -antagonistischen Wirkung der PPADS- und PPNDS-Analoga an humanen Thrombozyten wurden exemplarisch Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von MRS2159, PPADS und NAC erstellt.

In Anwesenheit der Antagonisten wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung des „shape change“ beobachtet (Abbildung 3.37). Es kam in allen 3 Fällen zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit einem deutlichen Abfall des Maximums und der Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Tabelle 3.13). Auffallend war außerdem, dass geringe Konzentrationsunterschiede der Antagonisten einen großen Einfluss auf die Inhibition hatten. Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei PPADS, MRS2159 und NAC um nichtkompetitive Antagonisten des P2X_1 -vermittelten „shape change“ humaner Thrombozyten handelt.

ERGEBNISSE

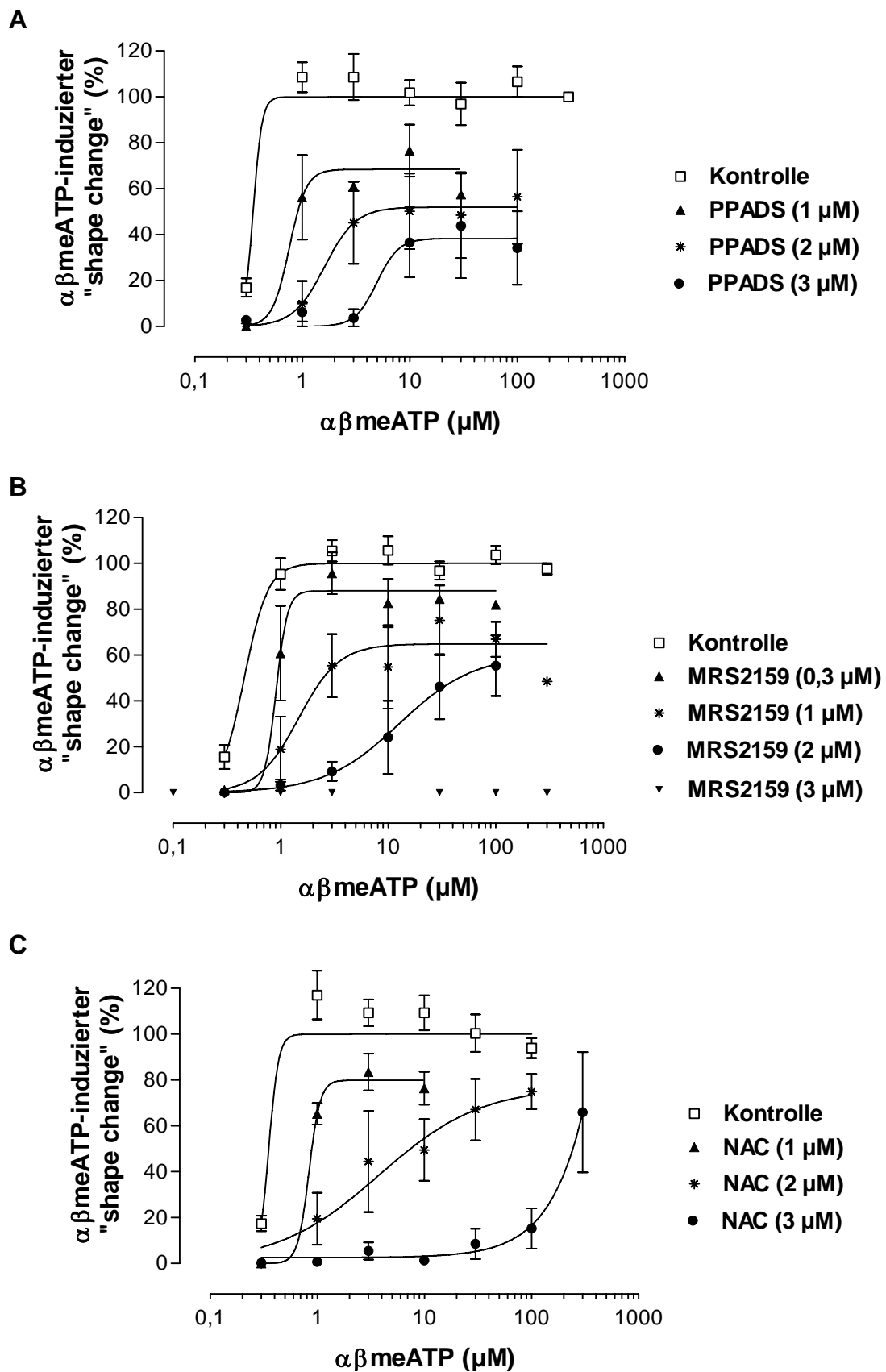


Abbildung 3.37: Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten in Anwesenheit von (A) PPADS, (B) MRS2159 und (C) NAC. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-5 (Inkubationskurven) bzw. 8-14 (Kontrollkurven) Einzelerperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.13: Steigung und Maximum (Kontrollkurve = 100%) der Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten sowie die resultierenden pEC_{50} -Werte in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PPADS, MRS2159 und NAC.

Substanz	Konzentration (μ M)	Steigung	Maximum (% Kontrolle)	pEC_{50}
PPADS	0	10,58	100	6,46
	1	5,49	68,5	6,12
	2	2,99	52	5,79
	3	4,29	38,3	5,31
MRS2159	0	3,95	100	6,34
	0,3	8,24	88,0	6,04
	1	2,31	64,9	5,83
	2	1,25	60,2	4,90
	3	n.b.	n.b.	n.b.
NAC	0	9,62	100	6,45
	1	8,31	80,0	6,08
	2	0,91	77,2	5,42
	3	n.b.	n.b.	n.b.

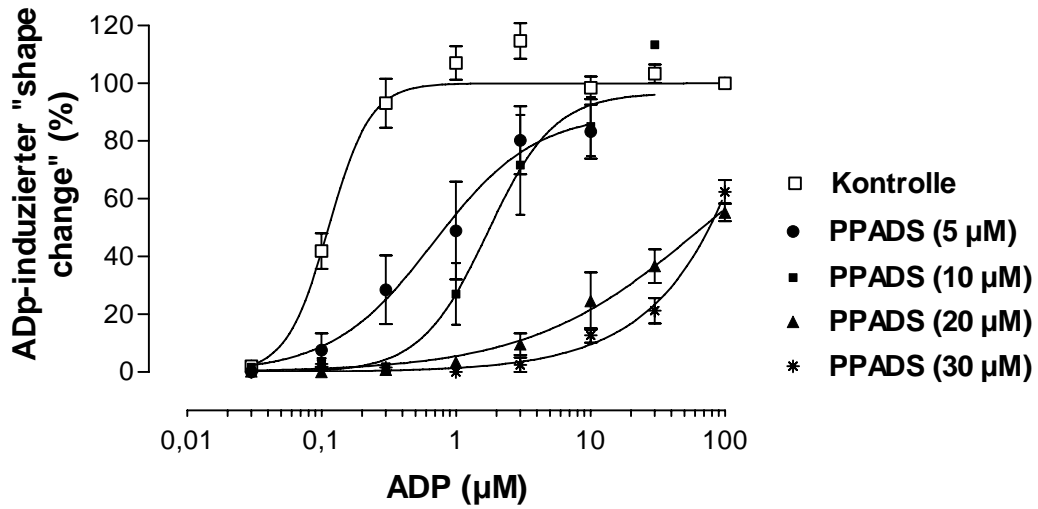
n.b. = nicht bestimmbar

3.3.2.5. Schild-Analyse des ADP-induzierten „shape change“

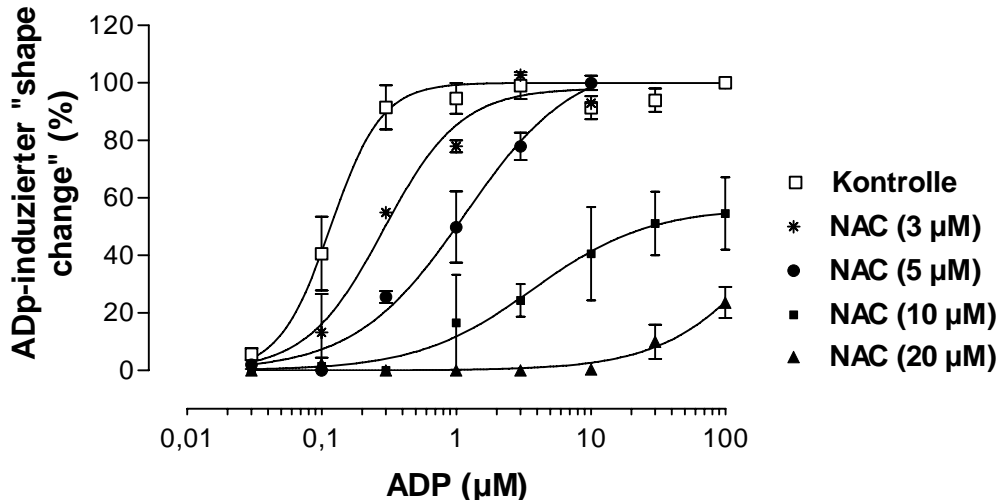
Zur genaueren Untersuchung des Antagonismus von PPADS- und PPNDS-Analoga an $P2Y_1$ -Rezeptoren humaner Thrombozyten wurden exemplarisch Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von PPADS, NAC und SB9 erstellt.

ERGEBNISSE

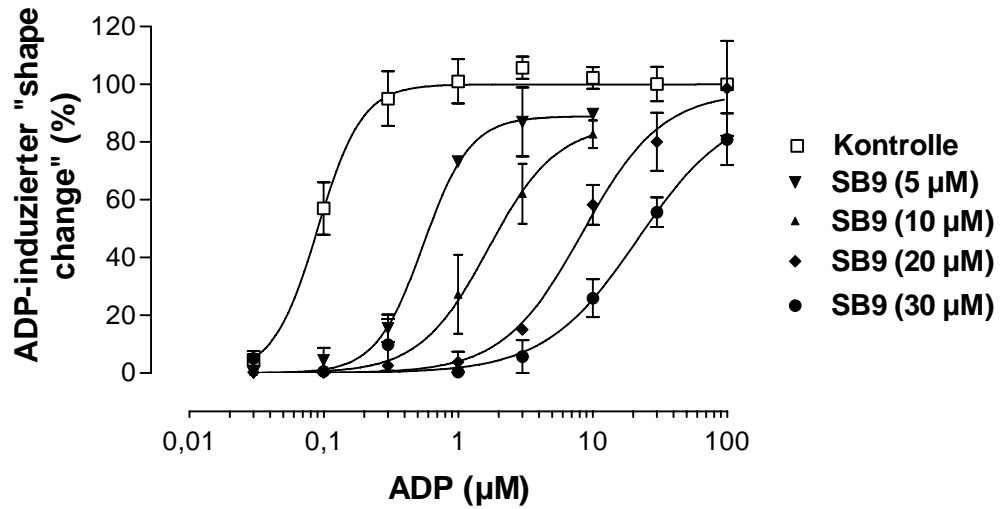
A



B



C



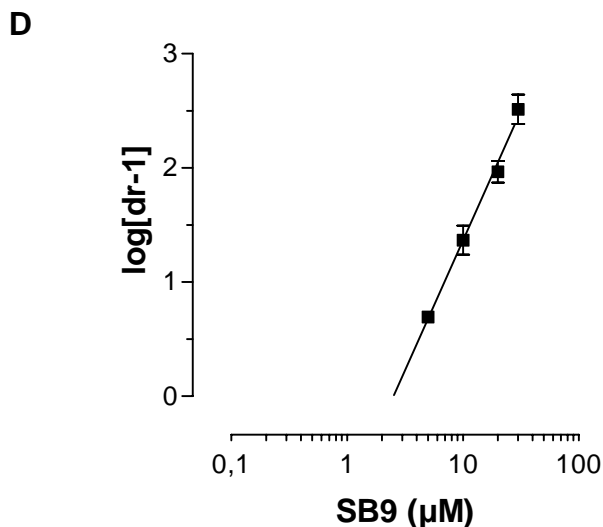


Abbildung 3.38: Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten in Anwesenheit von (A) PPADS, (B) NAC und (C) SB9. (D) Schild-Regression von SB9. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-5 (Inkubationskurven) bzw. 7-16 (Kontrollkurven) Einzelerperimenten \pm S.E.M..

Es kam bei allen 3 Verbindungen zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 3.38). Im Falle von SB9 ist eine Abnahme der Steigung bei steigenden Inkubationskonzentrationen zu beobachten, wobei jedoch 100% des Maximaleffekts der Kontrollkurve erreicht wird. Die Schild-Regression für SB9 ergab eine Gerade mit der Steigung von $2,28 \pm 0,13$, die signifikant von 1 verschieden war. Im Falle von PPADS und NAC ist bei den Inkubationskonzentrationen ebenfalls eine deutliche Abnahme der Kurvensteigung im Vergleich zur Referenzkurve festzustellen (Tabelle 3.14). Analog zu den Untersuchungen am $P2X_1$ -Rezeptor ist auch hier zu beobachten, dass geringe Konzentrationsunterschiede der Antagonisten einen großen Einfluss auf die Inhibition haben. Zusammenfassend ist auch hier festzustellen, dass es sich bei PPADS, NAC und SB9 um nichtkompetitive Antagonisten des $P2Y_1$ -Rezeptors humaner Thrombozyten handelt.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.14: Steigung und Maximum (Kontrollkurve = 100%) der Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten sowie die resultierenden pEC₅₀-Werte in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PPADS, NAC und SB9.

Substanz	Konzentration (μ M)	Steigung	Maximum (% Kontrolle)	pEC ₅₀
PPADS	0	2,80	100	6,95
	5	1,16	90	6,20
	10	1,75	97	5,77
	20	n.b.	n.b.	n.b.
	30	n.b.	n.b.	n.b.
NAC	0	2,29	100	6,93
	3	1,53	98	6,54
	5	1,07	108	5,94
	10	1,01	57	5,43
	20	n.b.	n.b.	n.b.
SB9	0	2,64	100	7,05
	5	2,48	89	6,26
	10	1,71	86	5,78
	20	1,47	97	5,08
	30	1,25	93	4,66

n.b. = nicht bestimmbar

3.3.2.6. Schild-Analyse der ADP-induzierten Aggregation

Zur weiteren pharmakologischen Charakterisierung wurde der Einfluss von PPADS, NAC und SB9 auf die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PPADS, NAC und SB9 ermittelt.

ERGEBNISSE

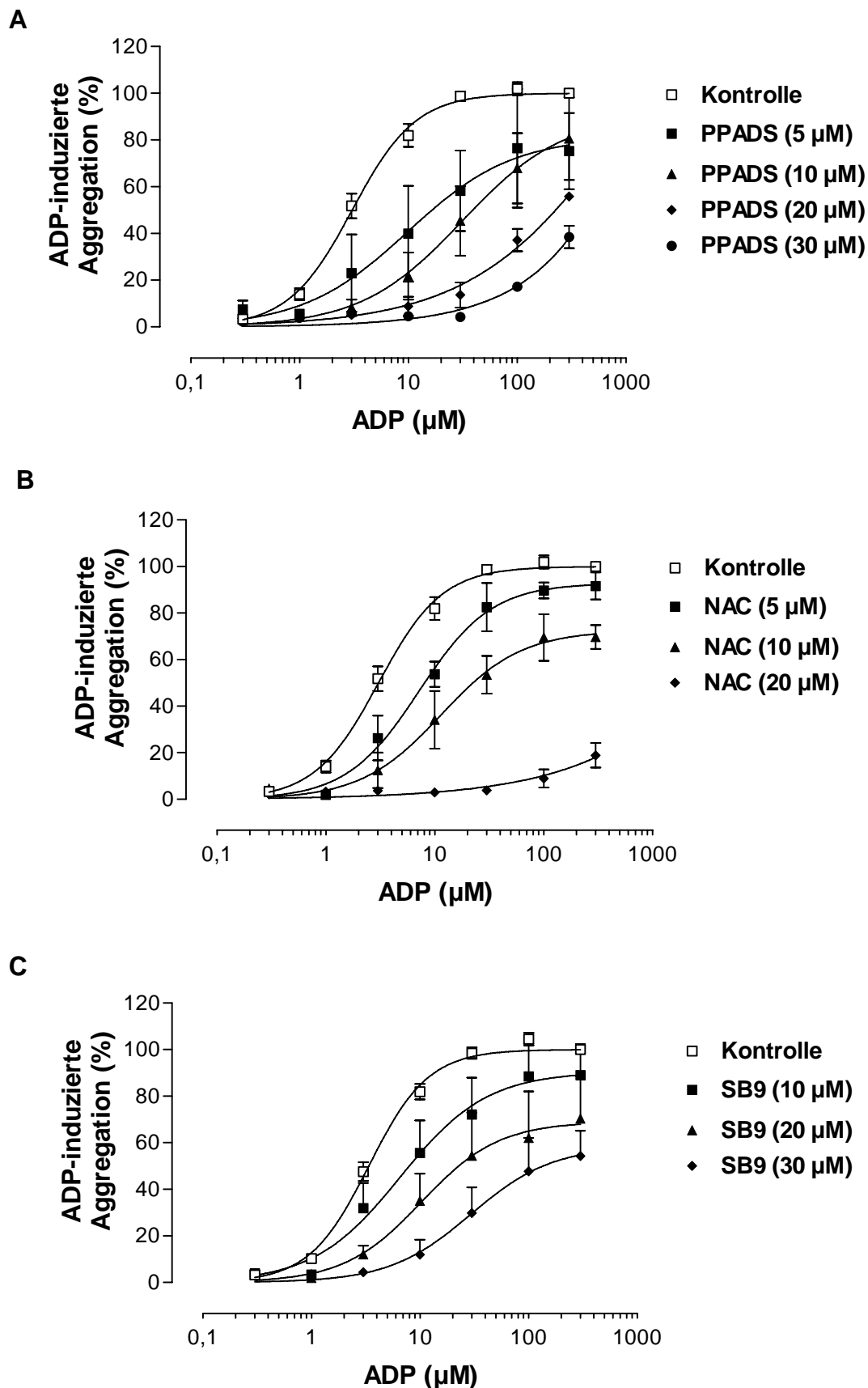


Abbildung 3.39: Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation humaner Thrombozyten in Anwesenheit von (A) PPADS, (B) NAC und (C) SB9. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-5 (Inkubationskurven) bzw. 10-14 (Kontrollkurven) Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.15: Steigung und Maximum (Kontrollkurven = 100%) der Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation humaner Thrombozyten sowie die resultierenden pEC₅₀-Werte in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von PPADS, NAC und SB9.

Substanz	Konzentration (μM)	Steigung	Maximum (% Kontrolle)	pEC ₅₀
PPADS	0	1,49	100	5,52
	5	0,90	81	5,01
	10	0,93	91	5,01
	20	n.b.	n.b.	n.b.
	30	n.b.	n.b.	n.b.
NAC	0	1,49	100	5,52
	5	1,31	93	5,15
	10	1,18	73	4,94
	20	n.b.	n.b.	n.b.
SB9	0	1,58	100	5,47
	10	1,09	91	5,18
	20	1,21	69	4,99
	30	1,16	58	4,53

n.b. = nicht bestimmbar

In Anwesenheit der Antagonisten kam es zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aggregation. Wie auch schon bei den „shape-change“-Untersuchungen war hier bei NAC und SB9 mit steigenden Antagonistenkonzentrationen neben einer Rechtsverschiebung auch eine deutliche Absenkung des Maximums und eine Abflachung der Steigung festzustellen. Es ist auch bei den Aggregationsversuchen zu beobachten, dass geringe Unterschiede in der Antagonistenkonzentration einen großen Einfluss auf die Inhibition zeigten. Der nichtkompetitive Antagonismus von PPADS, NAC und SB9 an den P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten wird somit bestätigt.

3.3.3. Suraminanaloga

Im folgenden wurden Suramin sowie einige bivalente und tetravalente Suraminanaloga (Abbildung 3.40, Abbildung 3.41) hinsichtlich ihrer antagonistischen Wirkung an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht. Hierbei wurden Untersuchungen der ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-induzierten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, des ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ und der ADP-induzierten Aggregation durchgeführt.

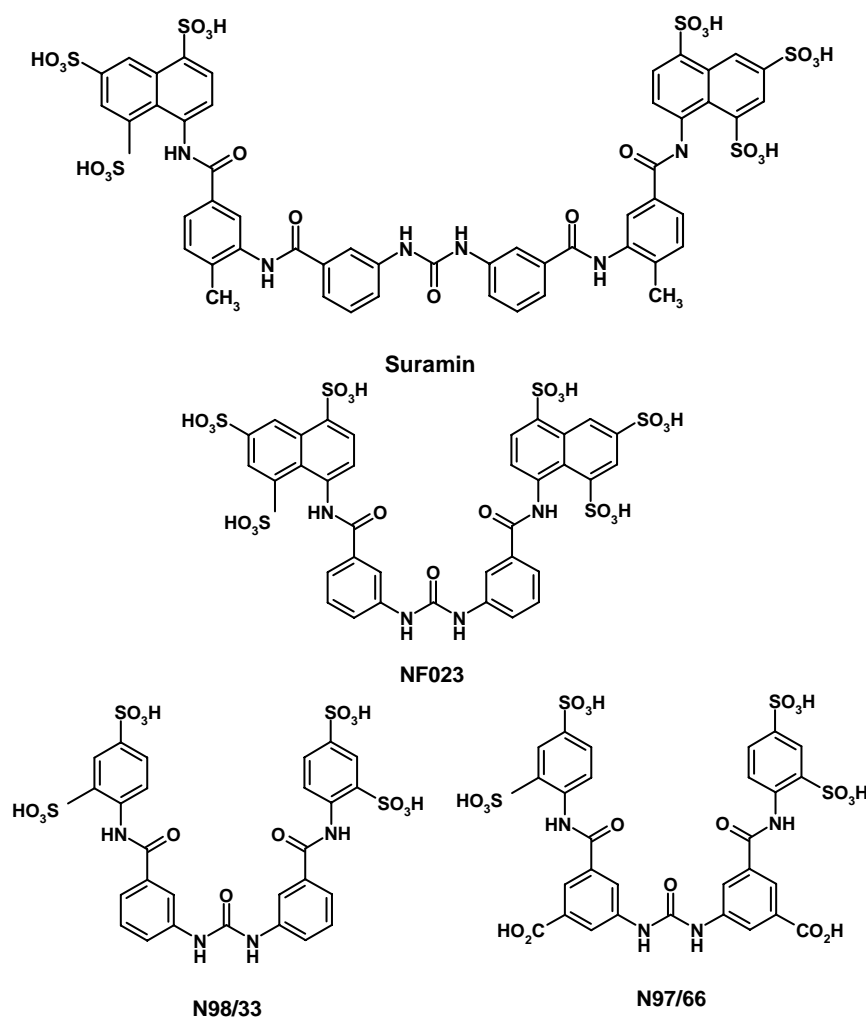


Abbildung 3.40: Strukturformeln der bivalenten Suraminanaloga.

Die Auswahl der Strukturen orientierte sich an den Ergebnissen früherer Untersuchungen der P2-antagonistischen Wirkstärke an isolierten Organen und an rekombinanten P2-Rezeptoren (Lambrecht et al., 2002).

ERGEBNISSE

Als Leitstruktur diente dabei Suramin. Durch Eliminierung der beiden Methylsubstituierten Benzamido-Reste kommt man zu NF023, das noch den Naphthalinrest von Suramin trägt. Dieser ist bei N98/33 und N97/66 durch einen Phenylring ersetzt. Durch Dimerisierung der bivalenten Strukturen NF023 und N98/33 erhält man die tetravalenten Antagonisten NF864 und NF449 mit der sogenannten „Schmetterlingsstruktur“. Bei NF110 wurde die Sulfonylgruppe in 1-Position am Phenylrest von NF449 entfernt.

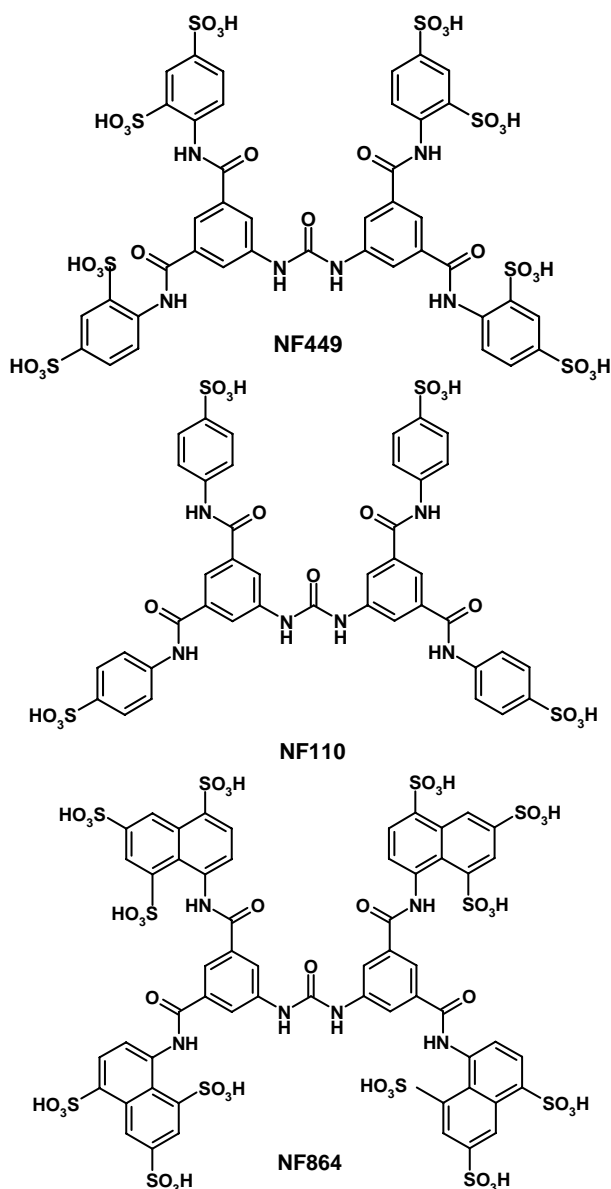


Abbildung 3.41: Strukturformeln der tetravalenten Suraminanaloga.

3.3.3.1. Hemmung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration

Es wurden Inhibitionskurven von Suramin, NF023, NF449, N97/66, N98/33, NF110, und NF864 gegen den P2X₁-vermittelten Calciumeinstrom in humane Thrombozyten erstellt; als Agonist diente dabei $\alpha\beta$ meATP (1 μ M). Der Calciumanstieg wurde mittels Fluoreszenzintensität der Farbstoffe Fura-2 bzw. Oregon green 488 BAPTA-1 gemessen. Für die Messungen in Gegenwart von Suramin und NF023 wurde Oregon green 488 BAPTA-1/AM verwendet, da die beiden Substanzen ein Absorptionsmaximum von ca. 350 nm aufweisen und deshalb bei den eingesetzten Konzentrationen mit der Exzitationswellenlänge von 340 nm des 2-Wellenlängenfarbstoffs Fura-2/AM interferieren (Kassack et al. 2004). Alle Antagonisten inhibierten konzentrationsabhängig den $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 3.42 und Menke, 2003). Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 3.16 aufgeführten pIC_{50} -Werte. Die Hemmkurven von Suramin, NF449 und NF023 wurden von K. Menke (2003) ermittelt.

Ausgehend von der Muttersubstanz Suramin zeigte die Strukturvariation zum kleinen Harnstoff NF023 keinen Einfluss auf die P2X₁-antagonistische Wirkstärke, da sich beide Substanzen als äquipotent erwiesen. Auch die Strukturabwandlungen zum N98/33 und zum N97/66 machten sich in der Inhibitionsstärke kaum bemerkbar.

Dagegen führte die Dimerisierung zu den tetraivalenten Strukturen zu einer starken Zunahme der Wirkstärke (bis zu 87-fach). NF864 mit dem Naphthalinringsystem erwies sich als potentester Antagonist.

So ergibt sich folgende Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke gegen die $\alpha\beta$ meATP-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten:

NF864 \geq NF110 = NF449 > N97/66 \geq Suramin = NF023 \geq N98/33.

ERGEBNISSE

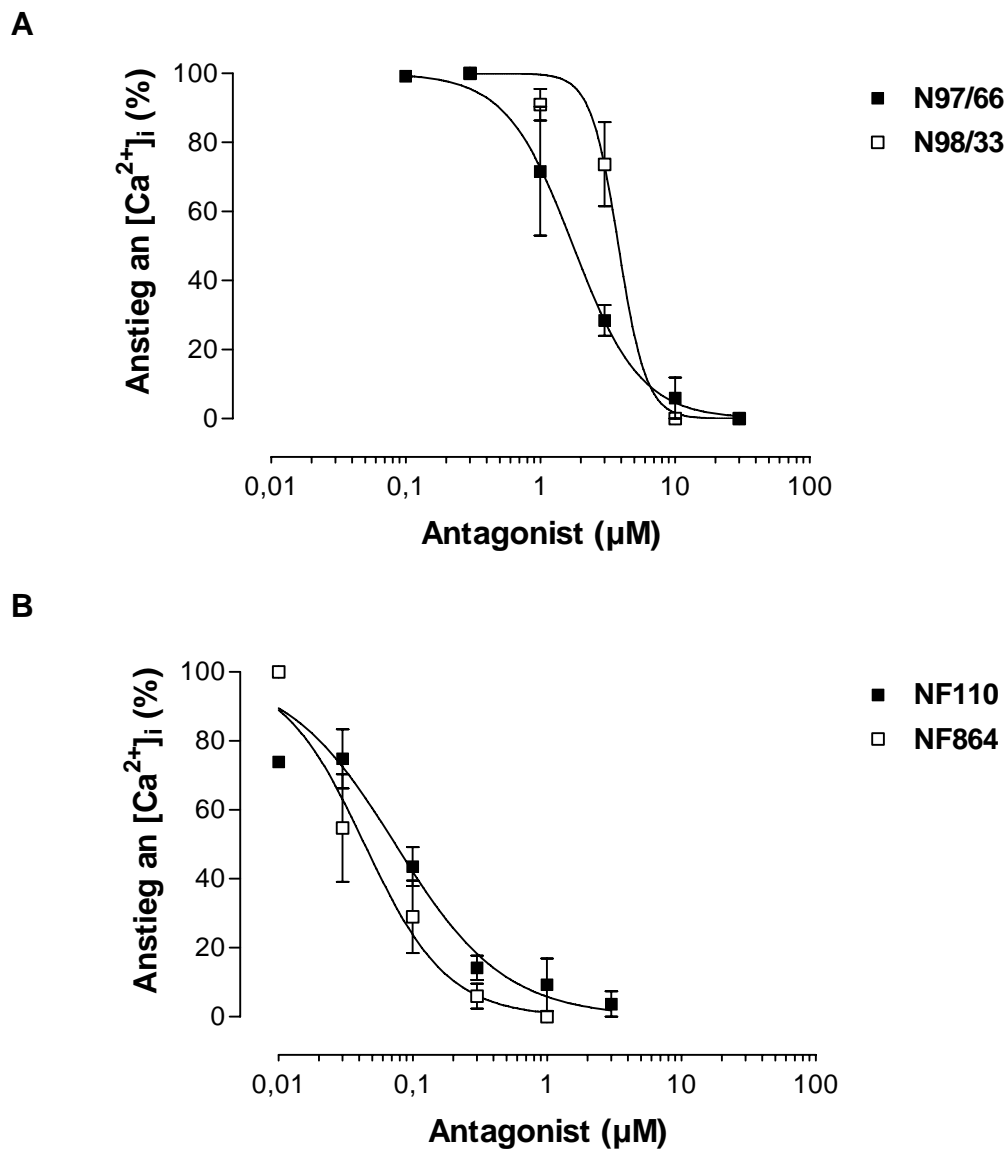


Abbildung 3.42: Inhibitionskurven von **(A)** N97/66 und N98/33 sowie **(B)** NF110 und NF864 gegen $\alpha\beta$ meATP ($1 \mu M$)-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten, der mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 erfasst wurde. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

ERGEBNISSE

Tabelle 3.16: pIC_{50} -Werte der Suraminanaloga gegen den $\alpha\beta meATP$ ($1 \mu M$)-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	Steigung $\pm S.E.M.$	Farbstoff
Suramin	5,55 ¹⁾	1,87	Oregon green 488 BAPTA-1
NF023	5,54 ¹⁾	2,38	Oregon green 488 BAPTA-1
N97/66	5,75 \pm 0,02	1,74 \pm 0,11	Fura-2
N98/33	5,42 \pm 0,07	4,23 \pm 2,55	Fura-2
NF449	7,11 ¹⁾	0,88	Fura-2
NF110	7,13 \pm 0,06	1,07 \pm 0,15	Fura-2
NF864	7,36 \pm 0,08	1,41 \pm 0,31	Fura-2

¹⁾ Werte aus der Dissertation von K. Menke (Menke, 2003).

Es zeigte sich bei NF864 eine deutliche Diskrepanz zwischen dem pIC_{50} -Wert gegen den $\alpha\beta meATP$ -induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Tabelle 3.16) und dem pA_2 -Wert, der bei den $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape-change“-Untersuchungen ermittelt wurde (siehe 3.3.3.3.). Eine mögliche Erklärung wäre die hohe Proteinbindung bei Suramin-Analoga an Serumproteine (Müller und Wollert, 1976), die sich vor allem in den niedrigen Antagonistenkonzentrationen bemerkbar machen sollte. Deshalb wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta meATP$ -induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration in An- und Abwesenheit der hohen Konzentration von $0,3 \mu M$ NF864 erstellt (Abbildung 3.43). Um den zeitlichen Abfall der Signale zu berücksichtigen wurde in jeder 2. Küvette der durch $1 \mu M$ $\alpha\beta meATP$ -induzierte Calciumanstieg gemessen und eine Regressionsgerade über den zeitlichen Verlauf erstellt, worauf dann normalisiert wurde.

ERGEBNISSE

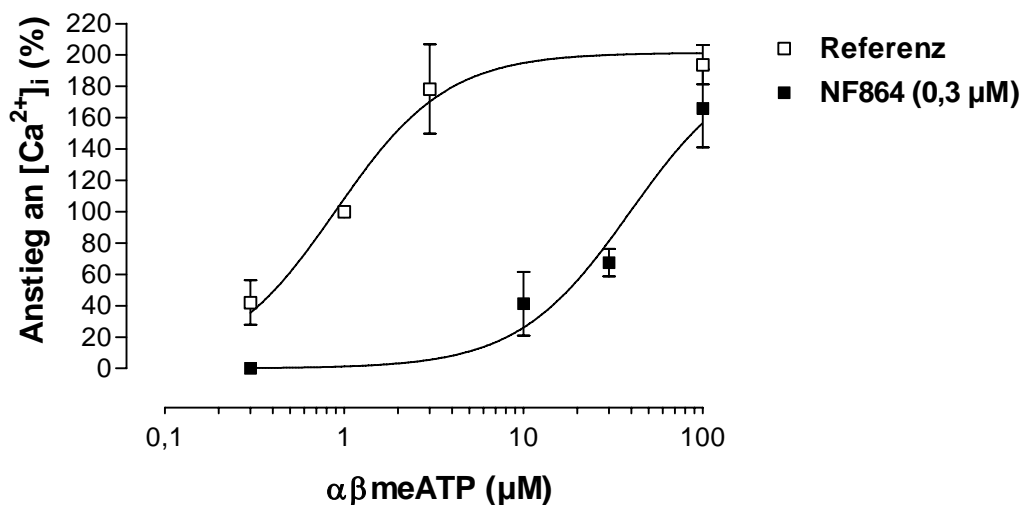


Abbildung 3.43: Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten in An- und Abwesenheit von $0,3 \mu\text{M}$ NF864. 100% der Ordinate entsprechen dem durch $1 \mu\text{M}$ $\alpha\beta\text{meATP}$ vermittelten Calciumanstieg. Die Daten sind Mittelwerte aus 4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

In Anwesenheit von $0,3 \mu\text{M}$ NF864 kam es zu einer parallelen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von $\alpha\beta\text{meATP}$ ohne Abfall des Maximaleffektes. Auswertung mit Hilfe der Schild-Gleichung ergab einen pA_2 -Wert von $8,17 \pm 0,23$, was für eine Depletion von NF864 bei niedrigen Konzentrationen durch Proteinbindung spricht.

3.3.3.2. Hemmkurven des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration

Es wurde der Einfluss von Suramin, NF023, N97/66, N98/33, NF449, NF110 und NF864 auf den P2Y_1 -vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten untersucht. Dazu wurden Hemmkurven der Analoga gegen die ADP ($1 \mu\text{M}$)-induzierte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern erstellt. Die Untersuchungen von NF449 wurden von K. Menke (2003) durchgeführt. Alle Antagonisten führten zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des intrazellulären Calciumanstiegs (Abbildung 3.44). Nichtlineare Regression der Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 3.17 aufgeführten pIC_{50} -Werte.

ERGEBNISSE

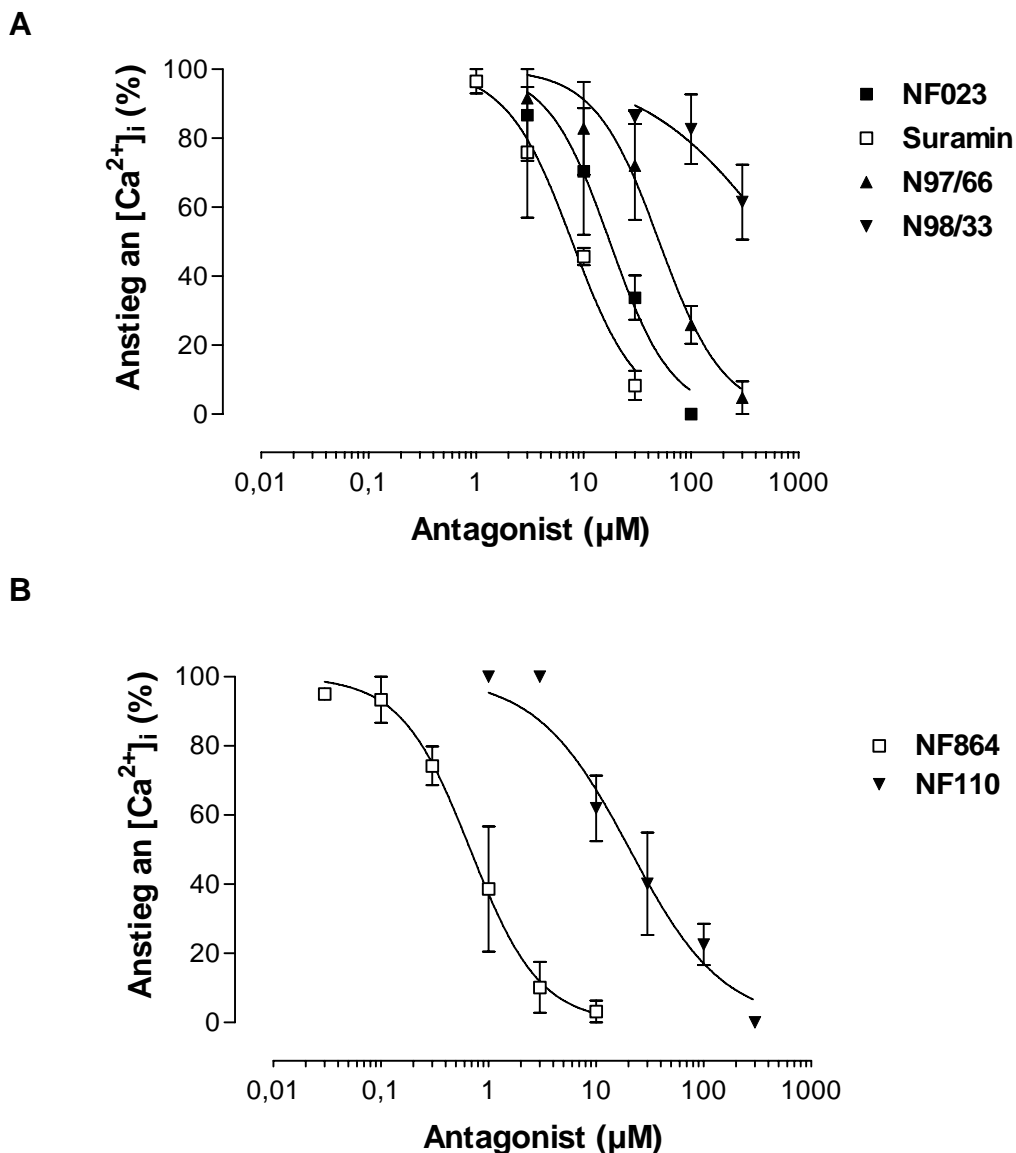


Abbildung 3.44: Inhibitionskurven von **(A)** Suramin, NF023, N97/66 und N98/33 sowie **(B)** NF110 und NF864 gegen ADP (1 μM)-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten, der mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2 und Oregon green 488 BAPTA-1 erfasst wurde. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-4 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

Suramin, NF023, N97/66, NF449 und NF110 erwiesen sich als nahezu äquipotent hinsichtlich ihrer P2Y₁-antagonistischen Wirkung an humanen Thrombozyten. N98/33 war nahezu wirkungslos und erneut zeigte NF864 die stärkste inhibitorische Wirkung. Es ergab sich folgende Hierarchie der Inhibition gegen den ADP-vermittelten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration humaner Thrombozyten:

NF864 > NF449 = Suramin \geq NF023 \geq NF110 > N97/66 > N98/33.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.17: pIC_{50} -Werte der Suraminanaloga gegen den ADP ($1 \mu M$)-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen Thrombozyten.

Substanz	$pIC_{50} \pm S.E.M.$	Steigung $\pm S.E.M.$	Farbstoff
Suramin	$5,03 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,22$	Oregon green 488 BAPTA-1
NF023	$4,76 \pm 0,06$	$1,50 \pm 0,30$	Oregon green 488 BAPTA-1
NF449	$5,10$ ¹⁾	$1,70$	Fura-2
N97/66	$4,30 \pm 0,05$	$1,45 \pm 0,23$	Fura-2
N98/33	$< 3,5$	n.b.	Fura-2
NF110	$4,69 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,18$	Fura-2
NF864	$6,17 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,06$	Fura-2

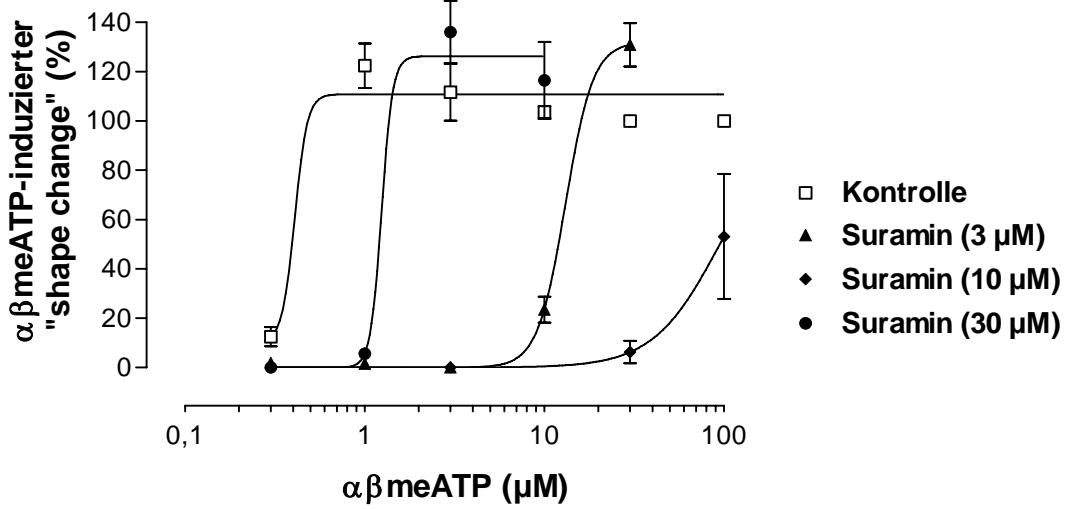
¹⁾ Werte aus der Dissertation von K. Menke (Menke, 2003).

3.3.3.3. Schild-Analyse des $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape change“

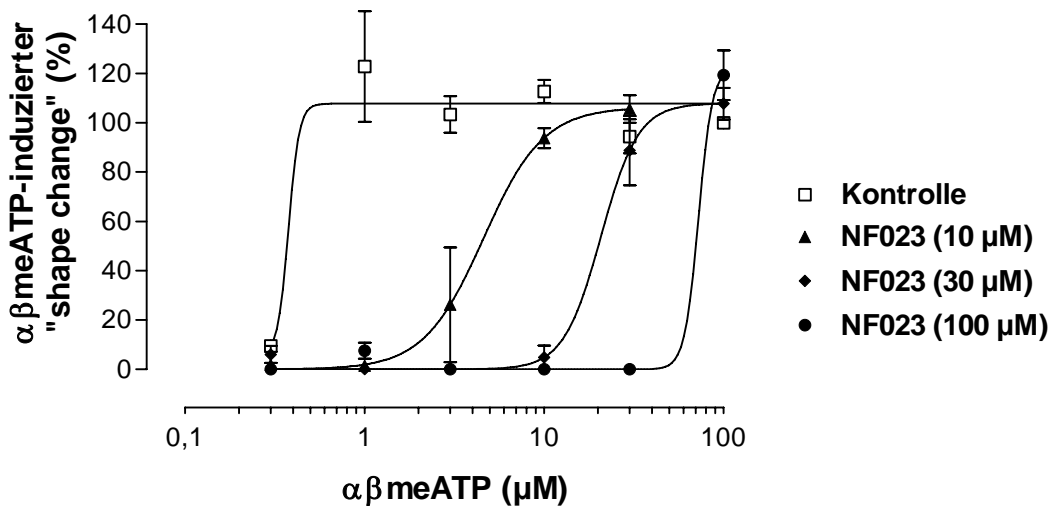
Zur weiteren Charakterisierung der $P2X_1$ -antagonistischen Wirkung der Suraminanaloga an humanen Thrombozyten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta meATP$ -induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Suramin, NF023, N97/66, N98/33, NF449, NF110 und NF864 erstellt (Abbildung 3.45). Die Gabe von $\alpha\beta meATP$ ($0,1-100 \mu M$) führte konzentrationsabhängig zu einem rasch einsetzenden, transienten „shape change“ ($pEC_{50} = 6,29 \pm 0,05$, $n = 15$), der über die Abnahme der Lichttransmission durch die Plättchensuspension erfasst und quantifiziert wurde.

ERGEBNISSE

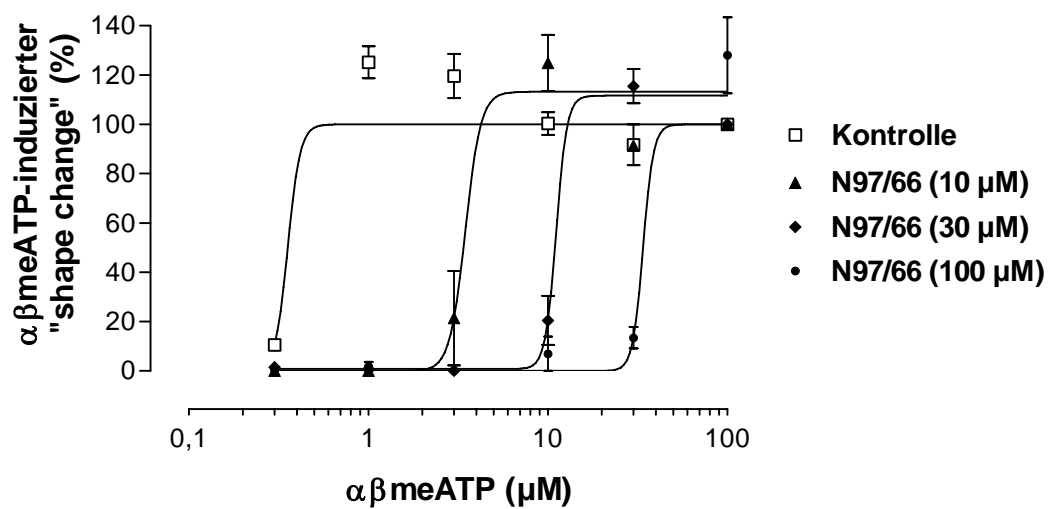
A



B

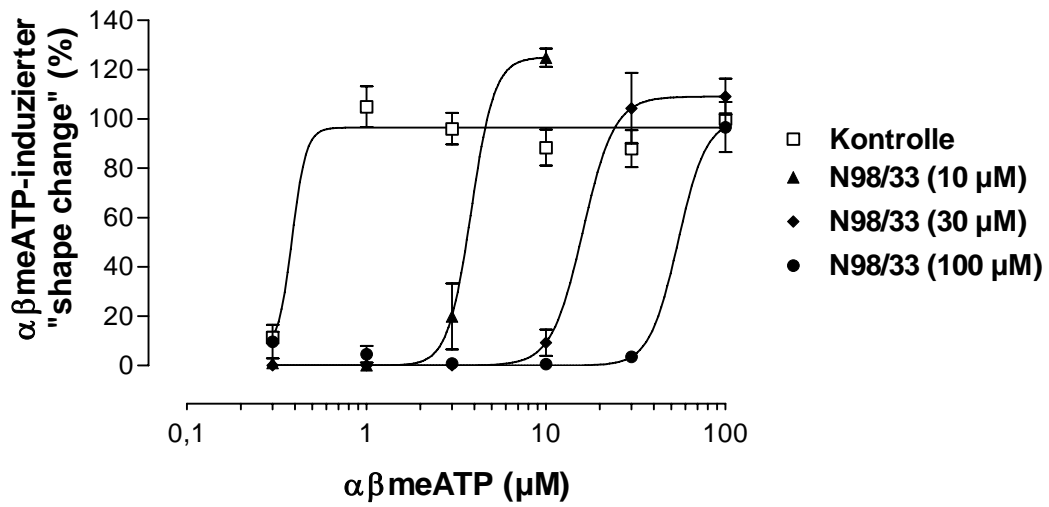


C

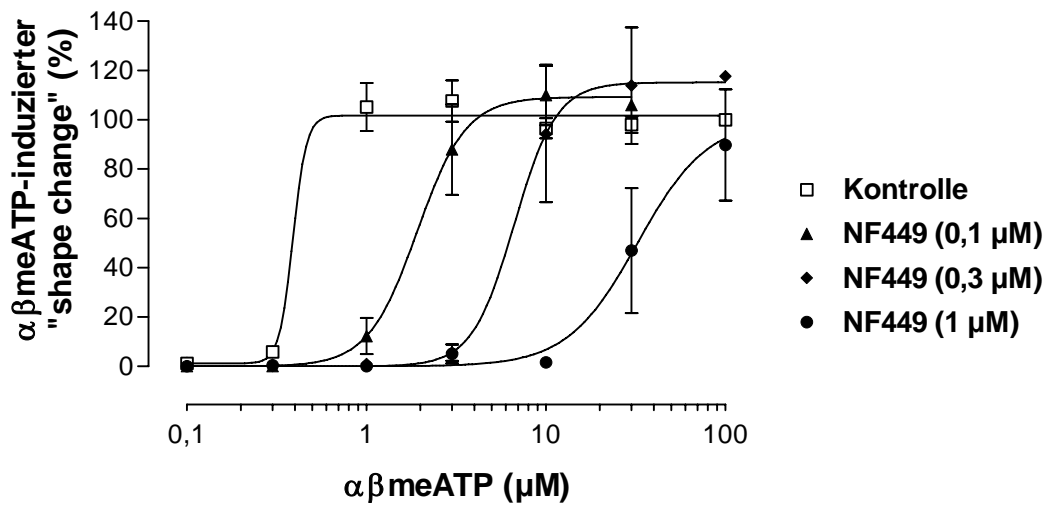


ERGEBNISSE

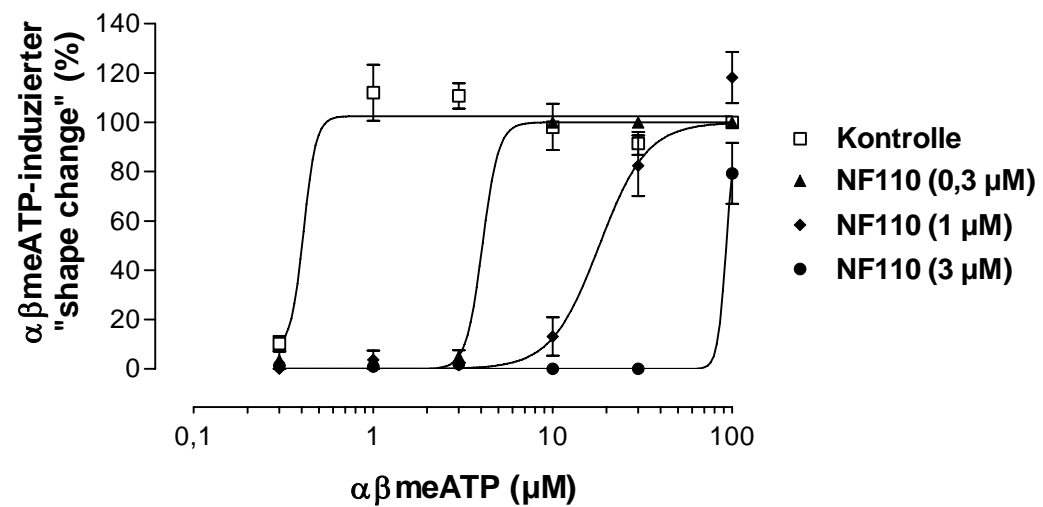
D



E

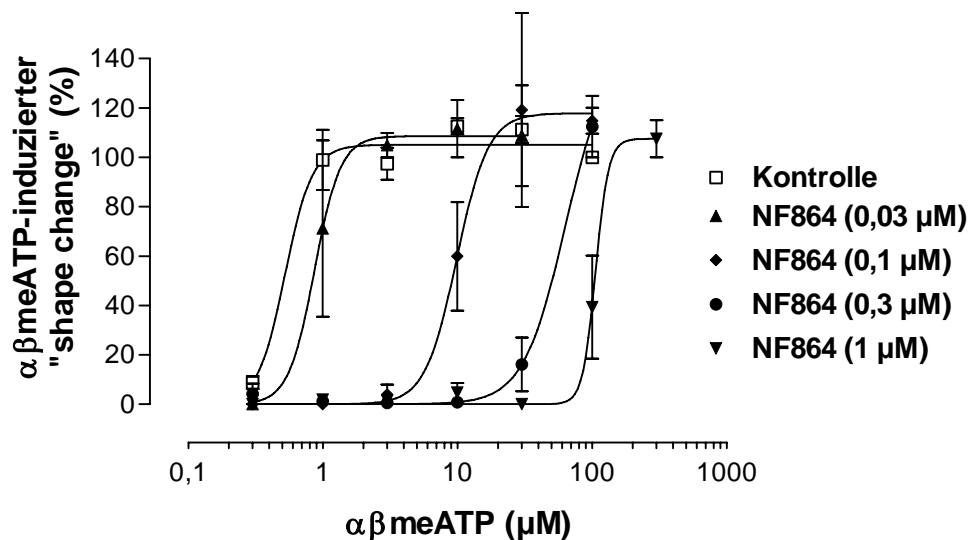


F



ERGEBNISSE

G



H

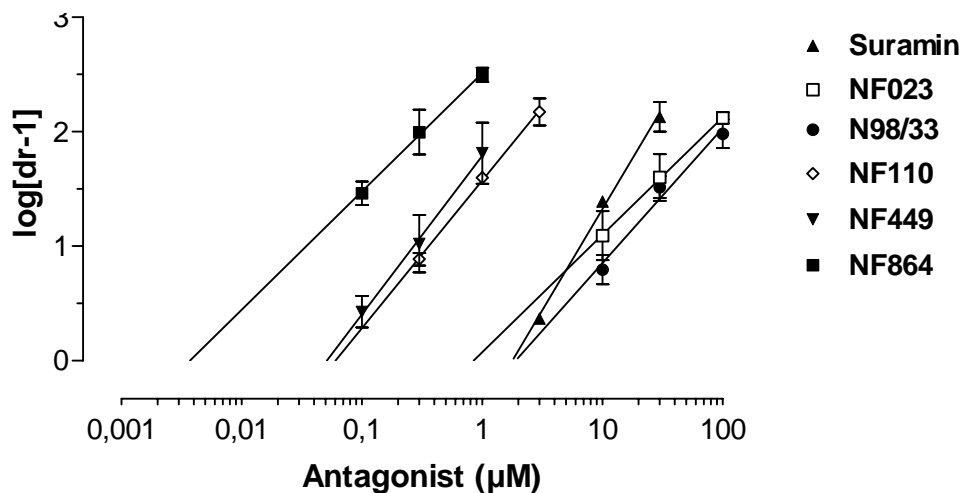


Abbildung 3.45: Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von (A) Suramin, (B) NF023, (C) N97/66, (D) N98/33, (E) NF449, (F) NF110 und (G) NF864. (H) Schild-Regression der Daten in (A) – (G). Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

Alle untersuchten Suraminanaloga hemmten konzentrationsabhängig den $\alpha\beta$ meATP-vermittelten „shape change“ und führten zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven. Die Regressiongeraden der Schild-Analyse aller Substanzen war linear und im Falle von NF023 (10-100 μ M; $m = 1,02 \pm 0,23$), N97/66 (10-100 μ M; $m = 1,17 \pm 0,11$), N98/33 (10-100 μ M; $m = 1,05 \pm 0,13$) und NF864 (0,1-1 μ M; $1,03 \pm 0,17$) war die Steigung nicht signifikant von 1 verschieden, was auf einen kompetitiven Antagonismus hinweist. Auch die Einzel- pA_2 -Werte, die mit Hilfe der Schild-Gleichung für die einzelnen Inkubationskonzentrationen errechnet wurden,

ERGEBNISSE

waren nicht signifikant voneinander verschieden (Tabelle 3.19). Der Einzel-pA₂-Wert von 0,03 µM NF864 ($6,85 \pm 0,63$) wich signifikant von denen der anderen Inkubationskonzentrationen ab. Dieses Phänomen kann mit der sättigbaren Bindung zu nicht-P2-Proteinen an Thrombozyten erklärt werden, die für Suramin an Serum-Albumin gezeigt wurde (Müller und Wollert, 1976).

Betrachtet man die Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke, ergibt sich für die Hemmung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ ein nahezu identisches Bild wie bei der Inhibition des $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration:

NF864 > NF449 > NF110 > NF023 ≥ N98/33 = N97/66 ≥ Suramin

Tabelle 3.18: pA₂-Wert von Antagonisten gegen den $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten ermittelt aus dem Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der Abszisse. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC₅₀-Werten ermittelt. War die Steigung der Regressionsgeraden nicht signifikant von 1 verschieden, wurde die Steigung der Geraden gleich eins gesetzt.

Substanz	pA ₂ ± S.E.M.	Steigung ± S.E.M.
Suramin	5,76 ± 0,10	1,80 ± 0,22
NF023	6,11 ± 0,09 ¹⁾	1,02 ± 0,23
NF449	7,61 ± 0,22 ¹⁾	1,39 ± 0,33
N97/66	5,94 ± 0,05 ¹⁾	1,17 ± 0,11
N98/33	5,98 ± 0,05 ¹⁾	1,05 ± 0,13
NF110	7,22 ± 0,10	1,29 ± 0,10
NF864	8,49 ± 0,07 ¹⁾	1,03 ± 0,17

¹⁾ Steigung gleich 1 gesetzt.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.19: Einzel-pA₂-Werte der Analoga für die Hemmung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten ermittelt mit Hilfe der Schild-Gleichung.

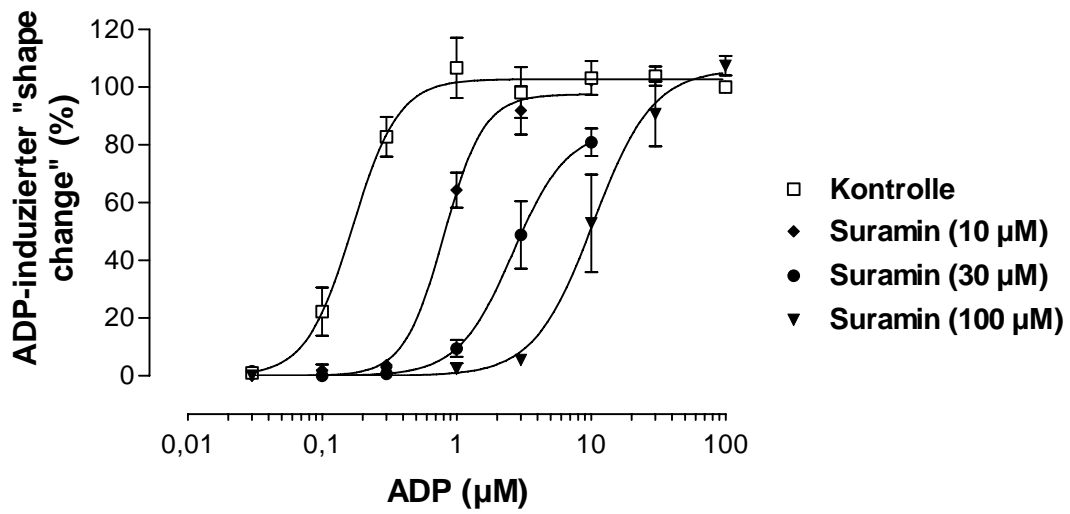
	Einzel-pA ₂ -Wert \pm S.E.M. bei der entsprechenden Antagonistenkonzentration							
	0,03 μ M	0,1 μ M	0,3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
Suramin					5,89 \pm 0,03	6,39 \pm 0,05	6,65 \pm 0,13	
NF023						6,09 \pm 0,21	6,12 \pm 0,21	6,12 \pm 0,05
NF449		7,43 \pm 0,14	7,54 \pm 0,25	7,81 \pm 0,27				
N97/66						5,86 \pm 0,10	5,91 \pm 0,09	6,04 \pm 0,04
N98/33						5,80 \pm 0,13	6,04 \pm 0,10	5,98 \pm 0,13
NF110			7,41 \pm 0,05	7,60 \pm 0,04	7,69 \pm 0,12			
NF864	6,85 \pm 0,63	8,46 \pm 0,10	8,52 \pm 0,20	8,50 \pm 0,06				

3.3.3.4. Schild-Analyse des ADP-induzierten „shape change“

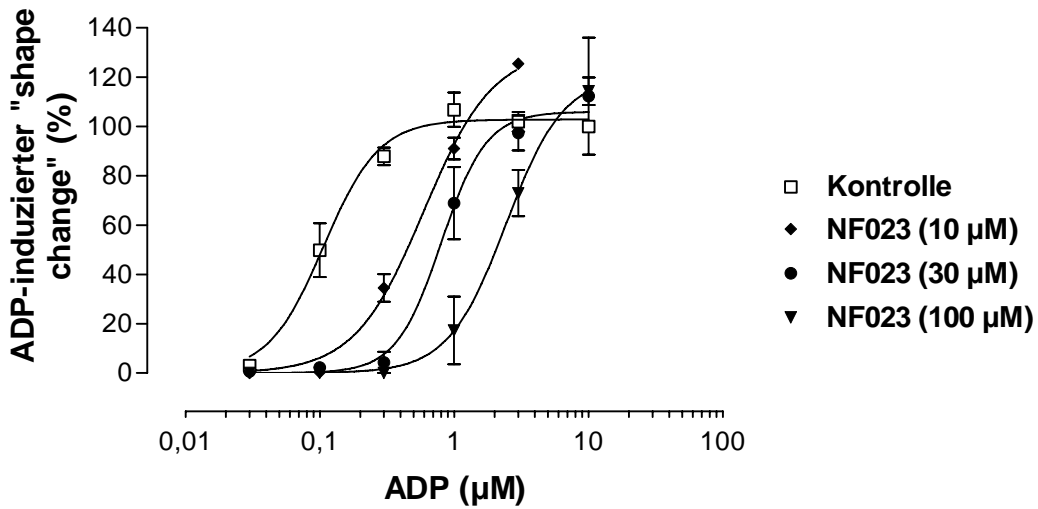
Zur weiteren Charakterisierung der P2Y₁-antagonistischen Wirkung der Suraminanaloga an humanen Thrombozyten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Suramin, NF023, N97/66, N98/33, NF449, NF110 und NF864 erstellt (Abbildung 3.46). Die Gabe von ADP (0,3-100 μ M) führte konzentrationsabhängig zu einem rasch einsetzenden, transienten „shape change“ ($pEC_{50} = 6,94 \pm 0,2$; $n = 140$), der über die Abnahme der Lichttransmission durch die Plättchensuspension erfasst und quantifiziert wurde.

ERGEBNISSE

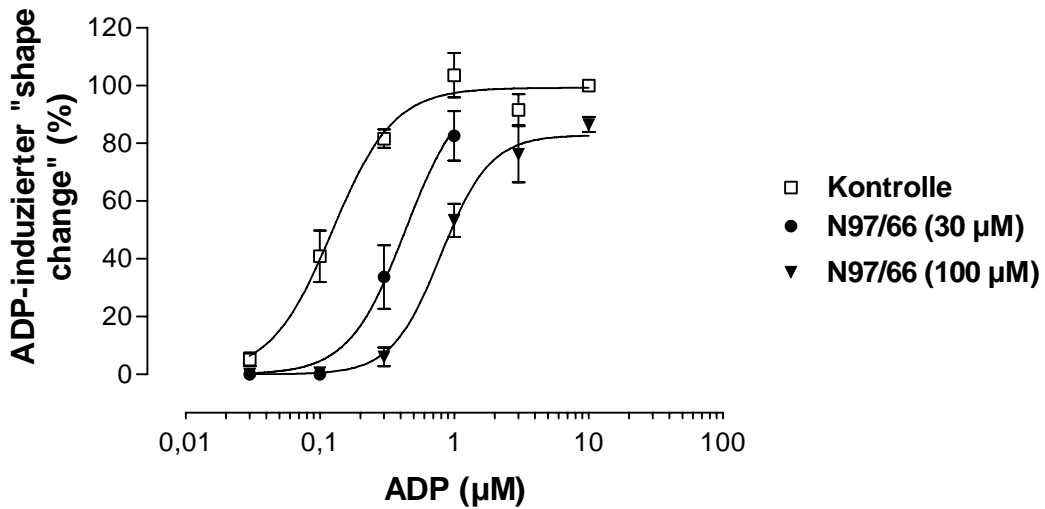
A



B

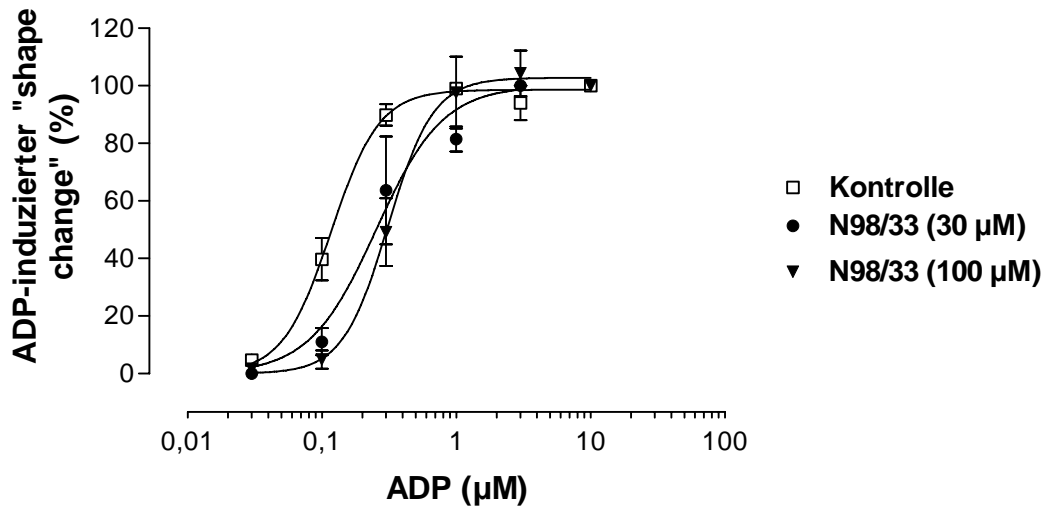


C

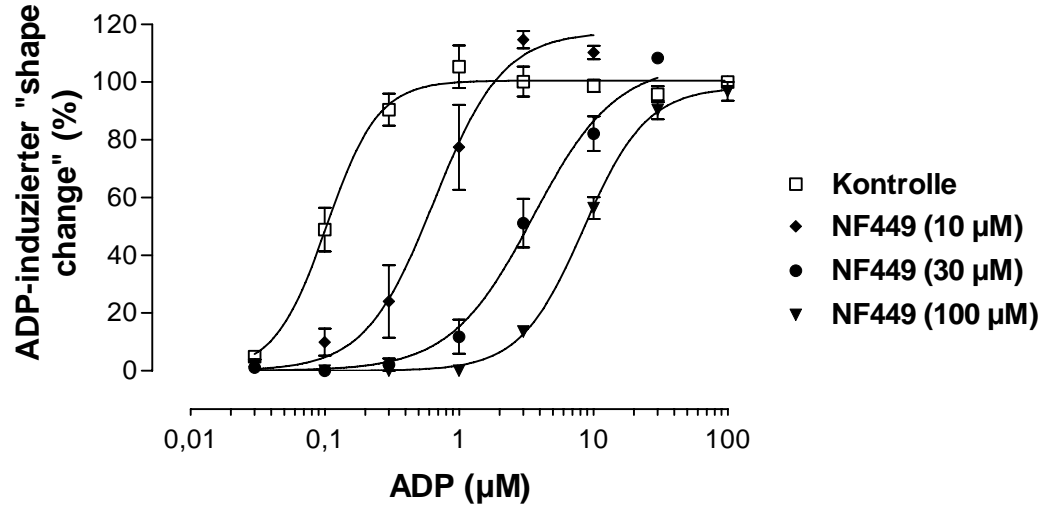


ERGEBNISSE

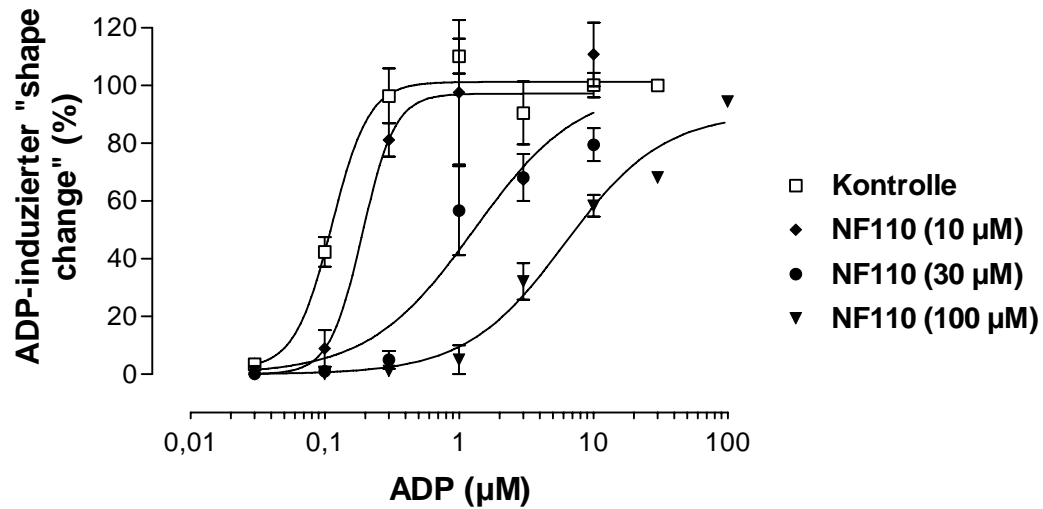
D



E



F



ERGEBNISSE

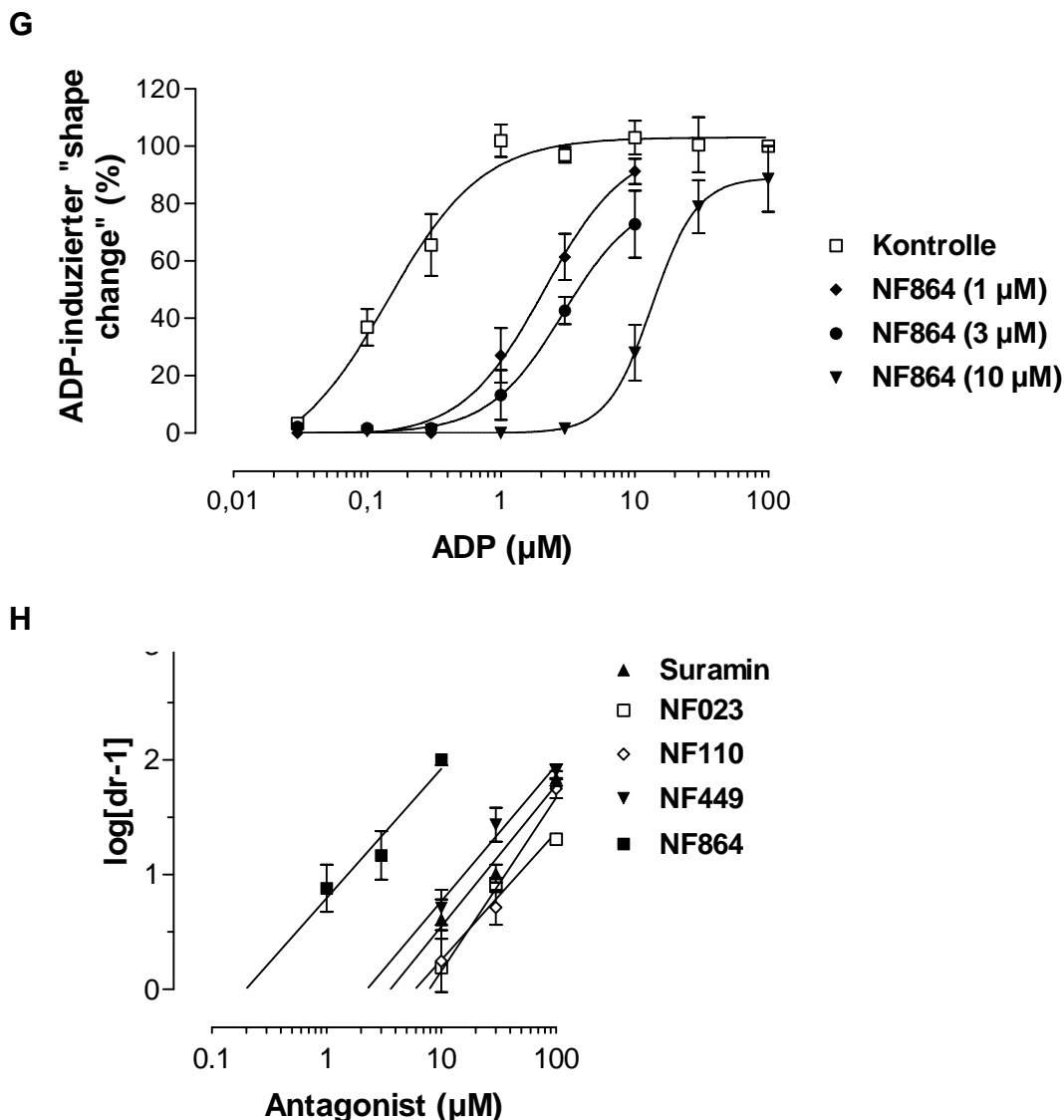


Abbildung 3.46: Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von (A) Suramin, (B) NF023, (C) N97/66, (D) N98/33, (E) NF449, (F) NF110 und (G) NF864. (H) Schild-Regression von Suramin, NF023, NF449, NF110 und NF864 gegen den ADP-induzierten „shape change“. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelexperimenten \pm S.E.M..

Alle untersuchten Analoga führten zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von ADP. Soweit eine Schild-Analyse durchgeführt werden konnte, waren die Regressionsgeraden linear und die Steigungen waren nicht signifikant von 1 verschieden, was für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Für die Ermittlung der Gesamt- pA_2 -Werte (Tabelle 3.20) wurde deshalb die Steigung gleich 1 gesetzt. N97/66 und N98/33 erwiesen sich als schwache Antagonisten, da nur 30 μ M und 100 μ M dieser Substanzen zu einer

ERGEBNISSE

messbaren Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven führten, weshalb keine Schild-Analyse erstellt werden konnte.

pA_2 -Werte für die einzelnen Inkubationskonzentrationen wurden mit Hilfe der Schild-Gleichung ermittelt und waren für alle Antagonisten nicht signifikant voneinander verschieden (Tabelle 3.21), was den kompetitiven Antagonismus bestätigt.

Betrachtet man die Reihenfolge der antagonistischen Wirkstärke, ergibt sich für die Hemmung des ADP-induzierten „shape change“ ein nahezu identisches Bild wie bei der Inhibition des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration (Tabelle 3.17):

NF864 > NF449 ≥ Suramin > NF110 = NF023 ≥ N97/66 > N98/33.

Tabelle 3.20: pA_2 -Werte der Suraminanaloga gegen den ADP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten ermittelt aus dem Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der Abszisse. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. War die Steigung der Regressionsgeraden nicht signifikant von 1 verschieden, wurde die Steigung der Geraden gleich eins gesetzt.

Substanz	$pA_2 \pm S.E.M.$	Steigung $\pm S.E.M.$
Suramin	$5,66 \pm 0,07$ ¹⁾	$1,23 \pm 0,17$
NF023	$5,31 \pm 0,04$ ¹⁾	$1,11 \pm 0,10$
N97/66	n.b.	n.b.
N98/33	n.b.	n.b.
NF449	$5,86 \pm 0,07$ ¹⁾	$1,19 \pm 0,18$
NF110	$5,37 \pm 0,12$ ¹⁾	$1,49 \pm 0,30$
NF864	$6,85 \pm 0,11$ ¹⁾	$1,10 \pm 0,28$

n.b. = nicht bestimmbar; ¹⁾ Steigung gleich 1 gesetzt.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.21: Einzel-pA₂-Werte der Suraminanaloga für die Hemmung des ADP-induzierten „shape change“ humaner Thrombozyten. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC₅₀-Werten ermittelt.

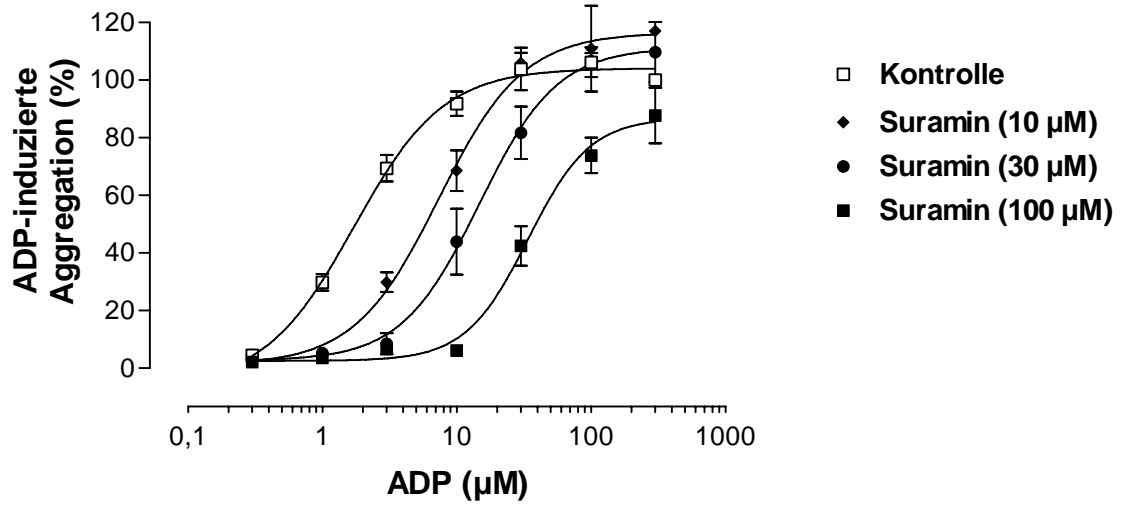
	Einzel-pA ₂ -Wert ± S.E.M. bei der entsprechenden Antagonistenkonzentration				
	1 µM	3 µM	10 µM	30 µM	100 µM
Suramin			5,61 ± 0,17	5,53 ± 0,08	5,84 ± 0,06
NF023			5,19 ± 0,03	5,43 ± 0,06	5,31 ± 0,03
NF449			5,71 ± 0,15	5,96 ± 0,15	5,87 ± 0,04
N97/66				4,99 ± 0,08	4,98 ± 0,21
N98/33				4,36 ± 0,20	4,31 ± 0,18
NF110			5,25 ± 0,27	5,24 ± 0,15	5,74 ± 0,08
NF864	6,88 ± 0,20	6,69 ± 0,21	7,00 ± 0,05		

3.3.3.5. Schild-Analyse der ADP-induzierten Aggregation

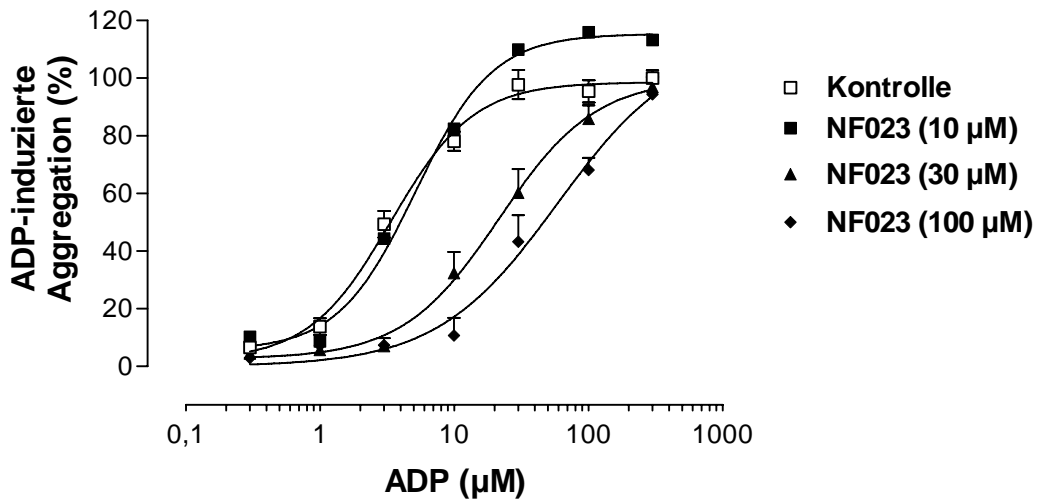
Zur weiteren Charakterisierung der Suramin-Analoga an humanen Thrombozyten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Suramin, NF023, N97/66, N98/33, NF449, NF110 und NF864 erstellt. ADP führte konzentrationsabhängig zu einer transienten Aggregation der Thrombozyten, die durch eine Zunahme der Lichttransmission durch die Plättchensuspension gemessen wurde (pEC₅₀: 5,40 ± 0,03, n = 128).

ERGEBNISSE

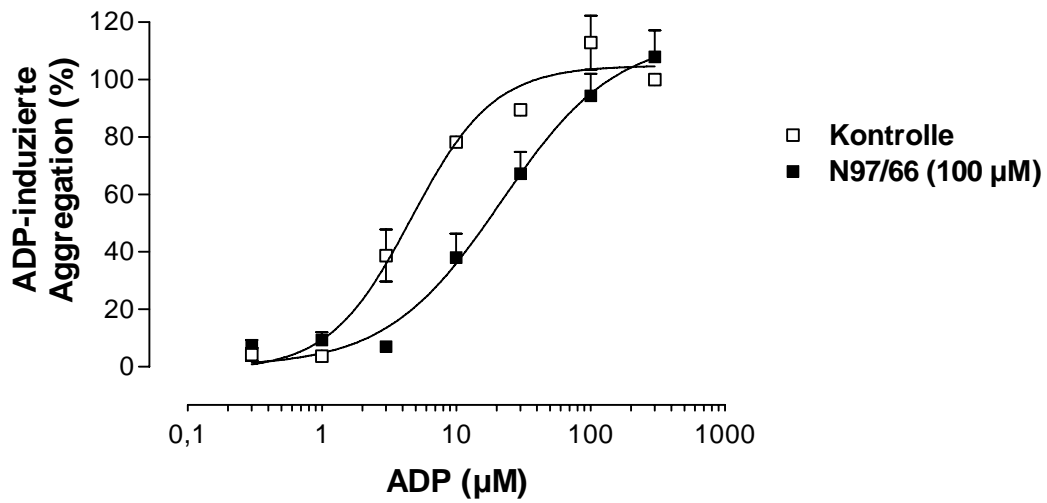
A



B

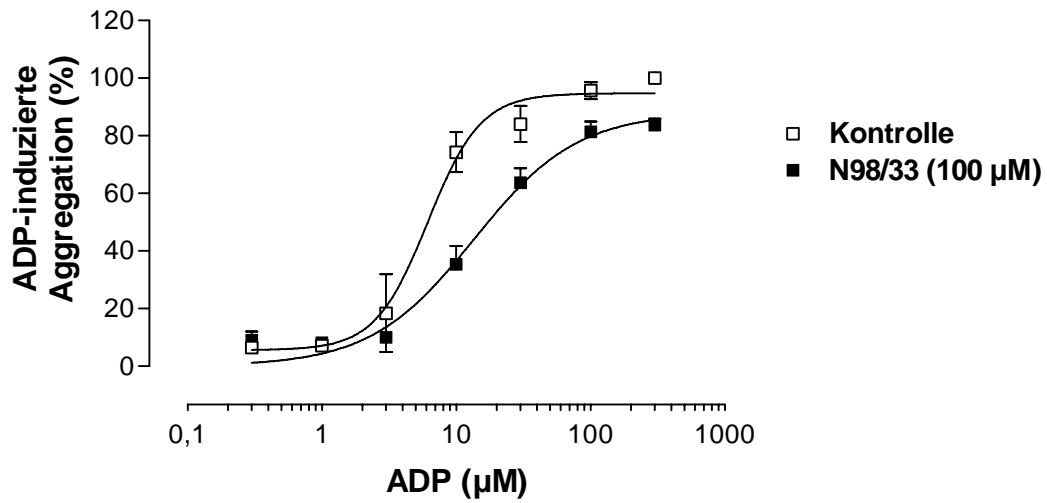


C

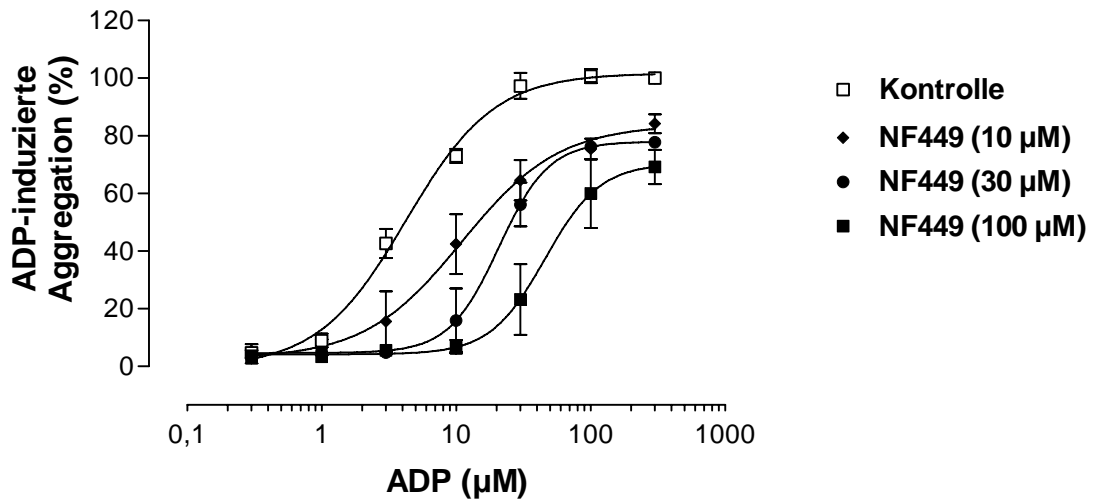


ERGEBNISSE

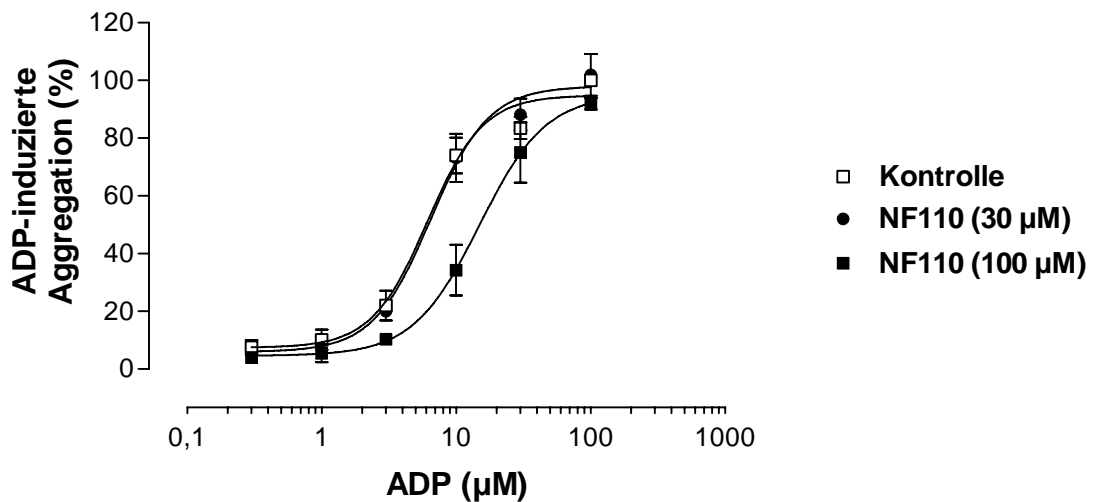
D



E

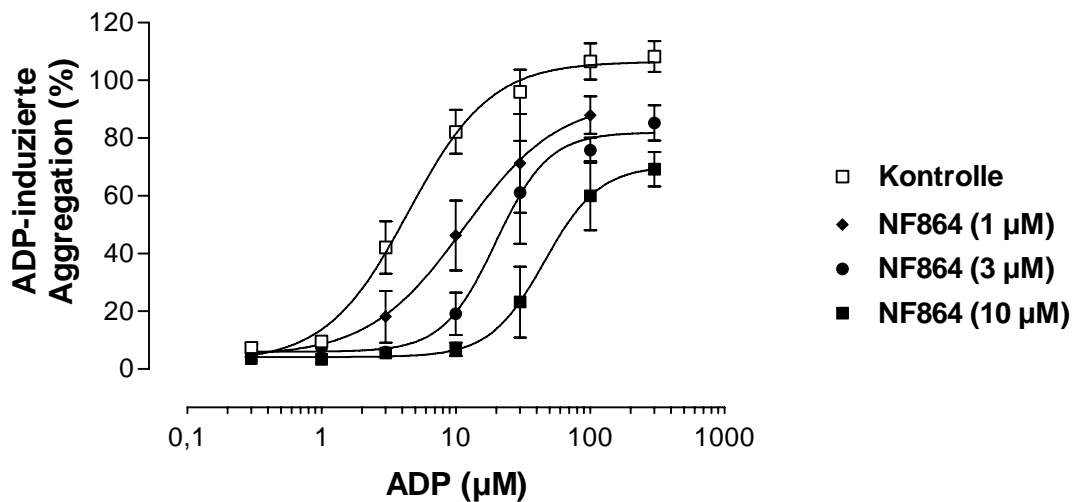


F



ERGEBNISSE

G



H

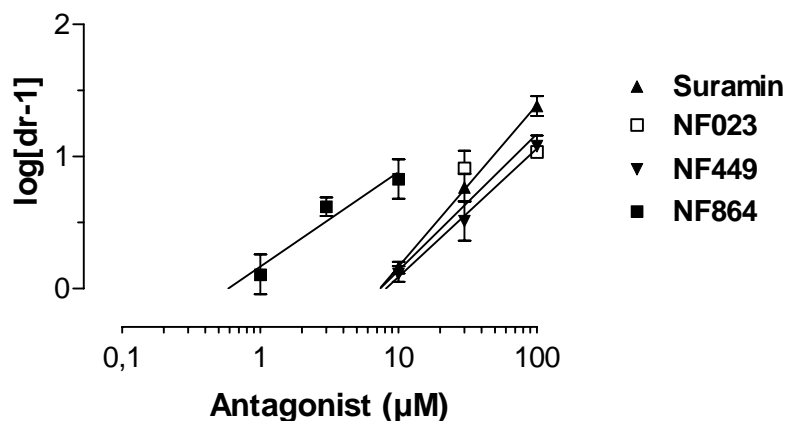


Abbildung 3.47: Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von (A) Suramin, (B) NF023, (C) N97/66, (D) N98/33, (E) NF449, (F) NF110 und (G) NF864. (H) Schild-Regression von Suramin, NF023, NF449 und NF864 gegen die ADP-induzierte Aggregation. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelerperimenten \pm S.E.M..

Alle Substanzen induzierten eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP (Abbildung 3.47). Soweit eine Schild-Analyse durchgeführt werden konnte, waren die Regressionsgeraden linear und die Steigung war nicht signifikant von 1 verschieden, was für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Deshalb wurde in diesen Fällen die Steigung für die Berechnung der pA_2 -Werte gleich 1 gesetzt. N97/66, N98/33 und NF110 erwiesen sich als schwache Antagonisten, da nur 100 μ M der Substanzen zu einer messbaren Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven führte, weshalb hier keine Schild-

ERGEBNISSE

Analysen erstellt werden konnten. Die pA_2 -Werte sind in Tabelle 3.22 und Tabelle 3.23 aufgeführt.

Betrachtet man die Hierarchie der hemmenden Wirkung der Suraminanaloga auf die ADP-induzierte Aggregation, so ergibt sich eine ähnliche Reihenfolge wie bei den „shape-change“-Messungen (Tabelle 3.21):

NF864 > Suramin \geq NF023 = NF449 > N98/33 \geq NF110 \geq N97/66.

Tabelle 3.22: pA_2 -Werte der ADP-induzierten Aggregation humaner Thrombozyten ermittelt aus dem Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der Abszisse. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC_{50} -Werten ermittelt. War die Steigung der Regressionsgeraden nicht signifikant von 1 verschieden, wurde die Steigung der Geraden gleich eins gesetzt.

Substanz	$pA_2 \pm S.E.M.$	Steigung $\pm S.E.M.$
Suramin	$5,28 \pm 0,06$ ¹⁾	$1,22 \pm 0,10$
NF023	$5,19 \pm 0,13$ ¹⁾	$0,91 \pm 0,36$
N97/66	n.b.	n.b.
N98/33	n.b.	n.b.
NF449	$5,08 \pm 0,05$ ¹⁾	$0,98 \pm 0,12$
NF110	n.b.	n.b.
NF864	$6,03 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,18$

n.b. = nicht bestimmbar; ¹⁾ Steigung gleich 1 gesetzt.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.23: Einzel-pA₂-Werte der Analoga für die Hemmung der ADP-induzierten Aggregation humaner Thrombozyten. Die „dose ratio“ wurde anhand von EC₅₀-Werten ermittelt.

	Einzel-pA ₂ -Wert ± S.E.M. bei der entsprechenden Antagonistenkonzentration				
	1 µM	3 µM	10 µM	30 µM	100 µM
Suramin			5,16 ± 0,04	5,29 ± 0,10	5,38 ± 0,08
NF449			5,11 ± 0,06	5,03 ± 0,15	5,08 ± 0,03
NF110					4,36 ± 0,08
NF864	6,11 ± 0,15	6,14 ± 0,07	5,83 ± 0,15		
NF023			4,99 ± 0,58	5,43 ± 0,13	5,04 ± 0,12
N97/66					4,18 ± 0,03
N98/33					4,58 ± 0,18

4. Diskussion

4.1. Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten

Neben den Studien an glattmuskulären Organen, deren Einsatz als funktionelle Modelle für P2-Rezeptorsubtypen bereits in unserem Labor etabliert war, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zahlreiche Untersuchungen an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten durchgeführt. Die Antagonisten wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf den ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und auf den „shape change“ sowie die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Der ADP-induzierte Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration wird ausschließlich über den P2Y₁-Rezeptor vermittelt ohne Beteiligung des P2Y₁₂- oder P2X₁-Rezeptors (Jin et al., 1998). Dagegen handelt es sich bei dem $\alpha\beta$ meATP-induzierten Calciumeinstrom in die Thrombozyten um einen reinen P2X₁-vermittelten Effekt (MacKenzie et al., 1996). Um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können, wurden zunächst die Methoden mit Hilfe literaturbekannter Standardantagonisten validiert, wobei zu bemerken ist, dass die Methode des $\alpha\beta$ meATP-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs bereits von K. Menke (2003) in unserem Labor etabliert wurde.

4.1.1. Untersuchung des ADP-induzierten Calciumanstiegs

Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten Calciumanstiegs an in Puffer resuspendierten Thrombozyten ergaben einen EC₅₀-Wert von 0,8 μ M (Abbildung 3.15). Das ADP wurde mit Hexokinase vorbehandelt, um mögliche Verunreinigungen mit ATP zu entfernen und somit eine Aktivierung des P2X₁-Rezeptors zu verhindern. Zusätzlich wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP β S, das mit Hilfe von Apyrase aufgereinigt wurde, an Thrombozyten ermittelt. Durch den Zusatz von Apyrase (0,32 U/ml) wurde das ADP β S von möglichen Verunreinigungen mit ADP befreit. Die Messungen ergaben einen EC₅₀-Wert von 1,05 μ M für ADP β S (Abbildung 3.34), das somit die gleiche agonistische Wirkstärke wie ADP am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten zeigt. Der für ADP gemessene EC₅₀-Wert von ca. 1 μ M steht im Einklang mit publizierten EC₅₀-Werten von $0,29 \pm 0,1$ μ M für den ADP-induzierten

Calciumanstieg (Hechler et al., 1998b) und 0,92 μM für ADP am gereinigten humanen P2Y₁-Rezeptor (Waldo et al., 2002).

Bei Untersuchungen mit [³H]MRS2279 am gereinigten humanen P2Y₁-Rezeptor wurde für ADP β S ein K_i-Wert von 2,4 μM ermittelt (Waldo und Harden, 2004), der gut mit unseren Ergebnissen korreliert.

Zur Methodenetablierung des P2Y₁-vermittelten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration in Thrombozyten wurden pIC₅₀-Werte von MRS2179 und A3P5P gegen 1 μM ADP bestimmt (Abbildung 3.16). Die Untersuchungen ergaben pIC₅₀-Werte von 6,43 für MRS2179 und 5,31 für A3P5P, die gut mit publizierten Werten übereinstimmen. Baurand et al. (2000) fanden für MRS2179 einen pIC₅₀-Wert von 6,59 gegen 1 μM ADP, Hechler et al. (1998b) ermittelten für A3P5P einen pA₂-Wert von 5,3. Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von A3P5P zeigten einen kompetitiven Mechanismus für die Hemmung der ADP-induzierten intrazellulären Calciuserhöhung mit einem pK_B-Wert von 6,0 (Fagura et al., 1998).

Somit war es gelungen, die Messung des ADP-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs in unserem Labor zu etablieren und publizierte Ergebnisse von P2Y₁-Standardantagonisten zu reproduzieren. Die Unwirksamkeit des P2Y₁₂-Antagonisten 2-meSAMP (Abbildung 3.16) bestätigte diese Befunde.

4.1.2. Untersuchungen der ADP-induzierten Aggregation

Zur weiteren Charakterisierung des Antagonismus verschiedener Substanzen am P2Y₁- bzw. P2Y₁₂-Rezeptor humaner Thrombozyten wurden neben den fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen auch aggregometrische Messungen durchgeführt.

Es wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der ADP-induzierten Aggregation von in Puffer resuspendierten Plättchen erstellt. Der Plättchensuspension wurden 0,32 U/ml Apyrase zugesetzt, um den P2Y₁-Rezeptor vor Desensibilisierung zu schützen (Maayani et al., 2003b).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Auswertung von Aggregationssignalen, die die Zunahme der Lichttransmission in Abhängigkeit von der Zeit widerspiegeln: Steigung, maximale Amplitude oder Amplitude nach Einstellung eines Plateaus. An der ADP-induzierten Aggregation sind sowohl P2Y₁- wie auch P2Y₁₂-Rezeptoren beteiligt (Kunapuli, 1998a). Über den P2Y₁-Rezeptor wird die schnelle, transiente

DISKUSSION

Aggregation vermittelt, Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors führt zur langsam einsetzenden, anhaltenden Aggregation. Untersuchungen von Jarvis et al. (2000) mit den P2Y₁- bzw. P2Y₁₂-selektiven Antagonisten A3P5P und ARC67085 zeigten, dass die Steigung der Aggregationskurve hauptsächlich die P2Y₁-vermittelte Aggregation und die Amplitude nach Erreichen eines Plateaus die P2Y₁₂-vermittelte Aggregation widerspiegelt. Die maximale Amplitude setzt sich aus der P2Y₁- und der P2Y₁₂-vermittelten Aggregation zusammen. Deshalb wurde die Steigung der Aggregationssignale als Parameter für die Auswertung gewählt.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP ergab sich für Thrombozyten isoliert aus Frischblut ein pEC₅₀-Wert von 5,44 (Abbildung 3.23), der gut mit publizierten Werten für diesen Effekt übereinstimmt (pEC₅₀: 5,36, Hechler et al., 1998b; pEC₅₀: 5,74, Vigne et al., 1999).

Zur Methodenetablierung wurden pA₂-Werte der P2Y₁-Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P ermittelt. Im Falle von MRS2179 war die Steigung der Schild-Regression (0,76) signifikant von 1 verschieden, was für einen nicht rein kompetitiven Mechanismus spricht. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergibt einen pA₂-Wert von 6,00 (Abbildung 3.24). Baurand et al. (2001) ermittelten einen pA₂-Wert von 6,55 mit einer Steigung von 0,64 für MRS2179 gegen die ADP-induzierte Aggregation. Die Autoren erklärten die Steigungsabweichung von 1 der Regressionsgeraden des kompetitiven P2Y₁-Antagonisten MRS2179 (Boyer et al., 1998) mit der heterogenen Rezeptorpopulation und der gemeinsamen Beteiligung des P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptors an der ADP-induzierten Aggregation.

Neben MRS2179 wurde der pA₂-Wert von A3P5P, einem weiteren in der Literatur gut charakterisierten P2Y₁-Standardantagonisten ermittelt. Auch hier ist die Steigung der Regressionsgeraden (0,79) signifikant von 1 verschieden, so dass der pA₂-Wert (Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse) von 5,16 als rein experimenteller Parameter angesehen werden sollte. Diese Ergebnisse werden durch Befunde von Hechler et al. (1998b) bestätigt, die mit Hilfe der Schild-Analyse für A3P5P einen pA₂-Wert von 5,4 bei einer Steigung der Regressionsgeraden von 0,69 bestimmten.

Ob eine ADP-vermittelte Aggregation durch Aktivierung lediglich eines Rezeptors (P2Y₁- oder P2Y₁₂-Rezeptor) möglich ist, oder ob eine Co-Stimulation beider P2-Rezeptoren notwendig ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Kunapuli (Daniel et. al., 1999) fand heraus, dass eine Co-

DISKUSSION

Stimulation beider Rezeptoren für die Aggregation zwingend erforderlich ist. Jarvis dagegen beobachtete an Thrombozyten in Plasma, dass auch bei vollständiger Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors eine P2Y₁-vermittelte Aggregation erfolgt (Jarvis et al., 2000). Auch an Plättchen, denen der P2Y₁-Rezeptor fehlt, wurde eine partielle Aggregation bei hohen ADP-Konzentrationen beobachtet (Fabre et al., 2001). Untersuchungen von Park und Hourani (1999) zeigten, dass Plättchen in Plasma und Plättchen, die in Puffer resuspendiert wurden, unterschiedlich auf bestimmte Agonisten (ADP β S, ADP α S) reagieren. Sie vermuten, dass der P2Y₁-Rezeptor auf Plättchen, die in Puffer resuspendiert wurden, teilweise desensibilisiert vorliegt und deswegen, im Gegensatz zu Plättchen im Plasma, eine Co-Stimulation des P2Y₁- und des P2Y₁₂-Rezeptors zwingend erforderlich ist, um eine Aggregation zu erreichen. Um nun herauszufinden, ob auch bei Thrombozyten, die in Puffer suspendiert wurden, bei vollständiger P2Y₁₂-Blockade eine Aggregation durch ADP erfolgen kann, wurden Versuche mit den P2Y₁-Antagonisten A3P5P und MRS2179, dem P2Y₁₂-Antagonisten 2-meSAMP und dem Thiolreagenz pHMBS durchgeführt.

Wie oben bereits ausgeführt, ist laut Untersuchungen von Jarvis und Mitarbeitern (2000) in plättchenreichem Plasma die Steigung der Aggregationskurve vor allem ein Maß für die P2Y₁-vermittelte Aggregation, während die Amplitude nach Einstellung eines Plateaus hauptsächlich die P2Y₁₂-vermittelte Aggregation widerspiegeln soll. Bei den hier ermittelten Aggregationskurven handelt es sich allerdings durchweg um transiente Signale. Ein Grund dafür könnte die Anwesenheit von Apyrase sein, die den Agonisten ADP zu AMP abbaut und somit eine längere Wirkdauer verhindert (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Deshalb war es bei den folgenden Untersuchungen mit dem P2Y₁₂-Antagonisten 2-meSAMP und dem Thiolreagenz pHMBS nicht möglich, die Amplitude nach Einstellung eines Plateaus zu ermitteln.

Die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von 2-meSAMP über die Steigung der Transmissionssignale ergab eine konzentrationsabhängige parallele Rechtsverschiebung (Abbildung 3.26). Die Steigung der Regressionsgeraden war mit 1,09 nicht signifikant von 1 verschieden, was für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Es wurde ein pA₂-Wert von 5,79 ermittelt. Kubista et al. (2003) untersuchten die Substanz 2-meSAMP an P2Y₁₂-Rezeptoren von PC12-Zellen, indem sie Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP in Anwesenheit von unterschiedlichen Antagonistenkonzentrationen über den cAMP-Spiegel erfassten. Sie fanden einen pA₂-Wert von 6,1. Michal et al. (1969) ermittelten einen pIC₅₀-Wert von 5,07 für die

DISKUSSION

Hemmung der durch 0,6 μM ADP induzierten Aggregation. Untersuchungen von Jantzen et al. (1999) ergaben einen pIC_{50} -Wert von 6,24 gegen die durch 1 μM ADP induzierte Hemmung der cAMP-Bildung in Thrombozyten. Die in der Literatur beschriebenen Daten stehen somit in gutem Einklang mit dem in dieser Arbeit erhaltenen pA_2 -Wert, woraus geschlossen werden kann, dass die Hemmung der Aggregation einen direkten Rückschluss auf die Blockade des P2Y_{12} -Rezeptors erlaubt, wenn der P2Y_1 -Rezeptor nicht gehemmt wird. Takasaki et al. (2001) ermittelten für 2-meSAMP einen pIC_{50} -Wert < 4 gegen die durch 10 nM 2-meSADP induzierte Calciummobilisierung in Gliomazellen der Ratte, die den humanen P2Y_1 -Rezeptor exprimierten. Diese Befunde werden durch die Ergebnisse bei der Calciummessung an humanen Thrombozyten bestätigt, wo 30 μM 2-meSAMP keinen signifikanten Einfluss auf die durch 1 μM ADP induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration zeigte (Abbildung 3.16).

Bei dem Thiolreagenz pHMBS handelt es sich um einen nahen chemischen Verwandten von p-Chloromercuribenzolsulfonsäure (pCMBS). pCMBS hemmt selektiv die P2Y_{12} -Rezeptoren durch Interaktion mit extrazellulären Cysteinresten, ohne einen Einfluss auf den P2Y_1 -Rezeptor (Ding et al., 2003). In Anwesenheit von pHMBS kam es zu einer nichtkompetitiven Hemmung der ADP-induzierten Aggregation (Abbildung 3.27). Da durch das Thiolreagenz der P2Y_{12} -Rezeptor inaktiviert wird, kann der Antagonismus auch durch hohe Konzentrationen von ADP nicht überwunden werden. Wie auch bei 2-meSAMP wurde durch die Messung des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration gezeigt, dass pHMBS in den eingesetzten Konzentrationen (3-30 μM) keinen Einfluss auf den P2Y_1 -Rezeptor ausübt (Abbildung 3.16).

Durch Untersuchung des $\alpha\beta\text{meATP}$ -induzierten Calciumeinstroms konnte außerdem bewiesen werden, dass 2-meSAMP und pHMBS in den eingesetzten Konzentrationen auch am P2X_1 -Rezeptor humaner Thrombozyten inaktiv sind (Abbildung 3.14).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass durch Blockade des P2Y_{12} -Rezeptors ohne Inhibition des P2Y_1 - und des P2X_1 -Rezeptors die ADP-induzierte Aggregation vollständig gehemmt werden kann. Somit ist es bei der Aggregationsmessung unter Verwendung von ADP als Agonist nicht möglich, zwischen P2Y_1 - und P2Y_{12} -Hemmung klar zu unterscheiden.

4.1.3. Untersuchungen des ADP-induzierten „shape change“

Neben der Beteiligung an der ADP-induzierten Aggregation vermittelt der P2Y₁-Rezeptor auch den ADP-induzierten „shape change“. Über den ADP-induzierten „shape change“ gibt es widersprüchliche Berichte. Die gängige Meinung ist, dass es sich hierbei um einen rein P2Y₁-vermittelten Effekt handelt (Daniel et al., 1998; Jin et al., 1998; Park und Hourani, 1999; Jantzen et al., 1999; Kim et al., 1999; Wilde et al., 2000). Daneben wird allerdings auch von einer Beteiligung des P2Y₁₂-Rezeptors am ADP-induzierten „shape change“ berichtet (Jagroop et al., 2003). Ziel war es nun zunächst, die Rolle des P2Y₁₂-Rezeptors am ADP-induzierten „shape change“ aufzuklären.

Nichtlineare Regressionsanalyse der Steigung ADP-induzierter „shape change“-Signale ergab einen pEC₅₀-Wert von 6,90 (Abbildung 3.19), der in gutem Einklang mit dem von Maayani et al. (2003b) gefundenen pEC₅₀-Wert von 7,33 ist.

Zunächst wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit von 2-meSAMP und pHMBS untersucht. Da die beiden Substanzen keinen Einfluss auf die P2Y₁-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zeigten, dürfte es in Anwesenheit der beiden Verbindungen zu keiner Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven des ADP-induzierten „shape change“ kommen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Dosis-Wirkungs-Kurven bei den verschiedenen Inkubationskonzentrationen von 2-meSAMP und pHMBS nahezu deckungsgleich waren. Das bedeutet, dass die Steigung des „shape change“ durch die P2Y₁₂-Antagonisten nicht beeinflusst wird. Dies bietet die Möglichkeit, den Antagonismus von Substanzen am P2Y₁-Rezeptor der Plättchen ohne Beteiligung des P2Y₁₂-Rezeptors zu untersuchen.

Zur weiteren Methodenetablierung wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP in Gegenwart der P2Y₁-Standardantagonisten MRS2179 und A3P5P über die Steigung der „shape change“-Signale ermittelt. Beide Substanzen zeigten einen kompetitiven Antagonismus (Abbildung 3.21 und 3.22), und die Auswertung der Schild-Analyse ergab einen pA₂-Wert von 6,55 für MRS2179 und 5,65 für A3P5P. Maayani und Mitarbeiter (2003b) fanden einen pA₂-Wert von 6,07 für die Hemmung des ADP-induzierten „shape change“ durch A3P5P, der im Rahmen unserer Ergebnisse liegt.

Im Vergleich zu den aggregometrischen Untersuchungen von MRS2179 (pA₂-Wert: 6,00; Steigung der Schild-Regression: 0,76) und A3P5P (pA₂-Wert: 5,16; Steigung:

DISKUSSION

0,79) liegen die mit Hilfe des „shape change“ ermittelten pA_2 -Werte etwa eine halbe Zehnerpotenz höher, gleichzeitig nähert sich die Steigung der Regressionsgeraden einem Wert von 1 an.

Für MRS2179 und A3P5P wurde gezeigt, dass es sich um kompetitive $P2Y_1$ -Antagonisten handelt. Untersuchungen von Boyer et al. (1996) ergaben, dass A3P5P kompetitiv humane $P2Y_1$ -Rezeptoren, die in Astrozytomazellen exprimiert wurden, mit einem pK_B -Wert von 6,0 hemmt. MRS2179 erwies sich als kompetitiver Antagonist am $P2Y_1$ -Rezeptor von Truthahnerythrozyten mit einem pA_2 -Wert von 6,99 (Boyer et al., 1998). Am rekombinanten humanen $P2Y_1$ -Rezeptor, exprimiert in Sf9-Insektenzellen, wurde für MRS2179 ein pA_2 -Wert von 7,08 (Waldo et al., 2002) bestimmt. Die Ergebnisse der „shape change“-Untersuchungen sind in guter Übereinstimmung mit diesen Daten, die an rekombinanten Rezeptoren gewonnen wurden. Wie auch dort erwiesen sich MRS2179 und A3P5P als kompetitive Antagonisten, wobei sich MRS2179 jeweils um den Faktor 10 potenter zeigte als A3P5P. Die pA_2 -Werte der „shape change“-Untersuchungen liegen lediglich um etwa eine halbe Zehnerpotenz unter denen der rekombinanten Rezeptoren. Eine mögliche Ursache dafür könnte der Abbau des Agonisten ADP durch Apyrase sein. Zwar kommt es innerhalb von Zehntelsekunden nach Agonistengabe zum „shape change“, trotzdem kann ein Abbau von ADP nicht ausgeschlossen werden. Dass auch bei rekombinanten Rezeptoren, die in Wirtszellen exprimiert werden, der Nukleotidmetabolismus eine Rolle spielt, wurde durch Untersuchungen von Waldo am gereinigten humanen $P2Y_1$ Rezeptor gezeigt, da dort für MRS2179 ein pK_i -Wert von 7,81 und für A3P5P ein pK_i -Wert von 6,12 ermittelt wurde (Waldo und Harden, 2004).

Die Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den „shape change“-Signalen um rein $P2Y_1$ -vermittelte Effekte handelt, bei dem der $P2Y_{12}$ -Rezeptor nicht beteiligt ist, und die sich zur Untersuchung des Antagonismus von Substanzen an diesem Rezeptor eignen.

4.1.4. Untersuchungen des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“

Rolf et al. (2001) zeigten, dass neben ADP auch $\alpha\beta$ meATP den „shape change“ auslösen kann. Es handelt sich hierbei um einen $P2X_1$ -vermittelten Effekt. Sie erstellten eine Dosis-Wirkungs-Kurve von $\alpha\beta$ meATP und erhielten einen pEC_{50} -Wert von 6,46.

Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass sich die Größe der „shape-change“-Signale durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration auf 10 mM steigern lässt (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Ähnliche pEC_{50} -Werte für den $\alpha\beta$ meATP-vermittelten „shape change“ wurden auch von anderen Autoren ermittelt (pEC_{50} : 6,40; Erhardt et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit von 10 mM Ca^{2+} und 0,6 U/ml Apyrase erstellt, die einen pEC_{50} -Wert von 6,42 ergaben (Abbildung 3.17, 3.18), der identisch mit den Literaturdaten war. Es ist ebenfalls eine gute Übereinstimmung mit dem von North und Surprenant (2000) gefundenen pEC_{50} -Wert für $\alpha\beta$ meATP von 6,0 an rekombinanten Ratten- $P2X_1$ -Rezeptoren festzustellen.

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ um keinen $P2Y_1$ -vermittelten Effekt handelt, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von 30 μ M des $P2Y_1$ -Antagonisten MRS2179 erstellt. Während es beim ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit von 30 μ M MRS2179 zu einer „dose ratio“ von 76 kam (Abbildung 3.21) waren die Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP-vermittelten „shape change“ in An- und Abwesenheit des Antagonisten deckungsgleich (Abbildung 3.18).

Daraus kann man schließen, dass der $\alpha\beta$ meATP-induzierte „shape change“ nicht über den $P2Y_1$ -Rezeptor vermittelt wird, sondern ausschließlich über den $P2X_1$ -Subtyp (siehe auch Abbildung 4.11).

4.1.5. Untersuchungen an Ekto-Nukleotidasen der Kartoffel (Apyrase grade VII)

Da bei den Versuchen an humanen Thrombozyten Apyrase im Puffer vorhanden war, wurden alle verwendeten Antagonisten hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Apyrase untersucht. Es zeigte sich, dass keiner der Antagonisten die Apyrase nennenswert hemmte (Tabelle 3.6), so dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch ein eventuelles Desensibilisieren der Rezeptoren ausgeschlossen werden kann.

Zur Stabilität der Antagonisten in Gegenwart der Apyrase und anderer Ekto-Nukleotidasen ist zu sagen, dass potentiell Phosphatgruppen von Antagonisten abgespalten werden könnten. Untersuchungen mit PPADS ergaben, dass die Phosphatgruppe nicht durch Ekto-Nukleotidasen gespalten wird (Hoffmann et al., 2000). Deswegen erscheint es unwahrscheinlich, dass die anderen PPADS- und PPNDS-Analoga durch Ekto-Nukleotidasen inaktiviert werden. Auch für MRS2179 konnte gezeigt werden, dass es nicht von der Apyrase abgebaut wird (siehe Kapitel 4.2.2.). Für A3P5PS wurde berichtet, dass es von Ekto-Nukleotidasen ausschließlich zu A3P5P abgebaut wird, woraus man schließen kann, dass A3P5P gegenüber diesen Enzymen stabil ist (Park et al., 1998).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Antagonisten die Apyrase nicht beeinflussen und durch sie auch nicht inaktiviert werden.

4.2. Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen

4.2.1. Rezeptorselektivität an nativen P2-Rezeptoren

Bei MRS2179 handelt es sich um einen gut untersuchten Standardantagonisten am rekombinanten P2Y₁-Rezeptor (siehe Kapitel 1.1.2.2.). Untersuchungen am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum zeigten, dass MRS2179 potent, allerdings nichtkompetitiv den P2Y₁-Rezeptor im Meerschweinchen-Ileum hemmt (Horner et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde MRS2179 hinsichtlich seiner Rezeptorselektivität am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (GPI) und am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (RVD) untersucht. MRS2179 zeigte am GPI gegen $\alpha\beta$ meATP (1 μ M) einen IC₅₀-Wert > 100 μ M (Abbildung 3.1), der um ca. eine Zehnerpotenz von dem Inhibitionswert abweicht, der für MRS2179 an rekombinanten P2X₃-Rezeptoren gefunden wurde. Messungen an rekombinanten P2X₃-Rezeptoren (Brown et al., 2000) ergaben einen IC₅₀-Wert von 12,9 μ M gegen ATP (3 μ M). Noch größer waren die Unterschiede zwischen den Ergebnissen am P2X₁-Rezeptor des RVD (siehe Kapitel 3.1.1.1.), wo MRS2179 bis 100 μ M keinen Effekt gegen $\alpha\beta$ meATP (1 μ M)-vermittelte Kontraktionen zeigte, und den Untersuchungen an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren (Brown et al., 2000), die einen IC₅₀-Wert von 1,15 μ M ergaben. Die Ergebnisse von MRS2179 am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens werden bestätigt durch Untersuchungen am P2X₁-Rezeptor von humanen Thrombozyten, wo MRS2179 bis zu einer Konzentration von 300 μ M keinen Einfluss auf die $\alpha\beta$ meATP-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zeigte (Menke, 2003). Auch andere Arbeitsgruppen kamen zu dem Ergebnis, dass MRS2179 am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wirkungslos ist. 30 μ M MRS2179 zeigte keinen Einfluss auf den durch 1 μ M $\alpha\beta$ meATP ausgelösten „shape change“ (Erhardt et al., 2003).

4.2.2. Stabilität von MRS2179 in Gegenwart des Ratten-Vas-deferens

Zur Aufklärung der Diskrepanz zwischen der antagonistischen Potenz an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren und der an nativen P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens wurden Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität von MRS2179 am Samenleiter der Ratte durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass MRS2179 von Ekto-Nukleotidasen aus *Xenopus*-Oozyten abgebaut wird, nicht allerdings von der Kartoffelaprase (Apyrase Grade VII) (Horner et al., 2002). Auch Baurand und Kollegen fanden heraus, dass MRS2179 nicht von der Kartoffelaprase abgebaut wird (Baurand et al., 2000). Deswegen wurde eine Inaktivierung von MRS2179 durch Ekto-Nukleotidasen, die sich auf dem Ratten-Vas-deferens befinden, in Betracht gezogen.

Gegen die enzymatische Inaktivierung von MRS2179 sprechen folgende Befunde (Abbildung 3.2): Die Variation der Inkubationszeit von Co-Applikation bis 15 Minuten macht einen Abbau von MRS2179 durch Enzyme des RVD recht unwahrscheinlich, da nach keinem Inkubationszeitraum ein inhibitorischer Effekt von MRS2179 am RVD festzustellen war. Durch die Untersuchungen von MRS2179 am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (GPI) in Anwesenheit von RVD kann ein Abbau von MRS2179 durch das RVD zu Metaboliten, die am P2Y₁-Rezeptor unwirksam sind, ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede der Hemmung von MRS2179 am P2Y₁-Rezeptor des GPI in An- und Abwesenheit des RVD festzustellen waren (Tabelle 3.1).

Die Wirksamkeit von MRS2179 in vivo wurde in Untersuchungen an Mäusen und Ratten gezeigt, wo die Applikation von 50 mg MRS2179 pro Kilogramm Körpergewicht zu einer verlängerten Blutungszeit führte, was für eine gewisse Stabilität der Substanz in nativem Gewebe spricht (Baurand et al., 2001).

Diese Ergebnisse lassen einen enzymatischen Abbau von MRS2179 als Grund für die Unwirksamkeit an nativen P2X₁-Rezeptoren als sehr unwahrscheinlich erscheinen.

Eine Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse könnten Speziesunterschiede sein, wie sie beim P2X₄-Rezeptor bekannt sind. Am P2X₄-Rezeptor des Menschen und der Maus zeigt $\alpha\beta\text{meATP}$ agonistische Eigenschaften, wohingegen es sich am P2X₄-Rezeptor der Ratte als Antagonist erwies (Kapitel 1.1.2.1.). Auch beim P2X₇-

Rezeptor wurden Speziesunterschiede zwischen humanem und Ratten-P2X₇-Rezeptor in der Ansprechbarkeit auf Bz-ATP beobachtet (Hibell et al., 2000). Zur weiteren Diskussion, siehe Kapitel 4.7.

4.2.3. Kinetik am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum

MRS2179 flutet schnell im Rezeptorkompartiment an und lässt sich rasch und vollständig auswaschen. Es handelt sich somit bei MRS2179 um einen Antagonisten mit einer „fast-on-fast-off-Kinetik“ am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (Abbildung 3.3).

Zusammenfassend kann man zu den Untersuchungen von MRS2179 an isolierten Organen sagen, dass es deutliche Unterschiede zwischen rekombinanten und nativen Rezeptoren gibt, die am P2X₁-Rezeptor am stärksten ausgeprägt sind. Abweichungen zwischen Inhibitionsstärke an nativen und rekombinanten P2X₁-Rezeptoren wurden ebenfalls bei NF279 und NF449 gefunden (Lambrecht et al., 2002), allerdings zeigen diese Substanzen im Gegensatz zu MRS2179 an beiden Modellen inhibitorische Wirkung. Auch am P2Y₁-Rezeptor sind Unterschiede festzustellen; am rekombinanten P2Y₁-Rezeptor erwies sich MRS2179 als kompetitiver Antagonist, wohingegen am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum ein nichtkompetitiver Antagonismus von MRS2179 beobachtet wurde. Es soll hier aber betont werden, dass MRS2179 durchaus ein wertvolles Werkzeug zur selektiven Blockade nativer P2Y₁-Rezeptoren darstellt (siehe Kapitel 4.1).

4.3. PPADS- und PPNDS-Analoga

4.3.1. Charakterisierung von PPADS- und PPNDS-Analoga an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe

Frühere Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei Pyridoxal-5-phosphat um einen nichtselektiven Antagonisten an P2X- und P2Y-Rezeptoren handelt, der ca. 10-fach schwächer potent ist als PPADS. Pyridoxal, Pyridoxin-5-phosphat und Dihydro-PPADS erwiesen sich an P2-Rezeptoren als wirkungslos (Lambrecht et al., 2002). Daraus kann man schließen, dass die Aldehydgruppe und die Phosphatgruppe im Pyridoxal-5-phosphat essentiell für die P2-antagonistische Wirkung sind. Untersuchungen von Brown et al. (2001) ergaben, dass die 5-Phosphatgruppe durch eine 5-Phosphonatgruppe ohne Verlust der P2-antagonistischen Wirkung ersetzt werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass es möglich ist, die Diazogruppe durch eine Methylengruppe unter Erhaltung der antagonistischen Wirkung an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren zu ersetzen (Brown et al., 2001).

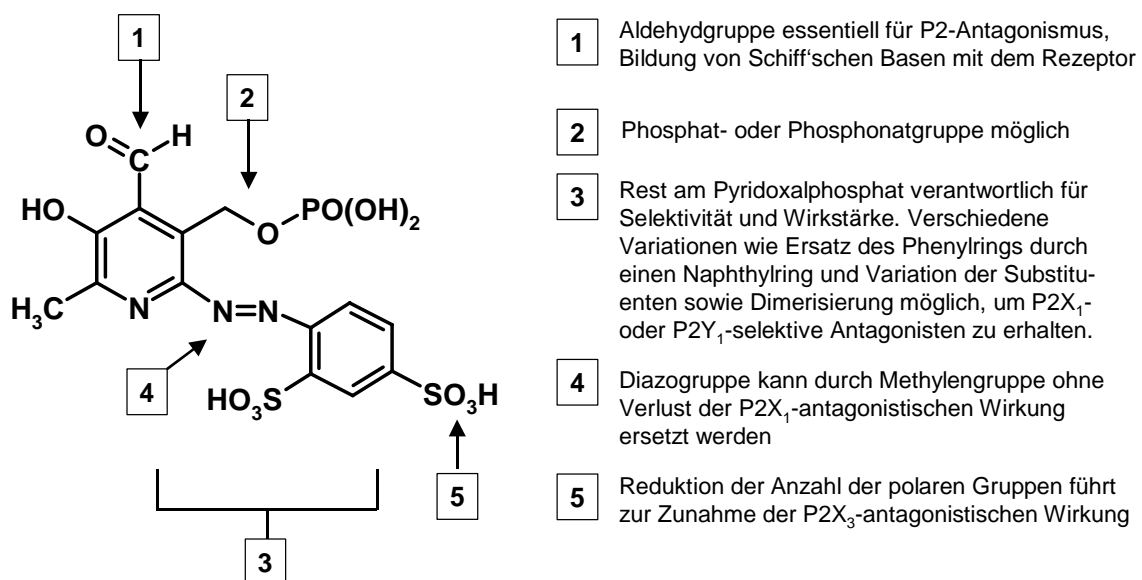


Abbildung 4.1: Strukturformel von PPADS und Auswirkungen der Strukturmodifikationen auf die P2-antagonistische Wirkung.

DISKUSSION

Der Rest, der über eine Diazogruppe mit dem Pyridoxalphosphat verknüpft ist, scheint für die Selektivität und die Wirkstärke an P2-Rezeptoren verantwortlich zu sein. Deshalb wurden hier verschiedene Strukturmodifikationen durchgeführt (Abbildung 4.1).

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es sich bei PPADS um einen spezifischen P2-Antagonisten handelt, der relativ unselektiv an P2X₁-, P2X₃- und P2Y₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens und des Meerschweinchen-Ileum wirkt (Lambrecht et al., 1992, 2002). Der Ersatz des Disulfonsäurephenylrestes im PPADS durch einen nitrierten Disulfonsäurenaphthylrest im PPNDS führt zu einer deutlichen Steigerung der Wirkstärke am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens bei gleichbleibender Hemmung des P2Y₁-Rezeptors, weshalb es sich bei PPNDS um einen P2X₁-selektiven Antagonisten handelt (Lambrecht et al., 2000b). Durch Verknüpfung von Pyridoxal-5-phosphat mit dem Monomer des Suramins entsteht der heterodimere Ligand SB9, der sich als P2Y₁-selektiver Antagonist an glattmuskulären Organen erwies (Lambrecht et al., 2000a).

Daran anknüpfend wurden im Rahmen dieser Arbeit einige PPADS- und PPNDS-Analoga (Strukturformeln siehe Abbildung 3.4) hinsichtlich ihrer antagonistischen Wirkung an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe untersucht. Durch Ersatz der beiden Sulfonsäuregruppen von PPADS durch eine para-ständige Carbonsäuregruppe gelangt man zum MRS2159. Es handelt sich hierbei um einen selektiven Antagonisten an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren der Ratte (Kim et al., 2001). Dimerisierung von MRS2159 über einen Spacer führt zum homodimeren CLII, das sich als effektiver „cross-linker“ zur Herstellung von rekombinanten P2X-Rezeptortrimeren aus identischen Untereinheiten erwiesen hat (Nicke et al., 1998). Beim NAC handelt es sich um ein Analogon von PPNDS, bei dem die Nitrogruppe von PPNDS zur Aminogruppe reduziert und mit Essigsäure amidiert wurde. Im Fall von N-Butyl wurde die Essigsäure im NAC durch Buttersäure ersetzt.

Bei SB9 konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung von Pyridoxal-5-phosphat und dem Suraminmonomer zu einer Steigerung der Wirkstärke und zu veränderten Selektivitäten im Vergleich zu den Monomeren führte (siehe Kapitel 1.1.2.2.). Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass bivalente Liganden, die 2 Pharmakophore besitzen, welche über einen „spacer“ miteinander verbunden sind, eine erhöhte Wirkstärke und Selektivität im Vergleich zu den Monomeren aufweisen

DISKUSSION

können. Solche Beispiele sind für Liganden verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren wie Opiat-, Bradykinin-, Dopamin-, Muskarin-, Adrenalin- oder Serotoninrezeptoren bekannt (Halazy et al., 1996; Halazy, 1999; Portoghese, 2001; Lalchandani et al., 2002).

Um den Einfluss der einzelnen Strukturmodifikationen auf die pharmakologische Wirkung vergleichen zu können, wurden pIC_{50} -Werte der Substanzen am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens sowie am $P2X_3$ - und $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum ermittelt. Um den Mechanismus des Antagonismus zu untersuchen, wurden von den interessantesten Verbindungen zusätzlich pA_2 -Werte bestimmt.

Vergleicht man die pIC_{50} -Werte der einzelnen Substanzen am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens miteinander (Tabelle 4.1), kann man folgende Aussagen treffen: Ausgehend von PPADS kommt es bei einem Ersatz der beiden Sulfonsäuregruppen durch eine para-ständige Carbonsäuregruppe (\rightarrow MRS2159) zu einer Steigerung der $P2X_1$ -antagonistischen Wirkung um den Faktor 14. Dimerisierung von MRS2159 zum CLII führt zu keiner geänderten Wirkung am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens im Vergleich zum Monomer. MRS2159, CLII und PPNDS zeigen vergleichbare antagonistische Wirkstärken am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens, obwohl sie sich in dem mit Pyridoxalphosphat verknüpften Rest deutlich voneinander unterscheiden. Daraus kann man schließen, dass die antagonistische Wirkung am $P2X_1$ -Rezeptor nicht zwingend auf die Anwesenheit von Sulfonsäuregruppen angewiesen ist. Allerdings weisen MRS2159 und CLII mit der para-ständigen Carbonsäuregruppe ebenfalls eine negativ geladene Gruppe auf. Aber auch MRS2143, ein PPADS-Analogon, bei dem die beiden Sulfonsäuregruppen fehlen und das somit keine negativ geladenen Reste am Phenylring trägt, zeigt eine um den Faktor 2 stärkere antagonistische Wirkung am rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptor der Ratte, der in *Xenopus*-Oozyten exprimiert wurde, im Vergleich zu PPADS (Brown et al., 2001).

DISKUSSION

Tabelle 4.1: Antagonistische Wirkstärke der PPADS- und PPNDS-Analoga am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (RVD) sowie am P2X₃- und am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (GPI).

Substanz	P2X ₁ (RVD)		P2X ₃ (GPI)	P2Y ₁ (GPI)	
	pIC ₅₀ ¹⁾	pA ₂	pIC ₅₀ ²⁾	pIC ₅₀ ³⁾	pA ₂
PPADS	5,83	6,59 ^{d) e)}	5,11	5,66 ^{a)}	6,20 ^{d) e)}
MRS2159	6,99	6,69	5,66	6,27; 4,33 ^{b)}	n.b.
CLII	6,87	7,0 ^{d) e)}	6,13	5,74	n.b.
PPNDS	6,79	7,43 ^{f) e)}	5,36	5,78 ^{c)}	6,13 ^{f)}
NAC	6,46	6,91	5,91	6,29	7,38
N-Butyl	6,66	n.b.	5,75	6,10	n.b.
SB9	6,26	6,05 ^{d)}	5,59	6,37 ^{a)}	6,98 ^{d)}

n.b.: nicht bestimmt; ¹⁾ 1 µM αβmeATP; ²⁾ 1 µM αβmeATP; ³⁾ 10 µM ADPβS; ^{a)} Lambrecht et al., 2000a; ^{b)} biphasischer Kurvenverlauf; ^{c)} persönliche Mitteilung Prof. Lambrecht; ^{d)} Lambrecht et al., 2002; ^{e)} pK_B-Wert; ^{f)} Lambrecht et al., 2000b.

Bei NAC und N-Butyl wurde die Nitrogruppe von PPNDS durch eine Acylaminogruppe ersetzt. Im Vergleich zu PPNDS ist dadurch die P2X₁-antagonistische Wirkung am Vas deferens der Ratte ca. um den Faktor 2 herabgesetzt. Wie bei NAC und N-Butyl zu sehen ist, scheint die Kettenlänge des Aminoacylrestes kaum einen Einfluss auf die P2X₁-antagonistische Wirkung auszuüben.

Am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum zeigen PPADS, CLII und PPNDS eine nahezu identische antagonistische Wirkstärke (Tabelle 4.1). Im Gegensatz dazu sind NAC und N-Butyl an diesem Rezeptor um den Faktor 3 potenter als die vorgenannten Substanzen. Die stärkste P2Y₁-antagonistische Wirkung zeigt SB9 mit einer 5-fach stärkeren Wirkung im Vergleich zu PPADS. MRS2159 unterscheidet sich von den anderen Substanzen am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum durch einen biphasischen Verlauf der Inhibitionskurve. Einen solchen biphasischen Kurvenverlauf zeigt auch NF449 am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum. Genauere Untersuchungen ergaben einen nichtkompetitiven Antagonismus für NF449 in diesem Modell (Menke, 2003).

DISKUSSION

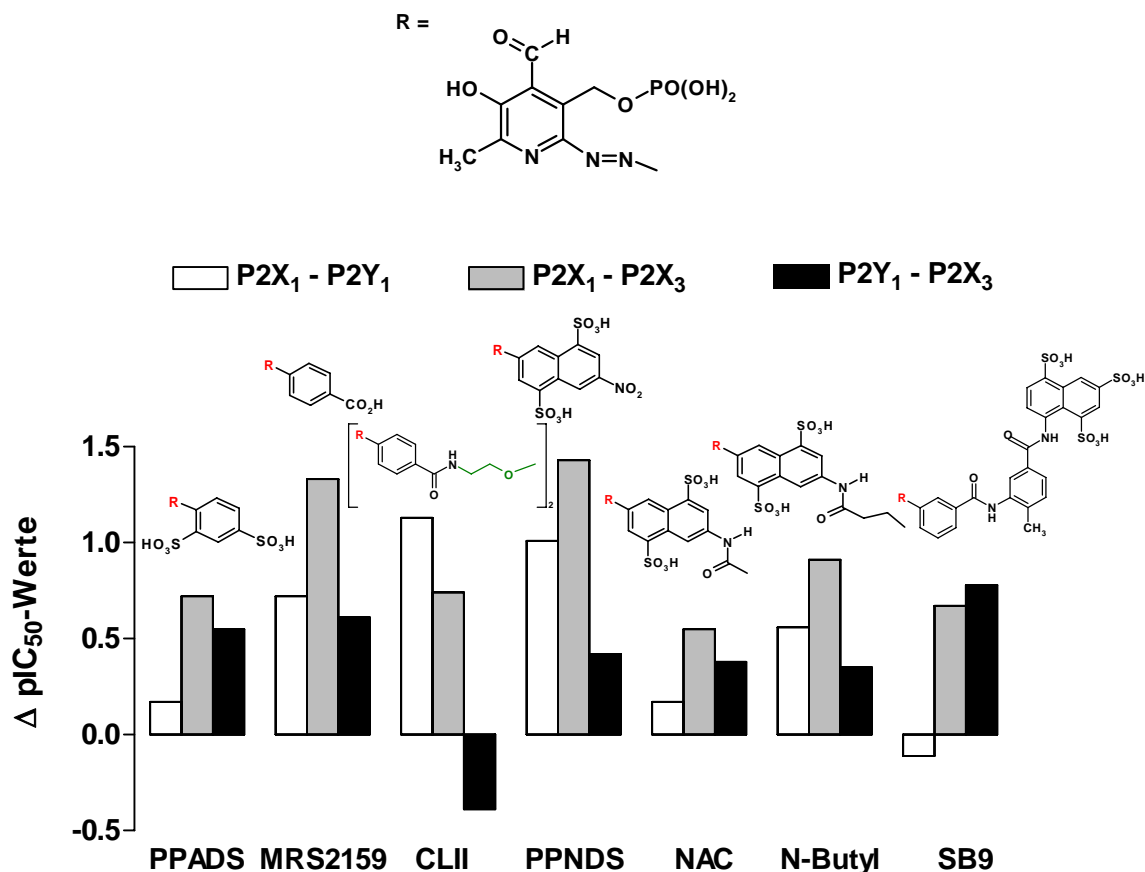


Abbildung 4.2: Differenzen der pIC_{50} -Werte der Substanzen als Maß der Rezeptorselektivität. Beim MRS2159 wurde am P2Y₁-Rezeptor der pIC_{50} -Wert der hochaffinen Bindungsstelle der Berechnung zugrunde gelegt (Tabelle 4.1)..

Am P2X₃-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum ist MRS2159 der stärkste Antagonist mit einer 10-fach erhöhten Wirkstärke im Vergleich zu PPADS. Bei den hier untersuchten Verbindungen ist eine Tendenz zur Zunahme der P2X₃-antagonistischen Wirkung durch eine Abnahme der polaren Gruppen im Vergleich zur Molekülgröße festzustellen. Lipophilere Moleküle scheinen somit potenter am P2X₃-Rezeptor zu sein als hydrophile. Diese Beobachtung wurde auch bei den Suraminanaloga gemacht, wo der Wegfall von 4 Sulfonsäuregruppen vom NF449 hin zum NF110 zu einer Zunahme der P2X₃-antagonistischen Wirkung um den Faktor 5 führte (Kassack et al., 2004).

Der Einfluss der Strukturmodifikationen auf die antagonistische Wirkung an den einzelnen nativen Rezeptoren ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Für die einzelnen Substanzen ergibt sich somit folgendes Rezeptorprofil (Abbildung 4.2): Mit Ausnahme von SB9 weisen alle Substanzen eine P2X₁- über P2Y₁-Selektivität auf. Diese ist bei CLII und PPNDS mit dem Faktor 10 am stärksten

DISKUSSION

ausgeprägt. Neben SB9 zeigen auch weitere heterodimere Liganden, die aus Strukturelementen von PPADS und Suramin aufgebaut sind, wie SB4 und SB6, eine P2Y₁- über P2X₁-Selektivität (Menke, 2003).

Bei allen PPADS- und PPNDS-Analoga ist eine P2X₁- über P2X₃-Selektivität vorhanden, die bei PPNDS und MRS2159 am größten ist. Mit Ausnahme von CLII sind alle Substanzen am P2Y₁-Rezeptor stärker wirksam als am P2X₃-Rezeptor. Bei den beiden bivalenten Liganden SB9 und CLII ist ein inverses Rezeptorprofil festzustellen. CLII zeigt eine P2X₁- über P2Y₁- und eine P2X₃- über P2Y₁-Selektivität, wohingegen bei SB9 eine P2Y₁- über P2X₁- und eine P2Y₁- über P2X₃-Selektivität gefunden wurde. SB9 besitzt also eine höhere Affinität zu P2Y₁-Rezeptoren, und CLII entfaltet stärkere antagonistische Wirkungen an P2X-Rezeptoren.

Allgemein lässt sich bei diesen sieben Analoga keine Aussage darüber treffen, welche Strukturen für die Wirkstärke und Selektivität an den einzelnen Rezeptoren verantwortlich sind, da unterschiedliche Strukturmodifikationen zu ähnlichen Rezeptorprofilen führen. Allerdings muss man bedenken, dass pIC₅₀-Werte von der Agonistenkonzentration und dem Mechanismus des Antagonismus abhängig sind.

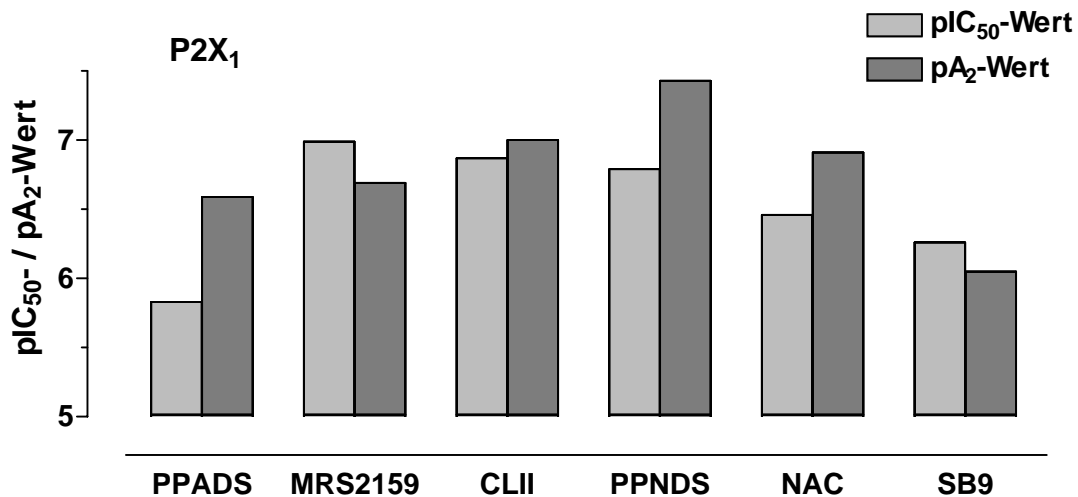
Zusammenfassend kann man sagen, dass der Versuch, die Wirkstärke und die Selektivität durch Dimerisierung von MRS2159 zum CLII zu erhöhen, nicht gelungen ist, da Monomer und Dimer ein sehr ähnliches pharmakologisches Profil aufweisen. Dies beweist, dass es extrem schwierig ist, bivalente Liganden mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften zu entwickeln. Im Falle von CLII wären Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit unterschiedlichen „spacern“ notwendig.

Bei der Ermittlung von pA₂-Werten (Tabelle 4.1) stellte sich heraus, dass sich die einzelnen Substanzen hinsichtlich des antagonistischen Mechanismus unterscheiden. Untersuchungen am Samenleiter der Ratte haben ergeben, dass es in Gegenwart zunehmender Konzentrationen von PPADS zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei gleichzeitigem Absinken des Maximums kommt. Dies ist auch bei PPNDS und CLII der Fall, weswegen hier kein pA₂-Wert sondern ein pK_B-Wert (pseudoirreversibler Antagonismus) bestimmt wurde. Bei NAC ist eine deutliche Rechtsverschiebung ohne Maximumsabfall zu erkennen, allerdings ergab der Schild-Plot eine Gerade mit einer Steigung, die signifikant größer als 1 ist, was auf einen nichtkompetitiven Antagonismus hinweist (Abbildung 3.6). Bei MRS2159 (Abbildung 3.6) und bei SB9 (Lambrecht et al., 2000a) kam es zu

DISKUSSION

einer parallelen Rechtsverschiebung mit der typischen Verteilung der Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit des Antagonisten, die auch bei NF449 (Braun et al., 2001) und NF279 (Lambrecht et al., 1999) beobachtet wurde. Insgesamt gesehen können aber MRS2159 und SB9 als kompetitive Antagonisten am P2X₁-Rezeptor des Vas deferens der Ratte angesehen werden.

A



B

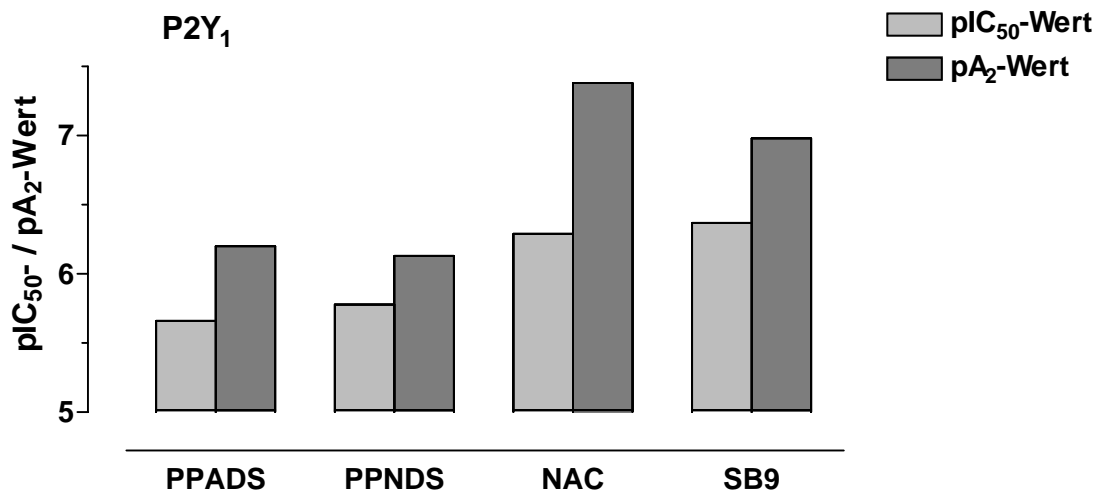


Abbildung 4.3: pIC₅₀- und pA₂-Werte ausgewählter PPADS- und PPNDS-Analoga am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (A) und am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (B).

Man kann also sagen, dass sich die PPADS- und PPNDS-Analoga deutlich in ihrem antagonistischen Verhalten am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens unterscheiden. Bei den pA₂-Werten, die in Tabelle 4.1 aufgeführt sind, handelt es sich im Falle von PPADS, PPNDS und CLII um pK_B-Werte (pseudoirreversibler

DISKUSSION

Antagonismus), die mit Hilfe eines doppelt reziproken Plots (Kenakin, 1993) ermittelt wurden, bei NAC (nicht-kompetitiv) wurde der Schnittpunkt der Regressionsgeraden des Schild-Plots mit der Abszisse angegeben. Somit sind diese Werte nur bedingt miteinander zu vergleichen. Interessanterweise fallen bei den beiden Substanzen MRS2159 und SB9, die sich als kompetitive Antagonisten in diesem System erwiesen haben, die pA_2 -Werte niedriger aus als die pIC_{50} -Werte, bei PPADS, CLII, PPNDS und NAC ist es umgekehrt (Abbildung 4.3).

Auch Untersuchungen hinsichtlich der Kinetik am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vasdeferens zeigen ein unterschiedliches Verhalten der Substanzen. PPADS lässt sich innerhalb von 30 Minuten wieder vollständig auswaschen und ist somit vollkommen reversibel (Ganso, 2004). NAC (Abbildung 3.7) und SB9 diffundieren nur sehr langsam vom Rezeptor ab, und die Organe erreichen auch nach einer Auswaschphase von zwei Stunden keine volle Kontraktionskraft (Lambrecht et al., 2000). CLII erwies sich als irreversibler Antagonist, der auch nach 1,5 Stunden Auswaschen noch eine maximale Hemmung zeigt (persönliche Mitteilung Prof. Lambrecht).

Auch andere Arbeitsgruppen fanden ein unterschiedliches kinetisches Verhalten einzelner PPADS-Analoga (Kim et al., 2001; Brown et al., 2001).

Am $P2Y_1$ -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum zeigt PPADS ein ähnliches Verhalten wie am $P2X_1$ -Rezeptor. Mit zunehmenden Konzentrationen des Antagonisten kam es zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven mit einer Absenkung des Maximums. PPNDS und SB9 hingegen erwiesen sich als rein kompetitive Antagonisten am Meerschweinchen-Ileum (Lambrecht et al., 2000a, Lambrecht et al., 2000b). NAC führt am Meerschweinchen-Ileum zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei steigenden Antagonistenkonzentrationen ohne eindeutige Maximumsdepression. Die Auswertung des Schild-Plots ergab eine Gerade, deren Steigung nicht signifikant von 1 verschieden ist, was auf einen kompetitiven Antagonismus hindeutet.

Untersuchungen hinsichtlich des kinetischen Verhaltens zeigen bei PPADS und SB9 einen teilweise reversiblen Antagonismus, wobei die Organe auch nach einer Auswaschphase von 1,5 Stunden noch nicht wieder vollständige Kontraktionskraft erreichen (Ganso, 2004). Bei NAC handelt es sich um einen pseudoirreversiblen Antagonisten, der auch nach einer Auswaschzeit von 1,5 Stunden maximale Hemmung zeigt (Abbildung 3.11).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den PPADS- und PPNDS-Analoga um potente P2-Antagonisten mit unterschiedlichen Selektivitätsprofilen an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe handelt. Die Substanzen unterscheiden sich hinsichtlich ihres kinetischen Verhaltens; manche Antagonisten zeigen einen reversiblen, andere einen irreversiblen oder pseudoirreversiblen Antagonismus. Wie bei PPNDS ist das kinetische Verhalten auch vom Rezeptor abhängig. Es wurde vermutet, dass die Aldehydgruppe von Pyridoxal eine Schiff'sche Base mit Lysinresten in den Rezeptoren bildet, was zu dem „pseudoirreversiblen“ Antagonismus führt (Buell et al., 1996). Allerdings kann die Aldehydgruppe nicht die alleinige Erklärung für den „pseudoirreversiblen“ Antagonismus sein, da diese bei allen hier untersuchten Liganden vorhanden ist. Eventuell könnte die Größe oder die sterische Anordnung des Moleküls eine Rolle bei der Ausbildung der Schiff'schen Basen spielen. Weitere Untersuchungen mit PPADS-Analoga unterschiedlicher Struktur wären notwendig, um die Ursache für das unterschiedliche kinetische Verhalten zu ergründen.

4.3.2. Charakterisierung von PPADS- und PPNDS-Analoga an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten

Die Untersuchungen von PPADS- und PPNDS-Analoga an P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten zeigten bei der Calciummessung eine etwas andere Reihenfolge der antagonistischen Wirkung im Vergleich zum P2X₁-Rezeptor des Vas deferens der Ratte (siehe Kapitel 3.3.2.1.). Hier wurde für PPADS eine stärkere antagonistische Wirkung ermittelt als für PPNDS (Tabelle 3.9), was im Gegensatz zu Untersuchungen am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (Tabelle 4.1) und am rekombinanten P2X₁-Rezeptor der Ratte steht. Man kann am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten die Substanzen in 2 Gruppen unterteilen: PPADS, MRS2159 und NAC weisen einen IC₅₀-Wert um 1 µM auf, wohingegen für CLII, PPNDS, N-Butyl und SB9 ein IC₅₀-Wert um 3 µM ermittelt wurde. Auffällig bei allen Substanzen ist der steile Kurvenverlauf der Inhibitionskurven.

Noch größer als beim P2X₁-Rezeptor sind die Unterschiede beim P2Y₁-Rezeptor zwischen glattmuskulären Organen (Tabelle 4.1) und humanen Thrombozyten (Tabelle 3.10). Mit Ausnahme von NAC wurde für alle untersuchten Analoga an den Thrombozyten ein IC₅₀-Wert um 10 µM ermittelt. Auffällig ist vor allem die große

DISKUSSION

Differenz hinsichtlich des P2Y₁-Antagonismus bei SB9 um mehr als eine Zehnerpotenz. Auch hier wird wieder ein extrem steiler Verlauf der Inhibitionskurven beobachtet.

Dadurch ergibt sich an den Thrombozyten für die einzelnen Substanzen ein anderes Selektivitätsprofil im Vergleich zu den glattmuskulären Organen (siehe Abbildung 4.4). Die P2X₁-Selektivität von PPNDS und CLII fällt hier wesentlich geringer aus, und die an glattmuskulären Organen P2Y₁-selektive Substanz SB9 zeigt sich an humanen Thrombozyten als P2X₁-selektiv. Grundsätzlich ist auffällig, dass alle untersuchten Substanzen ein sehr ähnliches Verhalten an den P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren der Thrombozyten aufweisen. Die Strukturmodifikationen haben einen wesentlich geringeren Einfluss auf das antagonistische Verhalten als an den glattmuskulären Rezeptoren.

Der Einfluss der Strukturmodifikationen auf die inhibitorische Wirkung an den P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

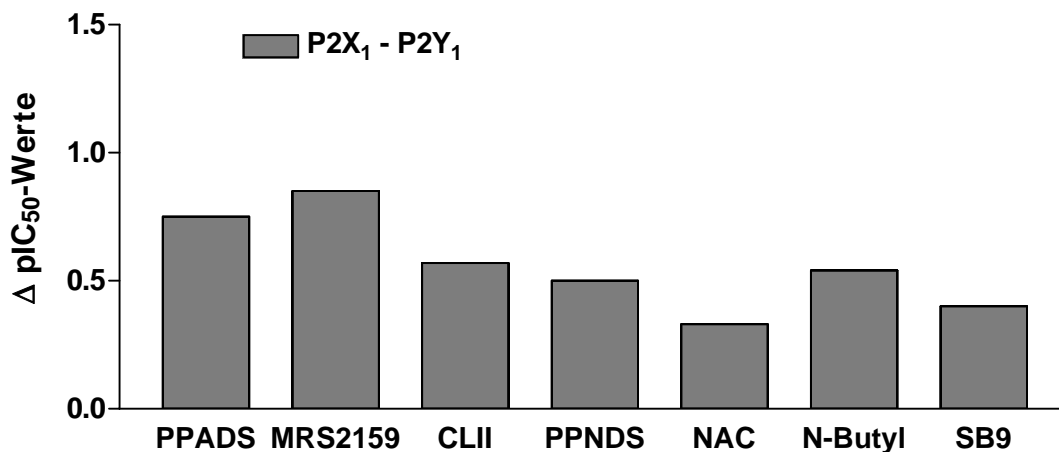


Abbildung 4.4: P2X₁-versus P2Y₁-Selektivität der PPADS- und PPNDS-Analoga an humanen Thrombozyten. Gemessen wurde die Hemmung des $\alpha\beta$ meATP- bzw. ADP-induzierten Anstiegs an $[Ca^{2+}]_i$ (Tabelle 3.9 und 3.10).

Als Grund für den steilen und vor allem am P2Y₁-Rezeptor nahezu deckungsgleichen Verlauf der Inhibitionskurven wurden optische Interferenzen zwischen den Antagonisten und den Fluoreszenzfarbstoffen, Fura-2 bzw. Oregon green, vermutet. Untersuchungen von Hall und Hourani (1993) ergaben, dass Suramin im Wellenlängenbereich, der für die Fluoreszenzmessung von Fura-2 verwendet wird, absorbiert und dass deshalb diese Messungen problematisch sind. Junankar et al.

DISKUSSION

(2002) fanden eine schwache Interferenz mit den Fluoreszenzsignalen von Fura-2 in Anwesenheit von 10 μM PPADS.

Deshalb wurde zunächst die Absorption ausgewählter PPADS- und PPNDS-Analoga bei den für die Fluoreszenzmessung relevanten Wellenlängen bestimmt (Kapitel 3.2.2.3). Es stellte sich heraus, dass die Absorption bei einer Konzentration von 10 μM der Antagonisten, bei der bereits mehr als 50% Hemmung der Calciumfreisetzung zu messen war, nur minimal war, so dass ein Einfluss auf die pIC_{50} -Ermittlung bei den Calciummessungen unwahrscheinlich erscheint.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Antagonisten auf die basalen Messkurven der Fluoreszenzfarbstoffe wurde lediglich bei MRS2159 und PPADS in Konzentrationsbereichen von 3-10 μM ein Einfluss auf die Grundlinie festgestellt, der in diesen Konzentrationen allerdings noch gering war. Auch diese Ergebnisse lassen einen optischen Einfluss auf die pIC_{50} -Werte als recht unwahrscheinlich erscheinen.

Die Untersuchungen des Einflusses der Substanzen auf die durch Serotonin induzierten Calciumsignale in Thrombozyten liefern keine eindeutigen Ergebnisse, da von NAC und N-Butyl vollständige Hemmkurven erstellt werden konnten (Abbildung 3.33). Allerdings befinden sich die IC_{50} -Werte in Konzentrationsbereichen um 10 μM , bei denen kein Einfluss auf die Grundlinie zu erkennen ist, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich bei NAC und N-Butyl um Antagonisten des 5-HT_{2A} -Rezeptors handelt.

Durch die Verwendung von $\text{ADP}\beta\text{S}$ anstelle von ADP kann ein Einfluss des Agonisten auf die Messwerte ausgeschlossen werden, da hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den pIC_{50} -Werten zu erkennen sind (Abbildung 3.35).

Weiterhin kann kein signifikanter Einfluss von 1 μM SB9 auf die MRS2179-vermittelte Blockade des P2Y_1 -Rezeptors festgestellt werden (Abbildung 3.36). Diese Konzentration von SB9 hemmt den P2Y_1 -Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum um ca. 80 %, zeigt aber keine Hemmung des P2Y_1 -Rezeptors humaner Thrombozyten. Somit kann ein optischer Einfluss, der die inhibitorische Wirkung von SB9 verschleiert, ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein optischer Einfluss auf die Messergebnisse sehr unwahrscheinlich ist.

In guter Übereinstimmung mit den hier gefunden Wirkstärken der Antagonisten am P2Y_1 -Rezeptor humaner Thrombozyten sind Ergebnisse von Guo et al. (2002), die für PPADS am humanen P2Y_1 -Rezeptor, exprimiert in COS-7-Zellen (African green

DISKUSSION

monkey kidney cells), über IP_3 -Messung einen pA_2 -Wert von 5,2 fanden. Radioligandbindungsmessungen mit $[^3H]\alpha\beta meATP$ am $P2X_1$ -Rezeptor von Thrombozyten der Ratte ergaben für PPADS einen pK_i -Wert von 5,2 (Savi et al., 1997).

Zur Aufklärung des antagonistischen Mechanismus der PPADS- und PPNDS-Analoga an $P2$ -Rezeptoren humaner Thrombozyten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta meATP$ - und des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit steigender Konzentrationen einiger Antagonisten erstellt.

Untersuchungen am $P2X_1$ -Rezeptor deckten für PPADS, MRS2159 und NAC einen nicht überwindbaren Antagonismus auf, der sich in einem deutlichen Absinken des Maximums widerspiegelt (Abbildung 3.37). Weiterhin auffällig ist, dass kleine Konzentrationsunterschiede der Antagonisten einen großen Einfluss auf die Dosis-Wirkungs-Kurven ausübten. So kommt es bei einer Konzentration von $0,3 \mu M$ MRS2159 zu einer „dose ratio“ von 2; in Anwesenheit von $3 \mu M$ MR2159 ist bereits eine vollständige Hemmung der Dosis-Wirkungs-Kurve zu beobachten. Dieser nichtkompetitive Antagonismus erklärt den steilen Verlauf der Inhibitionskurven. Der nichtkompetitive Mechanismus von MRS2159 steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die am $P2X_1$ -Rezeptor des Samenleiters der Ratte ermittelt wurden, wo sich die Substanz als kompetitiver Antagonist erwies (Abbildung 3.6).

Einen ähnlichen nichtkompetitiven Antagonismus für PPADS und einige Analoga fand Brown am rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptor der Ratte (Brown et al., 2001).

Am $P2Y_1$ -Rezeptor der humanen Thrombozyten zeigt sich ein ähnliches Bild. Zwar ist der Abfall des Maximums hier nicht so deutlich ausgeprägt, allerdings ist auch hier festzustellen, dass kleine Konzentrationsunterschiede der Antagonisten einen erheblichen Einfluss auf die Dosis-Wirkungs-Kurven ausüben. Im Falle von SB9 (Abbildung 3.38) ist eine parallele Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven festzustellen, allerdings ergibt die Auswertung des Schild-Plot eine Gerade mit der Steigung 2,3. Der Antagonismus unterscheidet sich somit von dem der anderen Substanzen. Mögliche Ursachen für diese große Steigung der Schild-Regression könnte laut Kenakin (1987) ein nicht erreichter Äquilibrierungsstatus sein. Dies erscheint hier allerdings unwahrscheinlich, da es sich bei den Thrombozyten um isolierte Zellen handelt, bei denen der Antagonist nicht durch Gewebe diffundieren muss. Vor Messbeginn befindet sich der Antagonist bereits ca. 15 Minuten in der Plättchensuspension, was für eine Blockade des Rezeptors ausreichen müsste.

DISKUSSION

Es handelt sich somit bei PPADS, NAC und SB9 um nichtkompetitive Antagonisten des P2Y₁-Rezeptors humaner Thrombozyten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Befunden, die von NAC und SB9 am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum erhoben wurden, wo ein kompetitiver Mechanismus gefunden wurde (Abbildung 3.10; Lambrecht et al., 2000a).

Weiterhin wurde der Einfluss von PPADS, NAC und SB9 auf die ADP-induzierte Aggregation humaner Thrombozyten ermittelt (Abbildung 3.39). Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den „shape-change“-Untersuchungen. In Anwesenheit von NAC und SB9 kam es zu einer deutlichen Absenkung des Maximums, wobei kaum eine Rechtsverschiebung festzustellen war, was für einen nichtkompetitiven Antagonismus spricht. Auch hier haben geringe Konzentrationsunterschiede der Antagonisten einen erheblichen Einfluss auf die Dosis-Wirkungs-Kurven.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei den PPADS- und PPNDS-Analoga um weitgehend nichtkompetitive Antagonisten an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten handelt.

DISKUSSION

Tabelle 4.2: Einfluss der Strukturmodifikationen bei PPADS- und PPNDS-Analoga auf die antagonistische Wirkstärke an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe und denen humaner Thrombozyten.

Strukturmodifikation	P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe	P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten
Ersatz der beiden Sulfonsäuregruppen im Phenylring von PPADS durch eine p-ständige Carbonsäure beim MRS2159	Steigerung der Inhibitionsstärke am P2X ₁ - und am P2X ₃ -Rezeptor, vergleichbare Wirkstärke am P2Y ₁ -Rezeptor	Nahezu identische Eigenschaften an P2X ₁ - und P2Y ₁ -Rezeptoren
Dimerisierung von MRS2159 zum CLII	Gleiche Wirkstärke am P2X ₁ - und P2Y ₁ -Rezeptor, Wirksteigerung am P2X ₃ -Rezeptor	Abnahme der Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, gleiche Wirkstärke am P2Y ₁ -Rezeptor
Ersatz des Phenylrings bei PPADS durch ein Naphthylringsystem im PPNDS	Zunahme der Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, gleiche Wirkstärke am P2X ₃ - und P2Y ₁ -Rezeptor	Abnahme der Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, gleiche Wirkstärke am P2Y ₁ -Rezeptor
Ersatz der Nitrogruppe bei PPNDS durch eine Acetylamino-Gruppe beim NAC	Leichte Abnahme der Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, Zunahme der Wirkstärke am P2Y ₁ - und P2X ₃ -Rezeptor	Zunahme der Wirkstärke am P2X ₁ - und P2Y ₁ -Rezeptor
Ersatz der Acetylgruppe bei NAC durch eine Butyrylgruppe bei N-Butyl	Vergleichbare Wirkstärke an P2X ₁ -, P2Y ₁ - und P2X ₃ -Rezeptoren	Abnahme der Wirkstärke am P2X ₁ - und P2Y ₁ -Rezeptor
Heteromerisierung von PPADS mit Suramin zu SB9	Vergleichbare Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, Zunahme der Wirkstärke am P2X ₃ - und P2Y ₁ -Rezeptor	Abnahme der Wirkstärke am P2X ₁ -Rezeptor, vergleichbare Wirkstärke am P2Y ₁ -Rezeptor

4.4. Suraminanaloga

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es sich bei bestimmten Suraminanaloga um potente und selektive Antagonisten an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe und an rekombinanten P2-Rezeptoren handelt. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von bivalenten und tetravalenten Suraminanaloga hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht. Bei den bivalenten Substanzen handelte es sich um die Muttersubstanz Suramin, den P2X₁-selektiven Antagonisten NF023 sowie N97/66 und N98/33, die Vorstufen von NF449 darstellen. Bei den tetravalenten Strukturen wurden 3 Verbindungen ausgewählt, die an den glattmuskulären Organen ein unterschiedliches Selektivitätsprofil aufweisen: zum einen der P2X₁-selektive Antagonist NF449, zum anderen die beiden P2X₃- bzw. P2Y₁-selektiven Substanzen NF110 und NF864 (Lambrecht et al., 2002; Kassack et al., 2004). Die Strukturformeln sind in Kapitel 3.3 und im Formelverzeichnis (8.2) abgebildet.

4.4.1. Charakterisierung von Suraminanaloga an humanen Thrombozyten

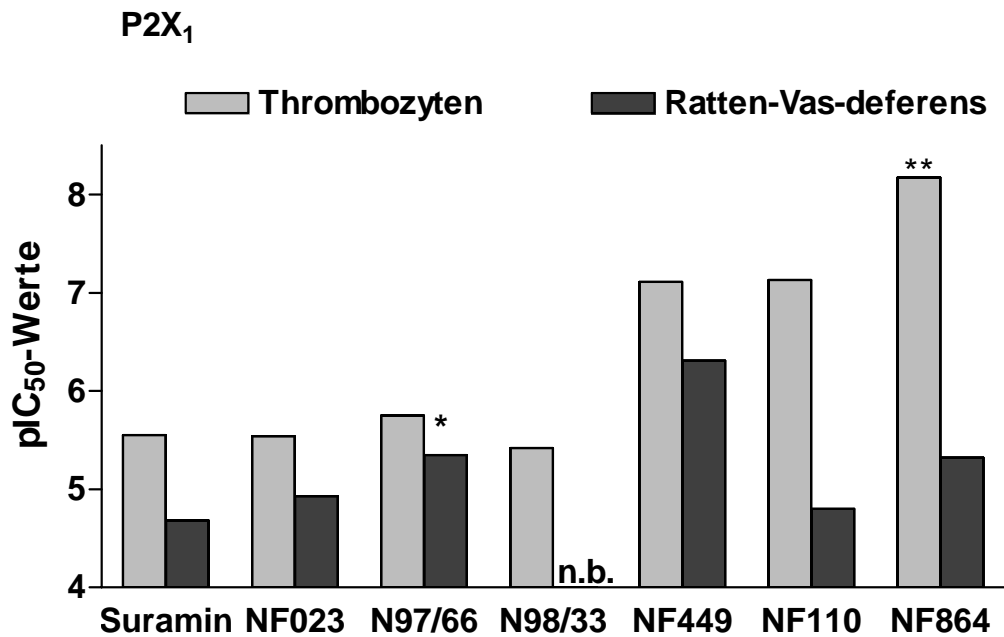
Die Ergebnisse der Calciummessungen (Tabelle 3.16) und der Bestimmung des $\alpha\beta$ meATP-induzierten „shape change“ (Tabelle 3.18) zeigen, dass die Reduzierung der Molekülgröße von Suramin zu NF023, N97/66 und N98/33 keinen Einfluss auf die antagonistischen Eigenschaften am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten hat, da alle 3 bivalenten Strukturen ähnliche Inhibitionswerte aufweisen. Überraschend waren die Resultate der tetravalenten Verbindungen NF449, NF110 und NF864. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an glattmuskulären Organen, wo sich NF449 als potentester P2X₁-Antagonist erwies, zeigte hier NF864 mit dem Naphthalinringsystem die stärkste inhibitorische Wirkung gegenüber $\alpha\beta$ meATP-induziertem Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ und „shape change“ in menschlichen Thrombozyten. NF864 war hier 8-fach potenter als NF449 und 540-fach stärker wirksam als Suramin. Im Gegensatz zu den Untersuchungen am Ratten-Vas-deferens machte sich der Wegfall der Sulfonsäuregruppe von NF449 (\rightarrow NF110) nicht in einer Abschwächung der P2X₁-antagonistischen Wirkung bemerkbar, da sich NF449 und NF110 als äquipotent am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten erwiesen. Vergleicht man die Ergebnisse einzelner Substanzen an den glattmuskulären Organen mit denen, die an Thrombozyten ermittelt wurden, so erkennt man beim P2X₁-Rezeptor erhebliche Abweichungen (siehe Abbildung 4.5A).

Es ist festzustellen, dass die Inhibitionswerte der Verbindungen an P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten höher ausfallen, als die an P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens. Bei Suramin, NF023 und NF449 sind Diskrepanzen von einer halben bis zu einer Zehnerpotenz festzustellen, wohingegen ein Unterschied von mehr als 2 Zehnerpotenzen bei NF110 und NF864 vorhanden ist.

Man kann also zusammenfassend feststellen (Tabelle 4.3), dass der P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten im Vergleich zu dem des Ratten-Vas-deferens eine höhere Affinität für die Suraminanaloga aufweist, wobei das Naphthalinringsystem von NF864 im Gegensatz zum Ratten-Vas-deferens eine essentielle Rolle für die antagonistische Wirkung spielt. Dagegen scheint die Sulfonsäuregruppe in 1-Position an den Phenylresten von NF449 keine Bedeutung bei der Hemmung des P2X₁-Rezeptors auf Blutplättchen zu haben.

DISKUSSION

A



B

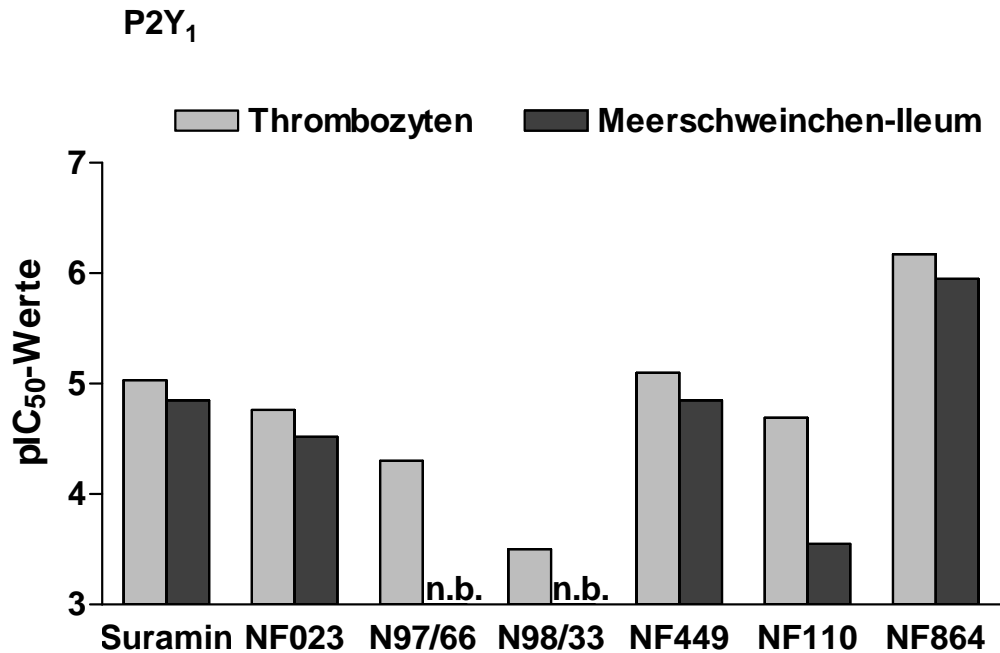


Abbildung 4.5: pIC₅₀-Werte der Suraminanaloga an glattmuskulären Organen und an humanen Thrombozyten. **(A)** pIC₅₀-Werte an P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens (10 μM αβmeATP) und humaner Thrombozyten (1 μM αβmeATP, Calciummessung). **(B)** pIC₅₀-Werte an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum (10 μM ADPβS) und humaner Thrombozyten (1 μM ADP, Calciummessung). * 1 μM αβmeATP als Agonist, ** pA₂-Wert (Abbildung 3.43), n.b. nicht bestimmt. pIC₅₀-Werte für glattmuskuläre Organe aus Kassack et al., 2004.

DISKUSSION

Tabelle 4.3: Einfluss von Strukturvariationen bei Suraminanaloga mit auf die antagonistische Wirkung an P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten und des Ratten-Vas-deferens.

Strukturvariation	humane Thrombozyten	Ratten-Vas-deferens
Bivalente oder tetravalente Struktur	Tetravalente Verbindungen NF449 und NF864 potenter als bivalente Vorstufen N98/33, N97/66 und NF023.	Tetravalente Verbindungen NF449 und NF864 potenter als bivalente Vorstufen N97/66 und NF023.
Naphthylring oder Phenylring	Bei bivalenten Verbindungen kein Unterschied; bei tetravalenten Verbindung Naphthalinsystem besser.	Bei bivalenten Verbindungen kein Unterschied; bei tetravalenten Verbindungen abhängig von der Anzahl der Sulfonsäuren; Phenylring besser.
Sulfonsäuregruppe in 1-Position des Phenylrings tetravalenter Verbindungen	Keinen Einfluss	Steigerung der Wirkstärke

Am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wirken Suramin, NF023, NF449 und NF110 nahezu äquipotent, N97/66 und N98/33 sind sehr schwache Antagonisten. Wie schon am P2X₁-Rezeptor zeigte sich NF864 als der stärkste Inhibitor. Der Einfluss der Strukturmodifikationen auf die P2Y₁-antagonistische Wirkung ist in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Am P2Y₁-Rezeptor ist mit Ausnahme von NF110 eine recht gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum gewonnen wurden, festzustellen (siehe Abbildung 4.5B).

Tabelle 4.4: Einfluss von Strukturvariationen bei Suraminanaloga auf die antagonistische Wirkung an P2Y₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten und des Meerschweinchen-Ileum.

Strukturvariation	humane Thrombozyten	Meerschweinchen-Ileum
Bivalente oder tetravalente Struktur	Tetravalente Verbindungen NF449 und NF864 potenter als bivalente Vorstufen N98/33, N97/66 und NF023.	Tetravalente Verbindungen NF449 und NF864 potenter als bivalente Vorstufen N97/66 und NF023
Naphthylring oder Phenylring	Bei bivalenten und tetravalenten Verbindungen Naphthalinsystem besser.	Bei tetravalenten Verbindungen Naphthalinsystem besser
Sulfonsäuregruppe in 1-Position des Phenylrings tetravalenter Verbindungen	Steigerung der Wirkstärke	Steigerung der Wirkstärke

DISKUSSION

Tabelle 4.5: pIC_{50} -Werte von Suraminanaloga an glattmuskulären Organen. Daten aus Kassack et al., 2004.

Substanz	P2X ₁ ¹⁾	P2Y ₁ ²⁾
Suramin	4,68	4,85
NF023	4,93	4,52
NF449	6,31	4,85
NF110	4,80	3,55
NF864	5,32	5,95

¹⁾ Ratten-Vas-deferens, $\alpha\beta$ meATP (10 μ M); ²⁾ Meerschweinchen-Ileum, ADP β S (10 μ M).

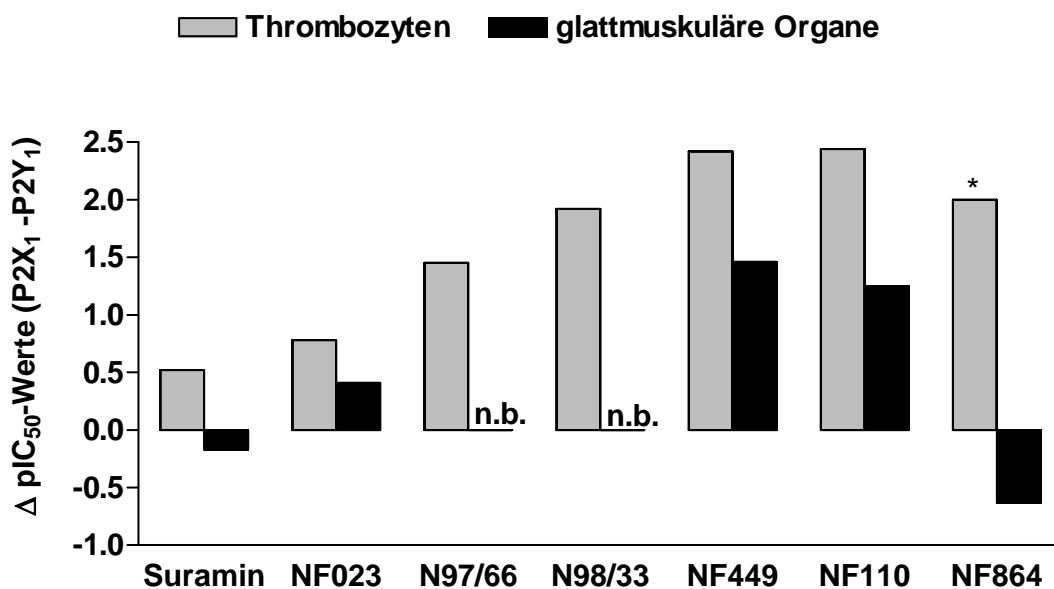


Abbildung 4.6: Differenzen zwischen pIC_{50} -Werten an P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren an humanen Thrombozyten (Calciummessung) und glattmuskulären Organen (Ratten-Vas-deferens (P2X₁) und Meerschweinchen-Ileum (P2Y₁)). n.b.: nicht bestimmt. * Bei NF864 wurde der Berechnung der pA_2 -Wert an P2X₁ von 8,17 zugrunde gelegt (Abbildung 3.43).

Vergleicht man die Selektivitätsprofile der Substanzen, so ergeben sich deutliche Abweichungen zwischen Thrombozyten und glattmuskulären Organen (Abbildung 4.6, Tabelle 4.5). Am deutlichsten sind die Unterschiede bei NF864 ausgeprägt; an den Thrombozyten zeigt die Substanz eine hohe P2X₁- versus P2Y₁-Selektivität, wohingegen sie am Meerschweinchen-Ileum (P2Y₁) potenter ist als am Ratten-Vas-deferens (P2X₁). Es ergibt sich somit ein ähnliches Verhalten wie bei SB9 (Abbildung 4.3 und 4.4). Der Grund für die Diskrepanzen ist nicht bekannt.

DISKUSSION

Zur Untersuchung des antagonistischen Mechanismus der NF-Analoga an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven des $\alpha\beta$ meATP- und des ADP-induzierten „shape change“ in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Antagonisten erstellt, so dass mit Hilfe der Schild-Analyse pA_2 -Werte ermittelt werden konnten.

Im Falle von NF864 unterscheidet sich der Einzel- pA_2 -Wert bei 0,03 μ M an den P2X₁-Rezeptoren deutlich von denen, die bei 0,1 bis 1 μ M NF864 ermittelt wurden (Tabelle 3.19). Der Grund dafür ist wahrscheinlich die hohe Proteinbindung (Müller und Wollert, 1976) der Suraminanaloga, die sich bei den niedrigen Konzentrationen bemerkbar macht. Diese Proteinbindung scheint auch bei der Calciummessung eine Rolle zu spielen, da hier zur Ermittlung des pIC_{50} -Werts sehr niedrige Konzentrationen an NF864 eingesetzt wurden. Deshalb wurde mit Hilfe der Calciummessung ein Einzel- pA_2 -Wert für 0,3 μ M NF864 von 8,17 bestimmt (Abbildung 3.43), der sehr gut mit den Ergebnissen der „shape change“-Messungen übereinstimmt.

Es zeigte sich, dass NF023, N97/66, N98/33, NF449 und NF864 kompetitiv den P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten hemmen (Tabelle 3.18). Bei Suramin handelt es sich eindeutig um einen nichtkompetitiven Antagonismus, da die Steigung der Schild-Geraden mit einem Wert von 1,8 deutlich von 1 abweicht. Bei NF110 ist die Steigung der Schild-Regression zwar auch signifikant von 1 verschieden, jedoch ergab sich bei der Varianzanalyse, dass die Einzel- pA_2 -Werte nicht signifikant voneinander abweichen, so dass die Frage nach dem kompetitiven Antagonismus nicht eindeutig beantwortet werden kann.

Man kann also feststellen, dass es sich bei NF023, N97/66, N98/33, NF449 und NF864 um kompetitive Antagonisten handelt, wohingegen Suramin den P2X₁-Rezeptor nichtkompetitiv inhibiert.

Untersuchungen des ADP-induzierten „shape change“ zeigten, dass es sich bei Suramin, NF023, NF449, NF110 und NF864 um kompetitive Antagonisten des P2Y₁-Rezeptors handelt. Da N98/33 und N97/66 nur bei Inkubationskonzentrationen von 30 und 100 μ M zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven führten, konnte für diese beiden Substanzen keine Schild-Analyse erstellt werden (Abbildung 3.46).

Der kompetitive Antagonismus von NF449 am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten steht im Gegensatz zu Untersuchungen am P2Y₁-Rezeptor des

DISKUSSION

Meerschweinchen-Ileum, wo sich NF449 als nichtkompetitiver Antagonist erwies (Braun et al., 2001). Wie schon bei MRS2179 (siehe Kapitel 4.2.1) sind hier Unterschiede hinsichtlich des Wirkmechanismus zwischen P2Y₁-Rezeptoren auf humanen Thrombozyten und denen am Meerschweinchen-Ileum zu beobachten. Der Grund dafür könnte eine mögliche Rezeptorheterogenität im Meerschweinchen-Ileum sein, die den kompetitiven Mechanismus am P2Y₁-Rezeptor verschleiern könnte (Kenakin, 1987). Im Gegensatz dazu erwiesen sich Suramin und NF023 sowohl am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wie auch am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum als kompetitive Antagonisten (Czeche, 2001).

Untersuchungen von Hourani (2001) ergaben für Suramin pA₂-Werte von 5,0 bei Messungen des ADP-induzierten „shape change“ und 4,6 bei dem ADP-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, die in recht guter Übereinstimmung mit unseren Befunden liegen.

Ein Vergleich der pA₂-Werte des P2X₁- und des P2Y₁-vermittelten „shape change“ zeigt, dass es sich bei den untersuchten Substanzen mit Ausnahme von Suramin um P2X₁-selektive Antagonisten handelt (Abbildung 4.7). Diese Selektivität ist unabhängig von der inhibitorischen Wirkstärke, wie bei N98/33 deutlich zu erkennen ist. N98/33 zeigt eine vergleichbare Wirkstärke am P2X₁-Rezeptor wie die unselektive Muttersubstanz Suramin, weist aber eine 42-fach stärkere inhibitorische Wirkung am P2X₁- im Vergleich zum P2Y₁-Rezeptor auf. Die größte Selektivität ist bei der Substanz NF110 gegeben. Die gezielte Blockade des P2X₁-Rezeptors mit den potenten und selektiven Suraminanaloga sollte sich als nützlich erweisen, die physiologische Bedeutung dieses Rezeptors bei der Hämostase weiter aufzuklären.

DISKUSSION

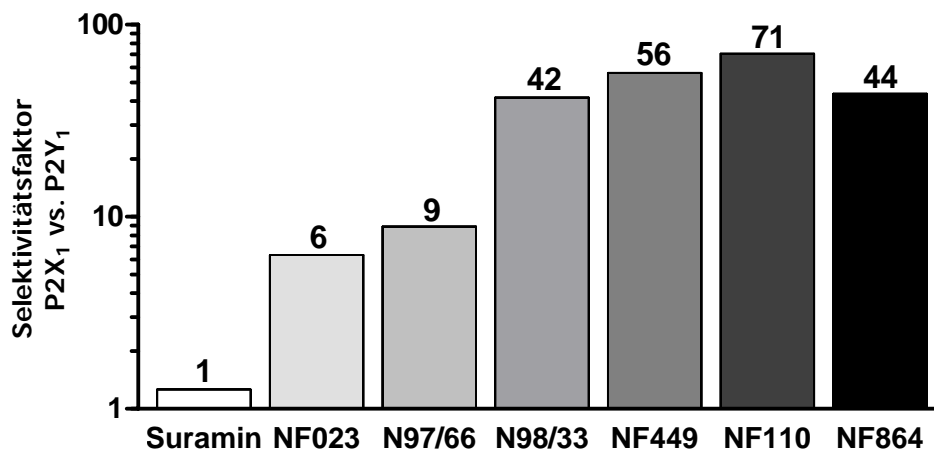


Abbildung 4.7: P2X₁-versus P2Y₁-Selektivität der Suraminanaloga, berechnet aus den pA₂-Werten des P2X₁- bzw. P2Y₁-vermittelten „shape change“.

Zur weiteren Charakterisierung der Suraminanaloga an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten wurde der Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Hierbei zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Untersuchungen des ADP-induzierten „shape change“ (Abbildung 3.47). Die Schild-Analyse ergab für Suramin, NF023 und NF449 einen kompetitiven Antagonismus. Bei N97/66, N98/33 und NF110 handelt es sich um sehr schwache Antagonisten, so dass die Ermittlung einer Schild-Analyse nicht möglich war. Die Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von NF864 zeigten neben einer Rechtsverschiebung auch ein Absinken der Maximalantwort, und auch die Steigung der Regressionsgeraden bei der Schild-Analyse war mit 0,72 signifikant von 1 verschieden, was für einen nichtkompetitiven Antagonismus spricht. Für Suramin fanden wir einen pA₂-Wert von 5,28, der etwas höher liegt als der von Hourani et al. (1992) ermittelte pA₂-Wert von 4,6.

Vergleicht man die Ergebnisse der Aggregationsmessung mit denen der „shape-change“-Untersuchungen, so erkennt man weitgehend eine recht gute Korrelation der Ergebnisse. Allerdings werden die Unterschiede mit zunehmender P2Y₁-antagonistischer Wirkstärke größer. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass es sich bei der Aggregation um einen kombinierten Prozess handelt, an dem P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren beteiligt sind. Untersuchungen am P2Y₁₂-Rezeptor über Messung der Adenylatcyclaseaktivität von Hourani (2001) ergaben für Suramin einen pA₂-Wert von 5,1, was bedeutet, dass P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren in etwa äquipotent inhibiert werden. Es gibt indirekte Hinweise dafür, dass alle hier untersuchten Suraminanaloga eine ähnliche P2Y₁₂-antagonistische Wirkstärke am

DISKUSSION

P2Y₁₂-Rezeptor entfalten. Dies bedeutet, dass mit zunehmender P2Y₁- über P2Y₁₂- Selektivität die Hemmung der Aggregation teilweise durch eine P2Y₁₂-Aktivierung durch ADP überwunden werden kann.

Andererseits kann man daraus schließen, dass der Antagonismus der untersuchten Suraminanaloga am P2Y₁₂-Rezeptor nicht die pA₂-Werte der ADP-induzierten Aggregation übersteigt.

Die Ergebnisse der Suraminanaloga an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten sind in Abbildung 4.8 graphisch dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es möglich war, durch Strukturmodifikationen einer unselektiven und relativ schwach wirksamen Substanz wie Suramin hochpotente und selektive Antagonisten für P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten zu entwickeln. Das tetravalente Suraminanalogon NF864 stellt den derzeit potentesten P2X₁-selektiven Antagonisten für humane Thrombozyten dar. Mit Hilfe dieses neuen Antagonisten sollte es in Zukunft möglich sein, die Rolle des P2X₁-Rezeptors auf Thrombozyten weiter aufzuklären.

DISKUSSION

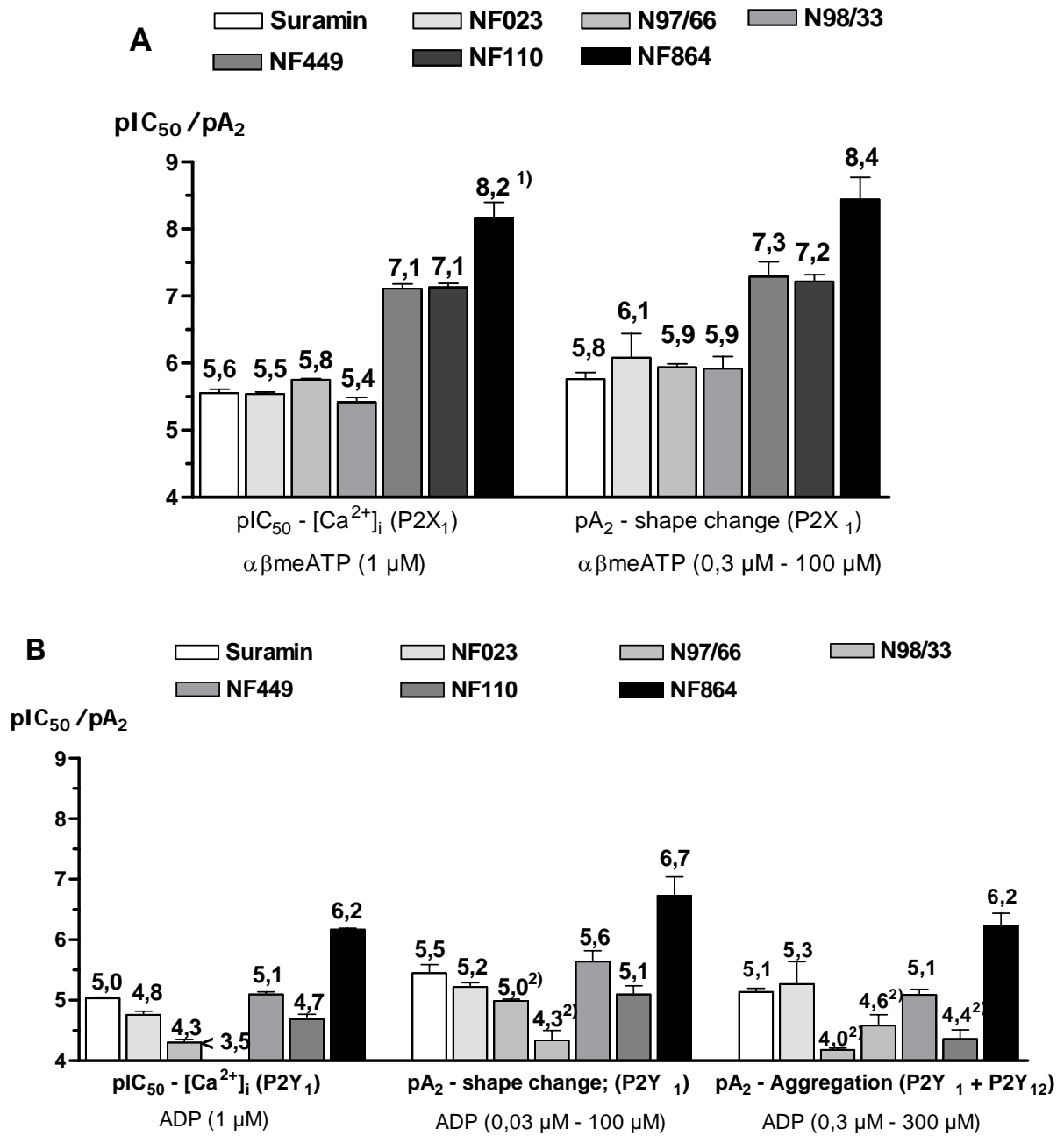


Abbildung 4.8: Hemmwerte der Suraminanaloga an humanen Thrombozyten. **(A)** pIC_{50} -Werte des P2X₁-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs sowie pA_2 -Werte des P2X₁-vermittelten „shape change“. **(B)** pIC_{50} -Werte des P2Y₁-vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs sowie pA_2 -Werte des P2Y₁-vermittelten „shape change“ und der ADP-induzierten Aggregation. ¹⁾ pA_2 -Wert, ²⁾ Einzel- pA_2 -Wert.

DISKUSSION

4.4.2. Effekte von Suraminanaloga an weiteren nativen und rekombinanten Rezeptoren

Bei Suramin handelt es sich, neben PPADS, um den am besten untersuchten P2-Antagonisten. Aber auch von NF449 und einer Reihe anderer Suraminanaloga wurden aufgrund ihrer P2-antagonistischen Wirkung an glattmuskulären Organen Untersuchungen an weiteren rekombinanten und nativen P2-Rezeptoren durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Inhibitionswerte der Suraminanaloga an verschiedenen rekombinanten und nativen P2-Rezeptoren.

Rezeptoren	Suramin	NF023	NF449	NF110	NF864
rP2X ₁ ³⁾	≈ 6 ⁱ⁾	6,62 ^{b)}	9,55 ^{c)}		
rP2X ₂ -X ₁ ⁷⁾				6,94 ^{h)}	8,15 ^{h)}
hP2X ₁ ⁴⁾	5,3 – 6 ^{b)}	6,68 ^{b)}	10,27 ^{d)}		
rP2X ₂ ³⁾	5,3 – 6 ^{b)}	4,20 ^{b)}	≈ 4,33 ^{f)}	5,21 ^{h)}	4,39 ^{h)}
rP2X ₃ ³⁾	4,82 – 5,5 ^{b)}	5,07 ^{b)}	5,74 ^{c)}		
rP2X ₂ -X ₃ ⁸⁾				7,59 ^{h)}	7,33 ^{h)}
rP2X ₄ ⁴⁾	3,74 ^{b)}	< 4,0 ^{b)}	<< 3,52 ^{f)}	< 4 ^{h)}	4,4 ^{h)}
rP2X _{1/5} ⁵⁾	≈ 5,7 ⁱ⁾		9,17 ^{f)}		
rP2X _{2/3} ⁵⁾	≈ 5,2 ⁱ⁾	5,85 ^{e)}	6,54 ^{f)}	6,53 ^{h)}	
hP2X ₇	4,04 ^{b)}		4,29 ^{d)}		
hP2Y ₁ ¹⁾	4,32 ^{a)}	< 4 ^{a)}	4,47 ^{a)}	< 4 ^{a)}	< 4 ^{a)}
hP2Y ₁₁ ²⁾	4,73 ^{a)}	3,98 ^{a)}	< 4 ^{a)}	< 4 ^{a)}	< 4 ^{a)}
hP2Y ₁₂ ⁶⁾	5,1 ^{g)}		Kein Effekt ^{k)}		

¹⁾ HEK293-Zellen, 3 μM ATP oder UTP, pIC₅₀-Werte; ²⁾ humane rekombinante Rezeptoren in CHO-Zellen, 3 μM ATPγS als Agonist, pIC₅₀-Werte; ³⁾ rekombinante Rezeptoren der Ratte in XLO-Zellen, verschiedene ATP-Konzentrationen, pIC₅₀-Werte; ⁴⁾ rekombinante humane Rezeptoren in XLO-Zellen, verschiedene ATP-Konzentrationen; ⁵⁾ heteromere rekombinante Rezeptoren der Ratte in XLO-Zellen, 1 μM αβmeATP, pIC₅₀-Werte; ⁶⁾ Hemmung der Adenylatcyclase in „washed platelets“, pA₂-Werte; ⁷⁾ nicht desensibilisierende Chimäre aus P2X₂-und P2X₁-Rezeptor der Ratte, pIC₅₀-Werte; ⁸⁾ nicht desensibilisierende Chimäre aus P2X₂-und P2X₃-Rezeptor der Ratte, pIC₅₀-Werte ^{a)} Kassack et al., 2004; ^{b)} Lambrecht, 2000; ^{c)} Braun et al., 2001; ^{d)} Hülsmann et al., 2003; ^{e)} Soto et al., 1999; ^{f)} Rettinger et al., 2003; ^{g)} Hourani, 2001; ^{h)} persönliche Mitteilung, R. Hausmann; ⁱ⁾ Damer, 2002; ^{k)} Hechler, 2004.

DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei Suramin um einen recht schwach wirksamen, nichtselektiven P2-Antagonisten handelt. Im Gegensatz dazu zeigt NF023 schon eine deutliche Präferenz für den P2X₁-Rezeptor. Am P2X₁-Rezeptor des Menschen und der Ratte wurde ein identischer pIC₅₀-Wert von 6,6 gefunden, der ca. eine halbe Zehnerpotenz höher liegt als der pA₂-Wert, der an P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten und des Ratten-Vas-deferens ermittelt wurde. Es ist hier somit eine gute Übereinstimmung zwischen Rezeptoren des Menschen und der Ratte sowie zwischen rekombinanten und nativen Rezeptoren festzustellen.

Eine deutliche Wirkungssteigerung bei NF449 ist am P2X₁-Rezeptor festzustellen. NF449 ist am rekombinanten P2X₁-Rezeptor der Ratte um den Faktor 850 wirksamer als NF023. Im Gegensatz zu NF023 gibt es bei NF449 eine leichte Diskrepanz zwischen dem rekombinanten P2X₁-Rezeptor der Ratte und des Menschen. NF449 ist am humanen rekombinanten P2X₁-Rezeptor um den Faktor 5 potenter als an dem der Ratte. Auch sind große Unterschiede zwischen rekombinanten und nativen Rezeptoren festzustellen. Bei der Ratte ist NF449 um den Faktor 250, beim Menschen um den Faktor 450 stärker wirksam an rekombinanten Rezeptoren im Vergleich zu nativen Rezeptoren. An den weiteren P2-Rezeptoren, mit Ausnahme des P2X_{1/5}-Rezeptors, weist NF449 eine vergleichbare Wirkstärke wie Suramin und NF023 auf. Es handelt sich somit bei NF449 um einen selektiven und potenten P2X₁-Antagonisten, dessen Affinität für rekombinante P2X₁-Rezeptoren größer ist als für native.

NF110 zeigt eine Selektivität für den P2X₃-Rezeptor; Untersuchungen an glattmuskulären Organen ergaben eine 9-fache P2X₃- versus P2X₁-Selektivität, die sich auch bei Untersuchungen an rekombinanten Rezeptoren bestätigt. Die Werte wurden an nicht desensibilisierenden Chimären durchgeführt, bei denen Teile der intrazellulären Domäne, die bei den P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren an der Desensibilisierung beteiligt sind, durch Sequenzen des nicht desensibilisierenden P2X₂-Rezeptors ersetzt wurden (siehe Kapitel 1.1.1.1.). Für die P2X₂-P2X₁-Chimäre konnte gezeigt werden, dass sie identische Eigenschaften wie der reine rekombinante P2X₁-Rezeptor aufweist (Rettinger und Schmalzing, 2004). Die Ergebnisse, die von NF110 an der P2X₂-X₁-Chimäre gewonnen wurden, stimmen mit denen am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten überein. Allerdings gibt es große Diskrepanzen zu den antagonistischen Eigenschaften an nativen P2X₁-Rezeptoren der Ratte, wo NF110 140-fach schwächer wirksam ist (Tabelle 4.). Auch am

DISKUSSION

rekombinanten P2X₃-Rezeptor ist NF110 um den Faktor 70 potenter im Vergleich zum nativen Rezeptor (Kassack et al., 2004).

Bei dem potentesten P2X₁-Antagonisten humaner Thrombozyten, NF864, wurde ein vergleichbarer Inhibitionswert an der rekombinanten P2X₂-X₁-Chimäre wie am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten ermittelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass teilweise große Diskrepanzen in der Wirkstärke der Antagonisten an rekombinanten und nativen Rezeptoren, aber auch an Rezeptoren unterschiedlicher Spezies festzustellen sind. Allerdings ist kein klares Muster zu erkennen, da bei einigen Substanzen auch eine gute Übereinstimmung zu finden ist. Zur weiteren Diskussion, siehe Kapitel 4.6 und 4.7.

Bei NF023, NF449, NF110 und NF864 handelt es sich um potente P2X₁-Antagonisten, von denen NF449 die größte Wirkstärke an rekombinanten Rezeptoren entfaltet, wohingegen NF864 der wirksamste Antagonist an nativen humanen P2X₁-Rezeptoren von Thrombozyten ist.

4.5. Korrelationen zwischen den Parametern Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$, „shape change“ und Aggregation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von Substanzen hinsichtlich ihres pharmakologischen Einflusses auf den ADP- bzw. $\alpha\beta$ meATP-induzierten Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ und „shape change“ sowie auf die ADP-induzierte Aggregation untersucht. Durch Korrelationen der Ergebnisse miteinander können Rückschlüsse daraus gezogen werden, welche P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten an welchem Phänomen beteiligt sind.

Um die pIC_{50} -Werte, die bei der Calciummessung ermittelt wurden, mit den pA_2 -Werten der „shape change“- und Aggregationsmessungen vergleichen zu können, wurden sie mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng und Prusoff, 1973) in scheinbare pA_2^* -Werte umgerechnet (Tabelle 4.7).

Die PPADS- und PPNDS-Analoga wurden bei diesen Korrelationen nicht berücksichtigt, da aufgrund ihres nichtkompetitiven Mechanismus bei den „shape-change“- und Aggregationsuntersuchungen kein pA_2 -Wert ermittelt werden konnte.

Tabelle 4.7: Scheinbare pA_2 -Werte (pA_2^ -Werte) verschiedener Antagonisten, berechnet aus pIC_{50} -Werten mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung an Thrombozyten.*

Substanz	pA_2^* -Wert	
	P2X ₁ - $[Ca^{2+}]_i$	P2Y ₁ - $[Ca^{2+}]_i$
Suramin	5,85	5,38
NF023	5,84	5,11
N97/66	6,05	4,65
N98/33	5,72	< 3,85
NF449	7,41	5,45
NF110	7,43	5,04
NF864	8,17 ¹⁾	6,52
MRS2179	< 3,85	6,73
A3P5P	4,04	5,61

¹⁾ Einzel- pA_2 -Wert von 0,3 μ M NF864

DISKUSSION

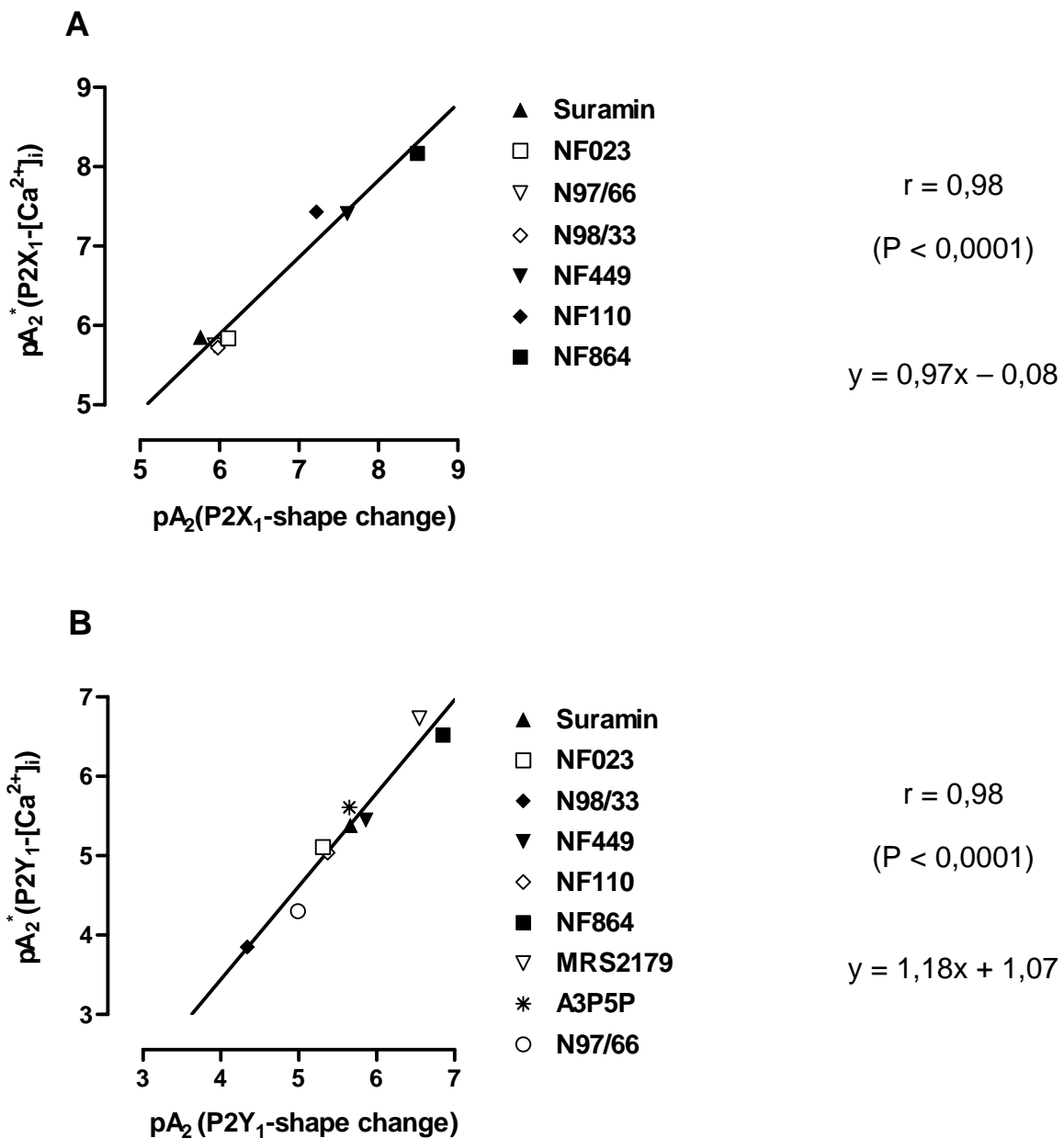


Abbildung 4.9: Korrelationen zwischen pA_2 -Werten der „shape-change“-Messungen und pA_2^* -Werten der Untersuchungen des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs. Die Linie stellt die lineare Regression der Korrelation dar. (A) Agonist: $\alpha\beta meATP$. (B) Agonist: ADP.

Die Korrelationen zwischen „shape-change“-Untersuchungen und Calciummessungen für die $P2X_1$ - und $P2Y_1$ -Rezeptoren sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

Bei dem $P2X_1$ -Rezeptor ist eine sehr gute Übereinstimmung der beiden $\alpha\beta meATP$ -induzierten Vorgänge gegeben. Durch lineare Regression der Wertepaare erhält man eine Gerade ($r = 0,98$), deren Steigung nicht signifikant von 1 verschieden ist und deren Schnittpunkt mit der Abszisse nahezu durch den Ursprung verläuft. Dies bedeutet zum einen, dass beide Effekte durch ein und denselben Rezeptor, den

DISKUSSION

P2X₁-Rezeptor, vermittelt werden, und zum anderen deutet es darauf hin, dass dies über denselben Transduktionsweg geschieht. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration induziert den „shape change“ der Thrombozyten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der P2X₁-vermittelte „shape change“ auf die Anwesenheit von extrazellulärem Calcium angewiesen ist (Rolf et al., 2001). Auch lässt sich der „shape change“ durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration verstärken (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Der pEC₅₀-Wert für den αβmeATP-induzierten „shape change“ liegt ungefähr eine halbe Zehnerpotenz höher als der des P2X₁-vermittelten Anstieg an [Ca²⁺]_i. Allerdings muss man bedenken, dass die Calciummessungen in Gegenwart von 2 mM externem Calcium durchgeführt werden, wohingegen bei den „shape-change“-Untersuchungen 10 mM extrazelluläres Calcium zur Verfügung stand. Untersuchungen von Rolf et al. (2001) in Anwesenheit von 1 mM Ca ergaben für αβmeATP einen pEC₅₀- Wert von 6,4 sowohl für die Calciummessung als auch für die „shape change“-Untersuchungen, was dafür spricht, dass bei gleichen Bedingung beide Vorgänge durch eine identische Agonistenkonzentration quantitativ ausgelöst werden.

Im Falle des P2Y₁-Rezeptors ist ebenfalls eine gute Korrelation zwischen pA₂-Werten der Calciummessung und denen der „shape-change“-Untersuchungen zu beobachten. Lineare Regression ergibt eine Gerade (r = 0,98), deren Steigung nicht signifikant von 1 verschieden ist. Dies bedeutet, dass es auch bei den ADP-induzierten Effekte einen direkten Zusammenhang zwischen Blockade der Calciumfreisetzung und der des „shape change“ gibt. Allerdings geht die Regressionsgerade nicht durch den Ursprung, sondern schneidet die Abszisse bei einem Wert von 1,1. Der Grund dafür ist, dass die pA₂-Werte, die beim ADP-induzierten „shape change“ ermittelt wurden, in der Regel etwas höher sind als die für die Calciummessungen errechneten pA₂-Werte. Vergleicht man die pEC₅₀-Werte von ADP für diese beiden Effekte, so stellt man fest, dass sie bei identischen Bedingungen um nahezu eine Zehnerpotenz voneinander abweichen. Außerdem scheinen sich die beiden Vorgänge hinsichtlich ihres Desensibilisierungsverhaltens zu unterscheiden. Für den ADP-induzierten intrazellulären Calciumanstieg konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 5 μM ADP zu keiner Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern führt, wenn die Thrombozyten mit 1 mM ADPβS für eine Stunde inkubiert wurden (Baurand et al., 2000). Dagegen beobachteten Maayani et al. (2003b) eine Desensibilisierung der ADP-induzierten Aggregation,

DISKUSSION

nicht aber des ADP-induzierten „shape change“ in Folge wiederholter Agonistenapplikation im Abstand von 120 Sekunden.

Da eine direkte Korrelation der Ergebnisse von ADP-induzierter Calciummessung und „shape-change“-Untersuchungen gegeben ist, kann man daraus schließen, dass beide Phänomene durch den P2Y₁-Rezeptor vermittelt werden.

Maayani et al. (2003b) vermuteten, dass die verschiedenen Agonistenaktivitäten durch unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege erklärt werden können, die durch ein und denselben G-Protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt werden. Die Aktivierung der unterschiedlichen Transduktionswege benötigt ein unterschiedliches Ausmaß an P2Y₁-Rezeptorbesetzung. Eine größere Rezeptorreserve für den „shape change“ im Vergleich zur Calciumfreisetzung könnte die unterschiedlichen EC₅₀-Werte für ADP erklären. Die ADP-induzierte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern läuft über eine Aktivierung der Phospholipase C und Bildung von IP₃ ab. Es werden 2 Transduktionswege beschrieben, über die der „shape change“ ausgelöst werden kann: Bei einem calciumabhängigen Weg wird über PLC-Aktivierung Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt, welches eine Umbildung des Cytoskelets auslöst. Dies geschieht durch Bildung eines Komplexes mit Calmodulin, der die MLC-Kinase (Myosin-Leichtketten-Kinase) stimuliert. Kürzlich wurde ein calciumunabhängiger Weg entdeckt, bei dem heterotrimere G_{12/13} Proteine involviert sind, die RhoA und Rho-Kinase aktivieren was über eine Hemmung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase zur MLC-Phosphorylierung führt (Bauer et al., 1999; Paul et al., 1999a; Klages et al., 1999). Der ADP-induzierte „shape change“ wird mit einer Aktivierung des Rho/Rho-Kinase Signalwegs in Verbindung gebracht (Bauer et al., 1999; Wilde et al., 2000).

Eine Korrelation der pA₂-Werte des ADP-induzierten „shape change“ mit denen der ADP-vermittelten Aggregation ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

DISKUSSION

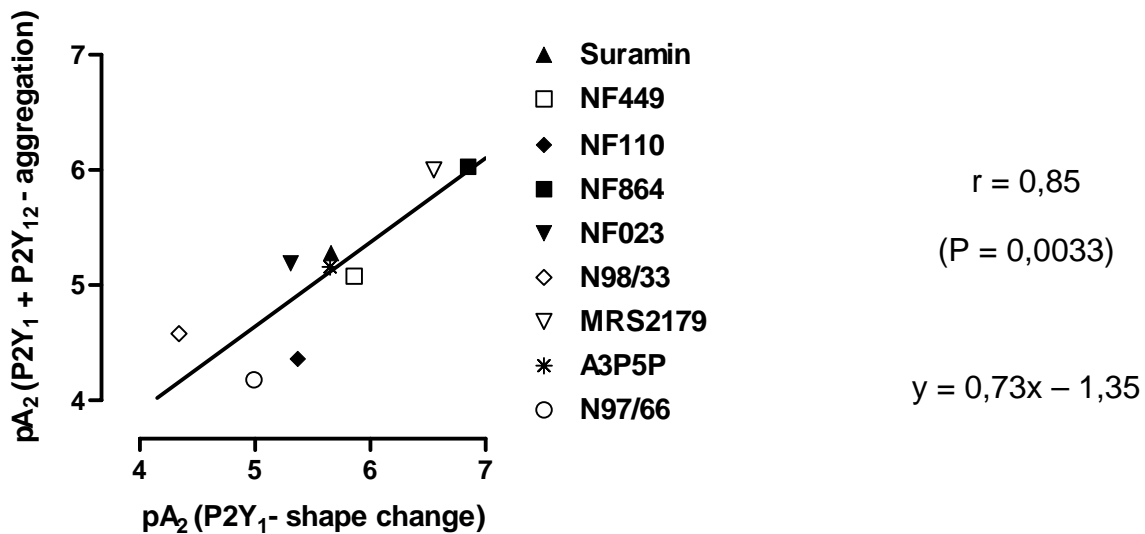


Abbildung 4.10.: Korrelationen zwischen pA_2 -Werten des ADP-induzierten „shape change“ und denen der ADP-induzierten Aggregation. Die Linie stellt die lineare Regression der Korrelation dar.

Die lineare Regression der Wertepaare ergibt eine Gerade ($r = 0,85$), deren Steigung mit 0,73 von 1 verschieden ist und nicht durch den Ursprung verläuft. Mit Ausnahme von NF110 und N97/66 liegen alle Wertepaare recht gut an oder auf der Regressionslinie, so dass man feststellen kann, dass der P2Y₁-Rezeptor einen direkten Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregation ausübt. Mit steigender Wirksamkeit am P2Y₁-Rezeptor werden die Unterschiede zwischen pA_2 -Werten der Aggregation und des „shape change“ größer. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die hier untersuchten Substanzen den P2Y₁-Rezeptor stärker hemmen als den P2Y₁₂-Rezeptor, so dass die Inhibition der Aggregation durch eine P2Y₁₂-Rezeptoraktivierung teilweise überwunden werden kann.

Zusammenfassend kann man sagen, dass „shape-change“-Untersuchungen und Calciummessungen reine P2X₁- bzw. P2Y₁-vermittelte Effekte darstellen, die sich zur Charakterisierung von Antagonisten an diesen Rezeptoren eignen. Der P2Y₁-Rezeptor ist an der ADP-induzierten Aggregation beteiligt, allerdings stimmen die erhaltenen pA_2 -Werte auch bei rein P2Y₁-selektiven Substanzen wie MRS2179 und A3P5P nicht überein. Wie man an den Beispielen von 2-meSAMP und pHMBS, Suramin und MRS2179 sehen kann, lässt sich bei der Aggregationsmessung nicht direkt unterscheiden, ob eine Hemmung des P2Y₁-, des P2Y₁₂- oder beider Rezeptoren vorliegt.

4.6. Korrelationen zwischen Ergebnissen an humanen Thrombozyten und an isolierten Organen

Zwischen dem P2X₁-Rezeptor der Ratte und dem des Menschen besteht eine Sequenzhomologie von 89% (Soto et al., 1997). Wie hoch die Übereinstimmung zwischen P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchens im Vergleich zu dem des Menschen ist, kann nicht gesagt werden, da der Rezeptor aus dem Meerschweinchen noch nicht kloniert wurde.

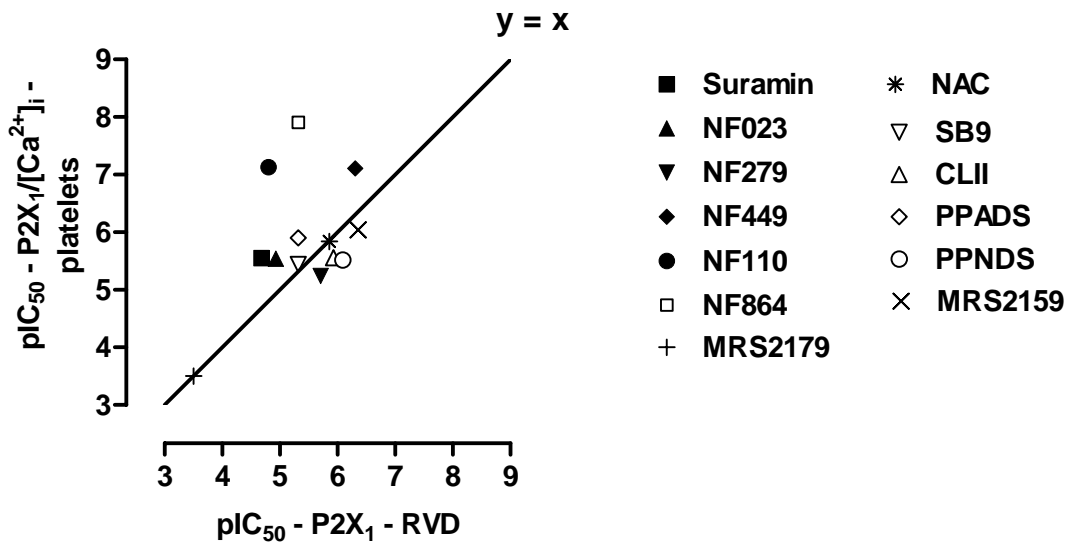
Für den Vergleich zwischen glattmuskulären Organen und humanen Thrombozyten wurden pIC₅₀-Werte von Substanzen verwendet, von denen Werte an beiden Modellen vorhanden waren. Die Agonistenkonzentration lag jeweils im Bereich der EC₅₀. Als Anhaltspunkt für eine äquivalente Wirkstärke wurde die Winkelhalbierende in die Abbildungen eingezeichnet.

Am P2X₁-Rezeptor ist festzustellen, dass es keine klare Korrelation zwischen den humanen Thrombozyten und dem Ratten-Vas-deferens gibt (Abbildung 4.11A). Lineare Regression der Wertepaare führt zu einer Geraden ($r = 0,48$) mit einer Steigung von 0,66. Bei einigen Substanzen, wie z. B. MRS2179, SB9, NAC und CLII ist eine äquipotente Wirkung an den beiden Modellen festzustellen, bei anderen Verbindungen wie NF864 und NF110 sind Abweichungen bis zu 2 Zehnerpotenzen zu erkennen. Es fällt auf, dass die PPADS- und PPNDS-Analoga trotz teilweise unterschiedlichem Wirkmechanismus eine recht gute Übereinstimmung zeigen. So verhält sich SB9 am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens als kompetitiver Antagonist, wohingegen am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten ein nichtkompetitiver Antagonismus zu beobachten ist. Trotzdem stimmen die Hemmwerte überein. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei NAC und MRS2159, wobei der Mechanismus von NAC am Ratten-Vas-deferens allerdings auch nicht rein kompetitiv zu sein scheint.

Größere Abweichungen der Inhibitionswerte sind hingegen bei den Suraminanaloga festzustellen. Besonders auffällig sind die Divergenzen bei den tetravalenten Schmetterlingsverbindungen NF449, NF110 und NF864, die alle am Vas deferens der Ratte schwächer antagonistisch wirken als an den Thrombozyten.

DISKUSSION

A



B

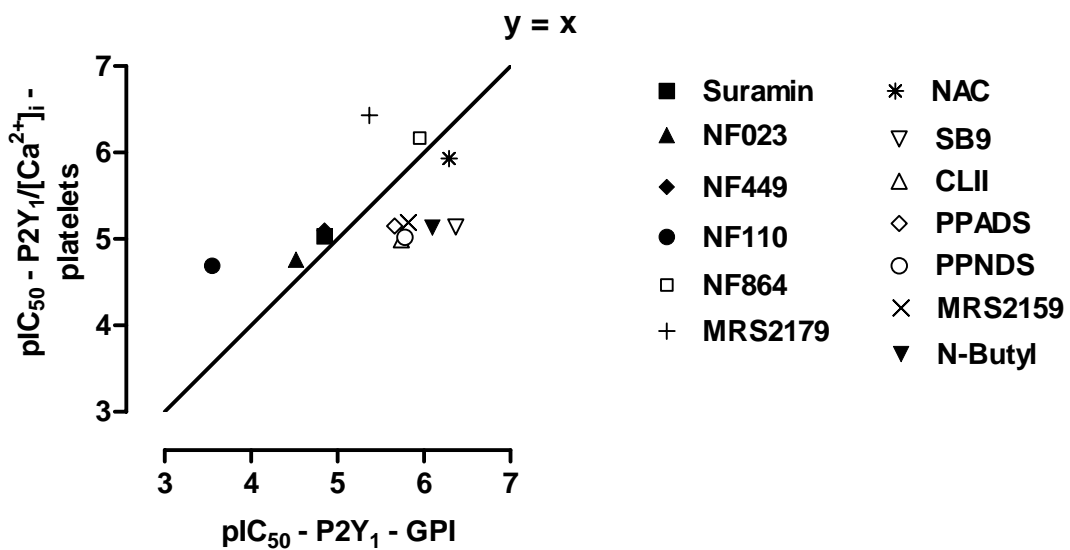


Abbildung 4.11: Vergleich der pIC_{50} -Werte von Antagonisten an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe mit denen an humanen Thrombozyten. Die eingezeichnete Linie stellt die Winkelhalbierende dar. **(A)** Abszisse: pIC_{50} -Werte am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (RVD), Agonist: 10 μ M $\alpha\beta$ meATP. Ordinate: pIC_{50} -Werte am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten, Calciummessung, Agonist: 1 μ M $\alpha\beta$ meATP. **(B)** Abszisse: pIC_{50} -Werte am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (GPI), Agonist: 10 μ M ADP β S. Ordinate: pIC_{50} -Werte am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten, Calciummessung, Agonist: 1 μ M ADP. Daten für NF023, NF279, NF449, NF110 und NF864 am P2X₁-Rezeptor des RVD, für Suramin, NF279, NF449, MRS2179, PPADS, PPNDS und MRS2159 am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten, für NF023, NF449, NF110, NF864, MRS2179, PPADS und PPNDS am P2Y₁-Rezeptor des GPI sowie für NF449 am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten aus Kassack et al., 2004; Czeche, 2001; Damer, 2002; Menke, 2003; Ganso, 2004 und persönliche Mitteilung Prof. Lambrecht.

DISKUSSION

Wie am P2X₁-Rezeptor ist auch am P2Y₁-Rezeptor keine Korrelation zwischen den Werten am glattmuskulärem Organ und Thrombozyten festzustellen (Abbildung 4.11B). Auch hier erweisen sich einige Substanzen als äquipotent an den beiden Modellen wie z. B. Suramin, NF023, NF449 und NF864, bei anderen Substanzen, wie z. B. bei SB9 und NF110 sind jedoch deutliche Diskrepanzen festzustellen.

Zeigten sich die Antagonisten meist am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten stärker wirksam als am Vas deferens der Ratte, so ist ein solches Muster bei dem P2Y₁-Rezeptor nicht zu beobachten. Einige Substanzen, wie NF110 und MRS2179 sind an humanen Thrombozyten wesentlich stärker wirksam, andere Verbindungen dagegen wie N-Butyl und SB9 hemmen den P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum deutlich potenter.

Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Strukturvariationen sich am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wesentlich weniger bemerkbar zu machen scheinen als an dem des Meerschweinchen-Ileum. Mit Ausnahme von MRS2179, NF864 und NAC wurde für alle Suramin- und PPADS-Analoga ein pIC₅₀-Wert um 5 ermittelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es deutliche Unterschiede zwischen P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe und denen humaner Thrombozyten gibt, wobei kein chemisch-strukturelles System zu erkennen ist. Man kann keine Rückschlüsse von dem einen Modell auf das andere ziehen. Die Antagonisten unterscheiden sich an den verschiedenen Systemen hinsichtlich Wirkstärke und Wirkmechanismus.

Gründe für die Diskrepanzen zwischen glattmuskulären Organen und humanen Thrombozyten könnten die nicht hundertprozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der Rezeptoren bei den verschiedenen Spezies sein. Eventuell gibt es Abweichungen der Aminosäuren an der Bindungsstelle für Antagonisten. Speziesunterschiede bei P2-Rezeptoren sind zum Beispiel beim P2X₄-Rezeptor bekannt. Der humane P2X₄-Rezeptor und der der Ratte zeigen eine Sequenzübereinstimmung von 87%, die vergleichbar ist mit der am P2X₁-Rezeptor. Hier ist bekannt, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich der inhibitorischen Wirkung von Antagonisten gibt (Soto et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass der P2Y₁-Rezeptor auf Thrombozyten in oligomerisierter Form vorkommt (Wang et al., 2003), was eventuell einen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors haben könnte.

DISKUSSION

Weitere Ursachen könnten Abweichungen in der Glykosylierung der Rezeptoren oder unterschiedliche unspezifische Membraneffekte in glattmuskulären Organen und in humanen Thrombozyten sein.

4.7. Korrelationen zwischen Ergebnissen an nativen und rekombinanten Rezeptoren

Der P2X₁-Rezeptor auf humanen Thrombozyten zeigt eine hundertprozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit der des P2X₁-Rezeptors auf der menschlichen Blase (Valera et al., 1995; Scase et al., 1998) und der von P2X₁-Rezeptoren auf B-Lymphozyten, die häufig zur Herstellung von rekombinanten humanen P2X₁-Rezeptoren verwendet werden (Klapperstück et al., 2000).

Der Ratten-P2X₁-Rezeptor zeigt eine 89%ige Identität in der Aminosäuresequenz im Vergleich zum humanen P2X₁-Rezeptor, und beide rekombinanten Spezieshomologe besitzen gegenüber Agonisten und Antagonisten in heterologen Expressionssystemen weitgehend identische pharmakologische Eigenschaften (Tabelle 4.6; Valera et al., 1994; Evans et al., 1995; Soto et al., 1997; Klapperstück et al., 2000; Rettinger et al., 2000; Jacobson et al., 2002). Vergleicht man die Inhibitionswerte verschiedener Antagonisten, die in elektrophysiologischen Experimenten an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren bzw. bei Calciummessungen an nativen P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten erhalten wurden, so ergibt sich das in Abbildung 4.12A dargestellte Bild. Einige Substanzen, wie Suramin, NF864 und NF110, zeigen in beiden Modellen identische inhibitorische Eigenschaften. Bei anderen Verbindungen, wie MRS2179, NF279, PPNDS, MRS2159 und NF449, dagegen sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der antagonistischen Wirkstärke an den beiden Modellen zu erkennen. Diese Antagonisten zeigen alle eine wesentlich höhere Affinität zum rekombinanten P2X₁-Rezeptor als zu dem der Thrombozyten. Erstaunlich ist vor allem das abweichende Verhalten von NF449 im Vergleich zu den anderen beiden tetravalenten Suraminanaloga. NF449 unterscheidet sich von NF110 lediglich durch jeweils eine Sulfonsäuregruppe an den Phenylresten. NF449 zeigt am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten im Vergleich zum humanen rekombinanten P2X₁-Rezeptor 1445-fach und zu dem der Ratte 280-fach niedrigere Inhibitionswerte, wohingegen NF110 am P2X₁-Rezeptor der Thrombozyten eine vergleichbare Wirkstärke wie am rekombinanten P2X₁-Rezeptor aufweist. Die Sulfonsäuregruppe in 1-Position des Phenylrings scheint eine große Rolle bei der inhibitorischen Wirkung an den rekombinanten Rezeptoren zu spielen, nicht aber an den nativen Rezeptoren. Somit zeigen rekombinante und native Rezeptoren des Menschen trotz

DISKUSSION

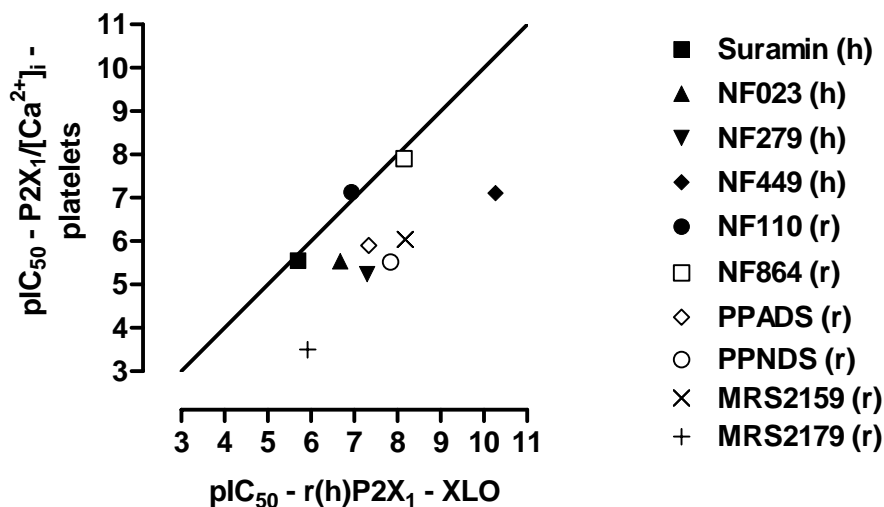
übereinstimmender Aminosäuresequenz unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. Da es sich bei Thrombozyten um isolierte Zellen handelt, kann eine Diffusionsbehinderung der Antagonisten in das Rezeptorkompartiment ausgeschlossen werden. Möglich wären unspezifische Membraneffekte, die sich bei Thrombozyten und Oozyten unterscheiden.

Suramin und verschiedene andere Antagonisten zeigen eine hohe Proteinbindung. Es könnte daher sein, dass bei den verschiedenen Modellen unterschiedliche Proteinmengen vorhanden sind, die durch unspezifische Bindung der Substanzen die Ergebnisse verfälschen. Allerdings wurde gezeigt, dass die Proteinbindung mit steigender Anzahl der Sulfonsäuregruppen bei polysulfatierten Verbindungen zunehmen kann (Tsopelas und Sutton, 2002). NF110 und Suramin besitzen 4 bzw. 6 Sulfonsäurereste, zeigen aber keine Unterschiede zwischen nativen und rekombinanten Rezeptoren. Dagegen sind bei MRS2179 und MRS2159, die keine Sulfonsäuregruppen tragen, deutliche Unterschiede zwischen den beiden Modellen festzustellen. Außerdem verhält sich NF449 als rein kompetitiver Antagonist am P2X₁-Rezeptor von Thrombozyten, was einen Einfluss durch Proteinbindung in diesem Modell unwahrscheinlich macht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass deutliche Unterschiede hinsichtlich des pharmakologischen Verhaltens gegenüber Antagonisten zwischen den P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten und rekombinanten P2X₁-Rezeptoren vorhanden sind. Eine befriedigende Erklärung hierfür gibt es bis heute nicht.

DISKUSSION

A



B

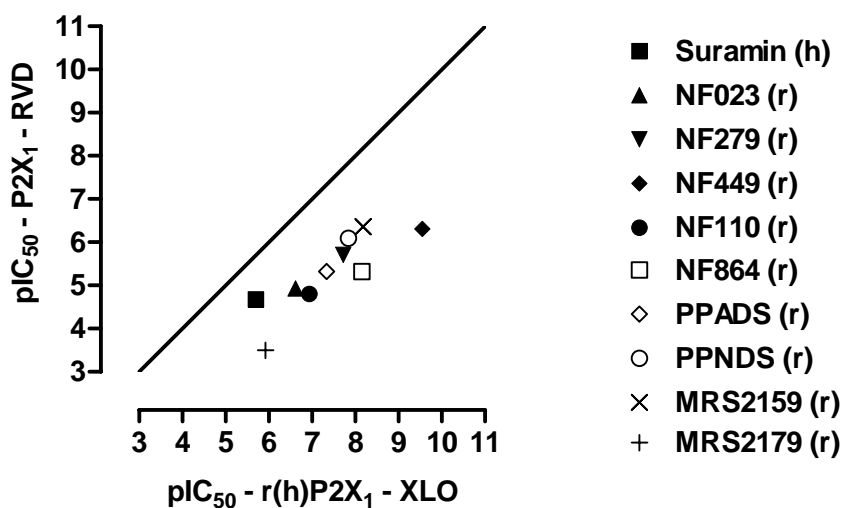


Abbildung 4.12 : Vergleich der pIC_{50} -Werte von Antagonisten an nativen P2-Rezeptoren mit denen an rekombinanten Rezeptoren. Die eingezeichnete Linie stellt die Winkelhalbierende dar. **(A)** Abszisse: pIC_{50} -Werte am rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptor des Menschen (h) oder der Ratte (r) exprimiert in *Xenopus*-Oozyten (XLO). Ordinate: pIC_{50} -Werte am $P2X_1$ -Rezeptor humaner Thrombozyten, Calciummessung, Agonist: $1 \mu M$ $\alpha\beta meATP$. **(B)** Abszisse: pIC_{50} -Werte am rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptor des Menschen (h) oder der Ratte (r) exprimiert in *Xenopus*-Oozyten (XLO). Ordinate: pIC_{50} -Werte am $P2X_1$ -Rezeptor des Ratten-Vas-deferens, Agonist: $10 \mu M$ $\alpha\beta meATP$. Daten für die Antagonisten an den rekombinanten Rezeptoren, für Suramin, NF279, NF449, PPADS, PPNDS, MRS2159 und MRS2179 am $P2X_1$ -Rezeptor humaner Thrombozyten, sowie für NF023, NF279, NF449, NF110 und NF864 am $P2X_1$ -Rezeptor des RVD aus Rettinger et al., 2000; Kassack et al., 2004; Damer, 2002; Menke, 2003; Ganso, 2004 und persönliche Mitteilung Prof. Lambrecht.

Vergleicht man die Hemmwerte der Antagonisten, die an rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptoren ermittelt wurden, mit denen des $P2X_1$ -Rezeptors am Ratten-Vas-deferens, so stellt man fest, dass alle Antagonisten am rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptor eine höhere Wirkstärke aufweisen (Abbildung 4.12B). Dass unspezifische

DISKUSSION

Bindung oder Diffusionsbarrieren durch das Gewebe die Ursache dafür sein könnte, wurde von K. Menke im Rahmen ihrer Dissertation ausgeschlossen (Menke, 2003). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die $\alpha\beta$ meATP-induzierte Kontraktion im Vas deferens der Ratte nicht durch einen homomeren P2X₁-Rezeptor, sondern durch ein P2X_{1/2}-Heteromer vermittelt wird. Gestützt wird diese Hypothese durch folgende Befunde. Lee et al. (2000) konnten mit Hilfe von subtypspezifischen Antikörpern sowohl die P2X₁- als auch die P2X₂-Untereinheit in der glatten Muskulatur des Ratten-Vas-deferens nachweisen. Darüber hinaus gelang es Brown et al. (2002) und Aschrafi et al. (2004) zu zeigen, dass die P2X₁- und P2X₂-Untereinheiten tatsächlich in der Lage sind, funktionelle heteromere P2X_{1/2}-Rezeptoren zu bilden. Endgültige Klarheit in diesem Bereich müssen aber zukünftige Untersuchungen bringen.

Diese Zusammenstellung (Abbildung 4.12) zeigt, dass Struktur-Wirkungs-Beziehungen von P2X₁-Antagonisten innerhalb eines Modells möglich sind. Rückschlüsse auf antagonistische Potenzen von Verbindungen zwischen nativen P2X₁-Rezeptoren unterschiedlicher Spezies sowie zwischen nativen und rekombinanten P2X₁-Rezeptoren einer Spezies müssen nach dem heutigen Kenntnisstand mit Vorsicht betrachtet werden.

DISKUSSION

5. Zusammenfassung

5.1. Ziel der Arbeit

Eine große Herausforderung auf dem Forschungsgebiet der P2-Rezeptoren stellt die Entwicklung von potenten und selektiven Antagonisten für die einzelnen Rezeptorsubtypen dar, um die P2-Rezeptoren in nativen Geweben zu identifizieren und ihre physiologische und pathophysiologische Funktion aufzuklären. Obwohl in den letzten Jahren eine Reihe von P2-Antagonisten entwickelt wurden, sind viele dieser Substanzen aufgrund ihrer Kinetik, Rezeptoraffinität, Subtypselektivität oder P2-Spezifität nicht ideal. Außerdem bleibt die Frage der Übertragbarkeit pharmakologischer Eigenschaften von Antagonisten, die an rekombinanten Rezeptoren ermittelt wurden, auf native Rezeptoren weiterhin offen.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, potente und subtypselektive P2-Antagonisten zu entwickeln und zum anderen die pharmakologischen Befunde, die an glattmuskulären Organen von Versuchstieren sowie an humanen Thrombozyten ermittelt wurden, mit Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren zu vergleichen und somit Aussagen über P2-Rezeptoren verschiedener Spezies sowie nativer und rekombinanter P2-Rezeptoren treffen zu können. Vor diesem Hintergrund werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Beitrag der Grundlagenforschung betrachtet, mit dem Fernziel der Entwicklung von neuartigen Arzneistoffen, die bei Störungen der Nukleotid-Signaltransmission beim Menschen als Therapeutika eingesetzt werden können.

5.2. Methodenetablierung und Untersuchung von Standardantagonisten an humanen Thrombozyten

Mit Hilfe der P2Y₁- und P2Y₁₂-Standardantagonisten MRS2179, A3P5P und 2-meSAMP sowie mit pHMBS konnte gezeigt werden, dass bei der ADP-induzierten Aggregationsmessung nicht zwischen P2Y₁- und P2Y₁₂-Hemmung unterschieden werden kann, und dass somit keine isolierte Betrachtung der P2Y₁-induzierten Aggregation unter diesen Versuchsbedingungen möglich ist. Dagegen handelt es sich bei dem ADP-induzierten „shape change“ um einen reinen P2Y₁-Effekt, bei dem der P2Y₁₂-Rezeptor nicht beteiligt ist und der somit neben der Messung des ADP-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration zur pharmakologischen Charakterisierung von Antagonisten am P2Y₁-Rezeptor der Thrombozyten geeignet

ist. Analog dazu bieten $\alpha\beta$ meATP-induzierter „shape change“ und $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg die Gelegenheit für isolierte Betrachtungen an P2X₁-Rezeptoren.

Untersuchungen an der Kartoffelapyrase haben gezeigt, dass die Antagonisten dieses Enzym kaum hemmen und somit die Ergebnisse nicht durch Desensibilisierung verfälscht werden.

5.3. Untersuchungen zu MRS2179 an isolierten Organen

Der Antagonismus von MRS2179 an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren konnte am nativen P2X₁-Rezeptor der Ratte nicht bestätigt werden, da sich die Substanz hier als vollkommen wirkungslos erwies. Ein enzymatischer Abbau von MRS2179 durch Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens erscheint sehr unwahrscheinlich, da der P2Y₁-Antagonismus erhalten bleibt. Am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum zeigt sich MRS2179 als reversibler Antagonist mit „fast-on-fast-off“-Kinetik.

5.4. PPADS- und PPNDS-Analoga

Bei den PPADS- und PPNDS-Analoga handelt es sich um potente Antagonisten an P2-Rezeptoren glattmuskulärer Organe mit unterschiedlichem Selektivitätsprofil. Ausgehend von PPADS können durch Strukturvariationen des Restes am Pyridoxalphosphat sowohl P2X₁- wie auch P2Y₁-selektive Antagonisten entwickelt werden. Bei CLII und PPNDS ist die größte P2X₁- versus P2Y₁-Selektivität festzustellen, wohingegen SB9 eine P2Y₁- versus P2X₁-Präferenz aufweist. Eine Reduktion der polaren Gruppen in Relation zur Molekülgröße scheint vorteilhaft für die P2X₃-antagonistische Wirkung zu sein. Allerdings lässt sich keine endgültige Aussage darüber treffen, welche Strukturen für die Wirkstärke und Selektivität an den einzelnen Rezeptoren verantwortlich sind, da unterschiedliche Strukturmodifikationen zu ähnlichen Rezeptorprofilen führen. Die PPADS- und PPNDS-Analoga unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kinetik und des antagonistischen Mechanismus. PPADS, PPNDS und CLII zeigen am P2X₁-Rezeptor des Ratten-Vas-deferens einen nicht überwindbaren, „pseudoirreversiblen“ Antagonismus. Bei NAC handelt es sich um einen nichtkompetitiven Antagonisten, was sich durch die große Steigung der Schild-Regression bemerkbar macht, wohingegen es sich bei MRS2159 und SB9 um kompetitive Antagonisten des P2X₁-Rezeptors im Ratten-Vas-deferens handelt. PPADS zeigt auch am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum einen

ZUSAMMENFASSUNG

„pseudoirreversiblen“ Antagonismus, wohingegen PPNDS, SB9 und NAC kompetitive Antagonisten an diesem Modell sind.

An den P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten zeichnen sich alle untersuchten PPADS- und PPNDS-Analoga durch einen extrem steilen Verlauf der Inhibitionskurven aus, der nicht durch optische Interferenzen der Substanzen mit der Fluoreszenzmessung erklärt werden kann. Im Gegensatz zu den glattmuskulären Organen wurden für die PPADS- und PPNDS-Analoga durchweg nichtkompetitive Wirkmechanismen ermittelt. Man kann die Substanzen am P2X₁-Rezeptor in 2 Gruppen unterteilen: PPADS, MRS2159 und NAC weisen einen IC₅₀-Wert um 1 µM auf, wohingegen für CLII, PPNDS, N-Butyl und SB9 ein IC₅₀-Wert um 3 µM ermittelt wurde. Am P2Y₁-Rezeptor zeigen alle Substanzen, mit Ausnahme von NAC einen IC₅₀-Wert um 10 µM. Grundsätzlich fällt auf, dass alle Verbindungen ein sehr ähnliches Verhalten an den Rezeptoren aufweisen. Die Strukturmodifikationen haben einen wesentlich geringeren Einfluss auf das antagonistische Verhalten als an den Rezeptoren glattmuskulärer Organe.

5.5. Suraminanaloga

Da sich bestimmte Suraminanaloga in der Vergangenheit als potente und selektive P2-Antagonisten an glattmuskulären Organen und an rekombinanten P2-Rezeptoren erwiesen, wurden sie hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung an P2-Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht.

Es zeigte sich, dass die tetravalenten Verbindungen NF449, NF110 und NF864 eine wesentlich höhere Affinität zum P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten aufweisen als ihre bivalenten Analoga. Im Gegensatz zu Befunden am Ratten-Vas-deferens machte sich der Wegfall der Sulfonsäuregruppe in 1-Position am Phenylrest von NF449 (→ NF110) nicht in einer Abschwächung der P2X₁-antagonistischen Wirkung bemerkbar, da sich NF449 und NF110 als äquipotent am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten erwiesen. NF864 mit dem Naphthalinringsystem zeigte die stärkste inhibitorische Wirkung am P2X₁-Rezeptor mit einem pA₂-Wert von 8,4.

Die Schild-Analyse ergab für NF864, NF449 sowie für die bivalenten Vorstufen NF023, N98/33 und N97/66 einen kompetitiven Antagonismus am P2X₁-Rezeptor humaner Thrombozyten.

Mit Ausnahme von Suramin handelt es sich bei den untersuchten Verbindungen um P2X₁-selektive Antagonisten, wobei die Selektivität unabhängig von der

inhibitorischen Wirkstärke ist. Es wurden Selektivitätsfaktoren von 6 bis 71 für die P2X₁- versus P2Y₁-Selektivität ermittelt, wobei das tetravalente NF110 die größte Selektivität aufweist.

Am P2Y₁-Rezeptor humaner Thrombozyten wirken Suramin, NF023, NF449 und NF110 nahezu äquipotent. N97/66 und N98/33 sind sehr schwache Antagonisten und wie schon am Meerschweinchen-Ileum erwies sich NF864 als der stärkste Inhibitor. Die Auswertung der Schild-Analyse ergab für Suramin, NF023, NF449, NF110 und NF864 einen kompetitiven Antagonismus. Von N97/66 und N98/33 konnte aufgrund des schwachen Antagonismus keine Schild-Regression durchgeführt werden.

Untersuchungen der ADP-vermittelten Aggregation waren in guter Übereinstimmung zu Ergebnissen des P2Y₁-vermittelten „shape change“. Allerdings fielen die pA₂-Werte um ca. eine halbe Zehnerpotenz niedriger aus, was der zusätzlichen Beteiligung des P2Y₁₂-Rezeptors an der ADP-induzierten Aggregation zugeschrieben werden kann.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es möglich ist, ausgehend von einer schwach wirksamen, unselektiven Muttersubstanz, wie Suramin, durch Strukturmodifikationen potente und selektive Antagonisten für die P2X₁-Rezeptoren zu entwickeln. Bei der Substanz NF864 handelt es sich um den derzeit potentesten P2X₁-selektiven Antagonisten humaner Thrombozyten. Somit sollte sich NF864 zur Untersuchung der Beteiligung des P2X₁-Rezeptors an der Hämostase als nützlich erweisen.

5.6. Korrelationen zwischen Anstieg an [Ca²⁺]_i, „shape change“ und Aggregation in humanen Thrombozyten

Eine Korrelation der pA₂-Werte des αβmeATP-vermittelten „shape change“ mit denen des αβmeATP-induzierten Calciumeinstroms ergibt eine lineare Regressionsgerade, deren Steigung nicht signifikant von 1 verschieden ist und die durch den Ursprung verläuft, woraus geschlossen werden kann, dass beide Vorgänge allein durch den P2X₁-Rezeptor vermittelt werden und wahrscheinlich über den gleichen Transduktionsweg ablaufen. Dies bedeutet, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration den „shape change“ induziert.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei ADP-vermitteltem „shape change“ und Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist ebenfalls eine gute Korrelation der pA_2 -Werte festzustellen. Die Steigung der Regressionsgeraden ist wiederum nicht signifikant von 1 verschieden, allerdings verläuft sie nicht durch den Ursprung. Dies spricht dafür, dass beide Vorgänge ausschließlich über den $P2Y_1$ -Rezeptor vermittelt werden, allerdings eventuell über unterschiedliche Transduktionswege, worauf auch die abweichenden pEC_{50} -Werte von ADP für die beiden Vorgänge hinweisen.

Im Falle einer Korrelation der pA_2 -Werte des ADP-induzierten „shape change“ mit denen der Aggregationsmessungen erhält man ebenfalls eine lineare Regressionsgerade, die nicht durch den Ursprung verläuft und die eine Steigung von 0,65 aufweist. Der Grund dafür ist, dass die untersuchten Substanzen den $P2Y_1$ -Rezeptor stärker hemmen als den $P2Y_{12}$ -Rezeptor, so dass die Inhibition der Aggregation durch eine $P2Y_{12}$ -Rezeptoraktivierung teilweise überwunden werden kann.

5.7. Korrelationen zwischen Ergebnissen an humanen Thrombozyten und an isolierten Organen

Am $P2X_1$ -Rezeptor ist festzustellen, dass es keine klare Korrelation zwischen humanen Thrombozyten und dem Ratten-Vas-deferens gibt. Bei einigen Substanzen wie z.B. MRS2179, SB9, NAC und CLII ist eine äquipotente Wirkung an beiden Rezeptoren festzustellen, bei anderen Verbindungen wie NF864 und NF110 sind jedoch Abweichungen bis zu zwei Zehnerpotenzen zu erkennen. Auch der Mechanismus der Antagonisten stimmt nicht in allen Fällen überein. So sind SB9 und MRS2159 kompetitive Antagonisten am Ratten-Vas-deferens, wohingegen am $P2X_1$ -Rezeptor der humanen Thrombozyten ein nichtkompetitiver Antagonismus festzustellen ist.

Wie am $P2X_1$ -Rezeptor ist auch am $P2Y_1$ -Rezeptor keine Korrelation zwischen glattmuskulären Organen und humanen Thrombozyten zu erkennen. Auch hier erweisen sich einige Substanzen wie Suramin, NF023, NF449 und NF864 als äquipotent an beiden Modellen, bei anderen wie z.B. SB9 und NF110 sind deutliche Differenzen festzustellen. Zusätzlich gibt es teilweise Unterschiede beim Inhibitionsmechanismus. So verhalten sich NF449 und MRS2179 als kompetitive Antagonisten an humanen Thrombozyten, wohingegen sie den $P2Y_1$ -Rezeptor des

Meerschweinchen-Ileum nichtkompetitiv hemmen. Bei SB9 ist ein umgekehrtes Bild zu beobachten.

Gründe für das unterschiedliche Verhalten der Antagonisten könnten die nicht 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der Rezeptoren, Unterschiede bei der Glykosylierung oder unspezifische Membraneffekte bei den verschiedenen Spezies sein.

5.8. Korrelationen zwischen Ergebnissen an nativen und rekombinanten Rezeptoren

Trotz einer weitgehenden Übereinstimmung in der Pharmakologie zwischen rekombinanten P2X₁-Rezeptoren der Ratte und des Menschen sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Inhibitionsstärke der Antagonisten an nativen und rekombinanten P2X₁-Rezeptoren festzustellen. Wiederum sind bei einigen Substanzen wie Suramin, NF110 und NF864 identische inhibitorische Eigenschaften an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren und denen humaner Thrombozyten zu beobachten, wohingegen bei anderen Verbindungen wie MRS2179, NF279, PPNDS, MRS2159 und NF449 deutliche Unterschiede zu erkennen sind. Diese Substanzen weisen alle zum rekombinanten Rezeptor eine wesentlich höhere Affinität als zum nativen Rezeptor auf. Erstaunlich sind vor allem die Abweichungen zwischen NF449 und NF110, die sich lediglich durch jeweils eine Sulfonsäuregruppe an den Phenylresten unterscheiden. Bei NF449 sind zwischen P2X₁-Rezeptoren humaner Thrombozyten und rekombinanten P2X₁-Rezeptoren Unterschiede von ca. 3 Zehnerpotenzen vorhanden, wohingegen NF110 an beiden Modellen vergleichbare inhibitorische Eigenschaften aufweist.

Ein Vergleich der Inhibitionswerte der Antagonisten an P2X₁-Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens mit rekombinanten Rezeptoren zeigt eine wesentlich höhere Affinität der Substanzen zu den rekombinanten Rezeptoren. Dass unspezifische Bindung oder Diffusionsbarrieren durch das Gewebe die Ursache dafür sein könnten, wurde in der Vergangenheit ausgeschlossen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Struktur-Wirkungs-Beziehungen von P2X₁-Antagonisten scheinbar nur innerhalb eines Modells möglich sind. Interpretation auf antagonistische Potenzen von Verbindungen zwischen nativen P2X₁-Rezeptoren unterschiedlicher Spezies sowie zwischen nativen und

ZUSAMMENFASSUNG

rekombinanten P2X₁-Rezeptoren einer Spezies müssen nach dem heutigen Stand der Wissenschaft mit Vorsicht betrachtet werden.

6. Literaturverzeichnis

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. und Burnstock, G.** (2003) Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 52-55.
- Arunlakshana, O. und Schild, H. O.** (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14: 48-58.
- Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J. und Schmalzing, G.** (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X₂ and heteromeric P2X₁₊₂ receptor subtypes. *J. Mol. Biol.* 342: 333-343.
- Barnard, E. A. und Simon, J.** (2001) An elusive receptor is finally caught: P2Y₁₂, an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 388-391.
- Barnard, E. A., Simon, J., Tsim, K. W. K., Filippov, A. K. und Brown, D. A.** (2003) Signalling pathways and ion channel regulations of P2Y receptors. *Drug Dev. Res.* 59: 36-48.
- Bauer, M., Retzer, M., Wilde, J. I., Maschberger, P., Essler, M., Aepfelbacher, M., Watson, S. P. und Siess, W.** (1999) Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 94: 1665-1672.
- Baurand, A., Eckly, A., Bari, N., Leon, C., Hechler, B., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (2000) Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y₁ and P2_{cyc} receptors. *Thromb. Haemost.* 84: 484-491.
- Baurand, A., Raboisson, P., Freund, M., Leon, C., Cazenave, J. P., Bourguignon, J. J. und Gachet, C.** (2001) Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y₁ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 412: 213-221.
- Baurand, A., Eckly, A., Hechler, B., Kauffenstein, G., Galzi, J. L., Cazenave, J. P., Leon, C. und Gachet, C.** (2004) Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors following activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? *Mol. Pharmacol.* (Elektronische Publikation; PMID: 15602005).
- Bergamini, C. und Grazi, E.** (1980) Human platelets 5'-nucleotidase: a cell membrane ectoenzyme with a possible regulatory role in the aggregation reaction. *Ital. J. Biochem.* 29: 273-288.
- Bigonnesse, F., Levesque, S. A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S. C., Fernandes, M. J. und Sevigny, J.** (2004) Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43: 5511-5519.
- Birk, A. V., Broekman, M. J., Gladek, E. M., Robertson, H. D., Drosopoulos, J. H. F., Marcus, A. J. und Szeto, H. H.** (2002) Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J. Lab. Clin. Medicine* 140: 166-175.
- Bodor, E. T., Waldo, G. L., Hooks, S. B., Corbitt, J., Boyer, J. L. und Harden, T. K.** (2003) Purification and functional reconstitution of the human P2Y₁₂ receptor. *Mol. Pharmacol.* 64: 1210-1216.
- Born, G. V.** (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nauchni. Tr. Vissh. Med. Inst. Sofia* 194: 927-929.

LITERATURVERZEICHNIS

- Born, G. V. und Kratzer, M. A.** (1984) Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. *J. Physiol* 354: 419-429.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V. und Seguela, P.** (2000) A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. *J. Biol. Chem.* 275: 10190-10195.
- Boyer, J. L., Romero-Avila, T., Schachter, J. B. und Harden, T. K.** (1996) Identification of competitive antagonists of the P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* 50: 1323-1329.
- Boyer, J. L., Mohanram, A., Camaioni, E., Jacobson, K. A. und Harden, T. K.** (1998) Competitive and selective antagonism of P2Y₁ receptors by N⁶-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1-3.
- Boyer, J. L., Adams, M., Ravi, R. G., Jacobson, K. A. und Harden, T. K.** (2002) 2-Chloro N⁶-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y₁ receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 135: 2004-2010.
- Brambilla, R., Burnstock, G., Bonazzi, A., Ceruti, S., Cattabeni, F. und Abbracchio, M. P.** (1999) Cyclo-oxygenase-2 mediates P2Y receptor-induced reactive astrogliosis. *Br. J. Pharmacol.* 126: 563-567.
- Braun, K., Rettinger, J., Ganso, M., Kassack, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G. und Lambrecht, G.** (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364: 285-290.
- Brown, S. G., King, B. F., Kim Y. C., Jang S. Y., Burnstock, G. und Jacobson, K. A.** (2000) Activity of novel adenine nucleotide derivatives as agonists and antagonists at recombinant rat P2X receptors. *Drug Dev. Res.* 49: 253-259.
- Brown, S. G., Kim Y-C., Kim S.A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. und King, B. F.** (2001) Actions of a series of PPADS analogs at P2X₁ and P2X₃ receptors. *Drug Dev. Res.* 53: 281-291.
- Brown, S. G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. und King, B. F.** (2002). Heteromultimeric P2X_{1/2} receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300: 673-680.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A. und Surprenant, A.** (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15: 55-62.
- Burgard, E. C., Niforatos, W., Van Biesen, T., Lynch, K. J., Touma, E., Metzger, R. E., Kowaluk, E. A. und Jarvis, M. F.** (1999) P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurophysiol.* 82: 1590-1598.
- Burnstock, G.** (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509-581.
- Burnstock, G.** (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones* Raven Press; New York.107-118.
- Burnstock, G. und Kennedy, C.** (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 16: 433-440.

LITERATURVERZEICHNIS

- Carpenter, D., Meadows, H. J., Brough, S., Chapman, G., Clarke, C., Coldwell, M., Davis, R., Harrison, D., Meakin, J., McHale, M., Rice, S. Q., Tomlinson, W. J., Wood, M. und Sanger, G. J.** (1999) Site-specific splice variation of the human P2X₄ receptor. *Neurosci. Lett.* 273: 183-186.
- Castelucci, P., Robbins, H. L., Poole, D. P. und Furness, J. B.** (2002) The distribution of purine P2X₂ receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem. Cell Biol.* 117: 415-422.
- Cattaneo, M., Lecchi, A., Randi, A. M., McGregor, J. L. und Mannucci, P. M.** (1992) Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood* 80: 2787-2796.
- Cheng, Y. und Prusoff, W. H.** (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
- Chijioke, C. P., Umeh, R. E., Mbah, A. U., Nwonu, P., Fleckenstein, L. L. und Okonkwo, P. O.** (1998) Clinical pharmacokinetics of suramin in patients with onchocerciasis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54: 249-251.
- Clifford, E. E., Parker, K., Humphreys, B. D., Kertesy, S. B. und Dubyak, G. R.** (1998) The P2X₁ receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes. *Blood* 91: 3172-3181.
- Cockayne, D. A., Hamilton, S. G., Zhu, Q. M., Dunn, P. M., Zhong, Y., Novakovic, S., Malmberg, A. B., Cain, G., Berson, A., Kassotakis, L., Hedley, L., Lachnit, W. G., Burnstock, G., McMahon, S. B. und Ford, A. P.** (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. *Nature* 407: 1011-1015.
- Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. und Boeynaems, J. M.** (1997) Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 272: 31969-31973.
- Cook, S. P., Rodland, K. D. und McCleskey, E. W.** (1998) A memory for extracellular Ca²⁺ by speeding recovery of P2X receptors from desensitization. *J. Neurosci.* 18: 9238-9244.
- Czeche, S.** (2001) Pharmacological investigations on muscarinic and P2 receptor subtypes. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.*
- Damer, S.** (2002) Pharmacological evaluation of NF279 as a P2 receptor antagonist. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.*
- Damer, S., Niebel, B., Czeche, S., Nickel, P., Ardanuy, U., Schmalzing, G., Rettinger, J., Mutschler, E. und Lambrecht, G.** (1998) NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 350: R5-R6.
- Dangelmaier, C., Jin, J., Smith, J. B. und Kunapuli, S. P.** (2001) Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by G_i signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb. Haemost.* 85: 341-348.
- Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J. B. und Kunapuli, S. P.** (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J. Biol. Chem.* 273: 2024-2029.

LITERATURVERZEICHNIS

- Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Kim, Y. B., und Kunapuli, S. P.** (1999) Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 82: 1322-1326.
- Devillers-Thiery, A., Galzi, J. L., Eisele, J. L., Bertrand, S., Bertrand, D. und Changeux, J. P.** (1993) Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membr. Biol.* 136: 97-112.
- Dhulipala, P. D., Wang, Y. X. und Kotlikoff, M. I.** (1998) The human P2X₄ receptor gene is alternatively spliced. *Gene* 207: 259-266.
- Ding, S. und Sachs, F.** (1999) Single channel properties of P2X₂ purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* 113: 695-720.
- Ding, Z., Kim, S., Dorsam, R. T., Jin, J. und Kunapuli, S. P.** (2003) Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101: 3908-3914.
- Dogne, J. M., Leval, X., X, Benoit, P., Delarge, J., Masereel, B. und David, J. L.** (2002) Recent advances in antiplatelet agents. *Curr. Med. Chem.* 9: 577-589.
- Dorsam, R. T., Kim, S., Jin, J. G. und Kunapuli, S. P.** (2002) Coordinated signaling through both G_{12/13} and G_i pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J. Biol. Chem.* 277: 47588-47595.
- D'Souza, L. und Glueck, H. I.** (1977) Measurement of nucleotide pools in platelets using high pressure liquid chromatography. *Thromb. Haemost.* 38: 990-1001.
- Dunn, P. M.** (2000) Fertility: purinergic receptors and the male contraceptive pill. *Curr. Biol.* 10: R305-R307.
- Dunn, P. M. und Blakeley, A. G.** (1988) Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 93: 243-245.
- Dunn, P. M., Zhong, Y. und Burnstock, G.** (2001) P2X receptors in peripheral neurons. *Prog. Neurobiol.* 65: 107-134.
- Dutton, J. L., Poronnik, P., Li, G. H., Holding, C. A., Worthington, R. A., Vandenberg, R. J., Cook, D. I., Barden, J. A. und Bennett, M. R.** (2000) P2X₁ receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39: 2054-2066.
- Dwyer, K. M., Robson, S. C., Nandurkar, H. H., Campbell, D. J., Gock, H., Murray-Segal, L. J., Fisicaro, N., Mysore, T. B., Kaczmarek, E., Cowan, P. J. und d'Apice, A. J.** (2004) Thromboregulatory manifestations in human CD39 transgenic mice and the implications for thrombotic disease and transplantation. *J. Clin. Invest* 113: 1440-1446.
- Egan, T. M., Haines, W. R. und Voigt, M. M.** (1998) A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X₂ receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J. Neurosci.* 18: 2350-2359.
- Egan, T. M., Cox, J. A. und Voigt, M. M.** (2004) Molecular structure of P2X receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 821-829.

LITERATURVERZEICHNIS

- Eickhorst, A. N., Berson, A., Cockayne, D., Lester, H. A. und Khakh, B. S.** (2002) Control of P2X₂ channel permeability by the cytosolic domain. *J. Gen. Physiol.* 120: 119-131.
- Ennion, S. J. und Evans, R. J.** (2002) P2X₁ receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 611-616.
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T. und Weisman, G. A.** (1995) Site-directed mutagenesis of P_{2U} purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* 270: 4185-4188.
- Erhardt, J. A., Pillarisetti, K. und Toomey, J. R.** (2003) Potentiation of platelet activation through the stimulation of P2X₁ receptors. *J. Thromb. Haemost.* 1: 2626-2635.
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A. und Surprenant, A.** (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P_{2x} purinoceptors). *Mol. Pharmacol.* 48: 178-183.
- Fabre, J. E., Nguyen, M., Latour, A., Keifer, J. A., Audoly, L. P., Coffman, T. M. und Koller, B. H.** (1999) Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y₁-deficient mice. *Nat. Med.* 5: 1199-1202.
- Fabre, J. E., King, B. F. und Koller, B. H.** (2001) Study of aggregation of platelets lacking the P2Y₁ receptor. *Drug Dev. Res.* 52: 150-155.
- Figura, M. S., Dainty, I. A., McKay, G. D., Kirk, I. P., Humphries, R. G., Robertson, M. J., Dougall, I. G. und Leff, P.** (1998) P2Y₁ receptors in human platelets which are pharmacologically distinct from P2Y_{ADP} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 124: 157-164.
- Figura, M. S., Jarvis, G. E., Dougall, I. G. und Leff, P.** (2000) Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 178-186.
- Fischer, B., Yefidoff, R., Major, D. T., Rutman-Halili, I., Shneyvays, V., Zinman, T., Jacobson, K. A. und Shainberg, A.** (1999) Characterization of "mini-nucleotides" as P2X receptor agonists in rat cardiomyocyte cultures. An integrated synthetic, biochemical, and theoretical study. *J. Med. Chem.* 42: 2685-2696.
- Fiske, C. H. und Subbarow, Y.** (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.
- Fontana, P., Dupont, A., Gandrille, S., Bachelot-Loza, C., Reny, J. L., Aiach, M. und Gaussem, P.** (2003) Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 108: 989-995.
- Foster, C. J., Prosser, D. M., Agans, J. M., Zhai, Y., Smith, M. D., Lachowicz, J. E., Zhang, F. L., Gustafson, E., Monsma, F. J., Jr., Wiekowski, M. T., Abbondanzo, S. J., Cook, D. N., Bayne, M. L., Lira, S. A. und Chintala, M. S.** (2001) Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest.* 107: 1591-1598.
- Frolenkov, G. I., Belyantseva, I. A., Kurc, M., Mastroianni, M. A. und Kachar, B.** (1998) Cochlear outer hair cell electromotility can provide force for both low and high intensity distortion product otoacoustic emissions. *Hearing Res.* 126: 67-74.

LITERATURVERZEICHNIS

- Galligan, J. J. und North, R. A.** (2004) Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1: 64-70.
- Ganso, M.** (2004) Funktionelle Pharmakologische Untersuchungen an P2-Rezeptoren und Evaluierung des P_{2U}-Rezeptors im Vas deferens der Ratte. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.*
- Geiger, J., Honig-Liedl, P., Schanzenbacher, P. und Walter, U.** (1998) Ligand specificity and ticlopidine effects distinguish three human platelet ADP receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 351: 235-246.
- Giaroni, C., Knight, G. E., Ruan, H. Z., Glass, R., Bardini, A., Lecchini, S., Frigo, G. und Burnstock, G.** (2002) P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 43: 1313-1323.
- Greco, N. J., Tonon, G., Chen, W., Luo, X., Dalal, R. und Jamieson, G. A.** (2001) Novel structurally altered P2X₁ receptor is preferentially activated by adenosine diphosphate in platelets and megakaryocytic cells. *Blood* 98: 100-107.
- Guile, S. D., Ince, F., Ingall, A. H., Kindon, N. D., Meghani, P. und Mortimore, M. P.** (2001) The medicinal chemistry of the P2 receptor family. *Prog. Med. Chem.* 38: 115-187.
- Guo, D. P., Von Kügelgen, I., Moro, S., Kim, Y. C. und Jacobson, K. A.** (2002) Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y₁ receptor. *Drug Dev. Res.* 57: 173-181.
- Haines, W. R., Torres, G. E., Voigt, M. M. und Egan, T. M.** (1999) Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X₁ and P2X₅ isoforms. *Mol. Pharmacol.* 56: 720-727.
- Halazy, S.** (1999) G-protein coupled receptors bivalent ligands and drug design. *Exp. Opin Ther. Patents* 9: 431-446.
- Halazy, S., Perez, M., Fourrier, C., Pallard, I., Pauwels, P. J., Palmier, C., John, G. W., Valentin, J. P., Bonnafous, R. und Martinez, J.** (1996) Serotonin dimers: application of the bivalent ligand approach to the design of new potent and selective 5-HT_{1B/1D} agonists. *J. Med. Chem.* 39: 4920-4927.
- Hall, D. A. und Hourani, S. M.** (1993) Effects of analogues of adenine nucleotides on increases in intracellular calcium mediated by P2_T-purinoceptors on human blood platelets. *Br. J. Pharmacol.* 108: 728-733.
- Hall, R. A., Premont, R. T. und Lefkowitz, R. J.** (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* 145: 927-932.
- Hassock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V. und Authi, K. S.** (2002) Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 100: 2801-2811.
- Hechler, B., Eckly, A., Ohlmann, P., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1998a) The P2Y₁ receptor, necessary but not sufficient to support full ADP- induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br. J. Haematol.* 103: 858-866.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1998b) The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 92: 152-159.
- Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J. P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z. M., Evans, R. und Gachet, C.** (2003a) A role of the fast ATP-gated P2X₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J. Exp. Med.* 198: 661-667.
- Hechler, B., Zhang, Y., Eckly, A., Cazenave, J. P., Gachet, C. und Ravid, K.** (2003b) Lineage-specific overexpression of the P2Y₁ receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J. Thromb. Haemost.* 1: 155-163.
- Hechler, B., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (2004) Effect of NF449, a novel selective P2X₁ receptor antagonist, on platelet activation and thrombosis. *Haematologica* 89 (suppl. 7):18-19.
- Hibell, A. D., Kidd, E. J., Chessell, I. P., Humphrey, P. P. und Michel, A. D.** (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130: 167-173.
- Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M. und Montrucchio, G.** (2001) Resistance to thromboembolism in PI₃K γ -deficient mice. *FASEB J.* 15: 2019-2021.
- Hoffmann, C., Heine, P., Pradel, G., Kim Y-C., Jacobson, K. A. und Zimmermann, H.** (2000) Inhibition of ecto-apyrase and ecto-ATPase by pyridoxal phosphate-related compounds. *Drug Dev. Res.* 51: 153-158.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. und Conley, P. B.** (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409: 202-207.
- Holmsen, H. und Weiss, H. J.** (1970) Hereditary defect in the platelet release reaction caused by a deficiency in the storage pool of platelet adenine nucleotides. *Br. J. Haematol.* 19: 643-649.
- Homolya, L., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., Koller, B. H. und Boucher, R. C.** (1999) Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y₂ receptor (-/-) mice. *J. Biol. Chem.* 274: 26454-26460.
- Horner, S., Ganso, M., Braun, K., Hildebrandt, C. und Lambrecht, G.** (2002) Is MRS2179 P2Y₁-selective in whole tissues? *Drug Dev. Res.* 56: A153.
- Hourani, S. M. O.** (2001) Discovery and recognition of purine receptor subtypes on platelets. *Drug Dev. Res.* 52: 140-149.
- Hourani, S. M., Hall, D. A. und Nieman, C. J.** (1992) Effects of the P2-purinoceptor antagonist, suramin, on human platelet aggregation induced by adenosine 5'-diphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 105: 453-457.
- Hülsmann, M., Nickel, P., Kassack, M., Schmalzing, G., Lambrecht, G. und Markwardt, F.** (2003) NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 470: 1-7.

LITERATURVERZEICHNIS

- Humphrey, P. P., Buell, G., Kennedy, I., Khakh, B. S., Michel, A. D., Surprenant, A. und Trezise, D. J.** (1995) New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352: 585-596.
- Ingall, A. H., Dixon, J., Bailey, A., Coombs, M. E., Cox, D., McInally, J. I., Hunt, S. F., Kindon, N. D., Teobald, B. J., Willis, P. A., Humphries, R. G., Leff, P., Clegg, J. A., Smith, J. A. und Tomlinson, W.** (1999) Antagonists of the platelet P_{2T} receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J. Med. Chem.* 42: 213-220.
- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. und Williams, M.** (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* 45: 4057-4093.
- Jagroop, I. A., Burnstock, G. und Mikhailidis, D. P.** (2003) Both the ADP receptors P2Y₁ and P2Y₁₂, play a role in controlling shape change in human platelets. *Platelets* 14: 15-20.
- Janssens, R., Paindavoine, P., Parmentier, M. und Boeynaems, J. M.** (1999) Human P2Y₂ receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* 127: 709-716.
- Jantzen, H. M., Gousset, L., Bhaskar, V., Vincent, D., Tai, A., Reynolds, E. E. und Conley, P. B.** (1999) Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb. Haemost.* 81: 111-117.
- Jarvis, G. E., Humphries, R. G., Robertson, M. J. und Leff, P.** (2000) ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y₁ and P_{2T} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129: 275-282.
- Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Chu, K., Lee, C. H., Stewart, A. O., Polakowski, J., Cox, B. F., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J. und Faltynek, C.** (2002) A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X₃ and P2X_{2/3} receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 17179-17184.
- Jarvis, M. F., Bianchi, B., Uchic, J. T., Cartmell, J., Lee, C. H., Williams, M. und Faltynek, C.** (2004) [³H]A-317491, a novel high-affinity non-nucleotide antagonist that specifically labels human P2X_{2/3} and P2X₃ receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310: 407-416.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. und North, R. A.** (2000) Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 34190-34196.
- Jiang, Q., Guo, D., Lee, B. X., Van Rhee, A. M., Kim, Y. C., Nicholas, R. A., Schachter, J. B., Harden, T. K. und Jacobson, K. A.** (1997) A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* 52: 499-507.
- Jin, J. und Kunapuli, S. P.** (1998) Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 8070-8074.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jin, J., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P.** (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y₁ receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* 273: 2030-2034.
- Junankar, P. R., Karjalainen, A. und Kirk, K.** (2002) The role of P2Y₁ purinergic receptors and cytosolic Ca²⁺ in hypotonically activated osmolyte efflux from a rat hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 277: 40324-40334.
- Jung, S. M. und Moroi, M.** (2001) Platelet collagen receptor integrin $\alpha 2\beta 1$ activation involves differential participation of ADP-receptor subtypes P2Y₁ and P2Y₁₂ but not intracellular calcium change. *Eur. J. Biochem.* 268: 3513-3522.
- Kagaya, A., Mikuni, M., Kusumi, I., Yamamoto, H. und Takahashi, K.** (1990) Serotonin-induced acute desensitization on serotonin₂ receptors in human platelets via a mechanism involving protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 305-311.
- Kassack, M. U., Braun, K., Ganso, M., Ullmann, H., Nickel, P., Boing, B., Müller, G. und Lambrecht, G.** (2004) Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X₁ receptor antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* 39: 345-357.
- Kawashima, Y., Nagasawa, T. und Ninomiya, H.** (2000) Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells. *Blood* 96: 2157-2162.
- Kenakin, T.** (1987) Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Raven Press, New York.
- Kenakin, T.** (1993) Analysis of drug-receptor interaction. Raven Press, New York.
- Kennedy, C. und Leff, P.** (1995) How should P2X purinoceptors be classified pharmacologically? *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 168-174.
- Kennedy, I. und Humphrey, P. P. A.** (1994) Evidence for the presence of two types of P2 purinoceptor in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Eur. J. Pharmacol.* 261: 273-280.
- Kettlun, A. M., Leyton, M., Valenzuela, M. A., Mancilla, M. und Traverso-Cori, A.** (1992) Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from solanum tuberosum. *Phytochemistry* 31: 1889-1894.
- Khakh, B. S., Michel, A. und Humphrey, P. P. A.** (1994) Estimates of antagonist affinities at P2X purinoceptors in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 263: 301-309.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. und Humphrey, P. P. A.** (2001a) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53: 107-118.
- Khakh, B. S., Smith, W. B., Chiu, C. S., Ju, D., Davidson, N. und Lester, H. A.** (2001b) Activation-dependent changes in receptor distribution and dendritic morphology in hippocampal neurons expressing P2X₂-green fluorescent protein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 5288-5293.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kim, Y. B., Jin, J., Dangelmaier, C., Daniel, J. L. und Kunapuli, S.** (1999) The P2Y₁ receptor is essential for ADP-induced shape change and aggregation in mouse platelets. *Platelets* 10: 399-406.
- Kim, Y. C., Brown, S. G., Harden, T. K., Boyer, J. L., Dubyak, G., King, B. F., Burnstock, G. und Jacobson, K. A.** (2001) Structure-activity relationships of pyridoxal phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X₁ receptors. *J. Med. Chem.* 44: 340-349.
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G. und Offermanns, S.** (1999) Activation of G₁₂/G₁₃ results in shape change and rho/rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J. Cell Biol.* 144: 745-754.
- Klapperstück, M., Büttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G. und Markwardt, F.** (2000) Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 245-252.
- Koziak, K., Sevigny, J., Robson, S. C., Siegel, J. B. und Kaczmarek, E.** (1999) Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thromb. Haemost.* 82: 1538-1544.
- Kubista, H., Lechner, S. G., Wolf, A. M. und Boehm, S.** (2003) Attenuation of the P2Y receptor-mediated control of neuronal Ca²⁺ channels in PC12 cells by antithrombotic drugs. *Br. J. Pharmacol.* 138: 343-350.
- Kunapuli, S. P.** (1998a) Molecular physiology of platelet ADP receptors. *Drug Dev. Res.* 45: 135-139.
- Kunapuli, S. P.** (1998b) Multiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 391-394.
- Kunapuli, S. P., Ding, Z. R., Dorsam, R. T., Kim, S., Murugappan, S. und Quinton, T. M.** (2003) ADP receptors-targets for developing antithrombotic agents. *Curr. Pharm. Des.* 9: 2303-2316.
- Lalchandani, S. G., Lei, L., Zheng, W., Suni, M. M., Moore, B. M., Liggett, S. B., Miller, D. D. und Feller, D. R.** (2002) Yohimbine dimers exhibiting selectivity for the human alpha_{2C}-adrenoceptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 979-984.
- Lambrecht, G.** (1996) Design and pharmacology of selective P2-purinoceptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 341-344.
- Lambrecht, G.** (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 340-350.
- Lambrecht, G., Friebe, T., Grimm, U., Windscheif, U., Bungardt, E., Hildebrandt, C., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G. und Mutschler, E.** (1992) PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 217: 217-219.
- Lambrecht, G., Damer, S., Niebel, B., Czeche, S., Nickel, P., Rettinger, J., Schmalzing, G. und Mutschler, E.** (1999) Novel ligands for P2 receptor subtypes in innervated tissues. *Prog. Brain Res.* 120: 107-117.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lambrecht, G., Ganso, M., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G., Hildebrandt, C., Braun, K. und Mutschler, E.** (2000a) The novel heteromeric bivalent ligand SB9 potently antagonizes P2Y₁ receptor-mediated responses. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 171-177.
- Lambrecht, G., Rettinger, J., Bäumert, H. G., Czeche, S., Damer, S., Ganso, M., Hildebrandt, C., Niebel, B., Spatz-Kümbel, G., Schmalzing, G. und Mutschler, E.** (2000b) The novel pyridoxal-5'-phosphate derivative PPNDS potently antagonizes activation of P2X₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387: R19-R21.
- Lambrecht, G., Braun, K., Damer, S., Ganso, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Kassack, M. U. und Nickel, P.** (2002) Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2371-2399.
- Laube, B., Kuhse, J. und Betz, H.** (1998) Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.* 18: 2954-2961.
- Lee, H. Y., Bardini, M. und Burnstock, G.** (2000) P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res.* 300: 321-330.
- Leon, C., Hechler, B., Vial, C., Leray, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1997) The P2Y₁ receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* 403: 26-30.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* 104: 1731-1737.
- Leon, C., Freund, M., Ravanat, C., Baurand, A., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (2001) Key role of the P2Y₁ receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y₁-knockout mice and mice treated with a P2Y₁ antagonist. *Circulation* 103: 718-723.
- Lewis, C. J., Surprenant, A. und Evans, R. J.** (1998) 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP) - a nanomolar affinity antagonist at rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 124: 1463-1466.
- Li, C.M., Campbell, S. J., Kumararatne, D. S., Bellamy, R., Ruwende, C., McAdam, K. P., Hill, A. V. und Lammas, D. A.** (2002) Association of a polymorphism in the P2X₇ gene with tuberculosis in a Gambian population. *J. Infect. Dis.* 186:1458-1462.
- Li, Q., Olesky, M., Palmer, R. K., Harden, T. K. und Nicholas, R. A.** (1998) Evidence that the P2Y₃ receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y₆ receptor. *Mol. Pharmacol.* 54: 541-546.
- Luthje, J. und Ogilvie, A.** (1988) Catabolism of Ap4A and Ap3A in whole blood. The dinucleotides are long-lived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 173: 241-245.
- Maayani, S., Tagliente, T. M., Schwarz, T., Craddock-Royal, B., Alcalá, C., Marrero, G. und Martinez, R.** (2001) Deaggregation is an integral component of the response of platelets to ADP in vitro: kinetic studies of literature and original data. *Platelets* 12: 279-291.

LITERATURVERZEICHNIS

- Maayani, S., Patel, N. D., Craddock-Royal, B. D., Schwarz, T. E. und Tagliente, T. M.** (2003a) Concurrent responses elicited by isolated activation of platelet G_q-coupled receptors, in vitro: a novel approach for their separation and analysis. *Platelets* 14: 89-102.
- Maayani, S., Schwarz, T. E., Patel, N. D., Craddock-Royal, B. D., und Tagliente T. M.** (2003b) Agonist concentration-dependent differential responsivity of a human platelet purinergic receptor: pharmacological and kinetic studies of aggregation, deaggregation and shape change responses mediated by the purinergic P2Y₁ receptor in vitro. *Platelets* 14: 445-462.
- MacKenzie, A. B., Mahaut-Smith, M. P. und Sage, S. O.** (1996) Activation of receptor-operated cation channels via P2X₁ not P2_T purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.* 271: 2879-2881.
- Mahaut-Smith, M. P., Sage, S. O. und Rink, T. J.** (1990) Receptor-activated single channels in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 265: 10479-10483.
- Mahaut-Smith, M. P., Hussain, J. F. und Mason, M. J.** (1999) Depolarization-evoked Ca²⁺ release in a non-excitabile cell, the rat megakaryocyte. *J. Physiol.* 515: 385-390.
- Mahaut-Smith, M. P., Ennion, S. J., Rolf, M. G. und Evans, R. J.** (2000) ADP is not an agonist at P2X₁ receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 131: 108-114.
- Mahaut-Smith, M. P., Tolhurst, G. und Evans, R. J.** (2004) Emerging roles for P2X₁ receptors in platelet activation. *Platelets* 15: 131-144.
- Mangin, P., Ohlmann, P., Eckly, A., Cazenave, J. P., Lanza, F. und Gachet, C.** (2004) The P2Y receptor plays an essential role in the platelet shape change induced by collagen when TxA₂ formation is prevented. *J. Thromb. Haemost.* 2: 969-977.
- Marcus, A. J., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H., Islam, N., Pinsky, D. J., Sesti, C. und Levi, R.** (2003) Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305: 9-16.
- Marinissen, M. J. und Gutkind, J. S.** (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 368-376.
- Marteau, F., Le Poul, E., Communi, D., Communi, D., Labouret, C., Savi, P., Boeynaems, J.-M. und Gonzalez, N. S.** (2003) Pharmacological characterization of the human P2Y₁₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* 64: 104-112.
- Martinez-Pinna, J., Tolhurst, G., Gurung, I. S., Vandenberg, J. I. und Mahaut-Smith, M. P.** (2004) Sensitivity limits for voltage control of P2Y receptor-evoked Ca²⁺ mobilization in the rat megakaryocyte. *J. Physiol.* 555: 61-70.
- McClure, M. O., Kakkar, A., Cusack, N. J. und Born, G. V.** (1988) Evidence for the dependence of arterial haemostasis on ADP. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 234: 255-262.
- McNally, W. P., DeHart, P. D., Lathia, C. und Whitfield, L. R.** (2000) Distribution of [¹⁴C]suramin in tissues of male rats following a single intravenous dose. *Life Sci.* 67: 1847-1857.

LITERATURVERZEICHNIS

- Menke, K.** (2003) Pharmakologische Charakterisierung von NF449 als hochpotenten und subtypelektiven P2X₁ Rezeptorantagonisten. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main*.
- Meyers, K. M., Holmsen, H. und Seachord, C. L.** (1982) Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am. J. Physiol.* 243: R454-R461.
- Michal, F., Maguire, H. M. und Gough, G.** (1969) 2-Methylthioadenosine-5'-phosphate: a specific inhibitor of platelet aggregation. *Nature* 222: 1073-1074.
- Moro, S., Guo, D., Camaioni, E., Boyer, J. L., Harden, T. K. und Jacobson, K. A.** (1998) Human P2Y₁ receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J. Med. Chem.* 41: 1456-1466.
- Moskvina, E.; Unterberger und U., Bohm, S.** (2003) Activity-dependent autocrine-paracrine activation of neuronal P2Y receptors. *J. Neurosci.* 23:7479-7488.
- Müller, W. und Wollert, U.** (1976) Spectroscopic studies on the complex formation of suramin with bovine and serum albumin. *Biochem. Biophys. Acta* 427: 465-480.
- Mulryan, K., Gitterman, D. P., Lewis, C. J., Vial, C., Leckie, B. J., Cobb, A. L., Brown, J. E., Conley, E. C., Buell, G., Pritchard, C. A. und Evans, R. J.** (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 403: 86-89.
- Nakata, H., Yoshioka, K. und Saitoh, S.** (2003) Hetero-oligomerization between adenosine A1 and P2Y₁ receptors in living cells: Formation of ATP-sensitive adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* 58: 340-349.
- Nassauw, L. V., Brouns, I., Adriaensen, D., Burnstock, G. und Timmermans, J. P.** (2002) Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X₃ receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem. Cell Biol.* 118: 193-203.
- Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G. und Rassendren, F.** (1998) Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J. Biol. Chem.* 273: 15177-15182.
- Nicke, A., Bäumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. und Schmalzing, G.** (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-3028.
- Nieswandt, B., Schulte, V., Zywiets, A., Gratacap, M. P. und Offermanns, S.** (2002) Costimulation of G_i- and G₁₂/G₁₃-mediated signaling pathways induces integrin α (IIb) β (3) activation in platelets. *J. Biol. Chem.* 277: 39493-39498.
- North, R. A.** (1996) P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found. Symp.* 198: 91-105.
- North, R. A.** (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.
- North, R. A. und Barnard, E. A.** (1997) Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 346-357.
- North, R. A. und Surprenant, A.** (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 563-580.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ogilvie, A., Blasius, R., Schulze-Lohoff, E. und Sterzel, R. B.** (1996) Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 325-328.
- Ohlmann, P., Laugwitz, K. L., Nurnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1995) The human platelet ADP receptor activates G₁₂ proteins. *Biochem. J.* 312: 775-779.
- Ohlmann, P., Eckly, A., Freund, M., Cazenave, J. P., Offermanns, S. und Gachet, C.** (2000) ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G α_q . *Blood* 96: 2134-2139.
- O'Reilly, B. A., Kosaka, A. H., Chang, T. K., Ford, A. P., Popert, R. und McMahon, S. B.** (2001) A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU. Int.* 87: 617-622.
- Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Van Geet, C., Thys, C., Wei, L., Nilius, B., Vermynen, J. und Hoylaerts, M. F.** (2000) A natural dominant negative P2X₁ receptor due to deletion of a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* 275: 22611-22614.
- Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Thys, C., Tytgat, J., Vermynen, J. und Hoylaerts, M. F.** (2001) The ATP-gated P2X₁ ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb. Haemost.* 86: 1264-1271.
- Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Vermynen, J. und Hoylaerts, M. F.** (2002) P2X₁-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100: 2499-2505.
- Oury, C., Kuijpers, M. J. E., Toth-Zsomboki, E., Bonnefoy, A., Danloy, S., Vreys, I., Feijge, M. A. H., De Vos, R., Vermynen, J., Heemskerk, J. W. M. und Hoylaerts, M. F.** (2003) Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood* 101: 3969-3976.
- Park, H. S. und Hourani, S. M.** (1999) Differential effects of adenine nucleotide analogues on shape change and aggregation induced by adenosine 5-diphosphate (ADP) in human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1359-1366.
- Park, H., Tennant, J. P., Waktolla, G. F., Sarkardei, S., Kass, G. E. N. und Hourani, S. M. O.** (1998) Effects of Adenosine 3'-Phosphate 5'-Phosphosulfate on P2 receptors in platelets and smooth muscle preparations. *Drug Dev. Res.* 45: 67-73.
- Parker, R. B. und Waud, D. R.** (1971) Pharmacological estimation of drug-receptor dissociation constants. Statistical evaluation. I. Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177: 1-12.
- Paul, B. Z., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P.** (1999a) Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J. Biol. Chem.* 274: 28293-28300.
- Paul, B. Z., Jin, J. und Kunapuli, S. P.** (1999b) Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for P_{2TAc} and α_{2a} receptors. *J. Biol. Chem.* 274: 29108-29114.

LITERATURVERZEICHNIS

- Payrastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M. und Chap, H.** (2000) The integrin $\alpha\text{IIb}/\beta 3$ in human platelet signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1069-1074.
- Pinsky, D. J., Broekman, M. J., Peschon, J. J., Stocking, K. L., Fujita, T., Ramasamy, R., Connolly, E. S., Jr., Huang, J., Kiss, S., Zhang, Y., Choudhri, T. F., McTaggart, R. A., Liao, H., Drosopoulos, J. H., Price, V. L., Marcus, A. J. und Maliszewski, C. R.** (2002) Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 109: 1031-1040.
- Poole, D. P., Castelucci, P., Robbins, H. L., Chiocchetti, R. und Furness, J. B.** (2002) The distribution of P2X₃ purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Auton. Neurosci.* 101: 39-47.
- Portoghese, P. S.** (2001) From models to molecules: opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptor probes. *J. Med. Chem.* 44: 2259-2269.
- Quinton, T. M., Ozdener, F., Dangelmaier, C., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P.** (2002) Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. *Blood* 99: 3228-3234.
- Ralevic, V. und Burnstock, G.** (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R. A. und Surprenant, A.** (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16: 3446-3454.
- Remijn, J. A., Wu, Y. P., Jeninga, E. H., Ijsseldijk, M. J. W., van Willigen, G., de Groot, P. G., Sixma, J. J., Nurden, A. T. und Nurden, P.** (2002) Role of ADP receptor P2Y₁₂ in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 686-691.
- Rettinger, J. und Schmalzing, G.** (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J. Gen. Physiol.* 121: 451-461.
- Rettinger, J. und Schmalzing, G.** (2004) Desensitization masks nanomolar potency of ATP for the P2X₁ receptor. *J. Biol. Chem.* 279: 6426-6433.
- Rettinger, J., Schmalzing, G., Damer, S., Müller, G., Nickel, P. und Lambrecht, G.** (2000) The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X₁ receptor. *Neuropharmacology* 39: 2044-2053.
- Rettinger, J., Braun, K., Hochmann, H., Kassack, M. U., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G. und Lambrecht, G.** (2004) Profiling at recombinant homomeric and heteromeric rat P2X receptors identifies the suramin analogue NF449 as a highly potent P2X₁ receptor antagonist. *Neuropharmacology*, im Druck.
- Robaye, B., Ghanem, E., Wilkin, F., Fokan, D., Van Driessche, W., Schurmans, S., Boeynaems, J. M. und Beauwens, R.** (2003) Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Mol. Pharmacol.* 63: 777-783.
- Rolf, M. G. und Mahaut-Smith, M. P.** (2002) Effects of enhanced P2X₁ receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets. *Thromb. Haemost.* 88: 495-502.

LITERATURVERZEICHNIS

- Rolf, M. G., Brearley, C. A. und Mahaut-Smith, M. P.** (2001) Platelet shape change evoked by selective activation of P2X₁ purinoceptors with α,β -methylene ATP. *Thromb. Haemost.* 85: 303-308.
- Rosa, J. P.** (2003) P2X₁: definitely not an ADP receptor. *Blood* 102: 3466-3467.
- Sage, S. O. und Rink, T. J.** (1987) The kinetics of changes in intracellular calcium concentration in fura-2-loaded human platelets. *J. Biol. Chem.* 262: 16364-16369.
- Savi, P., Bornia, J., Salel, V., Delfaud, M. und Herbert, J. M.** (1997) Characterization of P2X₁ purinoreceptors on rat platelets: effect of clopidogrel. *Br. J. Haematol.* 98: 880-886.
- Savi, P., Pereillo, J. M., Uzabiaga, M. F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J. P., Pascal, M. und Herbert, J. M.** (2000) Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb. Haemost.* 84: 891-896.
- Savi, P., Labouret, C., Delesque, N., Guette, F., Lupker, J. und Herbert, J. M.** (2001) P2Y₁₂, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 379-383.
- Scase, T. J., Heath, M. F., Allen, J. M., Sage, S. O. und Evans, R. J.** (1998) Identification of a P2X₁ purinoceptor expressed on human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 525-528.
- Schlüter, H., Grobeta, I., Bachmann, J., Kaufmann, R., van der, G. M., Tepel, M., Nofer, J. R., Assmann, G., Karas, M., Jankowski, J. und Zidek, W.** (1998) Adenosine(5') oligophospho-(5') guanosines and guanosine(5') oligophospho-(5') guanosines in human platelets. *J. Clin. Invest.* 101: 682-688.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. und Gabel, C. A.** (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X₇ receptors. *J. Biol. Chem.* 276: 125-132.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M. und Stühmer, W.** (1997) Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160: 91-100.
- Soto, F., Lambrecht, G., Nickel, P., Stühmer, W. und Busch, A. E.** (1999) Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38: 141-149.
- Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A. N., Stanfa, L., Suzuki, R., Carpenter, K., Dickenson, A., Boyce, S., Hill, R., Nebenuis-Oosthuizen, D., Smith, A. J., Kidd, E. J. und Wood, J. N.** (2000) Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X₃ receptors. *Nature* 407: 1015-1017.
- Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A. und North, R. A.** (1999) Contribution of individual subunits to the multimeric P2X₂ receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol. Pharmacol.* 56: 973-981.
- Storey, R. F., Newby, L. J. und Heptinstall, S.** (2001) Effects of P2Y₁ and P2Y₁₂ receptor antagonists on platelet aggregation induced by different agonists in human whole blood. *Platelets* 12: 443-447.

LITERATURVERZEICHNIS

- Storey, R. F., Judge, H. M., Wilcox, R. G. und Heptinstall, S.** (2002) Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb. Haemost.* 88: 488-494.
- Sun, B., Li, J., Okahara, K. und Kambayashi, J.** (1998) P2X₁ purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression. *J. Biol. Chem.* 273: 11544-11547.
- Swanson, K. D., Reigh, C. und Landreth, G. E.** (1998) ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X₂ purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *J. Biol. Chem.* 273: 19965-19971.
- Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H. und Furuichi, K.** (2001) Molecular cloning of the platelet P_{2T(AC)} ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* 60: 432-439.
- Tallarida, R. und Murray, R.** (1986) Manual of pharmacologic calculations with computer programs. 2nd. Ed., Springer Verlag, Berlin.
- Torres, G. E., Egan, T. M. und Voigt, M. M.** (1998) Topological analysis of the ATP-gated ionotropic P2X₂ receptor subunit. *FEBS Lett.* 425: 19-23.
- Torres, G. E., Egan, T. M. und Voigt, M. M.** (1999a) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274: 6653-6659.
- Torres, G. E., Egan, T. M. und Voigt, M. M.** (1999b) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 274: 22359-22365.
- Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Cornelissen, H., De Vos, R., Vermeylen, J. und Hoylaerts, M. F.** (2003) P2X₁-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation. *J. Biol. Chem.* 278: 46661-46667.
- Trebak, M., Vazquez, G., Bird, G. S. und Putney, J. W., Jr.** (2003) The TRPC_{3/6/7} subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 33: 451-461.
- Troyanovskaya, M. und Wackym, P. A.** (1998) Evidence for three additional P2X₂ purinoceptor isoforms produced by alternative splicing in the adult rat vestibular end-organs. *Hear. Res.* 126: 201-209.
- Tsopelas, C. und Sutton, R.** (2002) Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. *J. Nucl. Med.* 43: 1377-1382.
- Turner, N. A., Moake, J. L. und McIntire, L. V.** (2001) Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y₁₂ and P2Y₁ is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood* 98: 3340-3345.
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A. und Buell, G.** (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.

LITERATURVERZEICHNIS

- Valera, S., Talabot, F., Evans, R. J., Gos, A., Antonarakis, S. E., Morris, M. A. und Buell, G. N.** (1995) Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3: 283-289.
- Van Kolen, K. und Slegers, H** (2004) P2Y₁₂ receptor stimulation inhibits beta-adrenergic receptor-induced differentiation by reversing the cyclic AMP-dependent inhibition of protein kinase B. *J. Neurochem.* 89: 442-453.
- Vial, C., Hechler, B., Leon, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C.** (1997) Presence of P2X₁ purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines. *Thromb. Haemost.* 78: 1500-1504.
- Vial, C., Rolf, M. G., Mahaut-Smith, M. P. und Evans, R. J.** (2002) A study of P2X₁ receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135: 363-372.
- Vial, C., Pitt, S. J., Roberts, J., Rolf, M. G., Mahaut-Smith, M. P. und Evans, R. J.** (2003) Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X₁ receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis. *Blood* 102: 3646-3651.
- Vigne, P., Hechler, B., Gachet, C., Breitmayer, J. P. und Frelin, C.** (1999) Benzoyl ATP is an antagonist of rat and human P2Y₁ receptors and of platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 94-97.
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. und North, R. A.** (1998) Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol. Pharmacol.* 53: 969-973.
- Waldo, G. L. und Harden, T. K.** (2004) Agonist binding and G_q-stimulating activities of the purified human P2Y₁ receptor. *Mol. Pharmacol.* 65: 426-436.
- Waldo, G. L., Corbitt, J., Boyer, J. L., Ravi, G., Kim, H. S., Ji, X. D., Lacy, J., Jacobson, K. A. und Harden, T. K.** (2002) Quantitation of the P2Y₁ receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol. Pharmacol.* 62: 1249-1257.
- Wang, L., Ostberg, O., Wihlborg, A. K., Brogren, H., Jern, S. und Erlinge, D.** (2003) Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets. *J. Thromb. Haemost.* 1: 330-336.
- Webb, T. E., Simon, J., Krishek, B. J., Bateson, A. N., Smart, T. G., King, B. F., Burnstock, G. und Barnard, E. A.** (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324: 219-225.
- Werner, P., Seward, E. P., Buell, G. N. und North, R. A.** (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 15485-15490.
- Westwick, J., Scully, M. F., Poll, C. und Kakkar, V. V.** (1986) Comparison of the effects of low molecular weight heparin and unfractionated heparin on activation of human platelets in vitro. *Thromb. Res.* 42: 435-447.
- Wihlborg, A. K., Wang, L., Braun, O. O., Eyjolfsson, A., Gustafsson, R., Gudbjartsson, T. und Erlinge, D.** (2004) ADP Receptor P2Y₁₂ is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 10:1810-1815.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wiklund, N. P. und Gustafsson, L. E.** (1988) Indications for P₂-purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 361-370.
- Wilde, J. I., Retzer, M., Siess, W. und Watson, S. P.** (2000) ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation. *Platelets* 11: 286-295.
- Williams, M. und Jarvis, M. F.** (2000) Purinergic and pyrimidinerger receptors as potential drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 59: 1173-1185.
- Yang, J., Wu, J., Jiang, H., Mortensen, R., Austin, S., Manning, D. R., Woulfe, D. und Brass, L. F.** (2002) Signaling through G_i family members in platelets - Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J. Biol. Chem.* 277: 46035-46042.
- Yegutkin, G. G., Samburski, S. S. und Jalkanen, S.** (2003) Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J.* 17: 1328-1330.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y. und Shimizu, T.** (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature* 387: 620-624.
- Zemkova, H., He, M. L., Koshimizu, T. A. und Stojilkovic, S. S.** (2004) Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P_{2X} receptors. *J. Neurosci.* 24: 6968-6978.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M., Qiao, X., Liu, Y. H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T. M., Palmer, K., Bayne, M. und Monsma, F. J., Jr.** (2001) ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J. Biol. Chem.* 276: 8608-8615.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X. D., Fan, X. D., Yang, S. J., Laz, T. M., Bayne, M. und Monsma, F.** (2002) P_{2Y}₁₃: Identification and characterization of a novel G_{α_i}-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 705-713.
- Zhao, L., Bath, P. und Heptinstall, S.** (2001) Effects of combining three different antiplatelet agents on platelets and leukocytes in whole blood in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 134: 353-358.
- Zimmermann, H.** (1996) Extracellular purine metabolism. *Drug Dev. Res.* 39: 337-352.
- Zimmermann, H.** (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 299-309.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-meSAMP	2-Methylthio-AMP
2-meSATP	2-Methylthio-ATP
5-HT	Serotonin
$\alpha\beta$ meATP	α,β -Methylen-ATP
μ M	Mikromolar
A-317491	selektiver P2X ₃ -Antagonist ohne Nukleotidstruktur; 5-((3-phenoxybenzyl)-(1,2,3,4-tetrahydro-naphthalin-1-yl)-carbamoyl)-benzol-1,2,4-tricarbonsäure
A3P5P	Adenosin-3',5'-bisphosphat
A3P5PS	Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat
AC	Adenylatcyclase
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP _{HEX}	Mit Hexokinase aufgereinigtes ADP
ADP β S	Adenosin-5'-O-(2-thiodiphosphat)
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP _n A	Diadenosinpolyphosphate
AR-C67085	2-Propylthio-D- β,γ -dichloromethylen-ATP
ARL-66096 (AR-C66096; FPL66096)	2-Propylthio-D- β,γ -difluoromethylen-ATP
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	calciumspezifischer Chelator; Bis(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Bz-ATP	2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP
cAMP	cyclisches AMP
CD39	Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase Typ 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLII	6,6'(1,12-dioxo-5,8-dioxa-2,11-diazadodecan-1,12-diyl)bis (p-phenylen-diazen-diyl)(bispyridoxal-phosphat)
COS-7-Zellen	African green monkey kidney cells
DAG	Diacylglycerol
DRG	dorsal root ganglion
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EC ₅₀ ; pEC ₅₀	molare Konzentration, welche 50% der Maximalantwort eines Agonisten hervorruft; negativ dekadischer Logarithmus davon
E-NPP	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase / Phosphodiesterase
E-NTPDase	Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase
ERK	Kinase, die durch extrazelluläre Signale reguliert wird
G _i	inhibitorisches G-Protein
GPI	Meerschweinchen-Ileum
G-Protein	Guanylnukleotid-bindende Proteine
G _q	Phospholipase-C-stimulierendes G-Protein
HEK	Humane, embryonale Nierenzelllinie
ppHMBS	p-Hydroxymercuriphenylsulfonsäure
IC ₅₀ ; pIC ₅₀	molare Antagonistenkonzentration, die den Effekt eines Agonisten auf 50% reduziert, negativ dekadischer Logarithmus davon
IP ₃	Inositoltriphosphat
K _B -Wert; pK _B -Wert	Antagonistenkonzentration, bei der die doppelte Menge an Agonist eingesetzt werden muss um die gleiche Wirkung wie in Abwesenheit des Antagonisten zu erreichen; negativ dekadischer Logarithmus davon
K _i -Wert; pK _i -Wert	Dissoziationskonstante eines Inhibitors, negativ dekadischer Logarithmus davon
MAP	Mitogen-aktiviertes Peptid
MLC-Kinase	Myosin-Leichtketten-Kinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRS	Molecular Recognition Site
MRS 2159	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-carbonsäure
MRS 2179	N ⁶ -Methyl-2'-deoxy-adenosin-3',5'- bisphosphat
MRS 2279	2-Chloro-N ⁶ -methyl-(N)-methanocarpa-2'-desoxyadenosin-3',5'-bisphosphat
n	Anzahl unabhängiger Experimente
NDP	Nukleosiddiphosphat
NF023	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-benzolcarbonylimino))bis(1,3,5-naphthalintrisulfonsäure)
NF110	4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzoltriylobis(carbonylimino))) tetrakis-benzolsulfonsäure
NF279	8,8'-(Carbonylbis(imino-4,1-phenylencarbonylimino-4,1-phenylencarbonylimino))bis(1,3,5-naphthalintrisulfonsäure)
NF449	4,4',4'',4'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzoltriylobis(carbonylimino))) tetrakis-benzol-1,3-disulfonsäure
NF864	8,8',8'',8'''-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzoltriylobis(carbonylimino))) tetrakis-naphthalin-1,3,5-trisulfonsäure
NMP	Nukleosidmonophosphat
NTP	Nukleosidtriphosphat
P1-Rezeptoren	Nukleosidrezeptoren

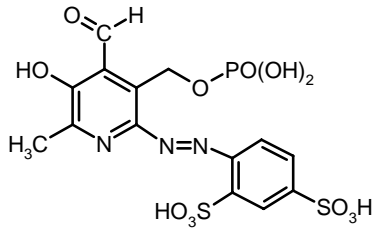
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

P2-Rezeptoren	Nukleotidrezeptoren
pA ₂ -Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration, die die Dosis-Wirkungs-Kurve eines Agonisten um den Faktor 2 nach rechts verschiebt
PC12	Phäochromozytomzelllinie der Ratte
pCMPS	p-Chloromercuriphenylsulfonsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _i	anorganisches Phosphat
PI ₃ -Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
PP _i	Pyrophosphat
PPNDS	Pyridoxal-5'-phosphat-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonat)
PRP	plättchenreiches Plasma, platelet rich plasma
r	Korrelationskoeffizient
Ras	Protein aus der Familie der "kleinen" G-Proteine
Rho	Protein aus der Familie der "kleinen" G-Proteine
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
RVD	Ratten-Vas-deferens, Samenleiter der Ratte
s.c.	shape change
SB9	6-((4,6,8-trisulpho-1-naphthyl)iminocarbonyl-1,3-(4-methylphenylen)iminocarbonyl-1,3-phenylen-azo)-pyridoxal-5'-phosphat
S.E.M.	standard error of the mean
Sf9	fibroblastenähnliche Insektenzelle
SOCE	„store operated calcium entry“, speicherabhängiger Calciueinstrom
TM	Transmembrandomäne
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-ATP
TRPC	„transient receptor potential channels“, nichtselektive Kationenkanäle
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
XLO	Xenopus-laewis-Oozyten

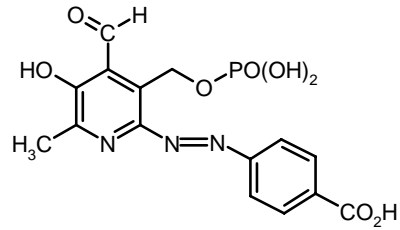
8. Formelverzeichnis

8.1. PPADS-Analoga

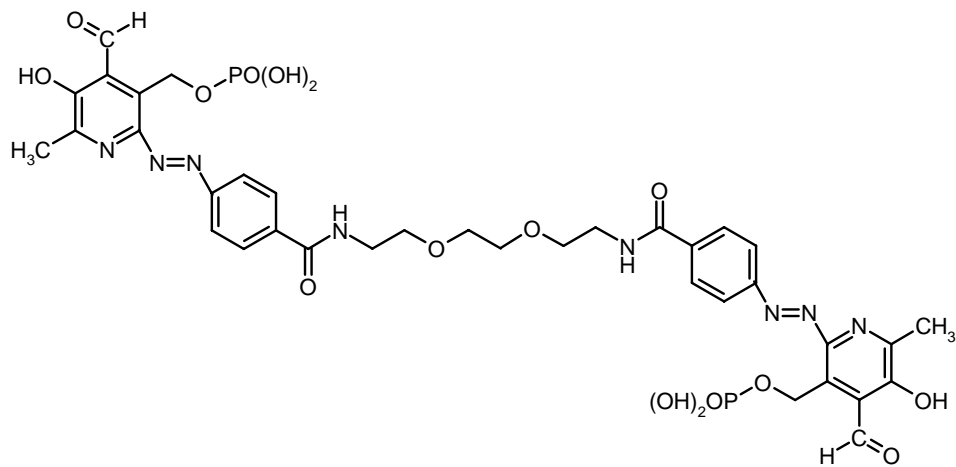
PPADS



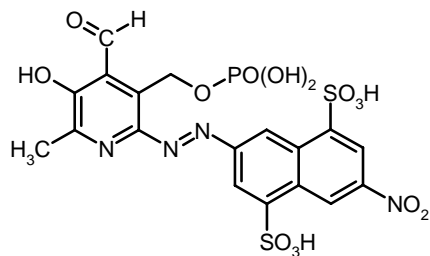
MRS2159



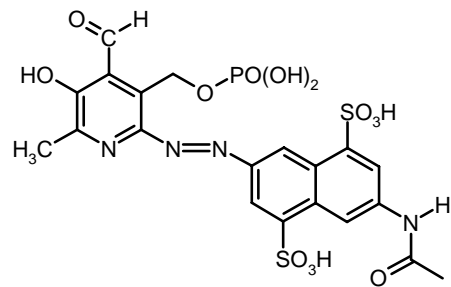
CLII



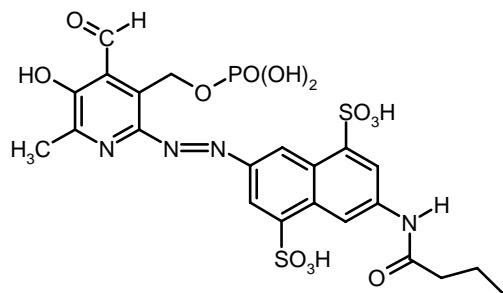
PPNDS



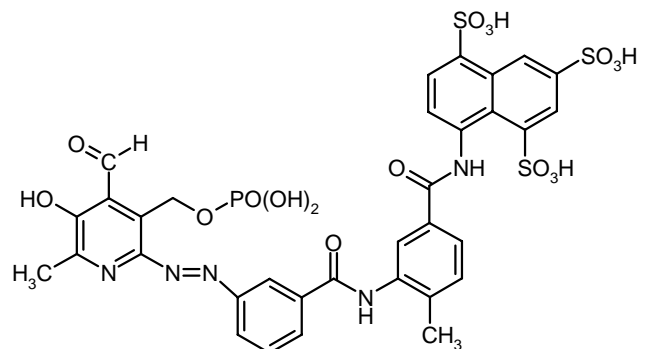
NAC



N-Butyl

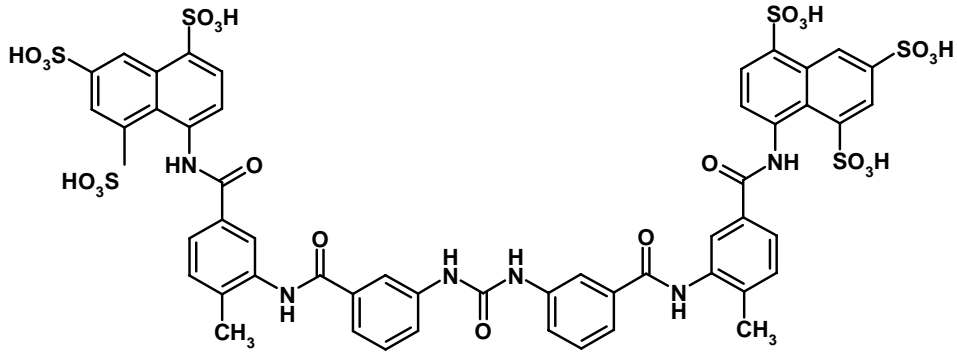


SB9

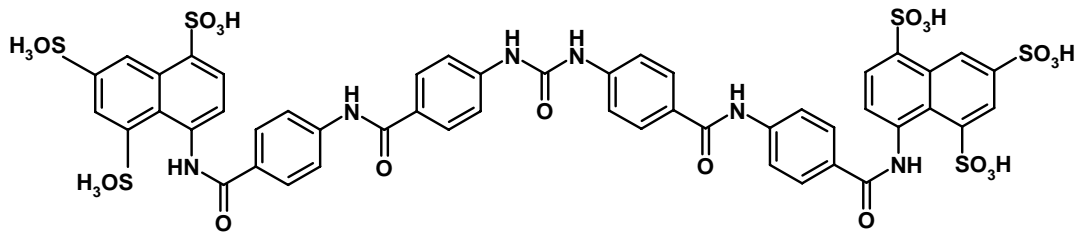


8.2. Suraminanaloga

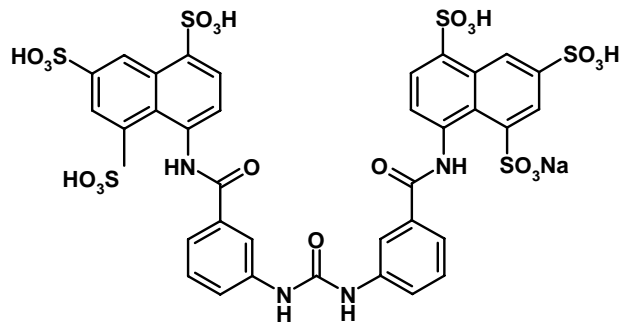
Suramin



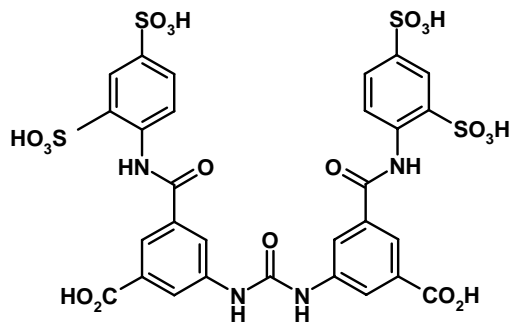
NF279



NF023

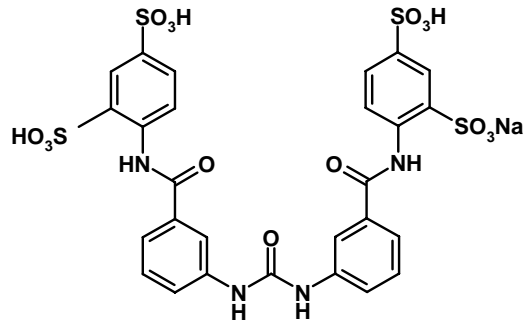


N97/66

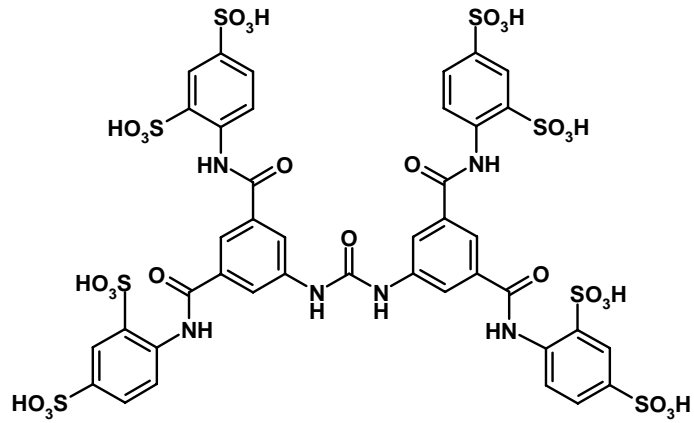


FORMELVERZEICHNIS

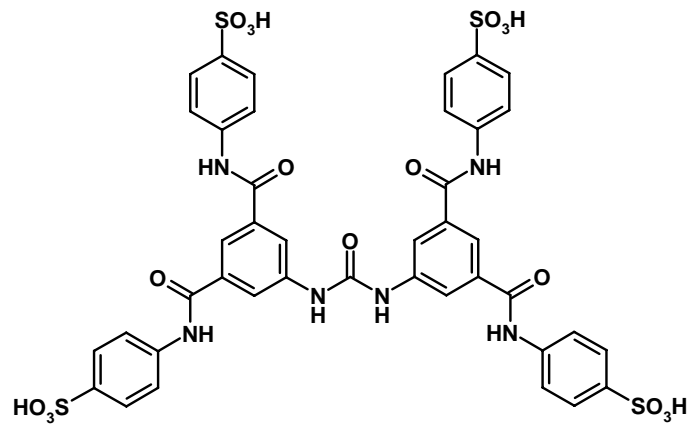
N98/33



NF449

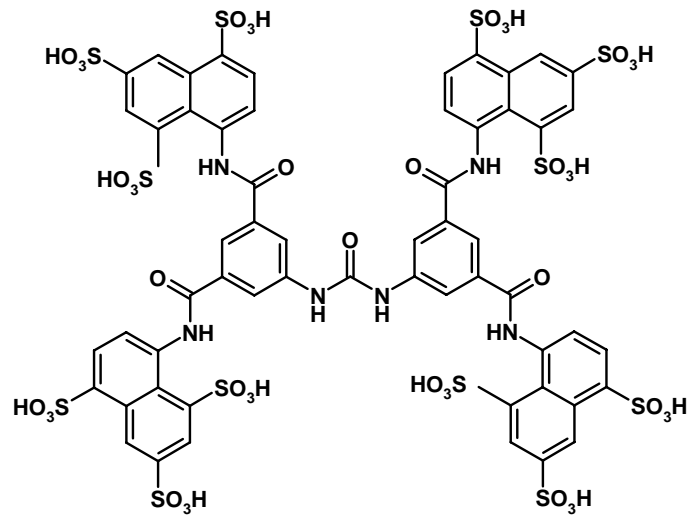


NF110



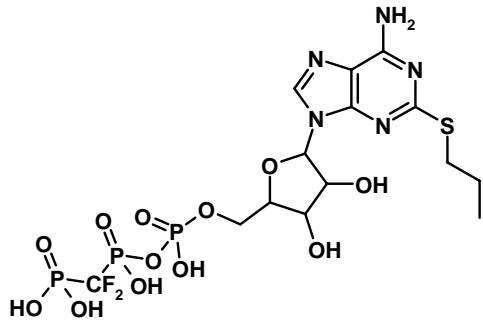
FORMELVERZEICHNIS

NF864

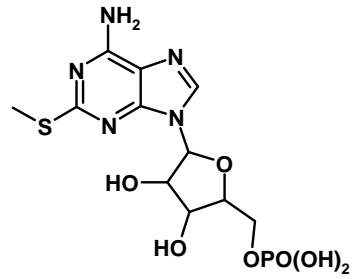


8.3. Nukleotidanaloga

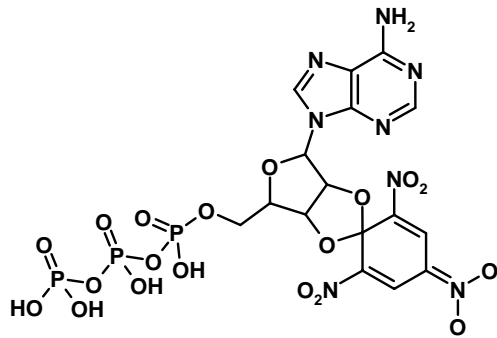
ARL66096



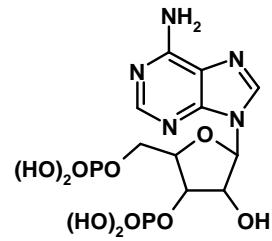
2-meSAMP



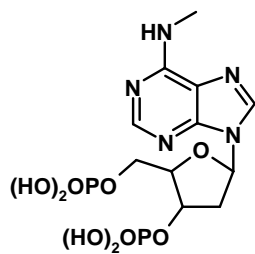
TNP-ATP



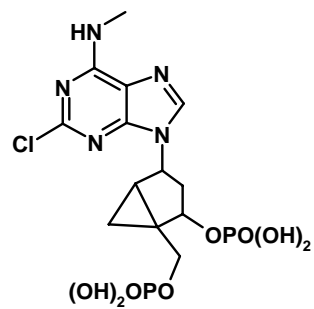
A3P5P



MRS2179



MRS2279



9. Publikationen und Kongressteilnahmen

9.1. Publikationen

Horner S., Menke K., Hildebrandt C., Kassack M. U., Nickel P., Ullmann H., Mahaut-Smith M., Lambrecht G. The novel suramin analogue NF864 selectively blocks P2X₁ receptors in human platelets with nanomolar potency. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, eingereicht.

9.2. Vorträge

Horner S., Menke K., Hildebrandt C., Kassack M. U., Nickel P., Ullmann H., Lambrecht G. (2004) The novel suramin analogue NF864 selectively blocks P2X₁ receptors in human platelets with nanomolar potency. *Symposiumsvortrag, Purines 2004. Chapel Hill, NC, USA*; zum Vortrag eingeladen.

Vorträge im Rahmen des Graduiertenkollegs „Arzneimittelentwicklung und Analytik“

Pharmakologische Untersuchungen an Nukleotidrezeptoren und Ekto-Nukleotidasen (2001)

Neue PPADS-Analoga: Untersuchungen an P2-Rezeptoren (2003)

Vergleichende pharmakologische Untersuchungen von Antagonisten an nativen und rekombinanten P2-Rezeptoren (2004)

9.3. Posterpräsentationen

7th International Symposium on Adenosine and Adenine Nucleotides, 24.-31. Mai 2002, Gold Coast, Australien.

Horner S., Ganso M., Braun K., Hildebrandt C., Lambrecht G. (2002) Is MR2179 P2Y₁-selective in whole tissues? *Drug Dev. Res.* 56: A153

44. Frühjahrstagung der DGPT, 17.-20. März 2003, Mainz, Deutschland

Menke K., **Horner S.**, Mahaut-Smith M., Hildebrandt C., Kassack M., Nickel P., Lambrecht G. (2003) NF449 and MRS2179 are useful tools to distinguish between P2X₁ and P2Y₁ receptors in human platelets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367 (Suppl. 1): R35

45. Frühjahrstagung der DGPT, 9.-11. März 2004, Mainz, Deutschland

Horner S., Hildebrandt C., Menke K., Lambrecht G. (2004) Pharmacological properties of the homomeric bivalent ligand CLII and its monomer, MRS2159, at native P2 receptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369 (Suppl.1): R30

4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides – Purines 2004, 6.-9. Juni 2004, Chapel Hill, NC, USA

Horner S., Menke K., Hildebrandt C., Kassack M. U., Nickel P., Ullmann H., Lambrecht G. (2004) The novel suramin analogue NF864 selectively blocks P2X₁ receptors in human platelets with nanomolar potency. *Abstract Book Purines 2004* http://www.purines.org/Purines2004_AbstractBook.pdf 74W

10. Lebenslauf

LEBENS LAUF

Susanne Regina Horner

05.11.1975	geboren in Würzburg
1982 - 1986	August-Becker Schule in Neustadt / Weinstraße
1986 - 1995	Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Neustadt / Weinstraße
Oktober 1995 - April 2000	Pharmaziestudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
August 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
April 2000	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2000 - Oktober 2000	Pharmaziepraktikum in der Steinern-Apotheke, Mainz-Kastell
November 2000 - April 2001	Pharmaziepraktikum bei der Firma Merck in Darmstadt
Mai 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Erteilung der Approbation als Apothekerin
seit Juni 2001	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt / Main unter Leitung von Prof. Dr. G. Lambrecht
Juni 2001 – Mai 2004	Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs "Arzneimittel – Entwicklung und Analytik"