

FUNKTIONELLE PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
P₂-REZEPTOREN UND EVALUIERUNG DES P_{2U}-REZEPTORS IM VAS
DEFERENS DER RATTE

Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Analoga der P₂-Rezeptor-Antagonisten NF023,
NF279 und SB9 an nativen P₂-Rezeptor-Subtypen und Ekto-Nukleotidasen, sowie
pharmakologische und immunzytochemische Beiträge zur Charakterisierung des P_{2U}-
Rezeptors des Vas deferens der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Matthias Ganso
aus Magdeburg, Sachsen-Anhalt

Frankfurt am Main 2004
(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. H. Zimmermann
Datum der Disputation:	2. Juli 2004

„Alles im Leben ist eine Brücke, ein Wort, ein Lächeln, das wir dem anderen schenken.“

[Ivo Andric, 1961 Nobelpreis für Literatur]

Meinen Eltern in Dankbarkeit und Katrin in Liebe gewidmet

Hintere Umschlagseite abgewandelt aus: Sobotta J., Atlas der Histologie des Menschen,
Urban und Schwarzenberg, München; 1975

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	P2-Rezeptoren	2
1.1.1	P2X-Rezeptoren	2
1.1.2	P2Y-Rezeptoren	4
1.1.3	P2X ₁ -Rezeptoren	6
1.1.4	P2Y ₁ -Rezeptoren	13
1.1.5	P _{2U} -Rezeptoren, Pyrimidinozeptoren	16
1.2	Medizinische Chemie von P2X ₁ - und P2Y ₁ -Rezeptor-Antagonisten	21
1.3	Nukleotid-spaltende Enzyme (Ekto-Nukleotidasen).....	28
1.4	Der Samenleiter der Ratte als funktionelles P2-Rezeptor- <i>In-vitro</i> -Modell	35
1.4.1	Histologie/Anatomie/Physiologie	35
1.4.2	Identifizierte P2-Rezeptoren im Vas deferens	38
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	41
2	EXPERIMENTELLER TEIL.....	47
2.1	Substanzen.....	48
2.1.1	Kommerziell bezogene Substanzen	48
2.1.2	Zur Verfügung gestellte Substanzen	50
2.1.3	Rezepturen.....	50
2.2	Geräte	52
2.3	Tiere	52
2.4	Methoden.....	53
2.4.1	Funktionelle Untersuchungen	53
2.4.1.1	Isoliertes Vas deferens der Ratte.....	53
2.4.1.2	Isoliertes Meerschweinchen-Ileum	56
2.4.1.3	Auswertung	57
2.4.2	Ekto-Nukleotidasen.....	60
2.4.2.1	<i>Xenopus laevis</i> Oozyten	60
2.4.2.2	Vas deferens der Ratte	61
2.4.2.3	Auswertung der Ekto-Nukleotidase Aktivität.....	62
2.4.3	Histo-/Immunzytochemie.....	62
2.4.3.1	Darstellung der ATPase/ADPase-Aktivität.....	62
2.4.3.2	Darstellung des P2Y ₂ -/P2Y ₄ - Rezeptors und des NTPDase2-Enzyms... 63	63

2.4.3.3 Auswertung der Histo- und Immunzytochemischen Versuche	64
2.5 Statistik	64
3 ERGEBNISSE.....	67
3.1 Entwicklung von potenten und Subtyp-selektiven P2-Rezeptor-Antagonisten und Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren	68
3.1.1 Screening von Suramin-Derivaten an nativen P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen	68
3.1.1.1 NF023-Analoga	69
3.1.1.2 Symmetrische NF279-Analoga	69
3.1.1.3 Unsymmetrische NF279-Analoga	71
3.1.1.4 SB-Analoga	72
3.1.2 Detaillierte pharmakologische Untersuchungen.....	73
3.1.2.1 NF023-Analoga	74
3.1.2.2 Symmetrische NF279-Analoga	74
3.1.2.3 Unsymmetrische NF279-Analoga	78
3.1.2.4 SB-Analoga	81
3.1.3 Pharmakologische Eigenschaften von SB9	83
3.1.3.1 Wirkgeschwindigkeit.....	84
3.1.3.2 Wirkmechanismus	86
3.1.3.3 Rezeptor-Selektivität und -Spezifität sowie Ekto-Nukleotidase-Inhibition von SB9	88
3.2 Untersuchungen zu Kontraktions-vermittelnden metabotropen P2-Rezeptoren in der <i>Pars epididymis</i> des Vas deferens der Ratte.....	90
3.2.1 Voruntersuchungen.....	90
3.2.2 Pharmakologische Untersuchung von Evans Blau	93
3.2.3 Pharmakologische Untersuchung der UTP-Kontraktion.....	94
3.2.4 Pharmakologische Untersuchung von P2-Agonisten	100
3.2.5 Pharmakologische Untersuchung von P2-Antagonisten	104
3.2.6 Histo- /Immunzytochemische Untersuchungen.....	105
3.2.6.1 Methodenoptimierung	106
3.2.6.2 Färbungen von P2Y ₂ -Rezeptor-Proteinen	106
3.2.6.3 Färbungen von Neurofilament.....	108
3.2.6.4 Färbungen von P2Y ₄ -Rezeptor-Proteinen	108
3.2.6.5 Darstellung der ATPase-/ADPase-Aktivität.....	109

3.2.6.6 Verteilung der ratNTPDase2.....	111
4 DISKUSSION	113
4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF- und SB-Analoga als P2-Rezeptor-Antagonisten	114
4.1.1 Ergebnisse aus „Screening“-Untersuchungen.....	114
4.1.2 Einfluss der Struktur von symmetrischen NF279-Analoga auf die Inhibition der P2X ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum	116
4.1.3 Einfluss der Struktur von unsymmetrischen NF279-Analoga auf die Inhibition der P2X ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum .	120
4.1.4 Einfluss der Struktur von SB-Analoga auf die Inhibition der P2X ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y ₁ -Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum	123
4.2 Der Stellenwert von NF816, NF786 und SB9 als P2Y ₁ -Rezeptor-Antagonisten in isolierten Geweben.....	127
4.3 Kontraktions-vermittelnder P2-Rezeptor für UTP in der <i>Pars epididymis</i> des Vas deferens der Ratte.....	135
4.3.1 Mögliche Zielstrukturen von Evans Blau	135
4.3.2 Metabotroper P2-Rezeptor sensitiv für UTP.....	139
4.3.3 Charakterisierung des metabotropen P2-Rezeptors mittels P2-Rezeptor-Agonisten	144
4.3.3.1 Endogene Nukleotide	146
4.3.3.2 (Partial-)synthetische Nukleotide.....	150
4.3.4 Charakterisierung des metaboropen UTP-Rezeptors mittels P2-Rezeptor-Antagonisten	156
4.3.5 Histo-/Immunzytochemische Charakterisierung von P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen in der <i>Pars epididymis</i> des Vas deferens der Ratte	164
4.3.5.1 P2-Rezeptoren.....	164
4.3.5.2 Ekto-Nukleotidasen.....	168
4.3.6 Zusammenfassende Schlußfolgerungen.....	172
5 ZUSAMMENFASSUNG	173

5.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF023-, NF279- und SB-Analoga als P2-Rezeptor-Antagonisten	174
5.2	Pharmakologische Charakterisierung von SB9	176
5.3	Charakterisierung UTP-sensitiver Rezeptoren in der <i>Pars epididymis</i> des Vas deferens der Ratte	177
6	LITERATURVERZEICHNIS	183
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	201
8	STRUKTURFORMELN.....	207
8.1	Chemische Struktur von NF023-Analoga	208
8.2	Chemische Struktur von symmetrischen NF279-Analoga	209
8.3	Chemische Struktur von unsymmetrischen NF279-Analoga	211
8.4	Chemische Struktur von SB-Analoga	213
8.5	Chemische Struktur von Vergleichssubstanzen	215
9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	217
9.1	Abbildungen	218
9.2	Tabellen	221
10	PUBLIKATIONEN/TAGUNGEN	223
10.1	Originalartikel/ Übersichtsarbeiten.....	224
10.2	Kongresse und Symposien.....	224
11	DANKSAGUNG	227
12	LEBENS LAUF.....	229

1 EINLEITUNG

1.1 P2-Rezeptoren

Nahezu alle Zellen von lebenden Organismen haben spezifische Zellmembran-Rezeptoren, um extrazelluläre Nukleotide zu binden. Diese Rezeptoren werden als P2-Rezeptoren bezeichnet, weil der endogene Agonist ATP ein Puringerüst enthält und sie sich von P1-Rezeptoren unterscheiden, welche durch das endogene Nukleosid, Adenosin, aktiviert werden. Da auch Pyrimidin-Nukleotide Liganden an P2-Rezeptoren darstellen, was man erst später feststellte, verbergen sich hinter der Abkürzung „P2-Rezeptoren“ Purino- und Pyrimidinozeptoren.

P2-Rezeptoren können in zwei Klassen unterteilt werden (Burnstock und Kennedy, 1985). Die Erste, genannt P2X-Rezeptoren, gehört zur Familie der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle (North, 1996), während die Zweite, genannt P2Y-Rezeptoren, zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten heptahelikalen Rezeptoren gehört (North und Barnard, 1997).

1.1.1 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren sind in Organismen weitverbreitete Kationen-selektive Kanäle (Ralevic und Burnstock, 1998), welche durch die Bindung von ATP innerhalb von Millisekunden öffnen. Selbst für größere Kationen wie Kalzium sind P2X-Rezeptoren gut permeabel. Bislang wurden sieben P2X-Isoformen, als P2X₁₋₇ bezeichnet, kloniert (Abbraccio et al., 2003). Die Proteine zeigen, verglichen in Paaren, 38 - 48 % Sequenz-Homologie untereinander, wobei keine Homologie zu anderen Ligand-gesteuerten Ionen-Kanälen besteht (North, 2002). Obwohl bislang noch keine Röntgen-Struktur-Analyse existiert, konnten fundamentale Unterschiede zu der ionotropen nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor-Familie (nAChR, GlyR, 5-HT₃R) und ionotropen Glutamat-Rezeptoren (GluR) aufgezeigt werden. Am auffälligsten ist die Anordnung der transmembranären Domänen: Jede Untereinheit – 384 (P2X₄) bis 595 (P2X₇) Aminosäuren lang und beide terminalen Sequenzen liegen intrazellulär – besteht lediglich aus zwei Membran-durchspannenden Domänen (jeweils ca. 20 Aminosäuren), welche durch eine große extrazelluläre und glykosylierte Peptidkette (270 Aminosäuren) verbunden sind. Der extrazelluläre Bereich beinhaltet 10 Cystein-Reste, welche fünf Disulfid-Brücken ausbilden. Wegen des hohen Grades an Konservierung der Cystein-Reste kommen ihnen eine große Bedeutung für die tertiäre Struktur und

Funktion des Rezeptors zu (Ennion und Evans, 2002). Die exakte Struktur der Agonist-Bindungsstelle ist noch unbekannt. Rezeptor-Mutationsstudien zeigten, dass die ATP-Bindungsstelle aus positiv geladenen Aminosäureresten, dicht an der Kanalöffnung gelegen, besteht (MacKenzie et al., 1999; Ennion et al., 2000; Khakh et al., 2001).

Im Vergleich zu den nAChR ist der Durchmesser der Kanalpore bei P2X-Rezeptoren etwas größer (Evans, 1996). An der Pore sind Strukturen des TM2-Segmentes beteiligt (Torres et al., 1999b; Robertson et al., 2001). Bislang ist nicht bekannt, auf welche Weise P2X-Rezeptoren die Kanal-Pore bilden. Eine weitergehende Aufweitung der Pore kann nach längerer Aktivierung durch ATP bei dem P2X₇-Rezeptor beobachtet werden, so dass neben Kalzium sogar (Fluoreszenz-) Farbstoffe die Pore passieren können (Surprenant et al., 1996; Khakh et al., 1999; Virginio et al., 1999). Wie dieser dynamische Prozeß im einzelnen abläuft, bleibt zu klären. Möglicherweise kann eine Porendilatation auch bei anderen P2X-Rezeptoren auftreten (Robertson et al., 2001).

Ein weiteres, von anderen Ligand-gesteuerten Ionenkanälen verschiedenes Merkmal, stellt die quartäre Struktur der P2X-Rezeptoren dar. Die exakte quartäre Struktur von funktionell aktiven P2X-Rezeptoren muß noch aufgeklärt werden. Wenngleich die Lagebeziehungen transmembranärer Domänen der P2X-Rezeptoren denen von epithelialen Natrium-Kanälen oder ATP-sensitiven Kalium-Kanälen ähneln, läßt sich keine vergleichbare quartäre Struktur finden (North, 1996). Für rekombinante P2X-Rezeptoren konnte mit Hilfe von Gel-Elektrophorese-Studien und Protein- vernetzenden P2-Antagonisten (CLII) sowie mit P2X₁-Rezeptor-Konkatameren gezeigt werden, dass identische P2X-Rezeptor-Untereinheiten ausschließlich trimere Protein-Komplexe bilden (Nicke et al., 1998; 2003). Wie auch andere Superfamilien der Ligand-gesteuerten Ionen-Kanäle können auch P2X-Rezeptoren aus verschiedenen P2X-Rezeptor-Untereinheiten gebildet werden. Dabei zeigt die P2X₇-Rezeptor-Untereinheit die geringste und die P2X₅-Rezeptor-Untereinheit die höchste Tendenz zur Heteromultimerisierung (North, 2002). Unklar ist, ob auch drei verschiedene P2X-Rezeptor-Untereinheiten einen funktionellen Rezeptor bilden können. Die Heteromultimerisierung könnte u.a. die funktionelle Diversität der P2X-Rezeptoren in Geweben, in denen häufig mehrere Untereinheiten detektiert werden können, begründen. Daraus könnten sich die großen Schwierigkeiten in der Bestimmung der Identität nativer P2X-Rezeptoren ergeben. Physiologisch lassen sich P2X-Rezeptoren u.a. hinsichtlich der Rezeptor-Desensibilisierung und pharmakologisch hinsichtlich der

Aktivierung durch α,β -Methylen-ATP (α,β -meATP) unterscheiden (MacKenzie et al., 1999). Ferner existieren Belege über die Wechselwirkung von P2X-Rezeptoren mit anderen Kanälen der gleichen Superfamilie wie den neuronalen nikotinischen Azetylcholinrezeptoren (Khakh et al., 2000) und 5-HT₃-Rezeptoren (Boue-Grabot et al., 2003).

P2X-Rezeptoren weisen eine breite Verteilung sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS; Nörenberg und Illes, 2000) wie auch in der Körperperipherie auf, wo sie bei einer Vielzahl biologischer Prozesse eine wichtige physiologische und pathophysiologische Rolle spielen (Ralevic und Burnstock, 1998; North, 2002). Dazu gehören die Kontraktion der glatten Muskulatur, Modulation des kardiovaskulären, respiratorischen und immunologischen Systems, Entzündung und Zelltod, Entstehung und Weiterleitung von Schmerzsignalen, schnelle synaptische Übertragung, Modulation der Transmitterfreisetzung und der neuronalen Erregung (Ralevic und Burnstock 1998; Lambrecht, 2000).

1.1.2 P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der heptahelikalen transmembranären Rezeptoren. Sie sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der Klasse A (Rodopsin- und β -adrenerg-ähnliche Rezeptoren) und fallen phylogenetisch gemeinsam mit Angiotensin II-, Opioid- und Chemokin-Rezeptoren in die Gruppe 5 (Boarder und Webb, 2001). 14 Proteine - P2Y₁ bis P2Y₁₄ - wurden mit der P2Y-Rezeptorfamilie in Verbindung gebracht und zumeist von humanen cDNA-Bibliotheken kloniert (Chambers et al., 2000; Sak und Webb, 2002; Abbracchio et al., 2003). Einige Vertreter stellen Nicht-Säugetier-Subtypen (z.B. P2Y₃ und P2Y₈), unbekannte Rezeptoren mit ähnlicher Struktur (P2Y₅, P2Y₉ und P2Y₁₀) oder Fehlbestimmungen (P2Y₇ ist der Leukotrien-Rezeptor B4) dar (Barnard et al., 2003). Die vom IUPHAR-Komitee akzeptierten 8 P2Y-Rezeptoren sind bezüglich Ihrer Liganden-Profile und Signaltransduktion verschieden und weisen unter den Spezies-orthologen Rezeptoren zum Teil auch Unterschiede auf, die eine eindeutige Identifizierung nativer P2Y-Rezeptoren erschweren (z.B. P2Y₂ und P2Y₄ der Ratte und des Menschen; King et al., 1998).

Grundsätzlich ist eine Unterteilung der P2Y-Rezeptoren hinsichtlich der Aktivierung durch Nukleotid-Agonisten (Adenin-Nukleotide bzw. Uracil-Nukleotide) möglich. So gibt es selektive Purinozeptoren (P2Y₁, P2Y₁₂ und P2Y₁₃; gültig für den

Menschen und Nager), selektive Pyrimidionzeptoren (P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₄; gültig für den Menschen) sowie Rezeptoren mit gemischer Selektivität (P2Y₂-Rezeptoren des Menschen und von Nagern sowie P2Y₄-Rezeptoren von Nagern). Eine andere sinnvolle Unterteilung berücksichtigt stärker die Sequenz-Homologie der Rezeptoren und führt zu zwei Untergruppen (Boeynames et al., 2003). Die erste Gruppe umfasst dabei spezifische purinerge Rezeptoren (P2Y₁, P2Y₁₁), spezifische pyrimidinerge Rezeptoren (hP2Y₄, hP2Y₆) und Rezeptoren mit gemischter Selektivität (P2Y₂ und rat P2Y₄). Der P2Y₁₂-Rezeptor, welcher zur zweiten Untergruppe der P2Y-Rezeptor-Familie gehört, ist strukturell mit den P2Y₁₃- und dem P2Y₁₄-Rezeptor verwandt.

Insgesamt weist diese Familie eine weite Gewebsverteilung auf. Dazu gehören autonome, zentrale, enterische und sensorische Neurone, Gliazellen, Epithelzellen, glatte Muskulatur, das Herz und sich entwickelnder Skelettmuskel sowie Niere, Leber, Lunge, Pankreas, Prostata, Thymus, Knochen und Zellen des haematopoetischen Systems (Ralevic und Burnstock, 1998).

Zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden werden von P2Y-Rezeptoren reguliert. Zum einem vermitteln P2Y-Rezeptoren die Wirkung von Liganden über die katalytische α -G-Protein-Untereinheit, zum anderen über die regulatorische $\beta\gamma$ -G-Protein-Untereinheit. Diese Untereinheiten der trimeren G-Proteine regulieren intrazelluläre Signalkaskaden, wie den IP₃-, NO- und cAMP-Stoffwechsel, bzw. membranäre Ionenkanäle, wie spannungsabhängige Kalziumkanäle und Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen (Ralevic und Burnstock 1998; Barnard et al., 2003).

Für P2Y-Rezeptoren nimmt man eine monomere Struktur an. Vermutungen über homomere Multimere wurden bislang nicht bewiesen. Allerdings existieren Belege für heteromere Multimere von rekombinanten P2Y₁- und P1-Rezeptor-(A₁R)-Proteinen (Yoshioka et al., 2001, 2002; Nakata et al., 2003). Das Vorkommen derartiger Multimere in Geweben ist umstritten, wengleich diese Rezeptoren das Phänomen nativer P3-Rezeptoren (ATP und Adenosin sind equipotente Agonisten) erklären könnten (Ralevic und Burnstock 1998).

Im Vergleich zu den vorangegangenen Abschnitten werden in den folgenden diejenigen P2 Rezeptoren konkreter erläutert, welche in dieser Arbeit eine herausragende Bedeutung haben. Dabei handelt es sich um die P2-Rezeptoren P2X₁ und P2Y₁, an welchen Struktur-Wirkungs-Beziehungen von potentiellen P2-Rezeptor-Antagonisten

ermittelt wurden, sowie um P_{2U} -Rezeptoren, deren Charakterisierung im Vas deferens vorgenommen wurde.

1.1.3 P_{2X_1} -Rezeptoren

Molekulare Struktur. Die P_{2X_1} -Rezeptor-Untereinheit der Ratte wurde aus dem Vas deferens kloniert und besteht aus 399 Aminosäuren (Valera et al., 1994). Die cDNA des Menschen und der Maus wurden ebenfalls kloniert (Valera et al., 1995). Greco und Mitarbeiter beschrieben ein um 17 Aminosäuren verkürztes P_{2X_1} -Rezeptor-Protein ($P_{2X_1\text{del}}$), welches aus einer humanen Megakaryozyten-Zelllinie und Thrombozyten isolierte und das ADP-sensitiv war (Greco et al., 2001). Eine weitere alternative Spleißvariante vom P_{2X_1} -Rezeptor des Menschen wurde beschrieben (Soto et al., 1997). Mutationen positiv geladener Aminosäuren in der extrazellulären Protein-Kette sind für die Desensibilisierung und für die Affinität von ATP zum Rezeptor von Bedeutung. So existiert beispielsweise eine natürlich vorkommende Mutation, bei der das Fehlen eines Leucins in der TM2-Region des P_{2X_1} -Rezeptors zu einem nicht-funktionellen Rezeptor führt (Oury et al., 2000). Der rekombinante P_{2X_1} -Rezeptor der Ratte besteht wahrscheinlich aus drei P_{2X_1} -Rezeptor-Untereinheiten (Nicke et al., 1998; 2003).

Physiologie. Der P_{2X_1} -Rezeptor ist für Natrium-, Kalium- und Kalziumionen durchlässig. Zwischen Natrium- und Kaliumionen bestehen nur geringe Unterschiede in der Leitfähigkeit, während – unter biionischen Bedingungen (112 mM Kalziumionen außen und 154 mM Natriumionen innen) - die Leitfähigkeit für Kalziumionen etwa Faktor 4 über der von Natriumionen liegt (Evans et al., 1996). Trotzdem müßte unter physiologischen Bedingungen der Natriumeinwärtsstrom überwiegen. Kleine organische Moleküle wie TRIS sind ebenfalls, jedoch schlechter, kanalgängig. Im sauren Milieu wird die Leitfähigkeit des P_{2X_1} -Rezeptors erniedrigt, was bei inflammatorischen Prozessen von pathophysiologischer Bedeutung sein kann. Durch die Aktivierung des rekombinanten homomeren P_{2X_1} -Rezeptors mittels ATP wird innerhalb von Millisekunden (ms) ein Ionenstrom erzeugt, welcher ebenso rasch, trotz weiterer Anwesenheit des Agonisten, wieder abnimmt. Die Abnahme des Ionenstromes in Anwesenheit des Agonisten entspricht der Rezeptor-Desensibilisierung. Der P_{2X_1} -Rezeptor unterliegt einer raschen Desensibilisierung, wobei diese in Abhängigkeit von der Rezeptorreserve erst oberhalb der EC_{50} des jeweiligen Agonisten beobachtet werden kann (North, 2002). Im Gegensatz zur Desensibilisierung ist die Resensibilisierung

extrem langsam. Dies hat in funktionellen Studien zur Folge, dass eine kumulative Gabe von Agonisten nicht möglich ist und in Abhängigkeit von der Agonisten-Konzentration genügend große Zeitintervalle in Abwesenheit von Agonisten für reproduzierbare Signale erforderlich sind (siehe Abschnitt 2.4.1.1). Darüber hinaus kann eine kontinuierliche endogene Freisetzung von ATP in das extrazelluläre Medium auf Grund der Rezeptor-Desensibilisierung die funktionelle Charakterisierung des P2X₁-Rezeptors erschweren. Mit Hilfe von Apyrase, welche den extrazellulären ATP-Spiegel erniedrigt, können die Rezeptoren in den nicht-desensibilisierten Status überführt und somit einer funktionellen Untersuchungen besser zugänglich gemacht werden. Als molekulare Ursache der Desensibilisierung konnten mittels elektrophysiologischer Untersuchungen von P2X_{1/2}-Rezeptor-Chimären zwei Regionen des P2X₁-Rezeptor-Proteins ermittelt werden (Werner et al., 1996). Beide transmembranären Domänen scheinen dabei in Anwesenheit eines Agonisten ihre Konformation zu ändern und dadurch nach der Aktivierung das Schließen des Kanals zu bewirken (North, 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen von Rettinger (Rettinger und Schmalzing, 2003) zeigten für den ratP2X₁-Rezeptor, dass für die Desensibilisierung bis zu Faktor 200 niedrigere Konzentrationen von ATP genügten als für dessen messbare Aktivierung. Die Autoren folgerten daraus, dass die Konzentration von ATP (3,2 nM), die zur halbmaximalen Desensibilisierung nötig ist, die Affinität von ATP zum Rezeptor reflektiert.

Neben der Desensibilisierung ist auch die Internalisierung des P2X₁-Rezeptors für funktionelle Untersuchungen von großer Bedeutung. Elegante Versuche mit Konstrukten aus P2X₁-Rezeptoren und Grün-Fluoreszierendem-Protein (GFP) (Dutton et al., 2000), zeigten eine Abnahme der Membran-assoziierten Fluoreszenz nach 1minütiger Anwesenheit von α,β -meATP. Die internalisierten P2X₁-GFP-Konstrukte konnten in sauren intrazellulären Vesikeln detektiert werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Ennion und Evans, als diese eine 50 %-Abnahme der biotinylierten P2X₁-Rezeptoren auf der Oberfläche glatter Muskelzellen des Vas deferens der Ratte nach 30minütiger Anwesenheit von α,β -meATP (100 μ M) beobachteten (Ennion und Evans, 2001). Dagegen zeigten funktionelle Untersuchungen eine Abnahme der P2X₁-vermittelten Kontraktion schon bei niedrigeren Agonist-Konzentrationen (10 μ M) und kürzerer Agonist-Exposition (2 min).

Eine Modulation der physiologischen Eigenschaften des P2X₁-Rezeptors, wie z.B. die Desensibilisierung und/oder die selektive Aktivierung durch Agonisten, besteht u.a. darin, dass die P2X₁-Rezeptor-Untereinheit mit anderen P2X-Rezeptor-

Untereinheiten multimerisieren kann. Bislang existieren Belege über die heteromere Multimerisierung von klonierten P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten mit P2X₂-, P2X₃-, P2X₅- und P2X₆-Rezeptor-Untereinheiten (Torres et al., 1999a; North, 2002). Allerdings ist die exakte Stöchiometrie der hetero-multimerisierten Rezeptoren unbekannt. Elektrophysiologische Untersuchungen an koexprimierten P2X₁- mit P2X₂- oder P2X₅-Rezeptor-Untereinheiten konnten hinsichtlich der Kinetik, Desensibilisierung und pH-Sensitivität von den jeweiligen Homomeren verschiedene phänotypische Merkmale aufzeigen. Beispielsweise ergab die Koexpression von P2X₁- und P2X₂-Rezeptor-Untereinheiten in *Xenopus* Oozyten bei nicht physiologischen pH-Werten eine für ATP erhöhte Potenz und intrinsische Aktivität gegenüber den jeweiligen Homomeren (Brown et al., 2002). Hinsichtlich der Desensibilisierung konnte z.B. bei dem Heteromultimer P2X_{1/5} keine Abnahme der Signalstärke bei wiederholter Applikation von ATP beobachtet werden, wenngleich bei homomeren P2X₁-Rezeptoren dies der Fall ist (North 2002). Die physiologischen Eigenschaften weiterer P2X₁-Heteromultimere ist noch nicht in der Literatur beschrieben. Aufgrund elektrophysiologischer Studien an stöchiometrisch verschiedenartig zusammengesetzten P2X_{2/3}-Rezeptoren ist anzunehmen, dass auch die Anzahl der jeweiligen P2X-Rezeptor-Untereinheiten in dem Trimer modulatorisch auf die physiologischen Eigenschaften der Heteromultimeren wirken kann (Jiang et al., 2003).

Pharmakologie. Sowohl ATP als auch α,β -meATP rufen an homomeren P2X₁-Rezeptoren in heterologen Expressionssystemen halb-maximale Wirkungen bei einer Konzentration von ca. 1 μ M hervor. Allerdings könnte die Affinität von ATP zum P2X₁-Rezeptor als Folge von Desensibilisierung und Nicht-Gleichgewichts-Bedingungen während des Aufzeichnens von Ionenströmen weit unter 1 μ M liegen (Rettinger und Schmalzing, 2003). In Radioligand-Bindungs-Studien mit verschiedenen radioaktiv markierten P2-Agonisten konnten tatsächlich nanomolare Affinitäten für P2X-Rezeptoren in Membranpräparationen isolierter glattmuskulärer Organe ermittelt werden (Michel et al., 1996; Michel und Humphrey, 1996). Im Vergleich zu diesen nanomolaren Bindungsstellen liegt die Potenz der verwendeten Agonisten an isolierten Organen dagegen im unteren mikromolaren Bereich (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht, 2000; Khakh et al., 2001). Wünschenswert wäre bei der Ermittlung pharmakologischer Parameter von P2-Antagonisten die Kenntnis von der wahren Affinität von P2-Agonisten. Insbesondere die Ermittlung von IC₅₀-Werten ist von der verwendeten Agonist-Konzentration (Affinität) abhängig (Cheng und Prusoff, 1973;

Cheng, 2002), so dass IC_{50} -Werte nur bedingt zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen vergleichbar sind.

Die pharmakologische Wirkung von ATP wird durch α,β -meATP nur an rekombinanten homomeren $P2X_1$ - und $P2X_3$ -Rezeptoren nachgeahmt und stellt damit die im Vergleich zu anderen $P2X$ -Rezeptor-Subtypen hervorstechendste pharmakologische Eigenschaft dieser zwei Subtypen dar. Etwa gleich potent wie ATP ist 2-MethylthioATP (2MeATP). Auch 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) ist ein potenter Ligand an klonierten $P2X_1$ -Rezeptoren (Bianchi et al., 1999). $P2X_1$ - vs. $P2X_3$ -selektiver (30-fach) als α,β -meATP aktiviert L- β,γ -Methylen-ATP (L- β,γ -meATP) den $P2X_1$ -Rezeptor, wobei L- β,γ -meATP bis zu Faktor 10 weniger potent als α,β -meATP ist (Trezise et al., 1995; Evans et al., 1995; North und Surprenant, 2000). Auch Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA) aktivieren klonierte $P2X_1$ -Rezeptoren. Im Vergleich zu Ap_4A ist Ap_6A ein voller Agonist, wenngleich Ap_4A potenter ist (Pintor et al., 2000). Nukleosiddiphosphate wie ADP sind um den Faktor 30 weniger potent als ATP (North und Surprenant, 2000). Geordnet nach agonistischer Potenz an rekombinanten $P2X_1$ -Rezeptoren, kann folgende Agonist-Reihe aufgestellt werden: BzATP \gg 2MeSATP \geq Ap_4A $>$ α,β -meATP \gg ADP β S $>$ ADP (Guile et al., 2001).

Zahlreiche Substanzen blockieren $P2X_1$ -vermittelte Wirkungen (Lambrecht, 2000; Jacobson et al., 2002). Vertreter dieser Substanzen stammen strukturell von Nukleotiden, Sulfonsäuren-substituierten Farbstoffen, dem Suramin oder dem Pyridoxal-Phosphat ab. An klonierten $P2X_1$ -Rezeptoren hemmt NF449 (Abb. 1.3) als Vertreter der Suramin-Klasse als einzige Verbindung ATP-induzierte Wirkungen schon im subnanomolaren Bereich (Braun et al., 2001; Hülsmann et al., 2003). Schwächer inhibitorisch wirksam – im unteren nanomolaren Bereich - sind die Nukleotide Ip_5I und TNP-ATP (Abb. 1.4). NF279 (Abb. 1.3), PPNDS und MRS 2159 (Abb. 1.2) und NF023 (Abb. 1.3) und PPADS (Abb. 1.2) im oberen nanomolaren Bereich $P2X_1$ -antagonistisch wirksam (Lambrecht, 2000; Jacobson et al., 2002). Im Falle von klonierten $P2X$ -Rezeptoren gehören die Substanzen Ip_5I , NF023, NF449, PPNDS und NF279 zu den $P2X_1$ -selektivsten Verbindungen. Dagegen sind Suramin (Abb. 1.3) und PPADS (Abb. 1.2) weitestgehend unselektiv (Guile et al., 2001). Vertreter des Pyridoxalphosphates können aufgrund der Aldehydgruppe und eines Lysinrestes in der extrazellulären Domäne des $P2X_1$ -Rezeptor-Proteins eine *Schiff*'sche Base bilden, was zu einer langsameren Dissoziation vom Rezeptor führt (Buell et al., 1996). Diese Eigenschaft kann zu einem pseudoirreversiblen Antagonismus führen (Kenakin, 1993).

Native P2X₁-Rezeptoren. Die P2X₁-Rezeptor-Untereinheit hat eine weite Verbreitung in Geweben. Allerdings wird die höchste Expression der P2X₁-Rezeptor-Untereinheit in der glatten Muskulatur beobachtet (Valera et al., 1994; Collo et al., 1996), wobei diese P2X-Rezeptor-Untereinheit nicht universell auf diesem Gewebe exprimiert wird (Vial und Evans, 2001). P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten wurden aus der Blase des Menschen, der Maus sowie aus dem Vas deferens der Ratte kloniert (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese und andere Gründe führten dazu, dass das Vas deferens der Ratte als Standard-Modell für native P2X₁-Rezeptoren gilt (siehe auch Damer, 2002). RT-PCR- und P2X₁-Rezeptor-Antikörper-Studien beweisen jedoch nicht die homomere Natur des P2X₁-Rezeptors. Ergebnisse aus Untersuchungen mit P2X₁-Rezeptor-Untereinheit-Knockout-Mäusen, sowie elektrophysiologische Untersuchungen von isolierten Muskelzellen des Vas deferens zeigten große Ähnlichkeiten zu heterolog exprimierten homomeren P2X₁-Rezeptoren (Khakh et al., 1995; North, 2002), so dass eine essentielle Rolle der P2X₁-Untereinheit am Phänotyp des nativen P2X₁-(ähnlichen)-Rezeptors vermutet werden kann. Der durch ATP verursachte Einwärtsstrom an isolierten Muskelzellen der Blase des Meerschweinchens besteht zu rund 6 % aus Kalziumionen (Schneider et al., 1991). Dieser Einstrom genügt, um Spannungs-gesteuerte Kalzium-Kanäle vom L-Typ zu hemmen. P2X-Rezeptoren der Blase und des Vas deferens des Meerschweinchens vermitteln Kontraktionen, induziert durch α,β -meATP, welche mit sinkender Temperatur zunehmen (Ziganshin et al., 2002a). Auch auf der glatten Muskulatur der Blutgefäße (z.B. *Vena saphena*, *Vena porta*, *Vena mesenterica*, *Vena umbilicalis*) konnten P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten belegt werden (Kunapuli und Daniel, 1998; Boarder und Hourani, 1998), die vergleichbare funktionelle Merkmale zum homomeren P2X₁-Rezeptor-Subtyp aufweisen (Ralevic, 2000; North, 2002). Immunhistochemische Studien zeigten für die glatte Muskulatur afferenter glomerulärer Arteriolen (North, 2002) und Muskelzellen des Herzens (Hansen et al., 1999; Vassort, 2001) ebenfalls die Expression von P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten.

Periphere Lymphozyten und solche von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) wurden umfangreich von Wiley und Mitarbeitern untersucht (Sluyter et al., 2001). Deren immunhistochemische Untersuchungen konnten die Expression der P2X₁-Untereinheit feststellen. Auch bei Thymozyten unterschiedlichen Reifegrades wurden zum einen die kodierende mRNA detektiert als auch elektrophysiologische Befunde für die P2X₁-Untereinheit beschrieben (Hourani, 2001). Ebenfalls aus dem hämatopoetischen System stammend, exprimieren Thrombozyten mit großer

Wahrscheinlichkeit homomere P2X₁-Rezeptoren (Hourani, 2001; Di Virgilio, 2001; North, 2002).

P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten wurden zunächst nicht mit purinergen zentralnervösen Effekten in Verbindung gebracht, jedoch konnte mittels elektronenmikroskopischen und zytochemischen Studien im Cerebellum die Beteiligung der P2X₁-Untereinheit an der synaptischen Transmission belegt werden (Loesch und Burnstock, 1998).

Therapeutische Bedeutung. Da die funktionellen Eigenschaften von heterolog exprimierten P2X-Rezeptoren nicht in allen Belangen mit denen von nativen P2X₁-Rezeptoren übereinstimmen (Khakh et al., 2001), ist die eindeutige Charakterisierung von nativen P2X₁-Rezeptoren in Geweben schwierig. Wenn physiologische und pathophysiologische Wirkungen von ATP nicht eindeutig bestimmten P2-Rezeptor-Subtypen zugeordnet werden können, ist die Entwicklung selektiver Liganden für native Rezeptoren erschwert. Ein Durchbruch bezüglich der physiologischen Bedeutung des P2X₁-Rezeptors gelang mit der Herstellung von P2X₁-Rezeptor-„Knockout“-Mäusen (Mulryan et al., 2000). Die männlichen Tiere wiesen eine 90 %ige Reduktion der Fertilität auf. Die Infertilität wurde auf eine Azoospermie bzw. Oligozoospermie ohne Beeinflussung der Spermatogenese und diese wiederum auf eine kontraktile Dysfunktion des Vas deferens zurückgeführt. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass ein selektiver P2X₁-Rezeptor-Antagonist ein geeignetes nicht-hormonelles Kontrazeptivum für den Mann darstellen könne (Dunn, 2000). Gleichfalls hohe P2X₁-Rezeptordichten liegen in der glatten Muskulatur der Blase vor (O'Reilly et al., 2001). Parasympathische Erregungen führen zur Kotransmission von ATP und Acetylcholin (ACh), welche eine Kontraktion des Detrusors über P2X₁(-ähnliche)- bzw. M₂/M₃-Rezeptoren verursachen. M₃-Rezeptoren haben einen geringeren Anteil an der neurogenen Kontraktion bei der funktionellen Inkontinenzform der überaktiven Blase, während ca. 50 % der neurogenen Kontraktion über P2X₁-Rezeptoren vermittelt zu sein scheinen (Andersson, 2002). Exakte Untersuchungen, insbesondere die Berücksichtigung von pathologischen P2X-Rezeptor-Expressionsmustern, müssen in Zukunft durchgeführt werden, um das therapeutische Potential von selektiven P2X₁-Antagonisten bei der Blaseninkontinenz besser abschätzen zu können.

Neben der glatten Muskulatur von Organen des Uro-Genital-Traktes steht auch diejenige von Blutgefäßen im therapeutischen Interesse. ATP verursacht u.a. über P2X₁-Rezeptoren die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und kann daher zu erhöhtem

Blutdruck und zu Krankheiten führen, welche im Zusammenhang mit erhöhtem Vasotonus auftreten. Ob die P2X₁-Rezeptor-Untereinheit beim Menschen eine bedeutende pathophysiologische Rolle bei Gefäßerkrankungen spielt, muß noch bewiesen werden. Jedoch lassen Hinweise aus Studien mit spontan hypertensiven Ratten vermuten, dass dem Kostransmitter ATP im Vergleich zu Noradrenalin eine größere pathophysiologische Bedeutung zukommt (Burnstock, 1998). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann die Rolle von P2X₁-Rezeptoren zunehmen. Beispielsweise ließ sich eine Induktion der mRNA für P2X₁-Rezeptoren im linken Ventrikel von Ratten mit kongestiver Herzinsuffizienz feststellen (Hou et al., 1999). Erste *In-vivo*-Untersuchungen mit P2-Antagonisten wie PPADS zeigten antihypertensive Wirkungen (Burnstock, 1998). Sollte die pathophysiologische Bedeutung der P2X₁-Rezeptor-Untereinheit bei kardio-vaskulären Erkrankungen des Menschen tatsächlich eine tragende Rolle spielen, dann könnte ein selektiver P2X₁-Rezeptor-Antagonist ein therapeutisches Potential u.a. für pulmonale Hypertension, kongestive Herzinsuffizienz, Bluthochdruck und koronare Herzkrankheit haben.

Die biologische Funktion von P2X₁-Rezeptoren auf Thrombozyten ist Gegenstand zahlreicher Publikationen (für Übersichtsarbeit siehe: Hourani, 2001). Dennoch ist die Rolle dieses Rezeptors bei der Thrombozyten-Aggregation unklar. Kontrovers ist auch die Wirkung von ADP an diesem Rezeptor-Subtyp. Zum einem kann eine Verunreinigung von ADP-Chargen mit ATP zu einer scheinbaren agonistischen Aktivität von ADP führen (Mahaut-Smith et al., 2000) und zum andern konnte eine Spleißvariante detektiert werden, die sensitiv für ADP und ATP aber nicht für α,β -meATP ist (Greco et al., 2001). Die elektrophysiologische Untersuchung dieser Variante im Vergleich zum Wildtyp könnte in diesem Fall Klärung bringen. Bezüglich der Funktion des P2X₁-Rezeptors wurde Widersprüchliches berichtet. Eine Aktivierung von Thrombozyten des Menschen durch α,β -meATP führte weder zu einer Aggregation noch zu einer Formveränderung (shape change) der Thrombozyten, wohl aber zu einem Kalzium-Einstrom (Kunapuli und Daniel, 1998). Ein Grund für diese Befunde könnte in der raschen Desensibilisierung des P2X₁-Rezeptors, verursacht durch endogen freigesetztes ATP, liegen (North und Surprenant, 2000). Wenn die Wirkung von endogenem ATP durch Zusatz von Apyrase vermieden wird, kann ein α,β -meATP-induzierter Kalzium-Einstrom und darüberhinaus eine Formveränderung der Thrombozyten beobachtet werden (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Durch P2X₁-Überexpressions-Studien konnte ein verstärkter Kalziumeinstrom, „shape-change“ und

sogar eine verstärkte Sekretion und Aggregation, induziert durch Kollagen, Scher-Streß und Thromboxan A₂ (TXA₂), beobachtet werden (Oury et al., 2003). Welche Rolle der Kalzium-Einstrom durch P2X₁-Rezeptoren und die Formveränderung der Thrombozyten im Sinne eines therapeutischen Potentials spielen, muß in Zukunft geklärt werden.

1.1.4 P2Y₁-Rezeptoren

Molekulare Struktur. Der P2Y₁-Rezeptor wurde zuerst aus dem Hirn des Huhns kloniert und zur Charakterisierung in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Weitere Homologe wurden vom Truthahn, vom Ileum der Ratte, Insulinomzellen, bovinen Endothelzellen, der humanen Plazenta, Gehirn, Prostata und Ovarien isoliert (Guile et al., 2001). Das humane Rezeptor-Protein besteht aus 377 Aminosäuren (AS). Das relativ kurze Protein (vgl. P2X₁ = 399 AS) druchspannt mit 7 α -helikalen Domänen die Zellmembran, wobei der N-Terminus (53 AS) extra- und der C-Terminus (47 AS) intrazellulär gelegen ist (Boarder und Webb, 2001). Vom N-Terminus aus ist die erste und zweite extrazelluläre Schleife glykosyliert (Boarder und Webb, 2001). Strukturelle Informationen basierend auf einer Bakterien-Rhodopsin-Vorlage (Moro et al., 1998) halfen bei der Aufklärung der Ligand-Bindungs-Stelle des Rezeptors. Dieses Modell zeigte, dass Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen 3, 5, 6 und 7 an der Ligand-Bindung beteiligt sind (von Kügelgen und Wetter, 2000). Durch zielgerichtete Mutagenese konnten hydrophile Aminosäuren in den gleichen transmembranären Domänen identifiziert werden, die ebenfalls an der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung beteiligt sind (Moro et al., 1998). Allerdings ließen sich erst durch den Einsatz von Antagonisten wie MRS 2179 und PPADS für die Ligandbindung Affinitäts-relevante Aminosäuren exakt bestimmen (Moro und Jacobson, 2002). Eine besondere Rolle für die Antagonist-Bindung konnte den Transmembran-Regionen 6 bzw. 7 in Position 280 bzw. 307 zugewiesen werden. Ebenso konnten durch zielgerichtete Mutagenese zwei Disulfid-Brücken in den extrazellulären Schleifen des P2Y₁-Rezeptors ermittelt werden, welche Bedeutung für die Ligandbindungs-Domäne und den Transport von P2Y₁-Rezeptoren an die Zelloberfläche haben können (Guile et al., 2001).

Physiologie. Sowohl klonierte und heterolog exprimierte als auch native P2Y₁-Rezeptoren koppeln intrazellulär an G_{q/11}-Proteine. Dadurch wird die Phospholipase C β aktiviert, was zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG)

führt. Schließlich reguliert IP_3 den intrazellulären Kalziumhaushalt der Zelle. Weiterhin konnte auch die Aktivierung der PKC-abhängigen Ras-ERK-Kaskade, der Phosphoinositol-3-Kinase (PI_3 -K) sowie der Stress-aktivierten Proteinkinase durch die Aktivierung des $P2Y_1$ -Rezeptors belegt werden (Barnard et al., 2003). Gemeinsam in einer Zelle exprimierte A_1 - und $P2Y_1$ -Rezeptoren bilden Heterodimere und weisen von $P2Y_1$ -Rezeptoren verschiedene physiologische Eigenschaften auf (Yoshioka et al., 2001; Nakata et al., 2003). Eine Desensibilisierung des $P2Y_1$ -Rezeptors kann im Zusammenhang mit Rezeptor-Phosphorylierungen durch Proteinkinasen auftreten (Ralevic und Burnstock, 1998).

Pharmakologie. Die pharmakologische $P2Y_1$ -Rezeptor-Charakterisierung wird in hohem Maße von der Instabilität der Liganden gegenüber Ekto-Nukleotidasen, der Rezeptordichte in Expressionssystemen und heterogenen Rezeptorpopulationen in nativen Geweben gestört (Barnard, 2000). Aus diesem Grund sind Wirkstärken-Reihenfolgen von Agonisten, die zur Identifizierung dieses Rezeptors dienen, z.T. schwierig zu interpretieren. Die endogenen Liganden des $P2Y_1$ -Rezeptors sind ATP, ADP und einige Diadenosinpolyphosphate (Ap_nA , $n < 4$), während UTP und UDP inaktiv sind. Im Allgemeinen scheinen Nukleosiddiphosphate wie ADP bzw. 2MeSADP am $P2Y_1$ -Rezeptor potenter als Nukleosidtriphosphate zu sein. Die Wirkung von ATP bleibt strittig. Zum einem ist ATP ein Agonist variabler Potenz und zum anderen ein partieller Agonist oder gar ein Antagonist (Ralevic und Burnstock, 1998; von Kügelgen und Wetter, 2000; Boarder und Webb, 2001). Allerdings werden klonierte $P2Y_1$ -Rezeptoren und native $P2Y_1$ -ähnliche-Rezeptoren effektiv durch 2MeSADP, ADP oder ADP β S aktiviert. Folgende Agonist-Reihe ist für klonierte $P2Y_1$ -Rezeptoren charakteristisch: 2MeSADP > 2MeSATP \geq ADP > ATP (Jacobson und Knutsen, 2001). Die Aktivierung des $P2Y_1$ -Rezeptors kann zur Kontraktion glatter Muskulatur, zur Freisetzung von NO aus Endothelien, zur Aktivierung von Ionen-Kanälen und zur Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) führen.

Zu den Antagonisten die $P2Y_1$ -vermittelte Wirkungen blockieren, gehören Suramin (Abb. 1.3), PPADS (Abb. 1.2), SB9 (Abschnitt 8.4), histochemische Farbstoffe und Nukleotid-Derivate (Lambrecht et al., 1996a, 2000a; 2002a Jacobson et al., 2002;). Insbesondere Nukleotid-Derivate (Abb. 1.4) konnten mit Hilfe von Struktur-Wirkungs-Beziehungen erfolgreich zu potenten und selektiven $P2Y_1$ -Rezeptor-Antagonisten, wie MRS 2179 bzw. MRS 2279 (Abb. 1.4) entwickelt werden (Ralevic und Burnstock, 1998; Jacobson et al., 2002; King, 2002). Bei den Nukleotid-Derivaten, mit welchen der

rekombinante P2Y₁-Rezeptor gut von anderen P2-Subtypen unterscheidbar ist, besteht die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus in Geweben und Zellkulturen, was zu einer scheinbar geringeren Affinität führen kann (Horner et al., 2002) und deren Brauchbarkeit limitieren könnte. Selbst im Falle von Radioligand-Bindungs-Messungen sind Ekto-Nukleotidasen in Membranpräparationen störend, wenn „heiße“ oder „kalte“ Liganden metabolisch nicht stabil sind (Waldo et al., 2002). Die Aufreinigung des humanen P2Y₁-Rezeptor-Proteins sowie Rekonstitutionierung in Ekto-Nukleotidasefreien Membranen und anschließender funktioneller Charakterisierung wird Gewissheit über die Bindung von Liganden und insbesondere von ATP geben können (persönliche Mitteilung T. K. Harden).

Native P2Y₁-Rezeptoren. Wie klonierte werden auch native P2Y₁-Rezeptoren bevorzugt durch Nukleosiddiphosphate aktiviert und im gleichen Ausmaß durch Antagonisten blockiert. Allerdings bestehen hinsichtlich Ligand-Bindungs-Profilen Unterschiede zwischen einzelnen Spezies, die höchstwahrscheinlich auf strukturelle Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz zurückzuführen sind (Ralevic und Burnstock, 1998). Unterschiede in der Sequenzhomologie könnten der Grund dafür sein, dass unter gleichen Bedingungen A3P5P und A3P5PS (Abb. 1.4) partielle Agonisten an P2Y₁-Rezeptoren des Truthahns, nicht aber an orthologen Rezeptoren des Menschen sind (Boyer et al., 1996). Die Heterogenität bezüglich der Ligandbindung betrifft sowohl Agonisten als auch Antagonisten. So konnten Boyer und Mitarbeiter für die Affinität von MRS 2279 Unterschiede zwischen den orthologen P2Y₁-Rezeptoren des Menschen und des Truthahns beobachten (Boyer et al., 2002). Native P2Y₁-Rezeptoren koppeln an verschiedene Signal-Transduktionswege und liegen in Geweben häufig mit andern P2Y-Rezeptoren vergesellschaftet vor. Erschwerend für die Interpretation pharmakologischer Daten in Geweben ist die Interkonversion von Nukleotiden bei gleichzeitiger P2Y-Rezeptor-Heterogenität. Beispielsweise könnte die scheinbare Wirkung von ATP an nativen P2Y₁-Rezeptoren durch die Konversion zu ADP oder im Falle einer P2Y₁- und P2Y₂-Rezeptor-Heterogenität (z.B. in Endothelien) durch die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors durch ATP zustandekommen (Ralevic und Burnstock, 1998).

Therapeutische Bedeutung. Abgesehen von Erkenntnissen aus Experimenten mit P2Y₁-Knockout-Mäusen ist wenig über die physiologische Rolle von P2Y₁-Rezeptoren bekannt. Trotz der weiten Verbreitung des P2Y₁-Rezeptors sind P2Y₁-Knockout-Mäuse lebensfähig und zeigen keine Abnormitäten hinsichtlich der Entwicklung, des Überlebens, der Reproduktion und der Thrombozytenanzahl und der Morphologie

(Leon et al., 1999). Genauere Untersuchungen ergaben jedoch folgendes: Thrombozyten von P2Y₁-Knockout-Mäusen aggregieren entweder nach Zugabe physiologischer Konzentrationen von ADP nicht oder die Aggregation induziert durch proaggregatorische Agonisten ist beeinträchtigt. Hieraus ergibt sich eine potentielle Bedeutung für den P2Y₁-Rezeptor in thromboembolischen Prozessen. Mit Hilfe des P2Y₁-Antagonisten MRS 2279 konnte die absolute Rezeptor-Zahl von rund 5-35 Rezeptoren pro Thrombozyt ermittelt werden (Waldo et al., 2002) und die Rolle des P2Y₁-Rezeptors funktionell mit MRS 2279 *in vitro* und mit MRS 2179 *in vivo* bestätigt werden (Boyer et al., 2002; Lenain et al., 2003). Versuche mit Mäusen, welche den P2Y₁-Rezeptor überexprimierten, zeigten eine verkürzte Blutungszeit und eine erhöhte Sensitivität für die Thrombozyten-Aggregation *in vivo* (Hechler et al., 2003). Somit konnte die physiologische Bedeutung des P2Y₁-Rezeptors im Rahmen der Thrombozyten-Aggregation eindeutig bewiesen werden und stellt eine wichtige Zielstruktur für neue Antithrombotika dar. Ob Patienten in Zukunft in Anbetracht der guten Verträglichkeit anderer antiaggregatorischer Arzneistoffe von oral verfügbaren P2Y₁-Antagonisten profitieren werden, bleibt unklar (siehe auch Cattaneo, 2003).

Mehr spekulativer Art sind die Befunde in anderen Geweben. So konnte bei peroraler Gabe eine ADP β S-induzierte Sekretion von Insulin beobachtet und die Expression verschiedener P2Y-Rezeptoren auf β -Zellen des Pankreas detektiert werden (Ziganshin et al., 2002b). Hier zeigen P2Y₁-(ähnliche)-Rezeptoren neue Möglichkeiten der Reduktion des Blutglucosespiegels auf. Eine weitere interessante Beobachtung betrifft das Knochengewebe. P2Y₁-Rezeptoren, exprimiert von Schädel-Osteoklasten der Maus, werden durch ADP aktiviert und induzieren eine Osteolyse und Knochenresorption (Jacobson et al., 2002). In diesem Zusammenhang könnten P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten im Rahmen der Osteoporose oder osteolytischen Metastasen eine Bedeutung haben.

1.1.5 P_{2U}-Rezeptoren, Pyrimidinozeptoren

Im Bezug zur pharmakologischen Wirkung von ATP/ADP und UTP/UDP wurden zahlreiche Unterschiede gefunden, die eine Unterteilung nativer P2Y-Rezeptoren in Purino- und Pyrimidinozeptoren rechtfertigten (Seifert und Schultz, 1989). Arbeiten an klonierten und exprimierten Rezeptoren konnten diese Unterschiede bestätigen. Historisch wurde ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der gleich potent durch die Purin- und Pyrimidinnukleotide ATP und UTP aktiviert wird aber nicht sensitiv für α,β -

meATP und 2MeSATP ist, als P_{2U}-Rezeptor bezeichnet (O'Connor et al., 1991; Abbracchio et al., 1993; Ralevic und Burnstock, 1998). Der P_{2U}-Rezeptor konnte durch folgende Agonist-Reihenfolge beschrieben werden: UTP = ATP ≥ ATPγS > > ADP > 2MeSATP, α,β-meATP (Abbracchio et al., 1993, King et al., 1998). Schon sehr bald zeigte sich, dass diese Nomenklatur (P_{2U}), welche die Identität von einem einzigen klonierten P2Y-Rezeptor-Subtyp für den P_{2U}-Rezeptor implizierte, für die z.T. widersprüchlichen Befunde in Geweben nicht genügte. Die Bezeichnung „P_{2U}-Rezeptor“ wurde als Synonym für den P2Y₂-Rezeptor und die des „Pyrimidinozeptor“ für den (humanen) P2Y₄-Rezeptor gebraucht (Harden et al., 1998). Anlass dazu gab die im Unterschied zum P2Y₂-Rezeptor selektive Aktivierung des P2Y₄-Rezeptor durch UTP aber nicht durch ATP. Sukzessives Klonieren und Exprimieren homologer P2Y-Rezeptoren führte zur Erweiterung der klonierten P2Y-Rezeptoren. Zusätzlich wurden der P2Y₆-Rezeptor, welcher UDP-selektiv ist und erst kürzlich der P2Y₁₄-Rezeptor, welcher potent durch UDP-Glucose aktiviert wird, kloniert (Harden et al., 1998; Chambers et al., 2000; Abbracchio et al., 2003). Damit existieren also noch weitere selektiv durch Pyrimidin-Nukleotide aktivierbare P2Y-Rezeptoren. Da ursprünglich der P_{2U}-Rezeptor ausschließlich als Synonym für den P2Y₂-Rezeptor gebraucht und somit weitere P2Y-Rezeptor-Subtypen ausgegrenzt wurden (Harden et al., 1998), können dagegen mit dem Begriff Pyrimidinozeptoren auch weitere UTP/UDP-sensitive Rezeptoren (z.B. P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₄) neben dem P2Y₂-Rezeptor eingeschlossen werden. In dieser Arbeit findet der Begriff Pyrimidinozeptor eine Anwendung im weiteren Sinne und zwar für alle durch Pyrimidin-Nukleotide aktivierbaren Rezeptoren. Derzeit zählen zu den durch Pyrimidin-Nukleotide aktivierbaren Rezeptoren die Subtypen P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ und P2Y₁₄ (Boeynaems et al., 1996; King et al., 1998; Communi et al., 2000; Boarder und Webb, 2001; Abbracchio et al., 2003). Für Pyrimidin-Nukleotide konnte bislang keine Aktivität an P2X-Rezeptoren festgestellt werden. Die Pyrimidinozeptoren lassen sich mit Hilfe von Agonist-Aktivitäts-Rangfolgen von P2-Antagonisten unterscheiden (King et al., 1998). Nach heutigem Wissenstand sind die nativen, mit klassischen, pharmakologischen Methoden charakterisierten P_{2U}-Rezeptoren nicht immer eindeutig den rekombinanten P2Y_{2,4,6,14} zuzuordnen (Davidson et al., 1990; O'Connor et al., 1991; King et al., 1998; Boarder und Webb, 2001; Müller, 2002). Im folgenden Abschnitt wird näher auf die P2Y_{2/4}-Rezeptorsubtypen eingegangen, da diese P2Y-Rezeptoren schwer pharmakologisch zu unterscheiden sind.

Der **P2Y₂-Rezeptor** wurde aus verschiedenen Säugetier-Geweben, wie solche vom Menschen (Parr et al., 1994), der Maus (Lustig et al., 1993), dem Hund (Zambon et al., 2000) und der Ratte (Rice et al., 1995; Chen et al., 1996; Gödecke et al., 1996; Seye et al., 1997) kloniert. Agonisten sind der Lage eine Desensibilisierung und Internalisierung des P2Y₂-Rezeptors zu induzieren. Als Mechanismus werden Phosphorylierungen des C-terminalen Endes des Rezeptorprotein angenommen (Boarder und Webb, 2001). Studien an humanen P2Y₂-Rezeptoren und an denen der Ratte zeigten, übereinstimmend mit Ergebnissen an P_{2U}-Rezeptoren in Geweben, dass Nukleosiddiphosphate weitestgehend inaktiv bzw. schwach wirksam sind (King et al., 1998; Ralevic und Burnstock, 1998). Die selektive Aktivierung von hP2Y₂- und nativen P_{2U}-Rezeptoren durch ATP/UTP gleichermaßen kann daher als Werkzeug zur Charakterisierung nativer Pyrimidinozeptoren in humanen Geweben benutzt werden. Dem ist allerdings bei Geweben der Ratte nicht so (Bogdanov et al., 1998). Bei P_{2U}-Rezeptoren der Ratte scheint es aufgrund von Spezies-Unterschieden zum Menschen mehr als einen korrespondierenden klonierten Rezeptorsubtyp, nämlich ratP2Y₂ und ratP2Y₄, zu geben (Ralevic und Burnstock, 1998; Boarder und Webb, 2001). Mit der Klonierung des humanen **P2Y₄-Rezeptors** (Communi et al., 1995; Nguyen et al., 1995) und der Expression in 1321N1-Zellen wurde ein Rezeptor charakterisiert, an dem UTP ein voller Agonist (Communi et al., 1995; Nguyen et al., 1995; Communi et al., 1996; Charlton et al., 1996a), ATP jedoch schwach wirksam (Charlton et al., 1996a) bzw. inaktiv ist (Nguyen et al., 1995; Communi et al., 1996). Darüber hinaus waren auch Nukleosiddiphosphate an hP2Y₄-Rezeptoren schwach wirksam. Kennedy und Mitarbeiter konnten in 1321N1-Zellen sogar zeigen, dass ATP antagonistisch am hP2Y₄-Rezeptor wirkt [$K_B = 0,7 \mu\text{M}$; (Kennedy et al., 2000)]. Das galt jedoch nicht für den P2Y₄-Rezeptor der Ratte. An in 1321N1- und Jurkat-Zellen sowie *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten ratP2Y₄-Rezeptoren ist ATP wie UTP ein voller Agonist mit vergleichbaren EC₅₀-Werten von 0,51 bzw. 0,2 μM (Bogdanov et al., 1998; Webb et al., 1998; Kennedy et al., 2000). Somit bestehen zwischen den orthologen Rezeptoren hP2Y₄ und ratP2Y₄ Speziesunterschiede, die bei der Beurteilung der Agonist-Aktivitätsreihenfolge an nativen Pyrimidinozeptoren berücksichtigt werden müssen (Boarder und Webb, 2001). An dieser Stelle soll nochmals hervorgehoben werden, dass nach heutigem Kenntnisstand der native humane P_{2U}-Rezeptor am besten mit dem rekombinanten hP2Y₂-Rezeptor korrespondiert, während Wirkungen an P_{2U}-Rezeptoren in Geweben der Ratte am besten mit der Existenz von zwei Rezeptoren, dem ratP2Y₂

und ratP2Y₄, erklärbar sind.

P_{2U}-Rezeptor-Antagonisten. Zur Charakterisierung von P_{2U}-Rezeptoren wurden hauptsächlich Suramin, PPADS und Reaktiv Blau 2 (siehe folgendes Kapitel; RB 2) verwendet. Vorteilhaft ist, dass diese Liganden weitverbreitet sind und ihre Wirkstärke an zahlreichen, wenn auch nicht an allen P2-Rezeptoren jeder Spezies, untersucht ist. King und Mitarbeiter (1998) sehen insbesondere in Suramin und RB 2 wichtige Liganden, die sinnvoll zur Unterscheidung von P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren eingesetzt werden können, da Suramin von diesen Rezeptoren den hP2Y₂ und RB 2 den ratP2Y₄ hemmt. Bislang gibt es keine äquivalenten Daten entsprechender Antagonisten für den ratP2Y₂. Für die Korrelation von nativen P2Y-Rezeptoren mit rekombinanten P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren ist die schwache Wirkstärke dieser Antagonisten ein großer Nachteil. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Aktivität einzelner P2-Liganden an rekombinanten P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren verschiedener Spezies. Auffällig ist, dass Suramin an humanen als auch an Nager-P2Y₄-Rezeptoren nicht aktiv ist. Die Datenlage zu PPADS sieht dagegen heterogener aus. Im Gegensatz zu Suramin ist bei der Bestimmung von nativen P2Y₄-Rezeptoren mit PPADS Vorsicht geboten. Bei der Interpretation von RB 2-Daten an nativen P2Y-Rezeptoren muß das Fehlen von pharmakologischen Daten an den rekombinanten Spezies-orthologen P2Y₂-Rezeptoren der Ratte und Maus berücksichtigt werden.

Tab. 1.1 Aktivität von P2-Liganden an rekombinanten P2Y₂/P2Y₄-Rezeptoren

Antagonist	Mensch (h)		Maus (m)		Ratte (rat)	
	hP2Y ₂	hP2Y ₄	mP2Y ₂	mP2Y ₄	ratP2Y ₂	ratP2Y ₄
Suramin	⊥ ^d	∅ ^{g,h}	-	∅ ^c	⊥ ^{a,f}	∅ ^{b,f}
PPADS	∅ ^{d,e}	⊥ ^g , ∅ ^h	-	⊥ ^c	⊥ ^f	∅ ^b , ⊥ ^c
RB 2	⊥ ^e	∅ ^g	-	⊥ ^c	-	⊥ ^b

∅ = schwach wirksam bzw. inaktiv; ⊥ = inhibitorisch wirksam; - = nicht untersucht

^a ratP2Y₂, 1321N1-Zellen, (Chen et al., 1996), ^b ratP2Y₄, XLO, (Bogdanov et al., 1998), ^c ratP2Y₄ bzw. mP2Y₄, 1321N1-Zellen, (Suarez-Huerta et al., 2001), ^d hP2Y₂, 1321N1-Zellen, (Charlton et al., 1996b), ^e hP2Y₂, 1321N1-Zellen, (Janssens et al., 1999), ^f ratP2Y₂, 1321N1-Zellen; (Gallagher und Salter, 2003), ^g hP2Y₄ Communi et al., 1996, ^h hP2Y₄, Charlton et al., 1996.

Physiologische/therapeutische Bedeutung. Nahezu auf allen Epithelien exprimiert, hat das P2Y₂-Rezeptor-Protein eine große physiologische Rolle in der Regulation der Schleimhaut bedeckenden Muzin-Elektrolyt-Schicht. P2Y₂-Rezeptor-Agonisten aktivieren einen zum „cystic fibrosis transmembrane regulator“-Protein (CFTR) alternativen Chlorid-Kanal (Parr et al., 1994). Dadurch wird bei den Krankheitsbildern

der zystischen Fibrose (CF) und der chronischen Bronchitits durch die Gabe von P2Y₂-Agonisten, in Folge die Wasser-Sekretion und die Sekretion von Muzin aus Globet-Zellen erhöht, sowie eine Zunahme der Zilien-Schlagfrequenz bewirkt (Kellerman, 2002). UTP (INS 316) und vor allem Analoga mit längerer Wirkdauer wie Up₄U (INS 365, Diquafosol, siehe Abb. 1.1) und dCp₄U (INS37217) befinden sich in der prä- bzw. klinischen Prüfung (Boeynaems et al., 2001; Müller, 2002; Kellerman, 2002; Kellerman et al., 2002, Yerxa et al., 2002, 2002a, 2002b, Meyer et al., 2002; Maminishkis et al., 2002; Nour et al., 2003).

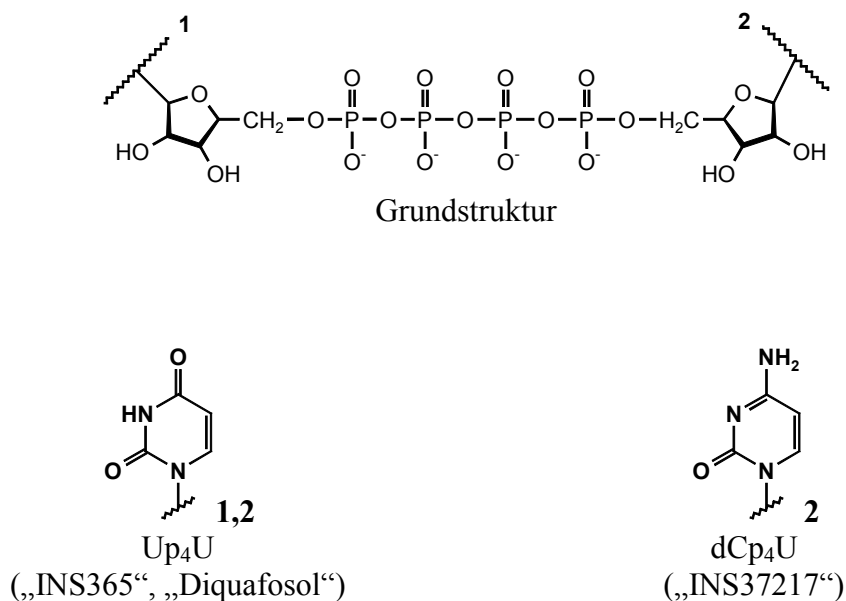


Abb. 1.1 Chemische Struktur von INS-Analoga als P2Y₂-Rezeptor-Agonisten.

Weitere Einsatzgebiete von P2Y₂-Agonisten liegen in der Diagnostik von Lungenerkrankungen, sowie der Sputumgewinnung bzw. der Dekontaminierung von inhalativen radioaktiven Diagnostika wie ^{99m}Tc (Müller, 2002). Das Krankheitsbild des „Trockenen Auges“ sowie der Netzhautablösung (*Ablatio retinae*) stellt ebenfalls ein wichtiges potentielles Indikationsgebiet für P2Y₂-Agonisten wie Up₄U bzw. dCp₄U (siehe Abb. 1.1) in 1 – 2 %-Lösungen zur topischen Therapie dar (Murakami et al., 2000; Fujihara et al., 2001; Kellerman et al., 2002). P2Y₂-Antagonisten könnten koronaren Vasospasmen vorbeugen und eine gewisse Rolle als neuroprotektive Substanzen erlangen (Müller, 2002). P2Y₂-Rezeptor-Knockout-Mäuse bestätigten die physiologische Rolle dieses Rezeptors in den Luftwegen der Lunge, gaben aber gleichzeitig den Hinweis, dass gastrointestinale Epithelien überwiegend P2Y₄-Rezeptor-vermittelt von extrazellulären Nukleotiden reguliert werden (Cressman et al., 1999; Homolya et al., 1999). Kürzlich gelang es durch die Herstellung einer P2Y₄-Rezeptor-Knockout-Maus, die physiologische Rolle von P2Y₄-Rezeptoren in

gastrointestinalen Epithelien direkt zu belegen (Robaye et al., 2003; Dubyak, 2003). Die pathophysiologische Relevanz, sowie das therapeutische Potential für diesen Rezeptor-Subtyp muss in zukünftigen Studien aufgezeigt werden.

1.2 Medizinische Chemie von P2X₁- und P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten

Viele Verbindungen völlig unterschiedlicher chemischer Struktur stellen P2-Antagonisten dar (Lambrecht, 2000; Lambrecht et al., 2002; Guile et al., 2001, Jacobson et al., 2002). Aber nur von einigen Substanzklassen konnten durch systematische Untersuchungen von Struktur und Wirkung Derivate mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften abgeleitet werden. Dazu zählen die Klasse der Suramin-Analoga, der Pyridoxal-Phosphat-Derivate, der Nukleotid-Analoga und der Anthrachinon-Derivate. Diese Verbindungen besitzen alle saure Gruppen und sind damit zumeist gut wasserlöslich, und können z.T. unspezifisch an (basische) Proteine binden.

Derivate des Pyridoxal-Phosphats. Die gemeinsame Eigenschaft von Suramin und Pyridoxal-Phosphat, ATP-abhängige Kalziumpumpen im sarkoplasmatischen Retikulum von Skelett-Muskeln an der Nukleotid-bindenden Domäne zu hemmen, sowie die Tatsache, dass Suramin gleichzeitig ein P2-Rezeptor-Antagonist war, veranlassten Lambrecht und Mitarbeiter zu der Annahme, dass Pyridoxal-Phosphat-Derivate (siehe Abb. 1.2) ebenfalls P2-Rezeptor-Antagonisten sein könnten. Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer Reihe von Pyridoxal-Phosphat-Derivaten führte vor 12 Jahren zu der Substanz PPADS (Lambrecht et al., 1992; Lambrecht et al., 2002). Heute ist PPADS einer der am besten untersuchten P2-Rezeptor-Antagonisten, welcher nicht-selektiv und spezifisch – aber nicht-universell – P2-Rezeptoren blockiert. Im Vergleich zu P2Y₁-Rezeptoren weist PPADS eine leichte Präferenz für P2X₁-Rezeptoren auf ($pIC_{50} \approx 0,1 - 1 \mu M$). An diesem Subtyp stellt PPADS ein Antagonist mit pseudoirreversibler Kinetik dar. Eine Ursache hierfür kann die Bildung einer *Schiff*'schen Base zwischen PPADS und Lysin in der extrazellulären Domäne des P2X₁-Rezeptors sein (Lambrecht et al., 2002). Mit MRS 2220 konnte gezeigt werden, dass die Affinität von iso-PPADS¹ wesentlich von der freien Aldehydgruppe mitbestimmt wird,

¹ In einigen Originalarbeiten wurde aufgrund eines Synthese-Fehlers des Herstellers von PPADS, iso-PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',5'-disulfonsäure) statt PPADS

da MRS 2220 deutlich schwächer wirksam am P2X₁-Rezeptor ist (Jacobson et al., 1998b). Eine Zunahme der P2X₁-Affinität konnte erfolgreich durch die Einführung eines größeren Arylazo-Substituenten in der Verbindung PPNDS realisiert werden. PPNDS ist 6 - 7 mal potenter an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren und an nativen Rezeptoren beachtlich P2X₁-selektiver, im Vergleich zu P2Y₁-Rezeptoren, als PPADS [bis zu Faktor 52 (Lambrecht et al., 2000b)]. Ähnlich potent wie PPNDS an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren verhält sich MRS 2159. Dieses Pyridoxal-Phosphat-Derivat weist u.a. im Vergleich zu PPADS in der para-Position zur Azo-Gruppe statt einer Sulfonsäure- eine Karbonsäurestruktur auf. Durch diese Strukturveränderungen konnte die Affinität zum rekombinanten P2X₁-Rezeptor im Vergleich zu PPADS um den Faktor 11 erhöht werden (Kim et al., 1998).

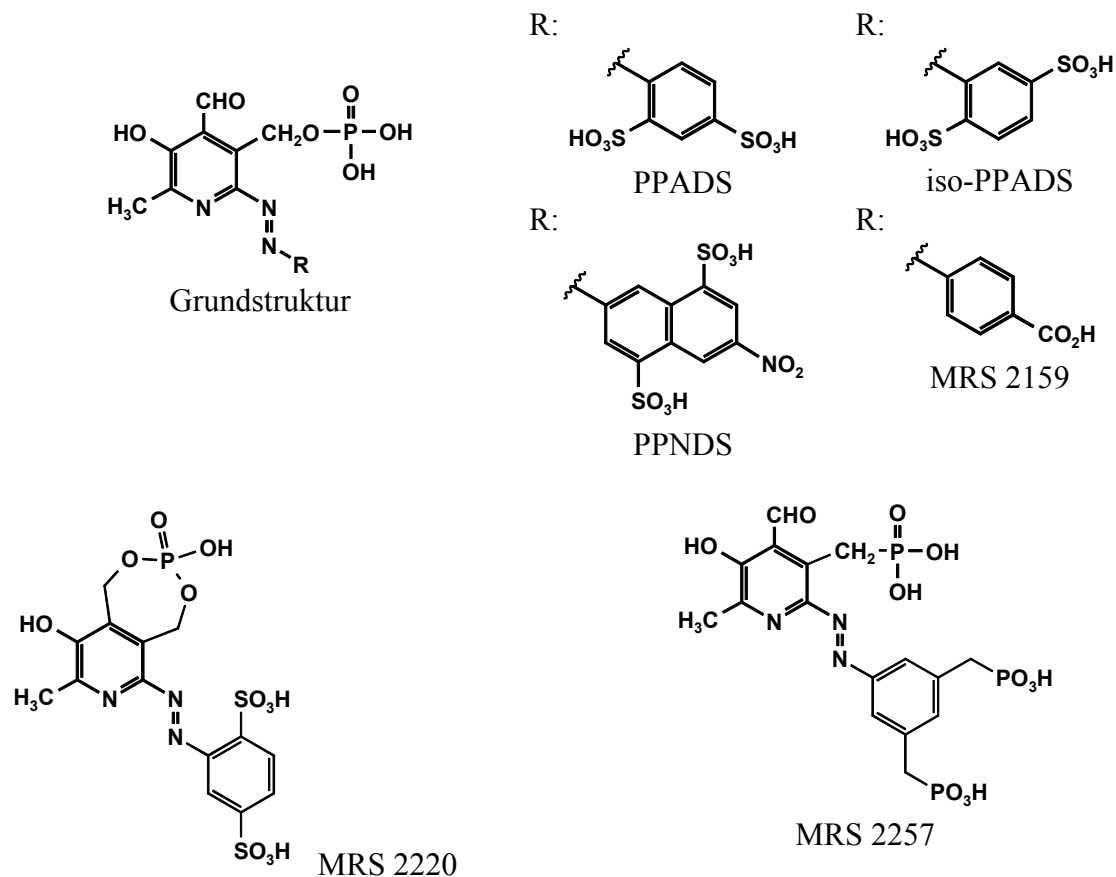


Abb. 1.2 Chemische Strukturformeln von Analoga des Pyridoxal-Phosphates.

Das Phosphonat-Analogon von PPADS, MRS 2257, hat ebenfalls eine im Vergleich zu PPADS 14-fach höhere Affinität zu rekombinanten P2X₁-Rezeptoren (Kim et al., 1998). Während PPADS und MRS 2257 eine vergleichbare Wirkstärke für P2Y₁-Rezeptoren aufweisen, konnte diejenige durch die Strukturvariation in MRS 2159 zu Gunsten der

verwendet. An rekombinanten P2X-Rezeptoren erwies sich iso-PPADS etwas wirkstärker als PPADS (Brown et al., 2001).

P2X₁-Selektivität gesenkt werden (Kim et al., 2001). Untersuchungen von PPADS, dessen Phosphatrest nicht von Ekto-Nukleotidasen gespalten wird (Lambrecht et al., 2002), bzw. seinen Analoga (100 µM) an Ekto-Nukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten (Ziganshin et al., 1996) und an klonierten und stabil exprimierten NTPDase1 und NTPDase2 der Ratte belegen (Heine et al., 1999, Hoffmann et al., 2000; siehe Abschnitt 1.3), dass oben abgebildete Derivate milde Inhibitoren sind. In Untersuchungen an NPP1 (PC1, siehe Abschnitt 1.3) wurde eine wirksame Inhibition dieses Enzyms durch 20 µM PPADS festgestellt (Zimmermann 2000).

Vertreter der Suramin-Klasse. Derivate des Suramins (siehe Abb. 1.3) gehören im Zusammenhang mit P2-Antagonisten zur am besten untersuchten Substanzklasse. Suramin² gehört zu den unspezifischen und schwach wirksamen P2-Rezeptor-Antagonisten (Lambrecht et al., 2002). Suramin blockiert nicht-selektiv P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren ($pA_2 = 1 - 10 \mu M$). Jedoch konnten durch die gezielte Wirkungs-Analyse einzelner Struktur-Merkmale selektive und hoch potente Derivate von Suramin synthetisiert werden. Durch Verkürzung der Benzoyl-Harnstoff-Brücke zwischen den Naphthylringen, sowie die Substitution der Methylgruppe durch Wasserstoff im Suraminmolekül gelang es, NF023, einen hochspezifischen und P2X₁-selektiven P2-Rezeptor-Antagonisten zu entwickeln (Lambrecht, 1996; Ziyal et al., 1997; Soto et al., 1999). Interessanterweise hatte die Entfernung der drei Sulfonsäuregruppen von einem der zwei Naphthylringe in NF023 keinen Einfluss auf die P2X₁-Affinität am Vas deferens der Ratte (Bültmann et al., 1996b). Erneut von Suramin ausgehend, ergab wie schon bei NF023, die Substitution der Methylgruppe durch Wasserstoff und die Variation der Verknüpfung der Benzoyl-Reste in NF279 eine deutliche Steigerung der P2X₁-Affinität und P2X₁- vs. P2Y₁-Rezeptor-Selektivität. NF279 war 6 mal potenter als NF023 an P2X₁-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte und vergleichbar inhibitorisch wirksam zu NF023, aber ca. Faktor 10 weniger potent zu Suramin am P2Y₁-Rezeptor im Meerschweinchen-Ileum (Damer et al., 1998; Lambrecht, 2000). Desweiteren konnte die P2X-antagonistische Wirkstärke für NF279 an isolierten, präglomerulären, mikrovaskulären, glatten Muskelzellen der Ratte (White et al., 2001) und an Pyramidalzellen des somato-sensorischen *Cortex* von Ratten mittels Ganz-Zell

² Das von O. Dressel (1865 bis 1941) hergestellte Präparat „Bayer 205“ wird als Germanin® (INN: Suramin) seit 1923 zur Behandlung von Trypanosomenerkrankungen (z.B. Schlafkrankheit) und der Onchozerkose (Flußblindheit) eingesetzt (Müller-Jahncke und Friedrich, 1996). Infolge der hohe Plasma-Eiweiß-Bindung hat Suramin eine sehr lange Halbwertszeit.

Spannungs-Klemme bestätigt werden (Pankratov et al., 2002). Auch an rekombinanten in *Xenopus* Oozyten exprimierten ratP2X₁-Rezeptoren bzw. an hP2X₁-Rezeptoren erwies sich NF279 als selektiv und wirkstark (P2X₁: IC₅₀ ≈ 20 nM; Rezeptorprofil: P2X₁ > P2X₂ ≥ P2X₃ > P2X₇ >> P2X₄; Klapperstück et al., 2000; Rettinger et al., 2000, Kassack et al., 2004).

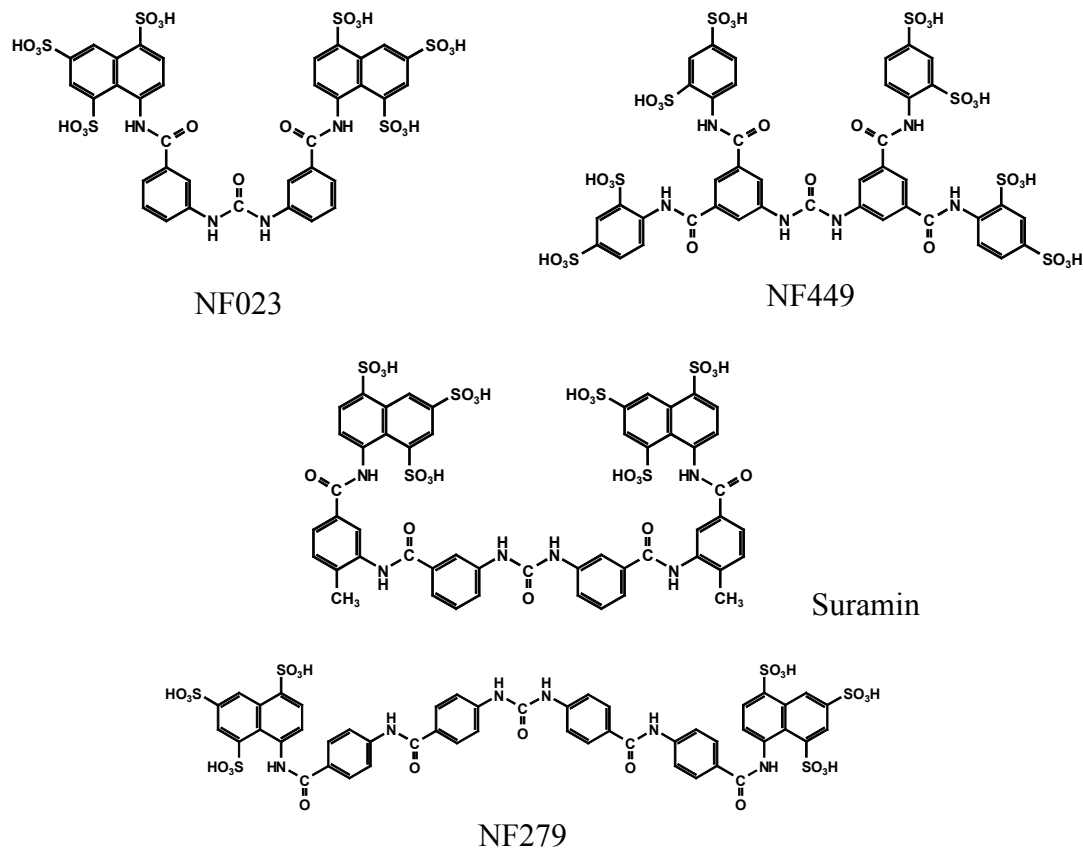
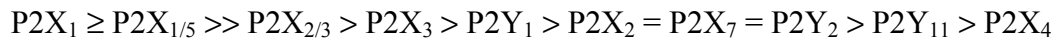


Abb. 1.3 Chemische Strukturformeln von Suramin und Suramin-Analoga.

Im Rahmen weiterführender Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnte NF449 als bislang potentester P2X₁-Rezeptor-Antagonist von unserer Arbeitsgruppe entwickelt werden (Braun et al., 2001, Kassack et al., 2004). Strukturelemente von PPADS und NF023, wie die mit Sulfonsäuren substituierten Aniline und die Benzoyl-Harnstoff-Brücke führten zu einer deutlichen Affinitätssteigerung am P2X₁-Rezeptor. Bei zu NF023 und NF279 vergleichbarer Affinität am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum konnte die Affinität am P2X₁-Rezeptor des Vas deferens der Ratte nochmals um Faktor 14 im Vergleich zu NF279 gesteigert werden (Braun et al., 2001). An rekombinanten Rezeptoren erwies sich NF449 sogar um den Faktor 70 potenter als NF279. Markward und seine Mitarbeiter konnten durch Schild-Analyse einen pA₂-Wert an humanen P2X₁-Rezeptoren von 10,7 ermitteln (Hülsmann et al., 2003). Für NF449 konnte folgendes P2-Rezeptorprofil erhalten werden:



[persönliche Mitteilung M. Kassack und J. Rettinger; (Braun et al., 2001; Hülsmann et al., 2003, Kassack et al., 2004)]. Damit repräsentiert NF449, der potenteste P2X₁-Rezeptor-Antagonist, den Höhepunkt mehrjähriger Arbeit in unserer Arbeitsgruppe. Suramin (100 µM) ist ein schwacher Inhibitor der Ekto-ATPase der *Xenopus laevis* Oozyten (Ziganshin et al., 1996), der NTPDase1 und NTPDase2 der Ratte (Heine et al., 1999; siehe Abschnitt 1.3) sowie der Ekto-5'-Nukleotidase (Zimmermann et al., 2000; siehe Abschnitt 1.3). Analoga des Suramins erwiesen sich in Untersuchungen an der Ekto-ATPase von *Xenopus laevis* Oozyten als schwache Inhibitoren (Damer, 2002).

Nukleotid-Analoga. Unter den Nukleotid-Analoga (siehe Abb. 1.4) befinden sich sowohl P2Y₁-selektive als auch P2X₁-selektive Verbindungen. Potent und P2X₁-antagonistisch sind die Nukleotid-Analoga Trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP) und Diinosin-Pentaphosphat (Ip₅I) (Lewis et al., 1998; King et al., 1999). Rekombinante P2X₁-Rezeptoren werden in nanomolaren Konzentrationen durch diese Derivate gehemmt. Die Instabilität von TNP-ATP gegenüber Ekto-Nukleotidasen (Ziganshin et al., 1996) und auch von Ip₅I (Lambrecht, 2000), könnte der Grund für die schwache antagonistische Wirkstärke von TNP-ATP und Ip₅I in funktionellen Modellen sein (Hoyle et al., 1997). Das natürlich vorkommende Bisphosphat Adenosin-3',5'-Bisphosphat (A3P5P) und Adenosin-3'-Phosphat-5'-Phosphosulfat (A3P5PS) wirken in mikromolaren Konzentrationen als kompetitive Antagonisten oder partielle Agonisten an P2Y₁-Rezeptoren (Boyer et al., 1996). Mit dieser Beobachtung und dem Ziel die Spezifität und Selektivität der Bisphosphate zu verbessern, führte der Weg über MRS 2179 zu der Verbindung MRS 2279. Sowohl MRS 2179 als auch MRS 2279 sind kompetitive Antagonisten am P2Y₁-Rezeptor. Im Vergleich zu MRS 2179 ist MRS 2279 mit einem K_B von ca. 10 nM am humanen P2Y₁-Rezeptor etwa 10 mal potenter und damit ca. 100 mal potenter als A3P5P (Waldo et al., 2002). Strukturell betrachtet wurde der erste Meilenstein durch die N⁶-Methyl-Substitution am A3P5P erzielt³.

In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte diese strukturelle Veränderung am A3P5P Molekül, welche zu MRS 2179 führte, allerdings P2X₁-antagonistische Eigenschaften (Brown et al., 2000). Damit war MRS 2179 etwa um den Faktor 4 wirkstärker am P2Y₁-Rezeptor als an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren.

³ Die Bindung von MRS 2179 zum P2Y₁-Rezeptor wird durch einen N⁶-Propyl-Substituent dagegen stark vermindert (Jacobson et al., 2002).

Die chemische Struktur der Phosphatgruppen/Nukleotide gibt Grund zur Vermutung, dass MRS 2179 nicht uneingeschränkt Ekto-Nukleotidase stabil ist. Dies konnte auch für Ekto-Nukleotidasen von follikulierten *Xenopus laevis* Oozyten, an welchen sich MRS 2179 als Substrat erwies, gezeigt werden (Horner et al., 2002). Trotzdem führte die intravenöse Applikation von MRS 2179 (50 mg/kg) zur Verlängerung der Blutungszeit von Mäusen und Ratten (Baurand et al., 2001), was darauf hindeutet, dass MRS 2179 *in vivo* wirksam und somit zumindest im Blutgefäßsystem Ekto-Nukleotidase-stabil ist.

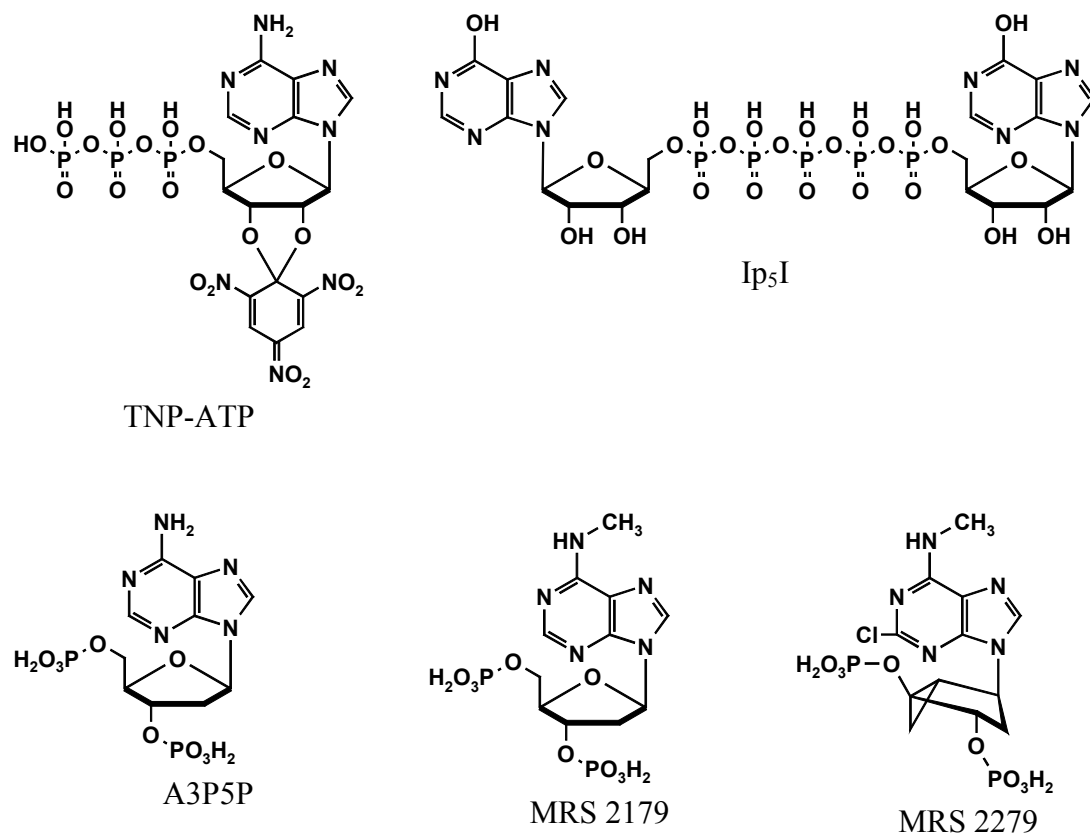


Abb. 1.4 Chemische Strukturformeln von Nukleotid-Analoga.

Der zweite wichtige Schritt zur Erhöhung der P2Y₁-Rezeptor-Affinität gelang durch die Einschränkung der Flexibilität des Riboserestes durch Pseudo-Hexosen wie (N)-Methanocarpa-Derivate in der Verbindung MRS 2279 (Jacobson et al., 2002). Leider wurde MRS 2279 bislang noch nicht an rekombinanten P2X-Rezeptoren und P1-Rezeptoren getestet, so dass die Rezeptor-Spezifität und –Selektivität Spekulationen bleiben. Zu hoffen bleibt, dass diese Molekülvariation zur Ekto-Nukleotidase-Stabilität beiträgt und damit die Substanz MRS 2279 auch zur Charakterisierung von P2-Rezeptoren in Geweben dienen kann und in *In-vivo*-Modellen zum Einsatz kommt. Neuere Studien belegen die Brauchbarkeit von MRS 2279 als Radioligand (Waldo et

al., 2002).

Anthrachinonderivate. Reaktiv Blau 2 (RB 2) ist ein Gemisch der meta- (35 %) und para-(65 %) Sulfonatisomere (siehe Abb. 1.5) und hemmt sowohl P_{2X} als auch P_{2Y}-Rezeptoren (Guile et al., 2001). RB 2 weist folgendes P₂-Rezeptor-Profil auf: native ratP_{2X}₁ ≥ rP_{2X}₂ >> hP_{2X}₄; hP_{2Y}₁₂ > tP_{2Y}₁ > hP_{2Y}₆ > hP_{2Y}₂ = hP_{2Y}₄ > hP_{2Y}₁₁ (Jacobson et al., 1999, 2002; Müller, 2002). Die jeweiligen Konstitutionsisomere des Reaktiv Blau 2 weisen im Vergleich zum Isomerengemisch (RB 2) ein verändertes inhibitorisches Profil an nativen Rezeptoren, wie an P_{2Y}-Rezeptoren der *Taenia coli* des Meerschweinchens bzw. an P_{2X}₁-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte, auf (Glänzel et al., 2003a). Glänzel und Mitarbeitern gelang es P_{2Y}- vs. P_{2X}₁-selektive Verbindungen wie das para-RB 2 (Faktor 13,7) zu ermitteln (Glänzel et al., 2003a). Anthrachinonderivate vom Azid-Blau-129-Typ (siehe Abb. 1.5) wiesen an oben genannten Rezeptoren eine noch größere P_{2Y}-Selektivität auf.

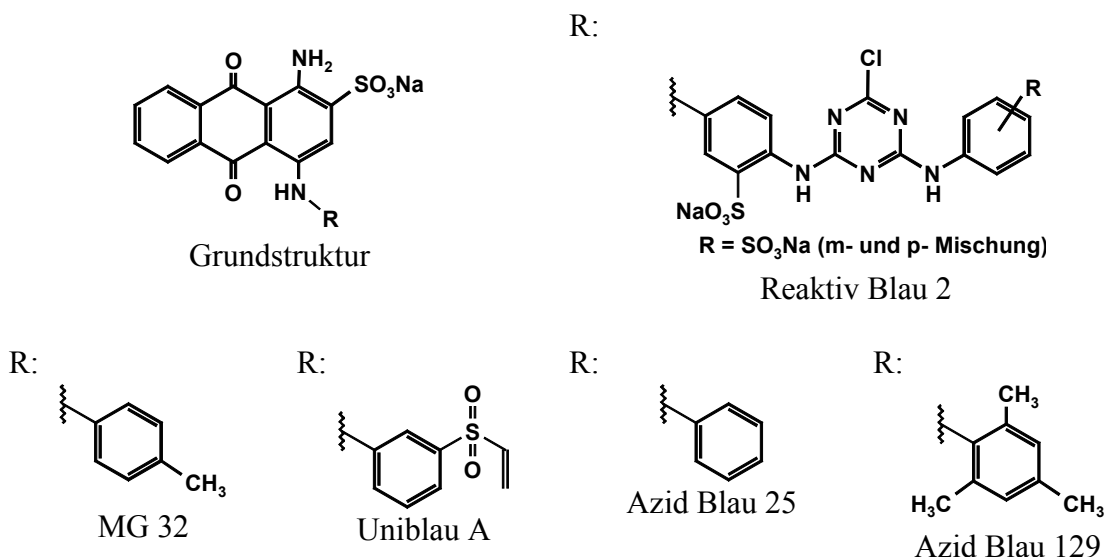


Abb. 1.5 Chemische Strukturformeln von Derivaten des Anthrachinons.

Unter Beibehaltung der nicht-planaren Anthrachinonstruktur gelang es, die aromatische Seitenkette des Reaktiv Blau 2 bei den Verbindungen wie MG 32, Uniblau, Azid Blau 25/129 zu verkleinern (siehe Abb. 1.5). Zwar gelang es bei diesen Verbindungen nicht die inhibitorische Wirkstärke der Verbindungen am P_{2Y}-Rezeptor der *Taenia coli* zu erhöhen, dafür konnte jedoch erfolgreich die inhibitorische Wirkstärke an P_{2X}₁-Rezeptoren des Vas deferens erniedrigt werden (MG32, Azid Blau 25/29; Tuluc et al., 1998; Glänzel et al., 2003b). Darunter befanden sich Analoga, die bis zu Faktor 35 P_{2Y}-über P_{2X}₁-selektiv sind, wobei Azid Blau 129 bis zu Faktor 25 - 70 potenter für den P_{2Y}-Rezeptor der *Taenia coli* war (Tuluc et al., 1998; Glänzel et al., 2003b). Während

Azid Blau 129 reversibel an P₂-Rezeptoren bindet, stellen andere Vertreter irreversible Antagonisten dar (z.B. Uniblau-A-Derivate; Jacobson et al., 2002, Glänzel et al., 2003b). Die Substanz Uniblau A ist im Vergleich zu den Methylgruppen-substituierten Verbindungen P₂X₁- über P₂Y-selektiv und hemmt die ATP-Spaltung durch Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte (IC₂₅ = 16,8 µM; Tuluc et al., 1998). Die Substanzen Reaktiv Blau 2, Azid Blau 25 und Azid Blau 129 sind schwache Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren (IC₂₅ > 50 µM; Tuluc et al., 1998). Einige Vertreter, wie Uniblau A und Azid Blau 25 und Derivate, interagieren in Kontraktionsstudien mit exogen applizierten Noradrenalin oder Carbachol (Tuluc et al., 1998; Glänzel et al., 2003b), was auf eine für experimentell-pharmakologische Substanzen unzureichende P₂-Rezeptor-Spezifität hinweist.

Die pharmakologischen Eigenschaften wie irreversibler Antagonismus und Wechselwirkungen mit Adrenozeptoren, Kaliumkanälen und P₁-Rezeptoren limitieren den Nutzen dieser Substanzen erheblich (Jacobson et al., 2002). Weitere Studien mit diesen Derivaten an nativen und rekombinanten P₂-Rezeptoren sind nötig, um vor allem die Natur des P₂Y-Rezeptor-Subtyp in der *Taenia coli* des Meerschweinchens zu klären, da sowohl Studien mit P₂-Agonisten (Dudeck et al., 1995) als auch P₂-Antagonisten für eine heterogene P₂-Rezeptorpopulation sprechen (Windscheif et al., 1995; Bültmann et al., 1996a; Lambrecht et al., 1996b; Damer, 2002). Eine Bewertung der Ergebnisse an der *Taenia coli* des Meerschweinchens muß kritisch erfolgen, solange die Natur des P₂-Rezeptor-Subtyps unklar ist.

1.3 Nukleotid-spaltende Enzyme (Ekto-Nukleotidasen)

Nach Eccles (Eccles, 1964) ist für die Regulation von Funktionen höherer Organismen eine wesentliche Voraussetzung, dass die dafür verantwortlichen Neurotransmitter, Hormone und anderen Wirkstoffen in ihrer zeitlichen und räumlichen Wirkung durch Wiederaufnahme-Mechanismen bzw. enzymatischen Abbau begrenzt werden. Im Falle von ATP und anderen Nukleotiden konnten zellmembranständige Enzyme (Ekto-Nukleotidasen) für deren extrazellulären Abbau nachgewiesen werden. Der Sammelbegriff Ekto-Nukleotidasen umfasst, gemäß der von Zimmermann und Kollegen vorgeschlagenen Nomenklatur, die Familien der Ekto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (E-NTPDasen, Ekto-Apyrasen), der Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterasen (E-NPP), die Ekto-5'-Nukleotidasen, die

alkalischen Phosphatasen (AP) und die Ekto-Nukleosid-Diphosphokinasen (E-NDPK) (Zimmermann, 2001). Das beim Abbau von ATP gebildete Adenosin kann zum einen über P1-Rezeptoren zelluläre Funktionen steuern und zum anderen über spezifische Transportsysteme wieder in die Zellen aufgenommen werden, wobei es dort für die erneute Nukleotid-Synthese zur Verfügung steht. Die komplette Hydrolyse von freigesetztem ATP im synaptischen Spalt kann weniger als 200 ms dauern, wobei der Abbau von AMP zum Adenosin der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt ist (Dunwiddie et al., 1997).

E-NTPDase-Familie. Bislang konnten sieben Mitglieder (NTPDase1-6, -8, EC 3.6.1.5) kloniert und z.T. funktionell charakterisiert werden. Mitglieder der E-NTPDase-Familie katalysieren die Hydrolyse von Nukleosid-5'-Triphosphaten und Diphosphaten (Abb. 1.6). Unter den einzelnen Enzymen existieren Präferenzen für bestimmte Nukleotide (Zimmermann, 2001; Bigonnesse et al., 2004). Die katalytische Domäne der E-NTPDasen befindet sich im extrazellulären Medium oder im Lumen intrazellulärer Organellen. Fünf hoch-konservierte Sequenz-Domänen (apyrase conserved regions, ACR) scheinen für die katalytische Aktivität der Enzyme von Bedeutung zu sein (Zimmermann, 2001). Drei Mitglieder (NTPDase1-3) der Familie werden an der Zelloberfläche exprimiert und sind im Rahmen dieser Dissertation wegen der Modulation der purinergen Neurotransmission von besonderem Interesse. Ähnlich zu P2X-Rezeptor-Untereinheiten (siehe Abschnitt 1.1.1) befinden sich bei NTPDase1-3 das N- und C-terminale Ende intrazellulär, und eine große extrazelluläre Schleife verbindet die membrandurchspannenden Domänen miteinander. Diese Mitglieder hydrolysieren Purin- und Pyrimidin-Nukleotide. Für die volle Aktivität sind die Anwesenheit divalenter Kationen und ein alkalischer pH notwendig. Die K_m -Werte für ATP liegen im unteren mikromolaren Bereich. Einzelne Enzyme liegen in Dimeren bis Tetrameren vor, und dies kann Auswirkungen auf die Substrat-Präferenz haben (Failer et al., 2003). Einzelne Mitglieder weisen elementare Unterschiede bezüglich der Substrat-Spezifität auf. So hydrolysiert die NTPDase1 (CD39, Ekto-Apyrase, Ekto-ATP-Diphosphohydrolase) die Nukleotide ATP und ADP gleich gut (Kaczmarek et al., 1996; Wang und Guidotti, 1996; Heine et al., 1999), während die NTPDase2 (CD39L1, Ecto-ATPase) um den Faktor 30 die Hydrolyse von ATP gegenüber ADP bevorzugt (Kegel et al., 1997; Kirley, 1997; Mateo et al., 1999). Im Vergleich zur Substratspezifität der NTPDase1 und NTPDase2 nimmt die NTPDase3 eine Mittelstellung ein. Die NTPDase3 katalysiert die Hydrolyse von ATP ca. dreimal besser

als die von ADP.

Aus der Substratspezifität ergeben sich wichtige funktionelle Konsequenzen. Beispielsweise bedeutet dies für die NTPDase1 die Produktion von Nukleosidmonophosphaten (NMP) und für die NTPDase2 die Produktion von Nukleosiddiphosphaten (NDP) aus Nukleosidtriphosphaten (NTP). Während die NTPDase3 Nukleosidtriphosphate hydrolysiert, erfolgt die Hydrolyse von Nukleosiddiphosphaten verzögert. Die Substratspezifität und die gewebespezifische Expression von NTPDasen1-3 ermöglichen eine Modulation der purinergen Transmission, was für das Wechselspiel von P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen von großer Bedeutung ist (Zimmermann, 2001).

Die Familie der **E-NPP** (Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase) besteht aus den Enzymen NPP-1-5. Die Mitglieder NPP-4 und NPP-5 konnten durch Datenbank-Recherchen identifiziert werden und sind noch nicht funktionell charakterisiert (Goding et al., 2003). NPP-1, NPP-2 und NPP-3 haben eine große Gewebsverbreitung und weisen eine sehr geringe Substratspezifität auf. Sie besitzen katalytische Aktivität für Phosphodiester- als auch Nukleotid-Pyrophosphatbindungen und kommen Zellmembran-gebunden oder im extrazellulären Raum gelöst vor (Bollen et al., 2000; Zimmermann, 2001). Das Mitglied NPP-2 (Autotaxin) ist in der Lage, ATP über Dinukleotide zum AMP und dieses bis zum Adenosin abzubauen. Damit zeigt NPP-2 eine größere Substratspezifität als andere untersuchte Mitglieder der Familie. Die katalytische Aktivität dieser Enzym-Familie ist von zweiwertigen Kationen sowie einem basischen pH-Optimum abhängig und die K_m -Werte für ATP liegen mit 50 μ M bis 500 μ M etwas über denen der E-NTPDase-Familie. Die physiologische Bedeutung liegt unter anderem in der Knochen-Mineralisierung, ektopen Kalzifizierungen und der Modulation der purinergen Transmission (Zimmermann, 2001; Goding et al., 2003).

Die **alkalischen Phosphatasen** besitzen wie die Mitglieder der E-NPP-Familie eine geringe Substratspezifität. Diese Enzyme sind in der Lage, Nukleotidtriphosphate bis zum Nukleosid zu metabolisieren (Zimmermann, 2001). Weitere Substrate wie anorganisches Pyrophosphat, Diadenosinpolyphosphate und cAMP werden ebenfalls katalytisch gespalten. Die physiologische Relevanz der alkalischen Phosphatasen, insbesondere in Anwesenheit von Vertretern anderer Ekto-Nukleotidasen, ist bei vergleichsweise hohen K_m -Werten und einem pH-Optimum von $\geq 8,5$ zu evaluieren (Zimmermann, 1996b).

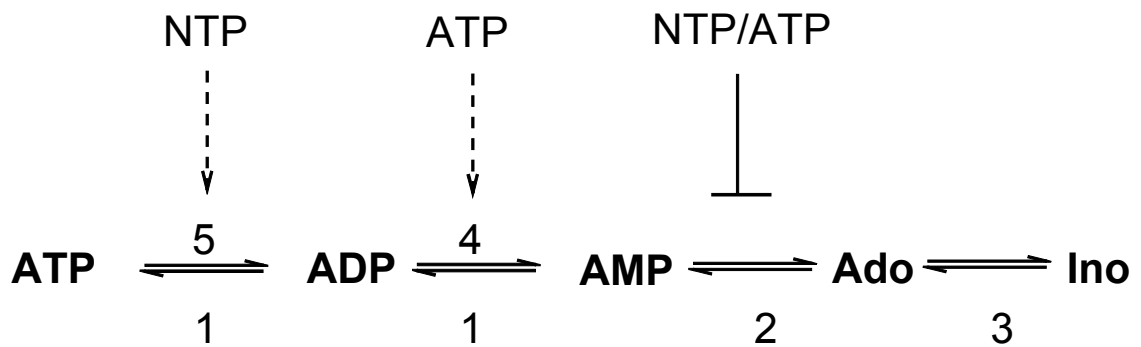


Abb. 1.6 Ecto-enzymatischer Umsatz von Purinen auf der Zelloberfläche

Metabolismus und Interkonversion extrazellulärer Nucleotide sowie deren Abbau zu Adenosin (Ado) oder Inosin (Ino). 1) NTPDase1/CD39; 2) Ekto-5'-Nucleotidase/CD73; 3) Ekto-Adenosindeaminase; 4) Ekto-Adenylat-Kinase; 5) Ekto-Nucleosid-Diphosphokinase. Gestrichelte, vertikale Pfeile symbolisieren eine Aktivierung, während durchgezogene vertikale Linien für eine Inhibition stehen. NTP steht für Nucleotidtriphosphat. Die Abbildung wurde aus Yegutkin et al., 2002 übernommen.

Ekto-5'-Nucleotidase (CD73; EC 3.1.3.5) katalysiert den letzten Schritt in der Hydrolysekette von Nucleosid-5'-Triphosphaten: den Abbau von Nucleosid-5'-Monophosphaten (z.B. AMP) zum Nucleosid (z.B. Adenosin) und Phosphat (Abb. 1.6). Die Substratspezifität ist gering und umfasst Nucleotide wie AMP, CMP, UMP, IMP und GMP. Die Verbindungen ATP, ADP und α,β -meADP wirken als kompetitive Inhibitoren der Ekto-5'-Nucleotidase (Zimmermann, 1992). Die bedeutendste physiologische Rolle der Ekto-5'-Nucleotidase besteht in der Bildung von Adenosin aus extrazellulärem AMP, welches nachfolgend als P1-Rezeptor-Ligand für zahlreiche biologische Wirkungen zu Verfügung gestellt wird (Zimmermann, 2000, 2001). Pathophysiologisch spielt das Enzym anscheinend bei ischämischen Prozessen des Myokards, der Proliferation von Intima-Zellen und Organ-Transplantationen, wie der Niere eine große Rolle (Smit-van Oosten et al., 2002).

Ekto-Adenosin-Deaminase. Ekto-Adenosin-Deaminase (EC 3.5.4.4) konvertiert Adenosin und Desoxyadenosin zu Inosin bzw. Desoxyinosin (Abb. 1.6). Dieses Enzym kommt in nahezu allen Geweben vor (Zimmermann, 1996b). Im Allgemeinen befindet sich das Enzym intrazellulär, abweichend davon wird es auch an der Oberfläche vieler Zellsysteme und Fibroblasten exprimiert (Zimmermann, 1996b). Die K_m -Werte für Adenosin liegen im Bereich von 50 bis 150 μ M und das pH-Optimum liegt bei physiologischen Werten. A_1 -Rezeptoren konnten mit Adenosindeaminase kolokalisiert gefunden werden (Ciruela et al., 1996; Saura et al., 1996), was den Verdacht nahe legt, dass dieses Enzym an der Beendigung P1-Rezeptor-vermittelter Wirkungen von Adenosin beteiligt ist. Darüber hinaus sind Wechselwirkungen von Adenosindeaminase und P1-Rezeptoren beschrieben, die zu einer Erhöhung der Liganden-Affinität und einer

vermehrten Produktion an Second Messenger führten (Zimmermann, 1996b).

Ekto-Nukleosid-Diphosphokinase. Ekto-Nukleosid-Diphosphokinasen (E-NDPK, EC 2.7.4.6) katalysieren den Transfer der γ -Phosphatgruppe von Nukleosid-5'-Triphosphaten auf Nukleosid-5'-Diphosphate (Abb. 1.6; Harden et al., 1997). Beispielsweise kann die Anwesenheit von Nukleosid-Diphosphokinasen die Konversion von UDP zu UTP unter ATP-Spaltung bewirken. Demnach können Nukleosid-Diphosphokinasen zu Fehldeutungen der Ligand-Wirkung in Geweben oder Zellen führen (Zimmermann, 1996b, 2001). Die basale Freisetzung von ATP durch Zellen und Zellverbände in das extrazelluläre Medium ermöglicht die Phosphorylierung von UDP zu UTP in 1321N1-Zellen, einer Standard-Zelllinie für rekombinante P2Y-Rezeptoren, an welchen sowohl Nukleosid-5'-Diphosphate als auch Nukleosid-5'-Triphosphate Liganden sein können (Harden et al., 1997). Untersuchungen von rekombinanten humanen P2Y₂-Rezeptoren in transfizierten 1321N1-Zellen ergab, dass UDP ein voller Agonist ist (Lazarowski et al., 1995). Nachfolgende Untersuchungen in denen UDP von UTP befreit und die Bildung von UTP während der Inkubation vermieden wurde belegten, dass UDP inaktiv an diesem Rezeptor-Subtyp ist (Harden et al., 1997). UDP ist also nicht der tatsächliche Agonist, sondern durch E-NDPK gebildetes UTP. Damit füllt die Ekto-Nukleosid-Diphosphokinase eine wichtige Funktion im Zusammenspiel ATP-konsumierender und ATP-generierender extrazellulärer Prozesse aus. Die zeitgleiche Aktivität von ATP-spaltenden und ATP-regenerierenden Enzymen könnte die Konzentration extrazellulärer Nukleotide und somit die Aktivierung von P2-Rezeptoren regulieren (Lazarowski et al., 2001).

Ekto-ATP:AMP-Phosphotransferase/Ekto-Adenylatkinase. Neben den Aspekten des Metabolismus bzw. der Inaktivierung von Nukleotiden wurde den alternativen Metabolisierungswegen bisher wenig Beachtung geschenkt. Adenylat-Kinasen (EC 2.7.4.3, Myokinase) sind Bestandteil dieser Mechanismen und phosphorylieren Nukleotide (Abb. 1.6; Zimmermann, 2001). Sie übertragen γ -Phosphatgruppen von ATP auf Nukleosid-5'-Monophosphate (Van Rompay et al., 2000). Oberflächenständige Adenylat-Kinasen wurden auf dem *Musculus sartorius* des Frosches (Cascalheira und Sebastiao, 1992), Synaptosomen der Ratte (Nagy et al., 1989), Endothelzellen der Nabelschnurvene des Menschen (Yegutkin et al., 2002) und dem Nasalepithel des Menschen detektiert (Donaldson et al., 2002). Als mögliche physiologische Rolle für Ekto-Adenylat-Kinasen kommt die Verlängerung P1- und P2-Rezeptor-vermittelter Wirkungen zum Beispiel auf humanem Lungenepithel (Picher und Boucher, 2003) oder

in Blutgefäßen (Yegutkin et al., 2002) in Frage.

Hemmstoffe des Nukleotid-Metabolismus. Ekto-Nukleotidase-Hemmstoffe sind u.a. nötig für die Analyse von Nukleotid-vermittelten Wirkungen. Eine wünschenswerte Voraussetzung wäre die Inaktivität des Inhibitors an P2-Rezeptoren. Unzählige Substanzen, wie z.B. Quercetin, Sulfanilsäure-Diazoniumsalz, Phenothiazine, 5'-P-(Fluorsulfonyl)benzoyl-adenosin, Cyclopiazonsäure (CPA), Natriumazid, Ap₅A, α,β -meATP, histochemische Farbstoffe, Heparin und Amilorid mit unspezifischen und unselektiven inhibitorischen Wirkungen auf Ekto-Nukleotidasen wurden beschrieben (Ziganshin et al., 1994; Zimmermann, 2000; Zimmermann, 2001). Darunter finden sich auch zahlreiche P2-Rezeptor-Agonisten (Chen und Lin, 1997). ARL 67156 (FPL 67156, siehe Abb. 4.15, Seite 144) ist der einzige Inhibitor, welcher eine gewisse Spezifität für die Inhibition von Ekto-Nukleotidasen im Vergleich zu P2-Rezeptoren aufweist. Für ARL 67156 konnte die Hemmung des ATP-Metabolismus in humanen Blutzellen (Crack et al., 1995) und im Vas deferens der Ratte gezeigt werden (Khakh et al., 1995). An der isolierten Ohrarterie des Kaninchens und am Vas deferens des Meerschweinchens konnten ATP-induzierte Kontraktionen verstärkt werden, während – erwartungsgemäß – diejenigen verursacht durch das stabile ATP-Analogon α,β -meATP unberührt blieben (Crack et al., 1995; Westfall et al., 1996; 1997a). ARL 67156 verstärkt auch die neurogene purinerge synaptische Transmission, was den Eindruck verstärkt, dass Ekto-Nukleotidasen die Wirkkonzentrationen endogener Purine erniedrigen (Zimmermann, 2001). Leider liegen zu ARL 67156 weder an rekombinanten Rezeptoren noch an Ekto-Nukleotidasen zugängliche Daten vor. In Geweben besitzt ARL 67156 nur eine moderate Wirkstärke (Crack et al., 1995; Westfall et al., 1996, 1997a). Zahlreiche Verbindungen wurden an nativen Ekto-Nukleotidasen hinsichtlich ihrer Hemmwirkung untersucht, vergleichsweise dazu aber nur wenige an molekular definierten Enzymen. Beispielsweise wurde die inhibitorische Wirkung von Suramin, PPADS, PPADS-Derivaten und Evans Blau an rekombinanter NTPDase1 und NTPDase2, exprimiert in CHO-Zellen, auf den ATP-Metabolismus untersucht (Heine et al., 1999; Hoffmann et al., 2000). Die Untersuchungen ergaben für Evans Blau eine starke Hemmung der NTPDase1, Suramin hemmte bevorzugt die NTPDase2 und PPADS inhibierte insgesamt betrachtet schwächer aber gleich stark die beiden Enzyme. Aufgrund seiner selektiven und potenten Hemmung der NTPDase1, stellte sich Evans Blau als wichtiges pharmakologisches Werkzeug für die Charakterisierung des UTP-sensitiven Rezeptors in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte in dieser

Arbeit heraus. Ein vielversprechender Ekto-Nukleotidase-Inhibitor scheint die Substanz 8-Thiobutyladenosin-5'-Triphosphat (8-BuS-ATP) zu sein (Gendron et al., 2000). Das ATP-Analogon hemmt weder P2X-Rezeptoren des Mesenterialbettes des Meerschweinchens noch P2Y₁-Rezeptoren von Erythrozyten des Truthahns und inhibiert den ATP-Metabolismus mit einem K_i von 10 µM. Doch auch diese Substanz muß erst an rekombinanten Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen untersucht werden (Gendron et al., 2002), um ihre allgemeine Brauchbarkeit zu beweisen.

Therapeutische Bedeutung. Abgesehen von der NTPDase1 und der NPP1 kann bislang wenig über das therapeutische Potential von anderen Zielstrukturen in der Nukleotid-Hydrolyse-Kette bzw. des Nukleotid-Metabolismus selbst oder von ihren Inhibitoren erläutert werden.

Insbesondere im Zuge der biotechnologischen Herstellung von rekombinanten Proteinen, scheint ein gewisses therapeutisches Anwendungspotential der humanen Ekto-Apyrase praktisch möglich zu sein. Humane Ekto-Apyrasen (CD39) haben eine große Bedeutung in der Regulation der Homöostase. Ekto-Apyrasen, exprimiert von Endothelzellen des Blutgefäßsystems, verschieben das Gleichgewicht von proaggregatorischen Substanzen wie ATP(als Vorstufe des ADP)/ADP zu antiaggregatorischen, wie AMP(als Vorstufe des Adenosin)/Adenosin (Birk et al., 2002; Belayev et al., 2003). Damit könnte eine lösliche Ekto-Apyrase (solCD39, NTPDase1) als Antithrombotikum zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse dienen, wie es durch die intravenöse Gabe von solCD39 bei Ratten gezeigt werden konnte (Di Virgilio et al., 2001; Belyev et al., 2003). Allerdings zeigten, entgegen der Erwartungen, Mäuse mit CD39-, 'Knock out' eine verlängerte Blutungszeit und eine fehlende Aggregation der Thrombozyten (Zimmermann 2001, Di Virgilio et al., 2001).

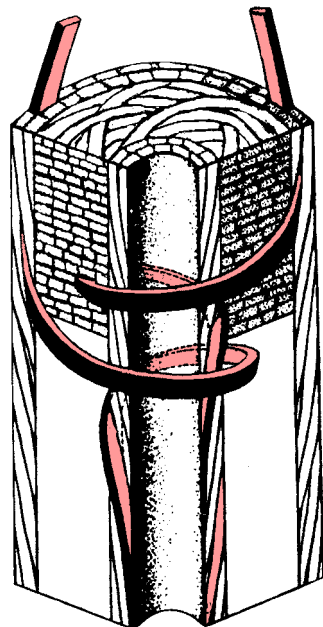
Im Falle der NPP1 (PC-1) existiert eine natürlich vorkommende Nonsense-Mutation, die bei Mäusen zum ‚tip-toe walking‘, begleitet von anormalen Ossifikationen, führt (Zimmermann, 2001). NPP1-, 'Knock-out'-Mäuse zeigten einen vergleichbaren Phänotyp. Diese Tiere wiesen eine exzessive Knochenbildung in Knochen, Knorpelgewebe, Sehnen und Gelenkkapseln auf, was die Bedeutung des Enzyms für die Balance der in der Mineralisierung des Bewegungsapparates unterstreicht (Zimmerman, 2001). Das therapeutische Potential dieser Zielstruktur muß in Zukunft näher untersucht werden.

1.4 Der Samenleiter der Ratte als funktionelles P2-Rezeptor-*In-vitro*-Modell

Der Samenleiter der Ratte spielt in der vorliegenden Arbeit eine sehr wichtige Rolle. Daher wird im folgenden auf dieses Präparat näher eingegangen.

1.4.1 Histologie/Anatomie/Physiologie

Das Vas deferens (Ductus deferens) ist ein aus einer kräftigen, glattmuskulären Wandung aufgebautes Rohr. Das Lumen ist mit zweireihigem Zylinder-Epithel, epididymal mit Stereocilien besetzt, ausgekleidet. Das Vas dient dem Transport der Spermatozyten und stellt die Verbindung zwischen Epididymis und der Prostata/Urethra dar. Anatomisch unterscheidet man in einen proximalen Teil, die *Pars prostatica* und einen distalen Teil, die *Pars epididymis*. Der Hauptunterschied liegt in der Stärke der aus glatten Muskelzellen bestehenden Wandung. Histologisch imponiert der massive Anteil der zirkulär verlaufenden Muskelschicht in der *Pars prostatica*. Die Wand des Vas deferens der Ratte (und des Menschen) besteht aus zirkulär- und längsverlaufender Muskulatur (siehe Abb. 1.7; Bargmann, 1967, Westfall und Westfall, 2001).



aus Bargmann, W (1967)

Abb. 1.7 Faserverlauf im Vas deferens des Menschen.

Schematische Erläuterung des Faserverlaufs aller Wandmuskeln. Schraubenförmige Spiralzüge mit außen und innen hohen Steigungswinkeln. Schattierte Strukturen entsprechen der inneren und äußeren Longitudinal-Muskulatur.

Die Zellen der äußeren Längsmuskulatur sind 30 – 40 µm lang und 2 – 5 µm dick. Einzelne Muskelzellen bilden Bündel zu 6 – 12 Zellen (Westfall und Westfall, 2001). Zwischen diesen Bündeln sind die Zellen durch hoch-ohmige Stellen (tight junctions) miteinander verbunden. Die glatte Muskulatur des Vas deferens gehört zum multi-unit-

Typ und wird daher vom vegetativen Nervensystem - statt von Schrittmacher-Zellen⁴ - gesteuert. Dabei ziehen fast ausschließlich kurze sympathische postganglionäre Nervenfasern in das Vas ein und innervieren jede Muskelzelle einzeln (Westfall und Westfall, 2001).

Nicht nur anatomisch-histologische Unterschiede, sondern auch funktionelle Unterschiede zwischen der *Pars epididymis* und *prostatica* sind bekannt (Sneddon und Machaly, 1992; Westfall und Westfall, 2001). So wurden nicht nur Unterschiede in der elektromechanischen Kopplung (McGrath, 1978; Brown et al., 1983) sondern auch in der postsynaptischen Reaktion der Myozyten auf α_1 -Adrenozeptor-Agonisten gefunden (MacDonald und McGrath, 1980; Moore und Griffiths, 1982; Sallés und Badia, 1991). Natürliche α_1 -Adrenozeptor-Agonisten wie Noradrenalin werden durch Monamin-Transporter wieder in präsynaptische Strukturen aufgenommen. Diese Verminderung der Konzentration von Noradrenalin im synaptischen Spalt ist u.a. ein Grund für die scheinbar niedrige Wirkstärke von Noradrenalin in beiden Teilen des Samenleiters der Ratte (Kenakin, 1980b). Mit der Entdeckung der neuronalen Kotransmission (Fedan et al., 1981; Sneddon und Westfall, 1984; Sneddon und Burnstock, 1984), sowie der P2-Rezeptoren im Vas deferens, war neben der adrenergen auch eine purinerge Komponente der Kontraktion, verursacht durch Feld-Stimulation, belegt. Ähnlich zu Noradrenalin ist auch ATP als natürlicher Neurotransmitter im Vas deferens einem Abbauprozess unterworfen (Plesner, 1995; Tennant und Hourani, 2000). Diese Ektokleotidasen vermindern auch die Wirkstärke von exogenem ATP im isolierten Vas deferens so wie Monamintransporter diejenige von Noradrenalin. Im Fall einer elektrischen Reizung kann eine biphasische Kontraktion beobachtet werden. Durch die unvollständige Blockade der neurogenen Kontraktion durch α -Rezeptor-Antagonisten wurde die Anwesenheit eines nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC) Kotransmitters vermutet (siehe Burnstock, 1999). Im Jahre 1972 vermutete Burnstock, dass der zweite Transmitter - freigesetzt aus Nervenendigungen - Adenosintriphosphat (ATP) sei. 6 Jahre später konnte Westfall und Mitarbeiter die Freisetzung von Purinen im Vas deferens des Meerschweinchens erstmals demonstrieren (Westfall et al., 1978). Durch den Einsatz von Tetrodotoxin (TTX), Guanethidin und der Freisetzung von

⁴ Vergleichsweise zum Vas deferens sind Schrittmacher-Zellen (Cajal-Zellen) des Gastrointestinal-Traktes verschiedener Spezies gut untersucht (Hagger et al., 1997; Horowitz et al., 1999). Burnstock und Lavin (2002) konnten auch P2X-Rezeptoren auf Cajal-Zellen bestimmen. Da das Vas deferens nicht zu den spontan-rhythmischen Organen gezählt wird, ist die Funktion der Cajal-Zellen unbekannt.

tritiertem Noradrenalin und ATP gelang es schließlich, die gleichzeitige Freisetzung und damit die Kotransmission zu belegen (Fredholm et al., 1982; Kirkpatrick und Burnstock, 1987). Später konnte eine deutliche Korrelation der biphasischen Kontraktion nach neurogener Stimulation mit dem jeweiligen Neurotransmitter aufgestellt werden (Todorov et al., 1996). Nicht zuletzt durch den Einsatz von P2-Liganden wie Arylazido-aminopropionyl-ATP (ANAPP₃), α,β -meATP, Suramin und PPADS (Fedan et al., 1982; Sneddon et al., 1984; von Kügelgen und Starke, 1991; Mallard et al., 1992; Lambrecht et al., 1992; Bailey und Hourani, 1994) war es möglich, die purinerge Komponente der biphasischen Kontraktion zu blockieren und zu belegen. Für die rasche, transiente Kontraktion ist ATP, für die tonische Phase überwiegend Noradrenalin verantwortlich.

Zusätzlich zu ATP und Noradrenalin konnte die Freisetzung von Neuropeptid Y (NPY) nach elektrischer Feldstimulation im Samenleiter des Meerschweinchens demonstriert werden (Kaskov et al., 1988). Während Kontraktionen, verursacht durch exogenes ATP und Noradrenalin, im Vas deferens der Maus durch NPY potenziert werden, konnte im Vas deferens der Ratte eine Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung gezeigt werden (Westfall und Westfall, 2001).

Wie bereits erwähnt läßt sich das Vas deferens anatomisch in ein prostatiches und epididymales Segment unterteilen. Eine Variation entlang des Vas kann auch in der purinergen und adrenergen Kontraktion beobachtet werden. Grundsätzlich reagieren beide Segmente auf ATP und Noradrenalin. Trotzdem reagiert das prostatiche mehr auf ATP und das epididymale Segment mehr auf Noradrenalin (Sneddon und Machaly, 1992). Sneddon und Machaly (1992) bemerkten auch, dass die Kontraktionen induziert durch ATP epididymal-nah tonischer, während solche durch Noradrenalin induziert prostata-nah phasischer wurden. Ob eine unterschiedliche Verteilung postsynaptischer purinerger und adrenerger Rezeptoren oder eine Interaktion zwischen beiden Neurotransmittern zu diesem Phänomen führt, konnte bislang nicht geklärt werden.

1.4.2 Identifizierte P2-Rezeptoren im Vas deferens

Nachweis von P2-Rezeptoren mittels molekular-biologischer Methoden. Mittels Expressionsklonierung konnten Valera und Mitarbeiter die P2X₁-Untereinheit im Vas deferens der Ratte nachweisen (Valera et al., 1994). Die herausragende physiologische Bedeutung dieser Rezeptor-Untereinheit konnte mit verschiedenen Methoden demonstriert werden (siehe Kapitel 1.1.3, ‚therapeutische Bedeutung‘). Neben der P2X₁-Rezeptor-Untereinheit konnte auch die mRNA der Untereinheiten P2X₂, P2X₃ und P2X₄ im gesamten Vas deferens der Ratte detektiert werden [C. Büttner und G. Schmalzing, persönliche Mitteilung; (Brake et al., 1994; Bo et al., 1995; Housley et al., 1995)]. Nachfolgende Untersuchungen mit Subtyp-spezifischen Antikörpern gegen verschiedene P2X-Untereinheiten ergaben für die P2X₁-Rezeptor-Untereinheit eine starke Immun-Reaktivität auf den Membranen der glatten Muskelzellen des gesamten Vas deferens der Maus bzw. der Ratte (Mulryan et al., 2000; Lee et al., 2000), sowie eine weniger Membran-bezogene Immunreaktivität im Bereich der glatten Muskulatur des Vas deferens der Ratte für die P2X₂-Rezeptor-Untereinheit (Lee et al., 2000). Ebenfalls im Vas deferens der Ratte wurde die P2X₃-Rezeptor-Untereinheit in Nervenfaserbündeln der Adventitia, sowie subepithelial im Bereich der Lamina propria gefunden, während für die Rezeptor-Untereinheiten P2X₄, P2X₅, P2X₆ und P2X₇ keine Immunreaktivität detektiert wurde (Lee et al., 2000). Diskrepanzen bestehen bezüglich der P2X₂- und P2X₄-Rezeptor-Untereinheit im Vas deferens der Ratte. Trotz nachgewiesener mRNA für die P2X₄-Rezeptor-Untereinheit konnte mit spezifischen Antikörpern keine Immunreaktivität für diese Untereinheit beobachtet werden. Während Lee und Mitarbeiter die Expression der P2X₂-Rezeptor-Untereinheit auf der glatten Muskulatur detektierten (Lee et al., 2000), konnten Vulchanova und Mitarbeiter diese Untereinheit nur auf Axonen und Neuronenendigungen finden (Vulchanova et al., 1996). Für die P2X₂-Rezeptor-Untereinheit konnten Burton und Mitarbeiter zwei mRNA-Isoformen für die Kodierung der P2X₂-Rezeptor-Untereinheit im Vas deferens der Ratte isolieren (Burton et al., 2000). Mittels *In-situ*-Hybridisierung, *In-situ*-PCR und Immunhistochemie konnten Burton und Kollegen in erster Linie die P2X₂-Rezeptor-Untereinheit in der Lamina propria lokalisieren, während die P2X₂-Rezeptor-Untereinheit-kodierende mRNA im Bereich der glatten Muskulatur weniger ausgeprägt war. Ferner ließen sich innerhalb der Lamina propria interstitielle Cajal-Zellen, die stark P2X₂-Rezeptor-positiv waren, mit für das Vas deferens unklarer physiologischer

Bedeutung lokalisieren. Somit scheint der Anteil der P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten in der glatten Muskulatur deutlich größer zu sein als der P2X₂-Anteil, dennoch kann die Bildung von heteromultimeren P2X_{1/2}- oder P2X_{1/4}-Rezeptoren mit diesen Befunden nicht ausgeschlossen werden (Torres et al., 1999a; Brown et al., 2002).

Trotz der dominierenden Rolle der Kontraktions-vermittelnden P2X₁(-ähnlichen)-Rezeptor-Untereinheit auf glatter Muskulatur, ergaben Untersuchungen mit degenerierten P2Y-Primern, dass auch P2Y-kodierende mRNS im gesamten Vas deferens der Ratte vorhanden ist (C. Büttner und G. Schmalzing, persönliche Mitteilung). Die einzige mRNS für einen P2Y-Rezeptor, die bislang im Vas deferens - allerdings nur mittels RT-PCR eindeutig und nicht mit Northern Blot - detektiert wurde, kodiert den P2Y₄-Rezeptor und wurde aus den Vasa deferentia 6 Tage alter Ratten isoliert (Webb et al., 1998).

Nachweis von P2-Rezeptoren mittels funktionell-pharmakologischen Methoden.

Durch die elektrische Feldstimulation (EFS) des Samenleiters der Ratte wird eine biphasische Kontraktion hervorgerufen, bei welcher der erste Teil durch Desensibilisierung mit dem P2X₁-/P2X₃-selektiven Agonisten α,β -meATP (siehe Abb. 4.15) bzw. durch Suramin (siehe Kapitel 1.2, Vertreter der Suramin-Klasse“) blockiert werden konnte (Westfall und Westfall, 2001). Der markante erste Teil der biphasischen Kontraktion kann auch durch die exogene Applikation von α,β -meATP hervorgerufen werden. Durch die Reihung anderer exogen applizierter P2-Agonisten nach ihrer Wirkstärke, wurde an prostatistischen und epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte eine für den P2X₁-Rezeptor typische Folge erhalten, die auch mit rekombinanten P2X₁-Rezeptoren gut übereinstimmt (α,β -meATP > L- β,γ -meATP > ATP γ S > ADP β S; Damer, 2002). Aber nicht nur die Reihenfolge der Wirkstärke von Agonisten, sondern auch diejenige von Antagonisten (inhibitorische Wirkstärke) am isolierten Vas deferens gegen α,β -meATP korrelierte mit den Daten, die an rekombinanten P2X₁-Rezeptoren der Ratte, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, ermittelt wurden (Lambrecht et al., 1999, 2002; Rettinger et al., 2000). Schließlich konnte durch Deletion des P2X₁-Rezeptor-Gens in Mäusen gezeigt werden, dass an isolierten Vasa deferentia der Maus α,β -meATP keine Kontraktion zu induzieren vermag (Mulryan et al., 2000). Zusammen mit den molekular-biologischen Methoden erhaltenen Befunden ist das Vorhandensein funktioneller P2X₁-Rezeptor-Untereinheiten gesichert. Anders ist die Datenlage zu metabotropen P2-Rezeptoren im Vas deferens von Nagern.

2002) als auch Antagonisten weisen auf eine P2-Rezeptorheterogenität hin (Bültmann und Starke, 1994). Der Verdacht, dass neben dem Kontraktions-vermittelnden P2X₁-Rezeptor weitere P2Y-Rezeptoren ebenfalls eine Kontraktion vermitteln könnten, wurde durch die Wirkung des P2Y-Agonisten ADPβS am Vas deferens des Kaninchens begründet (Lambrecht et al., 1996b). Auch Vasa deferentia der Ratte werden durch exogene Applikation von ADPβS sowie UTP kontrahiert (Damer, 2002; Bültmann et al., 1999a). Gegen eine P2X₁-vermittelte Kontraktion durch ADPβS spricht, dass selbst die kummulative Gabe dieses Agonisten zu keiner Desensibilisierung führte (Damer, 2002). Zusammengenommen deuten funktionelle Untersuchungen mit ADPβS und UTP auf das Vorhandensein von metabotropen P2-Rezeptoren im Vas deferens der Ratte hin, während molekular-biologische Methoden zu metabotropen P2-Rezeptoren weitestgehend fehlen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von potenten, kompetitiven und Subtyp-selektiven P2-Rezeptor-Antagonisten und Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren, die ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung von nativen P2-Rezeptoren darstellen. Neben dem Mangel von oben genannten Antagonisten und Inhibitoren existieren eine Vielzahl weiterer, für das Forschungsgebiet charakteristischer Probleme. An dieser Stelle seien hier einige stichpunktartig aufgezählt, da diese den zweiten Teil dieser Arbeit, die Charakterisierung nativer UTP-sensitiver Rezeptoren im Samenleiter der Ratte, stark mitbestimmt hatten.

- 1) Der Einfluß der metabolischen Stabilität von Nukleotidagonisten bzw. -antagonisten auf die Wirkstärke.
- 2) Die funktionellen Interaktionen der durch Ekto-Nukleotidasen gebildeten Abbauprodukte.
- 3) Die Überführung von Agonisten wie ADP/UDP in andere, wirksame Anabolite durch Nukleotid-anabole extrazelluläre Enzyme.
- 4) Die endogene Freisetzung von Nukeotiden und deren Wirkung.
- 5) Nukleotid-Verunreinigungen von kommerziell erworben Nukleotiden.
- 6) Mangelnde P2-Rezeptor-Subtyp-Selektivität von Agonisten und Antagonisten.
- 7) P2-Rezeptorheterogenität in Geweben mit funktionell-antagonistischer oder -synergistischer Wirkung.
- 8) Agonist-induzierte Rezeptor Desensibilisierung/Internalisierung.
- 9) Auswirkungen von Speziesunterschieden auf die agonistisch/antagonistische Wirkstärke von Substanzen.
- 10) Biologische Bedeutung von homo- bzw. heteromultimer assemblierten P2X-Rezeptor-Untereinheiten und von Rezeptorgen-Splice-Varianten.

Ein **Teilziel** dieser Arbeit war es, diejenigen Teilstrukturen von P2-Rezeptor-Antagonisten der Suramin- (Abb. 1.3) und Pyridoxal-Phosphat-Klasse (Abb. 1.2) systematisch aufzudecken, die essentiell für die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung sind, da für zahlreiche P2-Rezeptoren-Subtypen keine selektiven und spezifischen Antagonisten existieren, die jedoch dringend für die Charakterisierung von nativen Rezeptoren benötigt werden. Ferner lag ein Augenmerk auf potentiellen Ekto-

Nukleotidase-Inhibitoren, da auch hier ein dringender Bedarf für die experimentelle Pharmakologie besteht.

Mit Hilfe funktionell-pharmakologischer Methoden und in unserem Labor etablierten Modellen an nativen P2-Rezeptoren (Lambrecht et al., 2000a; Braun et al., 2001, Czeche, 2001; Damer, 2002) wurde die Wirkung der zu prüfenden Substanzen an P2X₁- bzw. P2Y₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte bzw. des Ileums des Meerschweinchens evaluiert. Pharmakologisch interessante Verbindungen wurden detaillierter im Hinblick auf die P2-Rezeptor-Selektivität und -Spezifität, der Wirkgeschwindigkeit und ihren Wirkmechanismus untersucht. Die Experimente an Ekto-Nukleotidasen erfolgten größten Teils an folliculierten *Xenopus laevis* Oozyten.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen lassen sich in vier Stoffklassen unterteilen:

- NF023-Analoga (siehe Abb. 1.8 und Abschnitt 8.1)

Untersucht wurde der Einfluss einer Ringverkleinerung (gestrichelter Bogen) ausgehend vom Naphthalin- zum Phenylgerüst, der Einfluß der Substituenten R (R = H oder SO₃H), R¹ (R¹ = H oder CH₃) sowie der Einfluss der meta(3')- oder para(4')-Substitution der Harnstoffbrücke auf die inhibitorische Wirkstärke an P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen.

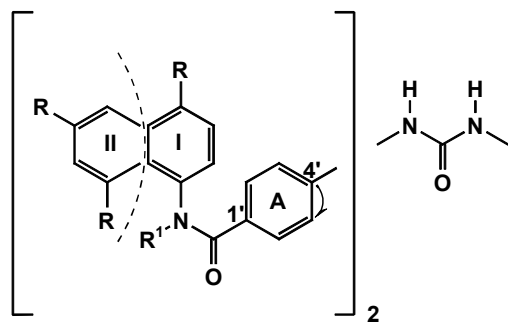


Abb. 1.8 Allgemeine strukturelle Modifikationen der NF023-Analoga.

Modifiziert wurde der aromatische Ring I durch eine weitere Anellierung (Ring II), Substituenten (R = H oder SO₃H). Weitere Substitutionen wurden am Amidstickstoff (R¹ = H oder CH₃) oder am Ring A wurde die Verknüpfung von der Para- (1'-4') auf die Meta-Position (1'-3') gewechselt.

- Symmetrische NF279-Analoga (siehe Abb. 1.9 und Abschnitt 8.2)

Untersucht wurde der Einfluss einer Ringverkleinerung (gestrichelter Bogen) vom Naphthalin- zum Phenylgerüst, der Einfluß der Substituenten R (R = H oder SO₃H) sowie der Einfluss der meta- oder para-Substitution der zwei Aminobenzoylreste auf die inhibitorische Wirkstärke an P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen (siehe Abb. 1.8). Zusätzlich wurden Verbindungen pharmakologisch und biochemisch charakterisiert, deren Aminobenzoylreste im Ring A gegen isostere Heterozyklen (Benzimidazol oder Furan; durchgezogene Bögen und gepunkteter Kreis) ausgetauscht oder deren

Stickstoffatome ($R^1 = H$ oder CH_3) methyliert waren.

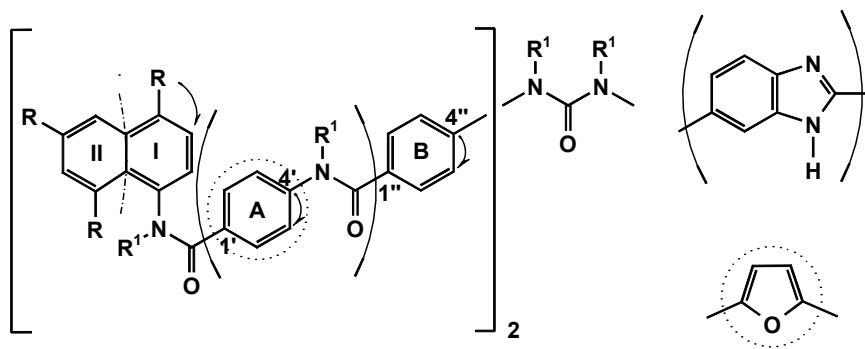


Abb. 1.9 Allgemeine strukturelle Modifikationen an symmetrischen NF279-Analoga.

Modifiziert wurden der aromatische Ring I durch eine weitere Anellierung (Ring II), die Substituenten ($R = H$ oder SO_3H). Weitere Substitutionen wurden an Stickstoffatomen ($R^1 = H$ oder CH_3) durchgeführt oder am Ring A und B wurde die Verknüpfung von der para-(1'-4') auf die meta-(1''-3''') Position gewechselt.

- Unsymmetrische NF279-Analoga (siehe Abb. 1.10 und Kapitel 8.3)

Der systematische Aufbau von NF279 führte zur Synthese von NF279-Teilstrukturen. Diese Teilstrukturen (a bis g) wurden pharmakologisch an P2-Rezeptoren und biochemisch an Ekto-Nukleotidasen charakterisiert.

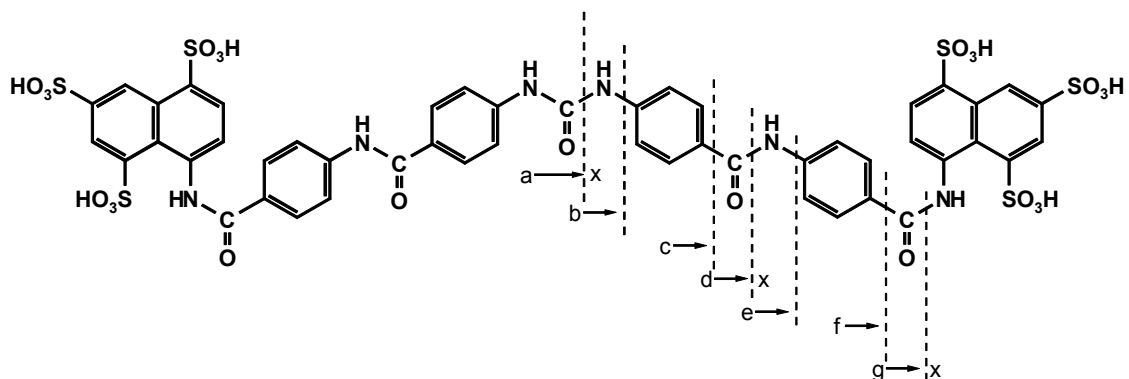


Abb. 1.10 Allgemeine strukturelle Modifikationen an unsymmetrischen NF279-Analoga.

Abbildung und Unterteilung nach Müller, 1999. Teilstrukturen stellen die Verbindungen a bis g dar. x symbolisiert OH, OCH_3 und OC_2H_5 .

- Heteromere, bivalente Verbindungen, bestehend aus Teilstrukturen des Suramins und PPADS: SB-Analoga (siehe Abb. 1.11 und Abschnitt 8.4).

Bei Vertretern der SB-Analoga wurde der Einfluss der Aldehydfunktion (R^1), die Anzahl und Substitutionsorte von Sulfonsäureresten am Naphthalingerüst (R^{3-5}), die Art der Verknüpfung (X) der Ringe A und B sowie die Substitution des Ringes A mit R^2 untersucht.

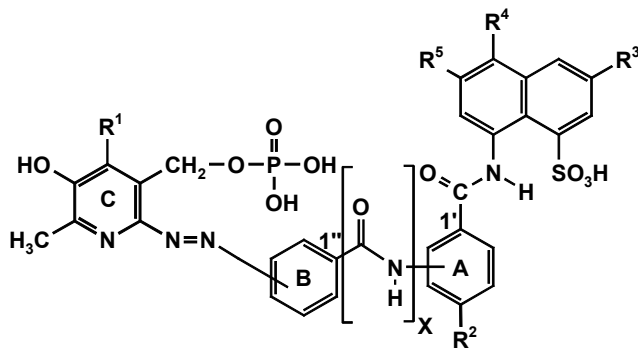


Abb. 1.11 allgemeine strukturelle Modifikationen an SB-Analoga.

$R^1 = \text{CH}_2\text{OH}, \text{CHO}$; $R^2 = \text{H}$ bzw. CH_3 ;
 $R^{3-5} = \text{H}$ bzw. SO_3H ; $X = 1$ oder 0 , $B = 1$
 oder 0 ; die Verknüpfung der Ringe A
 und B wurde von der Position 1' und 1''
 aus in die Meta- oder Para-Position
 variiert.

Der **zweite Teil** dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung metabotroper P2-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (Bültmann und Starke, 1994; Bültmann et al., 1999a, Damer, 2002). Die Charakterisierung nativer P2-Rezeptoren stellt eine der größten Herausforderungen in der P2-Rezeptor-Forschung dar. Es gibt eine Vielzahl nativer P2-Rezeptor-Phänotypen, denen bis heute kein exaktes Korrelat unter den möglichen homo- und heteromeren P2X-Rezeptoren oder P2Y-Rezeptoren zugeordnet werden kann. Allein für die trimeren P2X-Rezeptoren, die aus drei gleichen oder aus mindestens zwei verschiedenen P2X-Rezeptor-Untereinheiten gebildet werden können, wären für 7 verschiedene klonierte Untereinheiten nach Torres und Mitarbeiter (1999a), zirka 20 verschiedene Kombinationen möglich. Es kann nur gelingen die physiologischen Rezeptor-Untereinheit-Kombinationen aufzuklären, wenn von potenten und Subtyp-selektiven P2-Rezeptor-Antagonisten Affinitätsparameter bestimmt werden. Trotzdem wurde an dieser Stelle versucht, die Charakterisierung mit heute erhältlichen Antagonisten und Agonisten (siehe Abschnitt 1.5, erster Absatz, Punkte 1 - 10) in Ergänzung mit Histo- und Immunzytochemischen Methoden vorzunehmen.

Die große Bedeutung für dieses Vorhaben ergab sich zum einem aus der Notwendigkeit, das bereits bestehende P2X₁-Rezeptor-Modell - dem Samenleiter der Ratte - zu validieren, und zum anderen ein weiteres funktionelles P2Y-Rezeptor-Modell (P2Y₂/P2Y₄) in unserem Arbeitskreis zu etablieren. Da auch das medizinisch-therapeutische Interesse (siehe Kapitel 1.1.5) für diese Rezeptor-Subtypen enorm gewachsen ist, wäre es wünschenswert, wenn für diese Rezeptoren ein funktionelles Modell für die Entwicklung von potenten und Subtyp-selektiven P2Y-Liganden zur Verfügung stünde.

Unter Verwendung von P2-Agonisten, P2-Antagonisten und P2-Rezeptor-Antikörpern wurde versucht, funktionell und immunzytochemisch eine eindeutige Charakterisierung des metabotropen, UTP-sensitiven P2Y-Rezeptors vorzunehmen. Zur

Inhibition der hohen Nukleotid-spaltenden Enzymaktivität des Samenleiters (Khakh et al., 1995; Bültmann et al., 1996b, 1999b, Tennant et al., 1999) wurde Evans Blau, welches Ekto-Nukleotidasen hemmt (Bültmann et al., 1995, Ziganshin et al., 1996; Heine et al., 1999), verwendet. Das physiologische Zusammenspiel von P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen wurde bei der Charakterisierung des metabotropen P2-Rezeptors besonders berücksichtigt und stellte das Hauptproblem in diesem Teil der Arbeit dar.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Substanzen

2.1.1 Kommerziell bezogene Substanzen

- (-)-Noradrenalinhydrochlorid (NA; Fluka, Buchs, Schweiz)
- α,β -Methylenadenosin-5'-triphosphat-dilithiumsalz (α,β -meATP; Sigma, Deisenhofen)
- 2-Methylthioadenosin-5'-triphosphat-tetranatriumsalz (2MeSATP; Sigma, Deisenhofen)
- 6-N,N-Diethyl-D- β,γ -dibromomethylenadenosin-5'-triphosphat-triammoniumsalz (ARL67156, syn. FPL67156; Tocris Cookson, Bristol, Großbritannien)
- Adenosin (Ado; Sigma, Deisenhofen)
- Adenosin-5'-diphosphat-dinatriumsalz (ADP; Fluka, Neu-Ulm)
- Adenosin-5'-O-(2-thiodiphosphat)-dilithiumsalz (ADP β S; Sigma, Deisenhofen)
- Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)-tetralithiumsalz (ATP γ S; Sigma, Deisenhofen)
- Adenosin-5'-triphosphat-trinatriumsalz (ATP; Sigma, Deisenhofen)
- Albumin (Sigma, Deisenhofen)
- Ammoniummolybdat (Sigma, Deisenhofen)
- Atropinsulfat, kristallin, reinst (E. Merck, Darmstadt)
- Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Deisenhofen)
- Evans Blau Tetranatriumsalz (Eb; Tocris Cookson, Bristol, Großbritannien)
- Fiske-Subbarow Reduktionsmittel (Zusammensetzung: 1-Amino-2-naphthyl-4-sulfonsäure, Natriumsulfit und Natriumbisulfit; Sigma, Deisenhofen)
- Indomethacin (Sigma, Deisenhofen)
- Lithiumchlorid (Merk, Darmstadt)
- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES; Sigma, Deisenhofen)
- N⁶-Methyl-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat (MRS 2179, Sigma, Deisenhofen)
- Natriumdodecylsulfat, kristallin, reinst (SDS, E. Merck, Darmstadt)
- Nifedipin, kristallin, reinst (Sigma, St.Louis, USA)
- P¹, P⁴-Di-(adenosin-5')-tetrphosphat-ammoniumsalz (Ap₄A; Sigma, Deisenhofen)
- Physostigmin, kristallin, reinst (E. Merck, Darmstadt)
- Reaktiv Blau 2, kristallin, 88 % (RB 2; Synonym: Basilen Blau E-3G; Sigma, Deisenhofen)
- Suramin (Germanin[®]; Bayer, Leverkusen)
- Tetrodotoxin (TTX; RBI, Natick, MA, USA)
- Tricain, kristallin (Sigma, Deisenhofen)

- Uridin (Ud; Sigma, Deisenhofen)
- Uridin-5'-diphosphat-dinatriumsalz (UDP; Fluka, Neu-Ulm)
- Uridin-5'-triphosphat-trinatriumsalz (UTP; Sigma, Deisenhofen)

Histo- Immunzytochemie

Primärantikörper:

- Anti-P2Y₂, polyklonal, aus Kaninchen, 1:200 (P2Y₂-Antikörper; alomone labs, Jerusalem, Israel)
- Anti-P2Y₂, polyklonal, aus Kaninchen, 1:200 (P2Y₂-Antikörper; Neuromics, USA)
- Anti-P2Y₄, polyklonal, aus Kaninchen, 1:200 (P2Y₄-Antikörper, alomone labs, Jerusalem, Israel)
- ,Anti-P2Y₂'-Peptid (alomone labs, Jerusalem, Israel)
- ,Anti-P2Y₄'-Peptid (alomone labs, Jerusalem, Israel)
- Neurofilament-Antikörper (NF160); monoklonal, aus Maus, 1:100 (Sigma, Deisenhofen)

Sekundärantikörper:

- Anti-Kaninchen IgG Indocarbocyanin (Cy3) Konjugat, 1:400 (Dianova, Hamburg)
- Anti-Maus IgG, Fluorescein Isothiocyanat (FITC) Konjugat, 1:200 (Dianova, Hamburg)

Substanzen für Immunzytochemie:

- 4,6-Diaminido-2-phenylindol-dihydrochlorid, 1 µg/ml (DAPI; Sigma, Deisenhofen)
- Aceton, Methanol, Isopropylalkohol, Xylol, Isopentan (Reinheit: p.A.; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe)
- Antifading-Lösung [Glycerol, Moviol (Hoechst), Diazabicyclo-2.2.2-octane (DABCO; Fluka, Neu-Ulm)]
- Rinder Serum Albumin (BSA; Sigma, Deisenhofen)
- Gewebekleber (tissue-tek[®]; Leica, Bensheim)
- Natriumkakodylat, Sucrose, Ammoniumsulfid, Dextran-T250, Bleinitrat, Mangannitrat, Natriumhydroxid, Natriumazid, Salzsäure, Maleinsäure (Reinheit: p.A; Sigma, Deisenhofen)
- Paraformaldehyd, Pikrinsäure (E. Merck, Darmstadt)
- Permou[®] (Einbettmedium; Fischer Scientific; Fair Lawn, New Jersey, USA)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, freie Base (Tris; Sigma, Deisenhofen)
- Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen)

Chemikalien für Pufferlösungen:

Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Dinatriumsuccinat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kalziumchlorid, Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid, Natriumhydrogenkarbonat, Glukose (Reinheit: p.A.; E. Merck, Darmstadt)

2.1.2 Zur Verfügung gestellte Substanzen

Arecaidinpropargylesterhydrobromid (APE; synthetisiert von Herrn Dr. U. Moser und Frau U. Hermanni, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main)

NF-Substanzen⁵ (synthetisiert von Prof. Dr. P. Nickel, PD Dr. M. U. Kassack, Dr. G. Müller, Dr. K. Wehner, Dipl. pharm. H. Ullmann und Mitarbeiter, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn, Bonn)

Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'4'-disulfonsäure (PPADS) sowie SB-Substanzen synthetisiert von Herrn Dr. H. G. Bäumert, G. Spatz-Kümbel und Mitarbeiter, Institut für Biochemie, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main

Primärantikörper: NTPDase2-Antikörper (BZ3B4), 1:1500, polyklonal aus Kaninchen IgG von Prof. Dr. H. Zimmermann, Institut für Zoologie, Arbeitskreis Neurochemie Universität Frankfurt, Frankfurt/Main.

2.1.3 Rezepturen

Krebs-Henseleit-Lösung:

Wässrige Lösung (pH 7,4), in der 118,1 mmol Natriumchlorid, 25 mmol Natriumhydrogenphosphat, 4,7 mmol Kaliumchlorid, 1,3 mmol Kalziumchlorid, 1,2 mmol Kaliumdihydrogenphosphat, 0,6 mmol Magnesiumsulfat und 11,2 mmol Glukose pro Liter gelöst sind.

Für sämtliche **P2X₁**-vermittelten und **UTP-induzierten** Kontraktionen prostaticher bzw. epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte wurde der Krebs-Henseleit-Lösung 6 µM Indomethacin zugesetzt, um die Bildung von Prostaglandinen zu hemmen (Khakh et al., 1994). Für alle **P2Y₁**-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-

⁵ Die bereitgestellten NF-Substanzen wurden nach ihrer Synthese mittels ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und IR-Spektroskopie auf Identität und Struktur, sowie mittels HPLC/TLC auf Reinheit überprüft. Als bedeutendste Verunreinigung muß Natriumchlorid (durchschnittlich 0,7 – 28 %, Synthesebedingt) erwähnt werden. Abgesehen von Natriumchlorid und Wasser lag die Reinheit der Substanzen bei ≥95 % (Müller, 1999; M. U. Kassack et al., 2004).

leum wurde der Krebs-Henseleit-Lösung 0,3 μ M Atropin zugesetzt, um die M_3 -vermittelte Wirkung von neuronalem Acetylcholin zu hemmen (Lambrech et al., 1999).

Anti-Fading Lösung:

Eine mit 0.1 M Tris/HCl Puffer angesetzte und mit 25 % Glycerin und 10 % Moviol versetzte Lösung (pH 8,5), der vor Verwendung 2,5 % DABCO zugegeben wurde.

Phosphat-Puffer (PBS):

Wäßrige Lösung, in der 137 mmol Natriumchlorid, 3 mmol Kaliumchlorid, 10 mmol Dinatriumhydrogenphosphat und 1,8 mmol Kaliumdihydrogenphosphat pro Liter gelöst sind.

Tris-HCl:

Wässrige Lösung, in der 12,11 g Tris-HCl pro Liter gelöst ist.

TMS 0.2 M:

Wässrige Lösung, in der 24,2 g Tris-Base und 23,2 g Maleinsäure pro Liter gelöst sind.

TMS-Puffer:

200 ml einer wässrigen Lösung bestehend aus 60 ml TMS 0.2 M, 65 ml 0,2 M Natriumhydroxidlösung, 17.2 g Sucrose und 4 ml einer 0,1 M Kalziumchloridlösung. Diese Lösung wird mit 0,1 N HCl auf pH 6,8 eingestellt.

Antikörper:

Alle Antikörper wurden in PBS, in dem 1 % BSA (w/v) und 0,05 % Natriumazid (w/v) gelöst waren, angesetzt.

Puffer/Reagenzien für Studien an den Ekto-Nukleotidasen:

Fiske-Subbarow-Reduktionsmittel: Wässrige Lösung, in der 5 g des Reduktionsmittels in 31.3 ml gelöst sind.

Modifizierte Ringerlösung für *Xenopus laevis* Oozyten. Wässrige Lösung, in der 110 (90) mmol Natriumchlorid, 2,5 (1,0) mmol Kaliumchlorid, 1,8 (1,0) mmol Kalziumchlorid, 1,8 (1,0) mmol Magnesiumchlorid und 5 mmol HEPES pro Liter gelöst sind. In Klammern gesetzte Werte beziehen sich auf die Pufferlösung, die zum Lagern der Oozyten benutzt wurde. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Natriumhydroxidlösung auf 7,4 eingestellt.

Folgende Substanzen wurden gelöst in:

- Ethanol (96 % v/v): Indomethacin.

- 0.1 N NaOH und/ oder DMSO: NF793, NF792, NF824, NF840. Die DMSO Konzentration im Organbad war kleiner als 0,1 %.
- DMSO: Nifedipin.
- wäßriger Ascorbinsäure-Lösung (equimolar zur zu lösenden Substanz): Physostigmin und Noradrenalin.

2.2 Geräte

- DMS DC Verstärker, W. Fleck, Mainz
- HSE Stimulator II, Typ 215/II, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
- isometrischer Aufnehmer, TF6V5, W. Fleck, Mainz
- isotonischer Aufnehmer, TF6V5iso, W. Fleck, Mainz
- Jung CM 3000, Kryotom, Leica
- Photometer, Spectronic[®] Genesis 5 (Instruments, Inc., Rochester, New York, USA)
- Schreiber, Rikadenki Koguo, Tokyo, Japan
- Thermostat, Julabo U3, Julabo Labortechnik, Seelbach
- Zeiss Axiophot, Lichtmikroskop, Zeiss

2.3 Tiere

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

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

Die Haltung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit den Tierschutzgesetzlichen Vorgaben der Bundesrepublik Deutschland. Die Einhaltung dieser Vorgaben wurde regelmäßig durch einen Veterinärmediziner kontrolliert.

2.4 Methoden

2.4.1 Funktionelle Untersuchungen

Die funktionell-pharmakologischen Modelle des isolierten Vas deferens der Ratte und der isolierten Longitudinal-Muskulatur des Meerscheinchen-Ileums wurden von Frau Dr. S. Damer bzw. Frau Dr. S. Czeche etabliert und validiert (Czeche, 2001; Damer, 2002). Zusätzliche Untersuchungen wurden von Frau Dr. K. Menke durchgeführt (Menke, 2003).

2.4.1.1 Isoliertes Vas deferens der Ratte

Präparation/Allgemeines. Bei Sprague-Dawley Ratten wurden mittels Kohlendioxid-Begasung eine Asphyxie herbeigeführt, nach 1 min erfolgte die Dekapitierung und Ausblutung des Tieres. Nach Eröffnung des Abdomens kaudalwärts erfolgte die Darstellung des Urogenitaltraktes. Anschließend wurden die Vasa deferentia dargestellt und großzügig mit anhaftendem Bindegewebe ohne Palpation ektomiert. Die Vasa wurden in begaste Krebs-Henseleit-Lösung überführt (siehe 2.1.3), einer Mikropräparation unterzogen, von Bindegewebe befreit und in epididymale und prostatistische Segmente per Scherenschlag getrennt. Nachfolgend wurden ca. 1,5 cm lange Präparate mit Baumwollfäden an isometrischen Aufnehmern (TF6V5) befestigt. Die Präparate wurden in 6-ml-Organbäder, gefüllt mit modifizierter (6 μ M Indomethacin, 1,3 mM Kalzium), Carbogen-begaster Krebs-Henseleit-Lösung, aufgehängt. Prostatistische und auch epididymale Segmente wurden für den gesamten Versuch viertelstündlich gespült, unter einer Vorlast von 750 mg gehalten und anfangs für mindestens 1 Stunde an die Bedingungen (37 °C) adaptiert. Die Substanz Indomethacin (6 μ M) befand sich bei allen Versuchen mit prostatistischen und epididymalen Segmenten von Anfang an in der Krebs-Henseleit-Lösung. Für das P2X₁-Rezeptor-Modell wurde die *Pars prostatica* und für die Untersuchung des UTP-sensitiven Rezeptors die *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte verwendet. Bei allen Versuchen diente ein Organ als Zeitkontrolle.

Screening-Daten. Nach der oben erwähnten Adaptation der Organe an die Bedingungen im Organbad, erfolgte bei prostatistischen Segmenten eine Konditionierung mittels α,β -meATP (10 μ M), welches im Abstand von 30 min in die Organbadflüssigkeit appliziert wurde. Die Agonist-Applikationen wurden so lang

wiederholt, bis die durch α,β -meATP hervorgerufene Kontraktion nicht mehr als $\pm 15\%$ im Vergleich zur vorangegangenen abwich. War dies der Fall, wurde unmittelbar nach der letzten Agonistengabe der Organbadflüssigkeit die Antagonisten ($10\ \mu\text{M}$) zugesetzt und für mindestens 60 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde erneut α,β -meATP ($10\ \mu\text{M}$) appliziert. Nach einer Auswaschphase, deren Dauer mindestens 60 min betrug, aber im Falle einer andauernden Hemmung der Antagonisten auch länger erfolgte, wurde erneut in 30-min-Intervallen der Agonist, α,β -meATP ($10\ \mu\text{M}$), der Organbadflüssigkeit zugesetzt. Bei konstanten Kontraktionen wurde der oben beschriebene Zyklus erneut wiederholt und die gleiche Konzentration ($10\ \mu\text{M}$) eines anderen Antagonisten für 60 min inkubiert. Auf diese Weise konnten 2 - 4 Testzyklen durchgeführt werden.

Dosis-Inhibitions-Kurven (IC_{50} -Daten). Um IC_{50} -Werte (siehe 2.4.1.3) von Antagonisten zu ermitteln, wurde exakt das gleiche Verfahren wie unter Screening-Daten angegeben, durchgeführt. Abweichend davon, wurden jedoch, in Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkstärke des Antagonisten, verschiedene Konzentrationen des Antagonisten nach der letzten konstanten Kontraktion, hervorgerufen durch α,β -meATP ($10\ \mu\text{M}$), für mindestens 60 min inkubiert. Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass an ein und demselben Organen steigende, mindestens um Faktor 10 auseinanderliegende Konzentrationen des Antagonisten, Zyklus für Zyklus inkubiert wurden. Der Konzentrationsbereich eines Antagonisten, der die Hemmung von 0 % bis hin zur maximalen Wirkung beschreibt, wurde mindestens dreimal (n) an Organen von mindestens 3 verschiedenen Tieren (N) untersucht. Die erhaltenen Wertepaare (Konzentration des Antagonisten; %-Hemmung), wurden wie unter Abschnitt 2.4.1.3 beschrieben, ausgewertet. Im Falle von IC_{50} -Daten an epididymalen Segmenten (UTP-sensitiver Rezeptor) wurde UTP ($30\ \mu\text{M}$) - in Anwesenheit von $100\ \mu\text{M}$ Evans Blau - halbstündlich appliziert, und nach gleichem Prinzip wie an prostatistischen Segmenten verfahren.

Dosis-Wirkungs-Kurven (EC_{50} -Daten). Wie zur Ermittlung von IC_{50} -Daten (siehe 2.4.1.3), ist auch diejenige für EC_{50} -Daten eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve die wichtigste Grundlage. Das praktische Vorgehen für den Agonisten α,β -meATP (prostatistische Segmente des Vas deferens der Ratte; P2X_1) soll hier erläutert werden. Nach der üblichen Adaptation und Konditionierung (siehe „Screening-Daten“) der Organe erfolgte die Gabe von steigenden Konzentrationen α,β -meATP ($0,1 - 100\ \mu\text{M}$; bei Bedarf bis $300\ \mu\text{M}$) in Konzentrations-abhängigen Zeitintervallen ($0,1-10\ \mu\text{M}$:

15 min; 10-30 μM : 30 min; 30-100 μM : 45 min; ab 100 μM : 60 min), um eine Abnahme der Kontraktion in Folge der α,β -meATP-Konzentrations-abhängigen Desensibilisierung der Organe zu vermeiden. Zunächst wurde eine Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve, unter Verwendung eines Konzentrationsbereichs, der die Wirkung von α,β -meATP hinreichend beschreibt, in Abwesenheit eines Antagonisten durchgeführt. Nach Gabe der maximal-wirksamen Agonist-Konzentration (festgelegt auf 100 μM ⁶) am Ende der Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte, am selben Organ, die Inkubation des Antagonisten für mindestens 60 min, bis dann mit der kleinsten nicht-Kontraktions-auslösenden Konzentration von α,β -meATP, der zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve, begonnen wurde. Nach jeder Gabe von α,β -meATP wurde das Organ zur Elimination des Agonisten dreimal mit Krebs-Henseleit-Lösung (1,3 mM Kalziumionen und 6 μM Indomethacin) gespült und im Falle der zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve erneut mit Antagonist-enthaltender Nährlösung versetzt. Die Angabe der Wirkung von α,β -meATP (mg Zug) wurde in %-Wirkung transformiert. Die Maximal-Wirkung von α,β -meATP in einer Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve wurde willkürlich gleich 100 % gesetzt. Für jede Antagonisten-Konzentration wurde die oben beschriebene Prozedur mindestens dreimal (n) an Organen von mindestens drei verschiedene Tieren (N) wiederholt. Die durch die Antagonisten veränderte Wirkstärke (EC_{50} -Werte) von α,β -meATP wurde benutzt, um die antagonistische Potenz zu bestimmen (siehe 2.4.1.3). Durch die Transformation der Züge der Organe (mg) in prozentuale Wirkungen, war es möglich die Einzel-Daten, die die sigmoidale Kurve beschreiben, arithmetisch zu mitteln und summierte Einzelversuche darzustellen.

Die Ermittlung von **EC_{50} -Werten an epididymalen Segmenten** des Vas deferens der Ratte verschiedener P2-Rezeptor-Agonisten erfolgte nach der selben Vorgehensweise wie für α,β -meATP an prostatischen Segmenten. Allerdings wurden, unabhängig von der Konzentration, ausnahmslos alle Agonisten im Abstand von 30 min appliziert, um die Agonist-induzierte Desensibilisierung zu vermeiden. Die mathematische Auswertung ist analog zu 2.4.1.3, jedoch wurden zur Ermittlung der sigmoidalen Funktion absolut-quantitative (mg Zug) und nicht prozentuale Werte verwendet. Dies gestattete eine Vergleichende Darstellung der biologischen Aktivität der Agonisten.

⁶ Diese Konvention wurde nötig, da an prostatischen Segmenten des Samenleiters der Ratte selbst mit höchsten Konzentrationen von α,β -meATP keine definierte Maximalwirkung zu erreichen ist (Damer, 2002).

2.4.1.2 Isoliertes Meerschweinchen-Ileum

Präparation/Allgemeines. Die Meerschweinchen wurden durch Schlag betäubt und nachfolgend ausgeblutet oder dekapitiert. Nach Eröffnung des Abdomens kaudalwärts erfolgte die Darstellung des Caecums. Anschließend wurde der Ileo-caecal-Bereich dargestellt und mittels Scherenschlag ca. 2 cm vom Caecum entfernt, durchtrennt. Anschließend wurde mittels Mikroschere das Ileum von distal nach proximal auf einer Länge von etwa 10 cm vom Mesenterium befreit. Das so vom Mesenterium befreite Ileum wurde gleichförmig mit der anatomischen Pinzette, ca. 60 cm hoch, aus dem Tier herausgezogen, sofort wieder entspannt und vom proximalen Darmrohr getrennt. Das isolierte, ileo-caecal-nahe Darmrohr wurde in begaste Krebs-Henseleit-Lösung überführt (2.1.3), auf eine Pipette aufgezogen und längs zum Darm angeschnitten. In einer Mikropräparation wurde die Längs- von der Ringmuskulatur abgestreift. Nachfolgend wurde das gesamte Präparat in ca. 1,5 cm lange Stücke geschnitten, mit Baumwollfäden unter isometrischen oder isotonischen Bedingungen an Aufnehmern (TF6V5/iso bzw. TF6V5) befestigt und in 6-ml-Organbäder befüllt mit modifizierter (P2Y₁: 0,3 µM Atropin und 1,3 mM Kalzium) und mit Carbogen begaster Krebs-Henseleit-Lösung aufgehängt. Die isolierten Organe wurden während des gesamten Versuches viertelstündlich gespült, unter einer Vorlast von 1,0 g gehalten und anfangs für mindestens 1 Stunde an die Bedingungen (37 °C) adaptiert. Bei allen Experimenten befand sich Atropin (0,3 µM) von Anfang an in der Krebs-Henseleit-Lösung. Ein Organ diente als Zeitkontrolle.

Screening-Daten. Das Versuchsprotokoll entsprach dem bei den Experimenten am Vas deferens der Ratte (siehe 2.4.1.1), jedoch wurde als Agonist ADPβS (10 µM) verwendet.

Dosis-Inhibitions-Kurven (IC₅₀-Daten). Die Experimente zur Durchführung von Dosis-inhibitions-Kurven erfolgten analog zu jenen am Vas deferens der Ratte (siehe (siehe 2.4.1.1)). Auch hier erfolgte die Verwendung von 10 µM ADPβS.

Dosis-Wirkungs-Kurven (EC₅₀-Daten). Das praktische Vorgehen für den Agonisten ADPβS (Meerschweinchen-Ileum; P2Y₁) soll an dieser Stelle erläutert werden. Nach der üblichen Adaptation und Konditionierung (siehe „Screening-Daten“) der Organe erfolgte die Gabe von steigenden Konzentrationen ADPβS (0,1 – 100 ; bei Bedarf bis 300 µM) in konstanten Zeitintervallen von 15 min. Die Gabe von Einzeldosen erfolgte, um eine im Vergleich zum Vas deferens weniger starke Desensibilisierung, induziert

durch den Agonisten, zu vermeiden. Zunächst wurde eine Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve, unter Verwendung eines Konzentrationsbereichs, der die Wirkung von ADP β S vollständig beschreibt, in Abwesenheit eines Antagonisten durchgeführt. Nach Gabe der maximal-wirksamen Agonist-Konzentration (eine Maximalwirkung deutet sich bei 100 μ M an) am Ende der Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte, am selben Organ, die Inkubation des Antagonisten für mindestens 60 min, bis dann mit der kleinsten nicht-Kontraktions-auslösenden Konzentration von ADP β S, der zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve, begonnen wurde. Nach jeder Gabe von ADP β S wurde das Organ zur Elimination des Agonisten dreimal mit Krebs-Henseleit-Lösung (1,3 mmol Kalziumionen und 0,3 μ M Atropin) gespült und im Falle der zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve erneut mit Antagonist-enthaltender Nährlösung versetzt. Die Angabe der Wirkung von ADP β S (mg Zug) wurde in %-Wirkung transformiert. Die Maximalwirkung von ADP β S in einer Referenz-Dosis-Wirkungs-Kurve entsprach bei 100 μ M etwa 100 %. Für jede Antagonisten-Konzentration wurde die oben beschriebene Prozedur mindestens dreimal (n) an Organen von mindestens 3 verschiedene Tieren (N) wiederholt. Die durch die Antagonisten veränderte Wirkstärke (EC₅₀-Werte) von ADP β S wurde benutzt, um die Wirkstärke der Antagonisten zu bestimmen (siehe 2.4.1.3). Durch die Transformation der Züge der Organe (mg) in prozentuale Wirkungen, war es möglich die Einzel-Daten, die die sigmoidale Kurve beschreiben, arithmetisch zu mitteln und summierte Einzelversuche darzustellen.

2.4.1.3 Auswertung

Zur Bestimmung von **%-Hemmung** wurde die Hemmung der Agonist-induzierten (10 μ M Agonist; P2X₁: α , β -meATP; P2Y₁: ADP β S) Kontraktion in mg Zug (E_[B]) durch einen Antagonisten (10 μ M; mit Ausnahme der SB-Analoga; P2X₁ = 5 μ M, P2Y₁ = 1 μ M) ermittelt. Als Vergleich diente eine vorhergehende Referenz-Kontraktion in mg Zug (E₀) in Abwesenheit des Antagonisten. Gemäß Gleichung (1) erfolgte durch das Einsetzen der entsprechenden Werte für die Variablen E_[B] und E₀, die Berechnung der prozentualen Hemmung (%-Hemmung) Dieser Versuch wurde mindestens dreimal (n) an drei verschiedenen Individuen (N) wiederholt, und die Werte arithmetisch gemittelt.

$$(1) \quad \% \text{ Hemmung} = 100 - [100 \times E_{[B]} / E_0]$$

E₀ = Effekt des Agonisten

$E_{[B]}$ = Effekt des Agonisten in Anwesenheit einer definierten Konzentration des Antagonisten [B]

Die Ermittlung der **IC₅₀-Werte**, d.h. die Ermittlung derjenigen molaren Konzentration eines Antagonisten die nötig ist, um die Wirkung, verursacht durch eine definierte, konstante Konzentration eines Agonisten, halbmaximal zu hemmen, erfolgte in Analogie zu den Werten von %-Hemmung, aber in Gegensatz zu diesen wurde die Hemmung der Agonist-induzierten Kontraktion in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten bestimmt. Die so erhaltenen unabhängigen Wertepaare (Konzentration des Antagonisten; %-Hemmung) wurden für die jeweilige Konzentration des Antagonisten arithmetisch gemittelt. Die arithmetischen Mittelwerte der Hemmungen für die jeweiligen Antagonisten-Konzentrationen wurden einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Regression (Gleichung 2) mit variabler Steigung (p) unterzogen (Graphpad Software inc. 1996, Graphpad Prism 3.03). Diese Gleichung basiert auf der sigmoidalen Funktion zur mathematischen Beschreibung der Wirkung eines Agonisten (siehe unten) nach Parker und Waud (1971).

$$(2) \quad E_B = E_{\max} \times [B]^p / ([B]^p + IC_{50}^p)$$

E_B = Effekt bei einer bestimmten Konzentration des Antagonisten

E_{\max} = maximal erreichbarer inhibitorischer Effekt

[B] = Konzentration des Antagonisten

IC_{50} = molare Konzentration des Antagonisten, die die Auslösung einer halbmaximalen Hemmung der Agonist-Wirkung hervorruft

p = Steigung der Dosis-Inhibitions-Kurve

Das Maximum der ersten Ableitung der sigmoidalen Funktion ist die molare Konzentration des Antagonisten, die eine halbmaximale Hemmung der Kontraktion, hervorgerufen durch eine definierte Einzeldosis eines Agonisten, bewirkte. Die pIC_{50} -Werte wurden gemäß Gleichung (3) ermittelt:

$$(3) \quad pIC_{50} = -\log IC_{50}.$$

Die Bestimmung von **EC₅₀-Werten** von Agonisten aus Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte mit Hilfe einer nichtlinearen sigmoidalen Regression, wobei diejenige molare Agonisten-Konzentration, die den halbmaximalen Effekt hervorrief, die EC_{50} war. Es erfolgte die Bestimmung der Wirkung (mg Zug) für einen Konzentrationsbereich des Agonisten, der genügte, um die vollständige Beschreibung der Wirkung (keine Wirkung bis Maximalwirkung) vorzunehmen. Die für bestimmte Agonist-Konzentrationen

erhaltenen Wirkungen wurde arithmetisch gemittelt. Die arithmetischen Mittelwerte der Wirkungen für die jeweiligen Agonist-Konzentrationen wurden einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Regression (Gleichung 4) mit variabler Steigung unterzogen (Graphpad Software inc. 1996, Graphpad Prism 3.03). Diese Funktion wurde zur mathematischen Beschreibung der Wirkung von Agonisten von Parker und Waud (1971) beschrieben.

$$(4) \quad E_A = E_{\max} \times [A]^p / ([A]^p + EC_{50}^p)$$

E_A = Wirkung bei einer bestimmten Konzentration des Agonisten

E_{\max} = maximal erreichbarer Wirkung des Agonisten

$[A]$ = Konzentration des Agonisten

EC_{50} = molare Konzentration des Agonisten, die zur Auslösung einer halbmaximalen Wirkung führt

p = Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve

Das Maximum der ersten Ableitung der sigmoidalen Funktion nach Parker und Waud (1971) ist die molare Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale Wirkung bewirkte. Die pEC_{50} -Werte wurden gemäß Gleichung (5) ermittelt:

$$(5) \quad pEC_{50} = -\log EC_{50}.$$

Die durch den negativen dekadischen Logarithmus transformierten EC_{50} -Werte dienen u.a. im Abschnitt 3.2.4 zur Beschreibung der Agonist-Wirkstärke.

Zum Zwecke der Ermittlung von **pA_2 -Werten** erfolgte die Bestimmung von pEC_{50} -Werten (siehe Gleichung 5) des Agonisten in Ab- und in Anwesenheit (definierte Konzentration) des Antagonisten. Die durch dieses Verfahren ermittelten pEC_{50} Werte wurden in die Gleichung (6) eingesetzt und von einander subtrahiert, woraus der absolute Betrag dr (für dose ratio) resultiert:

$$(6) \quad \log dr = pEC_{50}[A] - pEC_{50}[a].$$

$[a]$ = Agonist-Konzentration die nötig ist, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen.

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

$$(7) \quad dr = 1 + [B]/K_B.$$

$[B]$ = Konzentration des Antagonisten

K_B = Dissoziationskonstante

Anschließend erfolgte die logarithmische Umformung der Gleichung (7)⁷ zu Gleichung (8) $\log (dr - 1) = \log [B] - \log (K_B)$.

Durch die experimentelle Bestimmung von dr wurden mit Hilfe von Gleichung (8) pA_2 -Werte ($pA_2 = -\log K_B$), korrespondierend zu jeweils einer Antagonisten-Konzentration, ermittelt. Wurden pK_2 -Werte eines Antagonisten bei verschiedenen Antagonisten-Konzentrationen bestimmt, folgte zum Zwecke der Schild-Plot-Analyse (Arunlakshana und Schild, 1959), das arithmetische Mitteln der Terme [$\log (dr-1)$, siehe Gleichung (8)] für eine jeweilige Antagonisten-Konzentration. Die Mittelwerte wurden graphisch in Abhängigkeit von der jeweiligen Antagonistenkonzentration im sogenannten Schild-Plot dargestellt und einer linearen Regression gemäß Gleichung (9) unterworfen (Tallarida und Murray, 1986).

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

m = Steigung der Regressionsgeraden

K_B = Dissoziationskonstante des Antagonisten, Schnittpunkt mit der Abszisse

$\log [B]$ = Logarithmus der molaren Konzentration des Antagonisten

Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse bzw. diejenige Antagonisten-Konzentration bei welcher $\log (dr-1) = 0$ ist (siehe Gleichung 10), wurde in der vorliegenden Arbeit als pA_2 -Wert bezeichnet.

$$(10) \quad pA_2 = -\log [B] = -\log K_B / m$$

Um die Frage nach der Art des Antagonismus zu klären, wurde die Steigung der Regressionsgeraden herangezogen. Eine Substanz wurde hinsichtlich ihres Antagonismus als rein kompetitiv betrachtet, wenn der Anstieg der Regressionsgeraden dieser Substanz von eins nicht signifikant ($p < 0,05$) verschieden war, sowie die Dosis-Wirkungs-Kurven des Agonisten durch die Anwesenheit des Antagonisten parallel nach rechts verschoben wurden.

2.4.2 Ekto-Nukleotidasen

2.4.2.1 *Xenopus laevis* Oozyten

Präparation. Das Abdomen des in Tricainlösung (0.2% w/v) betäubten

⁷ Gaddum, J. H. (1937) The quantitative effects of antagonistic drugs. J. Physiol. 89 7P - 9P.

südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) wurde eröffnet und die von Gallerte (Ovarialepithel) umgebenen Oozytensäckchen ektomiert. Anschließend wurden die Tiere chirurgisch versorgt, die Oozyten mechanisch von dem inneren Ovarialepithel getrennt und bis zu fünf Tage in modifizierter Ringerlösung (19 °C) gelagert (siehe 2.1.3).

Protokoll. Der gesamte Versuch wurde bei 20 °C in modifizierter Ringerlösung (2.1.3) durchgeführt. Der weitere Verlauf erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ziganshin et al., 1995 und Damer, 2002. Jeweils drei Oozyten wurden 15 – 25 min gespült und befanden sich in 250 µl Puffer. Der Puffer wurde durch Substrat-haltigen (ATP, 100 µM) Puffer (siehe 2.1.3) ersetzt. Diese Lösung wurde mit den Oozyten 30 min geschwenkt, nachfolgend von den Oozyten getrennt und die Substratspaltung beendet. Dazu wurde die Lösung mit 1 ml 2,5 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) versetzt. Die Oozyten wurden erneut für etwa 15 min gespült und nachfolgend mit 200 µl Puffer, welcher den möglichen Inhibitor (300 µM NF-/SB-Substanzen) enthielt, für 30 min vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl Puffer, in dem 500 µM ATP sowie die Hemmsubstanz gelöst war (Endkonzentration: ATP = 100 µM; Inhibitor = 300 µM). Die nach jeder Substratinkubation erhaltenen Lösungen wurden mit SDS (2,5 %) inaktiviert und gesammelt. Um darin enthaltenes anorganisches Phosphat zu bestimmen, wurde 1 ml einer 1,25 % (w/v) Ammoniummolybdat-Lösung in 2 M HCl und 0,1 ml des Reduktionsmittels Fiske-Subbarow, 16 % (w/v), zugesetzt. Die so behandelten Lösungen wurden in Küvetten überführt und 30 min später spektrophotometrisch bei 700 nm mit dem Gerät Spectronic (siehe Abschnitt 2.2) vermessen.

2.4.2.2 Vas deferens der Ratte

Protokoll. Die Vasa deferentia wurden wie unter 2.4.1.1 beschrieben präpariert. Die ca. 1 - 5 mg schweren Stücke (Feuchtgewicht) wurden sorgfältig von anhaftendem Bindegewebe befreit und mit 250 µl ATP-haltigem (100 µM) Succinat-Puffer für 30 min bei 30 °C versetzt. Anschließend wurde das Gewebe (epididymale und prostatistische Segmente) von der Puffer-Lösung getrennt und die Enzymaktivität mittels 1 ml 2,5 % Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) in der Lösung unterbunden und, wie unter 2.4.2.1 beschrieben, die gebildete Menge an anorganischem Phosphat (P_i) bestimmt. Nachdem die glattmuskulären Präparate 15 min gespült wurden, erfolgte die Vorinkubation mit 100 µM Evans Blau (Inhibitor) für 30 min und nachfolgend mit

Inhibitor und Substrat für wiederum 30 min. Die weitere experimentelle Vorgehensweise entsprach derjenigen in Abschnitt 2.4.2.1.

2.4.2.3 Auswertung der Ekto-Nukleotidase Aktivität

Den gemessenen Absorptionen bei 700 nm wurde mittels zuvor erstellter Eichgerade (Kaliumdihydrogenphosphat-Konzentrationsreihe), jeweils eine absolute Phosphatmenge in nmol zugewiesen. Lösungen mit Inhibitor wurden hinsichtlich ihrer absoluten Phosphatmengen (zweite Inkubation) ins Verhältnis mit den absoluten Werten der ersten Inkubation (nur ATP, 100 μ M) gesetzt, so dass ein prozentualer Hemmwert für den Inhibitor erhalten wurde. Falls nichts anderes angegeben, stammten die gemittelten %-Hemmwerte aus drei Einzelversuchen mit je drei Oozyten pro ‚well‘. Die Änderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit wurde parallel zu den Bestimmungen erfasst, um einen Zeitfaktor zu ermitteln. Dieser wurde zur Korrektur der absoluten Phosphatmengen benutzt.

2.4.3 Histo-/Immunzytochemie

2.4.3.1 Darstellung der ATPase/ADPase-Aktivität

Für die histologische Lokalisierung der Nukleotidase-Aktivität wurde eine Bleiphosphat-Methode angewendet (Braun et al., 1998; 2003). Die wie unter 2.4.1.1 gewonnenen Vasa deferentia wurden samt anhaftendem Bindegewebe in Gewebekleber (tissue-Tek[®]) eingebettet und mit Hilfe von in flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan (-80 °C) gefroren. Die gefrorenen epididymalen Segmente wurden bei -20 °C geschnitten. Die Kryo-Mikrotom-Schnitte mit einer Dicke von 14 μ M wurden auf „silanisierte“ Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden bei -80 °C bis zu Ihrer Verwendung gelagert. Die Gewebe wurden mit 4% Paraformaldehyd und 0,05 M Kakodylat-Lösung für 12 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Gewebe in einer Lösung mit 0,05 M Kakodylat und 0,25 M Sucrose für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Dann wurden die Objektträger für 30 min in mit Kalziumchlorid (2 mM) versetztem TMS-Puffer (siehe 2.1.3) gestellt. Anschließend wurden die Objektträger in TMS-Puffer, welcher zusätzlich 1 mM ATP bzw. ADP, 3g Dextran T250/ 100 ml, 2 mM Blei(II)nitrat und 5 mM Mangan(II)nitrat Lösung enthielt, für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach gründlichem 10minütigem Waschen in bidestilliertem Wasser erfolgte bei pH 7,0 für

die Dauer von 2 min die Umfällung des entstandenen Bleiphosphates zu Bleisulfid mittels 1 % Ammoniumsulfid-Lösung. Nach Entwässerung mittels Isopropanolreihe bzw. Entzug polarer Lösungsmittel durch eine Xylolreihe wurden die Objekte schließlich in Permount[®] eingebettet. Gewebeschnitte, in denen die Substrate ATP oder ADP durch Pufferlösung ersetzt wurden, dienten als Kontrollen.

2.4.3.2 Darstellung des P2Y₂-/P2Y₄- Rezeptors und des NTPDase2-Enzyms

P2Y₂/P2Y₄-Rezeptor-Immunfärbung. Die Kryostatschnitte (14 µm dick) epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte, gelagert bei -80 °C, wurden 7 min lang bei minus 20 °C mit Methanol fixiert und nachfolgend dreimal für 5 min in PBS-Puffer (siehe 2.1.3) bei Raumtemperatur gewaschen. Als weiteren Schritt wurden die Objekte bei Raumtemperatur für 30 min mit 5 % Rinder-Serum-Albumin behandelt. Der primäre Antikörper, wurde in einem Gemisch aus PBS-Puffer, 1 % Rinder-Serum-Albumin (BSA) und 0,05 % Natriumazid 1:200 verdünnt, wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer mit den Objekten inkubiert. Die Kontrollen wurden (statt mit dem primären Antikörper) nur mit dem Gemisch aus PBS-Puffer und 1 % Rinder Serum Albumin behandelt. Die Doppelmarkierung mit dem monoklonalen Neurofilamentantikörper NF160 (1:100) erfolgte nach der Inkubation mit dem Anti-P2Y₂ bzw. Anti-P2Y₄ für 50 min bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden dreimal für 5 min in PBS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen, um sie mit den sekundären Antikörpern Anti-Kaninchen IgG (CY3; 1:400) bzw. Anti-Maus (FITC; 1:200) jeweils kombiniert mit dem Kernfärbemittel DAPI (1 µg/ml) für 45 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss zu inkubieren. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut 3 mal 5 min mit PBS-Puffer gewaschen und in einer wässrigen „Anti-Fading“ Lösung eingebettet.

NTPDase2-Immunostaining. Die immunzytochemische Verwendung des Anti-NTPDase2-Antikörpers erfolgte nach der von Braun und Mitarbeitern (2003) vorgestellten Methode. Abweichend zu oben aufgeführtem P2Y₂-/P2Y₄-Protokoll wurden die Kryostatschnitte für 12 min bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert und nachfolgend mit 1 % Triton X-Lösung für 30 min behandelt. Der primäre NTPDase2-Antikörper (BZ3B4), 1:1500 verdünnt, wurde über Nacht bei 4 °C zusammen mit den Objekten inkubiert. Es erfolgte darauf ein Waschen in PBS-Puffer und anschließend die Inkubation mit sekundärem Antikörper Anti-Kaninchen IgG (CY3; 1:400) für 60 min bei Raumtemperatur. Die weitere Prozedur

entspricht dem unter 2.4.3.2 (P2Y₂/P2Y₄) beschriebenen Protokoll.

Preabsorptionstest/Kontrollen. Die primären Antikörper wurden, mit dem Immunisierungspeptid im Überschuß vorliegend, 120 min lang vorinkubiert und wie zuvor unter 2.4.3.2 beschrieben, verwendet⁸. Parallel zu jeder Untersuchung dienten Gewebeschnitte, bei denen der primäre Antikörper durch Pufferlösung oder IgG ersetzt wurde, als Kontrollen. Als Positiv-Kontrollen wurden Lungen/ZNS-Gewebeschnitte der Ratte herangezogen.

2.4.3.3 Auswertung der Histo- und Immunzytochemischen Versuche

Die eingebetteten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) im Hellfeld-, Phasenkontrast- oder Fluoreszenzauflicht betrachtet und die Bilder mit einer Digitalkamera dokumentiert (MCID imaging analysis system, Imaging Research, St. Chatharines, Ontario, Canada). Die Ergebnisse beziehen sich auf mindestens drei verschiedene Tiere (N) und drei voneinander nicht-abhängigen Experimenten. Um ein Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Strukturen zu verhindern, wurden die Objektträger bei 2 °C gelagert und anschließend der digitalen Dokumentation unterzogen.

2.5 Statistik

Die Versuche wurden nach den Prinzipien der statistischen Versuchsplanung, aufgestellt von (Sachs, 1978), durchgeführt. Die Daten wurden, im Falle von Konzentrationen erst nach Logarithmierung, arithmetisch gemittelt und dazugehörig der Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m. = Standard error of mean) mit N = Anzahl der Tiere/Individuen und n = Anzahl der Versuche angegeben. Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden auf statistische Signifikanz mit Hilfe der Student-t-Test (GraphPad Prism3, Version 3.0, GraphPad Software Inc.) geprüft. Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden als signifikant betrachtet, wenn der Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ($p \leq 0,05$) war. Lineare Regressionen wurden nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate mit Hilfe des Programms PHARM/PCS (Version 4.1, Pharmacological Calculation System, Tallarida und Murry, 1986) durchgeführt. Die nicht-lineare Regression wurde durch Analyse der gemittelten normalisierten Einzeldaten unter Anwendung der logistischen 4-Parameter-Funktion

⁸ siehe alomone labs Produkt-Information: www.alomone.com/products/P2X.htm

nach Parker und Woud (1971) mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism (Graphpad Software inc, 1996) ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung von potenten und Subtyp-selektiven P2-Rezeptor-Antagonisten und Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren

3.1.1 Screening von Suramin-Derivaten an nativen P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen

Zu Beginn wurden mittels funktionell-pharmakologischer Methoden Suramin-Derivate mit vier verschiedenen Grundstrukturen (Derivate von NF023, von symmetrischen-, unsymmetrischen NF279-Analoga und von SB9, siehe Kapitel 8) in einem Screening-Verfahren hinsichtlich ihres Antagonismus am P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren (siehe 2.4.1.1 und 2.4.1.2), sowie ihre Hemmwirkung auf Ekto-Nukleotidasen (siehe 2.4.2.1) untersucht. Zunächst wurde in der Regel (Ausnahme SB-Analoga) die Hemmung von 10 µM der Verbindungen auf Kontraktionen, verursacht durch der Badflüssigkeit zugesetzte Agonisten (prostatische Segmente des Vas deferens der Ratte, P2X₁: 10 µM α,β-meATP; Meerschweinchen-Ileum P2Y₁: 10 µM ADPβS) untersucht. Weiterhin wurde das Ausmaß der Hemmung der Verbindungen (300 µM) auf die Bildung von anorganischem Phosphat (P_i) durch den Follikelepithel-gebundenen enzymatischen ATP-Metabolismus von *Xenopus laevis* Oozyten ermittelt. Der Agonist α,β-meATP (10 µM) erzeugte in den Kontroll-Experimenten unter 3.1.1 und 3.1.2 durchschnittlich 1093 ± 30 mg Zug (N=40, n=79). Der Agonist ADPβS (10 µM) verursachte durchschnittlich 1385 ± 32 mg Zug (N = 25, n = 149). In Experimenten mit *Xenopus* Oozyten (drei Oozyten von *Xenopus laevis*) wurde durchschnittlich 8,41 ± 0,33 nmol anorganisches Phosphat (N=49, n=196) nach 30 min Inkubation mit 100 µM ATP in 250 µl, gemessen. Zeitbedingt nahm in Versuchen mit Oozyten die Phosphatbildung um den Faktor 1,07 ± 0,02 (N=49, n=196) zu. Dieser Faktor diente der Korrektur der gemessenen Werte. Auch bei den isolierten Organen dienten Zeitkontroll-Experimente der Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Organantwort. Keine der getesteten NF- oder SB-Substanzen hatte einen Einfluss auf den Grundtonus der verwendeten isolierten Organe.

3.1.1.1 NF023-Analoga

Wie im Abschnitt 1.2 ausgeführt, ist die Verbindung NF023 (siehe Abb. 1.3) ein selektiver P2X₁-Rezeptor-Antagonist. Um weitere pharmakologische Informationen über das strukturelle Umfeld von NF023 zu erhalten, wurden die Verbindungen NF824, NF811, NF803 und NF792 (siehe Abschnitt 8.1), wie unter Kapitel 2.4 beschrieben, untersucht. Die biologische Aktivität dieser Verbindungen ist in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Tab. 3.1 Biologische Aktivität von NF023-Analoga.

Prozentuale Hemmung der NF023-Analoga ermittelt an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (ratVD, prostatische Segmente), P2Y₁-Rezeptoren der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM), sowie Ekto-Nukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten (XLO). Die Daten sind arithmetische Mittelwerte \pm s.e.m., aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD) % Hemmung ^a	P2Y ₁ (GPI-LM) % Hemmung ^b	EctoN (XLO) % Hemmung ^c
NF023	44,0 \pm 2,0 ^d	18,1 ^f	31,1 \pm 2,1 ^e
NF792	6,6 \pm 6,6	12,5 \pm 3,4	59,4 \pm 3,1
NF803	4,5 \pm 3,0	25,5 \pm 11,5	n.d.
NF811	8,8 \pm 0,1	8,8 \pm 1,9	7,0 \pm 1,1*
NF824	8,4 \pm 5,0	10,1 \pm 6,8	n.d.

^a 10 μ M α,β -meATP und 10 μ M der Substanz, ^b 10 μ M ADP β S und 10 μ M der Substanz, ^c 100 μ M ATP als Substrat, 300 μ M der Substanz, ^d persönliche Mitteilung B.Niebel, ^e Damer, 2002; ^f Lambrecht et al., 2002, * arithmetisches Mittel \pm s.e.m. aus 2 unabhängigen Versuchen, n.d.: nicht bestimmt.

Alle NF023-Analoga fielen durch ihre sehr geringe Hemmwirkung an den pharmakologischen Modellen auf. Nur die Disulfonsäure NF792 zeigte eine vergleichsweise starke Hemmung der Bildung von anorganischem Phosphat (59,4%, in den Oozyten). Die Substanz NF824, die über keine Sulfonatgruppen verfügt, ließ aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit keine sinnvolle Charakterisierung an *Xenopus laevis* Oozyten zu.

3.1.1.2 Symmetrische NF279-Analoga

Da die Substanz NF279 (Abb. 1.3) einer der potentesten P2X₁-Rezeptor-Antagonisten ist (Damer et al., 1998; Lambrecht et al., 2002), wurden von dieser eine Vielzahl von Anlogen (siehe Abschnitt 8.2) synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität in Analogie zu 3.1.1 untersucht. Die Daten sind in Tab. 3.2 aufgelistet.

Tab. 3.2 Biologische Aktivität von symmetrischen NF279-Analoga.

Prozentuale Hemmung der symmetrischen NF279-Analoga ermittelt an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (ratVD, prostatische Segmente), P2Y₁-Rezeptoren der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM,) sowie Ekto-Nukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten (XLO). Die Daten sind arithmetische Mittelwerte \pm s.e.m., aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD) % Hemmung ^a	P2Y ₁ (GPI-LM) % Hemmung ^b	EctoN (XLO) % Hemmung ^c
Suramin	22,0 \pm 3,0 ^d	55,0 \pm 1,7	41,2 \pm 1,8 ^d
NF279	100,0 ^d	7,8 \pm 3,5 ^e	66,4 \pm 3,6 ^d
NF356	32,3 \pm 4,6	67,9 \pm 8,3	52,2 \pm 2,8 ^d
NF358	42,0 \pm 8,3	30,0 \pm 5,1	n.d.
NF506	64,6 \pm 11,7	69,8 \pm 4,9	62,7 \pm 3,0 ^d
NF507	53,7 \pm 0,7	74,2 \pm 2,8	39,7 \pm 4,3
NF793	13,8 \pm 1,7	28,0 \pm 8,0	24,7 \pm 5,4
NF798	43,7 \pm 10,1	23,0 \pm 2,2	40,7 \pm 13,8
NF804	43,7 \pm 9,5	44,1 \pm 11,0	62,2 \pm 8,2
NF813	13,1 \pm 3,1	5,0 \pm 5,0	6,9 \pm 4,2*
NF816	22,9 \pm 5,4	92,9 \pm 1,9	35,1 \pm 9,3
NF835	2,2 \pm 2,2	8,2 \pm 8,2	36,0 \pm 4,6
NF840	72,0 \pm 6,0	9,9 \pm 8,2	n.d.

^a 10 μ M α , β -meATP und 10 μ M der Substanz, ^b 10 μ M ADP β S und 10 μ M der Substanz, ^c 100 μ M ATP als Substrat, 300 μ M der Substanz, ^d Damer, 2002, ^e Menke, 2003, * arithmetisches Mittel \pm s.e.m. aus 2 unabhängigen Versuchen, n.d.: nicht bestimmt.

Die Substanzen NF358, NF356, NF506, NF507, NF835 und NF840 sind u.a. dadurch ausgezeichnet, dass sie an Stelle eines Phenylrings ein Furan- bzw. Benzimidazol-System enthalten (siehe Kapitel 8.2). Nahezu gleichstark inhibierten die Substanzen NF804 und NF506 die jeweiligen P2-Rezeptor-vermittelten Kontraktionen. Deutlich höhere P2Y₁-antagonistische Wirkungen ergaben sich für die Verbindungen NF816, NF356, NF506 und NF507 (67,9% - 92,9%), wobei NF816 die Verbindung mit der größten Potenz an und Selektivität für P2Y₁-Rezeptoren darstellt. Als selektiv für die P2X₁-inhibitorische Aktivität erwies sich die Verbindung NF840 mit 72,0% (P2X₁) zu 9,9% (P2Y₁) Hemmung. Bezüglich der Inhibition der Ekto-Nukleotidase zeigte NF804 von den getesteten Substanzen die größte und NF813 die geringste Wirkung.

3.1.1.3 Unsymmetrische NF279-Analoga

Um die minimal-notwendigen Strukturelemente für die hohe Wirkstärke von NF279 am P2X₁-Rezeptor zu ermitteln, wurden Verbindungen, die unsymmetrisch sind und Teilstrukturen von NF279 darstellen, untersucht (siehe Kapitel 8.3, Abb. 1.2). In gleicher Weise wie unter 3.1.1 erläutert, wurden auch diese Substanzen auf ihre biologische Aktivität an den drei Modellen untersucht (siehe Tab. 3.3). Alle Substanzen zeichneten sich durch einen raschen Wirkeintritt und Reversibilität der Hemmung an den Rezeptormodellen aus.

Tab. 3.3 Biologische Aktivität von unsymmetrischen NF279-Analoga.

Prozentuale Hemmung von unsymmetrischen NF279-Analoga ermittelt an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (ratVD, prostatische Segmente), P2Y₁-Rezeptoren der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM) sowie Ekto-Nukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten (XLO). Die Daten sind arithmetische Mittelwerte \pm s.e.m., aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD) % Hemmung ^a	P2Y ₁ (GPI-LM) % Hemmung ^b	EctoN (XLO) % Hemmung ^c
NF279	100,0 ^d	7,8 \pm 3,5 ^e	66,4 \pm 2,6 ^d
NF782	10,0 \pm 2,9	14,2 \pm 8,4	14,6 \pm 5,4*
NF783	14,1 \pm 5,2	14,0 \pm 1,7	12,4 \pm 0,1*
NF784	5,3 \pm 5,3	11,0 \pm 1,0	6,6 \pm 2,0*
NF785	24,2 \pm 11,0	40,0 \pm 6,6	37,4 \pm 3,3
NF786	76,8 \pm 8,2	71,0 \pm 8,1	53,2 \pm 2,1
NF787	19,8 \pm 9,1	20,7 \pm 2,2	n.d.
NF814	72,2 \pm 6,2	72,3 \pm 5,8	51,6 \pm 2,5
NF815	87,0 \pm 1,0	72,7 \pm 0,9	46,3 \pm 7,4
NF817	5,0 \pm 11,7	26,2 \pm 2,4	35,0 \pm 4,0*

^a 10 μ M α,β -meATP und 10 μ M der Substanz, ^b 10 μ M ADP β S und 10 μ M der Substanz, ^c 100 μ M ATP als Substrat, 300 μ M der Substanz, ^d Damer, 2002, ^e Menke, 2003, * arithmetisches Mittel \pm s.e.m. aus 2 unabhängigen Versuchen, n.d.: nicht bestimmt.

Die Daten verdeutlichen, dass die Verbindungen im allgemeinen gleich stark bzw. schwach ausgeprägte P2X₁-/P2Y₁-inhibitorische Aktivität aufweisen. Somit zeigt keine der gelisteten Substanzen eine nennenswerte Präferenz, wie die Muttersubstanz NF279, für einen der getesteten P2-Rezeptoren. Neben den schwach aktiven Substanzen wie NF782, NF783, NF784, NF785, NF787 und NF817 fiel besonders die relativ hohe

inhibitorische Aktivität von NF786, NF814 und NF815 auf (jeweils über 70% Hemmung). Bezüglich der Ekto-Nukleotidase ergaben die Daten keinen Hinweis auf eine überdurchschnittliche Hemmung. Als wichtige Beobachtung blieb festzustellen, dass die Teilstrukturen von NF279 schwächer P2X₁-inhibitorisch wirken als NF279 (10 µM, 100% Inhibition) selbst.

3.1.1.4 SB-Analoga

Substanzen aus der Gruppe der SB-Analoga (siehe Abschnitt 8.4) zeichnen sich durch die chemische Verbindung von zwei pharmakophoren Gruppen, einem polyanionischen Naphthalingerüst und einem Pyridoxalphosphatrest, aus. Diese Substanzen sind wegen des geringen Erkenntnisstandes über Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Muttersubstanz SB9 (siehe 3.1.3), welche ein potenter und selektiver P2Y₁-Rezeptor-Antagonist ist, von Interesse. Die biologischen Eigenschaften der SB-Analoga sind in Tab. 3.4 wiedergegeben.

Tab. 3.4 Biologische Aktivität der SB-Analoga.

Prozentuale Hemmung von SB-Analoga ermittelt an: P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (ratVD, prostatische Segmente), P2Y₁-Rezeptoren der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM), sowie durch Ekto-Nukleotidasen von Xenopus laevis Oozyten (XLO). Die Daten sind arithmetische Mittelwerte ±s.e.m., aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen ermittelt.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD) % Hemmung ^a	P2Y ₁ (GPI-LM) % Hemmung ^b	EctoN (XLO) % Hemmung ^c
SB1	57,8 ±10,9	58,7 ±7,3	86,9 ±3,4
SB2a	71,4 ±8,1	76,6 ±2,9	56,0 ±7,1
SB2b	12,9 ±8,9	25,6 ±4,8	71,3 ±8,7
SB3	59,8 ±6,5	63,7 ±4,3	49,5 ±3,8
SB4	76,8 ±10,8	73,8 ±1,8	80,1 ±3,6
SB5	77,4 ±6,1	73,2 ±4,6	61,6 ±6,2
SB6	59,4 ±10,0	62,3 ±7,7	58,9 ±2,3
SB9	74,0 ±7,4	67,3 ±4,8	66,6 ±4,2
SB9 _{red}	0,0 ±0,0	15,4 ±4,8	20,8 ±6,8

^a 10 µM α,β-meATP und 5,0 µM der Substanz, ^b 10 µM ADPβS und 1,0 µM der Substanz, ^c 100 µM ATP als Substrat, 300 µM der Substanz.

Die Ermittlung der Daten erfolgte in Analogie zu 3.1.1. Allerdings wurden die Konzentrationen der SB-Analoga wegen ihrer hohen Rezeptor-Affinität am P2Y₁-

Rezeptor-Modell gegenüber den Angaben unter 3.1.1 geändert: $P2Y_1 = 1 \mu\text{M}$; $P2X_1 = 5 \mu\text{M}$. D.h., die Konzentration der SB-Analoga war am Vas deferens der Ratte ($P2X_1$) 5-fach höher als am Ileum des Meerschweinchens ($P2Y_1$). Dies muß bei der Beurteilung von Rezeptor-Selektivitäten auf der Basis der in Tab. 3.4 aufgeführten Hemmwerte berücksichtigt werden. Bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ hemmen alle SB-Analoga, bis auf SB2b und SB9_{red}, sehr potent die $P2Y_1$ -vermittelte Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum (SB1, SB2a und SB3-9 %-Hemmung: 58,7 %-76,6 %, siehe Tab. 3.4). Im Gegensatz dazu sind die Substanzen SB9_{red} bzw. SB2b an diesem $P2$ -Rezeptor-Subtyp deutlich schwächer inhibitorisch wirksam (15,4 % bzw. 25,6 %). Auch am $P2X_1$ -Rezeptor-Modell waren SB9_{red} bzw. SB2b die am schwächsten wirksamen Substanzen (0 % bzw. 12,9 %, Tab. 3.4). Während, vergleichbar zu $P2Y_1$ -vermittelten Kontraktionen, diejenigen welche $P2X_1$ -vermittelt waren, ähnlich potent durch die SB-Analoga inhibiert wurden (SB1, SB2a, SB3-9 %-Hemmung: 57,8 %-77,4 %, siehe Tab. 3.4), muß nochmals betont werden, dass zur Bestimmung der prozentualen Hemmung der $P2X_1$ -vermittelten Kontraktionen des Samenleiters der Ratte 5-fach höhere Konzentrationen der SB-Analoga ($5 \mu\text{M}$) in den Untersuchungen eingesetzt wurden. D.h., dass die SB-Analoga stärker $P2Y_1$ - als $P2X_1$ -antagonistisch wirkten, trotz ähnlicher prozentualer Hemmwerte (siehe Tab. 3.4). Festzustellen war, dass SB2b, im Vergleich zu anderen SB-Analoga, als schwach $P2$ -Rezeptor-antagonistische Verbindung dennoch eine Hemmung der P_i -Bildung von 71,3 % aufwies und damit gemeinsam mit SB1 und SB4 unter den SB-Analoga zu den stärkeren Ekto-Nukleotidase-Hemmstoffen gehörte. Allerdings lagen die Test-Konzentrationen zur Hemmung der Ekto-Nukleotidasen ($300 \mu\text{M}$) follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich zu denen an $P2Y_1$ - bzw. $P2X_1$ -Rezeptoren um das 300- bis 60-fache darüber. Auffällig ist, dass wie schon bei den $P2Y_1$ - bzw. $P2X_1$ -Rezeptoren die reduzierte Form des SB9, SB9_{red}, ebenfalls eine geringe inhibitorische Aktivität an Ekto-Nukleotidasen hatte (20,8 %, Tab. 3.4).

3.1.2 Detaillierte pharmakologische Untersuchungen

Im Folgenden wurden in Abhängigkeit von den Ergebnissen aus 3.1.1 detaillierte pharmakologische Untersuchungen an $P2$ -Rezeptoren durchgeführt. Diese sollten tiefere Einblicke bezüglich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen und des Wirkmechanismus der Substanzen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden pIC_{50} -Werte der Hemmwirkung der Antagonisten (siehe 2.4.1) ermittelt. Dabei wurden die Agonist-

Konzentrationen derart gewählt, dass sie etwa der EC₅₀ (10 µM) entsprachen. Bei bestimmten Substanzen, wie NF816 und NF786, die auffallend wirkstark und/oder P2-selektiv erschienen, wurden darüber hinaus ihr Einfluß auf die Dosis-Wirkungs-Kurven von ADPßS am Meerschweinchen Ileum, sowie pA₂-Werte ermittelt. Detaillierte Untersuchungen bezüglich der Hemmung von Ekto-Nukleotidasen in *Xenopus laevis* Oozyten wurden wegen der milden Ekto-Nukleotidase Hemmung der Analoga nicht durchgeführt.

3.1.2.1 NF023-Analoga

Da sämtliche unter 3.1.1.1 untersuchten Substanzen keinen Hinweis auf eine hohe P2X₁- oder P2Y₁-Rezeptor-Affinität, sowie Ekto-Nukleotidase-Hemmung zeigten, wurde auf eine weitere Charakterisierung dieser Substanzen verzichtet.

3.1.2.2 Symmetrische NF279-Analoga

Wegen Mangels an den Substanzen NF813, NF835, NF793 und NF840 konnten leider von diesen Verbindungen keine pIC₅₀-Werte bestimmt werden. Von den übrigen Verbindungen wurden die pIC₅₀-Werte in Tab. 3.5 dargestellt. Darüber hinaus wurden die Wirkstärke und der Wirkmechanismus von NF816 mit Hilfe von Dosis-Wirkungs-Kurven charakterisiert.

Tab. 3.5 Inhibitorische Wirkstärke symmetrischer NF279-Analoga.

pIC₅₀-Werte symmetrischer NF279-Analoga. Hemmung von Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (ratVD, P2X₁, prostatische Segmente) bzw. der Longitudinal-Muskulatur des Meeschweinchen-Ileum (GPI-LM, P2Y₁), verursacht durch Einzeldosen von α,β-meATP (10 µM) bzw. ADPßS (10 µM), durch verschiedene Konzentrationen von NF279-Analoga. Gezeigt sind Mittelwerte ±s.e.m., sowie die jeweilige Anzahl von Einzelexperimenten (n) Die einzelnen Präparate stammten von „N“ Versuchstieren.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD)		P2Y ₁ (GPI-LM)	
	pIC ₅₀	n; N	pIC ₅₀	n; N
Suramin	4,68 ±0,02 ^a	16; 3	4,71 ±0,05 ^b	33; 7
NF279	5,71 ±0,09 ^a	13; 3	4,42 ±0,01 ^b	26; 9
NF356	4,72 ±0,04	14; 4	5,41 ±0,02	16; 4
NF358	4,90 ±0,01	13; 6	4,93 ±0,08	12; 7
NF506	5,11 ±0,02	13; 3	5,34 ±0,03	18; 4
NF507	5,02 ±0,01	14; 3	5,31 ±0,03	13; 4
NF798	4,71 ±0,07	12; 7	4,43 ±0,08	25; 8

NF804	4,92 ±0,04	17; 6	4,93 ±0,03	17;10
NF816	4,76 ±0,02	14; 5	5,62 ±0,05	20; 9

^a Damer, 2002, ^b Menke, 2003

Mit Ausnahme von NF279 ($pIC_{50} = 5,71$) ergaben die Untersuchungen am Vas deferens der Ratte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der pIC_{50} -Werte ($pIC_{50} \approx 5$, Tab. 3.5 und Abb. 3.1). Im Gegensatz dazu zeigte sich am Ileum des Meerschweinchens ein heterogenes Bild (siehe Abb. 3.2). Die Daten belegen, dass NF816 am stärksten $P2Y_1$ -inhibitorisch wirkte, während die Verbindungen Suramin, NF279, NF358, NF798 und NF804 am schwächsten $P2Y_1$ -inhibitorisch wirksam waren. Die $P2Y_1$ -Rezeptor-selektivsten Verbindungen sind NF816 bzw. NF356, mit ca. Faktor 10 bzw. Faktor 7. Die einzige $P2X_1$ -selektive Substanz ist NF279 (19,5-fach $P2X_1 > P2Y_1$). Die anderen Verbindungen, wie NF804, NF358, NF506 und NF507, zeigten, wie Suramin, keine signifikant verschiedenen pIC_{50} -Werte an den jeweiligen $P2X_1$ - und $P2Y_1$ -Rezeptoren.

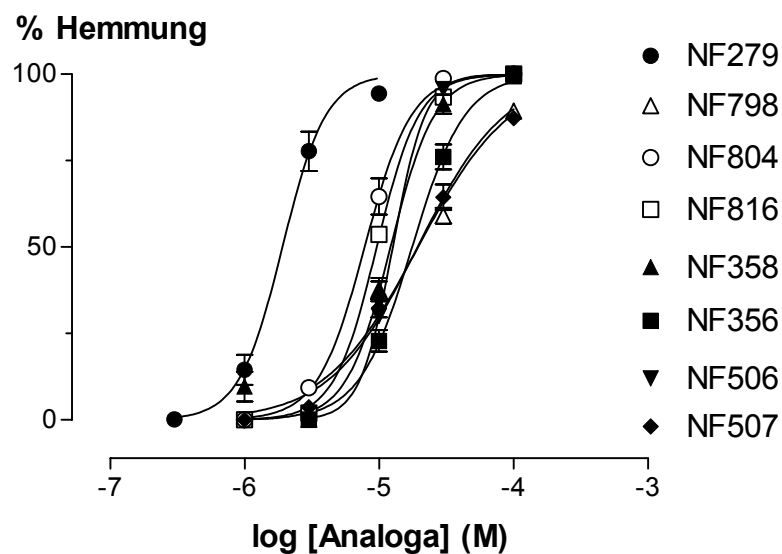


Abb. 3.1 Hemmkurven symmetrischer NF279-Analoga am $P2X_1$ -Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Vas deferens der Ratte, verursacht durch α, β -meATP. Ordinate: Hemmung der α, β -meATP-bedingten (10 μ M, Einzeldosen) Kontraktion durch NF279-Analoga in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der NF-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der NF279-Analoga. Die Steigungen der Kurven liegen zwischen 1,33 (NF356) und 3,61 (NF358). Die Kurven wurden mittels einer nicht-linearen Regression aus arithmetischen Mittelwerten \pm s.e.m. (zur Anzahl der Experimente siehe Tab. 3.5).

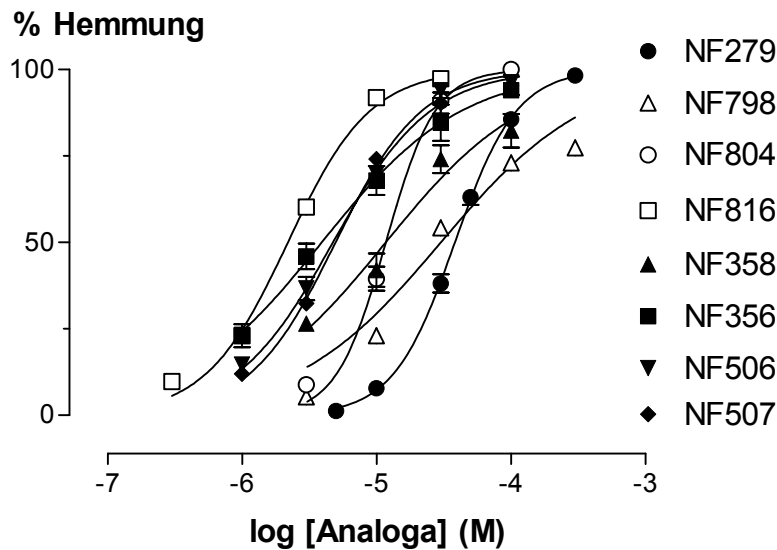


Abb. 3.2 Hemmkurven symmetrischer NF279-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum, verursacht durch ADPβS. Ordinate: Hemmung der ADPβS-bedingten (10 μM, Einzeldosen) Kontraktion durch NF279-Analoga in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der NF-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der NF279-Analoga. Die Steigungen der Kurven liegen zwischen 0,83 (NF358) und 2,36 (NF804). Die Kurven wurden mittels einer nicht-linearen Regression aus arithmetischen Mittelwerten ±s.e.m. (zur Anzahl der Experimente siehe Tab. 3.5).

Zur Aufklärung des Mechanismus der antagonistischen Wirkung der potentesten und P2Y₁-selektivsten Verbindung unter den symmetrischen NF279-Analoga, NF816 (Tab. 3.5), wurden an der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2Y₁-Rezeptoren) Dosis-Wirkungs-Kurven von ADPβS (0,1 – 300 μM) in An- und Abwesenheit von NF816 (1 – 30 μM) erstellt⁹. Zeit-Kontroll-Untersuchungen zeigten, dass sich weder der Maximaleffekt noch der EC₅₀-Wert von ADPβS während des Verlaufs der Experimente signifikant veränderten (Daten nicht gezeigt⁹).

Bei den Untersuchungen mit NF816 (siehe Abb. 3.3) entsprach der Agonist-Maximal-Effekt bei 100 μM ADPβS 2004 ±107 mg Zug und die mittlere pEC₅₀ = 5,40 ±0,16 (N=4, n = 14). Durch die Zugabe von 1 μM, 3 μM, 10 μM oder 30 μM NF816 wurde die monophasische Dosis-Wirkungs-Kurve von ADPβS parallel und abhängig von der Konzentration an NF816 nach rechts verschoben (Abb. 3.3). Die Schild-Plot-Analyse (Abb. 3.4) ergab für NF816 einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Konzentration von NF816 und dem Ausmaß der Rechtsverschiebung log(dr-1). Die Steigung der Geraden war nicht signifikant von 1 verschieden (1.01

⁹ Entsprechende Experimente mit der P2X₁-selektiven Verbindung NF279 am Vas deferens der Ratte (P2X₁-Rezeptoren) sind in der Literatur beschrieben (Lambrecht et al., 1999.; Damer, 2002).

$\pm 0,10$) und der Schnittpunkt mit der Abszisse ergab einen pA_2 -Wert von $6,45 \pm 0,13$. Auch für NF279 ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen den oben genannten, logarithmierten Parametern, bei einer ebenfalls nicht von 1 signifikant verschiedenen Geradensteigung von $0,89 \pm 0,19$. Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei der Substanz NF816 um einen potenten, selektiven ($P2Y_1 > P2X_1$) und kompetitiven Antagonisten handelt.

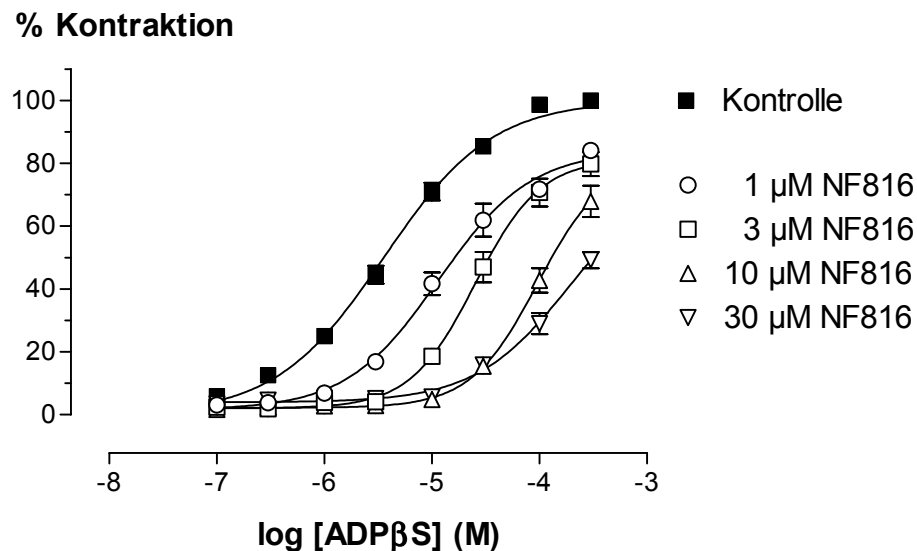


Abb. 3.3 Antagonismus von NF816 am $P2Y_1$ -Rezeptor.

Einfluss von NF816 (1, 3, 10 und 30 μM) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP β S (0,1 – 300 μM) an der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Ordinate: Prozent der Kontraktion im Vergleich zum Maximaleffekt von ADP β S in der Kontrolle. Abszisse: Molare Konzentration von ADP β S. Die Daten stellen Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelerperimenten von Präparaten von mindestens 3 Versuchstieren dar.

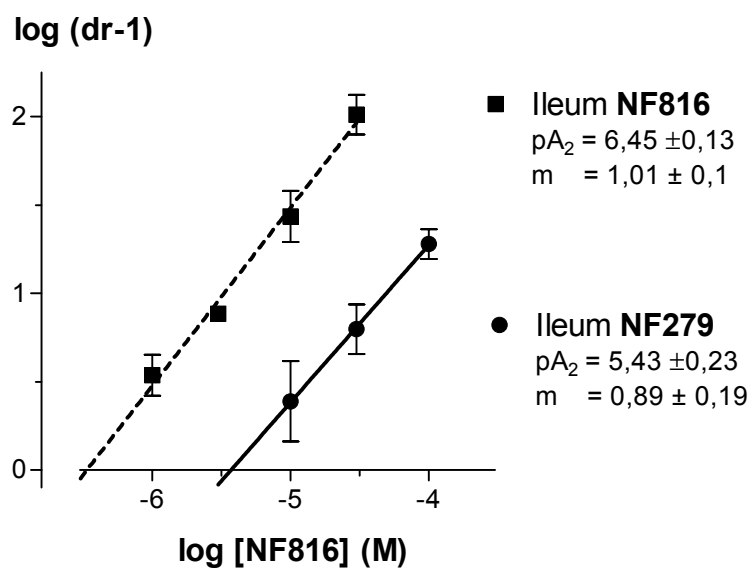


Abb. 3.4 Schild-Regression von NF816 an $P2Y_1$ -Rezeptoren am Meerschweinchen-Ileum. Schild-Regression für den NF816-Antagonismus von ADP β S-verursachten Kontraktionen am

Ileum des Meerschweinchens (P2Y₁-Rezeptoren). Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelexperimenten. m = Steigung der Regressionsgeraden.

3.1.2.3 Unsymmetrische NF279-Analoga

Die Gruppe unsymmetrischer NF279-Analoga stellt Teilstrukturen von NF279 dar (siehe Abschnitt 8.3). Um von NF279 Informationen über die minimal notwendigen Strukturen, die für den wirkstarken und selektiven P2X₁-Rezeptor-Antagonismus von NF279 bedeutsam sind, zu erhalten, wurde, basierend auf den Ergebnissen aus Tab. 3.3 von ausgewählten Substanzen, wie NF785, NF786, NF787 sowie NF815 pIC₅₀-Werte bestimmt. Die Werte sind in Tab. 3.6 tabelliert und in Abb. 3.5 bzw. Abb. 3.6 illustriert. NF279 wurde als Referenzsubstanz mit in die Tabelle und Abbildungen aufgenommen.

Tab. 3.6 Inhibitorische Wirkstärke unsymmetrischer NF279-Analoga.

pIC₅₀-Werte unsymmetrischer NF279-Analoga. Hemmung der Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (ratVD, prostatische Segmente) bzw. der Longitudinal-Muskulatur des Meeschweinchen-Ileum (GPI-LM) verursacht von Einzeldosen α,β -meATP (10 μ M) bzw. ADP β S (10 μ M) durch variable Konzentrationen von NF279-Teilstrukturen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. sowie die jeweilige Anzahl von „n“ Einzelexperimenten und die einzelnen Präparate stammten von „N“ Versuchstieren.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD)		P2Y ₁ (GPI-LM)	
	pIC ₅₀	n; N	pIC ₅₀	n; N
NF279	5,71 \pm 0,09 ^a	13; 3	4,42 \pm 0,01 ^b	26; 9
NF785	4,80 \pm 0,01	13; 4	4,81 \pm 0,01	12; 4
NF786	5,14 \pm 0,02	18; 4	5,66 \pm 0,06	24; 7
NF787	<5	3; 3	< 3,5	12; 4
NF815	5,22 \pm 0,01	14; 4	5,51 \pm 0,10	15; 8

^a Damer, 2002; ^b Menke, 2003.

Die unsymmetrischen NF279-Analoga zeigten eine vergleichbare (IC₅₀-Werte um 10 μ M) inhibitorische Wirkung auf Kontraktionen des Samenleiters der Ratte, die durch α,β -meATP (10 μ M, P2X₁-vermittelt) hervorgerufenen wurden. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Verbindungen NF786 und NF815 mit einem IC₅₀ von ca. 3 μ M deutlich stärker, während NF787 mit einem IC₅₀-Wert von > 300 μ M deutlich schwächer die durch ADP β S-hervorgerufenen (10 μ M, P2Y₁-vermittelt) Kontraktionen inhibierte.

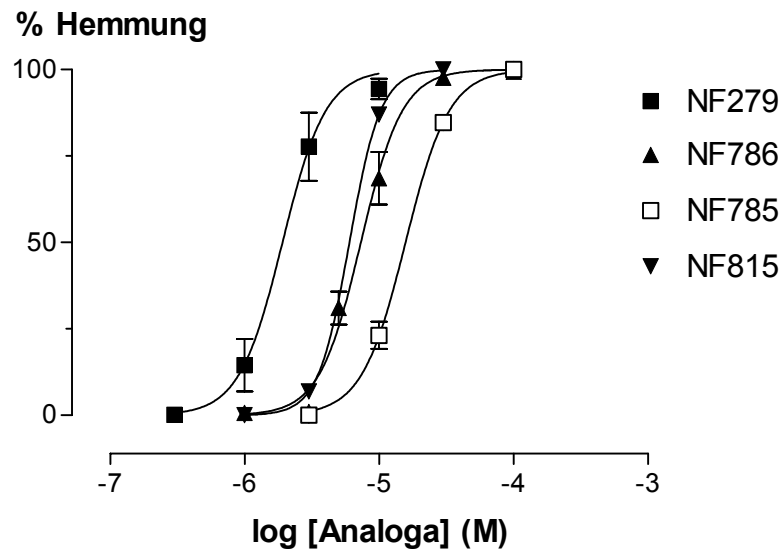


Abb. 3.5 Hemmkurven unsymmetrischer NF279-Analoga am P2X₁-Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Vas deferens der Ratte, verursacht durch α,β -meATP (10 μ M, Einzeldosen). Ordinate: Hemmung der α,β -meATP-bedingten Kontraktion in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der NF-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der NF279-Teilstrukturen. Die Steigung der Kurven variieren zwischen 2,67 (NF785) und 3,74 (NF815). Die Kurven wurden mittels einer nicht-linearen Regression aus arithmetischen Mittelwerten \pm s.e.m. ermittelt (zur Anzahl der Experimente, siehe Tab. 3.6).

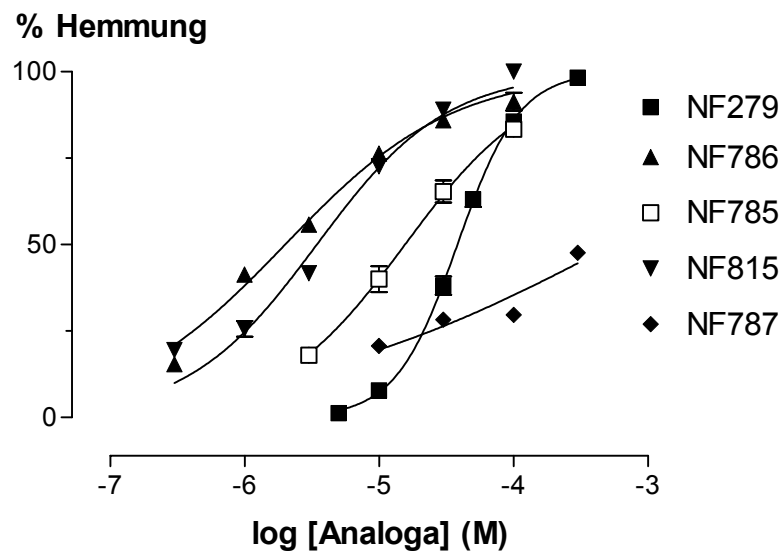


Abb. 3.6 Hemmkurven unsymmetrischer NF279-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum, verursacht durch ADP β S (10 μ M, Einzeldosen). Ordinate: Hemmung der ADP β S-bedingten Kontraktion durch NF279-Analoga in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der NF-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der NF279-Teilstrukturen. Die Steigung der Kurven variiert zwischen 0,83 (NF787) und 2,36 (NF804). Die Kurven wurden mittels einer nicht-linearen Regression aus arithmetischen Mittelwerten \pm s.e.m. ermittelt (zur Anzahl der Experimente, siehe Tab. 3.6).

Analog den Experimenten mit NF816 (siehe Abschnitt 3.1.2.2) wurde die Verbindung NF786 (Tab. 3.6) mit Hilfe einer Schild-Analyse auf den Mechanismus ihrer antagonistischen Wirkung an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum untersucht

(Abb. 3.7 und Abb. 3.8).

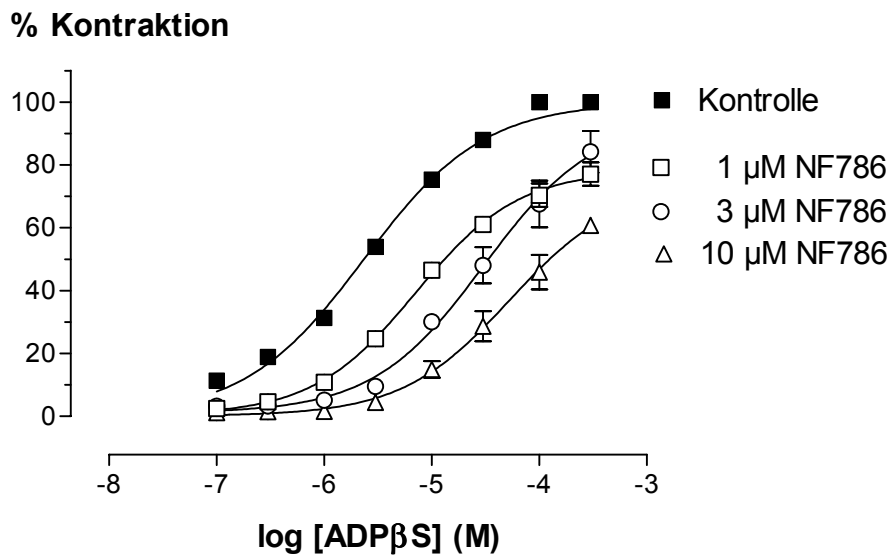


Abb. 3.7 Antagonismus von NF786 am P2Y₁-Rezeptor.

Einfluss von NF786 (1, 3, 10 μM) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von ADPβS (0,1 – 300 μM) an der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Ordinate: Prozent der Kontraktion im Vergleich zum Maximaleffekt von ADPβS in der Kontrolle. Abszisse: Molare Konzentration von ADPβS. Die Daten bestehen aus Mittelwerten \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelexperimenten von 3 Präparaten von mindestens 3 Versuchstieren dar.

Wie aus Abb. 3.7 zu ersehen ist, führen steigende Konzentrationen von ADPβS (0,1 – 300 μM) zur Zunahme der Kontraktion der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum in einer monophasischen Art. Der Agonist-Maximal-Effekt entsprach bei 100 μM ADPβS 1570 ± 108 mg Zug und die mittlere $pEC_{50} = 5,60 \pm 0,07$ ($N = 4$, $n = 12$). Durch die Zugabe von 1 μM, 3 μM oder 10 μM NF786 wurde die Dosis-Wirkungs-Kurve von ADPβS parallel und konzentrationsabhängig nach rechts verschoben. Die Schild-Analyse (Abb. 3.8) ergab für NF786 einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Konzentration von NF786 und dem Ausmaß der Rechtsverschiebung $\log(dr-1)$. Die Steigung der Regressionsgeraden war nicht signifikant von eins verschieden ($0,88 \pm 0,15$) und der Schnittpunkt mit der Abszisse ergab einen pA_2 -Wert von $6,76 \pm 0,24$. Als Vergleich zu NF786 diente die Schild-Plot-Analyse des Antagonismus der Muttersubstanz NF279. Beide Verbindungen, NF786 und NF279, wirken an den P2Y₁-Rezeptoren des Ileum des Meerschweinchens als kompetitive Antagonisten.

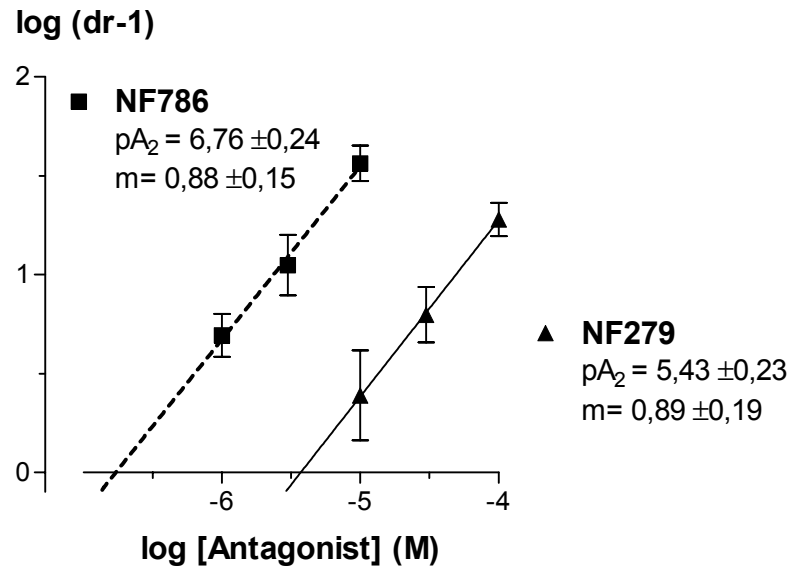


Abb. 3.8 Schild-Regression von NF786 vs. NF279 am Meerschweinchen-Ileum.

Schild-Regression für NF786-Antagonismus von ADP β S-verursachten Kontraktionen im Vergleich zu NF279. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelexperimenten. m = Steigung der Geraden.

Die Gerade der Schild-Regression war für die Substanz NF279, im Vergleich zu der von NF786, um den Faktor 21 parallel nach rechts verschoben.

3.1.2.4 SB-Analoga

Die grundsätzlich hohe inhibitorische Wirkstärke in dieser Substanzgruppe erlaubte an beiden funktionellen Rezeptor-Modellen (P2X₁: Vas deferens der Ratte; P2Y₁: Ileum des Meerschweinchens) eine detaillierte pharmakologische Charakterisierung (siehe Tab. 3.4 und Kapitel 8.4) für die Mehrheit der Verbindungen. Die Substanzen SB4 und SB5 wurden von K. Menke (Menke, 2003) untersucht. Im Rahmen dieser Dissertation wurden lediglich die Substanzen SB1, SB2a, SB2b, SB9 sowie SB9_{red} detaillierter untersucht, da die strukturellen Veränderungen in den Substanzen SB4, SB6, SB3 und SB5 in den Voruntersuchungen keine wesentlichen Auswirkungen auf die pharmakologischen Parameter hatten. Es stellte sich für alle SB-Analoga ein langsame On- und Off-Kinetik der inhibitorischen Wirkung heraus (siehe dazu u.a. Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Die pIC₅₀-Werte sind in Tab. 3.7 zusammengestellt, die zugehörigen Hemmkurven in Abb. 3.9 und Abb. 3.10 abgebildet.

Tab. 3.7 Inhibitorische Wirkstärke von SB-Analoga.

Hemmung von Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (ratVD, prostatische Segmente) bzw. der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM,) verursacht von Einzeldosen α,β -meATP ($10\ \mu\text{M}$) bzw. ADP βS ($10\ \mu\text{M}$) durch steigende Konzentrationen von SB-Analoga. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m., sowie die jeweilige Anzahl von „n“ Einzelexperimenten und die einzelnen Präparate stammten von „N“ Versuchstieren.

Substanzen	P2X ₁ (ratVD)		P2Y ₁ (GPI-LM)	
	pIC ₅₀	n; N	pIC ₅₀	n; N
Suramin	4,68 \pm 0,02 ^a	16; 3	4,71 \pm 0,05 ^b	33; 7
PPADS	5,36 \pm 0,06 ^a	18; 5	5,66 ^c	-
SB1	5,51 \pm 0,08	15; 3	6,10 \pm 0,08	15; 7
SB2a	5,55 \pm 0,03	15; 5	6,27 \pm 0,05	16; 9
SB2b	5,00 \pm 0,01	12; 7	5,49 \pm 0,03	15; 8
SB9	5,32 \pm 0,03	16; 5	6,37 \pm 0,05	28; 7
SB9 _{red}	4,14 \pm 0,09	15; 4	3,83 \pm 0,03	18; 6

^a Damer, 2002; ^b Menke, 2003; ^c persönliche Mitteilung S. Czeche.

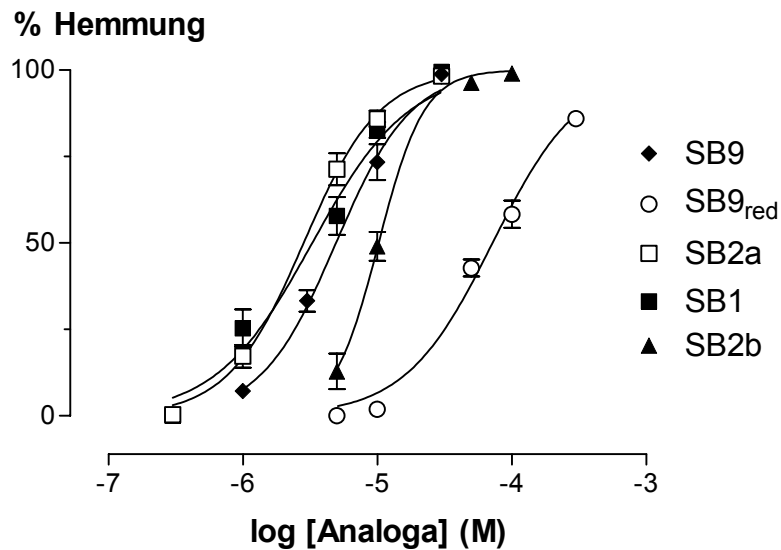


Abb. 3.9 Hemmkurven von SB-Analoga am P2X₁-Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Vas deferens der Ratte, verursacht durch α,β -meATP. Ordinate: Hemmung der α,β -meATP-bedingten ($10\ \mu\text{M}$, Einzeldosen) Kontraktion in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der SB-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der SB-Analoga. Die Steigung der Kurven liegt zwischen 1,21 (SB1) und 2,58 (SB2b). Die Kurven wurden mittels einer sigmoidalen Regression aus arithmetischen Mittelwerten \pm s.e.m. ermittelt (Anzahl der Experimente, siehe Tab. 3.7).

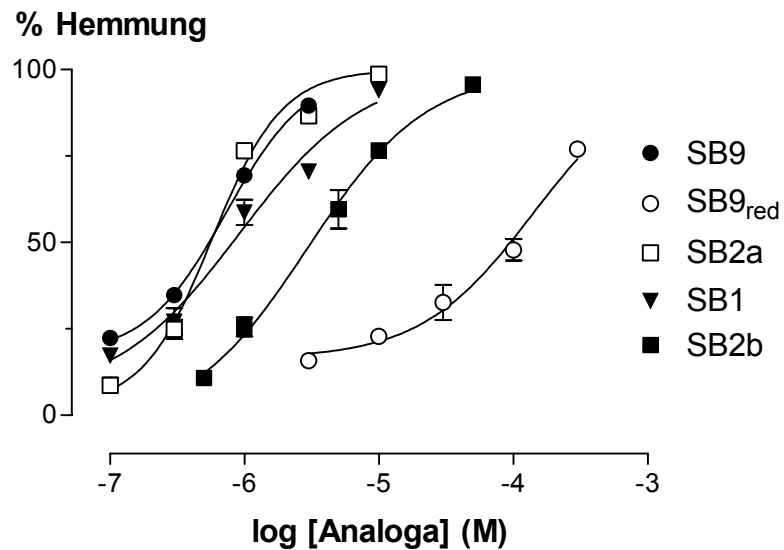


Abb. 3.10 Hemmkurven von SB-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.

Dosis-Inhibitions-Kurven ermittelt aus Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum, verursacht durch ADPβS. Ordinate: Hemmung der ADPβS-bedingten (10 μM, Einzeldosen) Kontraktion durch SB-Analoga in Prozent des Agonist-Effektes in Abwesenheit der SB-Analoga. Abszisse: Logarithmus der Konzentration der SB-Analoga. Die Steigung der Kurven liegt zwischen 0,93 (SB1) und 1,67 (SB2a). Die Kurven wurden mittels einer sigmoidalen Regression aus arithmetischen Mittelwerten ±s.e.m. ermittelt (zur Anzahl der Experimente siehe Tab. 3.7).

An beiden Rezeptormodellen erwies sich die reduzierte Form von SB9, SB9_{red}, als schwächste inhibitorisch wirksame Substanz (ratVD: IC₅₀ = 72 μM vs. GPI-LM: IC₅₀ = 148 μM). Während die Verbindung SB2b einen IC₅₀-Wert von 10 μM an den P2X₁-Rezeptoren aufwies, waren hier SB1, SB2a und SB9 um den Faktor 2 bis 4 stärker inhibitorisch wirksam. Ein vergleichbares Bild zeigten die Daten bezüglich der P2Y₁-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum. Auch hier waren die IC₅₀-Werte von SB1, SB2a und SB9 um den Faktor 4 bis 8 niedriger als die von SB2b. Für die Verbindungen SB9, SB2a und SB1 ließen sich P2Y₁- über P2X₁-Selektivitäten von maximal Faktor 10 (SB9: IC₅₀ = 4,8 μM vs. 0,43 μM) feststellen, während sich die Referenzsubstanzen Suramin und PPADS als unselektiv erwiesen hatten (siehe Tab. 3.7).

3.1.3 Pharmakologische Eigenschaften von SB9

Unter den bivalenten, heterodimeren SB-Analoga erwies sich die Verbindung SB9 (siehe Abschnitt 8.4, 3.1.1.4 und 3.1.2.4) als interessanteste Substanz. SB9 wurde daher in weitergehenden Untersuchungen im Hinblick auf Wirkgeschwindigkeit und Wirkmechanismus des Antagonismus an P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren sowie auf P2-Rezeptor-Selektivität und -Spezifität untersucht. Die Hemmung von Ekto-Nukleotidasen in *Xenopus laevis* Oozyten wurde mit Hilfe der Bestimmung eines pIC₅₀-Wertes weiter

quantifiziert. Alle diese Ergebnisse sind in den Abb. 3.11 -Abb. 3.15, sowie in Kapitel 3.1.3.3 (unter Einschluß von Daten externer Arbeitsgruppen) zusammengestellt.

3.1.3.1 Wirkgeschwindigkeit

Im Gegensatz zu echten, mikroskopischen Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten aus Radioligand-Bindungs-Studien kann in funktionellen Experimenten an isolierten Organen in der Regel lediglich die Geschwindigkeit der Zunahme und der Abnahme der hemmenden Wirkung von Antagonisten bestimmt werden. In Abb. 3.11 und Abb. 3.12 sind die zeitlichen Verläufe der hemmenden Wirkung von SB9 und PPADS (je 10 μM) vergleichend an P2X_1 -Rezeptoren prostaticher Segmente des Vas deferens der Ratte bzw. an P2Y_1 -Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum dargestellt. Die methodische Vorgehensweise entspricht der Ermittlung von IC_{50} -Werten. Dabei wurde der inhibitorische Einfluß einer definierten Antagonist-Konzentration auf Agonist-induzierte Kontraktionen in konstanten Zeitintervallen ermittelt.

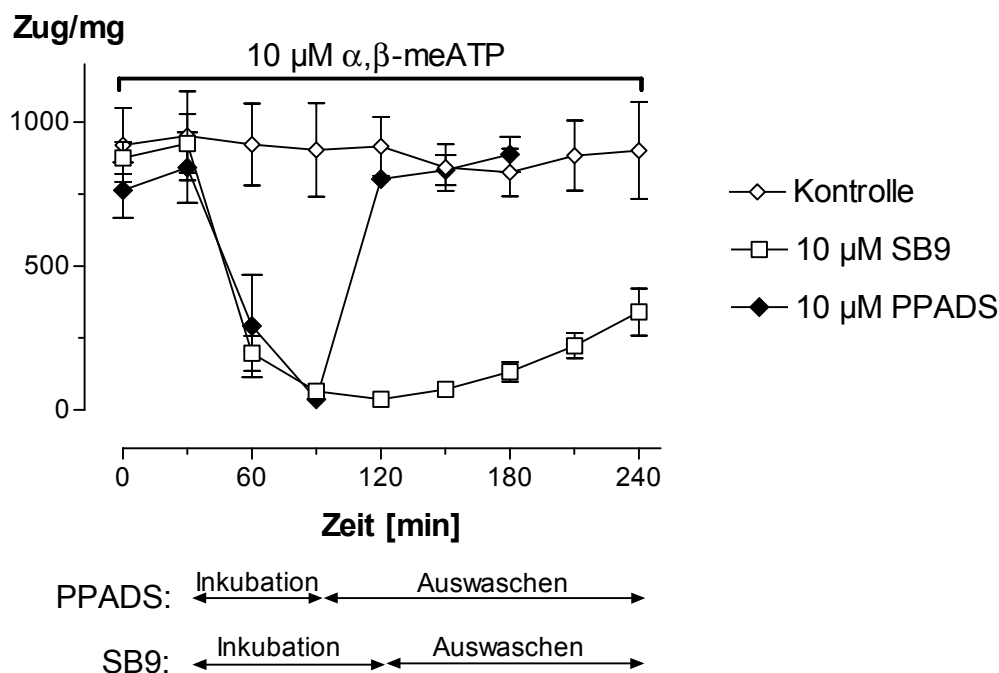


Abb. 3.11 Kinetik von SB9 und PPADS am P2X_1 -Rezeptor.

Geschwindigkeit der zunehmenden und abnehmenden P2X_1 -antagonistischen Wirkung von SB9 und PPADS (10 μM) an prostatichen Segmenten des Vas deferens. Die Symbole stellen Mittelwerte \pm s.e.m. ($n = 2-3$) isometrischer Kontraktionen, verursacht durch eine 30minütliche Gabe von 10 μM α,β -meATP, dar.

Nach 90 min Inkubation zeigte sich für SB9 (10 μM) eine 93%ige und für PPADS (10 μM) nach 60 min eine 92,5%ige Hemmung der durch 10 μM α,β -meATP am Vas deferens der Ratte hervorgerufenen Kontraktion (Abb. 3.11). Nachdem SB9 für

150 min ausgewaschen wurde, erreichte der Wert der Kontraktion, durch α,β -meATP (10 μ M) bedingt, nur 36,7 %, während PPADS innerhalb von 30 min des Auswaschens keinen antagonistischen Effekt mehr erkennen ließ. Innerhalb des Beobachtungszeitraums blieb die biologische Antwort auf 10 μ M α,β -meATP in Zeitkontrollen konstant.

Am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum (Abb. 3.12) ließ sich mit 3 μ M SB9 innerhalb von 60 min 87 % Hemmung und mit 10 μ M PPADS 72 % Hemmung der durch ADP β S (10 μ M) hervorgerufenen Kontraktion erzielen. In der Auswasch-Phase betrug die prozentuale Hemmung der Kontraktion durch PPADS nach 45 min 19,2 % und durch SB9 nach 120 min 37,5 %. Innerhalb des Beobachtungszeitraums blieb die biologische Antwort auf 10 μ M ADP β S in Zeit-Kontroll-Experimenten konstant.

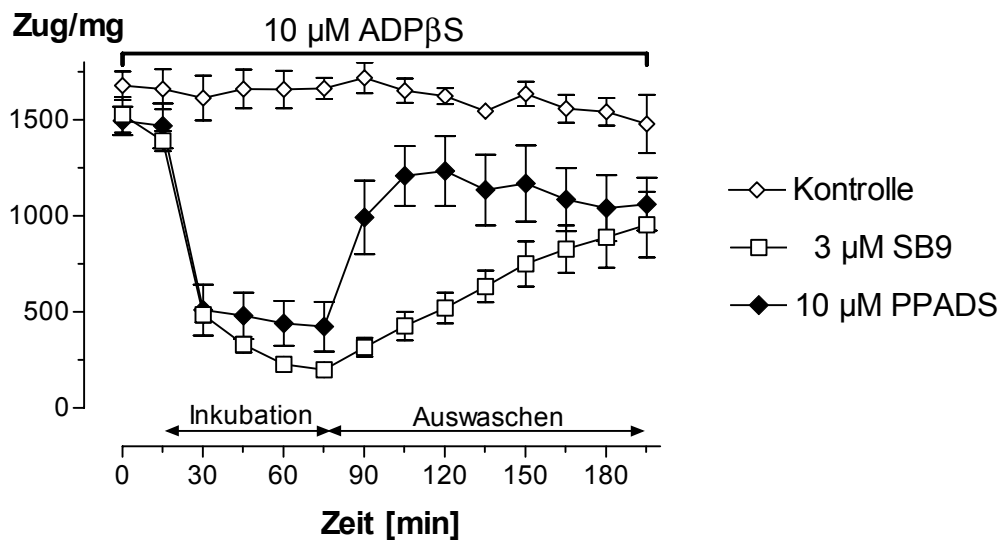


Abb. 3.12 Kinetik von SB9 und PPADS am P2Y₁-Rezeptor.

Geschwindigkeit der zunehmenden und abnehmenden P2Y₁-antagonistischen Wirkung von SB9 (3 μ M) und PPADS (10 μ M) am Ileum des Meerschweinens. Die Symbole stellen Mittelwerte \pm s.e.m. (n = 3) isometrischer Kontraktionen, verursacht durch eine 15minütliche Gabe von 10 μ M ADP β S, dar.

3.1.3.2 Wirkmechanismus

Die Art des Antagonismus von SB9 wurde mittels Dosis-Wirkungs-Kurven von α,β -meATP und ADP β S an nativen P2X₁-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte (prostatische Segmente) bzw. an nativen P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum untersucht (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). An beiden Modellen konnte der Antagonismus von SB9 durch steigende Dosen (0,1 – 300 μ M) von α,β -meATP (scheinbare pEC₅₀¹⁰ der Kontrollen = 5,09 \pm 0,05, N = 3, n = 3) bzw. ADP β S (pEC₅₀ der Kontrollen = 5,25 \pm 0,09 N = 9, n = 9) überwunden werden. Der Maximaleffekt von 100 % entsprach bei α,β -meATP (100 μ M) 2299 \pm 146 mg (N = 3, n = 3) und bei ADP β S (100 μ M) 1929 \pm 152 mg Zug (N = 9, n = 9).

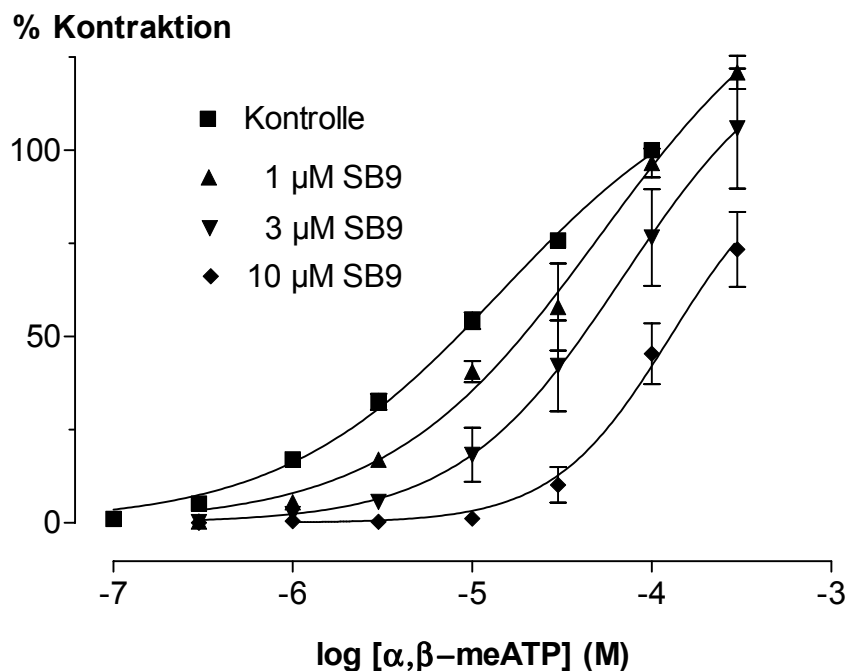


Abb. 3.13 Antagonismus von SB9 am P2X₁-Rezeptor.

Einfluss von SB9 (1, 3, 10 μ M) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von α,β -meATP (0,1 – 300 μ M) an prostatischen Segmenten des Samenleiters der Ratte. Ordinate: Prozent der Kontraktion im Vergleich zum Maximaleffekt von 100 μ M α,β -meATP in den Kontrollen. Abszisse: Molare Konzentration von α,β -meATP. Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens drei Einzelexperimenten von drei verschiedenen Individuen.

¹⁰ Der Begriff ‚scheinbare pEC₅₀‘ bezieht sich auf die Tatsache, dass an prostatischen Segmenten mit α,β -meATP kein Maximaleffekt erzeugt und somit auch kein halb-Maximaleffekt rechnerisch ermittelt werden kann. Um dennoch eine pharmakologische Auswertung vorzunehmen, wurde zum einem der Maximaleffekt auf 100 μ M α,β -meATP festgelegt und willkürlich gleich 100 % gesetzt (siehe auch Damer, 2002).

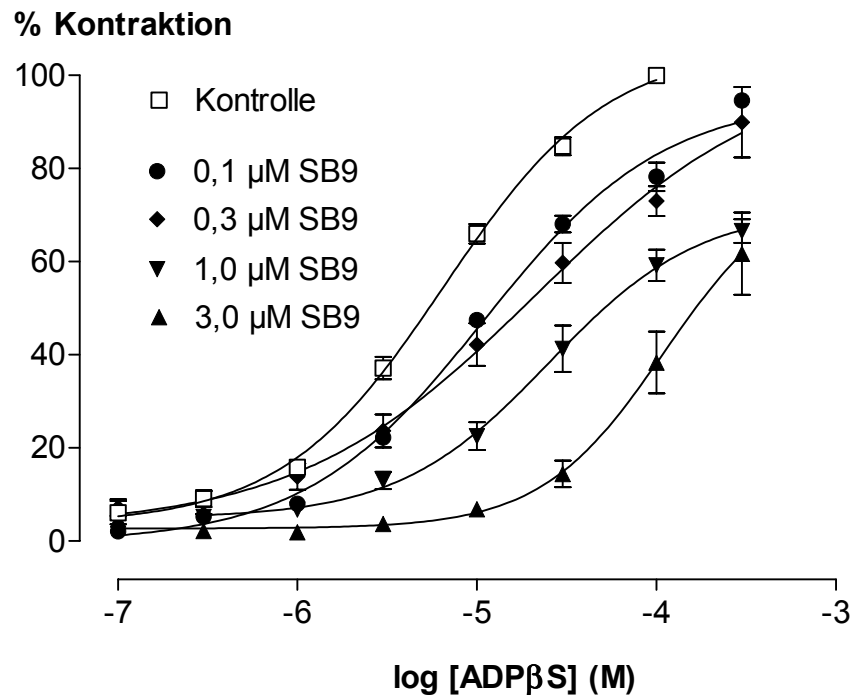


Abb. 3.14 Antagonismus von SB9 am P2Y₁-Rezeptor.

Einfluss von SB9 (0,1, 0,3, 1, 3 μM) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von ADPβS (0,1 – 300 μM) an der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM). Ordinate: Prozent der Kontraktion im Vergleich zum Maximaleffekt von 100 μM ADPβS. Abszisse: Molare Konzentration von ADPβS. Die Daten sind Mittelwerte ±s.e.m. aus mindestens drei Einzelexperimenten.

Die von der SB9-Konzentration abhängige parallele Rechtsverschiebung der monophasischen Dosis-Wirkungs-Kurven der Agonisten gestattete die Bestimmung der EC₅₀-Werte des jeweiligen Agonisten im halb-maximalen Bereich (siehe Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Aufgrund dieser Tatsache wurden Schild-Plot-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 3.15). Die linearen Schild-Regressionen für SB9 ergaben für das Vas deferens der Ratte einen pA₂-Wert von 5,98 ±0,19 (N=6, n=9) und für die Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchens einen ca. um Faktor 10 höheren pA₂-Wert von 6,91 ±0,11 (N=8, n=16). Die Steigungen der Geraden im Schild-Plot ergaben an beiden P2-Rezeptor-Modellen für SB9 nicht-signifikant von eins verschiedene Werte (1,14 ±0,35 und 1,10 ±0,14) Alle diese Befunde sprechen dafür, dass SB9 sowohl die α,β-meATP-induzierten Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (P2X₁) als auch die ADPβS-induzierten Kontraktionen des Ileum des Meerschweinchens kompetitiv antagonisiert.

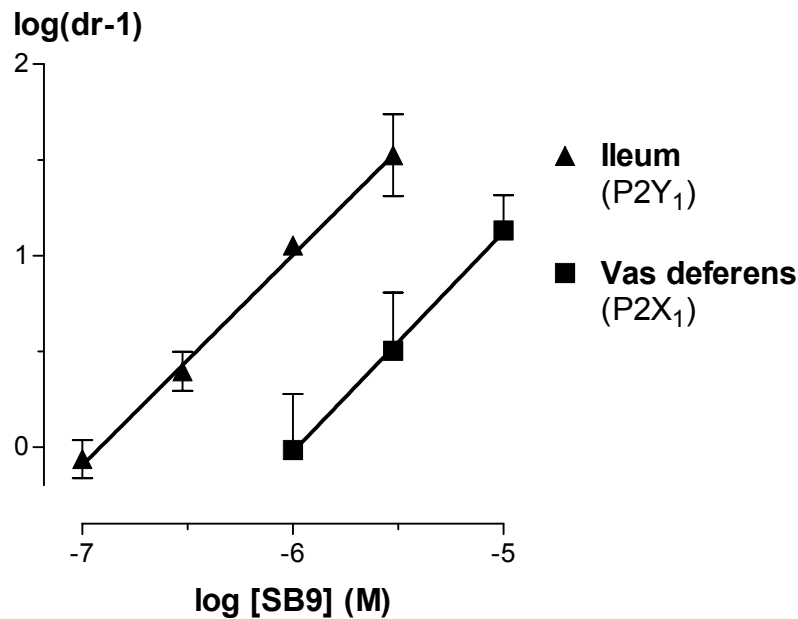


Abb. 3.15 Schild-Regressionen von SB9 an P2-Rezeptoren.

Schild-Regressionen des SB9-Antagonismus gegenüber steigenden Konzentrationen ADP β S (Meerschweinchen-Ileum) bzw. α,β -meATP (Vas deferens der Ratte). Die Fehlerabweichungen repräsentieren s.e.m. (n = 3, N = 3) und die Steigung der Geraden sind nicht-signifikant von eins verschieden.

3.1.3.3 Rezeptor-Selektivität und -Spezifität sowie Ekto-Nukleotidase-Inhibition von SB9

Neben den bisher beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften (siehe 3.1.3) wurde SB9 an weiteren nativen und rekombinanten P2-Rezeptoren auf seine antagonistischen Eigenschaften untersucht: **P2X₃** (Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum; für Methoden siehe Czeche, 2001, Menke, 2003; α,β -meATP 1 μ M, pIC₅₀-Wert = 5,49 \pm 0,06), **P_{2U}** (epididymale Segmente des Vas deferens der Ratte; für Methoden siehe Kapitel 2.4.1.1; UTP 30 μ M, 87,7 \pm 3,8 %-Hemmung), **tP2Y₁** (Truthahn-Erythrozyten, 2MeSADP, pIC₅₀-Wert = 5,32 \pm 0,06, persönliche Mitteilung J. Boyer), **hP2Y₂**, **hP2Y₄**, **hP2Y₆** und **hP2Y₁₁** (1321N1-Zellen, pIC₅₀-Wert < 4,0, persönliche Mitteilung J. Boyer und T.K. Harden). Aus der heutigen Datenlage (siehe Abb. 3.15) ergibt sich für SB9 folgendes P2-Rezeptor-Selektivitätsprofil:

$$\mathbf{P2Y_1 > P2X_1 > P2X_3 = tP2Y_1 > hP2Y_2 = P2Y_4 = P2Y_6 = P2Y_{11}}$$

Desweiteren wurde SB9 an funktionellen Standard-Modellen für α_{1A} -Adreno-, H₁-, M₃- und A₁-Rezeptoren untersucht (für Methoden siehe Czeche, 2001; Damer, 2002). Es konnte keine antagonistische Wirkung von 100 μ M SB9 auf die durch verschiedene Agonisten hervorgerufenen Reaktionen der prostatistischen Segmente des Vas deferens

der Ratte (α_{1A}), der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (H_1 - M_3 - und A_1 -Rezeptoren) beobachtet werden. Dies geht aus dem Vergleich der pEC_{50} -Werte aus Tab. 3.8 hervor.

Tab. 3.8 P2-Rezeptor-Spezifität von SB9

Die pEC_{50} -Werte der Agonisten [Noradrenalin, Vas deferens der Ratte (ratVD, prostatiche Segmente); Histamin, Arecaidinpropargylester (APE) und CCPA, Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI-LM)] in An- und Abwesenheit (Kontrolle) von SB9 (100 μ M). Die Daten sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus 3-4 Einzelexperimenten.

Rezeptor / Agonist / Gewebe	Kontrolle pD_2	SB9 (100 μ M) pD_2
α_{1A} / Noradrenalin / ratVD	5,71 \pm 0,05	6,13 \pm 0,17
H_1 / Histamin / GPI-LM	6,52 \pm 0,31	6,50 \pm 0,28
M_3 / APE / GLI-LM	7,60 \pm 0,04	7,78 \pm 0,09
A_1 / CCPA / GPI-LM	8,51 \pm 0,03	8,64 \pm 0,08

SB9 (1 - 1000 μ M, pIC_{50} =4,40 \pm 0,07, n = 24) hemmte linear und Konzentrations-abhängig die Bildung von anorganischem Phosphat (P_i), das durch die enzymatische Spaltung von ATP (100 μ M) durch Ekto-Nukleotidasen follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten gebildet wurde (siehe Abb. 3.16). Damit wird deutlich, dass SB9 im Vergleich zur Inhibition von $P2Y_1$ -Rezeptor-vermittelten Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileums (3.1.3.2) die Hemmung der Spaltung von ATP durch Ekto-Nukleotidasen um den Faktor 447 schwächer war.

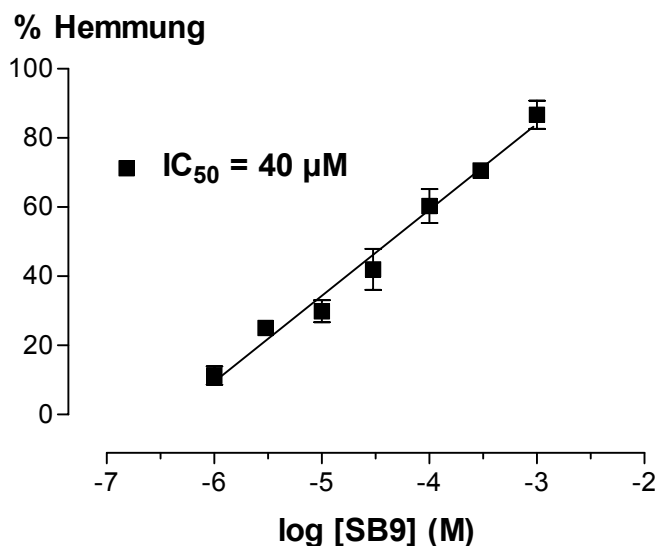


Abb. 3.16 Hemmung der Ekto-Nukleotidase-Aktivität von *Xenopus laevis* Oozyten durch SB9

Einfluss (%-Hemmung) von SB9 (1 – 1000 μ M) auf die Spaltung von ATP (100 μ M) durch Ekto-Nukleotidasen follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten (XLO). Bestimmt wurde die absolute Menge anorganischen Phosphates (P_i) in nmol über 30 min aus der Spaltung von 100 μ M ATP durch 3 Oozyten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m., bestehend aus 3 – 4 Einzelexperimenten.

3.2 Untersuchungen zu Kontraktions-vermittelnden metabotropen P2-Rezeptoren in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte

Das Vas deferens der Ratte gilt u.a. als pharmakologisches Standardmodell für den ionotropen, Kontraktions-vermittelnden P2X₁-Rezeptor (Valera et al., 1994; Westfall und Westfall, 2001 und siehe Kapitel 1.4.2). Für diesen und für den P2X₃-Rezeptor-Suptyp gibt es einen - im pharmakologischen Sinne - brauchbaren Agonisten und zwar α,β -meATP, weil dieses ATP-Analogon Ekto-Nukleotidase-stabil ist (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht, 2000). Für andere P2X-Rezeptor-Subtypen sieht die Situation anders aus, da für diese Subtyp-selektive und/oder Ekto-Nukleotidase-stabile Agonisten weitestgehend fehlen (Lambrecht, 2000). Für die Stimulation ionotroper oder metabotroper P2-Rezeptoren existieren nur wenige Agonisten, die gegen Ekto-Nukleotidasen stabil sind. Leider genügen die vorhandenen Agonisten nicht, um auf der Basis von Agonist-Aktivitäts-Reihenfolgen sämtliche P2-Rezeptoren eindeutig zu charakterisieren. Nahezu alle Zellen sind mit Ekto-Nukleotidasen, welche äußerst effektiv Nukleotide abbauen, ausgestattet. Durch den raschen Abbau nicht-Ekto-Nukleotidase-stabiler Agonisten ist eine wichtige Voraussetzung, nämlich das Arbeiten im Gleichgewichtszustand zwischen Rezeptor und Agonist, nicht mehr gegeben und somit pharmakologische Fehldeutungen nicht auszuschließen. Mit dem Ziel einen Kontraktions-vermittelnden, metabotropen UTP-sensitiven Rezeptor in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte zu charakterisieren, werden im folgenden Abschnitt Ergebnisse präsentiert, welche die Bedeutung des Zusammenspiels zwischen P2-Rezeptor-Agonist-vermittelten biologischen Effekten und den Agonist-abbauenden Ekto-Nukleotidasen verdeutlichen.

3.2.1 Voruntersuchungen

Der von Bültmann und Mitarbeitern (Bültmann et al., 1999a) beobachtete Aktivitäts-steigernde Einfluß von 100 μ M Evans Blau (von Sigma, Reinheit 85 %; siehe Abb. 3.17) auf die Wirkungen von UTP, konnte sowohl an prostatistischen als auch an epididymalen Segmenten bestätigt werden (siehe Abb. 3.18). In Abwesenheit von Evans Blau verursachte die höchste Konzentration UTP (100 μ M) eine Kontraktion von 114 ± 198 mg Zug, während in Anwesenheit von 100 μ M Evans Blau die gleiche

Konzentration UTP eine Maximalwirkung von 2108 ± 144 mg Zug hervorrief. Damit wurde die Aktivitäts-steigernde Wirkung (1000 μ M UTP: ca. Faktor 20; siehe Abb. 3.18) von Evans Blau auf UTP-induzierte Kontraktionen auch für epididymale Segmente gezeigt. Da infolge einer UTP-bedingten Desensibilisierung der Agonist nicht kumulativ appliziert werden konnte, wurde UTP in Einzeldosen in bis zu 30minütlichen Intervallen in die Badflüssigkeit gegeben.

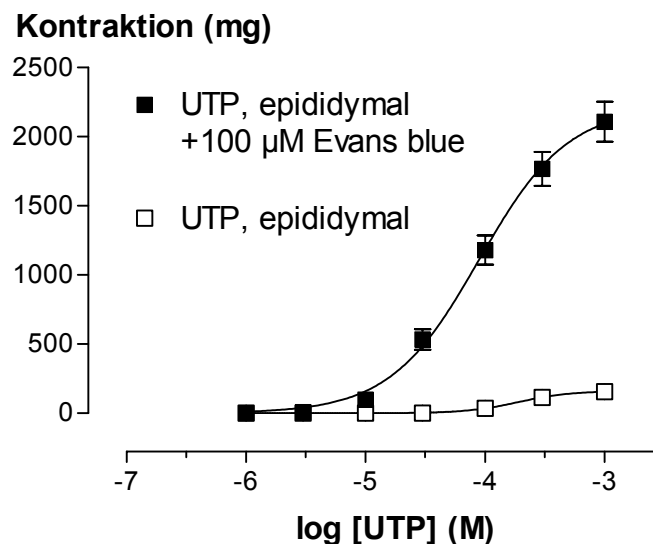


Abb. 3.17 Aktivitätssteigernder Einfluss von Evans Blau auf die UTP-Kontraktion.

Dosis-Wirkungs-Kurven von UTP an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. UTP wurde 30minütlich in Form von steigenden Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des UTP. Die Organe wurden mit 100 μ M Evans Blau (85 % Reinheit) vorbehandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 2 - 10 Einzelwerten von 2 - 5 verschiedenen Individuen.

Die UTP-Dosis-Wirkungs-Kurve an prostatishen Segmenten zeichnete sich im Gegensatz zu den Untersuchungen von Bültmann et al. (1999a) nicht durch ein klares Maximum aus (siehe Abb. 3.18), so dass die Bestimmung der EC_{50} von UTP nicht möglich war. Vergleichende Untersuchungen an epididymalen Segmenten dagegen zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven für UTP. Die EC_{50} für UTP an epididymalen Segmenten in Anwesenheit von Evans Blau (85 %) betrug 74 μ M bei einer Maximalwirkung von 2239 ± 77 mg Zug und einem Anstieg der Kurve von 1,25 (siehe Abb. 3.18).

Vergleichende Untersuchungen von 85 %-igem (Sigma) mit 99 %-igem Evans Blau der Firma Tocris (Abb. 3.19) ergaben eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, so dass die halb-effektive Konzentration (EC_{50}) bei der Verwendung von 99 % Evans Blau um ca. Faktor 2 signifikant zunahm (89 vs. 36 μ M, $p = 0,002$, Daten wurden gepoolt) und der Anstieg der UTP-Kurve bei 99 % Evans Blau von eins nicht-signifikant verschieden war.

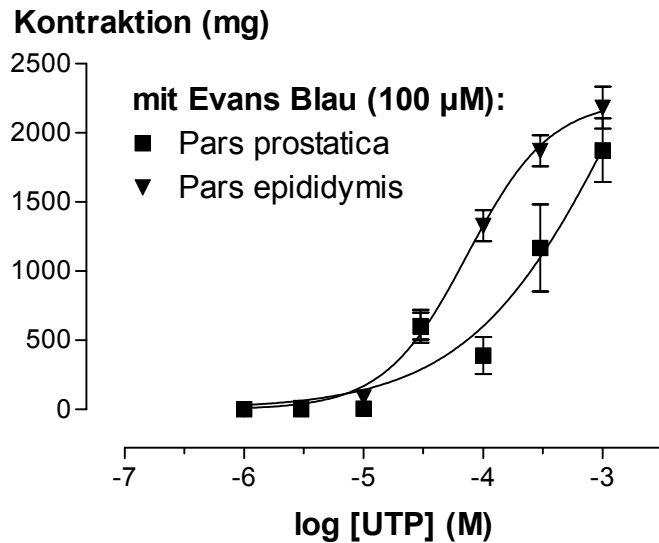


Abb. 3.18 Aktivitäts-Unterschiede von UTP am Vas deferens der Ratte.

Dosis-Wirkungs-Kurven von UTP an prostaticen und epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. UTP wurde 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des UTP. Die Organe wurden mit 100 μ M Evans Blau (85 % Reinheit) vorbehandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 5 Einzelwerten von 5 verschiedenen Individuen.

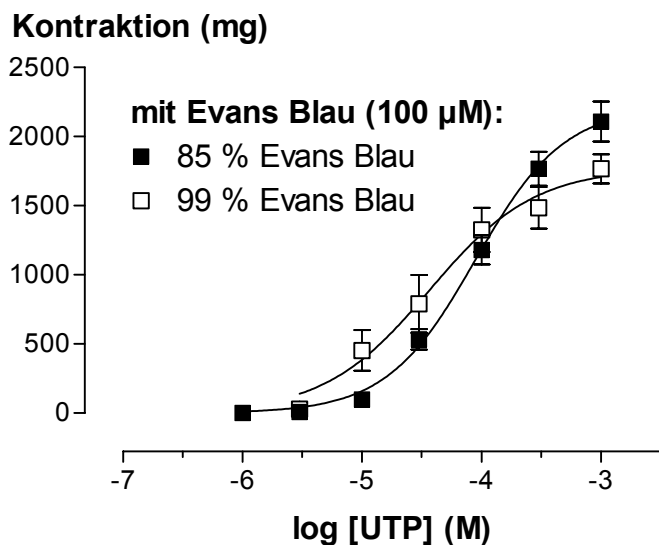


Abb. 3.19 Einfluss der Evans-Blau-Reinheit auf die Aktivität von UTP.

Einfluss von Evans Blau unterschiedlicher Reinheit auf die Wirkung von UTP an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. UTP wurde 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des UTP. Die Organe wurden mit 100 μ M Evans Blau behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 7 Einzelwerten von 7 verschiedenen Individuen.

Die Maximal-Antwort auf UTP war bei der Verwendung der unterschiedlichen Reinheitsgrade von Evans Blau signifikant verschieden ($p = 0,007$). Diese Befunde führten in den folgenden Experimenten zur Anwendung des 99 %-igen Evans Blau (siehe Kapitel 4.3.1).

3.2.2 Pharmakologische Untersuchung von Evans Blau

Zeitabhängigkeit der Evans-Blau-Wirkung. Zu Beginn der Untersuchungen von Evans Blau wurde auch der Einfluss von 100 μM dieser Substanz auf UTP-verursachte (100 μM) Kontraktionen der *Pars epididymis* des Vas deferens in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (siehe dazu Abb. 3.20).

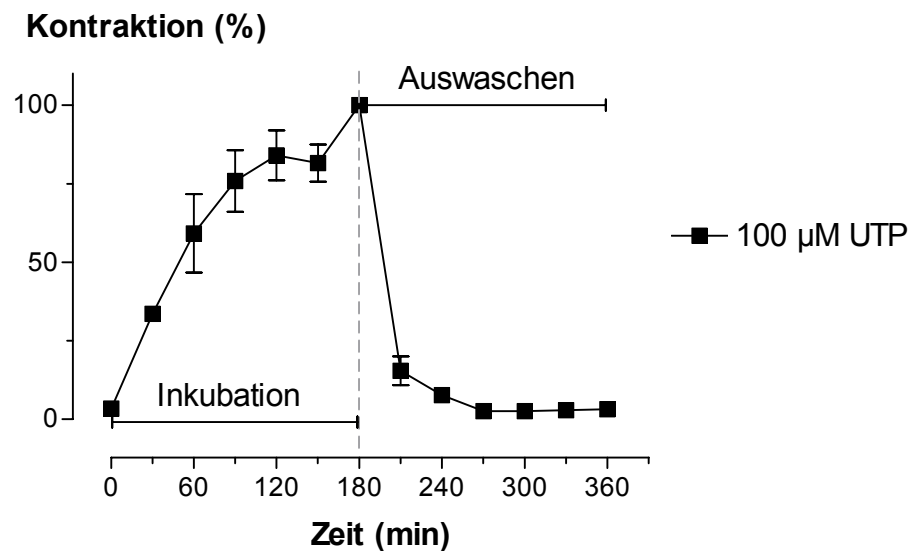


Abb. 3.20 Zeitverlauf der Evans-Blau-Wirkung.

Einfluss von Evans Blau (100 μM) auf Kontraktionen epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte verursacht durch Einzeldosen von 100 μM UTP. Ordinate: Kontraktion epididymaler Segmente auf UTP in Prozent der Maximal-Kontraktion von UTP. Abszisse: Zeit in Minuten. Das Organ wurde 180 min mit 100 μM Evans Blau inkubiert, anschließend ausgewaschen und währenddessen 30minütlich mittels 100 μM UTP kontrahiert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 5 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

Ohne Evans Blau betrug die Kontraktion auf 100 μM UTP $26 \pm 4,4$ mg Zug (n = 2) während die Maximalkontraktion auf 100 μM UTP in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau 1309 ± 290 mg, (n = 3) betrug (nach 180 min). Mit Beginn des Auswaschens wurde nach 90 min mit 41 ± 32 mg Zug kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Zeitpunkt 0 min beobachtet. Wie aus Abb. 3.20 hervorgeht, erreichte der Kontraktionsverstärkende Effekt von 100 μM Evans Blau bei Stimulation mit UTP nach ca. 90 - 150 min ein Maximum, wohingegen 60 min genügten, um den Einfluss des Evans Blau wieder aufzuheben.

Rezeptor-Selektivität und -Spezifität von Evans Blau. Neben der Wirkung von Evans Blau als Kontraktions-verstärkende Substanz der UTP-Wirkung wurde die Verbindung auch hinsichtlich ihres P2X₁-Antagonismus an prostatichen Segmenten des Samenleiters der Ratte gegen 1 μM α,β -meATP, sowie hinsichtlich der Inhibition von Ekto-Nukleotidasen einzelner Gewebestücke von prostatichen Segmenten des Vas

deferens der Ratte untersucht. Evans Blau erwies sich am Vas deferens der Ratte als P2X₁-Antagonist mit einem pIC₅₀-Wert von $5,57 \pm 0,01$ ($n = 18$, $N = 4$; $1 \mu\text{M}$ α,β -meATP; Daten nicht dargestellt). In Abb. 3.21 ist die Hemmung der Bildung von anorganischem Phosphat durch $100 \mu\text{M}$ Evans Blau gezeigt, welches aus dem ATP-Metabolismus durch Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens (prostatisch und epididymale Segmente) der Ratte gebildet wird. In Kontroll-Experimenten war die durchschnittliche Menge von anorganischem Phosphat, die innerhalb von 30 min aus $100 \mu\text{M}$ ATP pro mg Gewebe gebildet wurde $6,18 \pm 0,52$ nmol ($n=8$). Aus Zeitkontroll-Experimenten war ein leichter Abfall (um 11,8 %) der Phosphatbildung ersichtlich. Durch die Inkubation von Evans Blau ($100 \mu\text{M}$) 30 min vor Beginn der ATP-Zugabe und während der nächsten 30 min wurde die Phosphatbildung um 74 % vermindert.

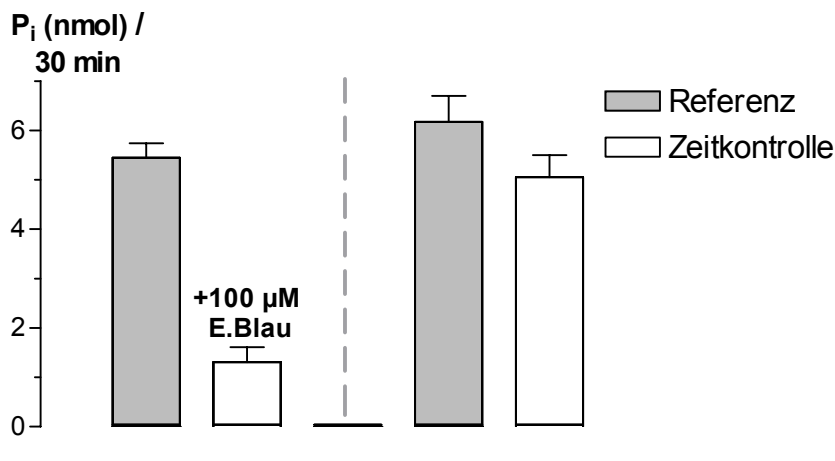


Abb. 3.21 Inhibition der ATP-Spaltung im Vas deferens der Ratte durch Evans Blau.

Abnahme der Bildung anorganischen Phosphates durch $100 \mu\text{M}$ Evans Blau, gebildet aus $100 \mu\text{M}$ ATP durch Ekto-Nukleotidasen prostatischer und epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte. Ordinate: Menge an anorganischem Phosphat, gebildet durch ATPase-Aktivität des Gewebes, in nmol bei Zugabe von $100 \mu\text{M}$ ATP innerhalb 30 min pro mg Feuchtgewicht des Gewebes. Die Inkubation von Evans Blau erfolgte für 30 min vor der Zugabe von ATP. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 8 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

3.2.3 Pharmakologische Untersuchung der UTP-Kontraktion

In diesem Kapitel werden Untersuchungen, die die UTP-bedingte Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Evans Blau näher charakterisieren, vorgestellt.

Einfluss von Tetrodotoxin auf die UTP-bedingte Kontraktion. Bei der Zugabe von UTP ($100 \mu\text{M}$) in die Organbadflüssigkeit kontrahiert sich das Vas deferens unter den gewählten Bedingungen isometrisch. Diese isometrische Kontraktion kann

grundsätzlich aus zwei Komponenten, einer neurogenen und einer muskulären, zusammengesetzt sein. Für die Bestimmung des Anteils der neurogenen Kontraktion eignet sich die Verwendung von 1 μM Tetrodotoxin (TTX). Aus Abb. 3.22 geht hervor, dass in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau 100 μM UTP durchschnittlich 1339 ± 114 mg Zug, $n=2$, $N=2$ erzeugte. Durch die Inkubation derselben Gewebe mit 1 μM TTX wurde die Kontraktion (1341 ± 16 mg Zug, $n=2$, $N=2$) nicht-signifikant beeinflusst.

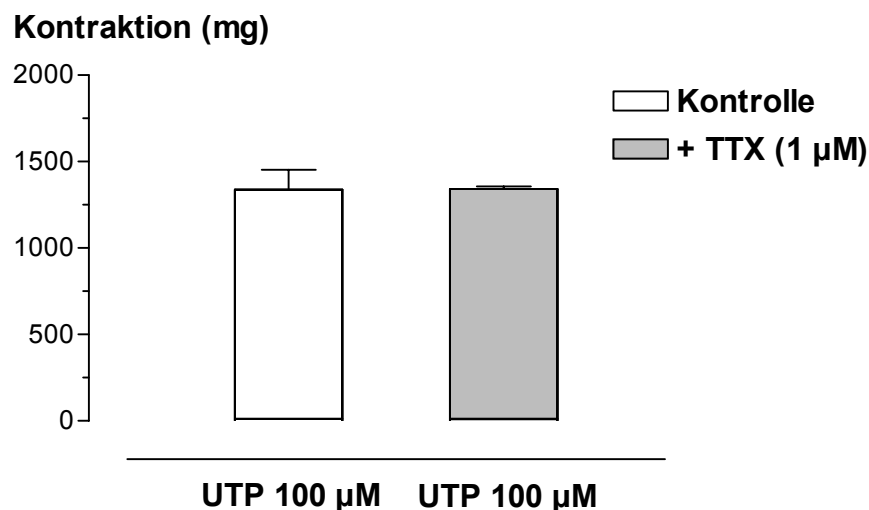


Abb. 3.22 Einfluß von TTX auf die UTP-bedingte Kontraktion im Vas deferens der Ratte. Einfluss von 1 μM Tetrodotoxin (TTX) auf Kontraktionen epididymaler Segmente verursacht durch 100 μM UTP. Ordinate: Zug des Organs in mg als Reaktion auf 100 μM UTP. Die Gewebe wurden mit 100 μM Evans Blau vorbehandelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 2 Einzelversuchen (n) und 2 Individuen (N).

Rolle von extrazellulärem Kalzium. Da die Kontraktion glattmuskulärer Organe grundsätzlich von der Freisetzung intrazellulären Kalziums bzw. vom Einstrom extrazellulären Kalziums abhängt (Sanders, 2001), wurden Untersuchungen mittels 2minütiger Inkubation Kalzium-freier Pufferlösungen oder 60minütiger Inkubation von Kalzium-Kanal-Antagonisten, wie Nifedipin, in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau durchgeführt. Bei den Untersuchungen in Kalzium-freier Badflüssigkeit diente Noradrenalin als Kontrolle, für welches gezeigt wurde (Bültmann et al., 1993; 1994), dass es im Vas deferens der Ratte Kontraktionen hervorruft, die hauptsächlich auf der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern beruht. Bei Anwesenheit von 1,3 mM Kalzium erzeugt Noradrenalin (100 μM) 2444 ± 205 mg und UTP (100 μM) 1376 ± 527 mg Zug ($n=3$, $N=3$, siehe Abb. 3.23). In Kalzium-freier Pufferlösung war sowohl die Kontraktion von Noradrenalin als auch von UTP deutlich vermindert (1408 mg bzw. 971 mg). Nach erneuter Zugabe von 1,3 mM Kalzium-haltiger Pufferlösung konnte die Verminderung der Antwort auf Noradrenalin bzw. UTP

aufgehoben und dabei ungefähr die Ausgangswerte (2100 mg bzw. 1661 mg) erreicht werden.

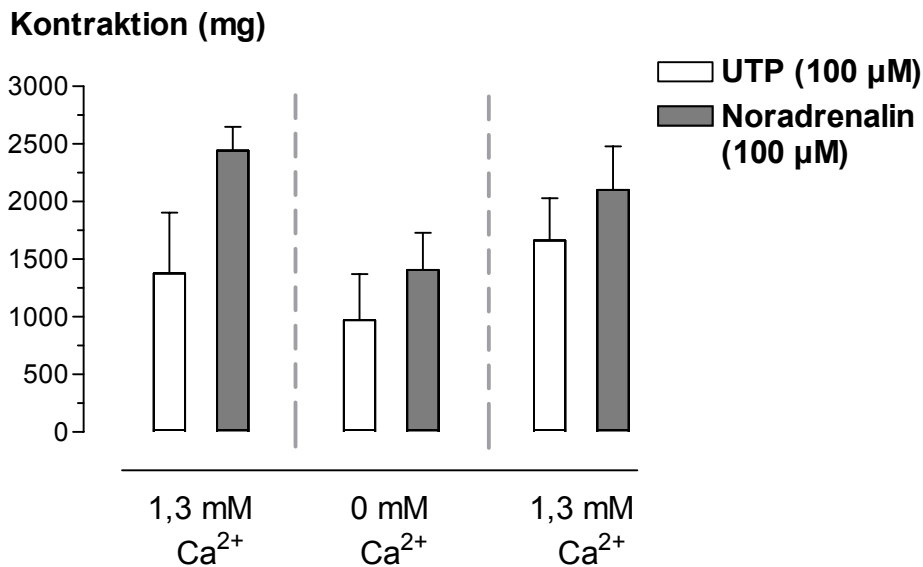


Abb. 3.23 Rolle von extrazellulärem Kalzium auf die UTP-Kontraktion des Vas deferens der Ratte.

Einfluss von Kalzium-freier Krebs-Henseleit-Lösung auf die Kontraktion verursacht durch 100 µM UTP im Vergleich zu 100 µM Noradrenalin. Ordinate: Zug des Organs in mg als Reaktion auf UTP oder Noradrenalin. Die Gewebe wurden mit 100 µM Evans Blau vorbehandelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ±s.e.m. aus mindestens 3 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

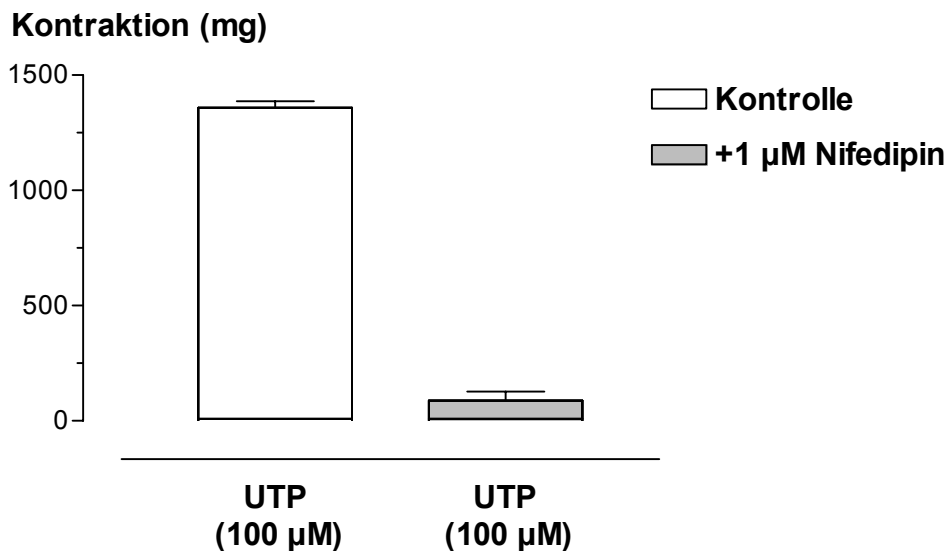


Abb. 3.24 Rolle von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen bei der UTP-Kontraktion im Vas deferens der Ratte.

Einfluss von Nifedipin (1 µM) auf Kontraktionen epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte in Anwesenheit von Evans Blau (100 µM). Ordinate: Zug des Organs in mg als Reaktion auf UTP. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ±s.e.m. aus mindestens 4 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

Der Einfluss auf die UTP-induzierte Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte (Anwesenheit von 100 µM Evans Blau) durch den Inhibitor Spannungs-abhängiger Kalzium-Kanäle vom L-Typ, Nifedipin, ist in Abb. 3.24

dargestellt. Abb. 3.24 zeigt, dass 100 μM UTP 1358 ± 29 mg Zug ($n=4$) in der Kontrolle erzeugen. Nach 1stündiger Inkubation von 1 μM Nifedipin war die UTP-Antwort (100 μM) stark auf 89 ± 39 mg Zug ($n=4$) reduziert.

Intrazellulärer Transduktionsmechanismus. Lithium interferiert mit der Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Phiel und Klein, 2001). Zahlreiche Enzyme sind Lithium-sensitiv. Dazu gehört auch die Inositolmonophosphatase (IMPase, Lithium: $K_i = 0,8$ mM; Hallcher und Sherman, 1980), welche Inositol aus Inositolmonophosphat für die Bildung von PIP_2 regeneriert. Die Hemmung der IMPase kann zur Depletion des Phosphatidylinositol-Diphosphates, dem Substrat der Phospholipase C, führen und damit die Bildung der intrazellulären Effektoren DAG und IP_3 unterbinden. Insbesondere IP_3 kann zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern führen und dadurch eine Kontraktion von glatter Muskulatur bewirken. Der Einfluß von Lithium auf die UTP-induzierte Kontraktion wurde untersucht. Wie aus Abb. 3.25 hervorgeht, zeigte die Kontrolle eine Konzentrations-abhängige Zunahme der Kontraktion durch UTP mit einer Maximalwirkung (100 μM UTP) von 1290 ± 176 mg Zug und einem pEC_{50} -Wert von $5,01 \pm 0,12$ ($n=3$, $N=3$).

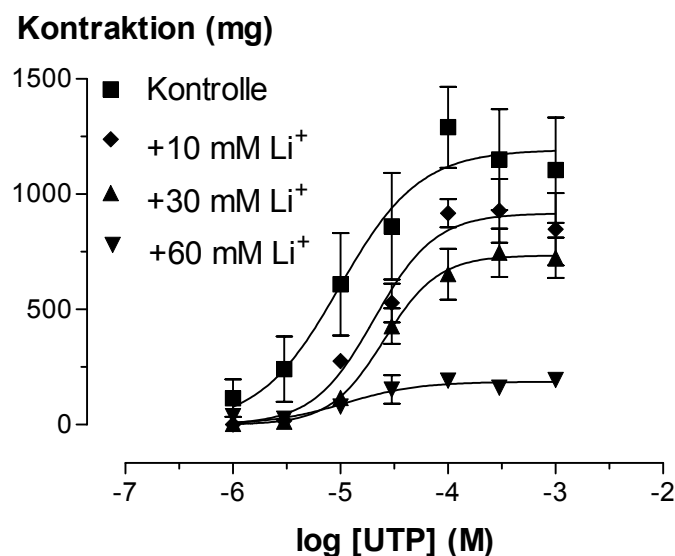


Abb. 3.25 Lithiumeffekt auf Dosis-Wirkungs-Kurven von UTP im Vas deferens der Ratte. Einfluss von Lithium (10 mM, 30 mM und 60 mM) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von UTP (1 μM – 1000 μM) epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau. Ordinate: Kontraktion des Organs in mg als Reaktion auf UTP. Abszisse: molare Konzentration von UTP im Organbad. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

Durch den Einsatz von Lithium konnte bei einer Konzentration von 10 mM bzw. 30 mM Lithium eine schwache Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve (pEC_{50}

von $4,70 \pm 0,08$ bzw. $4,60 \pm 0,02$ mit $n = 3$, $N = 3$) und für alle Lithiumkonzentrationen eine Konzentrations-abhängige Abnahme der Maximal-Antwort im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (abgelesen bei $300 \mu\text{M}$ UTP: $928 \pm 138 \text{ mg}$ und $746 \pm 105 \text{ mg}$ bzw. bei $1000 \mu\text{M}$ UTP: $193 \pm 3 \text{ mg}$).

Bezüglich der Überprüfung der Selektivität der Hemmung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Lithium wurde nach gleichem Protokoll, jedoch nicht in Anwesenheit von Evans Blau, der Einfluss von Lithium auf Dosis-Wirkungs-Kurven von α,β -meATP ($0,1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$), Agonist von Ligand-gesteuerten ionotropen P2X_{1-} , P2X_{3-} , $\text{P2X}_{1/3-}$, $\text{P2X}_{2/3-}$ und $\text{P2X}_{1/5-}$ -Kanälen (Lambrecht, 2000; North und Surprenant, 2000), untersucht (siehe dazu Abb. 3.26).

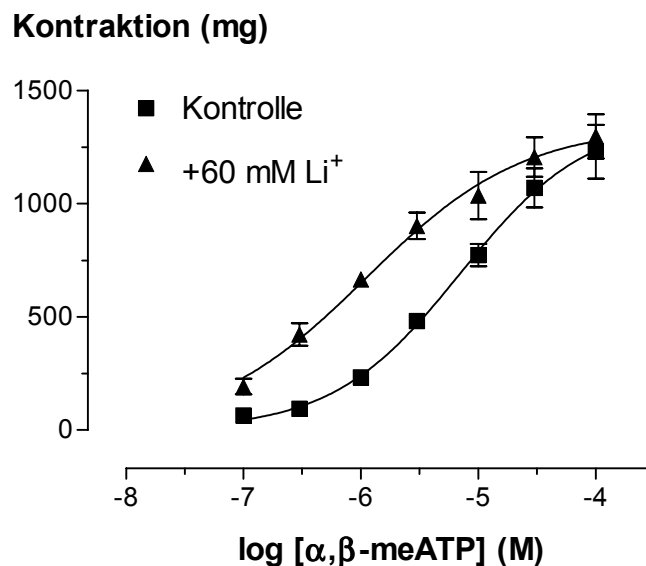


Abb. 3.26 Lithiumeffekt auf Dosis-Wirkungskurven von α,β -meATP am Vas deferens der Ratte.

Einfluss von Lithium (60 mM) auf Dosis-Wirkungs-Kurven von α,β -meATP ($0,1 \mu\text{M} - 100 \mu\text{M}$) an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. Ordinate: Kontraktion des Organs in mg als Reaktion auf α,β -meATP. Abszisse: molare Konzentration von α,β -meATP im Organbad. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens drei Einzelversuchen (n) und drei Individuen (N).

Eine wie in Abb. 3.25 zu beobachtende Abnahme des Maximaleffektes bzw. eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve konnte beim Einsatz von α,β -meATP nicht beobachtet werden. In der Kontrolle war die $p\text{EC}_{50} = 5,16 \pm 0,05$ von α,β -meATP und die Maximal-Antwort $1229 \pm 119 \text{ mg}$ Zug ($n = 3$ und $N = 3$). Im Gegensatz zur Kontrolle war bei den mit Lithium (60 mM) inkubierten Organen zwar die α,β -meATP-Maximal-Antwort nicht verschieden ($1297 \text{ mg} \pm 97 \text{ mg}$), jedoch die Dosis-Wirkungs-Kurve von α,β -meATP und damit auch die $p\text{EC}_{50}$ ($5,96 \pm 0,08$) deutlich nach links

verschoben. Alle dargestellten Experimente mit Lithium wurden hinsichtlich der Osmolarität der Krebs-Henseleit-Lösung nicht korrigiert. Das heißt Lithiumchlorid befand sich zusätzlich in der Nährlösung. In Kontrolluntersuchungen mit „korrigierter“ Krebs-Henseleit-Lösung (die physiologische Osmolarität wurde durch Erniedrigung der Natriumchlorid-Konzentration wieder hergestellt) ergab sich kein Hinweis auf eine veränderte Lage der Dosis-Wirkungs-Kurve von α,β -meATP (Daten nicht gezeigt).

Einfluss von UTP-Metaboliten auf die UTP-Kontraktion. Da Abbauprodukte des UTP physiologische Wirkungen an isolierten Gewebe hervorrufen können (Seifert und Schulz, 1989), bestand die Möglichkeit, dass, trotz Anwesenheit von Evans Blau, ein meßbarer Teil der UTP-induzierten Kontraktion des Vas deferens auf agonistischen Wirkungen der Metabolisierungsprodukte des UTP beruht.

Um Einflüsse der Metabolite UDP bzw. Uridin auf die UTP-Kontraktion zu untersuchen, wurden equimolare Konzentrationen von UTP mit seinen jeweiligen Abbauprodukten koappliziert und die Kontraktion gemessen (siehe Abb. 3.27).

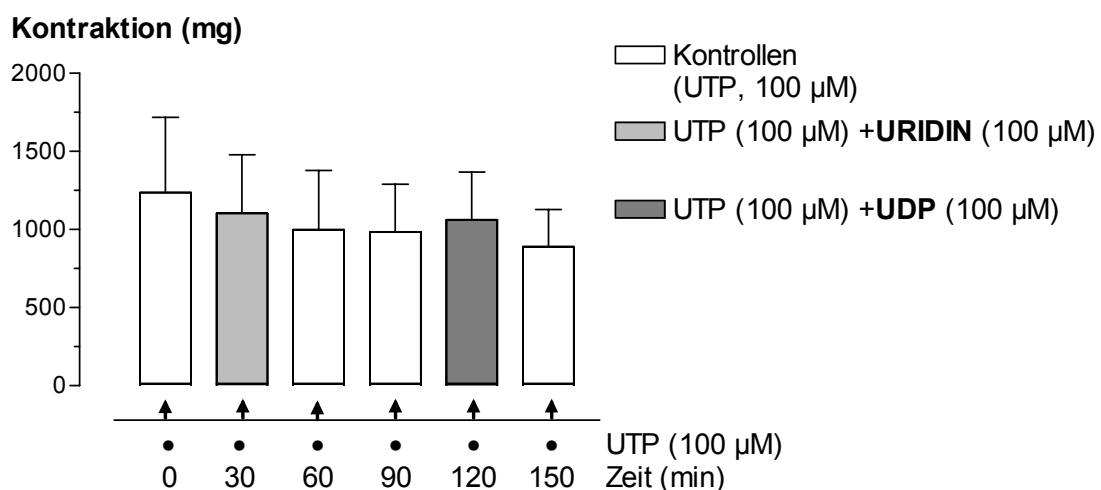


Abb. 3.27 Rolle von UTP-Metabolite auf die UTP-Kontraktion des Vas deferens der Ratte. Einfluss von Uridin (100 µM) und UDP (100 µM) auf Kontraktionen von epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte verursacht durch 100 µM UTP in Anwesenheit von 100 µM Evans Blau. Ordinate: Zug des Organs in mg als Reaktion auf UTP. Die Verbindungen wurden im 30-min-Abstand appliziert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 4 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

Zu Beginn der Untersuchungen erzeugte 100 µM UTP 1236 \pm 483 mg Zug und nach 150 min 890 \pm 239 mg Zug, was einem Zeit-abhängigen Abfall der Kontraktion auf UTP um 28 % entspricht. Diese Abnahme war nicht signifikant. Weder durch die zeitgleiche Applikation von 100 µM Uridin noch durch 100 µM UDP konnte das Ausmaß der Kontraktion auf UTP signifikant beeinflusst werden (1103 \pm 375 mg vs. 1062 \pm 305 mg Zug). Durch Koapplikation der equimolaren UTP/UDP- bzw. UTP/Uridin-Gemische

konnte keine Relaxation der Organe beobachten werden.

3.2.4 Pharmakologische Untersuchung von P2-Agonisten

Zur weiteren Charakterisierung der Kontraktions-vermittelnden, metabotropen P2-Rezeptoren wurden zunächst Dosis-Wirkungs-Kurven von Agonisten erstellt.

Ergebnisse mit natürlich vorkommenden Nukleotiden. Die chemisch nicht modifizierten, natürlichen Nukleotide ATP, ADP, UTP und Ap₄A erzeugten bei Abwesenheit von Evans Blau eine schwache und Konzentrations-abhängige Kontraktion. Das Datenmaterial konnte aber nicht durch eine sigmoidale Funktion beschrieben werden, da keine der Substanzen eine definierte Maximalkontraktion auslöste (Abb. 3.28). Demzufolge war es auch nicht möglich, EC₅₀-Werte zu bestimmen. Ap₄A erwies sich als potentester Agonist (1465 ± 75 mg Zug bei 300 μM), während UDP unwirksam war. Daraus ergab sich folgende Aktivitätsrangfolge:

$$\text{Ap}_4\text{A} > \text{ATP} > \text{ADP} = \text{UTP} > \text{UDP}.$$

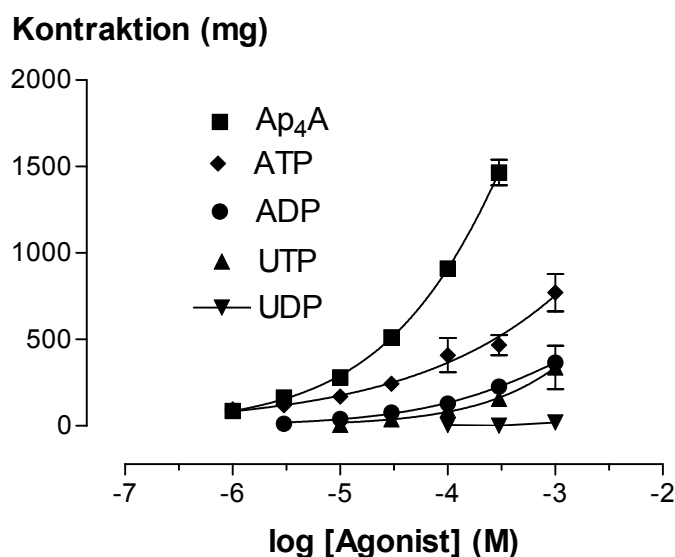


Abb. 3.28 Aktivitäten natürlicher Nukleotide am Vas deferens der Ratte.

Dosis-Wirkungs-Kurven von Ap₄A, ATP, UTP, ADP und UDP an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. Die Agonisten wurden 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des jeweiligen Agonisten. Gezeigt sind Mittelwerte ±s.e.m. aus mindestens 3 Einzelwerten von 3 verschiedenen Individuen.

Fügte man 90 min vor dem Untersuchungsbeginn mit Agonisten der Organbadflüssigkeit Evans Blau (100 μM) hinzu, so liess sich eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven feststellen (siehe dazu Abb. 3.28 und Abb. 3.29). Alle verwendeten Agonisten zeigten eine Konzentrations-abhängige, monophasische Zunahme der Kontraktion. Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 3.29) ist bis

auf diejenige von UDP sigmoidal und ließ die Bestimmung der Agonist-Maximal-Effekte zu. Die Agonisten unterscheiden sich hinsichtlich Ihrer intrinsischen Wirkaktivität, wobei ATP (2411 ± 100 mg Zug; $N = 3$, $n = 3$) die höchste und Ap₄A (1416 ± 191 mg Zug; $N = 3$, $n = 3$) die niedrigste aufwies (UDP nicht mit einbezogen). Im Gegensatz dazu zeigte Ap₄A ($pEC_{50} = 6,10 \pm 0,18$; $N = 3$, $n = 3$) die höchste und UDP (scheinbare $pEC_{50} < 3,0$; $N = 4$, $n = 4$) die niedrigste Potenz am Kontraktionsvermittelnden Rezeptor in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte. Die pEC_{50} -Werte der Nukleotide ATP ($4,54 \pm 0,13$, $n = 3$), UTP ($4,44 \pm 0,12$, $n = 7$) und ADP ($4,61 \pm 0,19$, $n = 3$) waren nicht signifikant voneinander verschieden.

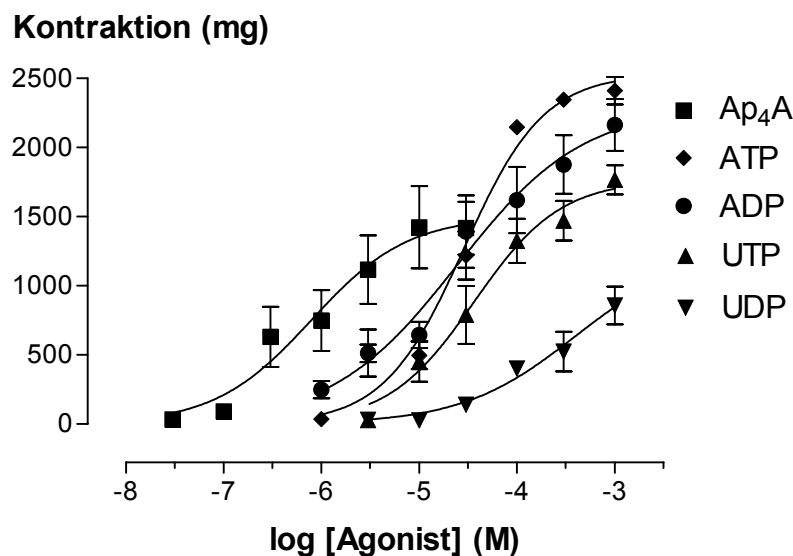


Abb. 3.29 Aktivitäten natürlicher Nukleotide in Anwesenheit von Evans Blau am Vas deferens der Ratte.

Dosis-Wirkungs-Kurven von Ap₄A, ATP, UTP, ADP und UDP an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von Evans Blau (100 μ M). Die Agonisten wurden 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des jeweiligen Agonisten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelwerten von 3 verschiedenen Individuen.

Ergebnisse mit (partial-)synthetischen Nukleotiden. Zur weiteren Charakterisierung des Kontraktionsvermittelnden P2-Rezeptors wurden auch (partial-)synthetische Nukleotide herangezogen und deren Wirkstärke bestimmt. Ohne Evans Blau, (Abb. 3.30), zeigten die verwendeten Nukleotide eine Konzentrations-abhängige Zunahme der Kontraktion. Bei der maximalen Konzentration der Nukleotide ATP γ S, ADP β S und 2MeSATP ließen sich keine Maximalwirkungen beobachten, während bei α,β -meATP (1229 ± 119 mg Zug, $n = 3$) sich eine solche andeutete. Deshalb war die Bestimmung der EC_{50} nur bei α,β -meATP ($pEC_{50} = 5,16 \pm 0,05$, $N = 3$, $n = 3$) möglich. α,β -meATP war der potenteste Agonist der getesteten Nukleotide. Insgesamt ergab sich

folgende Reihung in der Wirkstärke:

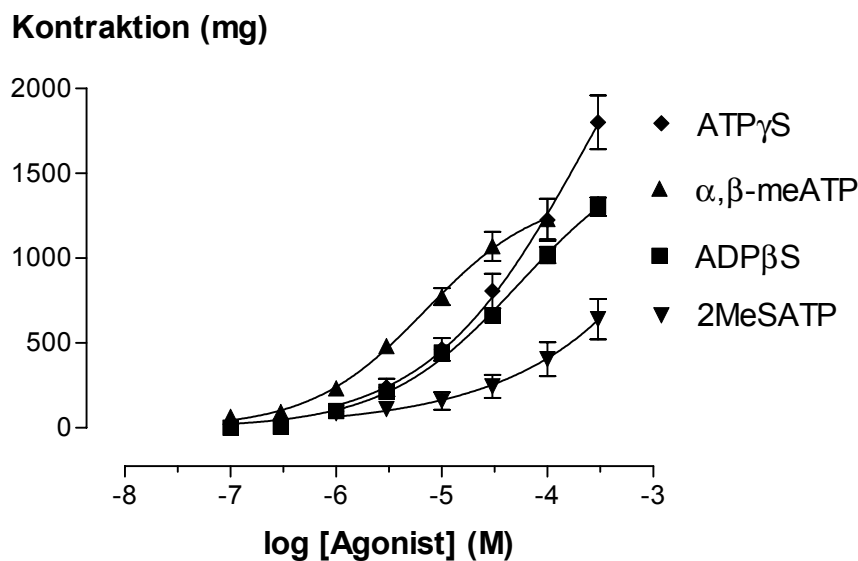
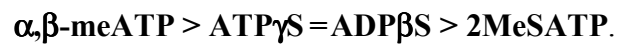


Abb. 3.30 Aktivitäten (partial-)synthetischer Nukleotide am Vas deferens der Ratte.

Dosis-Wirkungs-Kurven von 2MeSATP, ADP β S, ATP γ S und α,β -meATP an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte. Die Agonisten wurden 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des jeweiligen Agonisten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelwerten von 3 verschiedenen Individuen.

Betrachtet man nun Abb. 3.31, so wird deutlich, dass die Dosis-Wirkungs-Kurve der verwendeten Nukleotide in Anwesenheit von 100 μ M Evans Blau für ATP γ S und 2MeSATP eine starke Linksverschiebung erfahren haben und durchaus eine gut definierte Maximalwirkung erreichten (Maximalwirkung: ATP γ S = 1554 \pm 155 mg Zug, ADP β S = 1118 \pm 70 mg Zug und 2MeSATP = 1587 \pm 158 mg Zug, N=3, n=3). Weiterhin ist der Konzentrations-abhängige Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven monophasisch. Da Evans Blau ein P2X-Antagonist im Vas deferens der Ratte ist (Bültmann und Starke, 1993), wurde auf die Wiederholung der Dosis-Wirkungs-Kurve von α,β -meATP verzichtet. Aus den Ergebnissen resultierte folgende Reihung nach der Wirkstärke: 2MeSATP > ATP γ S > ADP β S.

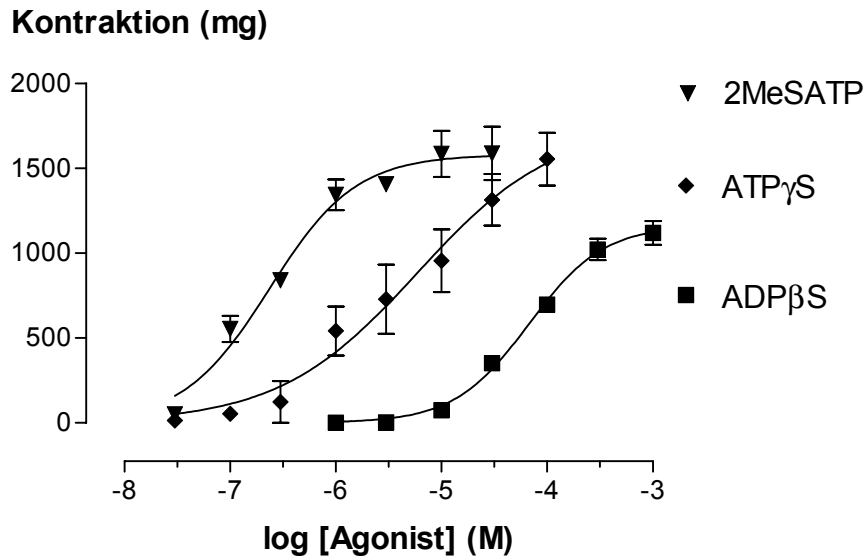


Abb. 3.31 Aktivitäten (partial-) synthetischer Nukleotide in Anwesenheit von Evans Blau am Vas deferens der Ratte.

Dosis-Wirkungs-Kurven von 2MeSATP, ADPβS und ATPγS an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte bei Anwesenheit von Evans Blau (100 μM). Die Agonisten wurden 30minütlich in Form von Einzeldosen appliziert. Ordinate: Kontraktion in mg Zug des Organs. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen des jeweiligen Agonisten. Gezeigt sind Mittelwerte ±s.e.m. aus mindestens 3 Einzelwerten von 3 verschiedenen Individuen.

Zur besseren Übersicht sind für das epididymale Segment des Samenleiters der Ratte die Aktivitäts-Reihenfolgen der untersuchten P2-Agonisten in Tab. 3.9 zusammengefasst.

Tab. 3.9 Übersicht der Aktivitäts-Reihenfolgen diverser P2-Agonisten am Vas deferens der Ratte.

Einfluss von Evans Blau (100 μM) auf die Aktivitäts-Reihenfolgen von: Ap₄A, ATP, UTP, ADP, UDP, 2MeSATP, ADPβS, ATPγS und α,β-meATP an epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte.

Agonisten	Ohne Evans Blau	Mit Evans Blau (100 μM)
natürliche Agonisten	Ap ₄ A > ATP > UTP = ADP > UDP	Ap ₄ A > ATP = UTP = ADP > UDP
(partial-) synthetische Agonisten	α,β-meATP > ATPγS = ADPβS > 2MeSATP	2MeSATP > ATPγS > ADPβS

Kreuz-Desensibilisierungs-Studien mit Agonisten. Epididymale Segmente des Samenleiters der Ratte wurden mit 100 μM Evans Blau vorbehandelt und später unter weiterer Anwesenheit von Evans Blau mit equi-effektiven Dosen (30 μM) von ATP bzw. UTP kontrahiert. Die Kontraktilität der Organe wurde in einem „Über-Kreuz-Verfahren“ hinsichtlich der Desensibilisierung durch ATP bzw. UTP (jeweils 100 μM), untersucht (siehe dazu Abb. 3.32).

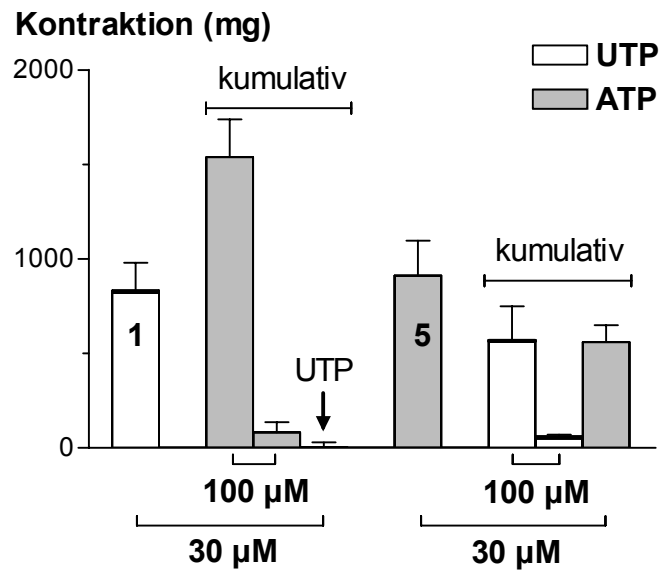


Abb. 3.32 Kreuz-Desensibilisierungs-Untersuchungen am Vas deferens der Ratte.

Einfluss von wiederholten, kumulativen Gaben von ATP bzw. UTP (100 µM) auf die Kontraktion der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte, hervorgerufen durch equieffektive Dosen (30 µM) von ATP bzw. UTP im Vergleich zu den Referenz-Kontraktionen (Balken 1 und 5). Ordinate: Kontraktion des Organs in mg Zug. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens fünf Einzelversuchen (n) und drei Individuen (N).

Wie aus der Abb. 3.32 hervorgeht, sind 30 µM UTP (832 ± 148 mg Zug, n=4, Balken 1) equieffektiv zu 30 µM ATP (911 ± 186 mg Zug, n =5, Balken 5). Weiterhin war zu beobachten, dass epididymale Segmente sowohl durch 100 µM ATP als auch durch 100 µM UTP desensibilisierbar sind und keine weitere Stimulation durch erneute, kumulative Gabe desselben Agonisten möglich ist. Die Organe waren bereits nach zweimaliger Applikation von ATP bzw. UTP (je 100 µM) desensibilisiert und zeigten nur noch geringe Kontraktionen (ATP: 82 ± 53 mg Zug, UTP: $59,6 \pm 10$ mg Zug; N=3, n=5). Wurde die *Pars epididymis* mit Hilfe von ATP desensibilisiert, so konnte 30 µM UTP keine Kontraktion hervorrufen. Wenn das Organ aber durch UTP desensibilisiert wurde, konnte mit 30 µM ATP (560 ± 90 mg Zug, N=3, n = 5) eine, wenn auch im Vergleich zur Kontrolle (Balken 5, 911 ± 186 mg Zug, n = 5) schwächere, Kontraktion hervorgerufen werden.

3.2.5 Pharmakologische Untersuchung von P2-Antagonisten

Im Rahmen dieser Experimente wurde der hemmende Einfluss der Standard-P2-Antagonisten Suramin, PPADS, MRS 2179 und Reaktiv Blau (RB 2) auf die UTP-induzierte Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte untersucht (Abb. 3.33). Die Auswahl der verwendeten Antagonisten erfolgte auf der Basis von Literaturdaten, die belegen, dass diese Substanzen zur Charakterisierung von

metabotropen P2Y-Rezeptoren dienen können (Ralevic und Burnstock, 1998; King et al., 1998; Lambrecht et al., 2002; Jacobson et al., 2002)

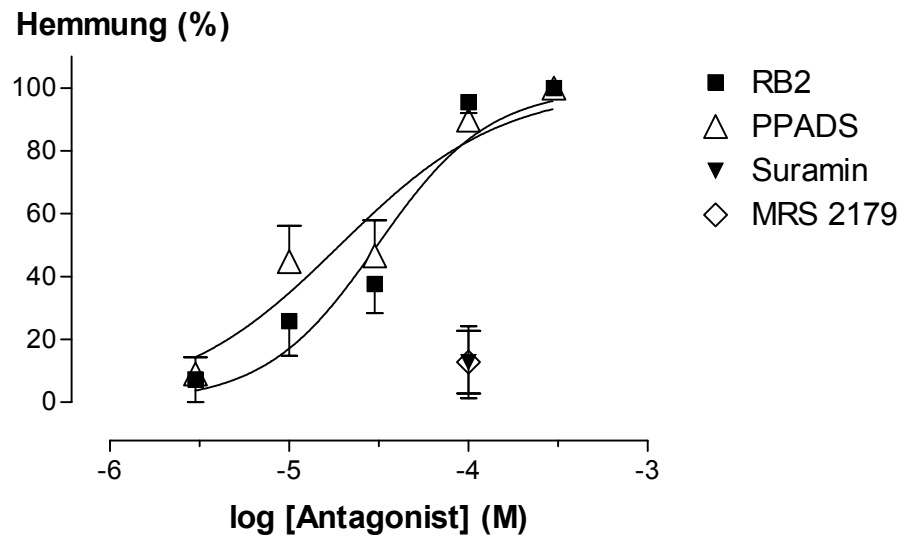


Abb. 3.33 Hemmung der UTP-vermittelten Kontraktion durch P2Y-Antagonisten am Vas deferens der Ratte.

Inhibition durch Reaktiv Blau (RB 2), PPADS, Suramin und MRS 2179 der UTP-bedingten (30 μ M) Kontraktion epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte in Anwesenheit von 100 μ M Evans Blau. Ordinate: Hemmung der UTP-Kontraktion in Prozent im Vergleich zur Referenz-Kontraktion ohne Antagonist. Abszisse: Logarithmus molarer Konzentrationen der Antagonisten, welche 60 min vorinkubiert wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm s.e.m. aus mindestens 3 Einzelversuchen (n) und 3 Individuen (N).

Die P2-Antagonisten Reaktiv Blau 2 (RB 2) und PPADS zeigten eine Konzentrationsabhängige Hemmung der durch 30 μ M UTP (\approx EC₅₀ von UTP) verursachten Kontraktion der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. Beide Substanzen hatten eine vergleichbare inhibitorische Wirkung (PPADS: IC₅₀ = 20,5 μ M; RB 2: IC₅₀ = 43,4 μ M), welche bei 300 μ M vollständig die Kontraktion inhibierte. Im Gegensatz dazu zeigten die Verbindungen Suramin (12,7 \pm 11,5) und MRS 2179 (12,7 \pm 10,0) bei 100 μ M nur eine schwache Inhibition.

3.2.6 Histo- /Immunzytochemische Untersuchungen

Für die Verifizierung bisher gewonnener pharmakologischer Daten wurden histo- und immunzytochemische Studien an fixierten Kryo-Mikrotom-Querschnitten epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte durchgeführt. Für die primären Antikörper Anti-P2Y₂ und Anti-P2Y₄ lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur wenige Erfahrungen in der Immunzytochemie vor (Coutinho-Silva et al., 2001), deshalb wurde zunächst mit der Methodenoptimierung begonnen. Für den Einsatz des NTPDase2-Antikörpers existierten Standardprotokolle (Braun et al., 2003).

3.2.6.1 Methodenoptimierung

Fixierung des Gewebes. Die Fixierung, der auf silanisierte Objektträger gebrachten Querschnitte, erfolgte zunächst mit Paraformaldehyd (4 %) oder Pikrinsäure (0,2 %) oder einem Gemisch aus beiden. Nach dem Wässern der Schnitte erfolgte eine Behandlung mit Triton X100, und das Prozedere, wie unter 2.4.3.2 beschrieben, wurde fortgesetzt. Die Art der Fixierung führte zur einer starken Fluoreszenz der Zellkerne aller Zellen. Ziel war es, die als unspezifisch angenommene Markierung der Kerne durch die Primärantikörper Anti-P2Y₂ und Anti-P2Y₄ mittels anderer Fixierungsmitteln zu vermindern. Zunächst wurden Fixierungsmittelgemische aus Paraformaldehyd oder Pikrinsäure mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Aceton kombiniert. Durch die Verwendung organischer Lösungsmittel als Fixiermittel ergab sich eine schwächere Fluoreszenz der Zellkerne. Aus diesem Grund wurden als nächstes Querschnitte mit Aceton oder Methanol fixiert und auf den Einsatz von Triton X100 verzichtet. Die Auswertung der mikroskopischen Beobachtungen ergab einen gänzlichen Verlust der Kernfärbungen, zusätzlich wurden filamentöse Strukturen durch die Antikörper Anti-P2Y₂ und Anti-P2Y₄ markiert (siehe unter 3.2.6.3). Im Vergleich zu den glatten Muskelzellen sowie zum Epithel führte die Verwendung von Aceton als Fixiermittel zu einer starken Überbetonung filamentöser Strukturen. Deshalb wurde die Methanol-Fixierung im folgenden als Standard-Fixierung für die Markierung des P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptor-Protein verwendet. Lungenschnitte der Ratte, welche als Kontrollen für ratP2Y₂-Rezeptoren gelten (Parr et al., 1994), zeigten mit diesem Protokoll gute Ergebnisse (Daten nicht dargestellt).

3.2.6.2 Färbungen von P2Y₂-Rezeptor-Proteinen

Die Immunfluoreszenz-Markierung des P2Y₂-Rezeptor-Proteins wurde, aus pharmakologischen Gründen, an Querschnitten der *Pars epididymis* untersucht. Die Spezifität der Antikörper wurde zum einen durch einen positiven Immunfluoreszenz-Befund an Lungengewebe der Ratte, für welches das endogene Vorkommen des P2Y₂-Rezeptor-Proteins als sicher gilt, und zum anderen durch die Preabsorption des P2Y₂-Antikörpers mit dem spezifischen Antigen und anschließender Inkubation mit den Objekten bestätigt. Das Weglassen des primären P2Y₂-Antikörpers ergab keinen Hinweis auf Fluoreszenz (nicht gezeigt). Sequenz-Vergleiche (multiple sequenz alignment plot) der Rezeptoren P2Y₁- bis P2Y₁₂-Rezeptoren zeigten keine Übereinstimmungen in den Epitopen, gegen die die jeweiligen Antikörpern gerichtet

sind. In Abb. 3.34 sind Querschnitte der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte des selben Objektes gezeigt. Areale, markiert durch einen weißen Rahmen, wurden zur besseren Illustration vergrößert dargestellt. Im Übersichtsbild (links) sind periphere Gefäße (weißer Pfeil), glatt-muskuläre Strukturen (2) und das Epithel (1) markiert. Besonders intensive Markierungen befinden sich im peripheren Bereich (mittleres Bild, weißer Pfeil), während das Muskelgewebe (Rahmen) schwächer markiert ist. Bei maximaler Vergrößerung des glatt-muskulären Bereichs (ganz rechts) sind quergeschnittene Myozyten und Filamente (weißer Pfeil) markiert. Das Fluoreszenzsignal war schwach oder fehlte im subepithelialen Raum (Lamina propria) und der Adventitia (1 und 3; linkes Bild).

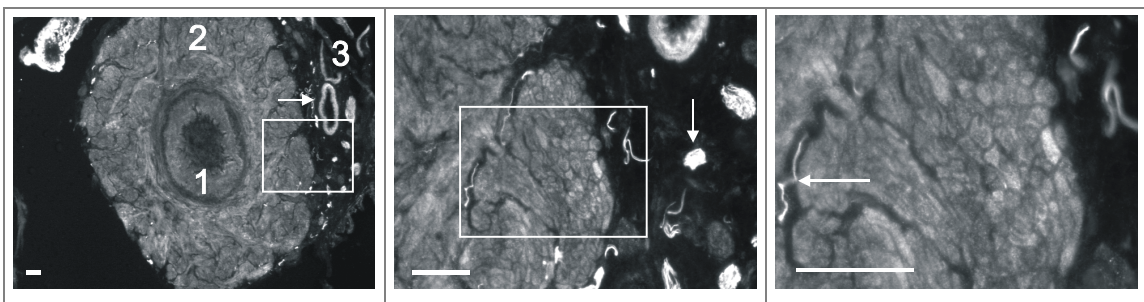


Abb. 3.34 Expression von P2Y₂-Rezeptoren .

Immunfluoreszenz-Markierung von Querschnitten der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. P2Y₂-Rezeptor-Immun-Reaktivität wurde in 1 = Epithel, 2 = glatte Muskulatur sowie in peripheren Strukturen wie Gefäßen und Filamenten (linkes Bild, 3) detektiert. 3 = Adventitia. Areale, markiert durch einen weißen Rahmen wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

In Abb. 3.35 ist die Markierung des mit Stereocilien besetzten Epithels deutlich zu erkennen, was die epididymale Herkunft der Objekte belegt (linkes Bild, weißer Rahmen, Vergrößerung davon rechts). Hier wurden insbesondere apikale als auch interzelluläre Plasmalemmata des Epithels (rechts) oberflächenmarkiert. Keine Fluoreszenz ist im Lumen (1) des Vas deferens, dem intermyozytären Raum und subepithelial (Lamina propria, Lp) zu finden.

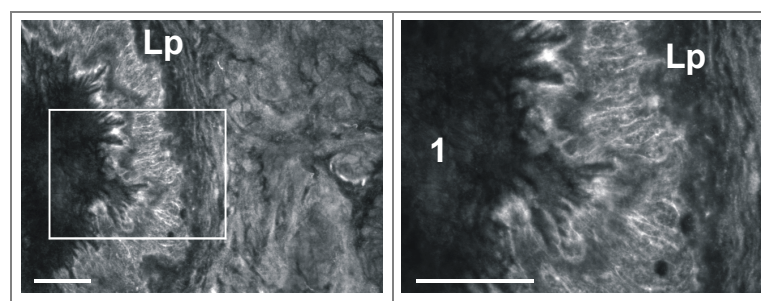


Abb. 3.35 Expression von P2Y₂-Rezeptoren.

Immunfluoreszenz-Markierung von Querschnitten der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. P2Y₂-Rezeptor-Immun-Reaktivität wurde im Epithel detektiert. 1 = Lumen, Lp = Lamina propria. Areale, markiert durch einen weißen Rahmen, wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

3.2.6.3 Färbungen von Neurofilament

Zur Charakterisierung der filamentösen Strukturen, welche sowohl peripher als auch intermyozytär in Begleitung von Bindegewebsstrukturen vorkommen, wurde der Neurofilament-Antikörper NF160 verwendet. Dazu wurden ein und die selben Gewebsschnitte doppelt, mit Anti-P2Y₂ und mit Anti-NF160, immunfluoreszenzmarkiert. Methodisch wurde dabei wie zur Färbung des P2Y₂-Rezeptor-Proteins vorgegangen (siehe Abschnitt 2.4.3.263). Die oberen 3 Bilder aus Abb. 3.36 zeigen die durch den P2Y₂-Antikörper und die unteren 3 die durch den Antikörper NF160 markierten Strukturen. Die Doppel-Immunfluoreszenz-Markierung zeigt deutliche Übereinstimmungen sowohl für die peripheren (linke Bilder, Strukturen im Rahmen und weißer Pfeil) als auch für die intermyozytären Filamente (ganz rechts, Pfeil). Die übereinstimmende, intensive Markierung durch beide Antikörper (siehe Bilder Mitte und ganz rechts) zeigt, dass es sich bei den peripheren und filamentösen Strukturen (rechtes Bild, Pfeil), welche durch den P2Y₂-Antikörper markiert wurden, wahrscheinlich um neuronale Strukturen handelt.

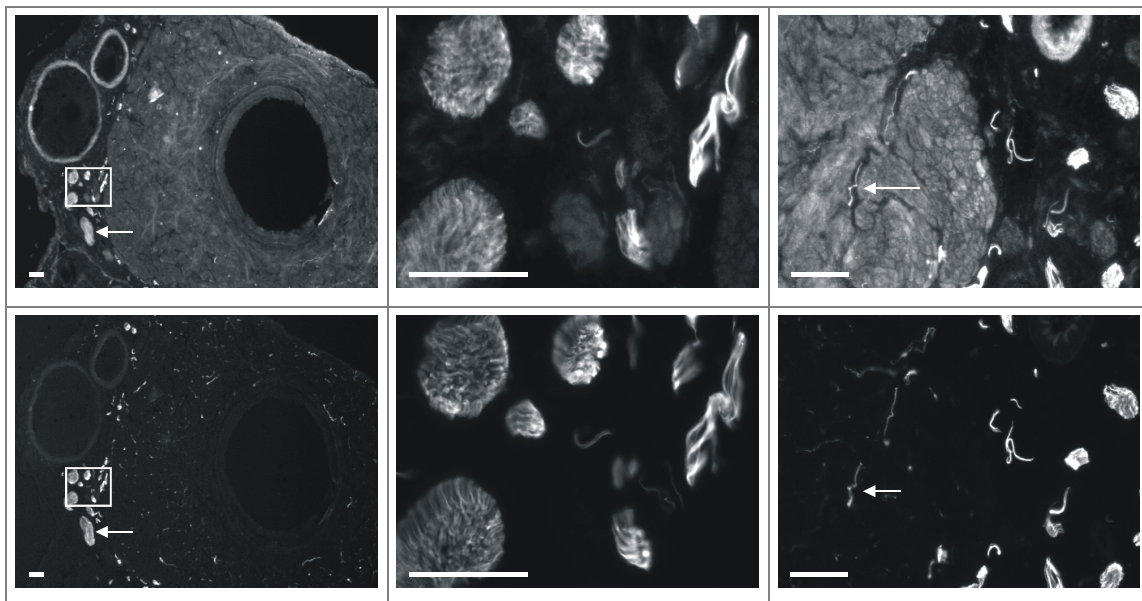


Abb. 3.36 Expression von P2Y₂-Rezeptoren und NF160.

Doppel-Immunfluoreszenz-Markierung von Querschnitten der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. Obere 3 Bilder: P2Y₂-Rezeptor-Immun-Reaktivität und untere Bilderreihe: NF160-Neurofilament-Immun-Reaktivität. Markierungen wurden in peripheren Strukturen (Bilder links, Pfeil) und intermyozytären Filamenten (Bilder rechts, Pfeile) detektiert. Areale, markiert durch einen weißen Rahmen, wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

3.2.6.4 Färbungen von P2Y₄-Rezeptor-Proteinen

Der Pre-Absorptions-Test ergab für den P2Y₄-Antikörper ein positives Ergebnis. Wie aus der Abb. 3.37 hervorgeht, wurden durch den Primär-Antikörper insbesondere das

muskuläre Gewebe markiert, unabhängig davon, ob der Antikörper in der ungebundenen, also aktiven Form (Bild oben rechts) oder präabsorbiert an sein spezifische Antigen (Bild unten rechts), inkubiert wurde. Lediglich periphere Strukturen (Bild oben rechts, Pfeile) scheinen spezifisch markiert zu sein, da die Fluoreszenz weitestgehend ausgelöscht war, wenn der Antikörper mit dem bindenden Peptid zuvor absorbiert wurde (Bild unten rechts, Pfeile). Nicht markiert wurden die Adventitia und die Lamina propria (= subepithelialer Raum). Als Vergleich dienten Phasenkontrastaufnahmen der jeweiligen Objekte (Bilder,links).

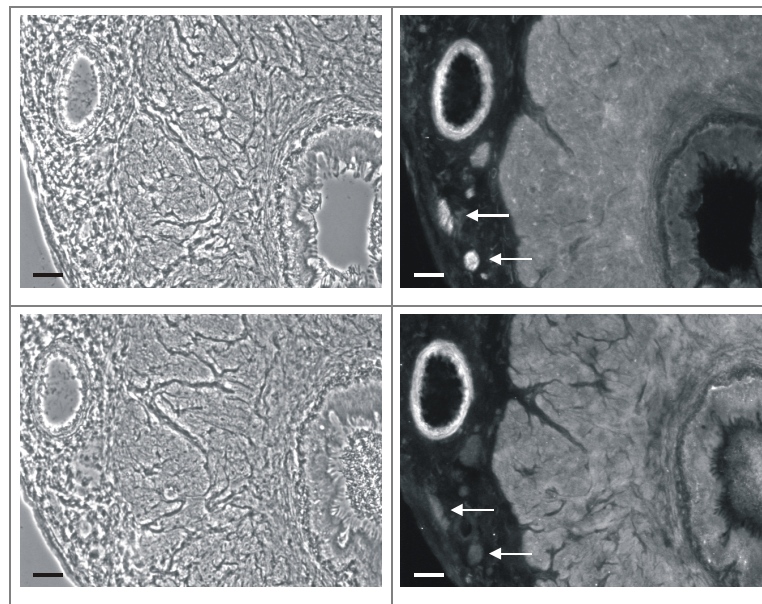


Abb. 3.37 Präabsorptions-Test, Anti-P2Y₄, Anti-P2Y₄+Bindungspeptid.

Phasenkontrast-Aufnahmen (Bilder links) und Immunfluoreszenz-Markierung (Bilder rechts) von Folge-Querschnitten der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. Spezifische P2Y₄-Rezeptor-Immun-Reaktivität (Bilder oben rechts) wurde in peripheren Strukturen (Pfeile) detektiert. Durch Präabsorption des P2Y₄-Antikörper (Bild unten rechts) erfolgte eine Fluoreszenzauslöschung nur im Bereich peripherer Strukturen (Pfeile = spezifisch markierte Strukturen). Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

3.2.6.5 Darstellung der ATPase-/ADPase-Aktivität

Die Wirkstärke von natürlichen Nukleotiden an isolierte Gewebe kann ein indirekter Hinweis auf das Ausmaß Nukleotidase-Aktivität sein (verfolge dazu EC₅₀-Werte von natürlichen Agonisten an isolierten Gefäßen und dem Meerschweinchen-Ileum; Ralevic und Burnstock, 1998). Das Vas deferens der Ratte gehört zu jenen Geweben, die äußerst effektiv endogene Nukleotide metabolisieren. Dies schlägt sich besonders in der ca. 100-fach geringeren Wirkstärke von z.B. ATP im Vergleich zu der von α,β-meATP nieder (Ralevic und Burnstock, 1998). Um die Strukturen darzustellen, die an der Metabolisierung von Nukleotiden beteiligt sind, wurden Gewebsschnitte epididymaler Segmente des Samenleiters der Ratte mit ATP bzw. ADP (je 1 mM) für 15 min

inkubiert und das entstandene Phosphat mit Blei(II)phosphat präzipitiert. Dieses Blei(II)phosphat wurde anschließend, wie unter 2.4.3.1 erläutert, in braun-schwarzes Bleisulfid überführt.

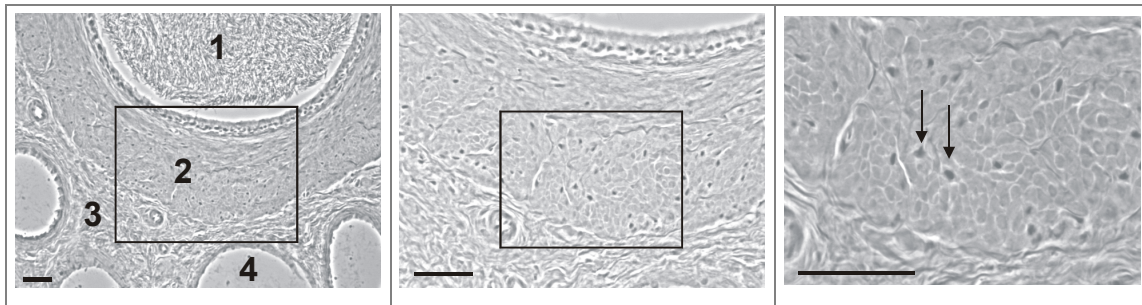


Abb. 3.38 Phasenkontrastaufnahmen, Kontrollen für ATPase-/ADPase-Aktivität.

Repräsentative Aufnahmen von Querschnitten epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte im Phasenkontrast. Schnitte wurden dem Protokoll für die Darstellung der ATPase/ADPase-Aktivität unterzogen, ohne jedoch ATP bzw. ADP zu inkubieren, so dass sie als Kontrollen für die Abb. 3.39 und Abb. 3.40 dienen. 1 = Lumen; 2 = Längsmuskulatur; 3 = Bindegewebe, 4 = Gefäße, Pfeil = Zellkern. Areale, markiert durch einen Rahmen, wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

Die Kontrollen in Abb. 3.38 zeigen Ausschnitte ein und desselben Objektes in von links nach rechts zunehmender Vergrößerung. Die linke Abbildung zeigt ein mit Spermien gefülltes Lumen (1) umgeben von einem Epithel mit Bürstensaum (mittlers Bild), einem sich anschließenden schmalen, zirkulären, glatt-muskulären Bereich, welcher in einen längsverlaufenden glatt-muskulären Bereich (2) übergeht. Jenseits des Muskelgewebes ist der Samenleiter von Bindegewebe (3, Adventitia), in welchem Blutgefäße (4) eingebettet sind, umgeben. Bei maximaler Vergrößerung (Bild ganz rechts) sind die einzelnen, querschnittenen Myozyten der Längsmuskulatur einschließlich der Zellkerne (Bild rechts, Pfeile) deutlich zu erkennen. Die Kontrollen ergaben in der Hellfeld-Mikroskopie keinen Hinweis auf eine Phosphatfällung. Damit konnte endogenes anorganischem Phosphat ausgeschlossen werden.

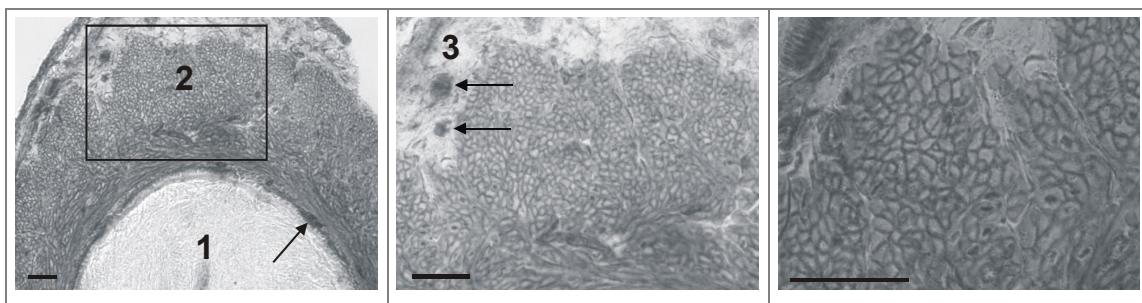


Abb. 3.39 ATPase-aktive Strukturen im Vas deferens der Ratte.

Querschnitte epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte im Hellfeld. Schnitte wurden mit 1 mM ATP inkubiert. Gebildetes Phosphat wurde als Blei(II)phosphat präzipitiert und anschließend als Blei(II)sulfid umgefällt. 1 = Lumen; 2 = Längsmuskulatur; 3 = Bindegewebe. Areale, markiert durch einen schwarzen Rahmen, wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

Inkubiert man jedoch die Gewebeschnitte mit 1 mM ATP für 15 min, dann fällt

besonders im Bereich der glatten Muskulatur (2) eine kräftige Schwärzung durch Bleisulfid auf (siehe dazu Abb. 3.39). Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 3.39, ganz rechts) sind die Membranen der Myozyten bzw. der intermyozytäre Raum die Orte der stärksten Phosphatbildung. Weitere Markierungen sind subepithelial zu sehen (links, schwarzer Pfeil) und in der Adventitia (mitte, schwarze Pfeile). Kaum gefärbt sind dagegen Strukturen wie Bindegewebe (3) und Spermien (1). Ein ähnliches Bild ergibt sich durch die Inkubation von 1 mM ADP (siehe Abb. 3.40). Auch hier ist die glatte Muskulatur das Gewebe der höchsten ADPase-Aktivität und speziell die Myozytenmembran bzw. der intermyozytäre Raum ist deutlich geschwärzt. Im Vergleich zu Abb. 3.39, ganz rechts, ist die Färbung in Abb. 3.40 weniger intensiv. Zusätzlich sind in Abb. 3.40 wie z.T. auch in Abb. 3.39 Strukturen subepithelial (links, Pfeil), der Adventitia (Mitte, Pfeile) und intermyozytär (rechts, Pfeile) markiert. Ungefärbt bleibt auch hier wieder das Bindegewebe (3, Adventitia) und das Lumen (1, linkes Bild).

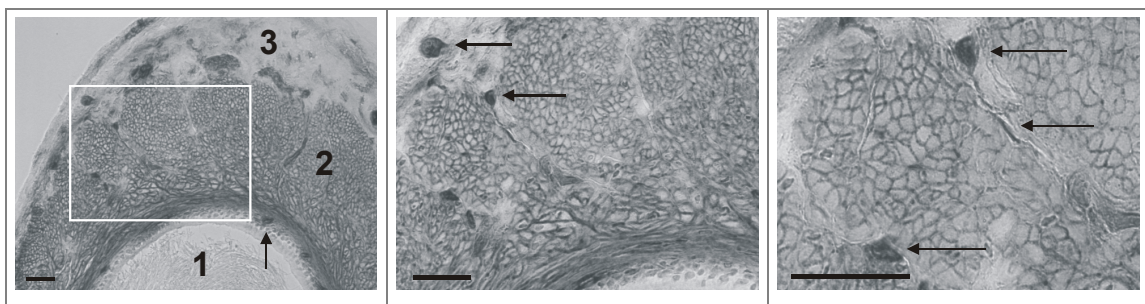


Abb. 3.40 ADPase-aktive Strukturen im Vas deferens der Ratte.

Querschnitte epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte im Hellfeld. Schnitte wurden mit 1 mM ADP inkubiert. Gebildetes Phosphat wurde als Blei(II)phosphat präzipitiert und anschließend als Blei(II)sulfid umgefällt. 1 = Lumen, 2 = Bindegewebe. Pfeile = intensive Bleipräzipitate im Bindegewebe. Areal, markiert durch einen weißen Rahmen, wurde zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 µm.

3.2.6.6 Verteilung der ratNTPDase2

Aus der Familie der E-NTPDasen können drei Subtypen, NTPDase1, -2, und -3, extrazellulär aktiv sein. Strukturen die durch den NTPDase2-Antikörper markiert wurden, konnten mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie histologisch zugeordnet werden [Abb. 3.41, Vergleich Bild A (Phasenkontrast) mit Bild B]. Demnach wurden das Bindegewebe (Adventitia) und darin eingeschlossene Strukturen (Bild B, Pfeil) markiert. Auch subepithelial (Lamina propria, Lp) wurde die NTPDase2-Immun-Reaktivität detektiert [Vergleich Bild E (Phasenkontrast) mit Bild F, Pfeile]. Im Bereich der glatten Muskulatur findet sich ebenfalls NTPDase2-Immun-Reaktivität, welche äußerst feine Strukturen zwischen den einzelnen Myozyten beschreibt (Abb. 3.41, Bild

D, Pfeilspitzen).

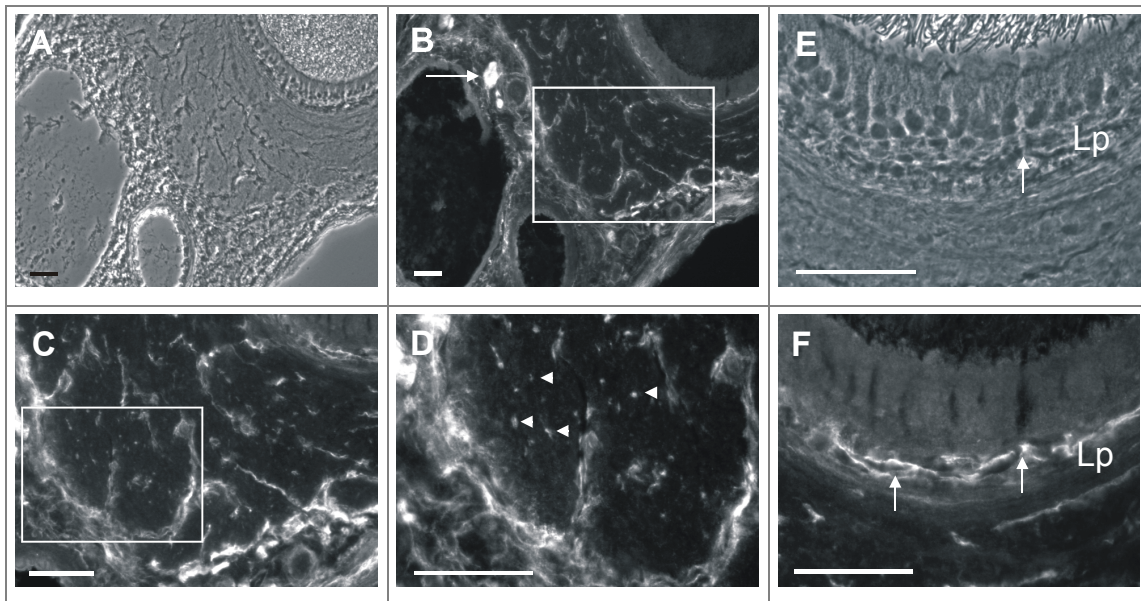


Abb. 3.41 Expression von NTPDase2.

Phasenkontrastaufnahmen (A und E) und Immunfluoreszenz-Markierungen (B,C,D und F) von Querschnitten der *Pars epididymis* des Samenleiters der Ratte. NTPDase2-Immun-Reaktivität wurde subepithelial (F, Pfeile), im Bereich der glatten Muskulatur mit Bindegewebe kolokalisiert (D, Pfeilspitzen) und peripher detektiert (B, Pfeil). Areale, markiert durch einen weißen Rahmen wurden zur Illustration vergrößert dargestellt. Balken entsprechen einer Größe von 50 μm .

Strukturen, welche spezifisch durch den NTPDase2-Antikörper markiert wurden (Abb. 3.41), stimmen z. T. mit Strukturen wie dem subepithelialen Raum (Lamina propria) und der Adventitia in Abb. 3.39 und in Abb. 3.40 überein. Allerdings lassen sich weitere Strukturen wie die Myozytenmembranen mit Nukleotidase-Aktivität beobachten, die nicht identisch mit der NTPDase2-Markierung sind.

4 DISKUSSION

4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF- und SB-Analoga als P2-Rezeptor-Antagonisten

4.1.1 Ergebnisse aus „Screening“-Untersuchungen

NF023-Analoga. Innerhalb der Gruppe der NF023-Analoga (Tab. 3.1) gab es wichtige Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die allerdings zu keiner Verbesserung der antagonistischen Wirkstärke und P2-Rezeptor-Selektivität von NF023 führten. Deshalb wurde von einer weiteren pharmakologischen Charakterisierung abgesehen. Damit bleibt innerhalb der Substanzgruppe der „kleinen Harnstoffe“ NF023 der potenteste und selektivste P2X-Antagonist (Lambrecht et al., 1996a, 2002; Ziyal et al., 1997).

Überaus interessant ist jedoch die Substanz NF824 (siehe Kapitel 8.1), welche lipophiler als andere Vertreter der NF023-Analoga bzw. der Suramin-/NF279-Analoga ist, da sie über keinerlei polyanionische Sulfonsäuregruppen verfügt. Die Bedeutung der Sulfonsäuregruppen für die P2-Rezeptor-antagonistische Wirkung konnte mit dieser Verbindung klar gezeigt werden (siehe Tab. 3.1). Während die symmetrische und 6-fach sulfonierte Verbindung NF023 selektiv P2X₁-Rezeptoren in nativen Geweben hemmt (Ziyal et al., 1997), erwies sich die Substanz NF824 bei einer Konzentration von 10 µM als unwirksam P2X₁-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen des Samenleiters der Ratte zu inhibieren. Dies bedeutet, dass polyanionische Substituenten eine strukturelle Voraussetzung für den P2X₁-Rezeptor-Antagonismus von NF023 darstellen. Literaturdaten von der Substanz BSt101 (Bültmann et al., 1996b), welche ein an nur einem Naphthalingerüst 3-fach substituiertes also unsymmetrisches NF023-Molekül darstellt, verdeutlicht weiter, dass (i) zwar polyanionische Gruppen - (ii) nicht jedoch die Symmetrie der anionischen SO₃H-Gruppen im NF023-Molekül - eine Voraussetzung für einen P2X₁-Rezeptor-Antagonismus darstellen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von NF803 und NF792 (siehe 8.1) wird deutlich, dass für den P2X₁-Rezeptor-Antagonismus von NF023 exakt 3 Sulfonsäurereste notwendig sind (%-Hemmung: NF023 = 44,0 und NF792 = 6,6; siehe Seite 69). Neben den strukturellen Variationen an NF803, NF824 und NF792 führte auch der Austausch des Naphthalinrings gegen einen Phenylring in NF811 zu keiner Wirksteigerung an nativen P2X₁-Rezeptoren (siehe Kapitel 8.1). Die Methylsubstitution in NF811 könnte einen

zusätzlichen negativen Einfluß auf die P2X₁-antagonistische-Wirkstärke haben, da Elektronen-donierende Substituenten auch bei anderen NF023-Derivaten zu einem Wirkverlust führten (Damer, 2002).

NF279-Analoga. Aus dieser Gruppe werden die Substanzen in den folgenden Abschnitten detailliert diskutiert (siehe 4.1.2). Wegen der begrenzten Verfügbarkeit der Verbindungen NF840 und NF813, sollen diese abschließend schon hier diskutiert werden. **NF840** (siehe Kapitel 8.2) unterscheidet sich stark von bisher untersuchten Strukturen. Im Vergleich zu NF279 wurden in NF840 die Naphthalinringe gegen einen mit einer Sulfonsäure substituierten Phenylring ausgetauscht. Die diesem Phenylring nächste Amidbindung wurde durch eine Sulfonamidbindung und das folgende Benzoylamid-Fragment durch ein Benzimidazol-System als isostere Molekülgruppe ausgetauscht. Die Verbindung NF840 zeigt trotz der z.T. gravierenden Strukturveränderungen vergleichbare pharmakologische Eigenschaften zu NF279 (Damer et al., 1998). NF840 ist wie NF279 P2X₁- vs. P2Y₁-selektiv und potent (Tab. 3.2). Offensichtlich stellen die drei neu eingeführten Teilstrukturen eine bioisostere Alternative dar. Weitere pharmakologische Untersuchungen mit NF840 und -Analoga sind nötig, um diesen Sachverhalt besser zu belegen. Erste Hinweise für die Bedeutung der Sulfonamid-Struktur ergeben sich aus den Daten in Tab. 3.2, wenn man NF840 mit NF835, in welchem die Sulfonamid-Gruppe gegen eine Carbonsäureamidgruppe ausgetauscht wurde, vergleicht. Die Sulfonamidgruppe in NF840 bewirkt eine dramatische Zunahme (um 70 %) der Hemmung P2X₁-vermittelter Kontraktionen des Vas deferens der Ratte. Das schwach wirksame Derivat **NF813** (siehe Kapitel 8.2; Tab. 3.2) entspricht dem NF279, nur dass dieses sowohl an den Stickstoffatomen der Harnstoffkomponente als auch an denen der Amidstrukturen methyliert wurde. Diese Methylierung führt im Vergleich zu NF279 u.a. zu einer starken Einschränkung der freien Drehbarkeit der Amidbindungen des NF813-Moleküls (Müller, 1999). Die pharmakologische Auswertung der Daten belegt, dass die freie Drehbarkeit der Bindungen des NF279-Moleküles offensichtlich eine wichtige Voraussetzung für die P2-Rezeptor-antagonistischen Eigenschaften ist.

4.1.2 Einfluss der Struktur von symmetrischen NF279-Analoga auf die Inhibition der P2X₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum

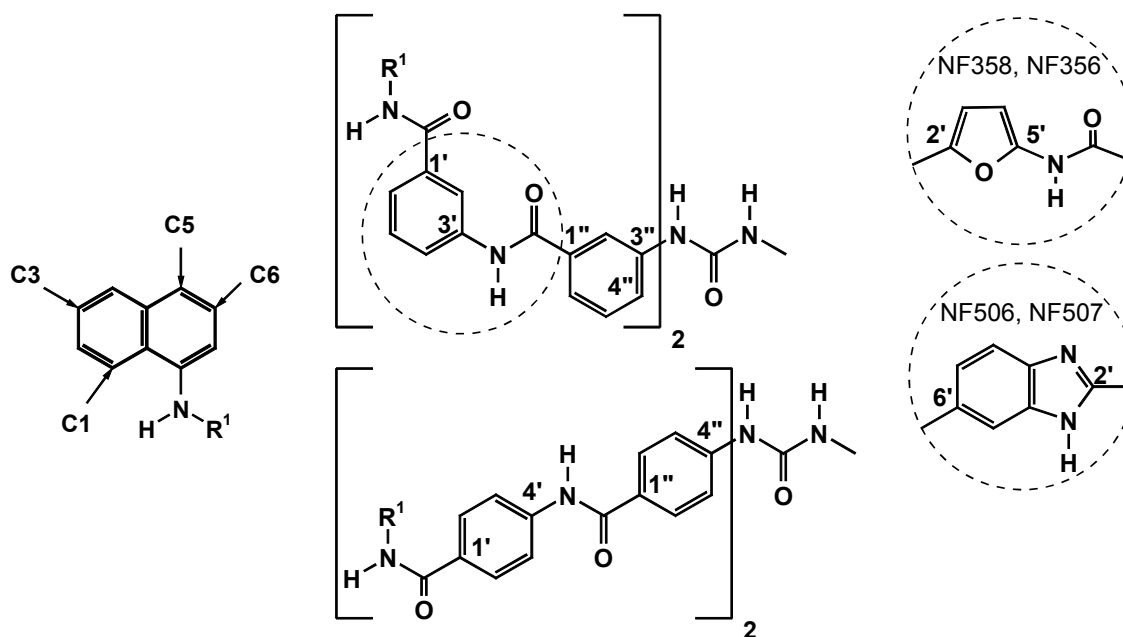


Abb. 4.1 Wichtige Strukturmerkmale von NF-Analoga.

Links: Substitutionsorte (C1, C3, C5 und C6) für Sulfonsäuren im Naphthalingerüst. Rechts: Verknüpfungsvariationen (1'-3', 1''-3'' bzw. 1'-4', 1''-4'') der Benzoylreste zwischen dem Naphthalingerüst (R¹) und der Harnstoffkomponente symmetrischer NF-Analoga, sowie der Austausch der Benzoylamid- gegen Furanylamid- bzw. Benzimidazol-Teilstrukturen.

Wesentliche, pharmakologisch-sensitive Struktur-Parameter der im folgenden diskutierten symmetrischen NF279-Analoga sind:

Die (i) Anzahl und (ii) Position (C1, C3, C5 und C6) der Sulfonsäurereste am NaphthalinGrundgerüst und die Verknüpfung der Benzoylreste (meta = 1'-3', 1''-3'' oder para = 1'-4', 1''-4'').

Betrachtet man zunächst den Einfluss der Anzahl der Sulfonsäurereste am NaphthalinGrundgerüst bei 1'-4', 1''-4''-verknüpften NF279-Analoga wie NF279, NF804, NF798 und NF793 (Tab. 3.2 und Abb. 4.2) auf die pharmakologische Aktivität, so wird deutlich, dass zum einen die P2X₁-antagonistische Wirkstärke (%-Hemmung, P2X₁: N279 = 100 %, NF804 = 43,7 %, NF798 = 43,7 % und NF793 = 13,8 %; siehe Tab. 3.2) gemeinsam mit der Verringerung der Anzahl der Sulfonsäuresubstituenten (N279 = 6, NF804 = 4, NF798 = 4 und NF793 = 2; siehe 8.2) deutlich abnimmt, aber

zum anderen die P2Y₁-antagonistische Wirkstärke mit zwei SO₃H-Gruppen (vier pro Molekül) maximal zu sein scheint. Diese Ergebnisse wurden durch die Ermittlung von IC₅₀-Werten gestützt und erwiesen sich als signifikant (siehe Abb. 4.2). Daraus resultiert, dass bei 1'-4',1''-4''-verknüpften NF279-Analoga ein dreifach mit Sulfonsäuren substituiertes Naphthalingerüst (C1, C3 und C5) für Wechselwirkungen

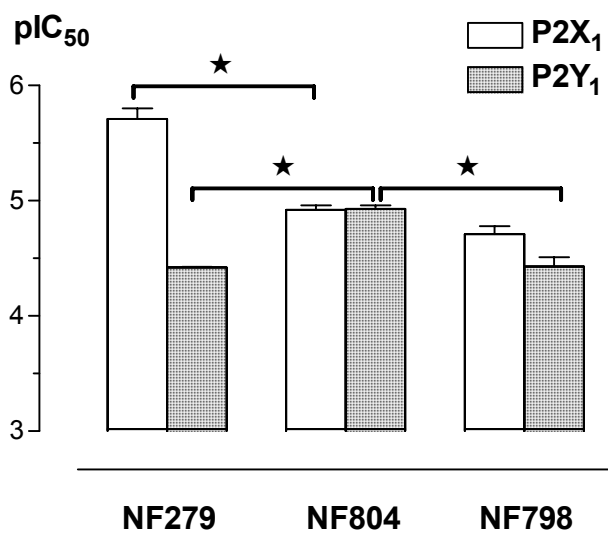


Abb. 4.2 Einfluss der Anzahl und Position (C1, C3, C5) der Sulfonsäuresubstituenten am Naphthalinring 1'-4',1''-4''-verknüpfter NF279-Analoga auf den P2-Antagonismus.

Die pIC₅₀-Werte für NF279 und -Analoga wurden in funktionellen Untersuchungen am Vas deferens der Ratte (P2X₁, helle Balken), sowie am Meerschweinchen-Ileum (P2Y₁, dunkle Balken) erhalten (Tab. 3.5). Die Daten stellen Mittelwerte \pm s.e.m. dar; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch das Symbol \star gekennzeichnet.

mit dem P2X₁-Rezeptor-Protein und ein zweifach substituiertes (an C1 und C5) Naphthalinrundgerüst (NF804) für Wechselwirkungen mit dem P2Y₁-Rezeptorprotein günstiger ist. Aus Untersuchungen von S. Damer (Damer, 2002) ging hervor, dass 1'-4',1''-4''-verknüpfte Benzoylreste eine wichtige strukturelle Voraussetzung innerhalb der symmetrischen NF-Analoga für einen effektiven P2X₁-Antagonismus darstellen. Aus dieser Beobachtung von S. Damer und da aus Abb. 4.2 hervorgeht, dass die Verbindung NF804, welche nur zwei Sulfonsäurereste in Position C1 und C5 am Naphthalinring trägt, eine im Vergleich zu NF279 erhöhte P2Y₁-antagonistische Wirkstärke aufweist, wurde bei dieser Substanz die Verknüpfung der Benzoylreste geändert, um eine weitere Erhöhung des P2Y₁-Antagonismus zu erhalten.

Eine weitere Anregung hierfür erhielten wir aus Untersuchungen die zeigten, dass bei dem Wechsel der Verknüpfung der Benzoylreste von 1'-4',1''-4'' zu 1'-3';1''-3'' auch für Verbindungen, welche an C1, C3 und C6 (NF031, NF551; siehe Kapitel 8.5) der Naphthalinringe mit drei Sulfonsäuren substituiert sind, eine Zunahme der P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke resultierte (Damer et al., 1999; Damer, 2002; Lambrecht et al., 2002). Die Substanz NF816 besitzt das gleiche Substitutionsmuster der Sulfonatgruppen wie NF804 (siehe Abschnitt 8.2), doch ist diese im Gegensatz zu NF804 1'-3';1''-3''-verknüpft. Wie Abb. 4.3 zeigt, gelang es, die P2Y₁-antagonistische

Wirkung durch die Einführung der 1'-3';1"-3"-Verknüpfung in NF816, wesentlich zu erhöhen. Damit wurde unter den NF279-Analoga erstmalig eine wirkstarke ($IC_{50} = 2,4 \mu M$) und selektive ($P2Y_1$ vs. $P2X_1$, Faktor 7) $P2Y_1$ -antagonistische Verbindung mit Hilfe von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt. Im Vergleich zu NF279, besitzt NF816 ein inverses Selektivitätsprofil an $P2X_1$ - und $P2Y_1$ -Rezeptoren (Abb. 4.3). Eine mit NF816 an den $P2Y_1$ -Rezeptoren durchgeführte Schild-Plot-Analyse zeigte, dass es sich um einen kompetitiven Antagonisten mit einem A_2 -Wert von 355 nM handelt (Abb. 3.3 und Abb. 3.4).

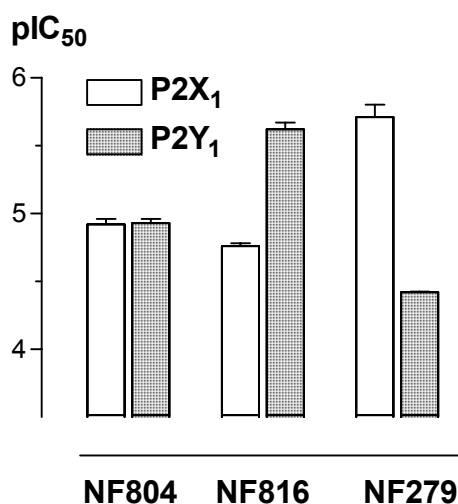


Abb. 4.3 Einfluss der Verknüpfung der Benzoylreste symmetrischer NF279-Analoga auf den $P2$ -Antagonismus.

Wechsel der Verknüpfung in NF804 (1'-4';1"-4"-Verknüpfung) zur 1'-3';1"-3"-Verknüpfung in NF816. Die 1'-4';1"-4"-verknüpfte Verbindung NF279 dient als Vergleichssubstanz. Die pIC_{50} -Werte für NF804, NF816 und NF279 wurden in funktionellen Untersuchungen am Vas deferens der Ratte ($P2X_1$; helle Balken) sowie am Meerschweinchen-Ileum ($P2Y_1$, dunkle Balken) erhalten (Tab. 3.5). Die Daten stellen Mittelwerte \pm s.e.m. dar.

Isostere Verknüpfungsvarianten. Als meta;meta-verknüpft betrachtet werden können die Verbindungen NF356, NF506 und NF507 (siehe 8.2 und Abb. 4.1), bei denen von insgesamt vier die zwei „äußeren“ Benzoylamid-Fragmente gegen zwei heterozyklische Aromaten getauscht wurden. Die jeweiligen Kombinationen Benzoylamid mit den Heterozyklen sind aus den Abbildungen Abb. 4.4 und Abb. 4.5 zu entnehmen. Die Verbindung NF358 nimmt hinsichtlich der Verknüpfung eine Mittelstellung ein, da sie meta;para-verknüpft ist. Alle Substanzen (mit Ausnahme von NF507), die zusätzlich zum Benzoyl-Fragment heterozyklische Fragmente aufweisen, sind Hexasulfonsäuren, die in Position C1, C3 und C6 des Naphthalingerüsts mit Sulfonsäuren substituiert sind. Der Vergleich der antagonistischen Wirkstärke mit dem direkten Analogon NF037, ermittelt an nativen $P2X_1$ -Rezeptoren des Vas deferens der Ratte zeigt, dass die $P2X_1$ -inhibitorische Potenz der Substanzen grundsätzlich nicht durch den Austausch von zwei Benzoylamid-Fragmenten gegen heterozyklische Fragmente vermindert wird. Im Falle der Kombination von Benzimidazol- mit Benzoylamid-Fragmenten scheint die Wirkstärke zuzunehmen (siehe NF506 in Abb. 4.4). Das bedeutet, dass diese chemischen Teilstrukturen eine echte Alternative zu Benzoylamid-Fragmenten

darstellen. Eine ähnliche Tendenz ist beim Vergleich der Substanzen NF507 und NF551 (Damer, 2002: P2X₁, NF551, pIC₅₀ = 4,84 ± 0,07 vs. siehe Tab. 3.5: NF507, pIC₅₀ = 5,02 ± 0,01) zu erkennen.

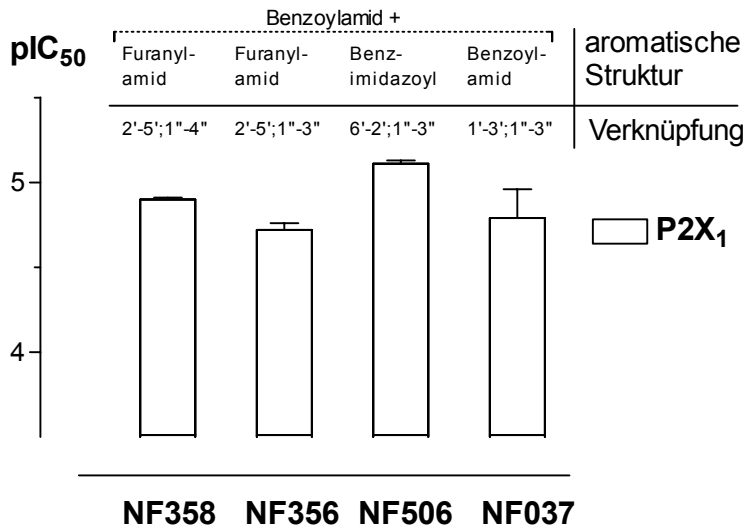


Abb. 4.4 Einfluss von hetero-zyklischen Fragmenten sowie der Verknüpfung auf die P2X₁-antagonistische Potenz.

Die pIC₅₀-Werte für NF358, NF356 und NF506 wurden in funktionellen Untersuchungen am Vas deferens der Ratte erhalten (siehe Tab. 3.5). Der Wert für die Vergleichssubstanz NF037 stammt aus Damer, 2002. Für die Terminologie der Verknüpfungen siehe auch Abb. 4.1. Die Daten stellen Mittelwerte ± s.e.m. dar.

Auch an nativen P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileums wird die inhibitorische Potenz der Verbindungen NF358, NF356, NF506 und NF507 im Vergleich zu Suramin (P2Y₁; GPI-LM; IC₅₀-Wert für NF037: 5,2 ± 0,04, unpublizierte Daten) durch den Austausch von zwei Benzoylamid-Fragmente gegen heterozyklische Aromaten nicht vermindert. Wenn die Verknüpfungen der aromatischen Ringe denen des Suramins isoster entsprechen, lässt sich sogar eine Zunahme der Wirkstärke feststellen. Somit sind diese chemischen Teilstrukturen (Furanylamid bzw. Benzimidazol) auch eine strukturelle Alternative zu Benzoylamid-Fragmenten und sollten für weitere Synthesen berücksichtigt werden (siehe auch Kapitel 4.1.1; NF840).

Für die gesamte Gruppe der in dieser Arbeit untersuchten Vertreter (300 µM) der symmetrischen NF279 Analoga kann aufgrund der geringen Hemmung von Ekto-Nukleotidasen follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten davon ausgegangen werden, dass in den funktionellen Untersuchungen an isolierten Organen keine störenden Einflüsse stattfanden. Bei potenten Analoga existiert eine hohe Rezeptor- vs. Ekto-Nukleotidase-Spezifität (z.B. NF816)

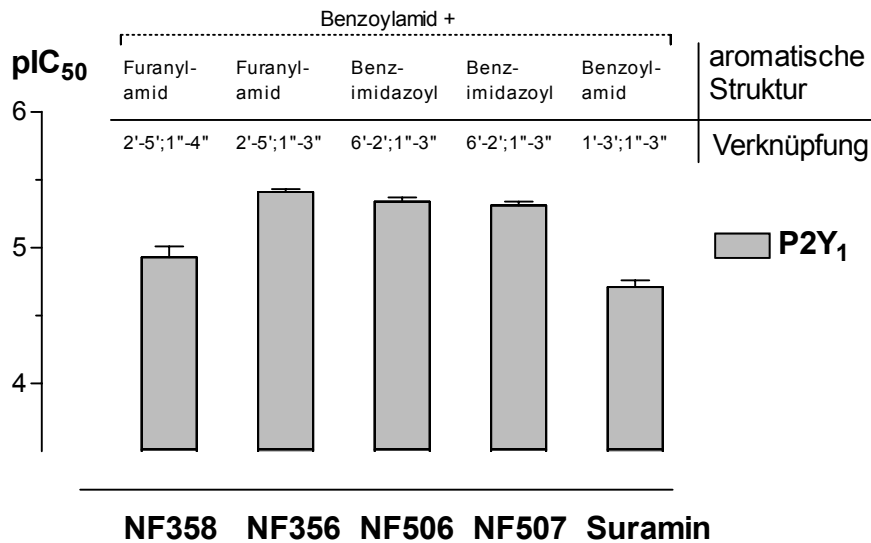


Abb. 4.5 Einfluss von heterozyklischen Fragmenten sowie der Verknüpfung auf die P2Y₁-antagonistische Wirkstärke.

Die pIC₅₀-Werte für NF358, NF356, NF506, NF507 und Suramin wurden in funktionellen Untersuchungen am Meerschweinchen-Ileum erhalten (siehe Tab. 3.5). Für die Terminologie der Verknüpfungen siehe auch Abb. 4.1. Die Daten stellen Mittelwerte \pm s.e.m. dar.

4.1.3 Einfluss der Struktur von unsymmetrischen NF279-Analoga auf die Inhibition der P2X₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum

Ziel der im Folgenden diskutierten Ergebnisse war es, die minimal-notwendige Teilstruktur für die Selektivität und Wirkstärke von NF279 an P2X₁ und P2Y₁-Rezeptoren zu ermitteln. Die im Rahmen dieser Untersuchungen getesteten unsymmetrischen NF279-Analoga sind nach ihrer chemischen Struktur sortiert in Abb. 4.6 (siehe auch Kapitel 8.3) dargestellt. Auf die Darstellung von NF817 in Abb. 4.6 wurde verzichtet, da die Benzoylreste dieses Analogons nicht so wie NF279 (para;para-Verknüpfung) sondern wie Suramin (meta;meta-Verknüpfung) verknüpft sind (siehe NF817; Kapitel 8.3). Ergebnisse aus den Vorversuchen (siehe Tab. 3.3) zeigten eindeutig, dass der Harnstoff des NF279-Monomers (NF784) mit mindestens einem Benzoyl-Rest (NF785, NF787, NF786, NF814 und NF815) substituiert sein muss, um einen meßbaren P2-Antagonismus zu erhalten. Dabei scheint es von keiner großen Bedeutung für den P2X₁-Antagonismus zu sein, ob der terminale Substituent als Carbonsäureester (NF814 und NF786) oder als Arylamid (NF815) vorliegt.

Überraschend ist, dass im Gegensatz zur wirkstarken und P2X₁-selektiven Verbindung NF279 alle anderen Substanzen schwächer P2X₁-antagonistisch, aber wesentlich stärker antagonistisch am P2Y₁-Rezeptor sind (pIC₅₀-Werte: NF786 vs. NF279, Faktor 17, Tab. 3.6).

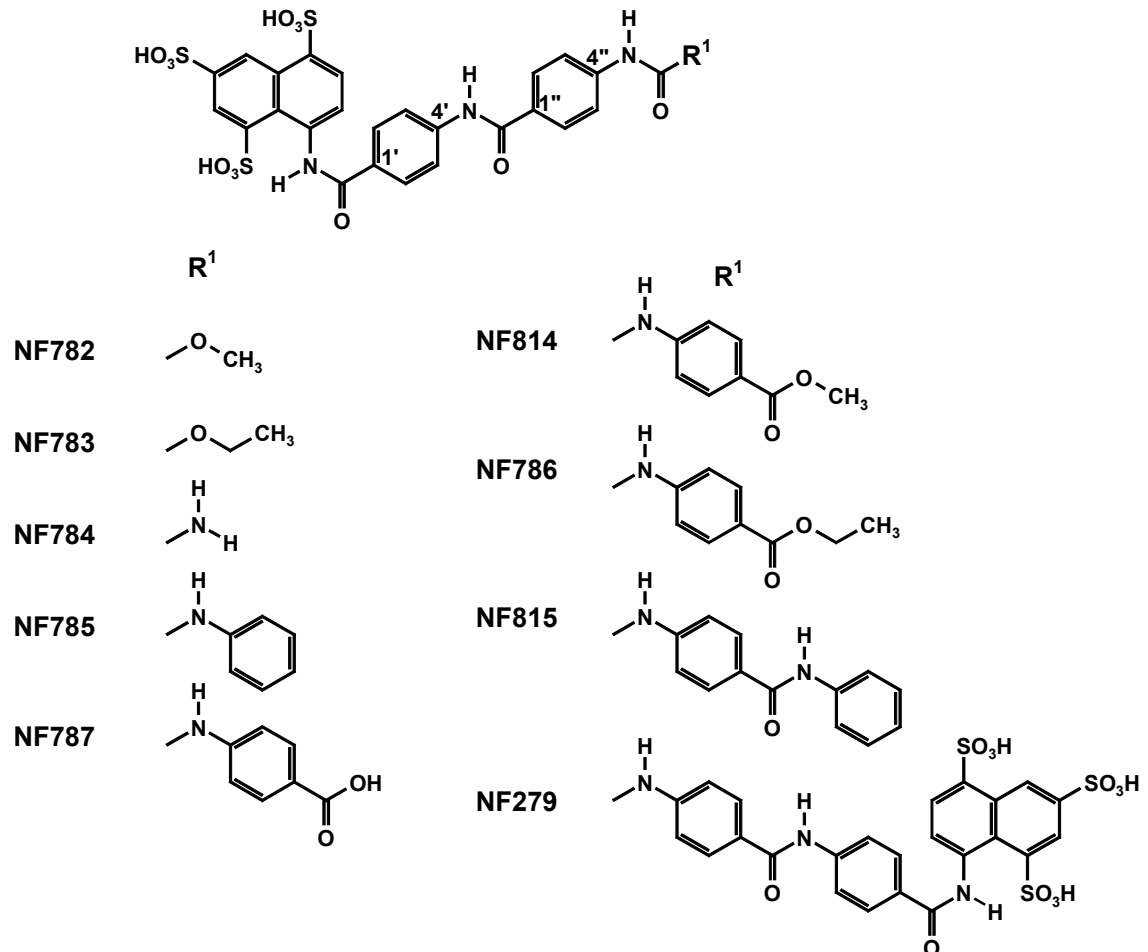


Abb. 4.6 Struktur unsymmetrischer NF279-Analoga und von NF279.

Detaillierte pharmakologische Untersuchungen (pIC₅₀-Werte; siehe Abb.3.3 und Abb. 3.4 sowie Tab. 3.6) von ausgewählten Substanzen bestätigen die niedrige P2X₁- vs. P2Y₁-Rezeptor-Selektivität aus den Voruntersuchungen, auch wenn im Vergleich zu den Dosis-Inhibitions-Kurven am Vas deferens der Ratte (Abb. 3.6) deutliche Unterschiede in der P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke (pIC₅₀ NF786 vs. NF787, Faktor > 144) am Meerschweinchen-Ileum beobachtet wurden. Aufgrund der relativ hohen P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke sowie der praktisch nicht vorhandenen P2X₁- vs. P2Y₁-Selektivität von NF814, NF815 und NF786 wurde die These überprüft, ob der Wechsel der 1'-4', 1''-4''-Verknüpfung der Benzoylreste bei NF786 (siehe Abb. 4.7) zur 1'-3', 1''-3''-Verknüpfung und die Verringerung der Sulfonatgruppen am Naphthalingerüst von drei auf zwei (wie bei NF816 pro Naphthalingerüst) zu einer deutlichen P2Y₁-Selektivität führt. Diese strukturellen Änderungen, die bei

symmetrischen NF279-Analoga zu P2Y₁-wirkstarken und -selektiven Substanzen führte (NF816, siehe 4.1.2), scheiterte bei der Substanz NF817 (siehe Abschnitt 8.3, Tab. 3.3) völlig. NF817 war unerwartet nahezu unwirksam am P2Y₁-Rezeptor des Meerscheinchens-Ileums (Kapitel 3.1.1.3 und Abb. 4.7). Das heißt, Erkenntnisse von symmetrischen NF-Analoga ließen sich nicht ohne weiteres auf unsymmetrische Verbindungen übertragen. Zusammenfassend ist festzustellen: Die pharmakologischen Untersuchungen mit den unsymmetrischen Teilstrukturen von NF279 (chemisch aufbauend von dem NF279-Monomer, NF784, bis zu NF815) zeigen, dass für die hohe Potenz und Selektivität von NF279 an P2X₁-Rezeptoren offensichtlich das komplette symmetrische Molekül notwendig ist. Schon das Fehlen von einem der terminalen, amidierten und sulfatierten Naphthalinringe (NF815) „vernichtet“ die P2X₁-Selektivität von NF279.

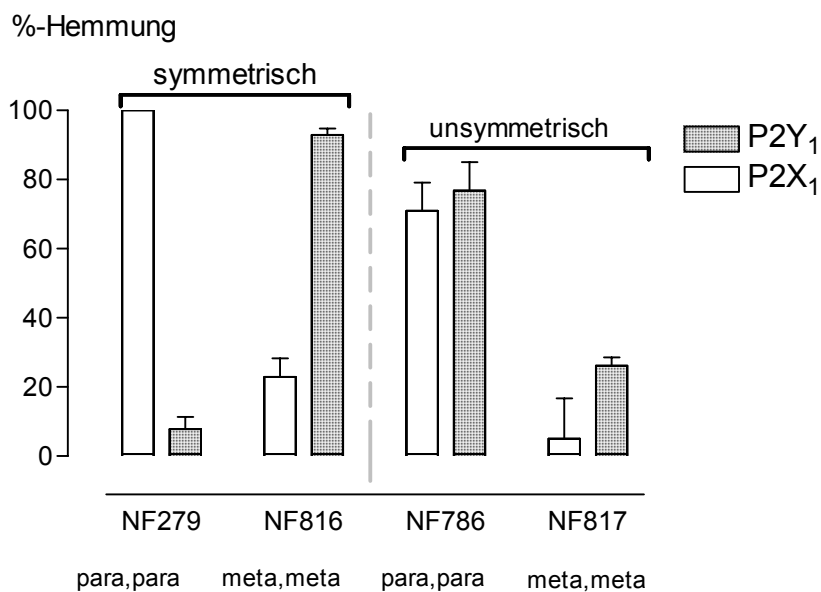


Abb. 4.7 Einfluss derselben chemischen Variationen auf die inhibitorische Wirkstärke von symmetrischen und unsymmetrischen NF279-Analoga.

Sowohl an symmetrischen als auch an unsymmetrischen NF279-Analoga wurden ein und dieselben chemischen Variationen (Wechsel der Verknüpfung von para,para zu meta,meta sowie Substitution der C3-SO₃H-Gruppe in den Naphthalinringen durch ein Wasserstoffatom in NF816 und NF817) vorgenommen und hinsichtlich ihres Einflusses auf die inhibitorische Wirkstärke von NF-Analoga an nativen P2-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte (P2X₁, prostatiscbe Segmente) sowie des Meerscheinchens-Ileums (P2Y₁) vergleichend gegenüber gestellt. Die Daten wurden aus den Tab. 3.2 und Tab. 3.3 entnommen und stellen Mittelwerte ±s.e.m. dar.

So wie symmetrische stellen auch unsymmetrische NF279-Analoga schwache Ekto-Nukleotidase-Hemmstoffe dar. Die P2-Rezeptor- vs. Ekto-Nukleotidase-Spezifität wird maßgeblich durch die Wirkstärke der Substanzen an P2-Rezeptoren bestimmt (z.B. NF786).

4.1.4 Einfluss der Struktur von SB-Analoga auf die Inhibition der P2X₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Vas deferens der Ratte und der P2Y₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum

Die SB-Verbindungen zeichnen sich chemisch u.a. durch die Verknüpfung von Pyridoxal-5'-Phosphat bzw. Pyridoxol-5'-phosphat (SB9_{red}) mit polyanionischen NaphthalinGrundgerüsten aus (Abb. 4.8). Da diese Strukturmerkmale jeweils Teilstrukturen von bereits bekannten P2-Rezeptor-Antagonisten wie PPADS und PPNDS bzw. Suramin-, NF023- und NF279-Analoga darstellen, repräsentieren SB-Analoga heteromere, bivalente Liganden. Auffällig für diese neue Substanzklasse ist das Auftreten einer hohen P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke und P2Y₁-Selektivität im Vergleich zu P2X₁-Rezeptoren (bis zu Faktor 10). Teilstrukturen symmetrischer NF-Analoga wurden mit Pyridoxal-5'-Phosphat über eine Azo-Brücke verbunden. Dabei wurden insbesondere solche Strukturvariationen unter den NF-Analoga berücksichtigt, die als sehr bedeutsam für die P2-Rezeptor-antagonistische Wirkstärke und Selektivität sind (siehe Abschnitt 4.1.2; Lambrecht et al., 2002).

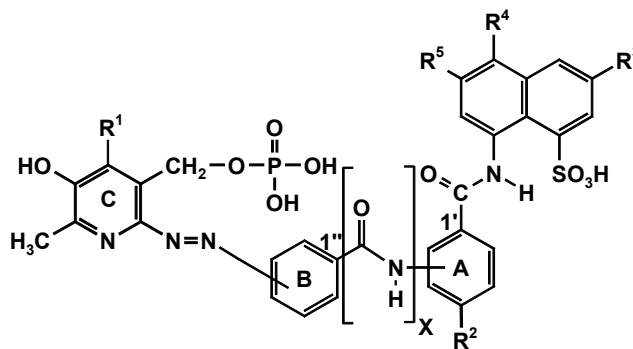


Abb. 4.8 Allgemeine Strukturformel der SB-Analoga.

R¹⁻⁵ stellen Orte struktureller Variationen dar, wobei R¹ eine Aldehyd-Funktion (CHO) oder Hydroxymethyl-gruppe (CH₂OH), R² ein Wasserstoff-atom oder eine Methylgruppe und R³⁻⁵ ein Wasserstoffatom oder ein Sulfonsäure-rest ist. X steht synonym für eine Amid-Verknüpfung oder für eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfung der Ringe A und B (Biphenylstruktur). Bei SB3 und SB5 fehlt der Ring „B“ und die Amidbindung „X“ (siehe 8.4)

Wie bei PPADS (Lambrecht et al., 2002), ist auch die Aldehydgruppe (R¹) bei SB-Analoga von herausragender Bedeutung für die P2X₁-antagonistische Wirkung (SB9 >15-fach SB9_{red}; siehe Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Wahrscheinlich ist die Bildung einer *Schiff*'schen Base zwischen den Lysinresten des P2X-Rezeptor-Proteins und den SB-Analoga verantwortlich für deren Antagonismus (Buell et al., 1996). Aber auch für die Hemmung der P2Y₁-vermittelten Kontraktion des Meerschweinchen-Ileum ist die Aldehydgruppe essentiell. Ihre Reduktion zur CH₂OH-Gruppe, vermindert die inhibitorische Wirkung am P2Y₁-Rezeptor um den Faktor 347 (siehe Abb. 4.10; SB9 vs.

SB9_{red}).

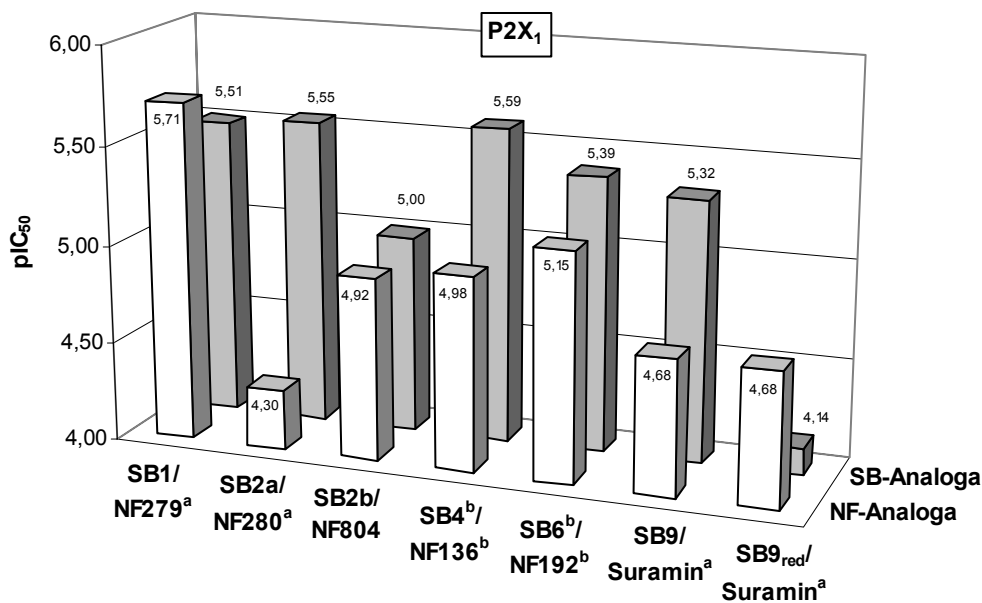


Abb. 4.9 Vergleich der P2X₁-antagonistischen Wirkstärke von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga.

Die Daten wurden aus Kontraktionen des Vas deferens der Ratte, verursacht durch α,β -meATP, ermittelt und stammen aus Tab. 3.5, Tab. 3.7 bzw. aus Damer (2002)^a und Menke (2003)^b. Die pIC₅₀-Werte repräsentieren Mittelwerte. Die Standardfehler der Mittelwerte sind in den Tabellen bzw. in den Quellen angegeben.

Wird die NF279-Teilstruktur mit Pyridoxal-5'-Phosphat gekoppelt, erhält man die Verbindung SB1. Unerwartet resultierte daraus kein wirkstärkeres P2X₁-antagonistisches SB-Analogon, obwohl NF279 deutlich P2X₁-selektiv und wirkstark ist (Damer et al., 1998). SB1 ist sogar schwächer P2X₁-antagonistisch als NF279 (siehe Abb. 4.9). Werden von NF279 die C3-Sulfonsäure-Gruppen durch Wasserstoffatome (R³) substituiert, erhält man eine deutlich schwächer P2X₁-antagonistische Verbindung NF804. Auch die Teilstruktur von NF804, welche mit Pyridoxal-5'-Phosphat gekoppelt wurde (= SB2b), ist ebenfalls schwächer P2X₁-antagonistisch wirksam im Vergleich zu SB1. Offensichtlich ist die Sulfonsäure-Gruppe in Position C3 des Naphthalinringes (siehe Abb. 4.1) ein wichtiger Ort für die Modulation der P2X-antagonistischen Eigenschaften der SB-Analoga. Im Gegensatz dazu scheint die Art der Verknüpfung (SB1, SB2a, SB9: Benzoylamid-Fragmente; SB4 und SB6: Biphenyl-Fragmente) des Pyridin- mit dem Naphthalinring für die P2X₁-antagonistische Wirkung keine bedeutende Rolle zu spielen (siehe Abb. 4.9). Von der Art der Verknüpfung des Pyridin- und Naphthalinringes weitestgehend unberührt ist auch die P2Y₁-antagonistische Wirkstärke (vgl. SB1, SB2a, SB4, SB6 und SB9; siehe Abb. 4.10). Lediglich SB2b und die reduzierte Form des SB9, SB9_{red}, zeigen eine Reduktion der

antagonistischen Wirkstärke an nativen P2Y₁-Rezeptoren. Interessant ist, dass die Substitution der Sulfonsäure-Gruppe in Position C3 des Naphthalinringes durch ein Wasserstoffatom (R³; siehe Abb. 4.8) statt - wie bei den NF-Analoga (NF279 vs. NF804) - zu einer Erhöhung wie schon an nativen P2X₁-Rezeptoren auch an nativen P2Y₁-Rezeptoren zu einer Verminderung der antagonistischen Potenz führte (vgl. SB1 und SB2b in Abb. 4.9 und Abb. 4.10).

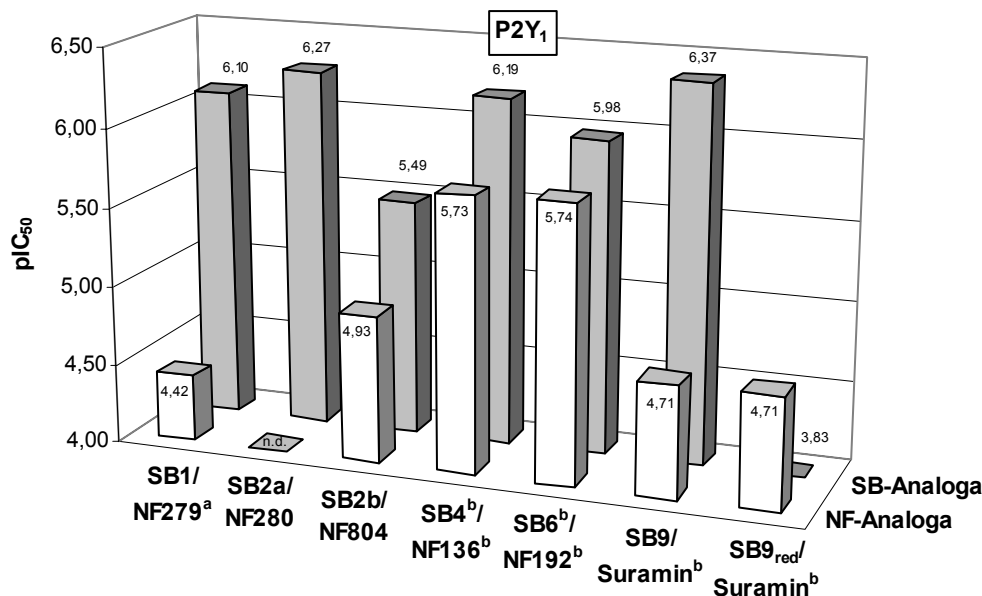


Abb. 4.10 Vergleich der P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga

Die Daten wurden aus Kontraktionen der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileums, verursacht durch ADPβS, ermittelt und stammen aus Tab. 3.5, Tab. 3.7 bzw. aus Damer (2002)^a und Menke (2003)^b. Die pIC₅₀-Werte repräsentieren Mittelwerte. Die Standardfehler der Mittelwerte sind in den Tabellen bzw. in den Quellen angegeben.

Andererseits konnte durch die chemische Verknüpfung von Teilstrukturen schwach P2Y₁-antagonistischer NF-Analoga, wie NF279 und Suramin, mit Pyridoxal-5'-Phosphat die Wirkstärke um ca. Faktor 50 erhöht werden. Umgekehrt konnte mit Teilstrukturen von stark P2Y₁-antagonistischen NF-Analoga, wie NF136 und NF192, keine zusätzliche Steigerung der inhibitorischen Potenz an nativen P2Y₁-Rezeptoren erzielt werden (siehe Kapitel 8.5).

Neben der Aktivität von SB-Analoga an nativen P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren zeigt Abb. 4.12 den Vergleich der Hemmwirkung von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga an Ekto-Nukleotidasen follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten. Die dargestellten Daten verdeutlichen, dass die heteromeren, bivalenten SB-Analoga (300 μM) die Ekto-Nukleotidasen vergleichbar hemmen wie die jeweiligen

NF-Analoga. Damit ist auch bei den SB-Analoga eine Beeinträchtigung der Untersuchungen an nativen P2-Rezeptoren in isolierten Organen durch Wechselwirkung mit Ekto-Nukleotidasen unwahrscheinlich. Die Verbindung SB9_{red} hemmt Ekto-Nukleotidasen schwächer als SB9 (siehe Abb. 4.11). Dies legt den Schluß nahe, dass die Aldehydfunktion einen Anteil an der Inhibition der Ekto-Nukleotidasen hat.

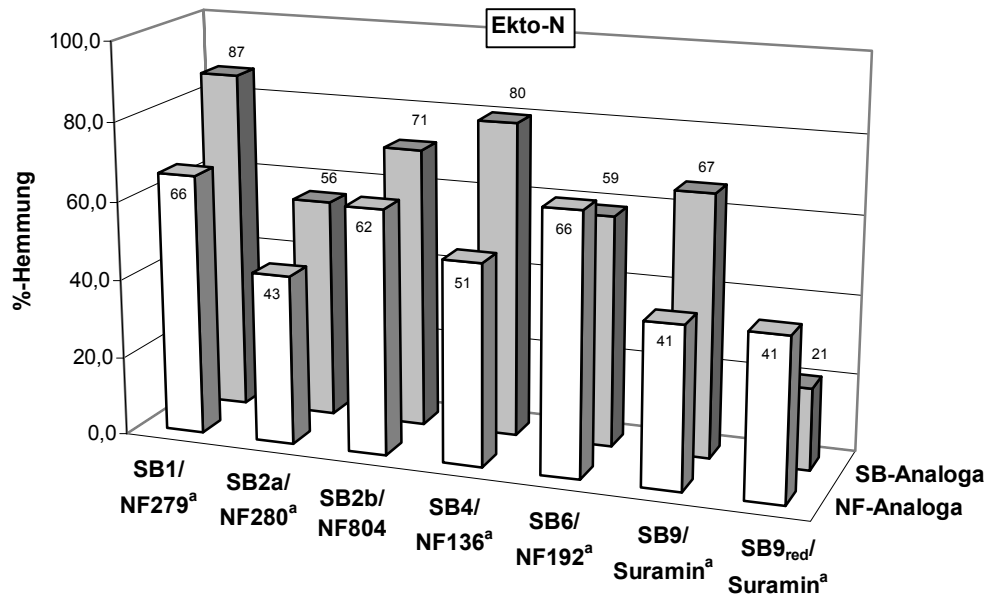


Abb. 4.11 Vergleich der Inhibition von Ekto-Nukleotidasen von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga.

Die Daten wurden aus der Hemmung des ATP-Abbaus durch follikulierte *Xenopus laevis* Oozyten durch Inkubation von 300 μ M der NF- bzw. SB-Analoga ermittelt und stammen aus Tab. 3.5, Tab. 3.7 bzw. aus Damer (2002)^a. Die %-Werte repräsentieren Mittelwerte. Die Standardfehler der Mittelwerte finden sich in den Tabellen bzw. den angegebenen Quellen.

Vergleicht man die Substanzen PPNDS und SB9 miteinander bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkstärke an nativen P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren so ergibt sich ein weiterer, wichtiger Hinweis über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Derivaten des Pyridoxal-5'-Phosphat (siehe dazu Abb. 4.12). Es ist offensichtlich, dass der Abstand des polyanionischen Naphthalinsystems vom Pyridinring entscheidend für die inhibitorische Wirkstärke und P2X₁- vs. P2Y₁-Selektivität ist. Während PPNDS ein potenter und selektiver P2X₁-Rezeptorantagonist ist (Lambrech et al., 2000b), stellt SB9 einen potenten und selektiven P2Y₁-Antagonisten dar. Auch die Analoga SB3 und SB5 (siehe Kapitel 8.4), welche nur im Rahmen des Screenings untersucht wurden und Teilstrukturen von NF023-Analoga darstellen (siehe Daten auf Seite 72), sind so wie SB9 potente und selektive P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten. Demnach kann die Wirkstärke und Selektivität von Pyridoxal-5'-Phosphat-Derivaten mittels geeigneter Spacer (z.B. Benzoylamid-Fragmenten oder Biphenyl-Fragmenten) zwischen dem Pyridin- und dem

Naphthalinring moduliert werden. Ein Benzoylamid-Fragment (vgl. SB5, NF023-analoge Teilstruktur; siehe Kapitel 8.4 und Tab. 3.4) zwischen den zwei pharmakophoren Gruppen (Pyridin- und Naphthalinring) genügt, um das pharmakologische P2-Rezeptor-Profil von PPNDS zu invertieren (siehe Abb. 4.12).

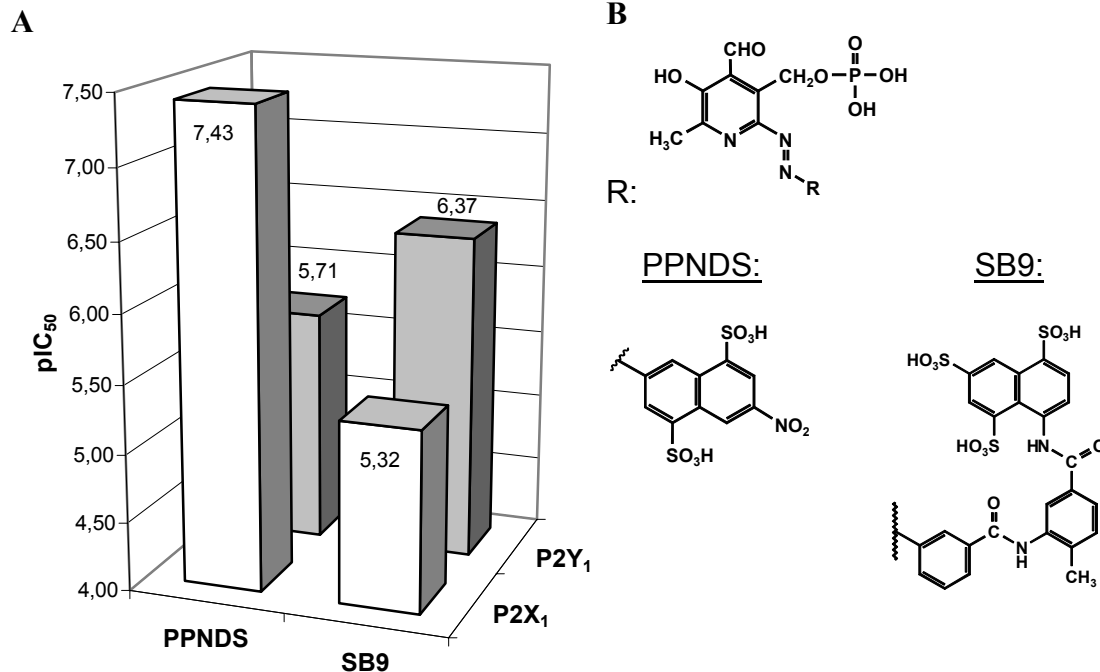


Abb. 4.12 Vergleich der P2-Antagonisten PPNDS und SB9 an nativen P2-Rezeptoren

(A) Die Daten wurden aus Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (P2X₁) bzw. der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileums (P2Y₁), verursacht durch α,β -meATP bzw. ADP β S, ermittelt (siehe Tab. 3.7 und Lambrecht et al, 2002). Die pIC₅₀-Werte repräsentieren Mittelwerte. Die Standardfehler der Mittelwerte sind in den Tabellen bzw. in den Quellen angegeben. (B) Chemische Struktur von PPNDS und SB9.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass SB9 unter den SB-Analoga die potenteste und selektivste Verbindung ist und die Heterodimerisierung bekannter pharmakophorer Gruppen, verbunden mit einer Diazogruppe als Zwischengruppe, auf dem Gebiet der P2-Antagonisten erfolgreich eingesetzt werden kann. Da sich Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF-Analoga nur teilweise auf SB-Analoga übertragen ließen, sind weitere Untersuchungen nötig, um die für die Wirkung der heteromeren, bivalenten Verbindungen essentiellen Strukturen zu ermitteln.

4.2 Der Stellenwert von NF816, NF786 und SB9 als P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten in isolierten Geweben

NF816. Strukturell betrachtet ist NF816 ein Derivat von NF037, dem Desmethyl-Suramin (siehe Kapitel 8.5). NF037 hemmt etwa gleich stark P2X-Rezeptor-vermittelte

Kontraktionen des Samenleiters des Kaninchens sowie die Bindung von $\text{ADP}\beta^{35}\text{S}$ an $\text{P}_{2\text{Y}}$ -Rezeptoren von Thruhan-Erythrozyten-Membranen (Lambrecht et al., 1996a). Im Vergleich zu NF037 fehlt pro Naphthalinring im NF816-Molekül die Sulfonatgruppe in Position C3. Interessanterweise ist NF037 an P_{2Y_1} -Rezeptoren der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum nicht kompetitiv, so dass die Strukturvariation in NF816 eine deutliche Verbesserung für die Art des Wirkmechanismus erbrachte¹¹. Die Disulfonsäure-Naphthylamin-Teilstruktur des NF816 erinnert strukturell entfernt an das Adenosin-3',5'-bisphosphat (A3P5P), welches sich wie NF816 als kompetitiver und P_{2Y_1} -selektive P_2 -Rezeptor-Antagonist erwiesen hat (siehe Abb. 4.13, Boyer et al., 1996, 1998; 2002).

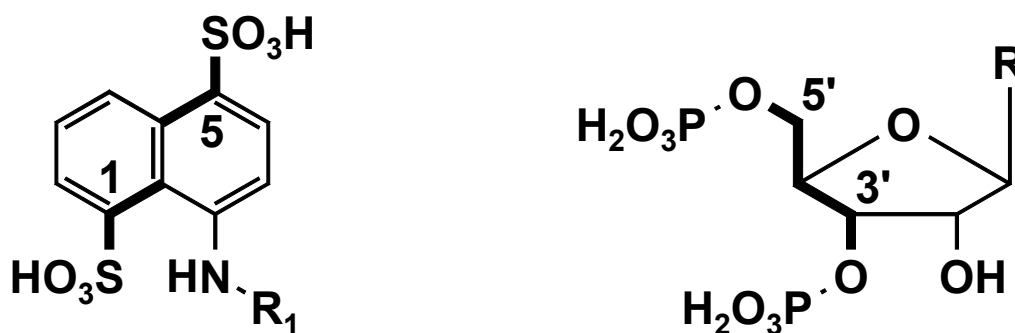


Abb. 4.13 Allgemeine Strukturformeln von Ribose-Bisphosphat- und von Naphthylamin-Disulfonsäure-Derivaten.

Durch die Kombination von zielgerichteter Mutagenese und „Molecular Modelling“ konnten mit Hilfe von A3P5P-Analoga, wie MRS 2179 (Abb. 1.4), sowie PPADS-Analoga Ligand-Bindungsstellen des humanen P_{2Y_1} -Rezeptors bestimmt werden (Moro et al., 1998). Umgekehrt konnte mit Hilfe des Rezeptormodells besser auf die Strukturanforderungen von P_{2Y_1} -Rezeptorenantagonisten geschlossen und die Bisphosphat-Struktur als wichtig bestätigt werden (Nandanan et al., 2000). Mit dem P_{2Y_1} -Rezeptor-Antagonist MRS 2279 (Abb. 1.4) kulminierte die Affinität der Substanzen durch die systematische Strukturoptimierung (Boyer et al., 2002). Unter anderen sind zwei anionische Gruppen im MRS 2179- und PPADS-Molekül für die Bindung am humanen P_{2Y_1} -Rezeptor von Bedeutung (Moro et al., 1998). Für Suramin existieren in diesem Zusammenhang nur vorläufige Untersuchungen (Jacobson et al., 1999), doch könnte NF816 als Suramin-Analogon, auf Grund seiner höheren P_{2Y_1} -Rezeptor-Affinität, besser als Suramin für solche Untersuchungen geeignet sein.

¹¹ Ein ähnlicher Sachverhalt liegt für die Verbindung NF550 vor. Auch bei dieser Substanz nimmt die inhibitorische Wirkstärke mit steigenden Konzentrationen ab. Daten hierzu wurden in Damer (2002) veröffentlicht.

Unter den symmetrischen Suramin-Analoga stellt NF816 eine herausragende Rolle dar. Suramin bzw. NF816 inhibieren konzentrationsabhängig P2X₁-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen des Vas deferens der Ratte, im gleichen Maße (IC₅₀ = 21 µM bzw. 17 µM). Im Gegensatz dazu werden durch ADPβS (10 µM) hervorgerufene und P2Y₁-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum durch NF816 8-fach stärker gehemmt als durch Suramin (Tab. 4.2). Der Antagonismus von NF816 wurde mit Hilfe der Schild-Regression untersucht (Abb. 3.5 Abb. 3.6). Die Schild-Analyse ergab über einen Konzentrationsbereich von 1-30 µM, dass NF816 ein kompetitiver Antagonist am P2Y-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum, mit einem pA₂-Wert von 6,53, ist. Der Vergleich der pA₂-Werte von NF816 mit Suramin ergab für NF816 eine 7-fach höhere Affinität zum P2Y₁-Rezeptorprotein des Meerschweinchen-Ileum. Im Vergleich zu anderen P2Y-Rezeptor-Antagonisten, wie PPADS, zeigte sich, ebenfalls am Ileum des Meerschweinchens, eine vergleichbare inhibitorische Wirkstärke für NF816 (NF816: K_B=0,30 µM vs. PPADS: K_B=0,63 µM).

Tab. 4.1 Inhibitorische Wirkstärke von P2-Antagonisten im Vergleich zu NF816.

Inhibitorische Wirkstärke (IC₅₀- und K_B-Werte) ausgewählter P2-Rezeptor-Antagonisten aus funktionellen Untersuchungen an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum und an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte.

Substanz	P2Y ₁ (µM)		P2X ₁ (µM)		P2X ₁ /P2Y ₁ ^{h)}	
	IC ₅₀	K _B	IC ₅₀	K _B [*]	IC ₅₀	K _B
NF816	2,4	0,30	17,4	-	7,2	-
NF037	6,3 ⁱ⁾	1,5 – 8,3	16,2 ^{a)}	1,5 ^{a)}	2,6	< 1
Suramin	19,5 ^{c)}	2,1 ^{b)}	21 ^{a)}	1,9 ^{a)}	1	1
PPADS	2,2 ^{g)}	0,63 ^{b)}	4,4 ^{a)}	0,26 ^{f)}	-	0,4
MRS 2179	4,3 ^{b)}	0,18 – 0,62 ^{d)}	> 100	-	> 23	-

^{a)} aus (Damer, 2002), ^{b)} aus (Czeche, 2001), ^{c)} persönliche Mitteilung K. Menke, ^{d)} persönliche Mitteilung S. Horner, ^{e)} persönliche Mitteilung B. Niebel/ G. Lambrecht, ^{f)} aus (Lambrecht et al., 2000b), ^{g)} persönliche Mitteilung S. Czeche, ^{*} apparenter pA₂, ^{h)} Aktivitätsquotienten als Maß der Rezeptorselektivität, ⁱ⁾ Ganso, unpublizierte Daten.

Vergleichsweise zu NF816 ist der pseudo-irreversible Antagonismus von PPADS nachteilig (Czeche, 2001). Unter den Nukleotid-Analoga ist MRS 2179 vergleichbar inhibitorisch wirksam am P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum wie NF816 (NF816: K_B = 0,30 µM vs. MRS 2179: K_B = 0,18 – 0,62 µM), wenngleich der Antagonismus von MRS 2179 nicht-kompetitiv zu sein scheint (Horner et al., 2002). Während das Nukleotidanalogen MRS 2179 antagonistisch an rekombinanten rP2X₁-Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus* Oozyten, wirkte [IC₅₀ = 1,2 µM; (Jacobson et al., 1999; Brown et al., 2000)], konnte an P2X₁-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte kein

Antagonismus festgestellt werden (Horner et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz der Daten kann zur Zeit nicht gegeben werden. Abschließend läßt sich feststellen, dass die Substanz MRS 2179 an isolierten Organen P2Y₁-selektiver als NF816 (vgl. Tab. 4.1) ist.

NF786. Viele Antagonisten wie Suramin, NF023, NF279 und NF449 aus der Klasse der Suramin-Analoga sind symmetrische Harnstoffverbindungen mit polyanionisch substituierten Naphthalinringen. Im Gegensatz dazu ist das NF279-Analogon NF786 ein unsymmetrisches Molekül. Der „linke“ Molekülteil von NF786 ist identisch mit dem von NF279, wobei der „rechte“ Harnstoffsubstituent ein N⁴-Ethoxycarbonylphenyl-Rest darstellt. Dieser neue Harnstoffsubstituent führt zu der relativ zu NF279 niedermolekularen (879 statt 1401 g/mol), unsymmetrischen Harnstoffverbindung NF786. Derartige Strukturen wie NF786 sind neu und wurden im Rahmen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF279 synthetisiert. Schon Bültmann und Mitarbeiter zeigten mit der unsymmetrischen Verbindung BSt101 (Bültmann et al., 1996b), dass die Symmetrie bei NF023 keine zwingende Voraussetzung für den P2X-Antagonismus im Vas deferens der Ratte darstellt.

NF279 (0,3 – 3 µM) hemmt Kontraktionen prostaticher Segmente des Vas deferens der Ratte, verursacht durch α,β-meATP (10 µM), konzentrationsabhängig und reversibel [IC₅₀ = 2 µM; (Damer et al., 1998; Lambrecht et al., 1999)]. Wie NF279 hemmt auch NF786 konzentrationsabhängig und reversibel P2X-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen des Vas deferens der Ratte. Im Vergleich waren für die halb-maximale Inhibition der α,β-meATP-bedingten Kontraktion höhere Konzentrationen nötig (IC₅₀ = 7 µM). Untersuchungen über den Einfluss von NF279 auf Dosis-Wirkungs-Kurven von α,β-meATP (0,1 - 300 µM) in prostatichen Segmenten des Samenleiters der Ratte zeigten, dass die mittleren pA₂-Werte von der NF279-Konzentration abhingen und somit eine Kalkulation des pA₂-Wertes nicht möglich war (Lambrecht et al., 1999). Alternativ hierzu wurden apparente pA₂-Werte aus IC₅₀-Werten ermittelt (Cheng und Prusoff, 1973). Bezüglich des Antagonismus von NF786 ergab sich in Vorversuchen ein ähnliches Bild, weswegen eine komplette Analyse nicht durchgeführt wurde (NF786; 10, 30 µM; pK_B = 5,15 ± 0,31, unpublizierte Daten). Die P2X₁-selektive Verbindung NF279 (3 - 300 µM) hemmt P2Y₁-vermittelte Kontraktionen des Meerschweinchen-Ileum, verursacht durch ADPβS (10 µM), dosisabhängig und reversibel [IC₅₀ = 38 µM; (Braun et al., 2001)]. Im Vergleich mit IC₅₀-Daten an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte ergibt sich für NF279 ein Selektivitätsverhältnis P2X₁ vs. P2Y₁

von Faktor 19. Da K_B -Werte geeigneter sind als IC_{50} -Werte Rezeptor-Selektivitäten von Verbindungen zu ermitteln, kann dieser Selektivitäts-Faktor nur als ein Anhaltspunkt für die P2-Rezeptor-Selektivität gelten. Für NF786 (0,3 - 100 μ M; IC_{50} : 2,2 μ M) konnte am Meerschweinchen-Ileum eine stärkere Inhibition der Kontraktionen, verursacht durch ADP β S (10 μ M), beobachtet werden als für NF279 (ca. Faktor 17). Interessant ist, dass NF786 im Screening unselektiv, in pIC_{50} -Studien leicht selektiv und in pA_2 -Studien deutlich selektiv für P2Y₁-Rezeptoren des Ileum ist (vgl. Tab. 3.3. und Tab. 4.2). Diese Befunde bestätigen in eindrucksvoller Weise, dass echte Affinitätsdaten, wie pA_2 - bzw. K_B -Werte, die besten Parameter zur Charakterisierung von Rezeptoren und der Selektivität von Wirkstoffen sind.

Tab. 4.2 Inhibitorische Wirkstärke von P2-Antagonisten im Vergleich zu NF786.

Inhibitorische Wirkstärke (IC_{50} - und K_B -Werte) ausgewählter P2-Rezeptor-Antagonisten aus funktionellen Untersuchungen an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum und an P2X₁-Rezeptoren des Samenleiters der Ratte.

Substanz	P2Y ₁ (μ M)		P2X ₁ (μ M)		P2X ₁ /P2Y ₁ ^{h)}	
	IC_{50}	K_B	IC_{50}	K_B^*	IC_{50}	K_B
NF786	2,2	0,17	7,2	7,0	3,3	24
NF279	38,0 ^{c)}	3,7 ^{a)}	1,9 ^{a)}	0,18 ^{a)}	0,05	0,05
Suramin	19,5 ^{c)}	2,1 ^{b)}	21 ^{a)}	1,9 ^{a)}	1	1
PPADS	2,2 ^{g)}	0,63 ^{b)}	4,4 ^{a)}	0,26 ^{e)}	0,5	0,4
SB9	0,43	0,11	4,8	0,89	11,2	8,5
MRS 2179	4,3 ^{b)}	0,18 – 0,62 ^{d)}	> 100	-	> 23	-
MRS 2279	-	0,009 ^{f)}	-	-	-	-

^{a)} aus (Damer, 2002), ^{b)} aus (Czeche, 2001), ^{c)} Braun et al, 2001, ^{d)} (Horner et al., 2002), ^{e)} aus (Lambrecht et al., 2000a), ^{f)} ADP-induzierte Plättchen-Aggregation aus (Boyer et al., 2002), ^{g)} persönliche Mitteilung S. Czeche, * apparenter K_B , ^{h)} Aktivitätsquotienten als Maß der Rezeptorselektivität

Für beide Substanzen war es möglich pA_2 -Werte am Ileum des Meerschweinchens zu ermitteln (siehe Abb. 3.7 und Abb. 3.8). NF279 (10, 30, 100 μ M) und NF786 (1, 3, 10 μ M) zeichnen sich durch einen kompetitiven und reversiblen P2Y₁-Antagonismus aus. Der Vergleich der pA_2 -Werte zeigt, dass NF786 (K_B = 174 nM) etwa 21-mal potenter an den P2Y₁-Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum bindet als NF279 (K_B = 3,7 μ M). In diesem Fall korreliert das Verhältnis der IC_{50} -Werte (Faktor 17) gut im Vergleich zum Verhältnis der pA_2 -Werte (Faktor 21). Wie NF279 [300 μ M; 66,4 %; (Damer et al., 1998)] hemmte auch NF786 (300 μ M; 53,2 %; siehe Tab. 3.3) in gleichem Ausmaß die Spaltung von ATP durch Ekto-Nukleotidasen in *Xenopus* Oozyten. Damit liegen die Konzentrationen von NF786 zur Hemmung von Ekto-

Nukleotidasen, um den Faktor 43 bis 136 über denjenigen, die für eine halbmaximale P2X₁- bzw. P2Y₁-Rezeptorblockade der jeweiligen Organe nötig sind. Im Vergleich zu NF279 ist NF786 ein potenter P2Y₁-Rezeptor-Antagonist. Die P2-Rezeptor-Selektivität und Rezeptor-Spezifität von NF786 muß in Zukunft näher untersucht werden.

Bemerkenswert ist ein Vergleich mit anderen weitgebräuchlichen P2Y-Rezeptor-Antagonisten wie Suramin, PPADS, SB9, MRS 2179 und MRS 2279. Am Ileum des Meerschweinchens ist NF786 um den Faktor 3,6 wirksamer als PPADS und um Faktor 12 wirksamer als Suramin (K_B-Werte; Lambrecht et al., 2002). Das Nukleotid-Analogon MRS 2179 [0,3 – 30 µM; mittlere pA₂-Werte: 6,21 - 6,75; (Horner et al., 2002)] antagonisierte die ADPβS-Wirkungen am Ileum des Meerschweinchens vergleichbar stark zu NF786 (pA₂-Wert: 6,76; Abb. 3.8). Nur SB9 (pA₂ = 6,98; siehe folgende Seiten; Lambrecht et al., 2000a) war an Ileum-Präparationen des Meerschweinchens geringfügig stärker P2Y₁-antagonistisch wirksam als NF786. Das erst kürzlich vorgestellte MRS 2279 (Boyer et al., 2002) ist ein potenter, kompetitiver und selektiver P2Y₁-Antagonist und hat einen K_D von 9 nM an P2Y₁-Rezeptoren der Thrombozyten des Menschen. Damit ist MRS 2279 an humanen P2Y₁-Rezeptoren ca. 19 mal potenter als NF786 an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum. Vorteilhaft gegenüber PPADS und -Analoga ist bei NF786 das rasche Einsetzen und die Reversibilität der antagonistischen Wirkung.

SB9. SB9 ist ein heteromerer bivalenter Ligand, der im mikromolaren bzw. oberen nanomolaren Bereich an P2X₁-Rezeptoren im Vas deferens der Ratte und P2Y₁-Rezeptoren in der Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum bindet (Abb. 3.13 und Abb. 3.14). Der Antagonismus erscheint spezifisch für P2-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.1.3.3 und Tab. 3.8). SB9 hat eine schwache inhibitorische Wirkung auf die Ekto-Nukleotidasen follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten (IC₅₀ = 40 µM, siehe Abb. 3.16), wobei es unwahrscheinlich ist, dass diese Enzyminhibition einen substanziellen Einfluss auf die funktionellen Untersuchungen hatte. Die in den Abb. 3.13, Abb. 3.14 und Abb. 3.15 präsentierten Daten sprechen dafür, dass SB9 an den P2X₁-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte und an den P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum als kompetitiver Antagonist wirkt. Aber es ist denkbar, dass SB9 an basische Reste von nicht-P2-Proteinen bindet. Dieses gebundene SB9 könnte während der Inkubation als Konkurrenz zur Rezeptor-Kompartiment-Konzentration von SB9 und in der Auswaschphase als Speicher für das Rezeptor-Kompartiment dienen und somit die langsame Kinetik bewirken (Bültmann und Starke, 1995). Diese Vermutung wird

dadurch gestützt, dass der Antagonismus von SB9 gegenüber den verwendeten Agonisten, deren Konzentration im Rezeptor-Kompartiment im Gegensatz zu SB9 diffusionskontrolliert überwindbar war und die Schild-Plot-Analyse für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Experimente mit isolierten Zellen ohne Diffusionsbarrieren sind nötig, um diesen Sachverhalt zu klären. Interessant ist der Vergleich von SB9 mit anderen P2-Antagonisten. Die präsentierten Daten illustrieren, dass SB9 ein hochpotenter Antagonist an P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum ist (Tab. 4.3). Im Gegensatz zu Suramin und PPADS (Tab. 4.3) ist SB9 bemerkenswert P2Y₁-selektiv (etwa Faktor 10). Die hohe inhibitorische Wirkstärke und Rezeptor-Selektivität von SB9 ist einzigartig unter den Suramin- und PPADS-Analoga, über die bislang in der Literatur berichtet wurde (Bültmann et al., 1996b; Kim et al., 1998; Jacobson et al., 1998a, 1998b, 2002; Lambrecht et al., 1999, 2000b, 2002). Bemerkenswert ist weiterhin, dass SB9 die gleiche Wirkstärke und Selektivität für P2Y₁- vs. P2X₁-Rezeptoren wie MRS 2179 an P2Y₁-Rezeptoren in Truthahn-Erythrozyten (pA₂ = 6,99; Boyer et al., 1998) und an in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten rP2X₁-Rezeptoren, (pIC₅₀ = 5,92; Jacobson et al., 1999; Brown et al., 2000), besitzt. Aus der Gruppe der Nukleotid-Antagonisten zeigt MRS 2279 derzeit die höchste Affinität zum humanen P2Y₁-Rezeptor (Boyer et al., 2002; Tab. 4.3). Demnach ist MRS 2279 am hP2Y₁-Rezeptor ca. 10-fach affiner als SB9 zum P2Y₁-Rezeptor des Meerschweinchen-Ileum. Nachteilig für MRS 2279 ist die momentane schlechte Datenlage bezüglich der P2-Rezeptor-Spezifität, seiner Aktivität an P2X-Rezeptoren und der Brauchbarkeit dieser Verbindung in isolierten Geweben.

SB9 zeigt eine verbesserte antagonistische Wirkstärke und P2Y₁-Selektivität im Vergleich zu seinen beiden entsprechenden monomeren Molekülen Pyridoxal-5'-phosphate (P5P) und der Suraminteilstruktur. Bezüglich P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren ist P5P ein nicht-selektiver P2-Antagonist. P5P scheint ein kompetitiver Antagonist an P2X₁-Rezeptoren des Vas deferens des Kaninchens bzw. der Ratte zu sein [pA₂ = 5,20; (Lambrecht, 1996) bzw. pA₂ = 5,33; (Trezise et al., 1994b)]. Effekte, vermittelt durch rekombinante P2X₁-Rezeptoren der Ratte, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, werden ebenfalls durch P5P gehemmt (pIC₅₀ = 5,50; Jacobson et al., 1999). Somit ist P5P an P2X₁-Rezeptoren drei bis sieben mal schwächer antagonistisch wirksam als SB9. Verglichen mit P2Y₁-ähnlichen-Rezeptoren der Aorta des Meerschweinchens [pA₂ = 5,39; (Trezise et al., 1994a)] ist SB9 an diesem Subtyp um den Faktor 39 stärker antagonistisch wirksam als P5P. Die Monomere von Suramin und vergleichbaren

bivalenten homomeren Analoga, wie NF023 und NF279, die in SB9 und seinen Anloga zu finden sind, stellen schwache P2-Rezeptor Antagonisten ($pK_B \leq 4,0$) und Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren dar (Urbanek et al., 1990; Bültmann et al., 1996b; Lambrecht et al., 2000a; Damer, 2002).

Tab. 4.3 Inhibitorische Wirkstärke ausgewählter P2-Antagonisten im Vergleich zu SB9.

Inhibitorische Wirkstärke (IC_{50} - und K_B -Werte) ausgewählter P2-Rezeptor-Antagonisten aus funktionellen Untersuchungen an $P2Y_1$ -Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum und an $P2X_1$ -Rezeptoren des Samenleiters der Ratte.

Substanz	P2Y ₁ (μM)		P2X ₁ (μM)		P2X ₁ /P2Y ₁ ¹⁾	
	IC ₅₀	K _B	IC ₅₀	K _B [*]	IC ₅₀	K _B
SB9	0,43	0,11	4,8	0,89	11,2	8,5
Suramin	19,5 ^{c)}	2,1 ^{b)}	21 ^{a)}	1,9 ^{a)}	1	1
PPADS	2,2 ^{f)}	0,63 ^{b)}	4,4 ^{a)}	0,26 ^{e)}	-	0,4
P5P	-	4,1 ^{h)}	-	1,6-13 ^{g)}	-	1
MRS 2179	4,3 ^{b)}	0,18 – 0,62 ^{d)}	> 100	n.d.	> 23	-
MRS 2279	-	0,009 ⁱ⁾	-	-	-	-

¹⁾Aktivitätsquotienten als Maß der Rezeptorselektivität

^{a)} aus (Damer, 2002), ^{b)} aus (Czeche, 2001), ^{c)} persönliche Mitteilung K. Menke, ^{d)} aus (Horner et al., 2002), ^{e)} aus (Lambrecht et al., 2000b), ^{f)} persönliche Mitteilung S. Czeche, ^{g)} aus (Trezise et al., 1994b), ^{h)} an Meerschweinchen-Aorta aus (Trezise et al., 1994a)b, ⁱ⁾ ADP-induzierte Plättchen-Aggregation aus Boyer (2002), * apparenter pA_2

Verschiedene Hypothesen zur verbesserten Wirkstärke und Selektivität von heterodimeren, bivalenten Liganden, im Vergleich zu ihren Monomeren, wurden aufgestellt (Halazy, 1999; Dean et al., 2001). Vor dem Hintergrund, dass SB9 zwei pharmakophore Gruppen von PPADS und Suramin vereint und für die jeweiligen Monomere ein schwächerer P2-Antagonismus gezeigt wurde, ist es denkbar, dass beide pharmakophoren Gruppen (Monomere) auch zur Bindung von SB9 beitragen. Dieser Gedanke wird durch die Ergebnisse aus den Struktur-Wirkungs-Beziehung gestützt. Die Ergebnisse, die mit SB9 und seinen Analogen erhalten wurden, haben gezeigt, dass die Hetero-Dimerisierung von bekannten pharmakophoren Gruppen ein brauchbarer Ansatz für die Entwicklung von selektiven P2-Rezeptorantagonisten darstellt.

4.3 Kontraktions-vermittelnder P₂-Rezeptor für UTP in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte

Voruntersuchungen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der Versuch unternommen, die erstmals von Bültmann und Mitarbeitern vorgestellte Hypothese, dass die UTP-induzierte Kontraktion des Vas deferens der Ratte vermutlich P₂Y₂-vermittelt sind, zu bestätigen (Bültmann et al., 1999a). Die Wirkung der Verbindung Evans Blau, welche die Aktivität von UTP erhöht, konnte reproduziert werden. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass epididymale Segmente für die Untersuchung UTP-bedingter Kontraktionen des Vas deferens der Ratte geeigneter sind, als prostatiche Segmente (siehe 3.2.1). Die Verwendung von reinem Evans Blau (99 %) an statt des ca. 85 %igen bestätigte, dass die Kontraktions-verstärkende Wirkung auf UTP-induzierte Kontraktionen durch Evans Blau und nicht auf Verunreinigungen beruht. Die UTP-induzierte Kontraktion war während der Anwesenheit von UTP transient und wurde bei mehrmaliger, kumulativer Gabe immer schwächer, was auf eine P_{2U}-Rezeptor-Desensibilisierung hinweisen könnte. Auch rekombinante und native P₂Y₂-Rezeptoren desensibilisieren (Ratanatharathorn et al., 2000; Gutierrez et al., 2000; Velazquez et al., 2000). Halbmaximale Wirkungen konnten mit ca. 30 µM UTP erzielt werden. Damit war eine brauchbare Ausgangssituation für weitere Untersuchungen geschaffen, die im Folgenden näher diskutiert werden.

4.3.1 Mögliche Zielstrukturen von Evans Blau

Evans-Blau-Reinheit. Vergleichende Untersuchungen von 85 %-igem (Sigma) Evans Blau mit 99 %-igem (Tocris) in Abschnitt 3.2.1 führten zu folgenden Ergebnissen: (I) Nicht Verunreinigungen (z.B. Schwermetalle; persönliche Mitteilung P. Nickel und A.W. Frahm) sind an der verstärkenden Wirkung auf UTP-induzierte Kontraktionen des Samenleiters der Ratte beteiligt, sondern Evans Blau selbst. (II) Das 99 %-ige Evans Blau (100 µM) hat eine stärkere Kontraktions-verstärkende Wirkung auf UTP-induzierte Kontraktionen als das 85 %-ige (Abb. 3.19). Diese Ergebnisse führten zur Verwendung von 99 %-igen Evans Blau in den folgenden Untersuchungen.

Kinetik. Durch Inkubation von 100 µM Evans Blau (siehe Abb. 4.14) mit dem Vas deferens der Ratte nahm die Kontraktilität, verursacht durch Einzeldosen von 100 µM UTP, langsam und kontinuierlich zu und nach Abbruch der Inkubation rasch wieder ab.

Diese verhältnismäßig rasche Abnahme der Kontraktilität nach der Inkubation von Evans Blau spricht für einen extrazellulären Effekt von Evans Blau. Auffällig ist die starke Gewebsaffinität dieses Farbstoffes, welche durch eine starke Eiweißbindung erklärt werden kann. Evans Blau (160 μM) bindet an Plasma-Eiweiße aus Ratten zu 68.1 %, wobei die Sulfonsäuresubstituenten für die Wechselwirkung von Evans Blau mit den Proteinen verantwortlich sind (Tsopelas und Sutton, 2002). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Evans Blau in hohem Maße an Proteine isolierter Organe unspezifisch binden kann. Daher kann eine wirksame Depletion dieser Verbindung bei funktionellen Untersuchungen als wahrscheinlich gelten. Betrachtet man die Bindung von Evans Blau an unspezifische Strukturen, wie basische Proteine, als Konkurrenz-Reaktion zu Bindungen von Evans Blau an spezifische Zielstrukturen, wie z.B. P2X-Rezeptoren oder Ekto-Nukleotidasen, dann kann dieser Sachverhalt eine Erklärung für das langsame Einsetzen der Wirkung von Evans Blau auf UTP-bedingte Kontraktionen sein. Wichtig für funktionelle Untersuchungen ist, dass der Kontraktions-verstärkende Effekt von 100 μM Evans Blau auf UTP einer Inkubation bedarf, die nach ca. 120 min im Gleichgewicht zu sein scheint. Auch nach Bültmann und Starke (1993) sowie Eltze und Ulrich (1996) sind mindestens 60 min Inkubation für die volle Wirksamkeit von Evans Blau erforderlich.

P2X₁-Rezeptor-Antagonismus. Evans Blau blockiert P2X₁-Rezeptoren im Vas deferens der Ratte mit einer inhibitorischen Wirkstärke von $K_B = 1,3 \mu\text{M}$ stärker als Suramin (Bültmann und Starke, 1993). Eigene Untersuchungen konnten dies bestätigen. Mit einem IC_{50} von 2,7 μM gegen 1 μM α,β -meATP, ist Evans Blau um den Faktor 3 schwächer als NF279 bzw. 38-mal schwächer als NF449 (Braun et al., 2001). Daraus ergibt sich für die Verwendung von Evans Blau in funktionellen Untersuchungen, dass bei 100 μM die Substanz starke P2X₁-Rezeptor-blockierende Eigenschaften aufweist.

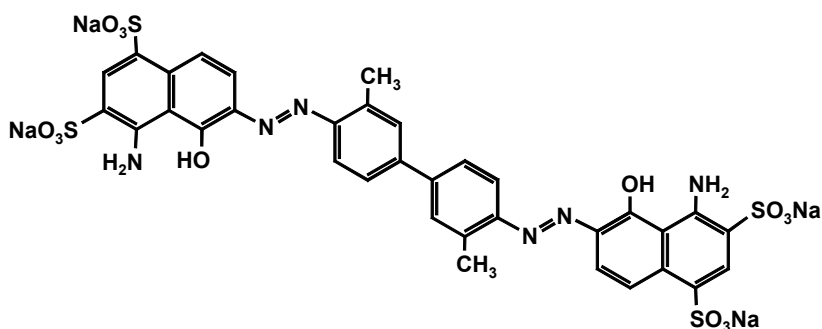


Abb. 4.14 Chemische Strukturformel von Evans Blau.

Ekto-Nukleotidase-Hemmung. In stabil mit ratNTPDase1 (CD39; Ekto-Apyrase) oder ratNTPDase2 (CD39L1; Ekto-ATPase) transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) inhibierte Evans Blau (100 μM) zu 99,8 % die ratNTPDase1 (Heine et al., 1999). Im Vergleich dazu inhibierte Suramin und PPADS die ratNTPDase1 zu 5,4 % bzw. zu 28,3 %. Die ratNTPDase2 wurde durch Evans Blau (100 μM) zu 55 %, durch Suramin zu 45 % und durch PPADS zu 14 % blockiert (Heine et al., 1999). Substratspezifität bezüglich ATP und ADP existieren nicht nur zwischen der NTPDase1 und NTPDase2 sondern auch unter verschiedenen Isoenzymen von Apyrasen aus *Solanum tuberosum* (Traverso-Cori et al., 1997). Untersuchungen der katalytische Spaltung von ATP durch die Kartoffel-Apyrase vom Grad VI ergaben, dass ca. 1 μM Evans Blau genügen, um das Enzym halbmaximal zu hemmen, während die Kartoffelapyrase vom Grad VII erst bei einer Konzentration von ca. 100 μM halbmaximal gehemmt wurde (C. Hildebrandt, persönliche Mitteilung). Für die Hemmung der Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens sind höhere Konzentrationen (100 μM) von Evans Blau nötig (siehe weiter unten im gleichen Kapitel). Dieser Unterschied kann durch das Vorhandensein einer heterogenen Expression verschiedener Ekto-Nukleotidasen erklärt werden (Zimmermann, 2000). Also wäre es denkbar, dass im Falle einer heterogenen Expression von Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte Evans Blau nicht alle Enzyme gleichermaßen hemmt.

Das Vas deferens der Ratte baut ATP (100 μM) mit einer Halbwertszeit von $5,35 \pm 0,5$ min ab, wobei das Hauptabbauprodukt Inosin ist (Park et al., 1998). Dies deutet u.a. auf das Vorhandensein von Ekto-ATPasen, Ekto-ADPasen, der 5'-Ekto-Nukleotidase sowie der Ekto-Adenosindeaminase auf den Oberflächen einzelner Zellen des Vas deferens hin. Mittels der Luciferin-Luciferase-Methode (Driessen und Starke, 1994) konnte für Evans Blau (100 μM) an prostatischen Segmenten des Samenleiters der Ratte eine 69,5 %-Hemmung des ATP-Abbaus (und ähnliche Werte für ADP und 2MeSATP) gezeigt werden (Bültmann et al., 1995). Eigene Untersuchungen an epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte konnten den hemmenden Einfluss (74 %) von 100 μM Evans Blau auch über die Bildung von anorganischem Phosphat aus dem ATP-Abbau belegen (siehe Abb. 3.21). Im Vergleich zu P2-Rezeptor-Standard-Antagonisten wie Suramin (100 μM , 9 %), PPADS (3,2 μM , 9 %) und Reaktiv Blau 2 (32 μM , 11 %) besitzt Evans Blau (100 μM , 88 %) an der Aorta der Ratte eine herausragende Stellung hinsichtlich der Hemmung des UTP-Metabolismus durch Ekto-Nukleotidasen (Hansmann et al., 1997). Somit kann Evans Blau in der

gewählten Konzentration von 100 μM effektiv Ekto-Nukleotidasen, wie z.B. die NTPDase1, inhibieren. Die Daten von exprimierten NTPDasen1/2 [99 % bzw. 55 % Hemmung der ATP-Hydrolyse, (Heine et al., 1999)] mit den Ergebnissen aus Geweben des Samenleiters der Ratte (74 % Hemmung der Phosphatbildung) ergeben eine vergleichbare prozentuale Hemmung für den ATP-Abbau. Evans Blau zeigt keine überdurchschnittliche Hemmung endogener Ekto-Nukleotidasen des Follikel-Epithels von *Xenopus laevis* Oozyten (Ziganshin et al., 1996), im Vergleich zu glatt-muskulären Organen der Ratte. Deshalb könnte die Ekto-Nukleotidase-inhibitorische Wirkung von Evans Blau Spezies-spezifisch und/oder spezifisch für eine bestimmte Ekto-Nukleotidase mit großer Bedeutung für die Modulation der purinerger Regulation glattmuskulärer Organen sein. Aufgrund des Fehlens von K_i -Werten sowie der Ekto-Nukleotidase-Selektivität und -Spezifität von Evans Blau und anderer geeigneter Substanzen ist es nicht möglich, an dieser Stelle auf die exakte Identität der Ekto-Nukleotidase in epididymalen Segmenten des Vas deferens zu schließen.

Nicht-P2-Effekte. Für Evans Blau wurde herausgefunden, dass es kompetitiv die Aufnahme von L-Glutamat in synaptische Vesikel der Ratte mit einem K_i -Wert von rund 40 nM hemmt (Roseth et al., 1995). Neben der wahrscheinlichen Interaktion mit dem Glutamattransporter verweisen die Autoren (Roseth et al., 1995) auf die Möglichkeit, dass Evans Blau das Membranpotential beeinflussen und mit der Mg^{2+} -ATPase wechselwirken könnte. Dieser Wirkmechanismus für Evans Blau kann auf Grund der hohen Affinität auch bei den pharmakologischen Untersuchungen grundsätzlich in Frage kommen. Abgesehen von der polaren Natur und der damit verbundenen schlechten Membranpermeabilität ist die Bedeutung dieser Wirkung von Evans Blau für die vorliegenden Experimente gering, da weder neuronale Strukturen stimuliert wurden, noch die Depletion von Glutamat in synaptische Vesikel einen Einfluss auf postsynaptische Effekte (siehe Abb. 3.22 sowie Kapitel 4.3.2) von exogenem UTP im Vas deferens der Ratte haben. Exogenes L-Glutamat (1 μM – 3 mM) hatte nur einen minimalen Effekt auf Kontraktionen des Vas deferens induziert durch 150 μM ATP (eigene Untersuchungen; Kwan et al., 1996).

Evans Blau beeinflusst auch Ca^{2+} -abhängige „big-conductance“-Kalium-Kanäle (BK-Kanäle). Evans Blau (100 μM) erhöht die Offen-Wahrscheinlichkeit von BK-Kanälen von isolierten Myozyten der Blase des Schafes ohne Beeinflussung einwärtsgerichteter Kalziumionenströme (Hollywood et al., 1998). Diese Arbeitsgruppe beschrieb auch für Reaktiv Blau 2 (RB 2) BK-Kanal-öffnende Eigenschaften. Im

Gegensatz zu dem strukturell nicht verwandten Evans Blau zeigt RB 2 in funktionell-pharmakologischen Untersuchungen keine Kontraktionskraft-steigernden Effekte auf Nukleotide (unpublizierte Daten). Ca^{2+} -abhängige BK-Kalium-Kanäle werden von der glatten Muskulatur exprimiert, durch intrazelluläre Kalzium-Konzentrations-„Spitzen“ aktiviert und dienen im Fall einer Depolarisierung der Hyperpolarisierung der Zelle [siehe (Vogalis, 2000)]. Wenn Evans Blau die Offen-Wahrscheinlichkeit von BK-Kalium-Kanälen erhöht, würde dies im Falle einer Depolarisierung durch Agonisten wie UTP zu einer rascheren (Re-)Hyperpolarisierung führen und damit müsste die Agonist-induzierte Kontraktion tendenziell abgeschwächt werden. Auch im Falle einer dauerhaften Öffnung der BK-Kalium-Kanäle durch Evans Blau müssten die Myozyten im Vas deferens schwieriger durch P2-Agonisten erregbar sein. Die BK-Kalium-Kanal-öffnende Eigenschaft von Evans Blau kann somit keine Erklärung für den Kontraktionskraft-steigernden Einfluss dieser Verbindung auf Nukleotid-bedingte Kontraktionen des Vas deferens der Ratte sein.

In der Zusammenschau der Ergebnisse existieren Belege, dass Evans Blau zahlreiche P2- und Nicht-P2-Wirkungen entfaltet. Deshalb kann festgestellt werden, dass Evans Blau zwar z.T. potent die Ekto-Nukleotidasen hemmt, aber nur mit Limitierungen als pharmakologisches Werkzeug eingesetzt werden kann.

4.3.2 Metabotroper P2-Rezeptor sensitiv für UTP

Erregung postsynaptischer Rezeptoren. Das Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) blockiert selektiv neuronale Spannungs-abhängige Natriumkanäle (Narahashi, 2000). Deshalb eignet sich TTX als wertvolles Hilfsmittel zur Bestimmung der Lokalisation von Rezeptoren auf neuronalen Strukturen. In den Untersuchungen dieser Dissertation hatte 1 μM TTX keinen Einfluss auf die UTP-bedingte (100 μM) Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau (siehe Abb. 3.22). Aus den Ergebnissen lässt sich folgern: (i) In Anwesenheit von 100 μM Evans Blau findet durch Gabe von UTP keine Erregung Aktionspotential-auslösender UTP-sensitiver Rezeptoren auf neuronalen Strukturen statt. (ii) Die UTP-induzierte Kontraktion epididymaler Segmente erfolgte durch die Erregung von postsynaptischen UTP-sensitiven Rezeptoren.

Kalzium als „second messenger“. UTP-sensitive P2-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und aktivieren intrazelluläre Signaltransduktionswege (von Kügelgen und Wetter, 2000). Für die Kontraktion glatter Muskelzellen ist die

Konzentration von intrazellulären Kalziumionen von herausragender Bedeutung. P2Y-Rezeptoren aktivieren u.a. die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern. Die ionotropen P2X-Rezeptoren, welche auch für Kalziumionen permeabel sind, können zur Erhöhung von intrazellulärem Kalzium aus dem extrazellulärem Medium beitragen. Deshalb wurde mit Kalzium-depletierten Nährlösungen versucht, die intrazelluläre Herkunft des Kalziums zu bestimmen. Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass UTP wie Noradrenalin Kalziumionen in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzt (siehe Kapitel 3.2.3). Für die postsynaptischen Wirkungen von Noradrenalin an prostatistischen Segmenten des Vas deferens gilt die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium als gesichert. Dennoch sind die Kontraktionen ausgelöst durch Noradrenalin und UTP nicht unberührt von der extrazellulären Kalziumionenkonzentration - die Kontraktionskraft ist in Abwesenheit von Kalzium vermindert (siehe Abb. 3.23). Dieser Befund kann auf anatomisch-funktionellen Unterschieden zwischen epididymalen und prostatistischen Segmenten basieren.

Eine weitere physiologische Möglichkeit, in den Zellen der glatten Muskulatur den intrazellulären Kalziumspiegel zu erhöhen, besteht durch die Öffnung Spannungs-abhängiger Kalziumkanäle von L-Typ. Nifedipin ($1 \mu\text{M}$), welches diesen Kanaltyp blockiert, wurde 60 min mit epididymalen Segmenten in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ Evans Blau inkubiert und reduzierte die Kontraktion induziert durch $100 \mu\text{M}$ UTP um 93 %. Dies bedeutet, dass für die UTP-induzierte Kontraktion Nifedipin-sensitive, Spannungs-abhängige Kalzium-Kanäle essentiell sind. Die Ergebnisse bezüglich der Kalzium-Depletion hängen stark von der Dauer des Kalzium-Mangels ab. Im Versuch wurde der Nährlösung für 2 min das Kalzium entzogen, bis die Agonistgabe erfolgte. Diese Dauer ist im Vergleich zu der 60minütigen Einwirkzeit von Nifedipin kurzfristig. Man muß davon ausgehen, dass die intrazelluläre Kalziumhomöostase Kompensationsmechanismen unterliegt, welche im Kalzium-Depletionssversuch noch nicht im Gleichgewicht vorlagen. Untersuchungen von Bültmann und Mitarbeitern belegten mittels Kalzium-Depletionsversuchen ebenfalls den intrazellulären Ursprung des Kalziums für Noradrenalin und UTP im prostatistischen Segmenten des Samenleiters der Ratte (Bültmann et al., 1999a). Veröffentlichungen von Dehpour und Mitarbeitern (Dehpour et al., 1995) und Amobi und Smith (Amobi und Smith, 1999) zeigten Unterschiede zwischen der Kontraktilität epididymaler und prostatistischer Segmente des Vas deferens der Ratte, die im Zusammenhang mit der intrazellulären Kalzium-

Homöostase stehen. So vermuteten Amobi und Smith aufgrund ihrer Arbeiten, dass für die Kontraktion induziert durch Noradrenalin in epididymalen Segmenten überwiegend extrazelluläres und in prostatistischen Segmenten sowohl extrazelluläres als auch intrazelluläres Kalzium Voraussetzung ist. Hay und Wadsworth (Hay und Wadsworth, 1983) konnten auch für Noradrenalin in epididymalen Segmenten eine deutliche Reduktion der Noradrenalin-induzierten Kontraktion durch 1 μ M Nifedipin feststellen. Ihre Untersuchungen weisen dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in epididymalen Segmenten lediglich eine Kalzium-puffernde, statt einer Kalzium-speichernden Funktion zu. Auch im Falle der Einzel-Puls-Reizung des Vas deferens der Ratte wurde in epididymalen Segmenten herausgefunden, dass die Reduktion von extrazellulärem Kalzium oder die Gabe von Nifedipin zu einer Hemmung der Kontraktion führte (Dehpour et al., 1995). Nifedipin (1 μ M) reduzierte die neurogene Kontraktion um ca. 40 %. Diese im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen schwache Inhibition der Kontraktion lässt sich auf ATP-gesteuerte, Kalzium-permeable P_{2X}-Rezeptoren zurückführen, die von Nifedipin nicht beeinflusst werden. Im Falle der elektrischen Stimulation kommt es zur Co-Transmission von Noradrenalin und ATP. Letzteres, welches unabhängig von Spannungs-abhängigen Kalzium-Kanälen die Konzentration von Kalziumionen in der Zelle erhöht, ermöglicht somit die Kontraktion. Die Untersuchungen zeigen übereinstimmend mit den Eigenschaften der P_{2U}-Rezeptoren, dass UTP, wie Noradrenalin, intrazelluläres Kalzium mobilisiert.

Inositoltriphosphat als „second messenger“. Eine weitere Eigenschaft von P_{2Y}-Rezeptoren ist es, intrazelluläres Kalzium über die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) zu regulieren. Ein pharmakologisches Werkzeug ist Lithium, welches u.a. die Inositolmonophosphatase (IMPase) hemmt (Hallcher und Sherman, 1980; Berridge et al., 1989). Nach der Inositol-Depletions-Hypothese führt die Inhibition der IMPase durch Lithium (K_i = 0,8 mM) zu einem Verlust der Inositol-Regeneration und damit sekundär zu einer Depletion des Substrates (Phosphatidyl-Inositoldiphosphat, PIP₂) der Phospholipase C (PLC). Die zytoplasmatische Signalkaskade, welche u.a. die Bildung von IP₃ zur Folge hat, wird unterbrochen. Die IP₃-gesteuerte Kalziumerhöhung bleibt aus und es kommt z.B. nicht zur Kontraktion isolierter glattmuskulärer Organe. Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation konnten zeigen, dass UTP in Anwesenheit von 100 μ M Evans Blau Kontraktionen epididymaler Segmente des Vas deferens verursacht, welche durch Lithium (10, 30, 60 μ M) gehemmt wurden. In Kontroll-Experimenten mit α,β -meATP (0,1 – 100 μ M) konnte mit der maximal-

inhibitorisch wirksamen Konzentration von Lithium (60 μM) keine Hemmung der Kontraktion epididymaler Segmente beobachtet werden, da die Aktivierung von P2X_1 -Rezeptoren durch α,β -meATP zum Einstrom von extrazellulärem Kalzium führt. Daraus ergibt sich, dass die Wirkung von Lithium P2Y -spezifisch ist und Kontraktionen, vermittelt durch Ionenkanäle wie P2X -Rezeptoren, nicht inhibiert werden. Allerdings kam es zu einer signifikanten Linksverschiebung der α,β -meATP-Dosis-Wirkungs-Kurve um den Faktor 6,3 an epididymalen Segmenten. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass α,β -meATP an Rezeptoren bindet, welche an eine Lithium-sensitive Signaltransduktion gekoppelt sind und den P2X_1 -vermittelten exzitatorischen Effekt von α,β -meATP, neben den P2X_1 -Rezeptoren inhibieren. Dieses Ergebnis ist unerwartet, wenngleich Hinweise in der Literatur existieren, dass α,β -meATP Ligand an relaxierenden P2 -Rezeptoren der *Taenia coli* des Meerschweinchens (Dudeck et al., 1995; Bültmann et al., 1996a), des *Duodenum* der Ratte (Windscheif et al., 1995), der Ringmuskulatur des Meerschweinchen-Dickdarms (Zagorodnyuk et al., 1996) und des *Pylorus* der Ratte (Ishiguchi et al., 2000) agonistisch wirksam ist. Der verantwortliche P2 -Rezeptor für die α,β -meATP-induzierte Relaxation wurde bislang keinem bekannten P2Y -Rezeptorsubtyp zugeordnet. Storr und Mitarbeiter postulierten, dass die α,β -meATP-induzierte Relaxation der Longitudinal-Muskulatur des Ileum der Ratte P2X -vermittelt sei und erklärt die Relaxation durch einen „Cross-talk“ von P2X -Rezeptoren mit Apamin-sensitiven Kalium-Kanälen (Storr et al., 2000). Denkbar wäre auch für das Vas deferens der Ratte ein ähnlicher „Cross-talk“, welcher zu einer Limitierung der α,β -meATP-induzierten Kontraktion führt. Dieser „Cross-talk“ müsste den eigenen Untersuchungen zufolge Lithium-sensitiv sein. Über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehende Arbeiten sind nötig, um diesen Sachverhalt zu klären. Schließlich bleibt festzustellen, dass UTP exzitatorisch an IP_3 -generierende P2Y -Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte bindet.

Einfluß von UTP-Metaboliten. Metabolite des UTP wie UDP oder Uridin, gebildet durch Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens, könnten einen Einfluss auf die durch UTP-verursachte Kontraktion haben. Beispielsweise ist am humanen P2Y_6 -Rezeptor UDP der potenteste natürliche Agonist (Nicholas et al., 1996). Andererseits wurde bislang, trotz beobachteter biologischer Effekte, noch kein Rezeptor für Uridin beschrieben (Connolly und Duley, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von UDP und Uridin auf die UTP-bedingte Kontraktion in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau an epididymalen Segmenten des Vas deferens untersucht (siehe Abb. 3.27). Zu diesem

Zweck wurde UTP entweder mit UDP oder Uridin in die Nährlösung koappliziert und die Kontraktionskraft gemessen. Es konnte im Vergleich kein additiver oder inhibierender Einfluss der UTP-Metabolite festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen z.B. nicht für das Vorhandensein von UDP-sensitiven P2Y₆-Rezeptoren, da diese ebenfalls mit dem IP₃-Stoffwechsel interagieren (von Kügelgen und Wetter, 2000) und eine Kontraktion verursachen müssten. Uridin hatte ebenfalls keinen Einfluss. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die UTP-bedingte Kontraktion von gleichzeitig gebildeten Abbauprodukten UDP und Uridin beeinflusst wird. Darüber hinaus können mögliche Auswirkungen von Verunreinigungen des kommerziell erhältlichen UTP mit seinen Abbauprodukten wie UDP ausgeschlossen werden.

4.3.3 Charakterisierung des metabotropen P2-Rezeptors mittels P2-Rezeptor-Agonisten

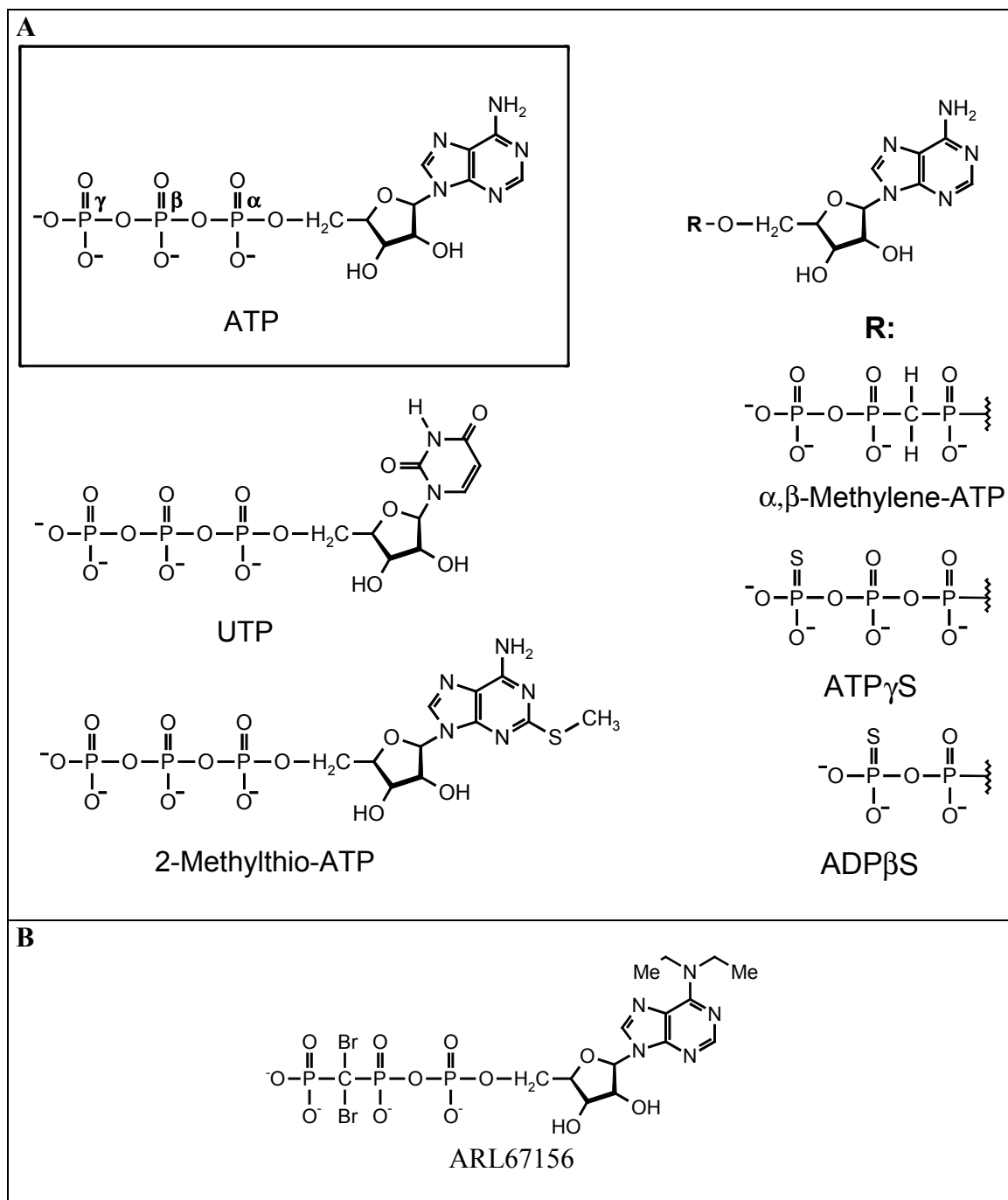


Abb. 4.15 Chemische Struktur ausgewählter Nucleotide.

Teil A: Nucleotide die agonistisch an bestimmten P2-Rezeptoren wirken. Sie zeichnen sich durch eine unterschiedliche Rezeptorselektivität und Ekto-Nucleotidase-Stabilität aus. Teil B: Nucleotid ARL67156 mit geringer Affinität zu P2-Rezeptoren und erhöhter Ekto-Nucleotidase-Hemmung

Da UTP im Beisein - nicht jedoch in Abwesenheit - von Evans Blau (100 μ M) deutliche Kontraktionen an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte induziert und der P2X₁-Rezeptor exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.4.2), kann von einer heterogenen Rezeptorpopulation, bestehend aus P2X₁- und P_{2U}-Rezeptoren, ausgegangen werden.

Das bedeutet, dass auch bei der Ermittlung von Agonist-Wirkstärken im Vas deferens der Ratte nicht-Rezeptor-Subtyp-selektiver Agonisten P2X₁-vermittelte Kontraktionen berücksichtigt werden müssen. Auch das Vorhandensein äußerst effizienter Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte beeinflusst unter Umständen die Agonist-Wirkung und kann somit zu Fehldeutungen führen (Ralevic und Burnstock, 1998). In Anwesenheit von Evans Blau sind Fehlbestimmungen von Wirkstärken von P2X₁-Rezeptor-Agonisten wahrscheinlich, da die Substanz P2X₁-antagonistisch wirkt (siehe Kapitel 4.3.1). Da selbst in Anwesenheit von Evans Blau - also trotz Hemmung von Ekto-Nukleotidasen - UDP in den vorliegenden Studien wenig wirksam war (siehe Abb. 3.29), und UTP, ATP, ADP und 2MeSATP deutliche Wirkungen zeigten, wurde schon an dieser Stelle der P2Y-Rezeptorsubtyp P2Y₆ ausgeschlossen.

Tab. 4.4 EC₅₀-Werte (µM) von endogenen Nukleotiden an klonierten rat/hP2Y₂-, ratP2Y₄-Rezeptoren sowie an P2X₁- und P_{2U}-Rezeptoren des Vas deferens (ratVD) und anderen nativen P_{2U}-Rezeptoren der Ratte.

Agonist	rat/hP2Y ₂ (rekombinant)	ratP2Y ₄ (rekombinant)	P2X ₁ (ratVD)	P _{2U} (ratVD) +Evans Blau	P _{2U} (nativ, Ratte)
ATP	≈0,25 ^{a,b}	0,5 ^g – 1,8 ^{e,f}	>1000,0	29,0	0,0008 ¹ -3,5 ^{2,4,5}
ADP	9,0 ^a , inaktiv (rein) ^c	1,9 (p.A.) ^f , inaktiv (rein) ^{e, g}	>1000,0	25,0	10,0 ¹¹ - inaktiv ^{3,10,12}
UTP	0,08 ^d - 0,2 ^{a,b}	0,2 ^g - 2,6 ^{f, e}	>1000,0	36,0	0,0006 ¹ - 1,0 ^{2,4,5} -16,0 ^{6,9,10}
UDP	16,0 ^a ; 16,5 (unrein) ^b , inaktiv (rein) ^c	4,2 (p.A.) ^f , inaktiv (rein) ^{e,c}	inaktiv	>1000,0	1,0 ⁴ - >100,0 ¹⁰
Ap ₄ A	0,2 ^d - 0,72 ^b	1,2 ^g – inaktiv ^{e, f}	≥100,0	0,79	11,8 ⁷ – inaktiv ⁸

rein/ unrein = Verunreinigung mit ATP oder UTP, p.A. = partieller Agonist

^a ratP2Y₂, 1321N1-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Chen et al., 1996), ^b humaner P2Y₂, 1321N1-Zellen, [³H]InsP-Messungen (Lazarowski et al., 1995), ^c humaner P2Y₂, 1321N1-Zellen, [³H]InsP-Messungen (Nicholas et al., 1996), ^d humaner P2Y₂, 1321N1-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Patel et al., 2001), ^e Jurkat-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Webb et al., 1998), ^f Xenopus laevis Oozyten, Ganz-Zell-Spannungs-Klemme (Bogdanov et al., 1998), ^g 1321N1-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Kennedy et al., 2000),

¹ Relaxation, Arteria mesenterica (Ralevic und Burnstock, 1996), ² Relaxation, Aorta thoracalis (Dol-Gleizes et al., 1999), ³ Kontraktion, Arteria basilaris (Malmsjö et al., 2003), ⁴ Dilatation, Mesenterial-Bett (Buvinic et al., 2002), ⁵ Relaxation, Aorta thoracalis (Hansmann et al., 1997), ⁶ Hinterwurzel-Ganglion (DRG) (Sanada et al., 2002), ⁷ Relaxation, mesenteriale Widerstandgefäße (Steinmetz et al., 2000), ⁸ Relaxation, Arteria mesenterica (Ralevic et al., 1995), ⁹ Kontraktion, Vena mesenterica (Galligan et al., 2001), ¹⁰ Relaxation, Arteria mesenterica (Malmsjö et al., 2000), ¹¹ Zunahme des Perfusionsdrucks, pulmonales Gefäß-Bett (Rubino und Burnstock, 1996), ¹² Aktivierung der Proteinkinase B, renale Mesangium-Zellen (Huwiler et al., 2002).

In Tab. 4.4 ergibt sich in Anwesenheit von 100 μM Evans Blau für epididymale Segmente folgende pEC_{50} -Reihenfolge:

$$\text{Ap}_4\text{A} > \text{ADP} = \text{ATP} = \text{UTP} > \text{UDP}.$$

Der $\text{P}_{2\text{U}}$ -Rezeptor nativer Gewebe der Ratte korrespondiert mit dem rekombinanten $\text{P}2\text{Y}_2$ - bzw. dem $\text{P}2\text{Y}_4$ -Rezeptor der Ratte. Zum Vergleich der Agonist-Wirkstärken wurden EC_{50} -Werte aus der Literatur, die an klonierten h/rat $\text{P}2\text{Y}_2$ - und rat $\text{P}2\text{Y}_4$ -Rezeptoren sowie an nativen $\text{P}_{2\text{U}}$ -Rezeptoren der Ratte ermittelt wurden, in einer Tabelle gegenüber gestellt (siehe dazu Tab. 4.4). EC_{50} -Werte von h $\text{P}2\text{Y}_4$ wurden wegen bekannter Spezies-Unterschiede zwischen Mensch und Ratte nicht in die folgenden Tabellen mit einbezogen (siehe Kapitel 1.1.5).

4.3.3.1 Endogene Nukleotide

ATP, UTP, UDP. Im Vas deferens der Ratte wurden die Nukleosidtriphosphate durch die Anwesenheit von 100 μM Evans Blau ca. um den Faktor 100 wirksamer. Derartige Wirkstärken von Nukleotiden werden an $\text{P}2$ -Rezeptoren isolierter Zellen gemessen, wo Nukleotid-spaltende Ekto-Enzyme eine geringere Rolle als in isolierten Organen spielen. Beispielsweise nimmt die Wirkung von ATP zum $\text{P}2\text{X}_1$ -Rezeptor des Vas deferens stark zu, wenn die Myozyten aus dem Organ isoliert werden (Khakh et al., 1995). Die Untersuchungen an epididymalen Segmenten des Vas deferens konnten weiterhin zeigen, dass ATP gleichermaßen wie UTP stark wirksam am $\text{P}_{2\text{U}}$ -Rezeptor der Ratte ist. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass in epididymalen Segmenten des Vas deferens $\text{P}2\text{Y}_2$ - oder $\text{P}2\text{Y}_4$ -Rezeptoren der Ratte exprimiert werden. Auch die Inaktivität von UDP ist ein indirekter Hinweis für die Beteiligung von $\text{P}2\text{Y}_2$ - oder $\text{P}2\text{Y}_4$ -Rezeptoren an der UTP-induzierten Kontraktion, da diese nicht oder schwach sensitiv für aufgereinigte¹² Nukleosiddiphosphate sind (siehe Tab. 4.4; Lazarowski et al., 1995; Chen et al., 1996; Bogdanov et al., 1998; Webb et al., 1998, Kennedy et al., 2000).

Ein wichtiges pharmakologisches Merkmal für $\text{P}2\text{Y}_{2/4}$ -Rezeptoren ist, dass die Äquipotenz und -Effizienz von ATP und UTP tatsächlich durch den gleichen Rezeptor vermittelt wird. Dazu wurden in dieser Arbeit „Kreuz“-Desensibilisierungs-Versuche durchgeführt (siehe Abb. 3.32), die eindeutig zeigten, dass ATP den UTP-Rezeptor desensibilisiert, jedoch UTP nicht vollständig die ATP-Rezeptoren desensibilisiert. In

Anbetracht der Rezeptorheterogenität im Vas deferens, die besonders für ATP zum Tragen kommt, steht dieses Ergebnis gut im Einklang mit der Hypothese, dass ATP und UTP Liganden an ein und demselben Rezeptor (P2Y₂/P2Y₄) sind. Damit konnte eine wichtige Eigenschaft von P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren der Ratte auch für das Vas deferens ermittelt werden.

ADP. Im Vas deferens der Ratte ist ADP gleich potent wie ATP und UDP in Anwesenheit von Evans Blau (siehe Tab. 4.4). Die Hemmung von Ekto-Nukleotidasen durch Evans Blau könnte wie für ATP und UTP auch für ADP der Grund für die starke Zunahme der Wirkung sein. Eine Voraussetzung für die Zuordnung des UTP-sensitiven Rezeptors im Vas deferens der Ratte zu den P2Y₂- oder P2Y₄-Rezeptoren scheint nicht erfüllt, da das Nukleosiddiphosphat ADP an rekombinanten h/ratP2Y₂- oder ratP2Y₄-Rezeptoren vergleichsweise zu ATP oder UTP schwach bzw. unwirksam war [siehe Tab. 4.4; (Chen et al., 1996, Bogdanov et al., 1998; Webb et al., 1998; Kennedy et al., 2000)]. Die halbmaximale Konzentration für ADP am Vas deferens ist zunächst verwunderlich, da ADP potent an einigen P2Y-Rezeptor-Subtypen aber schwach-wirksam bzw. inaktiv an P2X-Rezeptoren ist (Ralevic und Burnstock, 1998; Jacobson et al., 2002). Ähnliche EC₅₀-Werte wurden für ADP erhalten, wenn glatte Muskelzellen aus Vasa deferentia von Ratten gewonnen und diese mittels der Ganz-Zell-Spannungsklemme untersucht werden (Friel, 1988). Im Vergleich zu Kontraktionsstudien mit isolierten Vasa deferentia der Ratte, in denen ADP inaktiv ist, konnte ADP an den isolierten Muskelzellen, ebenso wie ATP, Suramin-sensitive Einwärtsströme induzieren (Khakh et al., 1995). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Dissertation, da der störende Einfluß von Ekto-Nukleotidasen auf die Untersuchungen in isolierten Muskel-Zellen genauso gering einzustufen ist, wie im intakten Vas deferens in Anwesenheit von Evans Blau als Ekto-Nukleotidase-Hemmer. In anderen Geweben, wie z.B. in isolierten Gefäßen, ist ADP ebenfalls in der Lage eine Kontraktion hervorzurufen. Beispielsweise kontrahiert ADP pulmonale Gefäße der Ratte (EC₅₀ ≥ 10 µM, Rubino und Burnstock, 1996), aber nicht mesenteriale Gefäße der Ratte (Buvinic et al., 2002). Jedoch werden mesenteriale Widerstandsgefäße der Ratte Epithel-unabhängig durch ADP (EC₅₀ = 47,0 µM) kontrahiert (Steinmetz et al., 2000). Weiterhin erhöht ADP intrazelluläres Kalzium in glatten Muskelzellen der *Arteria testicularis* der Ratte (Saino et al., 2002). Leider wurden die kontrahierenden

¹² Die Aufreinigung bezieht sich auf Verunreinigungen von kommerziell erhältlichen Nukleotiddiphosphaten mit Nukleotidtriphosphaten.

Wirkungen von ADP in den oben genannten Arbeiten nicht hinsichtlich eines P2Y-Rezeptors, endogen exprimiert auf glatten Muskelzellen, oder der Verunreinigung von ADP mit ATP geprüft. Messungen von intrazellulärem Kalzium zeigten, dass ADP an rekombinanten, in 1321N1-Zellen exprimierten hP2X₁-Rezeptoren mit einem EC₅₀ von ca. 10 µM bindet (Bianchi et al., 1999). Aber auch die Arbeitsgruppe um Bianchi machte keine Angaben bezüglich einer möglichen Verunreinigung des ADP mit ATP. Grundsätzlich wäre es denkbar, dass ADP via P2X-Rezeptoren Kontraktionen in epididymalen Segmenten des Vas deferens hervorruft, wobei Verunreinigungen mit ATP nicht ausgeschlossen werden können. Wegen der P2X-Rezeptor-Blockade von Evans Blau (100 µM) wäre eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von ADP zu fordern, so dass die wahre agonistische Wirkstärke von ADP am P2X-Rezeptor des Vas deferens der Ratte sogar noch höher als die gemessene sein müsste. Eine noch höhere Wirkstärke als 25µM (Tab. 4.4) für ADP an P2X-Rezeptoren ist nach heutigem Kenntnisstand abzulehnen.

Nicht nur ATP-Verunreinigungen im ADP, sondern auch die Umwandlung von ADP zu ATP durch extrazelluläre Phosphokinasen können eine hohe Wirksamkeit von ADP vortäuschen (Harden et al., 1997; Zimmermann, 2000). Ekto-Nukleotid-Kinasen konnten auf humanen Endothelzellen der *Vena umbilicalis* (Yegutkin et al., 2002), auf Bronchial-Epithel (Picher und Boucher, 2003) und humanen Hepatozyten (Dixon et al., 2003) nachgewiesen werden. Somit könnten Ekto-Nukleotid-Kinasen des Vas deferens aus ADP u.a. ATP generieren und somit die Äqui-Effektivität und Äqui-Potenz von ATP und ADP begründen. Ein weiteres Indiz dafür könnte die im Vergleich zu ADP niedrige Potenz von ADPβS im Vas deferens sein, da es unwahrscheinlich ist, dass dieses ADP-Analogon ein Substrat der Ekto-Nukleotid-Kinasen ist (siehe Tab. 4.5). Denn das Ekto-Nukleotidase-stabile ADPβS müsste erwartungsgemäß mindestens ebenso potent wie ADP in Anwesenheit von Evans Blau sein. Auch eine unterschiedliche Hemmung von ATPasen und ADPasen oder Ekto-Nukleotid-Kinasen durch Evans Blau könnten Gründe für die Wirkstärke von ADP sein (Harden et al., 1997; Heine et al., 1999; Lazarowski et al., 2001; Picher und Boucher, 2003). Weitere Untersuchungen, die über den Rahmen dieser Agoniststudien hinausgehen, sind für die Charakterisierung der ADP-Wirkungen nötig.

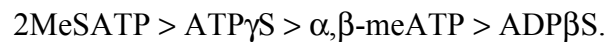
Ap₄A. Ein endogener Ligand von P2-Rezeptoren stellt Ap₄A dar. In Studien von Patel (Patel et al., 2001) an rekombinanten humanen P2Y-Rezeptoren exprimiert in 1321N1-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Ap₄A (HPLC, 99,5 % Reinheit) von den

untersuchten Rezeptorsubtypen (hP2Y₁, hP2Y₂, hP2Y₄, hP2Y₆ und hP2Y₁₁) der P2Y₂-Subtyp am stärksten aktiviert wurde (siehe Tab. 4.4, EC₅₀ = 0,2 µM). Unter der Annahme, dass Ap₄A ein P2Y₂-selektiver Agonist ist, liegt die Vermutung nah, dass es sich bei dem P_{2U}-Rezeptor im Vas deferens um P2Y₂-Rezeptoren handeln könnte. Die P2Y-Rezeptor-Selektivität von Ap₄A an rekombinanten Rezeptoren wäre zur Charakterisierung von nativen P2Y-Rezeptoren in Geweben nützlich, wenn die Befunde über Ap₄A an rekombinanten ratP2Y₄-Rezeptoren in der Literatur nicht widersprüchlich wären. (I) Ap₄A ist ein potenter Agonist des ratP2Y₄-Rezeptor-vermittelten intrazellulären Kalziumanstiegs in 1321N1-Zellen mit einer halbmaximalen Wirkung bei 1,2 µM (Kennedy et al., 2000). (II) Am gleichen Rezeptor-Subtyp, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, ist Ap₄A nahezu gleich potent, aber im Vergleich zu ATP partial-agonistisch (Bogdanov et al., 1998). (III) Ganz im Gegensatz dazu ist Ap₄A unwirksam an ratP2Y₄-Rezeptoren exprimiert in Jurkat-Zellen (Webb et al., 1998). Der ermittelte EC₅₀-Wert (siehe Tab. 4.4, EC₅₀ = 0,79 µM) an P_{2U}-Rezeptoren des Vas deferens ist identisch mit dem von humanen P2Y₂-Rezeptoren exprimiert in 1321N1-Zellen (Lazarowski et al., 1995). Für Ap₄A ist bekannt, dass es äquipotent zu ATP und UTP humane P2Y₂-Rezeptoren aktiviert (Hoyle et al., 2001). Diese Tatsache konnte aber für epididymale Segmente des Vas deferens der Ratte nicht bestätigt werden (siehe Tab. 4.4; EC_{50Ap4A} > 37 – 46mal EC_{50ATP/UTP}).

Ap₄A (oder ein Abbauprodukt des Ap₄A: Ap₄) aktiviert native P2X₁(-ähnliche)-Rezeptoren von Nagern (Westfall et al., 1997b; Lewis et al., 2000; Gabriëls et al., 2002). Ap₄A ist gegenüber Ekto-Nukleotidasen nicht stabil (Westfall et al., 1997b; Verspohl et al., 1999), jedoch stabiler als ATP (Pintor et al., 1996). An rekombinanten P2-Rezeptoren wie P2X₁- und P2Y₂-Rezeptoren ist Ap₄A gleich potent. Somit müsste Ap₄A in nativen Geweben mit einer P2X₁-/P2Y₂-Rezeptorheterogenität beide Rezeptoren aktivieren. Im Falle unterschiedlicher Potenz zu den Kontraktionsvermittelnden P2X₁-/P2Y₂-Rezeptoren müssten die Dosis-Wirkungs-Kurven im Vas deferens biphasisch sein. Dies wurde aber nicht beobachtet (Abb. 3.29). Im Vergleich zu ATP fällt der partielle Agonismus von Ap₄A im Vas Deferens auf. Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Ap₄A eine niedrigere intrinsische Aktivität als ATP hat (Kenakin, 1984). Auch an rekombinanten Rezeptoren liegen Hinweise vor, dass Ap₄A im Vergleich zu ATP ein partieller Agonist an ratP2X₁-Rezeptoren und ein voller Agonist an ratP2X₃-Rezeptoren exprimiert in XLO ist (Wildman et al., 1999).

4.3.3.2 (Partial-)synthetische Nukleotide

Chemisch modifizierte Nukleotide zeichnen sich gegenüber endogenen Verbindungen durch ein verändertes P2-Rezeptor-Selektivitäts-Profil und teilweise auch durch eine größere metabolische Stabilität gegenüber Ekto-Nukleotidasen aus. In Anwesenheit von Evans Blau ergibt sich folgende Aktivitätsreihenfolge synthetischer Nukleotide am Vas deferens der Ratte (Abb. 3.31, Tab. 4.5):



$\alpha,\beta\text{-meATP}$. Dieses synthetische Nukleotid ist ein potenter P2X-Agonist und aktiviert selektiv P2X₁- und P2X₃-Rezeptor-Subtypen ($\text{EC}_{50} = 1 - 10 \mu\text{M}$), an welchen es eine schnelle Desensibilisierung hervorruft. Weniger schnell desensibilisiert das Heteromer P2X_{2/3}, welches ebenfalls von $\alpha,\beta\text{-meATP}$ aktiviert wird. An dem Heteromer P2X_{1/5} ist $\alpha,\beta\text{-meATP}$ ebenfalls mit einem EC_{50} -Wert von ca. $1 \mu\text{M}$ agonistisch wirksam (North, 2002). An P2Y-Rezeptoren ist $\alpha,\beta\text{-meATP}$ nur schwach wirksam oder inaktiv (Lambrecht, 2000; Jacobson und Knutsen, 2001). Das Einfügen einer Methylenbrücke zwischen der alpha- und beta-Phosphatgruppe (siehe Abb. 4.15) bewirkt eine höhere Stabilität gegenüber Ekto-Nukleotidasen im Vergleich zum ATP (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese Stabilität von $\alpha,\beta\text{-meATP}$ ist wahrscheinlich der Grund für die gute Korrelation von Untersuchungen an nativen P2X-Rezeptoren mit der Pharmakologie von $\alpha,\beta\text{-meATP}$ an rekombinanten P2X-Rezeptoren (Lambrecht, 2000). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass $\alpha,\beta\text{-meATP}$ nicht nur metabolisch stabil ist, sondern Ekto-Nukleotidasen boviner Endothelzellen von pulmonalen Arterien inhibiert (Chen und Lin, 1997). Trotz einiger Befunde, dass $\alpha,\beta\text{-meATP}$ z.B. Relaxationen an vorkontrahierten, isolierten, glatt-muskulären Organen hervorruft (Dudeck et al., 1995; Windscheif et al., 1995; Zagorodnyuk et al., 1996; Bültmann et al., 1996a; Steinmetz et al., 2000; Ishiguchi et al., 2000), für die eher ein P2Y- als ein P2X-Rezeptor in Frage käme, gibt es bislang noch keinen eindeutigen Beweis dafür, dass $\alpha,\beta\text{-meATP}$ an P2Y-Rezeptoren bindet (Yu et al., 1999). In Abwesenheit von Evans Blau ist $\alpha,\beta\text{-meATP}$ ein potenter Agonist (siehe Tab. 4.5). Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass $\alpha,\beta\text{-meATP}$ ein potenter Ligand an P2X₁-Rezeptoren in Vasa deferentia von Nagetieren und ein gegenüber Ekto-Nukleotidasen relativ stabiles ATP-Analogon ist (Khakh et al., 1995; Mulryan et al., 2000). In Anwesenheit von Evans Blau ist die Wirkstärke von $\alpha,\beta\text{-meATP}$ erwartungsgemäß erniedrigt, da Evans Blau ein potenter P2X₁-Rezeptor-Antagonist ist (siehe Kapitel 4.3.1 sowie Tab. 4.5).

Tab. 4.5 EC_{50} -Werte (μM) von synthetischen Nukleotiden an klonierten rat/hP2Y₂-, ratP2Y₄-Rezeptoren sowie an P2X₁- und P_{2U}-Rezeptoren des Vas deferens (ratVD) und anderen nativen P_{2U}-Rezeptoren der Ratte.

Agonist	rat/hP2Y ₂ (rekombinant)	ratP2Y ₄ (rekombinant)	P2X ₁ (ratVD)	P _{2U} (ratVD) +Evans Blau	P _{2U} (nativ, Ratte)
α,β -meATP	inaktiv ^{a, b}	inaktiv ^d	7,0	38,5 ¹	0,7 - 32,0 ² ; inaktiv ⁸
2MeSATP	>100 ^{a, b}	2,1 (p.A.) ^c ; inaktiv ^d	$\geq 100,0$	0,24	>10,0 ⁴ ;; 63,0 - 300,0 ² ; inaktiv ^{3, 7, 8}
ATP γ S	1,72 ^b	2,1 (p.A.) ^c	$\geq 80,0$	6,0	8,0 ³ , 1,6 ⁵
ADP β S			54,0	67,0	>100,0 ⁶ ; inaktiv ^{7, 8}

p.A. = partieller Agonist

^a ratP2Y₂, 1321N1-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Chen et al., 1996), ^b humaner P2Y₂, 1321N1-Zellen, [³H]InsP-Messungen (Lazarowski et al., 1995), ^c Xenopus laevis Oozyten, Ganz-Zell-Spannungs-Klemme (Bogdanov et al., 1998), ^d Jurkat-Zellen, intrazelluläre Kalzium-Messungen (Webb et al., 1998),

¹ prostatische Segmente (Bültmann et al., 1995), ² Kontraktion; klein-/großlumige intrapulmonale Arterien (Chootip et al., 2002), ³ PC12-Zellen, [³H]InsP-Messungen (Murrin und Boarder, 1992), ⁴ Kontraktion, Vena mesenterica (Galligan et al., 2001), ⁵ Relaxation, Arteria mesenterica (Malmsjö et al., 2000), ⁶ Kontraktion, Aorta thoracalis (Hansmann et al., 1997), ⁷ Kontraktion, Arteria basilaris (Malmsjö et al., 2003), ⁸ Aktivierung der Proteinkinase B, renale Mesangium-Zellen (Huwiler et al., 2002).

2MeSATP. In Anwesenheit von 100 μM Evans Blau war 2MeSATP der potenteste Agonist am Vas deferens der Ratte und damit im Vergleich ca. 1000 mal wirksamer als ohne Evans Blau (siehe Tab. 4.5). Im Gegensatz zu α,β -meATP ist 2MeSATP ein potenter Agonist an P2X- und P2Y-Rezeptoren (Jacobson und Knutsen, 2001). Die Bedeutung von Ekto-Nukleotidasen für die Verminderung der Aktivität von 2MeSATP konnte durch den Entzug von extrazellulären Ca^{2+} und Mg^{2+} an der glatten Gefäßmuskulatur eindeutig gezeigt werden (Kennedy und Leff, 1995). Bültmann und Kollegen zeigten, dass der Abbau von 2MeSATP mit Evans Blau (100 μM) hemmbar ist (Bültmann et al., 1995). Diese Befunde sind stimmig mit der Überlegung, dass, wenn Ekto-Nukleotidasen inhibiert werden, die Wirkstärke von 2MeSATP höher ist als die von α,β -meATP an nativen P2X-Rezeptoren. In Anbetracht der P2X₁-Rezeptor-Blockade durch 100 μM Evans Blau müsste der wahre EC_{50} -Wert von 2MeSATP am Vas deferens kleiner als 0,24 μM sein (Tab. 4.5). Jedoch konnten Kennedy und Leff bzw. Khakh und Mitarbeiter keine Ionenströme durch P2X₁(-ähnliche)-Rezeptoren in glattmuskulären Zellen unterhalb von 0,1 bzw. 1,0 μM 2MeSATP mehr feststellen (Khakh et al., 1995; Kennedy und Leff, 1995). Die vergleichbaren Wirkstärken von 2MeSATP an funktionellen Untersuchungen am Vas deferens der Ratte in Anwesenheit

von Evans Blau zum einen und an Geweben mit geringer Ekto-Nukleotidase-Aktivität zum anderen, legen die Vermutung nahe, dass 2MeSATP in Anwesenheit von Evans Blau P2X₁-Rezeptoren im Vas deferens aktiviert. Die ähnlich hohe agonistische Wirkstärke von 2MeSATP bei Endothel-abhängigen Gefäß-Relaxationen ist durch die hohe Affinität zu endothelialen P2Y₁-Rezeptoren begründet, welche über die NO-Freisetzung zur Dilatation führen und gemeinsam mit P_{2U}-Rezeptoren eine heterogene P2-Rezeptorpopulation auf Endothelzellen bilden. Aufgrund der Daten von 2MeSATP an klonierten und exprimierten h/ratP2Y₂- und ratP2Y₄-Rezeptoren (siehe Tab. 4.5) kann man folgern, dass 2MeSATP nur endotheliale P2Y₁- aber nicht P_{2U}-Rezeptoren stimuliert. Somit induziert 2MeSATP in erster Linie als selektiver Ligand an nativen P2X-Rezeptoren Kontraktionen im Vas deferens der Ratte.

ATP γ S. Das Thiophosphat-Analogon des ATP, ATP γ S, aktiviert zumeist schwächer als ATP die rekombinanten homomeren Rezeptoren P2X₁₋₆ und die heteromeren Rezeptoren P2X_{2/3} und P2X_{1/5} (Lambrecht, 2000; Jacobson et al., 2002). An rekombinanten P2Y₁-, P2Y₂- P2Y₁₁-Rezeptoren erwies sich die Substanz ebenfalls als potenter Agonist. Sehr schwach wirksam hingegen ist die Substanz an ratP2Y₄- und ratP2Y₆-Rezeptoren (Lambrecht, 2000). Untersuchungen mit ATP γ S an nativen P2 Rezeptoren stimmen in der Regel gut mit den Ergebnissen von rekombinanten Rezeptoren überein. Dies könnte darin begründet sein, dass ATP γ S kein Substrat für Ekto-Nukleotidasen darstellt und diese Enzyme in mikromolaren Konzentrationen kompetitiv hemmt (Welford et al., 1986; Chen und Lin, 1997; Jacobson und Knutsen, 2001; Jacobson et al., 2002). Diese Eigenschaften machen ATP γ S zu einem nützlichen Instrument für den Gebrauch als P2-Agonist in isolierten Geweben. Der Vergleich der Wirkstärke von ATP γ S mit anderen Nukleotiden in Tab. 4.5 zeigt Überraschendes. Ohne Evans Blau ist ATP γ S etwas schwächer wirksam als ADP β S aber deutlich weniger wirksam als α,β -meATP am isolierten Samenleiter der Ratte. Eine derartige Konstellation der Aktivitäten für diese Nukleotide konnte bislang an rekombinanten P2X-Rezeptoren nur für das Homomer P2X₁ gezeigt werden (Jacobson et al., 2002). Allerdings sieht die Situation in Anwesenheit von 100 μ M Evans Blau, welches P2X₁-Rezeptoren blockiert und Ekto-Nukleotidasen hemmt, anders aus. In Anwesenheit von Evans Blau ist ATP γ S potenter als α,β -meATP und ADP β S. Diese Reihenfolge der Agonist-Wirkstärke könnte, verglichen mit Aktivitäten an rekombinanten Rezeptoren, auf den P2X₃-Rezeptor oder, bezüglich einer P2X/P_{2U}-Rezeptorheterogenität, den P2Y₂-Rezeptor, an welchen ATP γ S affin bindet (siehe Tab. 4.5), hinweisen. Merkwürdig ist,

dass die Dosis-Wirkungs-Kurve von ATP γ S durch Evans Blau ca. um den Faktor 10 nach links verschoben wurde (siehe Abb. 3.30 sowie Abb. 3.31) obwohl (I) ATP γ S im Allgemeinen gegenüber Ekto-Nukleotidasen als metabolisch stabil gilt und (II) Evans Blau ein P2X₁-Rezeptor-Antagonist ist. Wenn ATP γ S metabolisch völlig stabil ist und den P2X₁-Rezeptor aktiviert, müsste wegen des P2X-Antagonismus von Evans Blau eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, wie dies für α,β -meATP der Fall ist, resultieren. Die Linksverschiebung kann durch folgende Möglichkeiten erklärt werden: (I) Falls ATP γ S im Vas deferens gespalten werden kann, was im innervierten *Musculus sartorius* des Frosches gezeigt werden konnte (Cascalheira und Sebastiao, 1992), müsste sich wegen der Ekto-Nukleotidase-Hemmung von Evans Blau die Dosis-Wirkungs-Kurve - wie das in den Experimenten der Fall war - nach links verschieben, wie z.B. bei ATP, Ap₄A oder 2MeSATP. (II) Es wäre denkbar, dass die Inhibition der Ekto-Nukleotidasen durch Evans Blau und zusätzlich durch ATP γ S sich addieren und sich somit eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt.

ATP γ S aktiviert rekombinante humane P2Y₂-, aber nicht P2Y₄-Rezeptoren der Ratte, mit einer Potenz sehr ähnlich zu den Ergebnissen in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte [siehe Tab. 4.5; (Murrin und Boarder, 1992; Lazarowski et al., 1995)].

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass ATP γ S nur eine relative Stabilität gegenüber Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte besitzt und durch die Blockade von P2X₁-Rezeptoren sowie der zusätzlichen Inhibition der Ekto-Nukleotidasen durch Evans Blau weitestgehend selektiv einen P2Y₂(-ähnlichen)-Rezeptor aktiviert.

ADP β S. Auffällig für ADP β S sind die ähnlichen Wirkstärken im Vas deferens unabhängig davon, ob Evans Blau inkubiert wurde oder nicht. Dieses Ergebnis zeigt, dass ADP β S zum einen relativ stabil gegenüber Ekto-Nukleotidasen ist und zum anderen seine Wirkungen womöglich nicht über P2X₁(-ähnliche)-Rezeptoren vermittelt. Allerdings ist die Potenz von ADP β S mit EC₅₀-Werten von 54 - 67 μ M in einem Bereich, in welchem ADP β S nicht mehr als selektiver Agonist gelten kann (Guile et al., 2001). Beispielsweise konnten an rekombinanten hP2X₁-, h/ratP2X₃-; hP2X₄-Rezeptoren EC₅₀-Werte für ADP β S zwischen 2,5 – 25 μ M ermittelt werden, während andere P2X-Rezeptoren nicht aktiviert wurden (Bianchi et al., 1999). ADP β S-induzierte Kontraktionen konnten auch in Vasa-deferentia-Präparationen des Meerschweinchens

(Bailey und Hourani, 1995) und des Kaninchens gezeigt werden (G. Lambrecht, persönliche Mitteilung). In epididymalen Segmenten der Ratte konnte gezeigt werden, dass ADP β S kumulativ appliziert werden kann und die Kontraktionen weder durch maximale Konzentrationen von P2X₁-Rezeptor-Antagonisten wie NF449 (10 μ M), NF279 (30 μ M), NF023 (300 μ M) und Suramin (100 μ M) noch durch P2Y₁-Rezeptor-Antagonisten wie MRS 2179 (100 μ M) zu hemmen waren [(Damer, 2002) sowie eigene Untersuchungen]. Eine Kreuz-Desensibilisierung von ADP β S und UTP bestand in Anwesenheit von Evans Blau nicht (Daten nicht gezeigt). Das legt für die Charakterisierung des P_{2U}-Rezeptors den wichtigen Schluss nahe, dass ADP β S weder über P2X₁-, P2Y₁- noch über P_{2U}-Rezeptoren im Vas deferens Kontraktionen vermittelt. Damer (2002) schließt die Beteiligung von anderen P2X-Rezeptoren an der ADP β S-induzierten Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte nicht aus. Diese Vermutung kann durch die Beobachtung, dass die gleichzeitige Inkubation von 100 μ M Evans Blau und 100 μ M α,β -meATP die Dosis-Wirkungs-Kurve von ADP β S deutlich um den Faktor 10 nach rechts verschoben ist, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Unterschiede zwischen prostatistischen und epididymalen Segmenten deuten darauf hin, dass α,β -meATP-induzierte Kontraktionen weniger schnell in epididymalen Segmenten desensibilisieren. Die Eigenschaften wie Aktivierung durch α,β -meATP und langsame Desensibilisierung lassen das Vorkommen eines heteromeren P2X-Rezeptors vermuten. Vergleichsweise zum P2X₁- und P2X₃- desensibilisieren die P2X_{2/3}- und P2X_{1/5}-Rezeptoren nach Aktivierung durch α,β -meATP deutlich langsamer (North, 2002). Leider konnte im Zusammenhang mit der Aktivitätsreihenfolge verschiedener Agonisten die Frage nach dem P2X-Rezeptor-Subtyp nicht beantwortet werden, zumal die Wirkung des P2-Agonisten ADP β S an rekombinanten heteromeren P2X-Rezeptoren unbekannt ist.

Es ergeben sich aus der Analyse der einzelnen Agonisten folgende offene Fragen: Wieso ist ATP in Anwesenheit von Evans Blau etwa um den Faktor 100 weniger potent als 2MeSATP, obwohl an homomeren rekombinanten P2X-Rezeptoren ein derartiges Verhältnis noch nicht beschrieben wurde? Das gleiche gilt für Ap₄A, welches ca. um Faktor 37 potenter ist als ATP. Eine Erklärung ergibt sich unter Umständen aus der unterschiedlich ausgeprägten Hemmung der verschiedenen Ekto-Nukleotidasen durch Evans Blau (Heine et al., 1999) sowie aus den unterschiedlichen Substrateigenschaften von Nukleotiden wie ATP, UTP, Ap₄A und 2MeSATP für Ekto-Nukleotidasen. Folgende Faktoren bestimmen an isolierten Geweben die

Aktivitätsreihenfolge von P2-Agonisten: (I) die Rezeptorselektivität der Agonisten, (II) die P2-Rezeptorheterogenität und (III) Ekto-Nukleotidase-Diversität des Gewebes, sowie die Substratspezifität der Ekto-Nukleotidasen.

Tab. 4.6 Aktivitätsreihenfolge und hypothetische Zielstrukturen von Nukleotiden in Anwesenheit von Evans Blau.

Aktivitätsparameter (EC_{50} -Werte in μM) von diversen Agonisten an epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte in Gegenwart von 100 μM Evans Blau.

Zielstruktur	2MeSATP	AP ₄ A	ATP γ S	ADP	ATP	UTP	α,β -meATP	ADP β S	UDP
P2X ₁	0,24	0,79	n.d.	25	29	-	38,5	67	>1000
P2Y ₂	-	0,79(?)	6	-	29	36	-	-	>1000
Ekto-N	S	S	I	S	S	S	I(?)	I(?)	S

Ekto-N = Ekto-Nukleotidase, S = Substrat, I = Inhibitor; - = keine Aktivität, n.d. = nicht bestimmt

Diese komplexe Pharmakologie schlägt sich in der Reihenfolge (siehe Tab. 4.6) der Aktivitäten der getesteten Agonisten mit Evans Blau nieder. Für die Nukleosidtriphosphate wie ATP und UTP existieren mit großer Wahrscheinlichkeit alternative Ekto-Nukleotidasen, welche nicht durch Evans Blau gehemmt werden, weswegen die ermittelte Aktivität dieser Agonisten scheinbar zu niedrig sein könnte. Dagegen besitzt ATP γ S zusätzliche ATPase-hemmende Eigenschaften und könnte deshalb potenter sein.

Zusammenfassend sprechen die Befunde aus den Studien mit P2-Rezeptoragonisten für (I) eine P2-Rezeptorheterogenität bestehend aus P2X₁- und P2U-Rezeptoren, (II) die Anwesenheit von UTP-sensitiven P2Y₂- und/oder P2Y₄-Rezeptoren. Die Wirksamkeit von ATP γ S und Ap₄A am Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von Evans Blau schließt die Expression von Kontraktions-vermittelnden P2Y₂-Rezeptoren im Besonderen ein, da diese Agonisten nicht oder nur schwach P2Y₄-Rezeptoren aktivieren (siehe Tab. 4.4, Tab. 4.5).

4.3.4 Charakterisierung des metabotropen UTP-Rezeptors mittels P₂-Rezeptor-Antagonisten

Selektive und spezifische Rezeptor-Antagonisten in Verbindung mit der Schild-Plot-Analyse eignen sich am besten zur funktionellen Klassifizierung von Rezeptoren. Die durch den Einsatz verschiedener Antagonisten erhaltene Aktivitätsreihenfolge gibt einen Anhaltspunkt für den Rezeptor-Subtyp. Leider konnten aufgrund des Mangels an potenten und Subtyp-selektiven P_{2U}-Rezeptor-Antagonisten keine Schild-Plot-Analysen vorgenommen werden, so dass die inhibitorische Wirkstärke mit IC₅₀-Werten quantifiziert wurde (siehe Kapitel 2.4.1.3). Entscheidend für die Bestimmung der inhibitorischen Wirkstärke ist, dass der Antagonist mit dem Rezeptor im Gleichgewicht vorliegt. Dieser Zustand wird bei einer 60minütigen Inkubation (wie in dieser Arbeit) des Antagonisten angenommen (Kenakin, 1980a).

Auch das Vorliegen einer heterogenen Rezeptorpopulation ist bei Untersuchungen mit Antagonisten von Bedeutung. Fehlbestimmungen von Antagonist-Wirkstärken durch heterogene Rezeptorpopulationen im Gewebe können durch die geeignete Wahl des Agonisten unter Umständen vermieden werden. Im Vergleich zu ATP stellt UTP einen geeigneteren Agonisten für Untersuchungen mit Antagonisten dar, da ATP zusätzlich neben dem möglichen P_{2U}- auch den P_{2X}₁-Rezeptor im Vas deferens der Ratte aktiviert. Erschwerend auf die Ermittlung der Agonist-Wirkstärke wirken sich hemmende Effekte der Antagonisten bezüglich der Ekto-Nukleotidasen aus. Hier kann es bei der Verwendung von metabolisch instabilen Agonisten wie UTP zu erheblichen Fehlinterpretationen kommen. Ferner haben Suramin oder PPADS ein anderes Inhibitionsprofil bezüglich der klonierten NTPDase1 und NTPDase2 als Evans Blau (Heine et al., 1999), so dass bei verschiedenen Antagonisten das Ausmaß des verzögerten Agonist-Metabolismus und somit die Aktivität des Agonisten in isolierten Geweben unterschiedlich ausfallen kann. So wäre es denkbar, dass es im Falle von Untersuchungen im Vas deferens der Ratte durch die Kombination von Evans Blau mit Suramin, PPADS oder RB 2 wegen der Inhibition weiterer Ekto-Nukleotidasen bzw. Verstärkung der Inhibition identischer Ekto-Nukleotidasen zu einer Zunahme der Aktivität von UTP kommt. Daraus könnten beispielsweise scheinbar schwächere inhibitorische Wirkstärken für Antagonisten resultieren (Chen und Lin, 1997). Die Untersuchungen zeigten in keinem Fall eine Zunahme der Kontraktion für UTP in Anwesenheit von Evans Blau und weiteren Substanzen wie Suramin, PPADS oder

RB 2. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine zusätzliche Inhibition weiterer Ekto-Nukleotidasen den Antagonismus von Suramin, PPADS und RB 2 abschwächte. Wegen der zusätzlichen Inhibition der Ekto-Nukleotidasen durch P2-Antagonisten wie Suramin, PPADS und RB 2 im Vas deferens müssten im Vergleich zu Daten an klonierten P2Y₂- oder P2Y₄-Rezeptoren, diejenigen an isolierten Organen tendenziell eher zu niedrig sein, da die Aktivität der Nukleotide durch Anwesenheit mehrerer potentieller Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren zunehmen kann (siehe Tab. 4.7).

Native P_{2U}-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Vas deferens. Aus der Tab. 4.7 wird deutlich, dass Kontraktionen induziert durch 30 µM UTP im Vas deferens (rechte Spalte) schwach durch Suramin (100 µM), wohl aber konzentrationsabhängig durch Reaktiv Blau 2 und PPADS gehemmt wurden (siehe Abb. 3.33). Maximale Konzentrationen der beiden letztgenannten Substanzen führten zu einer vollständigen Hemmung der UTP-Kontraktion. Die Beteiligung eines eventuell im Vas deferens exprimierten P2Y₁-Rezeptors an der UTP-induzierten Kontraktion konnte mit dem P2Y₁-selektiven Antagonisten MRS 2179 ausgeschlossen werden (siehe Abb. 3.33). Untersuchungen mit den P2Y₁-Agonisten ADPβS und MRS 2179 durch Damer (2002) gaben ebenfalls keinen Hinweis auf funktionelle P2Y₁-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte.

Rekombinante P2Y₂/P2Y₄-Rezeptoren. Ein Vergleich der erhaltenen Werte für Suramin, PPADS und RB 2 mit Daten aus Untersuchungen an rekombinanten P2Y₂- bzw. P2Y₄-Rezeptoren der Ratte und des Menschen ergeben kein 100 %ig einheitliches Bild, jedoch lassen sich einige wichtige Schlußfolgerungen ziehen. Für Reaktiv Blau 2 (RB 2) existieren leider keine Untersuchungen an dem P2Y₂-Orthologen-Subtyp der Ratte.

Für eine sinnvolle Charakterisierung des P_{2U}-Rezeptors im Vas deferens wäre der Vergleich der Wirkungen von Suramin, PPADS und RB 2 mit ihren Effekten an rekombinanten Rezeptoren der Ratte von ein und derselben Arbeitsgruppe an einem Modell wünschenswert. Derartige Studien, in denen alle drei Verbindungen vergleichend untersucht wurden, gibt es für den P2Y₄-Rezeptor der Ratte (Bogdanov et al., 1998).

Tab. 4.7 Inhibitorische Aktivität von Suramin, PPADS und RB 2 an klonierten P2Y_{2/4}-Rezeptoren sowie UTP-sensitiver Rezeptor im Vas deferens der Ratte (ratVD) .

Antagonist	h/ratP2Y ₂ (rekombinant), %-Hemmung/IC ₅₀	ratP2Y ₄ (rekombinant), %-Hemmung/IC ₅₀	P _{2U} (ratVD) +Evans Blau, %-Hemmung/IC ₅₀
Suramin	75 % (100 µM Suramin, 0,5 µM ATP) ^a 44 % (100 µM Suramin, 3 µM UTP) ^d inaktiv (bis 30 µM Suramin) ^d 23,5 % (100 µM Suramin, 30 nM UTP) ^e 7 – 23 µM (10 µM UTP) ^f	10 % (100 µM Suramin, 3 µM UTP) ^b inaktiv (100 µM Suramin, 10 µM UTP) ^f	12,7 % (100 µM Suramin, 30 µM UTP)
PPADS	inaktiv (bis 30 µM PPADS) ^d inaktiv (bis 100 µM PPADS) ^e 24 µM (10 µM UTP) ^f	inaktiv^b 25 µM (1 µM UTP, nicht kompetitiv) ^c	20,5 µM (30 µM UTP)
Reaktiv Blau 2 (RB 2)	85 % (100 µM RB 2, 30 nM UTP) ^e	21,1 µM (3 µM UTP) ^b	43,4 µM (30 µM UTP)

^a ratP2Y₂, 1321N1-Zellen, intrazelluläre Kalziummessung, 0,5 µM = EC₅₀ von ATP, 1 min Inkubation (Chen et al., 1996), ^b ratP2Y₄, XLO, Einwärts-Ströme, 3 µM = EC₇₀ von UTP, 60 min Inkubation (Bogdanov et al., 1998), ^c ratP2Y₄, 1321N1-Zellen, [³H]-InsP₃-Messung, 1 µM UTP = EC₇₀, 20 min Inkubation (Suarez-Huerta et al., 2001), ^d hP2Y₂, 1321N1-Zellen, [³H]-InsP₃-Messung, 3 µM = EC₇₀ von UTP, 10 min Inkubation (Charlton et al., 1996b), ^e hP2Y₂, 1321N1-Zellen, [³H]-InsP₃-Messung, 30 nM = EC₆₀ von UTP, 30 s Inkubation (Janssens et al., 1999), ^f ratP2Y₂, 1321N1-Zellen; intrazelluläre Kalziummessung, 60 s Inkubation (Gallagher und Salter, 2003)

An diesem P2Y-Rezeptor-Subtyp der Ratte war **PPADS** bis zu einer Konzentration von 100 µM und einer Inkubationsdauer von 60 min inaktiv. Dieser Befund stimmt nicht mit den Daten für PPADS am Vas deferens (epididymale Segmente) überein. Hier zeigt PPADS (ca. 20 µM) halbmaximale inhibitorische Wirkung auf UTP(30 µM)-verursachte Kontraktionen (siehe Tab. 4.7). Im Gegensatz zu Bogdanov und Mitarbeiter konnten Suarez-Huerta und Mitarbeiter eine inhibitorische Wirkung nicht kompetitiver Art von PPADS (IC₅₀ ca. 25 µM) am P2Y₄-Rezeptor der Ratte feststellen (Bogdanov et al., 1998; Suarez-Huerta et al., 2001). Auch Janssens und Mitarbeiter hatten alle drei P2-Antagonisten am P2Y₂-Rezeptor des Menschen vergleichend untersucht (Janssens et al., 1999). Allerdings ist die Inkubationsdauer mit ca. 30 s für die Antagonisten Suramin, PPADS und RB 2 im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen kurz. Die Gefahr des Nicht-Equilibriums für einige Substanzen ist in diesen Untersuchungen

wahrscheinlich. Interessant ist der Befund, dass für PPADS wie am P2Y₄-Rezeptor der Ratte ebenfalls keine inhibitorische Aktivität an humanen P2Y₂-Rezeptoren festgestellt werden konnte. Da PPADS entweder nur 30 s inkubiert wurde oder nur bis zu einer Konzentration von 30 µM benutzt wurde, lässt sich im Fall von humanen P2Y₂-Rezeptoren keine eindeutige Aussage über die inhibitorische Potenz von PPADS am hP2Y₂-Rezeptor treffen. Am ratP2Y₂ dagegen war PPADS deutlich inhibitorisch wirksam (IC₅₀ = 24 µM; Gallagher und Salter, 2003).

Somit spechen die Ergebnisse an rekombinanten Rezeptoren im Falle von PPADS für die Expression von P2Y₂-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte.

Suramin ist an P2Y₂-Rezeptoren der Ratte und des Menschen deutlich inhibitorisch wirksam (siehe Tab. 4.7, 23,5 %-75 %Hemmung, IC₅₀ = 7-23 µM), und sehr schwach an klonierten P2Y₄-Rezeptoren der Ratte. Dieser Unterschied stützt die Sicht, dass mittels Suramin die P2Y₂- bzw. P2Y₄-Rezeptoren der Ratte unterschieden werden können. Dies läßt im Gegensatz zu PPADS den Schluß zu, dass P2Y₄-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte exprimiert werden.

Reaktiv Blau 2. RB 2 inhibiert P2Y₁-Rezeptoren auf Truthahn-Erythrozyten und die rekombinanten Rezeptoren hP2Y₆ und ratP2Y₁₂, während die humanen P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₁₁-Rezeptoren erst oberhalb einer Konzentration von 100 µM gehemmt werden (siehe 1.2; Jacobson et al., 2002). Janssens und Mitarbeiter (1999) konnten zeigen, dass humane P2Y₂-Rezeptoren und Bogdanov und Mitarbeiter (1998) das P2Y₄-Rezeptoren der Ratte RB 2-sensitiv sind (siehe Tab. 4.7). Demnach inhibiert RB 2 beide P2Y-Rezeptorsubtypen gleichermaßen und kann somit nicht als Mittel zur Unterscheidung von P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren der Ratte (Bogdanov et al., 1998; Janssens et al., 1999), wohl aber zum Nachweis beider Rezeptoren bezüglich ihrer An- oder Abwesenheit in einem gegebenen Gewebe dienen. RB 2 inhibiert UTP-sensitive Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte schwach (IC₅₀ = 43,4 µM; siehe Abb. 3.33), was im Einklang mit Befunden an rekombinanten hP2Y₂- bzw. ratP2Y₄-Rezeptoren steht. Somit bestätigt die Wirksamkeit von RB 2 die Expression von P2Y₂- und/oder P2Y₄-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte.

Tab. 4.8 Inhibitorische Aktivität von Suramin, PPADS und RB 2 an nativen P_{2U}-Rezeptoren der Ratte (%-Hemmung).

UTP Konz.	Suramin		PPADS			RB 2	
	100 µM	1000 µM	10 µM	30 µM	100 µM	100 µM	200 µM
0,01 µM			inaktiv ^a		inaktiv ^a		
3 µM	97 % ^b				29% ^b		
10 µM	100 % ^c			inaktiv ^d	100 % ^c		
100 µM	50 % ^e 100 % ^f 65 % ^g		100 % ^f	inaktiv ^e inaktiv ^h		inaktiv ^g	
300 µM	35 % ⁱ	inaktiv ^j	100 % ⁱ				

^a Gefäß-Bett der Arteria mesenterica der Ratte, Hemmung der Abnahme des Perfusionsdruck (Ralevic und Burnstock, 1996), ^b Aorta der Ratte, Relaxation (Dol-Gleizes et al., 1999), ^c Astrozyten der Ratte, intrazelluläre Kalziummessungen (Ho et al., 1995), ^d Gefäß-Bett der Arteria pulmonalis, Hemmung der Zunahme des Perfusionsdruck (Rubino und Burnstock, 1996), ^e Vena mesenterica der Ratte, Hemmung der Kontraktion (Galligan et al., 2001), ^f Neurone des Hinterwurzel-Ganglion der Ratte, intrazelluläre Kalziummessung (Sanada et al., 2002), ^g intrapulmonale Arterien der Ratte, Hemmung der Kontraktion (Chootip et al., 2002), ^h Astrozyten der Ratte, intrazelluläre Kalziummessungen (Delicado et al., 2001), ⁱ Intrakardiale Neurone der Ratte, intrazelluläre Kalziummessung (Liu et al., 2000), ^j Duodenum der Ratte, Kontraktion (Johnson und Hourani, 1994)

Native P_{2U}-Rezeptoren der Ratte. Auch die Wirkungen von Suramin, PPADS und RB 2 auf UTP-induzierte Effekte in isolierten Organen der Ratte sind nicht einheitlich (siehe Tab. 4.8). Die UTP-induzierte Endothel-abhängige Relaxation der Aorta der Ratte ist durch RB 2, PPADS und schwächer durch Suramin hemmbar [siehe Tab. 4.9 (Hansmann et al., 1997)]. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Befunden an epididymalen Segmenten des Vas deferens in Gegenwart von Evans Blau überein. Seye und Mitarbeiter konnten durch *In-situ*-Hybridisierung die Expression von P2Y₂-mRNA im Endothel der Aorta der Ratte zeigen (Seye et al., 1997). Somit kann als wahrscheinlich gelten, dass Endothelzellen der Aorta der Ratte neben P2Y₁- auch P2Y₂-Rezeptoren exprimieren. Im Gegensatz zu den Befunden von Hansmann und Mitarbeitern fanden Dol-Gleizes und Mitarbeiter heraus, dass an der isolierten Aorta der Ratte UTP-verursachte Relaxationen stärker durch Suramin als durch PPADS gehemmt werden (Dol-Gleizes et al., 1999). Für die UTP-vermittelte Relaxation wird von Dol-Gleizes und Mitarbeitern ebenfalls der P2Y₂-Rezeptor verantwortlich gemacht. Wie schon bei klonierten P2Y-Rezeptoren lassen sich ebenfalls große Unterschiede hinsichtlich der Inkubationsdauer zwischen 5 min (Dol-Gleizes) und 50 min (Hansmann) ausmachen, worin der Grund für die unterschiedlichen Befunde zur Wirkung von PPADS an P_{2U}-Rezeptoren liegen kann.

In einem anderen Beispiel ist PPADS im Fall von UTP-induzierten Wirkungen

im Gegensatz zur isolierten Aorta der Ratte an anderen Gefäßpräparationen inaktiv (siehe Tab. 4.8; Rubino und Burnstock, 1996; Ralevic und Burnstock, 1996; Galligan et al., 2001). Ebenfalls die Aorta der Ratte betreffend, zeigte PPADS ($< 300 \mu\text{M}$) keine hemmende Wirkung auf UTP-induzierte Inositolphosphat-Bildung in isolierten glatten Muskelzellen spontan-hypertensiver Ratten, für welche eine überwiegende Beteiligung von P2Y_4 -Rezeptoren gezeigt werden konnte (Harper et al., 1998). Allerdings konnte Seye und Mitarbeiter (1997) in der glatten Muskulatur der *Aorta thoracalis* auch P2Y_2 -Rezeptor-codierende mRNS detektieren. Wenn P2Y_4 -Rezeptoren funktionell in der Aorta der Ratte exprimiert werden, dann demonstriert der Befund von Harper und Kollegen, dass PPADS an P2Y_4 -Rezeptoren der Ratte inaktiv ist. Chen und Lin sahen in Ekto-Nukleotidasen – gehemmt durch PPADS - den Grund für die scheinbar niedrige Affinität von diesem Antagonisten zum endothelialen P2Y_2 -Rezeptor (Chen und Lin, 1997). Chen und Lin konnten zeigen, dass in Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ α,β -meATP, zur Inhibition von Ekto-Nukleotidasen des Endothels boviner, pulmonaler Arterien, PPADS UTP-induzierte Wirkungen mit einem pA_2 -Wert von 4,1 hemmte. Auch in anderen Gefäßpräparationen könnten Ekto-Nukleotidasen ein Grund für die scheinbare Inaktivität von PPADS und somit für die gegensätzlichen Befunde an nativen P2Y_2 -Rezeptoren sein.

Unter Berücksichtigung des Einflusses der Inkubationszeit und Ekto-Nukleotidase-Aktivität isolierter Gefäße auf die Wirkstärke von Antagonisten ist der Schluß möglich, dass PPADS native P2Y_2 -Rezeptoren hemmt.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Befunde in den einzelnen Präparaten kann eine verschieden heterogene P2 -Rezeptorpopulation sein. Dies könnte auch auf Astrozyten zutreffen. So fanden Ho und Mitarbeiter (Ho et al., 1995) an einer Astrozyten-Zellkultur aus dem dorsalen Rückenmark der Ratte PPADS-sensitive ($\text{IC}_{50} = 7,2 \mu\text{M}$) $\text{P}_{2\text{U}}$ -Rezeptoren, während gereinigte Typ 1 Astrozyten isoliert aus dem *Cerebellum* der Ratte insensitiv gegenüber PPADS waren (Jimenez et al., 2000). Leider geht aus der Veröffentlichung von Ho und Mitarbeiter nicht hervor, welcher der verwendeten Antagonisten (PPADS/Suramin) stärker UTP-hervorgerufene Wirkungen hemmte. Trotz der Aufreinigung der Astrozyten konnten Jimenez und Mitarbeiter aufgrund der Hemmung von Suramin auf UTP-vermittelte Wirkungen drei Untergruppen von Astrozyten feststellen und folgerten daraus eine variable Verteilung von P2Y_2 - und P2Y_4 -Rezeptoren (Jimenez et al., 2000; Delicado et al., 2001). Durch

Untersuchungen von Yamakuni und Mitarbeiter konnte der Befund von Jimenez der heterogenen Rezeptorpopulation bezüglich P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren auf Astrozyten auch an Astrozyten der Großhirnrinde der Ratte bestätigt werden (Yamakuni et al., 2002). Für die Charakterisierung des fraglichen P_{2U}-Rezeptors des Vas deferens sind die pharmakologischen Befunde an Astrozyten von Suramin und PPADS nicht sinnvoll verwendbar, da eine heterogene P2Y_{2/4}-Rezeptorpopulation vorliegt.

Einheitlicher als die Befunde von PPADS an Astrozyten scheinen die an isolierten Neuronen zu sein. Sowohl an intrakardialen Neuronen als auch an Hinterwurzel-Ganglion-Neuronen der Ratte inhibierte PPADS stärker als Suramin UTP-bedingte Wirkungen (siehe Tab. 4.8; Liu et al., 2000; Sanada et al., 2002). Die Reihenfolge (siehe Tab. 4.9) nach der inhibitorischen Wirkstärke von Suramin und PPADS ist in guter Übereinstimmung mit den Befunden an epididymalen Segmenten des Vas deferens in Gegenwart von Evans Blau, wobei Reaktiv Blau 2 allerdings ungetestet blieb. In der Zusammenschau ihrer Ergebnisse kamen die Autoren Liu (2000) und Sanada (2002) zu dem Schluss, dass der P2Y₂-Rezeptor an diesen Neuronen der Ratte für die UTP-bedingten Wirkungen hauptsächlich verantwortlich ist. Damit sprächen die Antagonist-Untersuchungen an isolierten Neuronen, wie die Befunde an der Aorta der Ratte (Hansmann et al., 1997) für einen P2Y₂(-ähnlichen)-Rezeptor im Vas deferens der Ratte.

Tab. 4.9 Rangfolge ausgewählter P2-Antagonisten an P_{2U}-Rezeptoren der Ratte.

Modell	Rangfolge	Quelle
Vas deferens	PPADS ≥ RB 2 > Suramin	eigene Untersuchungen
Aorta thoracalis	Suramin ≥ PPADS PPADS ≥ RB 2 > Suramin	(Dol-Gleizes et al., 1999) (Hansmann et al., 1997)
Astrozyten	PPADS = Suramin	(Ho et al., 1995)
Vena mesenterica	Suramin > PPADS	(Galligan et al., 2001)
Intrakardiale Neurone	PPADS > Suramin	(Liu et al., 2000)
Hinterwurzel-Ganglion Neurone	PPADS > Suramin	(Sanada et al., 2002)
Arteria pulmonalis	PPADS > RB 2	(Chootip et al., 2002)

Dennoch stützen Studien an klonierten, humanen oder nativen P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren die Mehrheitsmeinung, die besagt, dass mittels Suramin die P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren unterschieden werden können, die P2Y₂(-ähnliche)-Rezeptor-Hypothese für das Vas deferens nicht. Wie aus Tab. 4.8 und Tab. 4.9 hervorgeht, existieren klare Wirk-Unterschiede zwischen PPADS und Suramin nur im Falle der

Aorta thoracalis (Dol-Gleizes et al., 1999), der *Vena mesenterica* (Galligan et al., 2001), der Neurone des Hinterwurzel-Ganglions (Sanada et al., 2002), sowie intrakardialer Neurone der Ratte (Liu et al., 2000). In diesen vier pharmakologischen Modellen ist keineswegs stets Suramin der potenteste Antagonist an P_{2U}-Rezeptoren. Dies bestätigt einerseits die Sichtweise, dass mit P_{2U}-Rezeptoren der Ratte mindestens 2 verschiedene P_{2Y}-Rezeptoren korrespondieren, jedoch nicht, dass diese eindeutig mit Suramin und PPADS unterschieden werden können. Ein Beispiel für Suramin-insensitive P_{2Y}₂(-ähnliche)-Rezeptoren stellen myelinisierte Axone der Vorderwurzel der Ratte dar. Für Schwanzzellen der Ratte wurde zwar die Expression von P_{2Y}₂-Rezeptoren gezeigt, dennoch konnte der UTP-bedingte (30 µM) intrazelluläre Kalziumanstieg nicht durch 100 µM Suramin gehemmt werden (Mayer et al., 1998).

Eine abschließende Bewertung UTP-induzierter Wirkungen an isolierten Zellen oder Organen ist nach heutigem Kenntnisstand nicht möglich. Dazu müssen P_{2U}-Rezeptoren aus den Geweben der Ratte kloniert und pharmakologisch mit P₂-Rezeptor-Liganden charakterisiert werden. Wichtig wäre die vollständige Untersuchung mit Subtyp-selektiven Agonisten (wie z.B. UTPγS) und Antagonisten, um mit valideren pharmakologischen Daten argumentieren zu können. Durch die zusätzliche Hemmung von Ekto-Nukleotidasen können Antagonisten im unterschiedlichen Ausmaß die ihnen eigene inhibitorische P₂-Rezeptor-Wirkung maskieren, indem die Affinität von UTP zum P_{2U}-Rezeptor scheinbar erhöht wird. Die Ekto-Nukleotidase-Verteilung ist gewebeabhängig, so dass dadurch unterschiedliche Rangfolgen von Antagonisten wie Suramin, PPADS oder RB 2 resultieren können. Beispielsweise potenzierte RB 2 die Wirkung von UTP-induzierten Einwärtsströmen im oberen Hals-Ganglion der Ratte (Connolly und Harrison, 1994), PPADS die Wirkung von UTP an bovinen Endothelzellen (Brown et al., 2002) und Evans Blau die Wirkung von ATP im Vas deferens (Bültmann et al., 1999a).

Bezüglich der Hemmwirkungen von Suramin, PPADS und RB 2 an klonierten P_{2Y}₂-/P_{2Y}₄- bzw. nativen P_{2U}-Rezeptoren, sind die in der Literatur zu findenden Daten heterogen. Während die Befunde an den klonierten Rezeptoren von methodischen Bedingungen (Inkubationszeit) und der Spezies abzuhängen scheinen, werden diejenigen an nativen P_{2U}-Rezeptoren zusätzlich durch heterogene P₂-Rezeptorpopulationen und Ekto-Nukleotidasen in isolierten Geweben beeinflusst. Trotz

dieser Umstände lassen sich wichtige Schlüsse ziehen. Rekombinante P2Y₂-Rezeptoren der Ratte werden durch PPADS genauso effektiv wie native P_{2U}-Rezeptoren der Ratte blockiert. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Befunden an epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von Evans Blau. Auch die Wirkung von RB 2 scheint für die Expression von P2Y₂- und/oder P2Y₄-Rezeptoren in epididymalen Segmenten zu sprechen. Die schwache inhibitorische Aktivität von Suramin weist eher auf die Expression von P2Y₄- als auf P2Y₂-Rezeptoren hin.

4.3.5 Histo-/Immunzytochemische Charakterisierung von P2-Rezeptoren und Ekto-Nukleotidasen in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte

4.3.5.1 P2-Rezeptoren

P2Y₂-Rezeptoren. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit mit polyklonalen P2Y₂-Rezeptor-Antikörpern ergaben für das Epithel, für die glatte Muskulatur und für neuronale Strukturen in der glatten Muskulatur und der Adventitia eine starke Immun-Reaktivität, während die Lamina propria sowie das Bindegewebe nicht markiert wurden. Allerdings war die Immun-Reaktivität nicht eindeutig auf die Membranen der glatten Muskelzellen beschränkt, sondern diffus über den Querschnitt der Zelle im Bereich der Longitudinal-Muskulatur verteilt. Eine ähnliche Markierung wurde für den P2X₂-Rezeptor an Querschnitten des Samenleiters der Ratte erhalten (Lee et al., 2000). Auch auf der glatten Muskulatur von Gefäßen des Pankreas 16-Wochen-alter Ratten konnten P2Y₂-Rezeptoren immunzytochemisch detektiert werden (Coutinho-Silva et al., 2001).

Deutlich Membran-assoziiert dagegen konnte das P2Y₂-Rezeptor-Protein im Epithel epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte lokalisiert werden (Abb. 3.35). Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenz-Intensität zwischen der glatten Muskulatur und dem Epithel bestanden nicht. Auch andere Epithelien wie nasal- (Parr et al., 1994; Morse et al., 2001), vaginal- (Min et al., 2003), bronchial- (Lazarowski et al., 1994; Homolya et al., 1999) und konjunktival-Epithelien (Dartt, 2002) exprimieren P2Y₂-Rezeptoren.

Die Markierung neuronaler Strukturen durch den P2Y₂-Rezeptor-Antikörper konnte durch Doppel-Markierungen mit dem Neurofilament-Antikörper NF160 bestätigt werden. Eine zur P2Y₂-Markierung vergleichbare Immunfluoreszenz der neuronalen Strukturen innerhalb der glatten Muskulatur konnte von Vulchanova (Vulchanova et al., 1996) für den P2X₂-Antikörper ebenfalls detektiert werden. Peripher im Bindegewebe entsprach die Markierung durch den P2Y₂-Antikörper weitestgehend der Markierung durch P2X₃-Antikörper (Lee et al., 2000). Dabei handelte es sich ebenfalls um periphere Nervenfasern-Bündel.

Für die Spezifität des Antikörpers spricht, dass Bindegewebe nicht markiert wurde. Dazu zählen insbesondere die Adventitia, Bindegewebssepten, welche in das glatte Muskelgewebe eingestreut sind, sowie der als Lamina propria bezeichnete subepitheliale Raum. Eine unspezifische Bindung des Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörpers fand nicht statt (Daten nicht gezeigt), und der polyklonale P2Y₂-Rezeptor-Antikörper konnte vollständig durch sein Immunisierungspeptid absorbiert werden. Das Gemisch aus P2Y₂-Rezeptor-Antikörper und Immunisierungspeptid ergab keine Fluoreszenzmarkierung nach der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Die Aussage des Präabsorptionstestes bezüglich der Spezifität ist begrenzt und darf nicht überbewertet werden. Vielmehr lässt sich mit Hilfe dieses Verfahrens der Prä-Immunisierungs-Status des Tieres, aus dem der Antikörper gewonnen wurde, ermitteln. Zusätzlich wurde jedoch unter den selben Versuchsbedingungen für Lungengewebe der Ratte, das zu Positiv-Kontrollen für das P2Y₂-Rezeptor-Protein herangezogen werden kann, ein positives Ergebnis erhalten (siehe „Certificate of analysis“ der Herstellerfirma alamon labs). Der Antikörper Anti-P2Y₂ erkennt ein Epitop, welches mit den Aminosäurepositionen 227 – 244 korrespondiert und in der dritten intrazellulären Schleife zwischen der TM5 und TM6 intrazellulär liegt. Die Aminosäuresequenz ist spezifisch für das P2Y₂-Rezeptorprotein.

Physiologische Implikationen. Im Vas deferens der Ratte wurden auf der **glatten Muskulatur** P2X₁- und P2X₂-Rezeptor-Untereinheiten detektiert (s.o. sowie S. 38). Damit kolokalisiert finden sich eine hohe ATPase-Aktivität sowie P2Y₂-Rezeptoren (siehe Abb. 3.34). Neben α_1 -adrenergen Rezeptoren vermitteln P2Y₂(-ähnliche)-Rezeptoren ebenso eine Kontraktion, die der P2X₁-Rezeptor-vermittelten zeitlich nachfolgen müsste. Die hohe ATPase-Aktivität des Gewebes reguliert die zeitliche und räumliche Wirkung des Neurotransmitters ATP. P2Y₂-Rezeptoren, exprimiert von

glatten Muskelzellen, führen zur intrazellulären Freisetzung von Kalzium. Dadurch ist eine wichtige Voraussetzung für eine Kontraktion erfüllt. Somit könnte der P2Y₂-Rezeptor wie der P2X₁-Rezeptor eine Zielstruktur für neuronal und nicht-neuronal freigesetztes ATP sein und eine Kontraktion vermitteln. P2Y₂(-ähnliche)-Rezeptoren wurden auch in kultivierten glatten Myosarkomzellen (DDT₁ MF-2) aus dem Vas deferens des Syrischen Hamsters (Van der Zee et al., 1992; Sipma et al., 1994) vermutet. Im Gegensatz dazu konnten neueste Studien ausschließlich P2Y₆-Rezeptor-kodierende mRNA nachweisen (Fredholm et al., 2003). Kontraktions-vermittelnde P2Y₂-Rezeptoren konnten in der Gefäß-Muskulatur der *Arteria basilaris* nachgewiesen werden (Malmsjö et al., 2003). Ferner werden dem ATP auch mitogene Wirkungen zugeschrieben, welche P2Y-vermittelt sind (Boarder et al., 2001). Für die Proliferation der Intima und der glatten Muskulatur von Blutgefäßen der Ratte werden u.a. P_{2U} bzw. P2Y-Rezeptoren verantwortlich gemacht (Erlinge, 1998; Burnstock, 2002; Seye et al., 2002). Da die glatte Muskulatur des Vas deferens vor allem in der *Pars prostatica* stark ausgebildet ist, wäre es denkbar, dass dem P2Y₂-Rezeptor in prostatistischen Segmenten eine Bedeutung für die Zellproliferation zukommt.

Die Expression von P2Y₂-Rezeptoren auf **neuronalen Strukturen** könnte funktionell für die präsynaptische Modulation der Neurotransmitterfreisetzung von Bedeutung (Stone et al., 2000; Cunha und Ribeiro, 2000; Boehm, 2003) oder für die Wechselwirkung zwischen periaxonalen Zellen und Axonen verantwortlich sein (Mayer et al., 1998). Präsynaptische P2-Rezeptoren wurden im Vas deferens der Ratte nachgewiesen (Kurz et al., 1993). Weiterhin konnte am Vas deferens der Maus und der Ratte gezeigt werden, dass ATP, ATP γ S und UTP die Freisetzung von tritiiertem Noradrenalin während elektrischer Stimulation hemmte (von Kügelgen et al., 1989, Forsyth et al., 1991). Somit könnte der P2Y₂-Rezeptor eine Funktion in der präsynaptischen Modulation der adrenergen Neurotransmission haben. Ferner spielen P2Y₂-Rezeptoren auf peripheren neuronalen Strukturen bei der Regulation der Zytokinexpression, wie Leukämie-inhibierender Faktor (LIF) eine Rolle, und können daher die Differenzierung von Neuronen beeinflussen (Yamakuni et al., 2002).

Epithel. Die Bedeutung von epithelialen P2Y₂-Rezeptoren des Vas deferens der Ratte kann in der Regulation der Zusammensetzung der intraluminalen Ionenkonzentration und somit indirekt für den Transport von Spermien dienen. So konnte an kultivierten Epithelzellen aus dem Nebenhoden der Ratte gezeigt werden, dass extrazelluläres ATP die Chloridionen-Sekretion über P2-Rezeptoren regulierte

(Wong, 1988). RT-PCR-Untersuchungen konnten sowohl P2Y₁- als auch P2Y₂-Rezeptor-kodierende mRNS im *Caput epididymis* der Maus nachweisen. Ergänzende funktionelle Untersuchungen konnten epitheliale P2Y-Rezeptoren bestätigen (Shariatmadari et al., 2003).

P2Y₄-Rezeptor. Im Gegensatz zu Studien von Webb und Kollegen (1998), welche P2Y₄-kodierende mRNS im 6-Tage-alten Vasa deferentia der Ratte detektierte, konnte in eigenen Untersuchungen keine spezifische Markierung durch P2Y₄-Antikörper im Bereich der glatten Muskulatur bzw. des Epithels ermittelt werden. Lediglich einige periphere Strukturen, wahrscheinlich neuronalen Ursprungs, schienen spezifisch markiert zu sein. Diese Strukturen könnten eine Quelle für die P2Y₄-kodierende mRNS in den Untersuchungen von Webb und Kollegen gewesen sein. Weiterführende Studien mit spezifischeren Antikörpern, z.B. mittels monoklonaler Antikörper, sind nötig, um diesen Sachverhalt zu belegen. Als Ursache für die unspezifische Markierung kommt der fluoreszenz-markierte Sekundär-Antikörper nicht in Betracht, da dieser nicht unspezifisch bindete (Daten nicht gezeigt). Demnach ist es wahrscheinlich, dass der Prä-Immunsierungs-Status des Tieres, in welchem der Antikörper erzeugt wurde, zu den immunzytochemischen Befunden führte, oder aber das spezifische Peptid defekt war. In „Western-Blot“-Studien von Sage und Marcus (2002) wurden durch diesen P2Y₄-Rezeptor-Antikörper mehrere Banden markiert. Die Autoren verweisen auf unterschiedliche Glykosylierungs-Stufen des P2Y₄-Rezeptors und geben zu bedenken, dass aufgrund der kurzen Sequenz des Immunsierungspeptides die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität mit gleichen Epitopen anderer Proteine bestünde. Trotzdem wurde gezeigt, dass sowohl beim „Western-Blot“ als auch bei der Immunzytochemie der P2Y₄-Rezeptor-Antikörper spezifisch präabsorbiert werden konnte. Da in der vorliegenden Arbeit auch die Markierung durch den P2Y₄-Rezeptor-Antikörper sehr diffus war, erfolgte keine Verwendung dieser immunzytochemischen Befunde zur Identifizierung des UTP-sensitiven Rezeptors. Leider war dazu kein anderer P2Y₄-Rezeptor-Antikörper kommerziell erhältlich. Insgesamt betrachtet kann an dieser Stelle die Expression des P2Y₄-Rezeptors im Bereich der glatten Muskulatur des Vas deferens der Ratte nicht ausgeschlossen werden.

4.3.5.2 Ekto-Nukleotidasen

Während der elektrischen Stimulation von Vasa deferentia verschiedener Spezies konnten lösliche Ekto-Nukleotidasen neuronaler Herkunft im Medium detektiert werden (Mihaylova-Todorova et al., 2001; Westfall und Westfall, 2001). Am unstimulierten Vas deferens der Ratte bauen endogen vorkommende Ekto-Nukleotidasen 100 μ M ATP mit einer Halbwertszeit von 5,83 min ab (Tennant et al., 1999). Das Hauptabbauprodukt des ATP war Inosin. Abbauprodukte wie ADP und AMP waren mittels HPLC-Analytik detektierbar, während Adenosin als Zwischenprodukt kaum nachweisbar war. Die Beobachtungen von Tennant und Mitarbeiter (1999) sprechen für die Anwesenheit von Ekto-ATPDasen, der Ekto-5'-Nukleotidase und einer Ekto-Adenosindeaminase. Der Nukleotid-Metabolismus durch das Vas deferens der Ratte wurde auch durch die Abnahme der ATP-Konzentration (Luziferin-Luziferase-Assay, Driessen et al., 1993; Bültmann R. et al., 1996) oder durch die Bildung von anorganischem Phosphat aus ATP mit der „Lanzetta-Methode“ (Khakh et al., 1995) oder „Fiske-Subbarow-Methode“ (Ziganshin et al., 1995) demonstriert. Im Vas deferens des Meerschweinchens bestehen keine Unterschiede im ATP-Metabolismus zwischen prostatistischen und epididymalen Segmenten (Tennant und Hourani, 2000). Molekular-biochemische Charakterisierungen von Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens der Ratte existieren bislang nicht. Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte dienen der zeitlichen und räumlichen Begrenzung der Neurotransmitter-Wirkungen von ATP sowie der Bildung von Nukleosiden wie Adenosin (Zimmermann, 1996a). Durch die Zelltyp-spezifische Expression von Ekto-Nukleotidasen erfolgt eine differenzierte Wirkung auf P₂- und P₁-Rezeptoren.

ATPase-/ADPase-Aktivität im Vas deferens der Ratte. Histochemische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass das Vas deferens der Ratte Myozytenmembran-assoziierte Enzyme exprimiert, welche sowohl aus ATP als auch aus ADP anorganisches Phosphat (P_i) freisetzen. Weniger, dafür diskrete Bleisulfid-Präzipitate wurden im Falle von ADP im Bereich der glatten Muskulatur detektiert. Bei gleicher Inkubationsdauer können Gründe für diese Befunde der geringere stöchiometrische Beitrag von P_i aus ADP im Vergleich zu ATP sein und/oder an dem spezifischeren Abbau von ADP durch Ekto-Nukleotidasen liegen. Trotzdem existierten Strukturen, welche im Vergleich zu den Myozyten bei Verwendung von ADP als Substrat stärker markiert wurden, obgleich bislang noch keine ADP-bevorzugende Ekto-Nukleotidase auf Zelloberflächen bekannt ist (Zimmermann, 2001). Dieser Befund

wird auch von Studien, die zeigen, dass ATP und ADP gleichermaßen gut vom Vas deferens metabolisiert werden, bestätigt (Bültmann et al., 1995). Zu den Strukturen mit ADPase-Aktivität zählen die Lamina propria, sowie Strukturen in der Adventitia und den Bindegewebssepten. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Strukturen neuronalen Ursprungs. Eine basolaterale Markierung des Epithels erfolgte nur bei der Applikation von ATP, was z.B. auf eine ATP-spezifische Ekto-ATPase hinweisen könnte. Das Lumen des Vas zeigte sowohl bei ATP als auch bei ADP bemerkenswerterweise keine Markierung durch Bleipräzipitate. Zusammengenommen verdeutlichen diese Ergebnisse die hohe Nukleotid-spaltende Aktivität der glatten Muskulatur epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte.

NTPDase2-Expression. Mit dem polyklonalen NTPDase2-Antikörper konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur ATPase/ADPase-Aktivität nur diskrete Strukturen markiert wurden. Um welche Strukturen es sich dabei handelt, kann nur spekuliert werden. In Frage kämen im Bindegewebe verlaufende Blutgefäße und Axone. Die Markierung erinnert an die Neurofilament-Markierung mit NF160 (siehe Abb. 3.36), ist jedoch im Gegensatz zu dieser diffuser. Dabei könnte es sich um perineuronale Strukturen handeln. In der Adventitia wurden durch den NTPDase2-Antikörper Nervenfaserbündel markiert. Vergleichbar dazu konnten auch Vlajkovic und Mitarbeiter eine intensive NTPDase2-spezifische Immunfluoreszenz auf Nervenfasern in der Cochlea der Ratte feststellen (Vlajkovic et al., 2002). Im subepithelialen Raum des Vas deferens lässt sich ebenfalls eine spezifische NTPDase2-Immunfluoreszenz detektieren. NTPDase2-kodierende mRNS konnte in Organen epithelialen Ursprungs festgestellt werden (Chadwick und Frischauf, 1997; Gao et al., 1998). Übereinstimmend mit der subepithelialen Expression der NTPDase2 im Vas deferens der Ratte konnten Dranhoff und Mitarbeiter eine die intrahepatischen Gallengänge umgebende Lokalisation der NTPDase2 nachweisen (Dranoff et al., 2002). Diese Autoren identifizierten spezielle Fibroblasten als Träger der NTPDase2 mit unbekannter physiologischer Funktion. Interessante immunzytochemische Befunde liegen für die NTPDase1/2 in intrakardialen Blutgefäßen der Maus vor (Sevigny et al., 2002). Wie im Vas deferens konnte in intrakardialen Gefäßen eine spezifische NTPDase2-Immunreaktivität in der Gefäß-Adventitia, subendothelial (korrespondierend zum subepithelialen Raum im Vas deferens), auf Perizyten sowie im subendokardialen Raum detektiert werden. Die glatte Gefäßmuskulatur war wie die des Vas deferens NTPDase2-negativ. Die Autoren argumentierten, dass der NTPDase2-Antikörper als

spezifischer Perizyten-Marker verwendet werden könne. Rein spekulativ könnten demnach auch im Vas deferens Fibroblasten Zellen der NTPDase2-Expression sein. Ähnlich zu den histochemischen Befunden mit ADP als Substrat für die endogenen Ekto-Nukleotidasen, wurde die NTPDase2 in der Lamina propria sowie in Strukturen der Adventitia und den Bindegewebssepten exprimiert. Obwohl für dieses Enzym eine starke Präferenz für ATP demonstriert werden konnte (Zimmermann, 2000), wurden vergleichbare Strukturen auch bei der Verwendung von ADP als Substrat für endogene Nukleotidasen durch Bleipräzipitate im Vas deferens markiert. Eine mögliche Erklärung könnte die in der Regel überlappende Expression von Ekto-Nukleotidasen sein (Zimmermann, 2000). Wie schon beim Nachweis der ATP- und ADP-spaltenden Aktivität epididymaler Segmente des Vas deferens blieb sowohl das Epithel als auch der luminal Inhalt bei der Verwendung des NTPDase2-Antikörpers unmarkiert. Obwohl selbst feinste intermyozytäre Bereiche markiert wurden, kann die NTPDase2 nicht hauptsächlich für die hohe Ekto-Nukleotidase Aktivität in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte verantwortlich sein, da weitaus größere Bereiche ATP/ADP-spaltende Aktivität aufwiesen (siehe Abb. 3.39 - Abb. 3.41).

Physiologische Implikationen. Einzelne Myozyten des Vas deferens werden durch „en-passant“-Varikositäten innerviert. „Tight-junctions“ erlauben die Ausbreitung eines elektrischen Potentials nur innerhalb eines kleinen Zellverbandes. Dieser Multiunit-Typ der glatten Muskulatur setzt eine intensive Innervation voraus. Beispielsweise werden von einer axoterminalen Endigung oder einer Varikosität ca. 6 - 12 Myozyten innerviert. Demzufolge sollten in der räumlichen Nähe jeder Neurotransmitter-freisetzenden Varikosität die Signalwirkung-begrenzende Enzyme, wie z.B. die NTPDase2 lokalisiert sein. Dieses Enzym spaltet bevorzugt ATP und bildet dabei ADP, welche einem weiteren Abbau unterliegt. Somit könnte die NTPDase2 die Konzentration des Neurotransmitters ATP im Bereich von Bindegewebsstrukturen, in welchen Blutgefäße und Axone eingebettet vorliegen, erniedrigen und die Konzentration von ADP, welches ein anderes P2-Rezeptor-Selektivitäts-Profil als ATP hat, erhöhen. In Gefäßen des Myokards der Maus sind Perizyten, welche NTPDase2 exprimieren, eventuell in die purinerge Regulation des Tonus glatter Muskelzellen involviert (Sevigny et al., 2002). In karidalen Blutgefäßen der Maus wurde die NTPDase1 auf glatten Muskelzellen detektiert (Sevigny et al., 2002). Dieser Befund deckt sich teilweise mit dem an epididymalen Segmenten des Vas deferens, da auch dort die NTPDase2 nicht auf glatter Muskulatur detektiert wurde. Ein der purinerger

Regulation des Gefäßtonus ähnliches Zusammenspiel von Ekto-Nukleotidasen und P2-Rezeptoren könnte auch für die purinerge Regulation des Epithels in Samenleiter der Ratte existieren. Im Falle des Vas deferens könnte die Regulation des Epithels von basolateral und damit die Zusammensetzung der luminalen Elektrolyt-Konzentration, gesteuert durch den Nukleotidmetabolismus seitens der Ekto-Nukleotidasen und P2-Rezeptoren, eine wichtige Rolle für die Fertilität spielen. Tatsächlich werden P2-Rezeptoren sowohl luminal als auch basolateral auf dem epididymalen Epithel der Ratte exprimiert, welche den luminalen Elektrolythaushalt regulieren (Wong, 1988). Weiter distal gelegen, im *Caput epididymidis* der Maus, sind Epithelien identifiziert worden, welche bedeutsam für die Spermatozytenreifung sind (Shariatmadari et al., 2003). Unklar ist, welche Ekto-Nukleotidasen neben der NTPDase2 hier eine Rolle spielen. Bedeutsam sind für funktionelle Untersuchungen an der glatten Muskulatur auch Ekto-Nukleotidasen, welche sich außerhalb des synaptischen Spalts befinden. Dazu gehört wahrscheinlich der größte Anteil der Ekto-Nukleotidase-Aktivität des isolierten Vas deferens und diese ist nicht identisch mit der nachgewiesenen NTPDase2-Expression. Diese, durch die Inkubation von ATP mit Querschnitten des Vas deferens dargestellte ATPase-Aktivität, kann auf die Anwesenheit zahlreicher Nukleotidasen basieren. So kommen Enzyme der Familien der E-NTPDase, der E-NPP, die alkalische Phosphatase oder Ekto-Nukleosiddiphosphokinasen (E-NDPK) gleichermaßen in Frage. Vermutlich handelt es sich hierbei um die NTPDase1, da für dieses Enzym die Expression auf der glatten Muskulatur von Gefäßen gezeigt wurde und Evans Blau als potenter ENTPDase1-Inhibitor an epididymalen Segmenten des Samenleiters sowohl die Wirkstärke von Agonisten erhöht und den Abbau von ATP durch Gewebe des Vas deferens hemmt (siehe Kapitel 3.2.2). Nicht zuletzt können intrazelluläre Enzyme die Ursache der Präzipitation von Bleiverbindungen sein. Für die pharmakologischen Untersuchungen am isolierten Vas deferens sind jedoch nur Ekto-Nukleotidasen bedeutsam, diese könnten eine große Bedeutung in der purinergen Regulation des Tonus der glatten Muskulatur haben. Auch die Diffusion exogen zugeführter Nukleotide zum Rezeptor-Kompartiment wird durch die Ekto-Nukleotidase-Aktivität des Gewebes funktionell behindert, so dass gegenüber Ekto-Nukleotidasen stabile ATP-Analoga bis zu 100 mal potenter sind als ATP selbst (Kennedy und Leff, 1995; Bailey und Hourani, 1995).

4.3.6 Zusammenfassende Schlußfolgerungen

Die Frage nach dem P₂Y-Rezeptor-Subtyp, der die UTP-Kontraktion in Anwesenheit von Evans Blau im Vas deferens vermittelt, kann zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. In den Studien zur Charakterisierung des P_{2U}-Rezeptors mittels Agonisten, Antagonisten und spezifischen P₂Y-Rezeptor-Antikörpern konnte nur der P₂Y₆ von den in Frage kommenden Rezeptoren ausgeschlossen werden. Damit ist der Grad der Evidenz für die beiden Rezeptoren P₂Y₂ und P₂Y₄ insgesamt betrachtet hoch, aber eine weitere Charakterisierung des fraglichen P_{2U}-Rezeptors in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte war mit den verwendeten Methoden nicht möglich. Es konnten sowohl mit P₂-Liganden als auch mit P₂Y-Rezeptor-Antikörpern Hinweise für den P₂Y₂-Rezeptor erbracht werden. Jedoch der wissenschaftlich ‚saubere‘ Ausschluß des P₂Y₄-Rezeptors gelang nicht.

Eindeutig erfolgte der Nachweis der NTPDase₂, die als ‚Haupt‘-Ekto-Nukleotidase aufgrund ihrer histologischen Lokalisation für den extrazellulären Nukleotidmetabolismus nicht in Frage kommen kann. Den Hauptanteil der Ekto-Nukleotidase-Aktivität in epididymalen Segmenten des Vas deferens trägt die glatte Muskulatur. Evans Blau hemmt offensichtlich die NTPDase₁, welche bei exogen applizierten natürlichen Nukleotiden scheinbar das bedeutendste Isoenzym darstellt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit ist eingebunden in Bemühungen, physiologische/pharmakologische Befunde an nativen Rezeptoren mit denen an klonierten Rezeptoren zu korrelieren. Zu diesem Zweck sind potente und selektive P2-Rezeptor-Liganden (Agonisten und Antagonisten) äußerst hilfreich. Bislang jedoch erschweren zahlreiche Umstände, wie mangelnde P2-Rezeptor-Selektivität bzw. Spezifität, zu geringe Potenz oder Irreversibilität der Wirkung, den Nutzen dieser Liganden (siehe Kapitel 1.5). Darüber hinaus interagieren P2-Rezeptor-Liganden mit Ekto-Nukleotidasen, was ihren Einsatz weiter einschränkt. Mit Hilfe von Struktur-Wirkungs-Analysen ist es möglich, einzelne Nachteile zu eliminieren, um z.B. affine Radioliganden, die zum Auffinden neuer Zielstrukturen und Leitstrukturen für die Arzneistoffentwicklung dienen, zu entwickeln.

5.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF023-, NF279- und SB-Analoga als P2-Rezeptor-Antagonisten

Am Anfang der Arbeit stand ein breit angelegtes „Screening“ von Substanzen, die sich von NF023-, symmetrischen und unsymmetrischen NF279-Analoga ableiten. Weiterhin wurden Chimäre (heteromere, bivalente Liganden), aus Teilstrukturen des Suramins und des Pyridoxal-5'-Phosphates bestehend, untersucht. Die verwendeten „Screening“-Methoden wurden von Czeche (2001) und Damer (2002) etabliert. Ziel dieses „Screenings“ war es, neue, in ihrer antagonistischen Wirkstärke bzw. in ihrem pharmakologischen P2-Rezeptorprofil den Muttersubstanzen NF023 und NF279 überlegene P2-Rezeptor-Antagonisten zu identifizieren. Pharmakologische Befunde aus dem „Screening“ wurden als Anhaltspunkte benutzt, um mittels detaillierterer Untersuchungen systematisch Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erarbeiten. Ergebnisse bereits früherer Studien über Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden vervollständigt und für eine gezielte Synthese von unsymmetrischen und symmetrischen NF279-Analoga herangezogen (Damer, 2002). Aus der Vielzahl der untersuchten Struktur-Variationen ergaben sich folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen:

1) Für die Wirkung von **NF023** sind die Sulfonsäure-Substituenten eine wichtige Voraussetzung für die P2-Rezeptor-antagonistische Wirkung. Für die Potenz und P2X₁-Selektivität von NF023 ist mindestens ein in den Positionen C1, C3 und C5 mit SO₃H-Gruppen substituiertes Naphthalinringsystem nötig.

2) Bei Substanzen, die sich von den **symmetrischen NF279-Analoga** ableiten, konnten die vom Harnstoff am weitesten entfernte Benzoylamid-Fragmente durch bioisostere aromatische Heterozyklen, wie Furanylamid- bzw. Benzimidazol-Reste, ausgetauscht werden, ohne dass dadurch die Affinität an nativen P2-Rezeptoren, wie P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren des Vas deferens bzw. des Meerschweinchen-Ileum, vermindert wurde. Hinsichtlich P2X₁-vermittelter Wirkungen erwies sich das Sulfonamid-Derivat NF840 als neue Ausgangsstruktur für die Synthese potenter und selektiver P2-Antagonisten.

Es konnte klar gezeigt werden, dass zum einen die Anzahl und Position von Sulfonsäure-Resten am Naphthalin-Ringsystem und zum anderen die Art der Verknüpfung der Aryl-Harnstoff-Kette für die gezielte Modulation der Affinität von symmetrischen NF-Analoga an nativen P2-Rezeptoren benutzt werden kann. Während die Substanz NF279 (Hexasulfonsäure, 1'-4',1''-4''-Verknüpfung der Phenylreste) ein Maximum an Selektivität und Affinität für native P2X₁-Rezeptoren aufweist, zeigt die Substanz NF816 (Tetrasulfonsäure, 1'-3',1''-3''-verknüpft) bezüglich nativer P2X₁- und P2Y₁-Rezeptoren ein inverses pharmakologisches Profil. An nativen P2-Rezeptoren ist NF816 ein selektiver, kompetitiver und potenter P2Y₁- über P2X₁-Rezeptorantagonist (P2Y₁, pA₂ = 6,45).

3) Die pharmakologischen Eigenschaften von NF279 führten zur Synthese von **unsymmetrischen NF279-Analoga** dieser Substanz. Grundsätzlich konnte belegt werden, dass die Symmetrie von NF279 keine Voraussetzung für einen Antagonismus an nativen P2X- oder P2Y-Rezeptoren ist. Allerdings konnte bei den NF279-Teilstrukturen keine wirksamere oder P2X₁- vs. P2Y₁-selektivere Verbindung gefunden werden. Detaillierte pharmakologische Untersuchungen zeigten aber, dass NF786 ein hochpotenter, kompetitiver P2Y₁-Antagonist (pA₂ = 6,75) mit geringen Ekto-Nukleotidase-hemmenden Eigenschaften ist. Diese Substanz könnte sich als vielversprechende Leitstruktur für die Synthese von P2-Antagonisten mit geringerem Molekulargewicht erweisen.

4) Vom experimentell-pharmakologischen Standpunkt aus, stellen **SB-Analoga** eine besondere Substanzgruppe dar, da sie Teilstrukturen von PPADS und Suramin-Analoga vereinen. Struktur-Wirkungs-Beziehungen belegen, dass die chemische Verknüpfung von Teilstrukturen der NF-Analoga mit Pyridoxal-5'-Phosphat zu wirksamen P2-

Liganden führt. Unter den SB-Analoga, welche zumeist P2Y₁-selektive Substanzen darstellen, ist SB9 der potenteste, selektivste und kompetitive P2Y₁-Rezeptor-Antagonist. Die Wirkvoraussetzung für SB9 scheint die Aldehydgruppe des Pyridoxals zu sein, während die Anzahl der Sulfonsäure-Gruppen am Naphthalin-Ringsystem, sowie die Anzahl der Phenylreste und deren Verknüpfung auf die P2-Rezeptor-Affinität modulatorischen Einfluß zeigt. Fasst man SB-Analoga als Derivate des Suramins auf, dann konnte erneut gezeigt werden, dass eine Symmetrie unter den NF-Analoga keine Wirkvoraussetzung darstellt.

5) Die inhibitorische Aktivität von NF023-, symmetrischen und unsymmetrischen NF279-Analoga sowie SB-Analoga auf die Spaltung von ATP durch **Ekto-Nukleotidasen** follikulierter *Xenopus laevis* Oozyten ist für alle getesteten Substanzen vergleichbar. Tendenziell zeigen SB-Analoga mit einer chemisch aktiven Aldehydgruppe eine höhere inhibitorische Aktivität. Bei hinreichender P2-Rezeptor-antagonistischer Potenz einzelner Verbindungen ist die P2-Rezeptor- vs. Ekto-Nukleotidase-Spezifität jedoch groß genug, um störende Auswirkungen auf die funktionellen Untersuchungen auszuschließen.

5.2 Pharmakologische Charakterisierung von SB9

Aufgrund der inhibitorischen Potenz, der P2Y₁- vs. P2X₁-Rezeptor-Selektivität und seiner interessanten chemischen Struktur wurde die Verbindung SB9 pharmakologisch näher charakterisiert. SB9 stellt einen potenten, kompetitiven und selektiven P2Y₁-Antagonisten dar, mit langsamer Off- und On-Kinetik. Native P2Y₁-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileums (pA₂-Wert = 6,91) werden 10-fach stärker blockiert als native P2X₁-Rezeptoren (pA₂-Wert = 5,98) im Samenleiter der Ratte. Im Vergleich zu Ekto-Nukleotidasen wird durch SB9 der native P2Y₁-Rezeptor 447-fach stärker gehemmt. Darüber hinaus konnte aus Untersuchungen an nativen adrenergen α₁-, histaminergen H₁-, muskarinergen M₃- und Adenosin A₁-Rezeptoren der Schluß gezogen werden, dass SB9 P2-Rezeptor-spezifisch wirkt. Der heteromere bivalente Ligand, SB9, ist potenter P2Y₁-antagonistisch als die jeweiligen monomeren Vorstufen, wie das Pyridoxal-5'-Phosphat und das Suramin-Monomer. Damit scheint die Heterodimerisierung bekannter pharmakophorer Gruppen einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung selektiver P2-Rezeptor-Antagonisten zuleisten.

5.3 Charakterisierung UTP-sensitiver Rezeptoren in der *Pars epididymis* des Vas deferens der Ratte

Um mit den hier dargestellten Methoden die Anwesenheit eines Kontraktionsvermittelnden P_{2U}-Rezeptors zu belegen, muß folgendes Berücksichtigung finden:

- (I) P_{2U}-Rezeptoren der Ratte korrelieren mit mindestens zwei rekombinanten Rezeptoren, dem ratP2Y₂- und dem ratP2Y₄-Rezeptor.
- (II) Die Pharmakologie dieser Rezeptor-Subtypen ist sehr ähnlich.

Wirkung von Evans Blau auf Ekto-Nukleotidasen im Vas deferens der Ratte. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der vorliegenden Studien der Einfluss des polaren Farbstoffs Evans Blau auf die Ekto-Nukleotidasen des Vas deferens überprüft. Histochemische Befunde zeigen die starke Ekto-Nukleotidase-Aktivität insbesondere der glatten Muskulatur in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte. Die Untersuchungen sowie Daten aus der Literatur bestätigten, dass Evans Blau im Vas deferens Ekto-Nukleotidasen bzw. die NTPDase1 zu inhibieren scheint. Immunzytochemische Studien in dieser Arbeit zeigten, dass die NTPDase2 nur diskret in epididymalen Segmenten des Samenleiters der Ratte exprimiert wird und als „Haupt“-Ekto-Nukleotidase nicht in Frage kommen kann. Diese Ergebnisse und der Befund, dass Evans Blau ein P2X₁-Rezeptor-Antagonist ist, wird für die weiteren Betrachtungen zu Grunde gelegt. Demzufolge war es möglich, einen UTP-bindenden Rezeptor mit nicht-Ekto-Nukleotidase-stabilen Agonisten unter Zuhilfenahme von Evans Blau zu charakterisieren.

Wirkungen des UTP im Vas deferens der Ratte. Die Verwendung von UTP als Agonist zur Charakterisierung des P_{2U}-Rezeptors im Vas deferens hat zwei Vorteile:

- (I) Dieses Nukleotid ist deutlich P2Y-selektiver als ATP und bindet
- (II) nur an bestimmten P2Y-Rezeptor-Subtypen (P2Y₂, P2Y₄ und P2Y₆).

Mit Hilfe von TTX konnte die Beteiligung neuronaler Strukturen an der Erregung der postsynaptischen Myozytenmembran ausgeschlossen werden. Damit ist der direkte Kontraktionsvermittelnde Wirkort von UTP die Myozytenmembran.

Die klonierten P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren der Ratte zeichnen sich an beiden Rezeptoren durch eine gleichwertige Aktivierung durch ATP und UTP aus. Dieses Merkmal konnte für den Kontraktionsvermittelnden, UTP-sensitiven Rezeptor in

epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte bestätigt werden. Ergänzend konnte mit „Kreuz“-Desensibilisierungs-Versuchen der Nachweis erbracht werden, dass die Agonisten UTP und ATP an ein und denselben Rezeptor binden.

Intrazellulär binden P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren an trimere G-Proteine, welche u.a. Phospholipase C (PLC) aktivieren und schließlich über die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) aus Membranlipiden intrazelluläres Kalzium freisetzen. Lithium blockiert diese Signalkaskade. Für epididymale Segmente des Vas deferens der Ratte konnte gezeigt werden, dass die UTP-induzierten Wirkungen mittels Lithium blockierbar sind. Das legt den Schluß nahe, dass P_{2U}-Rezeptoren in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte ebenfalls an diese Signalkaskade gekoppelt und damit metabotrope Rezeptoren sind.

Zusätzlich wurde die Rolle von intrazellulärem Kalzium untersucht, wobei jedoch z.T. gegenläufige Ergebnisse erhalten wurden. Sowohl intrazellulär freigesetztes als auch extrazelluläres Kalzium scheinen für die UTP-induzierte Kontraktion epididymaler Segmente des Vas deferens von Bedeutung zu sein. Die Befunde sprechen auch für die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium, induziert durch UTP, wie es für rekombinante P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptoren der Fall ist.

Studien mit Agonisten. Unter den drei UTP-bindenden, rekombinanten Rezeptoren ist UDP, vergleichsweise zu UTP, deutlich potenter am P2Y₆-Rezeptor. Dieser sowohl an klonierten als auch an nativen P2Y₆-Rezeptoren erhaltene Befund ist von elementarer Bedeutung für die Charakterisierung des fraglichen P2Y-Rezeptors im Vas deferens. Ohne Evans Blau ist UTP etwa gleich-potent wie UDP im Vas deferens, während in Anwesenheit von Evans Blau UTP deutlich potenter als UDP ist. Daher ist - trotz der fälschlichen Identifizierung nativer P2Y₆- als P2Y₂-Rezeptoren in der Literatur - die Expression Kontraktions-vermittelnder P2Y₆-Rezeptoren unwahrscheinlich und wurde an dieser Stelle in epididymalen Segmenten des Vas deferens ausgeschlossen.

Die Aktivitätsreihenfolgen von Agonisten eigneten sich nur bedingt zur Charakterisierung der P2-Rezeptoren im Vas deferens. Die Aktivitäten der P2-Agonisten basieren zum einen auf der P2X₁- und P2Y₂/P2Y₄(-ähnlichen)-Rezeptor-Heterogenität im Vas deferens und zum anderen auf der Ekto-Nukleotidase-Stabilität von einigen der verwendeten Nukleotide. Zu den P2X-Liganden werden α,β -meATP, 2MeSATP, ATP γ S und Ap₄A gezählt. Bei den letzten zwei sind neben der P2X-

agonistischen auch potente P2Y₂-agonistische Wirkungen belegt. Aus diesem Grund ist im Vas deferens eine Diskriminierung zwischen P2X und P2Y-vermittelten Effekten mittels Ap₄A oder ATPγS alleine nicht möglich. Allerdings kann in Anwesenheit von Evans Blau bei diesen Agonisten von einer starken Hemmung der P2X₁-Rezeptor-vermittelten Kontraktion ausgegangen werden. Demnach müßten die ATPγS- bzw. Ap₄A-induzierten Kontraktionen P_{2U}-vermittelt sein. Während mit Ap₄A keine Unterscheidung von P2Y₂ und P2Y₄-Rezeptoren möglich ist, deuten die Befunde mit ATPγS auf den P2Y₂-Rezeptor hin, da der P2Y₄-Rezeptor von ATPγS nur schwach partial-agonistisch aktiviert wird. Die Wirkungen von Ap₄A und ATPγS an epididymalen Segmenten des Vas deferens nähren die Vermutung, dass P2Y₂(-ähnliche)-Rezeptoren UTP-bedingte Kontraktionen verursachen.

Nicht ins Bild einer P2X₁-/P_{2U}-Rezeptor-Heterogenität passen die Befunde zu ADP und ADPβS. Gründe hierfür können (i) Verunreinigungen im ADP mit ATP, (ii) die Anwesenheit von Ekto-Nukleosiddiphosphat-Kinasen (E-NDPK) sein. Ob neben den P2X₁- und P_{2U}-Rezeptoren ein dritter Kontraktions-vermittelnder P2-Rezeptor vorliegt oder nicht, konnte in dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Studien mit Antagonisten. Bezüglich der inhibitorischen Wirkung von klassischen P2-Antagonisten, wie Suramin, PPADS und Reaktiv Blau 2 (RB 2) an klonierten P2Y₂- bzw. P2Y₄-Rezeptoren der Ratte liegen widersprüchliche Daten vor. Folgt man der Mehrheitsmeinung, so ist Suramin geeignet, zwischen den Rezeptor-Subtypen P2Y₂ und P2Y₄ zu diskriminieren. Suramin ist in epididymalen Segmenten des Vas deferens bis zu einer Konzentration von 100 μM nur ein schwacher Inhibitor der UTP-induzierten Kontraktion. Somit erscheint die Anwesenheit eines P2Y₂-Rezeptors im Vas deferens unwahrscheinlich. Jedoch wird diese Sicht nicht durch die Wirksamkeit von PPADS im Vas deferens gestützt, da es an klonierten P2Y₂-Rezeptoren der Ratte wirksam ist und an klonierten ratP2Y₄-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Expressionssystem sowie der Inkubationsdauer widersprüchliche Daten zur Wirksamkeit vorliegen. Leider wurde RB 2 bislang noch nicht am ratP2Y₂-Rezeptor getestet. Die Wirkung der verwendeten Agonisten läßt den Schluß zu, dass in epididymalen Segmenten P_{2U}-Rezeptoren exprimiert werden, jedoch ist eine zweifelsfreie Bestimmung der Identität nicht möglich.

Rezeptor-Antikörper-Studien. Für die Expression von P2Y₂-Rezeptoren im Vas deferens sprechen immunzytochemische Studien dieser Arbeit. Mit dem spezifischen polyklonalen P2Y₂-Rezeptor-Antikörper konnte eine Myozyten-, Epithel-assoziierte und neuronale Immunreaktivität demonstriert werden. Im Gegensatz dazu war die P2Y₄-Rezeptor-Markierung größtenteils unspezifisch. Daher konnte jedoch die Expression des P2Y₄-Rezeptors auf den Myozyten nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt betrachtet sprechen die immunzytochemischen Untersuchungen für die Expression des P2Y₂-Rezeptors in epididymalen Segmenten des Vas deferens der Ratte.

Schlußfolgerung. Alle Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung des UTP-sensitiven Rezeptors lassen den Schluß zu, dass die glatte Muskulatur epididymaler Segmente des Vas deferens der Ratte P_{2U}-Rezeptoren, welche eine Kontraktion vermitteln, exprimieren. Während die gleichwertige Aktivierung durch ATP und UTP, die Wirkung von ATPγS, von PPADS und die immunzytochemischen Befunde eher für den P2Y₂-Rezeptor-Subtyp sprechen, weisen die Befunde mit Suramin und Reaktiv Blau 2 auf P2Y₄-Rezeptoren hin. Unabhängig von der Identität des P2Y-Rezeptor-Subtyps stellen diese Befunde den Samenleiter der Ratte pharmakologisch betrachtet in ein neues Licht. Das Vas deferens der Ratte gilt u.a. als Standard-Modell für Ligand-gesteuerte P2X-Kanäle. Ein G-Protein-gekoppelter P2-Rezeptor müsste bei der Verwendung von Liganden wie ATP zu einer Fehlinterpretation von Agonist- bzw. Antagonistaktivitäten führen. Allerdings bietet die P2-Rezeptorheterogenität auch neue Ansatzpunkte für physiologisch-pharmakologischen Untersuchungen von nativen P_{2U}-Rezeptoren. Für diesen Rezeptor existieren keine potenten und Subtyp-selektiven Antagonisten. Auch die Modulation von Wirkungen an P2-Rezeptoren durch Ekto-Nukleotidasen ist im Vas deferens eindrucksvoll zu beobachten. Somit ließe sich das Vas deferens als Ekto-Nukleotidase- und als P_{2U}-Rezeptor-Modell nutzen, um neue biologisch aktive Substanzen für native Enzyme und Rezeptoren zu ermitteln.

Das hier gewählte Versuchsdesign, in welchem Evans Blau eine zentrale Rolle spielt, erwies sich im Sinne eines P_{2U}-Rezeptor-Modells bedingt tauglich. Zur Etablierung des Samenleiters der Ratte als P2Y₂- bzw. P2Y₄-Rezeptor-Modell gibt es in Zukunft 2 Möglichkeiten: Erstens die Verwendung von potenten, Subtyp-selektiven, Ekto-Nukleotidase-stabilen P2Y₂/P2Y₄-Rezeptor-Agonisten bzw. Antagonisten oder zweitens den Einsatz eines potenten, selektiven und spezifischen Ekto-Nukleotidase-Inhibitors.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbraccio 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. & 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.
- Abbraccio M. P., Cattabeni F, Fredholm B. B. & Williams M. (1993)** Purinoceptor nomenclature: A status report. *Drug Dev. Res.* 28: 207-213.
- Amobi N. I. B. & Smith I. C. H. (1999)** Different actions in the rat prostatic and epididymal vas deferens of cyclopiazonic acid or ryanodine on noradrenaline-induced contractions. *Gen. Pharmacol.* 32: 271-278.
- Andersson K. E. (2002)** Overactive bladder-pharmacological aspects. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 210: 72-81.
- Arunlakshana O. & Schild O. H. (1959)** Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14: 48-58.
- Bailey S. J. & Hourani S. M. O. (1994)** Differential effects of suramin on P2-purinoceptors mediating contraction of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 112: 219-225.
- Bailey S. J. & Hourani S. M. O. (1995)** Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 114: 1125-1132.
- Bargmann W. (1967)** *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 6. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Barnard E. A. (2000)** Imagination and reality in the search for the P2Y receptors. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 10-15.
- Barnard E. A., Simon J., Tsim K. W. K., Filippov A. K. & Brown D. A. (2003)** Signalling pathways and ion channel regulations of P2Y receptors. *Drug Dev. Res.* 59: 36-48.
- Baurand A., Raboisson P., Freund M., Leon C., Cazenave J. P., Bourguignon J. J. & Gachet C. (2001)** Inhibition of platelet function by administration of MRS 2179, a P2Y₁ receptor antagonist. *Thromb. Haemostasis* 412: 213-221
- Belayev L., Khoutorova L., Deisher T. A., Belayev A., Busto R., Zhang Y. B., Zhao W. Z. & Ginsberg M. D. (2003)** Neuroprotective effect of SolCD39, a novel platelet aggregation inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 34: 758-763.
- Berridge M. J., Downes C. P. & Hanley M. R. (1989)** Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59: 411-419.
- Bianchi B., Lynch K. J., Touma E., Niforatos W., Burgard C. E., Alexander K. M., Park H. S., Yu H. X., Metzger R., Kowaluk E., Jarvis M. F. & van Biesen T. (1999)** Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376: 127-138.
- Bigonnesse F., Levesque S.A., Kukulski F., Lecka J., Robson S.C., Fernandes M.J. & Seigny 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. & Szeto H. H. (2002)** Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J. Lab. Clin. Medicine* 140: 166-175.
- Bo X., Zhang Y., Nassar M., Burnstock G. & Schoepfer R. (1995)** A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375: 129-133.
- Boarder M. R. & Hourani S. M. O. (1998)** The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 99-107.
- Boarder M. R. & Webb T. E. (2001)** P2Y receptors: structure and function. In: *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling I. Molecular, Nervous and Urogenitary System Function.* (Abbraccio M.P., Williams M., eds), pp 65-88. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Boarder M. R., White P. J., Roberts R. J. & Webb T. E. (2001)** Regulation of vascular endothelial cells and vascular smooth muscle cells by multiple P2Y receptor subtypes. *Drug Dev. Res.* 53: 180-185.
- Boehm S. (2003)** P2Ys go neuronal: modulation of Ca²⁺ and K⁺ channels by recombinant receptors. *Br. J. Pharmacol.* 138: 1-3.
- Boeynaems J.-M., Communi D., Piroton S., Motte S. & Parmentier M. (1996)** Involvement of distinct receptors in the actions of extracellular uridine nucleotides. *Ciba Found. Symp.* 198: 266-274.

- Boeynaems J.-M., Robaye B., Janssens R., Suarez-Huerta N. & Communi D.** (2001) Overview of P2Y receptors as therapeutic targets. *Drug Dev. Res.* 52: 187-189.
- Boeynaems J.-M., Wilkin F., Marteau F., Duhant X., Savi P., Suarez Gonzalez N., Robaye B & Communi D.** (2003) P2Y receptors: new subtypes, new functions. *Drug Dev. Res.* 59: 30-35.
- Bogdanov Y. D., Wildman S. S., Clements M. P., King B. F. & Burnstock G.** (1998) Molecular cloning and characterization of rat P2Y₄ nucleotide receptor. *Br. J. Pharmacol.* 124: 428-430.
- Bollen M., Gijssbers R., Ceulemans H., Stalmans W. & Stefan C.** (2000) Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35: 393-432.
- Boue-Grabot E., Barajas-Lopez C., Chakfe Y., Blais D., Belanger D., Emerit M. B. & Seguela P.** (2003) Intracellular cross talk und physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J. Neurosci.* 23: 1246-1253.
- Boyer J. L., Romero-Avila T., Schachter J. B. & 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. & 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. & 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.
- Brake A. J., Wagenbach M. J. & Julius D.** (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523.
- Braun K., Rettinger J., Ganso M., Hildebrandt C., Nickel P., Schmalzing G. & Lambrecht G.** (2001) NF449-the first subnanomolar P2 antagonist selective for recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364: 285-290.
- Braun N., Zhu Y., Kriegelstein J., Culmsee C. & Zimmermann H** (1998) Upregulation of enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischemia in the rat. *J. Neurosci.* 18: 4891-4900.
- Braun N., Sevigny J., Mishra S. K., Robson S. C., Barth S. W., Gerstberger R., Hammer K. & Zimmermann H.** (2003) Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 17:1355-1364.
- Brown D. A., Docherty J. R., French A. M., MacDonald A., McGrath J. C. & Scott N. C.** (1983) Separation of adrenergic and non-adrenergic contractions to field stimulation in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 79: 379-393.
- Brown S. G., King B. F., Kim Y. C., Jang S. Y., Burnstock G. & Jacobson K. A.** (2000) Activity of novel adenine nucleotide derivates 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. & King B. F.** (2000) 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. & 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. & Surprenant A.** (1996) An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15: 55-62.
- Burnstock G.** (1998) Purinergic Signaling: Therapeutic Potential. *Drug Dev. Res.* 45: 86-92.
- Burnstock G.** (1999) Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50: 355-357.
- Burnstock G.** (2002) Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 364-373.
- Burnstock G. & Lavin S.** (2002) Interstitial cells of Cajal and purinergic signalling. *Auton. Neurosci.* 97: 68-72.
- Burnstock G. & Kennedy C.** (1985) Is there a basis for distinguishing two types of purinoceptors? *Gen. Pharmacol.* 19: 433-440.
- Burton L. D., Housley G. D., Salih S. G., Jarlebark L., Christie D. L. & Greenwood D.** (2000) P2X₂ receptor expression by interstitial cells of Cajal in vas deferens implicated in semen emission. *Auton. Neurosci.* 84: 147-161.

- Buvinic S., Briones R. & Huidobro-Toro J. P.** (2002) P2Y₁ and P2Y₂ receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br. J. Pharmacol.* 136: 847-856.
- Bültmann R. & Starke K.** (1993) Evans blue blocks P2X-purinoceptors in rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348: 684-687.
- Bültmann R. & Starke K.** (1994) P2-purinoceptor antagonists discriminate three contraction-mediating receptors for ATP in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 349: 74-80
- Bültmann R. & Starke K.** (1995) Reactive red 2: a P_{2Y}-selective purinoceptor antagonist and an inhibitor of ecto-nucleotidase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352: 477-482.
- Bültmann R., von Kügelgen I. & Starke K.** (1993) Effects of nifedipine and ryanodine on adrenergic neurogenic contractions of rat vas deferens: evidence for a pulse-to-pulse change in Ca²⁺ sources. *Br. J. Pharmacol.* 108: 1062-1070.
- Bültmann R., Kurz A. K. & Starke K.** (1994) α₁-adrenoceptors and calcium sources in adrenergic neurogenic contractions of rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 111: 151-158.
- Bültmann R., Driessen B., Goncalves J. & Starke K.** (1995) Functional consequences of inhibition of nucleotide breakdown in rat vas deferens: a study with Evans blue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351: 555-560.
- Bültmann R., Dudeck O. & Starke K.** (1996a) Evaluation of P2-purinoceptor antagonists at two relaxation-mediating P2-purinoceptors in guinea-pig taenia coli. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353: 445-451.
- Bültmann R., Wittenburg H., Pause B., Kurz G., Nickel P. & Starke K.** (1996b) P2-purinoceptor antagonists: III. Blockade of P2-purinoceptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to suramin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354: 498-504.
- Bültmann R., Klebroff W. & Starke K.** (1999a) A contraction-mediating receptor for UTP, presumably P2Y₂, in rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360: 196-201.
- Bültmann R., Trendelenburg M., Tuluc F., Wittenburg H. & Starke K.** (1999b) Concomitant blockade of P2X-receptors and ecto-nucleotidases by P2-receptor antagonists: functional consequences in rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359: 339-344.
- Cascalheira J. F. & Sebastiao A. M.** (1992) Adenine nucleotide analogues, including γ-phosphate-substituted analogues, are metabolised extracellularly in innervated frog sartorius muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 222: 49-59.
- Cattaneo M.** (2003) The platelet P2Y receptors as targets for new antithrombotic drugs. *J. Thromb. and Haemost.* 1: 1133-1135.
- Chadwick B. P. & Frischauf A. M.** (1997) Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes. *Mamm. Genome* 8: 668-672.
- Chambers J. K., Macdonald L. E., Sarau H. M., Ames R. S., Freeman K., Foley J. J., Zhu Y., McLaughlin M. M., Murdock P., McMillan L., Trill J., Swift A., Aiyar N., Taylor P., Vawter L., Naheed S., Szekeres P., Hervieu G., Scott C., Watson J. M., Murphy A. J., Duzic E., Klein C., Bergsma D. J., Wilson S. & Livi G. P.** (2000) A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* 275: 10767-10771.
- Charlton S. J., Brown C. A., Weisman G. A., Turner J. T., Erb L. & Boarder M. R.** (1996a) Cloned and transfected P2Y₄ receptors: characterization of a suramin and PPADS-insensitive response to UTP. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1301-1303.
- Charlton S. J., Brown C. A., Weisman G. A., Turner J. T., Erb L. & Boarder M. R.** (1996b) PPADS and suramin as antagonists at cloned P_{2Y}- and P_{2U}-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 118: 704-710.
- Chen B. C. & Lin W. W.** (1997) Inhibition of ecto-ATPase by the P2 purinoceptor agonists, ATPγS, α,β-methylene-ATP, and AMP-PNP, in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 442-446.
- Chen Z. P., Krull N., Xu S., Levy A. & Lightman S. L.** (1996) Molecular cloning and functional characterization of a rat pituitary G protein-coupled adenosine triphosphate (ATP) receptor. *Endocrinology* 137: 1833-1840.
- Cheng H. C.** (2002) The power issue: determination of K_B or K_i from IC₅₀. A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 46: 61-71.
- Cheng Y.-C. & Prusoff W. H.** (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.

- Chootip K., Ness K. F., Wang Y., Gurney A. M. & Kennedy C.** (2002) Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation. *Br. J. Pharmacol.* 137: 637-646.
- Ciruela F., Saura C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. & Franco R.** (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* 380: 219-223.
- Collo G., North R. A., Kawashima E., Merlo-Pich E., Neidhart S., Surprenant A. & Buell G.** (1996) Cloning of P2X₅ and P2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16: 2495-2507.
- Communi D., Piroton S., Parmentier M. & Boeynaems J. M.** (1995) Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 30849-30852.
- Communi D., Motte S., Boeynaems J.-M. & Piroton S.** (1996) Pharmacological characterization of the human P2Y₄ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 317: 383-389.
- Communi D., Janssens R., Suarez-Huerta N., Robaye B. & Boeynaems J. M.** (2000) Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell. Signal.* 12: 351-360.
- Connolly G. P. & Harrison P. J.** (1994) Reactive blue 2 discriminates between responses mediated by UTP and those evoked by ATP or α,β -methylene-ATP on rat sympathetic ganglia. *Eur. J. Pharmacol.* 259: 95-99.
- Connolly G. P. & Duley J. A.** (1999) Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 218-225.
- Coutinho-Silva R., Parsons M., Robson T. & Burnstock G.** (2001) Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. *Cell Tissue Res.* 306: 373-383.
- Crack B. E., Pollard C. E., Beukers M. W., Roberts S. M., Hunt S. F., Ingall A. H., McKechnie K. C., Ijzerman A. P. & Leff P.** (1995) Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 114: 475-481.
- Cressman V. L., Lazarowski E., Homolya L., Boucher R. C., Koller B. H. & Grubb B. R.** (1999) Effect of loss of P2Y₂ receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl⁻ transport. *J. Biol. Chem.* 274: 26461-26468.
- Cunha R. A. & Ribeiro J. A.** (2000) ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci.* 68: 119-137.
- Czeche S.** (2001) Pharmacological investigations on muscarinic and P2 receptor subtypes. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.*
- Damer S., Niebel B., Czeche S., Nickel P., Ardanuy U., Schmalzing G., Rettinger J., Mutschler E. & Lambrecht G.** (1998) NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 350: R5-R6.
- Damer S., Czeche S., Ganso M., Nickel P., Niebel B., Mutschler E. & Lambrecht G.** (1999) Structure-activity relationship studies of compounds related to the P2X₁ receptor antagonist NF279. *Abstract-Book, 12th Camerino-Noordwijkerhout Symposium, "Receptor Chemistry Towards the Third Milenium", Camerino/Italy: 5-9 September.*
- Damer S.** (2002) Pharmacological evaluation of NF279 as a P2 receptor antagonist. *Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.*
- Dartt D. A.** (2002) Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 21: 555-576.
- Davidson J. S., Wakefield I. K., Sohnius U., van der Merwe P. A. & Millar R. P.** (1990) A novel extracellular nucleotide receptor coupled to phosphoinositidase-C in pituitary cells. *Endocrinology* 126: 80-87.
- Dean M. K., Higgs C., Smith R. E., Bywater R. P., Snell C. R., Scott P. D., Upton G. J. G., Howe T. J. & Reynolds C. A.** (2001) Dimerization of G-protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.* 44: 4595-4614.
- Dehpour A. R., Tajkhorshid E., Alimian M. & Behbahani N. R.** (1995) Different calcium dependencies of contractile activity of prostatic and epididymal portions of rat vas deferens. *Gen. Pharmacol.* 26: 633-639.
- Delicado E. G., Jimenez A. I., Castro E. & Miras-Portugal T.** (2001) Cerebellar astrocytes coexpress different purinoceptors: Cross-talk between several transduction mechanisms. *Drug Dev. Res.* 52: 114-121.

- Di Virgilio F., Chiozzi P., Ferrari D., Falzoni S., Sanz J. M., Morelli A., Torboli M., Bolongesi G. & Baricordi O.R.** (2001) Nukleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 97: 587-599.
- Dixon C. J., Hall J. F. & Boarder M. R.** (2003) ADP stimulation of inositol phosphates in hepatocytes: role of conversion to ATP and stimulation of P2Y₂ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 138: 272-278.
- Dol-Gleizes F., Mares A. M., Savi P. & Herbert J. M.** (1999) Relaxant effect of 2-methyl-thioadenosine diphosphate on rat thoracic aorta: effect of clopidogrel. *Eur. J. Pharmacol.* 247-253.
- Donaldson S. H., Picher M. & Boucher R. C.** (2002) Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 26: 209-215.
- Dranoff J. A., Kruglov E. A., Robson S. C., Braun N., Zimmermann H. & Seigny J.** (2002) The ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase2/CD39L1 is expressed in a novel functional compartment within the liver. *Hepatology* 36: 1135-1144.
- Driessen B. & Starke K.** (1994) Modulation of neural noradrenaline and ATP release by angiotensin II and prostaglandin E2 in guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350: 618-625.
- Driessen B., von Kügelgen I. & Starke K.** (1993) Neural ATP release and its α_2 -adrenoceptor-mediated modulation in guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348: 358-366.
- Dubyak G. R.** (2003) Knock-out mice reveal tissue-specific roles of P2Y receptor subtypes in different epithelia. *Mol. Pharmacol.* 63: 773-776.
- Dudeck O., Bültmann R. & Starke K.** (1995) Two relaxation-mediating P2-purinoreceptors in guinea-pig taenia caeci. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351: 107-110.
- Dunn P. M.** (2000) Fertility: purinergic receptors and the male contraceptive pill. *Curr. Biol.* 10: R305-R307.
- Dunwiddie T. V., Diao L. & Proctor W. R.** (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17: 7673-7682.
- Dutton J. L., Poronnik P., Li G. H., Holding C. A., Worthington R. A., Vandenberg R. J., Cook D. I., Barden J. A. & Bennett M. R.** (2000) P2X₁ receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39: 2054-2066.
- Eccles J. C.** (1964) *The physiology of synapses.* Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Eltze M. & Ullrich B.** (1996) Characterization of vascular P2 purinoreceptors in the rat isolated perfused kidney. *Eur. J. Pharmacol.* 306: 139-152.
- Ennion S. J. & Evans R. J.** (2001) Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X₁ in rat vas deferens. *FEBS Lett.* 489: 154-158.
- Ennion S. J. & Evans R. J.** (2002) Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X₁ receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol. Pharmacol.* 61: 303-311.
- Ennion S. J., Hagan S. & Evans R. J.** (2000) The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X₁ receptors. *J. Biol. Chem.* 275: 29361-29367.
- Erlinge D.** (1998) Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 31: 1-8.
- Evans R. J.** (1996) The molecular biology of P2X receptors. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 309-310.
- Evans R. J., Lewis C., Buell G., Valera S., North R. A. & Surprenant A.** (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P_{2x} purinoreceptors). *Mol. Pharmacol.* 48: 178-183.
- Evans R. J., Lewis C., Virginio C., Lundstrom K., Buell G., Surprenant A. & North R. A.** (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol.* 497: 413-422.
- Failer B. U., Aschrafi A., Schmalzing G. & Zimmermann H.** (2003) Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* 270: 1802-1809.
- Fedan J. S., Hogaboom G. K., O'Donnel J. P., Colby J. & Westfall D. P.** (1981) Contribution by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea pig. *Br. J. Pharmacol.* 69: 41-53.

- Fedan J. S., Hogaboom G. K., Westfall D. P. & O'Donnel J. P.** (1982) Comparison of the effects of arylazido aminopropionyl ATP (ANAPP3), an ATP antagonist, on responses of the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens to ATP and related nucleotides. *Eur. J. Pharmacol.* 85: 277-290.
- Forsyth K. M., Bjur R. A. & Westfall D. P.** (1991) Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256: 821-826
- Fredholm B. B., Hedqvist P., Lindstrom K. & Wennmalm M.** (1982) Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation. *Acta Physiol. Scand.* 116: 285-295.
- Fredholm B. B., Assender J. W., Irenius E., Kodama N. & Saito N.** (2003) Synergistic effects of adenosine A₁ and P2Y receptor stimulation on calcium mobilization and PKC translocation in DDT1 MF-2 cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 23: 379-400.
- Friel D. D.** (1988) An ATP-sensitive conductance in single smooth muscle cells from the rat vas deferens. *J. Physiol.* 401: 361-380.
- Fujihara T., Murakami T., Fujita H., Nakamura M. & Nakata K.** (2001) Improvement of corneal barrier function by the P2Y₂ agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 96-100.
- Gallagher C. J. & Salter M. W.** (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci.* 23: 6728-6739.
- Gabriëls G., Rahn K., Schlatter E. & Steinmetz M.** (2002) Mesenteric and renal vascular effects of diadenosine polyphosphates (Ap_nA). *Cardiovasc. Res.* 56: 22-32.
- Galligan J. J., Hess M. C., Miller S. B. & Fink G. D.** (2001) Differential localization of P2 receptor subtypes in mesenteric arteries and veins of normotensive and hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 478-485.
- Gao L., Dong L. & Whitlock J. P., Jr.** (1998) A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression. *J. Biol. Chem.* 273: 15358-15365.
- Gendron F.-P., Halbfinger E., Fischer B., Duval M., D'Orleans-Juste P. & Beaudoin A. R.** (2000) Novel inhibitors of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases: chemical synthesis and biochemical and pharmacological characterizations. *J. Med. Chem.* 43: 2239-2247.
- Gendron F.-P., Benrezzak O., Krugh B. W., Kong Q., Weisman G. A. & Beaudoin A. R.** (2002) Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr. Drug Targets* 3: 229-245.
- Glänzel M., Bültmann R., Starke K. & Frahm A. W.** (2003a) Constitutional isomers of reactive blue 2 - selective P2Y-receptor antagonists? *Eur. J. of Med. Chem.* 38: 303-312.
- Glänzel M., Bültmann R., Starke K. & Frahm A. W.** (2003b) Members of the acid blue 129 family as potent and selective P2Y-receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* 59: 64-71.
- Goding J. W., Grobden B. & Slegers H.** (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1638: 1-19.
- Gödecke S., Decking U. K., Gödecke A. & Schrader J.** (1996) Cloning of the rat P_{2u} receptor and its potential role in coronary vasodilation. *Am. J. Physiol.* 270: C570-C577.
- Greco N. J., Tonon G., Chen W. D., Luo X. Y., Dalal R. & Jamieson G. A.** (2001) Novel structurally altered P_{2X1} 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 N. D. & Mortimore M. P.** (2001) The medicinal chemistry of the P2 receptor family. *Prog. Med. Chem.* 38: 115-187.
- Gutierrez A. M., Leu X. F., Persson A. E. G. & Ring A.** (2000) Growth hormones reverse desensitization of P2Y₂ receptors in rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 594-599.
- Hagger R., Finlayson C., Jeffrey I. & Kumar D.** (1997) Role of the interstitial cells of Cajal in the control of gut motility. *Br. J. Surg.* 84: 445-450.
- Halazy S.** (1999) G-protein-coupled receptors bivalent ligands and drug design. *Exp. Opin. Ther. Patents* 9: 431-446.
- Hallcher L. M. & Sherman W. R.** (1980) The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo- inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 255: 10896-10901.
- Hansen M. A., Bennett M. R. & Barden J. A.** (1999) Distribution of purinergic P2X receptors in the rat heart. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78: 1-9.

- Hansmann G., Bültmann R., Tuluc F. & Starke K.** (1997) Characterization by antagonists of P2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356: 641-652.
- Harden T. K., Lazarowski E. R. & Boucher R. C.** (1997) Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G-protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 43-46.
- Harden T. K., Barnard E. A., Boeynames H.-M., Burnstock G., Dubyak G., Hourani S. M. O. & Insel P. A.** (1998) Nucleotides receptors: P2Y receptors. In *IUPHAR Compendium of Receptor Characterisation and Classification*, IUPHAR Media; pp 209-217.
- Harper S., Webb T. E., Charlton S. J., Ng L. L. & Boarder M. R.** (1998) Evidence that P2Y₄ nucleotide receptors are involved in the regulation of rat aortic smooth muscle cells by UTP and ATP. *Br. J. Pharmacol.* 703-710.
- Hay D. W. & Wadsworth R. M.** (1983) The effects of calcium channel inhibitors on twitches and noradrenaline contractions of the rat bisected vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 87: 367-378.
- Hechler B., Zhang Y., Eckly A., Cazenave J. P., Gachet C. & Ravid K.** (2003) Lineage-specific overexpression of the P2Y₁ receptor induces platelet hyper-reactivity in transgenic mice. *J. Thromb. and Haemost.* 1: 155-163.
- Heine P., Braun N., Heilbronn A. & Zimmermann H.** (1999) Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* 262: 102-107.
- Ho C., Hicks J. & Salter M. W.** (1995) A novel P2-purinoceptor expressed by a subpopulation of astrocytes from the dorsal spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2909-2918.
- Hoffmann C., Heine P., Pradel G., Kim Y. C., Jacobson K. A. & Zimmermann H.** (2000) Inhibition of ecto-apyrase and ecto-ATPase by pyridoxal phosphate-related compounds. *Drug Dev. Res.* 51: 153-158.
- Hollywood M. A., Cotton K. D., McHale N. G. & Thornbury K. D.** (1998) Enhancement of Ca²⁺-dependent outward current in sheep bladder myocytes by evans blue dye. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 435: 631-636.
- Homolya L., Watt W. C., Lazarowski E. R., Koller B. H. & 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. & Lambrecht G.** (2002) Is MRS 2179 P2Y₁-selective in whole tissues? *Drug Dev. Res.* 56: A153
- Horowitz B., Ward S. M. & Sanders K. M.** (1999) Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 19-43.
- Hou M., Malmjö M., Moller S., Pantev E., Bergdahl A., Zhao X. H., Sun X. Y., Hedner T., Edvinsson L. & Erlinge D.** (1999) Increase in cardiac P2X₁- and P2Y₂-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life Sci.* 65: 1195-1206.
- Hou M., Harden T. K., Kuhn C. M., Baldetorp B., Lazarowski E., Pendergast W., Moller S., Edvinsson L. & Erlinge D.** (2002) UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y₆ receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282: H784-H792.
- Hourani S. M. O.** (2001) Discovery and recognition of purine receptor subtypes on platelets. *Drug Dev. Res.* 52: 140-149.
- Housley G. D., Greenwood D., Bennett T. & Ryan A. F.** (1995) Identification of a short form of the P2xR1-purinoceptor subunit produced by alternative splicing in the pituitary and cochlea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 501-508.
- Hoyle C. H., Pintor J., Gualix J. & Miras-Portugal M. T.** (1997) Antagonism of P2X receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate. *Eur. J. Pharmacol.* 333 : R1-2
- Huwiler A., Rolz W., Dorsch S., Ren S. & Pfeilschifter J.** (2002) Extracellular ATP and UTP activate the protein kinase B/Akt cascade via the P2Y₂ purinoceptor in renal mesangial cells. *Br. J. Pharmacol.* 136: 520-529.
- Hülsmann M., Nickel P., Kassack M., Schmalzing G., Lambrecht G. & Markwardt F.** (2003) NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P2X₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 470: 1-7.
- Ishiguchi T., Takahashi T., Itoh H. & Owyang C.** (2000) Nitroergic and purinergic regulation of the rat pylorus. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G740-G747.

- Jacobson K. A. & Knutsen L. J. S.** (2001) P1 and P2 purine and pyrimidine receptor ligands. In: Handbook of Experimental Pharmacology; Purinergic and Pyrimidinergetic Signalling I Abbraccio MP & Williams M (eds), Vol. 151/I, pp 129-175. Berlin, Springer-Verlag.
- Jacobson K. A., Kim Y.-C., Camaioni E. and van Rhee A.M.**(1998a) Structure activity relationships of P2 receptor agonist and antagonist. In: Turner, J. T., Weisman, G. A., and Fedan, J. S. (eds), The P2 Nucleotide Receptors, Totowa, Humana press.
- Jacobson K. A., Kim Y. C., Wildman S. S., Mohanram A., Harden T. K., Boyer J. L., King B. F. & Burnstock G.** (1998b) A pyridoxine cyclic phosphate and its 6-azoaryl derivative selectively potentiate and antagonize activation of P2X₁ receptors. *J. Med. Chem.* 41: 2201-2206.
- Jacobson K. A., Hoffmann C., Kim Y.-C., Camaioni E., Nandan E., Jang S. Y., Guo D.-P., Ji X.-D., von Kügelgen I., Moro S., Ziganshin A. U., Rychkov A., King B. F., Brown S. G., Wildman S. S., Burnstock G., Boyer J. L., Mohanram A. & Harden K. T.** (1999) Molecular recognition in P2 receptors: ligand development aided by molecular modeling and mutagenesis. *Prog. Brain Res.* 120: 119-132.
- Jacobson K. A., Jarvis M. F. & Williams M.** (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* 45: 1-37.
- Janssens R., Paindavoine P., Parmentier M. & Boeynaems J. M.** (1999) Human P2Y₂ receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* 127: 709-716.
- Jiang L.-H., Kim M., Spelta V., Bo X., Surpremant A. & North R. A.** (2003) Subunit arrangement in P2X receptors. *J. Neurosci.* 23: 8903-8910.
- Jimenez A. I., Castro E., Communi D., Boeynaems J. M., Delicado E. G. & Miras-Portugal M. T.** (2000) Coexpression of several types of metabotropic nucleotide receptors in single cerebellar astrocytes. *J. Neurochem.* 75: 2071-2079.
- Johnson C. R. & Hourani S. M. O.** (1994) Contractile effects of uridine 5'-triphosphate in the rat duodenum. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1191-1196.
- Kaczmarek E., Koziak K., Sevigny J., Siegel J. B., Anrather J., Beaudoin A. R., Bach F. H. & Robson S. G.** (1996) Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- Kaskov L., Ellis J., Kirkpatrick K., Milner P. & Burnstock G.** (1988) Direct evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine 5'-triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerve supplying the guinea-pig vas deferens. *J. Auton. Nerv. Syst.* 22: 75-82.
- Kassack M. U., Braun K., Ganso M., Ullmann H., Nickel P., Böing B., Müller G. und Lambrecht G.** (2004) Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selektive known P2X₁ receptor antagonist. *Eur. J. Med. Chem.* 39: 345-357.
- Kegel B., Braun N., Heine P., Maliszewski C. R. & Zimmermann H.** (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36: 1189-1200.
- Kellerman D. J.** (2002) P2Y₂ receptor agonists: a new class of medication targeted at improved mucociliary clearance. *Chest* 121: 201S-205S.
- Kellerman D. J., Evans R., Mathews D. & Shaffer C.** (2002) Inhaled P2Y₂ receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54: 1463-1474.
- Kenakin T. P.** (1980a) Effects of equilibration time on the attainment of equilibrium between antagonists and drug receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 66: 295-306.
- Kenakin T. P.** (1980b) On the importance of agonist concentration-gradients within isolated tissues. Increased maximal responses of rat vasa deferentia to (-)-noradrenaline after blockade of neuronal uptake. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 833-838.
- Kenakin T. P.** (1984) The relative contribution of affinity and efficacy to agonist activity: organ selectivity of noradrenaline and oxymetazoline with reference to the classification of drug receptors. *Br. J. Pharmacol.* 81: 131-141.
- Kenakin T. P.** (1993) Pharmacologic analysis of drug - receptor interaction. New York, Raven Press.
- Kennedy C. & Leff P.** (1995) How should P2X purinoceptors be classified pharmacologically? *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 168-174.
- Kennedy C., Qi A. D., Herold C. L., Harden T. K. & Nicholas R. A.** (2000) ATP, an agonist at the rat P2Y₄ receptor, is an antagonist at the human P2Y₄ receptor. *Mol. Pharmacol.* 57: 926-931.
- Khakh B. S., Michel A. & Humphrey P. P. A.** (1994) Estimates of antagonist affinities at P_{2X} purinoceptors in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 263: 301-309.

- Khakh B. S., Surprenant A. & Humphrey P. P. A.** (1995) A study on P2X purinoceptors mediating the electrophysiological and contractile effects of purine nucleotides in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 115: 177-185.
- Khakh B. S., Bao X. R., Labarca C. & Lester H. A.** (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat. Neurosci.* 2: 322-330.
- Khakh B. S., Zhou X. P., Sydes J., Galligan J. J. & Lester H. A.** (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406: 405-410.
- Khakh B. S., Burnstock G., Kennedy C., King B., North R. A., Séguéla P., Voigt M. & Humphrey P. P.** (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53: 107-118.
- Kim Y.-C., Camaioni E., Ziganshin A. U., Ji X.-D., King B. F., Wildman S. S., Rychkov A., Yoburn J., Kim H., Mohanram A., Harden K. T., Boyer J. L., Burnstock G. & Jacobson K. A.** (1998) Synthesis and structure-activity relationships of pyridoxal-6-arylazo-5'-phosphate and phosphonate derivatives as P2 receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* 45: 52-66.
- Kim Y.-C., Brown S. G., Harden K. T., Boyer J. L., Dubyak G., King B. F., Burnstock G. & Jacobson K. A.** (2001) Structure-activity relationships of pyridoxal-6-arylazo-5'-phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X₁ receptors. *J. Med. Chem.* 44: 340-349.
- King B. F., Townsend-Nicholson A. & Burnstock G.** (1998) Metabotropic receptors for ATP and UTP: exploring the correspondence between native and recombinant nucleotide receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 19: 506-514.
- King B. F., Lui M., Pintor J., Gualix J., Miras-Portugal M. T. & Burnstock G.** (1999) Diinosine pentaphosphate (Ip₅I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 128: 981-988.
- King B. F.** (2002) 2-Chloro N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y₁ receptor antagonist: commentary on Boyer et al. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1839-1840.
- Kirkpatrick K. & Burnstock G.** (1987) Sympathetic nerve-mediated release of ATP from the guinea-pig vas deferens is unaffected by reserpine. *Eur. J. Pharmacol.* 138: 207-214.
- Kirley T. L.** (1997) Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *Eur. J. Pharmacol.* 272: 1076-1081.
- Klapperstück M., Büttner C., Nickel P., Schmalzing G., Lambrecht G. & Markwardt F.** (2000) Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X₁ and P2X₇ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 245-252.
- Kunapuli S. P. & Daniel J. L.** (1998) P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336: 513-523.
- Kurz K., von Kügelgen I. & Starke K.** (1993) Prejunctional modulation of noradrenaline release in mouse and rat vas deferens: contribution of P1- and P2-purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 110: 1465-1472.
- Kwan Y. W., Ngan M. P., Tsang K. Y., Lee H. M. & Chu L. A.** (1996) Presynaptic modulation by L-glutamate and GABA of sympathetic co-transmission in rat isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 118: 755-761.
- 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. & Mutschler E.** (1992) PPADS, a novel functionally selective antagonist of P2 purinoceptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 217: 217-219.
- Lambrecht G., Ardanuy U., Bäumert H.G., Bo X., Hoyle C.H.V., Nickel P., Pfaff O., Ralevic V., Ziganshin A.U., Ziyal R., Mutschler E. & Burnstock G.** (1996a) Design and pharmacological characterization of selective P₂-purinoceptor antagonists. In: PERSPECTIVE IN RECEPTOR RESEARCH. Proceedings of the 10th Camerino-Noordwijkerhout Symposium. Giardina D., Piergentili A., Pignini M., (eds); Elsevier, Amsterdam, pp. 337-350.
- Lambrecht G., Niebel B., Ziyal R., Ardamuy U., Bäumert H. G., Nickel P. & Mutschler E.** (1996b) P2-purinoceptor heterogeneity in guinea-pig taenia coli and rabbit vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 353 (Suppl.), R42.

- Lambrecht G., Damer S., Niebel B., Czeche S., Nickel P., Rettinger J., Schmalzing G. & Mutschler E. (1999) Novel ligands for P2 receptor subtypes in innervated tissues. *Prog. Brain Res.* 120: 107-117.
- Lambrecht G., Ganso M., Bäumert H. G., Spatz-Kümbel G., Hildebrandt C., Braun K. & 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. & 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 M., Ganso M., Hildebrandt C., Ullmann H., Kassack M. U. & Nickel P. (2002) Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2371-2399.
- Lazarowski E. R., Boucher R. C. & Harden T. K. (1994) Calcium-dependent release of arachidonic acid in response to purinergic receptor activation in airway epithelium. *Am. J. Physiol.* 266: C406-C415.
- Lazarowski E. R., Watt W. C., Stutts M. J., Boucher R. C. & Harden T. K. (1995) Pharmacological selectivity of the cloned human P_{2U}-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 116: 1619-1627.
- Lazarowski E. R., Boucher R. C. & Harden T. K. (2001) Interplay of constitutively released nucleotides, nucleotide metabolism, and activity of P2Y receptors. *Drug Dev. Res.* 53: 66-71.
- Lee H. Y., Bardini M. & Burnstock G. (2000) P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res.* 300: 321-330.
- Lenain N., Freund M., Leon C., Cazenave J. P. & Gachet C. (2003) Inhibition of localized thrombosis in P2Y₁-deficient mice and rodents treated with MRS 2179, a P2Y₁ receptor antagonist. *J. Thromb. Haemost.* 1: 1144-1149.
- Leon C., Hechler B., Freund M., Eckly A., Vial C., Ohlmann P., Dierich A., LeMeur M., Cazenave J. P. & Gachet C. (1999) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y₁ receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* 104: 1731-1737.
- Lewis C. J., Surprenant, A. & 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
- Lewis C. J., Gitterman D. P., Schluter H. & Evans R. J. (2000) Effects of diadenosine polyphosphates (A_p_nAs) and adenosine polyphospho guanosines (A_p_nGs) on rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 129: 124-130.
- Liu D. M., Katnik C., Stafford M. & Adams D. J. (2000) P2Y purinoceptor activation mobilizes intracellular Ca²⁺ and induces a membrane current in rat intracardiac neurones. *J. Physiol.* 526: 287-298.
- Loesch A. & Burnstock G. (1998) Electron-immunocytochemical localization of P2X₁ receptors in the rat cerebellum. *Cell. Tissue Res.* 294: 253-260.
- Lustig K. D., Shiao A. K., Brake A. J. & Julius D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5113-5117.
- MacDonald A. & McGrath J. C. (1980) The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 71: 458.
- MacKenzie A. B., Surprenant A. & North, R. A. (1999) Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 868: 716-729.
- Mahaut-Smith M. P., Ennion S. J., Rolf M. G. & 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.
- Mallard N., Marschall R., Sithers A. & Spriggs B. (1992) Suramin: a selective inhibitor of purinergic neurotransmission in the rat isolated vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 220: 1-10.
- Malmsjö M., Adner M., Harden T. K., Pendergast W., Edvinsson L. & Erlinge D. (2000) The stable pyrimidines UDPβS and UTPγS discriminate between the P2 receptors that mediate vascular contraction and relaxation of the rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 131: 51-56.

- Malmsjö M., Hou M., Pendergast W., Erlinge D. & Edvinsson L.** (2003) The stable pyrimidines UDPBS and UTR γ S discriminate between contractile cerebrovascular P2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 458: 305-311.
- Maminishkis A., Jalickee S., Blaug S. A., Rymer J., Yerxa B. R., Peterson W. M. & Miller S. S.** (2002) The P2Y₂ receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 3555-3566
- Mateo J., Harden T. K. & Boyer J. L.** (1999) Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* 128: 396-402.
- Mayer C., Quasthoff S. & Grafe P.** (1998) Differences in the sensitivity to purinergic stimulation of myelinating and non-myelinating Schwann cells in peripheral human and rat nerve. *Glia* 23: 374-382.
- McGrath J. C.** (1978) Adrenergic and 'non-adrenergic' components in the contractile response of the vas deferens to a single indirect stimulus. *J. Physiol.* 283: 23-39.
- Menke K.** (2003) Pharmakologische Charakterisierung von NF449 als hochpotenten und Subtyp-selektiven P2X₁-Rezeptorantagonisten. Dissertationsschrift, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
- Meyer C. H., Hotta K., Peterson W. M., Toth C. A. & Jaffe G. J.** (2002) Effect of INS37217, a P2Y₂ receptor agonist, on experimental retinal detachment and electroretinogram in adult rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 3567-3574.
- Michel A. D. & Humphrey P. P. A.** (1996) High affinity P_{2x}-purinoceptor binding sites for [³⁵S]-adenosine 5'-O-[β -thiotriphosphate] in rat vas deferens membranes. *Br. J. Pharmacol.* 117: 63-70.
- Michel A. D., Lundstrom K., Buell G. N., Surprenant A., Valera S. & Humphrey P. P. A.** (1996) The binding characteristics of a human bladder recombinant P_{2x} purinoceptor, labelled with [³H]- α β meATP, [³⁵S]-ATP γ S or [³³P]-ATP. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1254-1260.
- Mihaylova-Todorova S., Todorov L. D. & Westfall D. P.** (2001) Correlation between the release of the sympathetic neurotransmitter ATP and soluble nucleotidases from the guinea pig vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 64-70.
- Min K., Munarriz R., Yerxa B. R., Goldstein I., Shaver S. R., Cowlen M. S. & Traish A. M.** (2003) Selective P2Y₂ receptor agonists stimulate vaginal moisture in ovariectomized rabbits. *Fertil. Steril.* 79: 393-398.
- Moore P. K. & Griffiths R. J.** (1982) Pre-synaptic and post-synaptic effects of xylazine and naphazoline on the bisected rat vas deferens. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 260: 70-77.
- Moro S. & Jacobson K. A.** (2002) Molecular modeling as a tool to investigate molecular recognition in P2Y receptors. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2401-2413.
- Moro S., Guo D., Camaioni E., Boyer J. L., Harden T. K. & 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.
- Morse D. M., Smullen J. L. & Davis C. W.** (2001) Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1485-C1497.
- 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. & Evans R. J.** (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 403: 86-89.
- Murakami T., Fujihara T., Nakamura M. & Nakata K.** (2000) P2Y₂ receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Curr. Eye Res.* 21: 782-787.
- Murrin R. J. & Boarder M. R.** (1992) Neuronal "nucleotide" receptor linked to phospholipase C and phospholipase D? Stimulation of PC12 cells by ATP analogues and UTP. *Mol. Pharmacol.* 41: 561-568.
- Müller C. E.** (2002) P2-pyrimidinerger receptors and their ligands. *Curr. Pharm. Des.* 8: 2353-2369.
- Müller G.** (1999) Synthese von Suramin-analogen Verbindungen. Variationen der Struktur von NF279, einem hochselektiven P2-Rezeptor Antagonisten. Dissertationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Müller-Jahncke W.-D. & Friedrich Ch.** (1996) Geschichte der Arzneimitteltherapie. Stuttgart, Deutscher Apotheker-Verlag.
- Nagy A. K., Shuster T. A. & Delago-Escueta, A. V.** (1989) Rat brain synaptosomal ATP:AMP-phosphotransferase activity. *J. Neurochem.* 53: 1166-1172.

- Nakata H., Yoshioka K. & 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.
- Nandanan E., Jang S. Y., Moro S., Kim H. O., Siddiqui M. A., Russ P., Marquez V. E., Busson R., Herdewijn P., Harden T. K., Boyer J. L. & Jacobson K. A.** (2000) Synthesis, biological activity, and molecular modeling of ribose-modified deoxyadenosine bisphosphate analogues as P2Y₁ receptor ligands. *J. Med. Chem.* 43: 829-842.
- Narahashi T.** (2000) Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 1-26.
- Nguyen T., Erb L., Weisman G. A., Marchese A., Heng H. H., Garrad R. C., George S. R., Turner J. T. & O'Dowd B. F.** (1995) Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J. Biol. Chem.* 270: 30845-30848.
- Nicholas R. A., Watt W. C., Lazarowski E. R., Li Q. & Harden K.** (1996) Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol. Pharmacol.* 50: 224-229.
- Nicke A., Bäumert H. G., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E. & Schmalzing G.** (1998) P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-3028.
- Nicke A., Rettinger J. & Schmalzing G.** (2003) Monomeric and dimeric byproducts are the principle functional elements of higher order P2X₁ concatamers. *Mol. Pharmacol.* 63: 243-252.
- 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. & Barnard E. A.** (1997) Nucleotide receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 346-357.
- North R. A. & Surprenant A.** (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 563-580.
- Nour M., Quiambao A. B., Peterson W. M., Al Ubaidi M. R. & Naash M. I.** (2003) P2Y₂ receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4505-4514.
- Nörenberg W. & Illes P.** (2000) Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 324-339.
- O'Connor S. E., Dainty I. A. & Leff P.** (1991) Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 137-141.
- O'Reilly B. A., Kosaka A. H., Chang T. K., Ford A. P., Popert R. & 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-Zsamboki E., Van Geet C.,m Thys C., Wei L., Nilius B., Vermylen J. & 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., Kuijpers M. J. E., Toth-Zsamboki E., Bonnefoy A., Danloy S., Vreys I., Feijge M. A. H., De Vos R., Vermylen J., Heemskerk J. W. M. & Hoylaerts M. F.** (2003) Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood* 101: 3969-3976.
- Pankratov Y., Lalo U., Krishtal O. & Verkhratsky A.** (2002) Ionotropic P2X purinoceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J. Physiol.* 542: 529-536.
- Park H. S., Tennant J. P., Waktolla G. F., Sarkardei S., Kass G. E. N. & 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. & Waud D. R.** (1971) Pharmacological estimation of drug-receptor dissoziation constants. Statistical evaluation. I. Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177: 1-12.
- Parr C. E., Sullivan D. M., Paradiso A. M., Lazarowski E. R., Burch L. H., Olsen J. C., Erb L., Weisman G. A., Boucher R. C. & Turner J. T.** (1994) Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for Cystic Fibrosis pharmacotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 3275-3279.

- Patel K., Barnes A., Camacho J., Paterson C., Boughtflower R., Cousens D. & Marshall F.** (2001) Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 430: 203-210.
- Phiel C. J. & Klein P. S.** (2001) Molecular targets of lithium action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41: 789-813.
- Picher M. & Boucher R. C.** (2003) Human airway ecto-adenylate kinase - a mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J. Biol. Chem.* 278: 11256-11264.
- Pintor J., King B. F., Miras-Portugal M. T. & Burnstock G.** (1996) Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X₂ and P2Y₁ purinoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1006-1012.
- Pintor J., Diaz-Hernandez M., Gualix J., Gomez-Villafuertes R., Hernando F. & Miras-Portugal M. T.** (2000) Diadenosine polyphosphate receptors from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol. Ther.* 87: 103-115.
- Plesner L.** (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214.
- Ralevic V.** (2000) P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 205-211.
- Ralevic V. & Burnstock G.** (1996) Discrimination by PPADS between endothelial P_{2Y}- and P_{2U}-purinoceptors in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 118: 428-434.
- Ralevic V. & Burnstock G.** (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50: 413-492.
- Ralevic V., Hoyle C. H. & Burnstock G.** (1995) Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J. Physiol.* 483: 703-713.
- Ratanatharathorn V., Powers W. E., Moss W. T. & Perez, C.** (2000) Bone metastasis: Review and critical analysis of random allocation trial of local field treatment: Regarding Ratanatharathorn et al. - *JROB* 44(1): 1-18; 1999 - Response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 46: 518.
- Rettinger J. & Schmalzing G.** (2003) Activation and desensitization of the recombinant P2X₁ receptor at nanomolar ATP concentrations. *J. Gen. Physiol.* 121: 451-461.
- Rettinger J., Schmalzing G., Damer S., Müller G., Nickel P. & Lambrecht G.** (2000) The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X₁ receptor. *Neuropharmacology* 39: 2044-2053.
- Rice W. R., Burton F. M. & Fiedeldej D. T.** (1995) Cloning and expression of the alveolar type II cell P_{2u}-purinergic receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12: 27-32.
- Robaye B., Ghanem E., Wilkin F., Fokan D., van Driessche W., Schurmans S., Boeynaems J. M. & Beauwens R.** (2003) Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Mol. Pharmacol.* 63: 777-783.
- Robertson S. J., Ennion S. J. Evans R. J. & Edwards F. A.** (2001) Synaptic P2X receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 378-386.
- Rolf M. G. & Mahaut-Smith M. P.** (2002) Effects of enhanced P2X₁ receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets. *Thromb. Haemost.* 88: 495-502.
- Roseth S., Fykse E. M. & Fonnum F.** (1995) Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.* 65: 96-103.
- Rubino A. & Burnstock G.** (1996) Evidence for a P₂-purinoceptor mediating vasoconstriction by UTP, ATP and related nucleotides in the isolated pulmonary vascular bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1415-1420.
- Sachs L.** (1978) *Angewandte Statistik, Statistische Methoden und Ihre Anwendung.* Berlin, Springer-Verlag.
- Sage C. L. & Marcus D. C.** (2002) Immunolocalization of P2Y₄ and P2Y₂ purinergic receptors in strial marginal cells and vestibular dark cells. *J. Membr. Biol.* 185: 103-115.
- Saino T., Matsuura M. & Satoh Y.** (2002) Comparison of the effect of ATP on intracellular calcium ion dynamics between rat testicular and cerebral arteriole smooth muscle cells. *Cell Calcium* 32: 153.
- Sak K. & Webb T. E.** (2002) A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 131-136.
- Sallés J. & Badia A.** (1991) Mechanisms underlying the differential sensitivity to α_1 -adrenoceptor activation in the bisected rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 102: 439-445.

- Sanada M., Yasuda H., Omatsu-Kanbe M., Sango K., Isono T., Matsuura H. & Kikkawa R.** (2002) Increase in intracellular Ca^{2+} and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 111: 413-422.
- Sanders K.M.** (2001) Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J. Appl. Physiol.* 91: 1438-1449.
- Saura C., Ciruela F., Casadó V., Canela E. I., Mallol J., Lluís C. & Franco R.** (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J. Neurochem.* 66: 1675-1682.
- Schneider P., Hopp H. H. & Isenberg G.** (1991) Ca^{2+} influx through ATP-gated channels increments $[Ca^{2+}]_i$ and inactivates I_{Ca} in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J. Physiol.* 440: 479-496.
- Seifert R. & Schultz G.** (1989) Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 365-369.
- Sevigny J., Sundberg C., Braun N., Guckelberger O., Csizmadia E., Qawi I., Imai M., Zimmermann H. & Robson S. C.** (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99: 2801-2809.
- Seye C. I., Gadeau A. P., Daret D., Dupuch F., Alzieu P., Capron L. & Desgranges C.** (1997) Overexpression of P2Y₂ purinoceptor in intimal lesions of the rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 3602-3610.
- Seye C. I., Kong Q. M., Erb L., Garrad R. C., Krugh B., Wang M. F., Turner J. T., Sturek M., Gonzalez F. A. & Weisman G. A.** (2002) Functional P2Y₂ nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* 106: 2720-2726.
- Shariatmadari R., Sipila P., Vierula M., Tornquist K., Huhtaniemi I. & Poutanen M.** (2003) Adenosine triphosphate induces Ca^{2+} signal in epithelial cells of the mouse caput epididymis through activation of P2X and P2Y purinergic receptors. *Biol. Reprod.* 68: 1185-1192.
- Sipma H., den Hertog A. & Nelemans A.** (1994) The phospholipase C activating P2U purinoceptor also inhibits cyclicAMP formation in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 431-437.
- Sluyter R., Barden J. A. & Wiley J. S.** (2001) Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell. Tissue Res.* 304: 231-236.
- Smit-van Oosten A., Bakker W. W. & van Goor H.** (2002) De-novo expression of vascular ecto-5'-nucleotidase and down-regulation of glomerular ecto-ATPase in experimental chronic renal transplant failure. *Transpl. Int.* 15: 602-609.
- Sneddon P. & Burnstock G.** (1984) Inhibition of excitatory junction potentials in guinea-pig vas deferens by α,β -methylene-ATP: further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 85-90.
- Sneddon P. & Westfall D. P.** (1984) Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 347: 561-580.
- Sneddon P. & Machaly M.** (1992) Regional variation in purinergic and adrenergic responses in isolated vas deferens of rat, rabbit and guinea-pig. *J. Auton. Pharmacol.* 12: 421-428.
- Sneddon P., Westfall D. P., Colby J. & Fedan J. S.** (1984) A pharmacological investigation of the biphasic nature of the contractile response of rabbit and rat vas deferens to field stimulation. *Life Sci.* 35: 1903-1912.
- Soto F., Garcia-Guzman M. & 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. & Busch A. E.** (1999) Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38: 141-149.
- Steinmetz M., Schlatter E., Boudier H. A. J. S., Rahn K. H. & DeMey J. G. R.** (2000) Diadenosine polyphosphates cause contraction and relaxation in isolated rat resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 1175-1181.
- Stone T. W., O'Kane E. M., Nikbakht M. R. & Ross F. M.** (2000) Presynaptic P2 receptors? *J. Auton. Nerv. Syst.* 81: 244-248.
- Storr, M., Franck, H., Saur, D., Schusdziarra, V. & Allescher, H. D.** (2000) Mechanisms of α,β -methylene ATP-induced inhibition in rat ileal smooth muscle: Involvement of intracellular Ca^{2+} stores in purinergic inhibition. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27: 771-779.

- Suarez-Huerta N., Pouillon V., Boeynaems J. & Robaye B.** (2001) Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y₄ nucleotide receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 197-202.
- Surprenant A., Rassendren F., Kawashima E., North R. A. & Buell G.** (1996) The cytolytic P_{2Z} receptor for extracellular ATP identified as a P_{2X} receptor (P2X₇). *Science* 272: 735-738.
- Tallarida R. J. & Murray R. B.** (1986) Manual of pharmacologic calculations with computer programs. 2nd. Ed., Springer Verlag, Berlin.
- Tennant J. P. & Hourani S. M. O.** (2000) Breakdown of extracellular ATP by the prostatic and epididymal ends of the guinea pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 107-109.
- Tennant J. P., Pearson A. & Hourani S. M. O.** (1999) Effects of noradrenaline, the calcium ionophore A23187, forskolin, sodium nitroprusside and glibenclamide on the degradation of extracellular adenosine 5'-triphosphate by the rat isolated vas deferens. *J. Auton. Pharmacol.* 167-171.
- Todorov L. D., Mihaylova-Todorova S., Craviso G. L., Bjur R. A. & Westfall D. P.** (1996) Evidence for the differential release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 496: 731-748.
- Torres G. E., Egan T. M. & 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. & Voigt M. M.** (1999b) Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly. *J. Biol. Chem.* 274: 22359-22365.
- Traverso-Cori A., Mancilla M., Kettlum A. M. & Valenzuela M. A.** (1997) Potato Apyrase: an Overview. In: *Ecto-ATPases* (Plesner L., ed), pp 227-229. New-York, Plenum Press.
- Trezise D. J., Bell N. J. & Humphrey P. P. A.** (1994a) P2 purinoceptor antagonist effects of pyridoxal-5-phosphate in rat vagus nerve and guinea-pig aorta. *Br. J. Pharmacol.* 112: 502P.
- Trezise D. J., Bell N. J., Khakh B. S., Michel A. D. & Humphrey P. P. A.** (1994b) P2 purinoceptor antagonist properties of pyridoxal-5-phosphate. *Eur. J. Pharmacol.* 259: 295-300.
- Trezise D. J., Michel A. D., Grahames C. B., Khakh B. S., Surprenant A. & Humphrey P. P. A.** (1995) The selective P_{2X} purinoceptor agonist, β,γ -methylene-L-adenosine 5'-triphosphate, discriminates between smooth muscle and neuronal P_{2X} purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351: 603-609.
- Tsopelas C. & Sutton R.** (2002) Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. *J. Nucl. Med.* 43: 1377-1382.
- Tuluc F., Bültmann R., Glänzel M., Frahm A. W. & Starke K.** (1998) P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ecto-nucleotidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 111-120.
- Urbanek E., Nickel P. & Schlicker E.** (1990) Antagonistic properties of four suramin-related compounds at vascular purine P2X receptors in the pithed rat. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 207-210.
- Valera S., Hussy N., Evans R. J., Adami N., North R. A., Surprenant A. & Buell G.** (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2X} receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519.
- Valera S., Talabot F., Evans R. J., Gos A., Antonarakis S. E., Morris M. A. & Buell G. N.** (1995) Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3: 283-289.
- Van der Zee L., Nelemans A. & den Hertog A.** (1992) Nucleotide receptors on DDT1 MF-2 vas deferens cells. *Eur. J. Pharmacol.* 215: 317-320.
- Van Rompay A. R., Johansson M. & Karlsson A.** (2000) Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol. Ther.* 87: 189-198.
- Vassort G.** (2001) Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergetic agonist in the myocardium. *Physiol. Rev.* 81: 767-806.
- Velazquez B., Garrad R. C., Weisman G. A. & Gonzalez F. A.** (2000) Differential agonist-induced desensitization of P2Y₂ nucleotide receptors by ATP and UTP. *Mol. Cell. Biochem.* 206: 75-89.
- Verspohl E. J., Johannwille B., Kaiserling-Buddemeier I., Schluter H. & Hagemann J.** (1999) Diadenosine polyphosphates in cultured vascular smooth-muscle cells and endothelium cells - Their interaction with specific receptors and their degradation. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: 1175-1181.
- Vial C. & Evans R. J.** (2001) Smooth muscles does not have a common P_{2X} receptor phenotype: expression, ontogeny and function of P_{2X1} receptors in mouse ileum, bladder and reproductive systems. *Auton. Neurosci.* 92: 56-64.

- Vigne P., Breittmayer J. P. & Frelin C.** (2000) Diadenosine polyphosphates as antagonists of the endogenous P2Y₁ receptor in rat brain capillary endothelial cells of the B7 and B10 clones. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1506-1512.
- Virginio C., MacKenzie A., Rassendren F. A., North R. A. & Surprenant A.** (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.* 2: 315-321.
- Vlajkovic S. M., Thorne P., Sevigny J., Robson S. & Housley G.** (2002) Distribution of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases 1 and 2 in rat cochlea. *Hear Res.* 170: 127-138.
- Vogalis F.** (2000) Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J. Auton. Pharmacol.* 20: 207-219.
- von Kügelgen I. & Starke K.** (1991) Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 319-324.
- von Kügelgen I. & Wetter A.** (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362: 310-323.
- von Kügelgen I., Schöffel E. & Starke K.** (1989) Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P2-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 340: 522-532.
- Vulchanova L., Arvidsson U., Riedl M., Wang J., Buell G., Surprenant A., North R. A. & Elde R.** (1996) Differential distribution of two ATP-gated channels (P_{2X} receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 8063-8067.
- Waldo G. L., Corbitt J., Boyer J. L., Ravi G., Kim H. S., Ji X. D., Lacy J., Jacobson K. A. & Harden T. K.** (2002) Quantitation of the P2Y₁ receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol. Pharmacol.* 62: 1249-1257.
- Wang T.-F. & Guidotti G.** (1996) CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- Webb T. E., Henderson D. J., Roberts J. A. & Barnard E. A.** (1998) Molecular cloning and characterization of the rat P2Y₄ receptor. *J. Neurochem.* 71: 1348-1357.
- Welford, L. A., Cusack, N. J. & Hourani, S. M. O.** (1986) ATP analogues and the guinea-pig taenia coli: a comparison of the structure-activity relationships of ectonucleotidases with those of the P2-purinoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 217-224.
- Werner P., Seward E. P., Buell G. N. & North R. A.** (1996) Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 15485-15490.
- Westfall T. D. & Westfall D. P.** (2001) Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 45: 109-122.
- Westfall D. P., Stitzel R. E. & Rowe J. N.** (1978) The postjunctional effects and neural release of purine compounds in the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 50 : 27-38.
- Westfall T. D., Kennedy C. & Sneddon P.** (1996) Enhancement of sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br. J. Pharmacol.* 117: 867-872.
- Westfall T. D., Kennedy C. & Sneddon P.** (1997a) The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 329: 169-173.
- Westfall T. D., McIntyre C. A., Obeid S., Bowes J., Kennedy C. & Sneddon P.** (1997b) The interaction of diadenosine polyphosphates with P_{2X}-receptors in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 121: 57-62.
- White S. M., Imig J. D., Kim T. T., Hauschild B. C. & Inscho E. W.** (2001) Calcium signaling pathways utilized by P2X receptors in freshly isolated preglomerular MVSMC. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F1054-F1061.
- Wildman S. S., Brown S. G., King B. F. & Burnstock G.** (1999) Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits. *Eur. J. Pharmacol.* 367: 119-123.
- Windscheif U., Pfaff O., Ziganshin A. U., Hoyle C. H., Bäumert H. G., Mutschler E., Burnstock G. & Lambrecht G.** (1995) Inhibitory action of PPADS on relaxant responses to adenine nucleotides or electrical field stimulation in guinea-pig taenia coli and rat duodenum. *Br. J. Pharmacol.* 115: 1509-1517.
- Wong P. Y.** (1988) Control of anion and fluid secretion by apical P2-purinoceptors in the rat epididymis. *Br. J. Pharmacol.* 95: 1315-1321.

- Yamakuni H., Kawaguchi N., Ohtani Y., Nakamura J., Katayama T., Nakagawa T., Minami M. & Satoh M.** (2002) ATP induces leukemia inhibitory factor mRNA in cultured rat astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 129: 43-50.
- Yegutkin G. G., Henttinen T., Samburski S. S., Spychala J. & Jalkanen S.** (2002) The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells. *Biochem. J.* 367: 121-128.
- Yerxa B. R., Sabater J. R., Davis C. W., Stutts M. J., Lang-Furr M., Picher M., Jones A. C., Cowlen M., Dougherty R., Boyer J., Abraham W. M. & Boucher R.C.** (2002) Pharmacology of INS37217 [P^1 -(uridine 5')- P^4 -(2'-deoxycytidine 5')tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation $P2Y_2$ receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 302: 871-880.
- Yerxa B. R., Mundasad M., Sylvester R. N., Garden J. C. Cooper M. & Kellerman D. J.** (2002a) Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a $P2Y_2$ agonist, in patients with mild to moderate dry eye disease. *Adv.Exp.Med.Biol.* 506: 1251-1257.
- Yerxa B. R., Douglass J. G., Elena P. P., Caillaud T., Amar T., Edick C. & Peterson W. M.** (2002b) Potency and duration of action of synthetic $P2Y_2$ receptor agonists on Schirmer scores in rabbits. *Adv.Exp.Med.Biol.* 506: 261-265.
- Yoshioka K., Saitoh O. & Nakata H.** (2001) Heteromeric association creates a $P2Y$ -like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7617-7622.
- Yoshioka K., Hosoda R., Kuroda Y. & Nakata H.** (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A_1 receptors with $P2Y_1$ receptors in rat brains. *FEBS Letters* 531: 299-303.
- Yu H. X., Bianchi B., Metzger R., Lynch K. J., Kowaluk E. A., Jawis M. F. & van Biesen T.** (1999) Lack of specificity of [^{35}S]ATP γ S and [^{35}S]ADP β S as radioligands for ionotropic and metabotropic $P2$ receptor binding. *Drug Dev. Res.* 48: 84-93.
- Zagorodnyuk V., Santicoli P., Maggi C. A. & Giachetti A.** (1996) The possible role of ATP and PACAP as mediators of apamin-sensitive NANC inhibitory potentials in circular muscle of guinea-pig colon. *Brit. J. Pharmacol.* 119: 779-786.
- Zambon A. C., Hughes R. J., Meszaros J. G., Wu J. J., Torres B., Brunton L. L. & Insel P.A.** (2000) $P2Y_2$ receptor of MDCK cells: cloning, expression, and cell-specific signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F1045-F1052.
- Ziganshin A. U., Hoyle C. H. V. & Burnstock G.** (1994) Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Dev. Res.* 32: 134-146.
- Ziganshin A. U., Ziganshina L. E., Bodin P., Bailey D. & Burnstock G.** (1995) Effects of $P2$ -purinoceptor antagonists on ecto-nucleotidase activity of guinea-pig vas deferens cultured smooth muscle cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 863-869.
- Ziganshin A. U., Ziganshina L. E., King B. F., Pintor J. & Burnstock G.** (1996) Effects of $P2$ -purinoceptor antagonists on degradation of adenine nucleotides by ecto-nucleotidases in folliculated oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochem. Pharmacol.* 51: 897-901.
- Ziganshin A. U., Rychkov A. V., Ziganshina L. E. & Burnstock G.** (2002a) Temperature dependency of $P2$ receptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 456: 107-114.
- Ziganshin A. U., Ziganshina, L. E. & Burnstock, G.** (2002b) $P2$ receptors: theoretical background for the use in clinical practice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 134: 313-317.
- Zimmermann H.** (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285: 345-365.
- Zimmermann H.** (1996a) Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 49: 589-618.
- Zimmermann H.** (1996b) 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.
- Zimmermann H.** (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56.
- Ziyal R., Ziganshin A. U., Nickel P., Ardanuy U., Mutschler E., Lambrecht G. & Burnstock G.** (1997) Vasoconstrictor responses via $P2X$ -receptors are selectively antagonized by NF023 in rabbit isolated aorta and saphenous artery. *Br. J. Pharmacol.* 120: 954-960.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

α,β -meADP	α,β -Methylen-ADP
α,β -meATP	α,β -Methylen-ATP
L- β,γ -meATP	L- β,γ -Methylen-ATP
2MeSADP	2-Methylthio-ADP
2MeSATP	2-Methylthio-ATP
A3P5P	Adenosin-3',5'-bisphosphat
A3P5PS	Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP β S	Adenosin-5'-O-(2-thiodiphosphat)
ATP γ S	Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANAPP ₃	Arylazidoaminopropionyl-ATP
AP	Alkalische Phosphatase
APE	Arecaidinpropargylester
Ap _n A	Diadenosinpolyphosphat ("n" indiziert die Anzahl der Phosphatreste zwischen den zwei Adenosinresten)
ARL 67156	6-N,N-diethyl-D- β,γ -dibromomethylen-ATP (= FPL 67156)
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat

B

BK-Kanäle	Big-conductance = large-conductance = high-conductance Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
Bst101	Analogon des NF023, N-[3-(N-(1,3,5-Trisulpho-8-naphthyl)carbamoyl)-phenyl]-N'-[3-(N-(1-naphthyl)-carbamoyl)phenyl]-harnstoff
8-BuS-ATP	8-Thiobutyladenosin-5'-triphosphat
BzATP	2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP

C

CCPA	2-Chloro-N ⁶ -cyclopentyladenosin
CF	zystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHO-Zellen	Ovarial-Zellen des chinesischen Hamsters
CLL	Chronische lymphatische Leukämie

D

dr	Dose ratio
DAG	Diacylglycerol, second messenger
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol

E

EC ₅₀	molare Konzentration, welche 50 % der Maximal-Antwort eines Agonisten hervorruft
E-NDPK	Ekto-Nukleosid-Diphosphokinasen
E-NTPDase	Ekto-Nukleosid-5'-Triphosphat-Diphosphohydrolase
E-NPP	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase

ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
<u>F</u>	
FPL 67156	6-N,N-diethyl-D-β,γ-dibromomethylen-ATP (= ARL 67156)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, gelb-grün
<u>G</u>	
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GlyR	Glycin-Rezeptor
GPI-LM	Longitudinal-Muskulatur des Meerschweinchen-Ileum
G-Protein	Guanylnukleotid-bindende Proteine
<u>H</u>	
HPLC	„High-performance“ Flüssig-Chromatographie
5-HT ₃ -R	Serotonin-Rezeptorsubtyp 3
<u>I</u>	
IC ₅₀	Halbmaximale, inhibitorisch wirksame Konzentration eines Antagonisten in Abhängigkeit einer definierten Agonistkonzentration = Inspire Pharmaceuticals Inc.
INS	UTP
INS316	Diuridin-tetraphosphat
INS365	[P ¹ -(uridin-5')-P ⁴ -(2'-deoxycytidin-5')]tetraphosphat tetranatriumsalz]
INS37217	Diquafosol
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
Ip ₅ I	Diinosinpentaphosphat
iso-PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',5'-disulfonsäure
IUPHAR	International Union of Pharmacology
<u>K</u>	
K _m	Michaelis-Konstante, diejenige Substratkonzentration, bei welcher die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist
<u>M</u>	
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
min	Minute(n)
MRS	= Molecular Recognition Site
MRS 2159	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-4'-carbonsäure
MRS 2179	N ⁶ -Methyl-2'-deoxy-adenosin-3',5'- bisphosphat
MRS 2220	Cyclopyridoxin-α ^{4,5} -monophosphat-6-phenylazo-2',5'-disulfonat
MRS 2257	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-3',5'-phosphonat
MRS 2279	2-Chloro-N ⁶ -mehtyl-(N)-methanocarpa-2'-desoxyadenosin-3',5'-bisphosphat
ms	Millisekunde(n)
<u>N</u>	
n.d.	nicht bestimmt
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NANC	nicht-adrenerg, nicht-cholinerg

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NF	= „Nickel-Filarien“; polysulfatierte organische Substanzen, synthetisiert von Prof. Dr. P. Nickel, mit dem Ziel filarizide Substanzen zu finden.
NF023	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino)) bis(1,3,5-naphthalentrisulphonsäure)

P

pA ₂	Negativer dekadischer Logarithmus der Antagonist-Konzentration, die die Agonist-Dosis-Wirkungs-Kurve um den Faktor 2 nach rechts verschiebt; Schnittpunkt der Regressionsgeraden im Arunlakshana-Schild-Plot mit der Abzisse.
PC12-Zellen	Phäochromocytom-Zellen der Ratte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pD ₂	negativer dekadischer Logarithmus der Agonistkonzentration der den halbmaximalen Effekt hervorruft, Kennzahl zur Beschreibung der Wirkstärke eines Agonisten
P _i	anorganisches Phosphat
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulphonsäure
PP _i	Pyrophosphat
PPNDS	Pyridoxal-5'-phosphat-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonat)
P _{2U}	Metabotroper UTP-sensitiver Rezeptor, veraltete Nomenklatur, basierend auf Aktivitätsreihenfolge von P ₂ -Agonisten; als Synonym für P _{2Y} ₂ -Rezeptor gebraucht
P _{2Y}	Metabotroper P ₂ -Rezeptor, veraltete Nomenklatur, basierend auf Aktivitätsreihenfolge von P ₂ -Agonisten
P5P	Pyridoxal-5'-phosphat

R

Ras	Protein aus der Familie der „kleinen“ G-Proteine
ratVD	Vas deferens der Ratte
RB 2	Reaktiv Blau 2
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion

S

s	Sekunde
SB9	6-[(4,6,8-trisulpho-1-naphthyl)iminocarbonyl-1,3-(4-methylphenylen)-iminocarbonyl-1,3-phenylen-azo]-pyridoxal-5'-phosphat; synthetisiert von Spatz-Kümbel und Bäumert

T

t	Zeit
TNP-ATP	2',3'-O-(2',4',6')-Trinitrophenyl-ATP
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin, Gift des Kugelfisches

U

UDP	Uridin-5'-diphosphat
-----	----------------------

UDPβS	Uridin-5'-O-(2-thiodiphosphat)
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTPγS	Uridin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
UTP/INS316	Uridin-5'-triphosphat

W

w/v Gewicht pro Volumen

X

XLO *Xenopus laevis* Oozyten, Laich des Südafrikanischen Krallen
Frosches

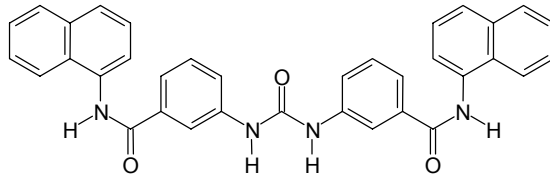
Z

ZNS Zentralnervensystem

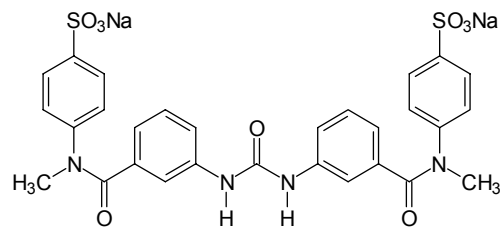
8 STRUKTURFORMELN

8.1 Chemische Struktur von NF023-Analoga

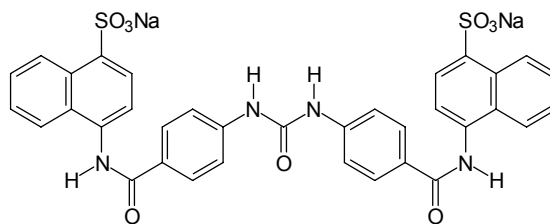
NF824



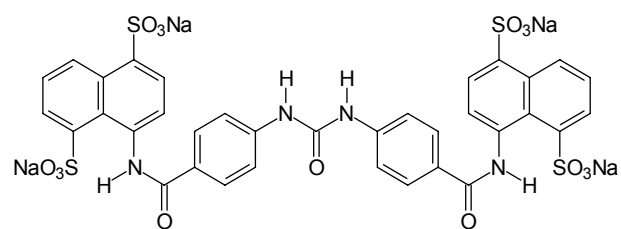
NF811



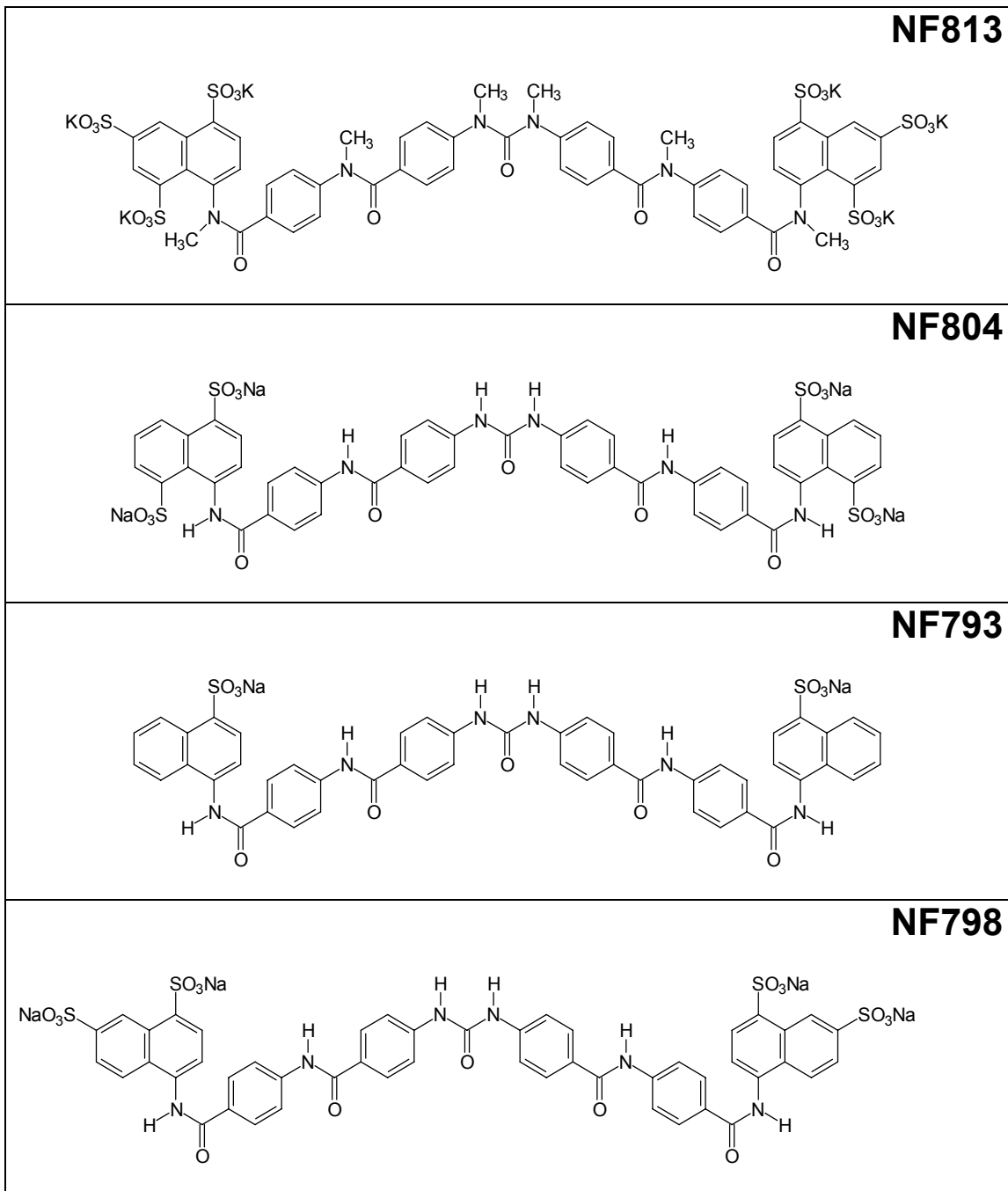
NF792

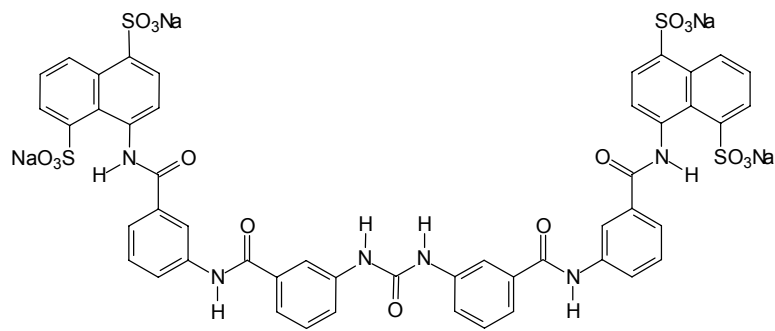
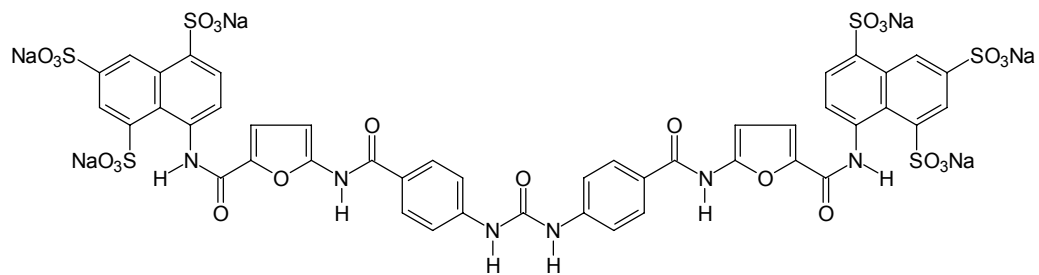
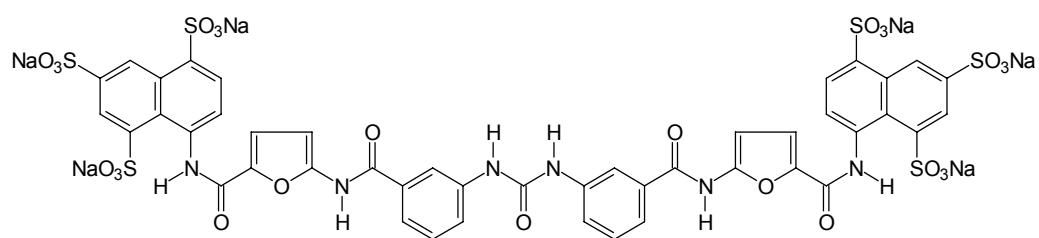
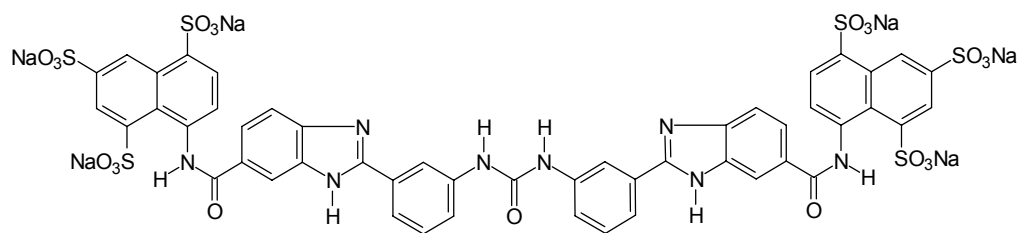
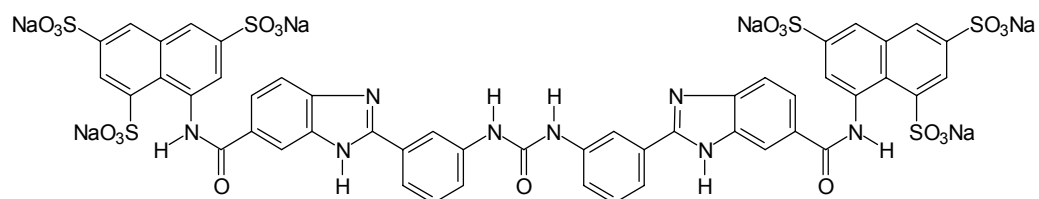


NF803

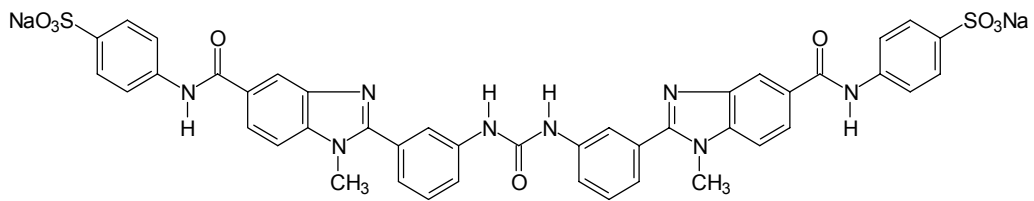


8.2 Chemische Struktur von symmetrischen NF279-Analoga

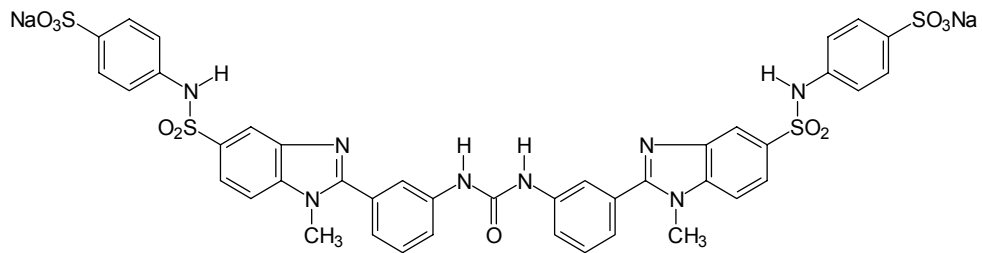


NF816**NF358****NF356****NF506****NF507**

NF835

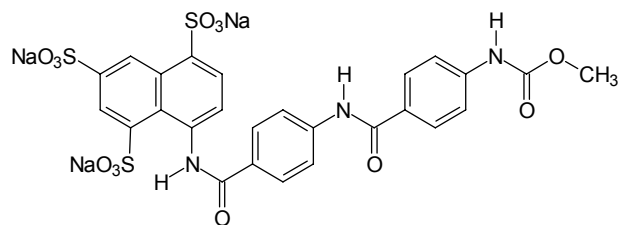


NF840

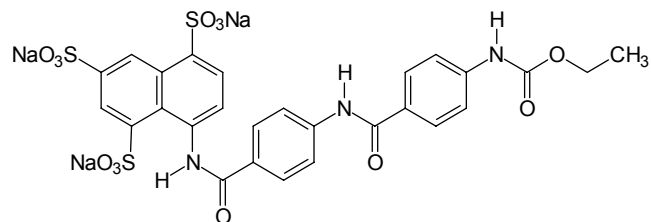


8.3 Chemische Struktur von unsymmetrischen NF279-Analoga

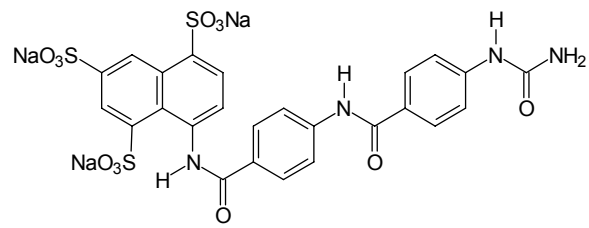
NF782



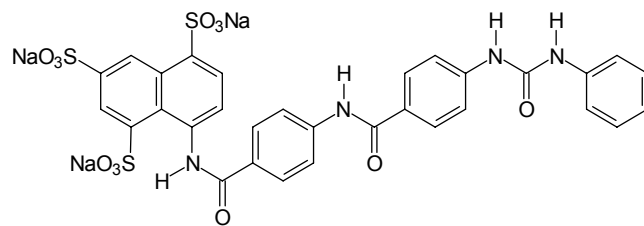
NF783



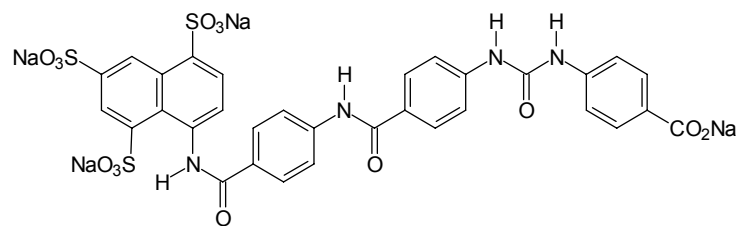
NF784



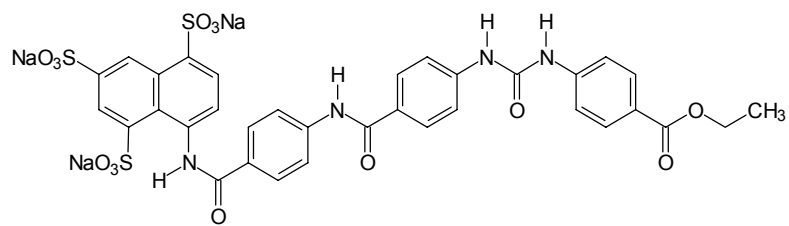
NF785



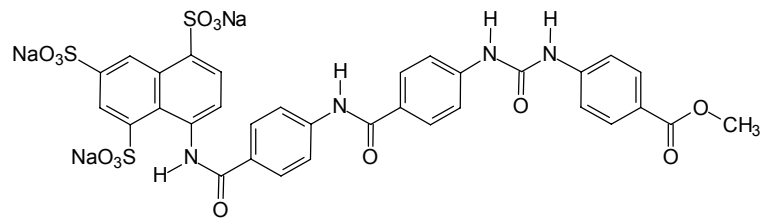
NF787



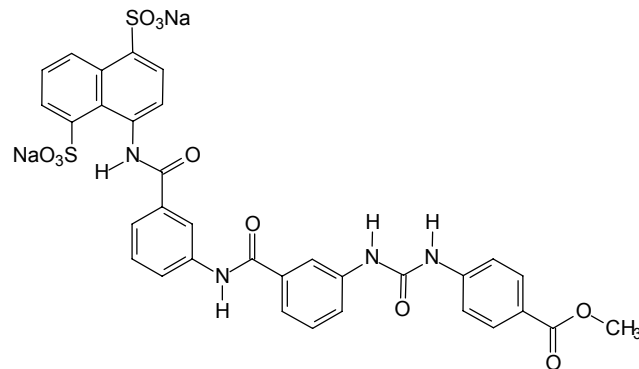
NF786



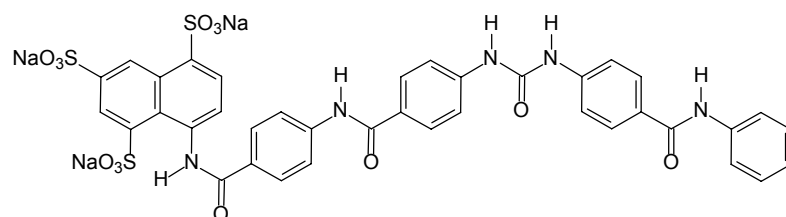
NF814



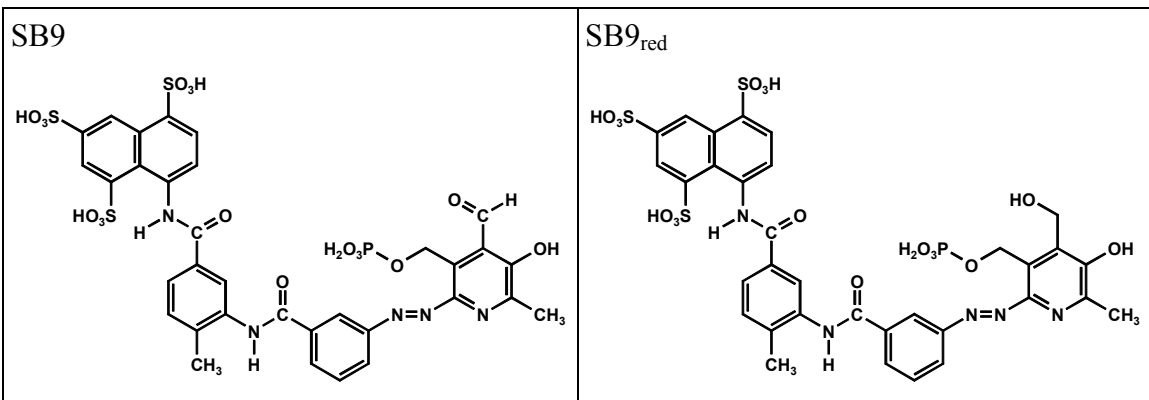
NF817¹³



NF815

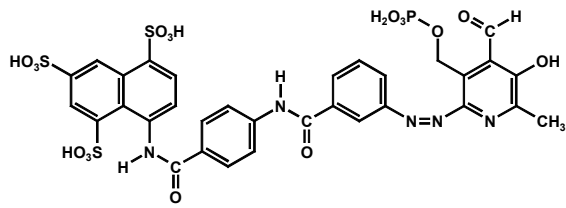


8.4 Chemische Struktur von SB-Analoga

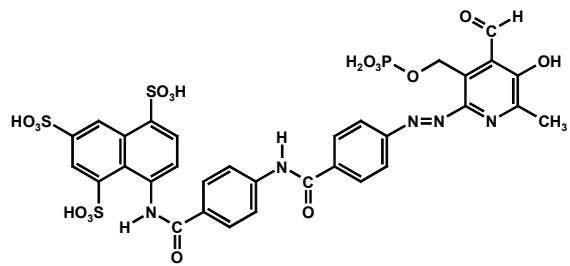


¹³ Die Benzoylreste der Verbindung NF817 sind innerhalb dieser Gruppe meta-meta verknüpft, und NF817 müßte daher als Vertreter unsymmetrischer Suramin-Analoga aufgefaßt werden. Aus Gründen der Übersicht wurde NF817 dennoch an dieser Stelle eingeordnet.

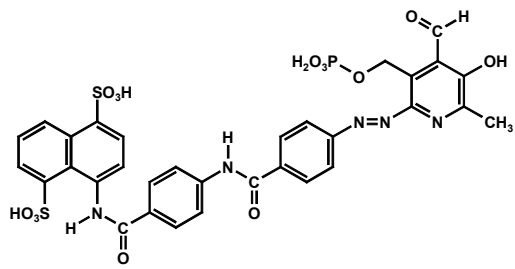
SB2a



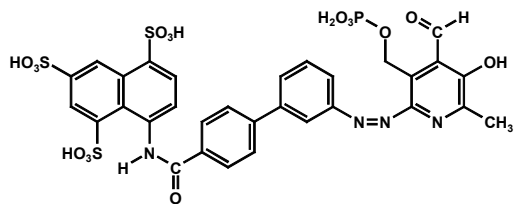
SB1



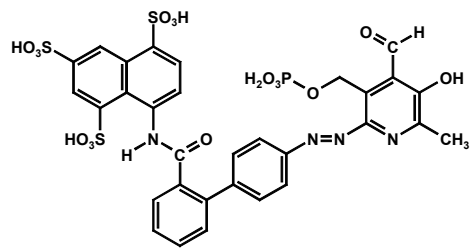
SB2b



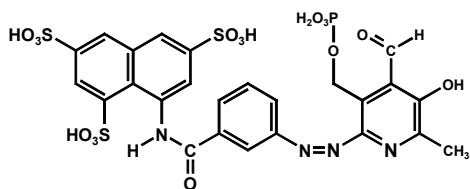
SB6



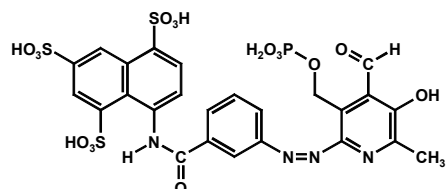
SB4



SB3

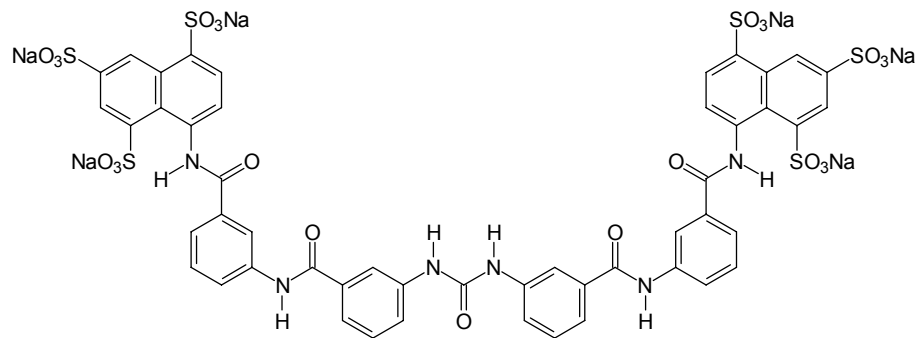


SB5

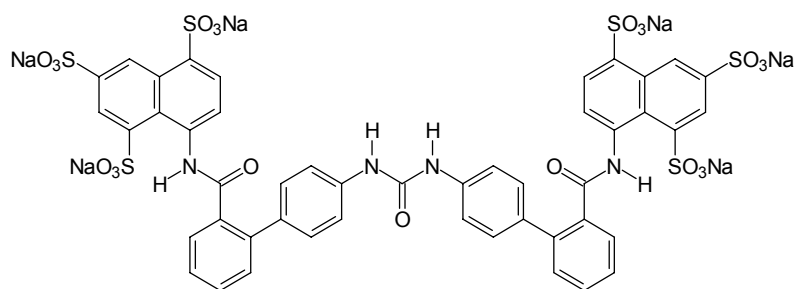


8.5 Chemische Struktur von Vergleichssubstanzen

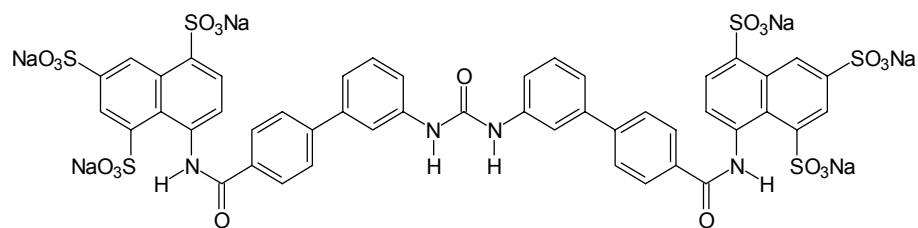
NF037



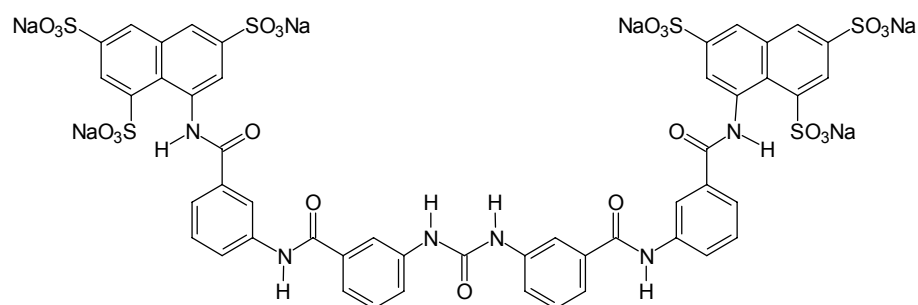
NF136



NF192



NF551



9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

Abb. 1.1 Chemische Struktur von INS-Analoga als P2Y₂-Rezeptor-Agonisten.	20
Abb. 1.2 Chemische Strukturformeln von Analoga des Pyridoxal-Phosphates.	22
Abb. 1.3 Chemische Strukturformeln von Suramin und Suramin-Analoga.	24
Abb. 1.4 Chemische Strukturformeln von Nukleotid-Analoga.	26
Abb. 1.5 Chemische Strukturformeln von Derivaten des Anthrachinons.	27
Abb. 1.6 Ekto-enzymatischer Umsatz von Purinen auf der Zelloberfläche.	31
Abb. 1.7 Faserverlauf im Vas deferens des Menschen.	35
Abb. 1.8 Allgemeine strukturelle Modifikationen der NF023-Analoga.	42
Abb. 1.9 Allgemeine strukturelle Modifikationen an symmetrischen NF279-Analoga.	43
Abb. 1.10 Allgemeine strukturelle Modifikationen an unsymmetrischen NF279-Analoga.	43
Abb. 1.11 allgemeine strukturelle Modifikationen an SB-Analoga.	44
Abb. 3.1 Hemmkurven symmetrischer NF279-Analoga am P2X₁-Rezeptor.	75
Abb. 3.2 Hemmkurven symmetrischer NF279-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.	76
Abb. 3.3 Antagonismus von NF816 am P2Y₁-Rezeptor.	77
Abb. 3.4 Schild-Regression von NF816 an P2Y₁-Rezeptoren am Meerschweinchen-Ileum.	77
Abb. 3.5 Hemmkurven unsymmetrischer NF279-Analoga am P2X₁-Rezeptor.	79
Abb. 3.6 Hemmkurven unsymmetrischer NF279-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.	79
Abb. 3.7 Antagonismus von NF786 am P2Y₁-Rezeptor.	80
Abb. 3.8 Schild-Regression von NF786 vs. NF279 am Meerschweinchen-Ileum.	81
Abb. 3.9 Hemmkurven von SB-Analoga am P2X₁-Rezeptor.	82
Abb. 3.10 Hemmkurven von SB-Analoga am P2Y₁-Rezeptor.	83
Abb. 3.11 Kinetik von SB9 und PPADS am P2X₁-Rezeptor.	84
Abb. 3.12 Kinetik von SB9 und PPADS am P2Y₁-Rezeptor.	85
Abb. 3.13 Antagonismus von SB9 am P2X₁-Rezeptor.	86
Abb. 3.14 Antagonismus von SB9 am P2Y₁-Rezeptor.	87
Abb. 3.15 Schild-Regressionen von SB9 an P2-Rezeptoren.	88
Abb. 3.16 Hemmung der Ekto-Nukleotidase-Aktivität von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten durch SB9.	89
Abb. 3.17 Aktivitätssteigernder Einfluss von Evans Blau auf die UTP-Kontraktion.	91

Abb. 3.18 **Aktivitäts-Unterschiede von UTP am Vas deferens der Ratte.** 92

Abb. 3.19 **Einfluss der Evans-Blau-Reinheit auf die Aktivität von UTP.**..... 92

Abb. 3.20 **Zeitverlauf der Evans-Blau-Wirkung.**..... 93

Abb. 3.21 **Inhibition der ATP-Spaltung im Vas deferens der Ratte durch Evans Blau.**..... 94

Abb. 3.22 **Einfluß von TTX auf die UTP-bedingte Kontraktion im Vas deferens der Ratte.**..... 95

Abb. 3.23 **Rolle von extrazellulärem Kalzium auf die UTP-Kontraktion des Vas deferens der Ratte.** 96

Abb. 3.24 **Rolle von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen bei der UTP-Kontraktion im Vas deferens der Ratte.**..... 96

Abb. 3.25 **Lithiumeffekt auf Dosis-Wirkungs-Kurven von UTP im Vas deferens der Ratte.**..... 97

Abb. 3.26 **Lithiumeffekt auf Dosis-Wirkungskurven von α,β -meATP am Vas deferens der Ratte.** 98

Abb. 3.27 **Rolle von UTP-Metabolite auf die UTP-Kontraktion des Vas deferens der Ratte.**..... 99

Abb. 3.28 **Aktivitäten natürlicher Nukleotide am Vas deferens der Ratte.**..... 100

Abb. 3.29 **Aktivitäten natürlicher Nukleotide in Anwesenheit von Evans Blau am Vas deferens der Ratte.**..... 101

Abb. 3.30 **Aktivitäten (partial-)synthetischer Nukleotide am Vas deferens der Ratte.** 102

Abb. 3.31 **Aktivitäten (partial-) synthetischer Nukleotide in Anwesenheit von Evans Blau am Vas deferens der Ratte.** 103

Abb. 3.32 **Kreuz-Desensibilisierungs-Untersuchungen am Vas deferens der Ratte.** 104

Abb. 3.33 **Hemmung der UTP-vermittelten Kontraktion durch P2Y-Antagonisten am Vas deferens der Ratte.** 105

Abb. 3.34 **Expression von P2Y₂-Rezeptoren** 107

Abb. 3.35 **Expression von P2Y₂-Rezeptoren.**..... 107

Abb. 3.36 **Expression von P2Y₂-Rezeptoren und NF160.**..... 108

Abb. 3.37 **Präabsorptions-Test, Anti-P2Y₄, Anti-P2Y₄+Bindungspeptid.**..... 109

Abb. 3.38 **Phasenkontrastaufnahmen, Kontrollen für ATPase-/ADPase-Aktivität.** 110

Abb. 3.39 ATPase-aktive Strukturen im Vas deferens der Ratte.	110
Abb. 3.40 ADPase-aktive Strukturen im Vas deferens der Ratte.	111
Abb. 3.41 Expression von NTPDase2.....	112
Abb. 4.1 Wichtige Strukturmerkmale von NF-Analoga.	116
Abb. 4.2 Einfluss der Anzahl und Position (C1, C3, C5) der Sulfonsäuresubstituenten am Naphthalinring 1'-4',1''-4''-verknüpfter NF279- Analoga auf den P2-Antagonismus.	117
Abb. 4.3 Einfluss der Verknüpfung der Benzoylreste symmetrischer NF279- Analoga auf den P2-Antagonismus.	118
Abb. 4.4 Einfluss von hetero-zyklischen Fragmenten sowie der Verknüpfung auf die P2X₁-antagonistische Potenz.	119
Abb. 4.5 Einfluss von heterozyklischen Fragmenten sowie der Verknüpfung auf die P2Y₁-antagonistische Wirkstärke.	120
Abb. 4.6 Struktur unsymmetrischer NF279-Analoga und von NF279.....	121
Abb. 4.7 Einfluss derselben chemischen Variationen auf die inhibitorische Wirkstärke von symmetrischen und unsymmetrischen NF279-Analoga.....	122
Abb. 4.8 Allgemeine Strukturformel der SB-Analoga.	123
Abb. 4.9 Vergleich der P2X₁-antagonistischen Wirkstärke von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga.....	124
Abb. 4.10 Vergleich der P2Y₁-antagonistischen Wirkstärke von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga.....	125
Abb. 4.11 Vergleich der Inhibition von Ekto-Nukleotidasen von strukturell miteinander korrespondierenden NF- und SB-Analoga.....	126
Abb. 4.12 Vergleich der P2-Antagonisten PPNDS und SB9 an nativen P2- Rezeptoren.....	127
Abb. 4.13 Allgemeine Strukturformeln von Ribose-Bisphosphat- und von Naphthylamin-Disulfonsäure-Derivaten.	128
Abb. 4.14 Chemische Strukturformel von Evans Blau.	136
Abb. 4.15 Chemische Struktur ausgewählter Nukleotide.....	144

9.1 Tabellen

Tab. 1.1	Aktivität von P2-Liganden an rekombinanten P2Y ₂ /P2Y ₄ -Rezeptoren...	19
Tab. 3.1	Biologische Aktivität von NF023-Analoga.....	69
Tab. 3.2	Biologische Aktivität von symmetrischen NF279-Analoga.....	70
Tab. 3.3	Biologische Aktivität von unsymmetrischen NF279-Analoga.....	71
Tab. 3.4	Biologische Aktivität der SB-Analoga.....	72
Tab. 3.5	Inhibitorische Wirkstärke symmetrischer NF279-Analoga.....	74
Tab. 3.6	Inhibitorische Wirkstärke unsymmetrischer NF279-Analoga.....	78
Tab. 3.7	Inhibitorische Wirkstärke von SB-Analoga.....	82
Tab. 3.8	P2-Rezeptor-Spezifität von SB9.....	89
Tab. 3.9	Übersicht der Aktivitäts-Reihenfolgen diverser P2-Agonisten am Vas deferens der Ratte.....	103
Tab. 4.1	Inhibitorische Wirkstärke von P2-Antagonisten im Vergleich zu NF816.	129
Tab. 4.2	Inhibitorische Wirkstärke von P2-Antagonisten im Vergleich zu NF786.	131
Tab. 4.3	Inhibitorische Wirkstärke ausgewählter P2-Antagonisten im Vergleich zu SB9.....	134
Tab. 4.4	EC ₅₀ -Werte (µM) von endogenen Nukleotiden an klonierten rat/hP2Y ₂ -, ratP2Y ₄ -Rezeptoren sowie an P2X ₁ - und P _{2U} -Rezeptoren des Vas deferens (ratVD) und anderen nativen P _{2U} -Rezeptoren der Ratte.....	145
Tab. 4.5	EC ₅₀ -Werte (µM) von synthetischen Nukleotiden an klonierten rat/hP2Y ₂ -, ratP2Y ₄ -Rezeptoren sowie an P2X ₁ - und P _{2U} -Rezeptoren des Vas deferens (ratVD) und anderen nativen P _{2U} -Rezeptoren der Ratte.....	151
Tab. 4.6	Aktivitätsreihenfolge und hypothetische Zielstrukturen von Nukleotiden in Anwesenheit von Evans Blau.....	155
Tab. 4.7	Inhibitorische Aktivität von Suramin, PPADS und RB 2 an klonierten P2Y _{2/4} -Rezeptoren sowie UTP-sensitiver Rezeptor im Vas deferens der Ratte (ratVD).....	158
Tab. 4.8	Inhibitorische Aktivität von Suramin, PPADS und RB 2 an nativen P _{2U} - Rezeptoren der Ratte (%-Hemmung).....	160
Tab. 4.9	Rangfolge ausgewählter P2-Antagonisten an P _{2U} -Rezeptoren der Ratte.	162

10 PUBLIKATIONEN/TAGUNGEN

10.1 Originalartikel/ Übersichtsarbeiten

Lambrecht G., **Ganso M.**, Bäumert H.G., Spatz-Kümbel G., Hildebrandt C., Braun K., Mutschler E. (2000) 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. and Mutschler E. (2000) The novel pyridoxal-5'-phosphate derivative PPNDS potently antagonizes activation of P2X₁ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387, R19-21.

Baun K., Rettinger J., **Ganso M.**, Kassack M.U., Hildebrandt C., Ullmann H., Nickel P., Schmalzing G., Lambrecht G. (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X₁ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 364, 285-290.

Lambrecht G., Braun K., Damer S., **Ganso M.**, Hildebrandt C., Ullmann H., Kassack M. und Nickel P. (2002) Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr. Pharmac. Des.*, 8, 2371-2399.

Kassack M. U., Braun K., **Ganso M.**, Ullmann H., Nickel P., Böing 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.

10.2 Kongresse und Symposien

12th Camerino-Noordwijkerhout Symposium, "Receptor Chemistry Towards the Third Millennium", 5 - 9 September, 1999, Camerino/Italy,

Damer S., Czeche S., **Ganso M.**, Nickel P., Niebel B., Mutschler E., and Lambrecht G., Structure-activity relationship studies of compounds related to the P2X₁ receptor antagonist NF279. *Book of abstracts*, P55.

12th Camerino-Noordwijkerhout Symposium, "Receptor Chemistry Towards the Third Millennium", 5 - 9 September, 1999, Camerino/Italy,

Lambrecht G., Rettinger J., Bäumert H., Czeche S., Damer S., **Ganso M.**, Hildebrandt C., Niebel B., Schmalzing G. and Mutschler E., The pyridoxal-6-naphthylazo-5'-phosphate PPNDS potently antagonizes activation of P2X₁ Receptors. Book of abstracts, P56.

Purines 2000, International Symposium of Nucleosides and Nucleotides, July 9-13, 2000, Madrid/Spain,

Ganso M., Bäumert H.G., Spatz-Kümbel G., Hildebrandt C., Braun K., Mutschler E., Lambrecht G., Heterodimerisation of suramin and pyridoxalphosphate pharmacophores as a novel approach in the design of selective P2 receptor antagonist. Drug Dev. Res. 50, 1, 055.

42. Frühjahrstagung der DGPT, 13.-15. März 2001, Mainz/Deutschland,

Braun K., Rettinger J., **Ganso M.**, Hildebrandt C., Nickel P., Schmalzing G., Lambrecht G., NF449 - The first subnanomolar P2 Antagonist selective for recombinant rat P2X₁ receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363 (Suppl.), R35.

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., Is MRS 2179 P2Y₁-selective in whole tissues? Drug Dev. Res. 56: A153.

44. Frühjahrstagung der DGPT, 17.-20. März 2003, Mainz/Deutschland,

Ganso M., Menke K., Hildebrandt C., Bäumert H.G., Spatz-Kümbel G., Lambrecht G., Structure-activity relationships of SB9 analogues as selective antagonists of P2Y₁ receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 367 (Suppl.) R35.

11 DANKSAGUNG

Prof. Dr. Günter Lambrecht danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas, die unkomplizierte Bereitstellung von Arbeitsmitteln und für das große freundschaftliche Vertrauen in meine Person.

Mein Dank gilt Prof. Dr. H. Zimmermann für die Begutachtung der Dissertation, sowie für die Bereitstellung von Labor und Materialien im Institut für Neurochemie.

Dr. Ulrich Moser möchte ich für seine Hilfe in Promotionsangelegenheiten und der Institutsorganisation danken. Irma Bozyk danke ich für Ihren aufopfernden und liebevollen Einsatz bei der Tierpflege.

Prof. Dr. Peter Nickel, PD Dr. M. U. Kassack, Dr. Gregor Müller, Dr. Kirsten Wehner, Dipl. pharm. Heiko Ullmann danke ich für die Synthese und Bereitstellung von NF-Analoga. Insbesondere Matthias Kassack und Gregor Müller möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die häufig über das fachliche hinaus ging, danken.

PD Dr. Norbert Braun und Klaus Hammer danke ich für den Einführung in die Immunzyto- und Histochemie und für die wertvolle Zusammenarbeit zwischen unseren sich ergänzenden Arbeitskreisen.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Kollegin Susanne Horner, Ludwig Lohwasser, Dr. Steffani Ortinau, Uli, Ede und Katrin für das rasche Korrekturlesen und die vielen Tips und Verbesserungsvorschläge für das Manuskript bedanken.

Dr. Sittah Czeche, Dr. Christine Keim, Dr. Annette Nicke und Dr. Susanne Damer möchte ich für die herzliche Aufnahme, Einarbeitung in das Thema und die wissenschaftliche Betreuung danken.

Mein besonderer Dank gilt Uli Hermanni (Hebbes) und Dr. Edwin Bungardt, die mich überzeugten, eine Dissertation anzufertigen. Dr. Spendarmaz Aschrafi sowie Dr. Jürgen Rettinger danke ich für die molekular-biochemischen bzw. elektrophysiologischen Diskussionen während der Anfertigung der Dissertation. Caren Hildebrandt und Ina Henke möchte ich für Ihr technisches „Know-How“ bei der Ermittlung wichtiger Ergebnisse danken.

Kai Kreuzmann, Kirsten Menke und Matthias Linder danke ich für die vielen freundschaftlichen Erlebnisse im Labor, auf Kongressreisen sowie in der Freizeit.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern des Pharmakologischen Institutes,

DANKSAGUNG

insbesondere: Dr. Katharina Schindowski, Dr. Andrea Singer, Andrea Kastl, Barbara Siebert, Dr. Meinolf Wonnemann, Dr. Gisela Holoubek, Bettina Fröstl, Karin Merbitz-Zahradnik, Daniela Konca-Mucha, Elke Förster, Uta Keil, PD. Dr. Anne Eckert und Dr. Gunter Eckert für die nette Institutsatmosphäre.

Danke all jenen Freunden wie Ludwig, Gabe, Dieter, Annette, Thomas, Astrid, Nick, Filomena, Salam, Markus, Eva, Horst, Anne-Katrin, Sandra und Anka, die zum Glück eigentlich nichts mit der Promotion zu tun hatten und gerade deshalb so wichtig waren.

Katrin und meinen Eltern möchte ich für die unendliche Geduld für meine Belange und der ausdauernden Unterstützung für dieses Vorhaben von ganzem Herzen danken.

12 LEBENS LAUF

Persönliches

12.10.1973 geboren in Zerbst /Sachsen-Anhalt als Sohn von Brigitte Ganso geb. Schmidt (Fachverkäuferin) und Rolf Ganso (Zimmermann)

Schulbildung

09/1980 – 09/1981 Polytechnische Oberschule Hermann Danz, Magdeburg
 09/1981 – 09/1988 Polytechnische Oberschule Gerogi Dimitroff, Magdeburg
 09/1988 – 09/1992 Spezialschule für Naturwissenschaften/ Landesgymnasium Werner von Simens, Magdeburg
 1992 Abitur (in den Fächern: Deutsch, Mathematik, Englisch, Biologie, Geographie)

Zivildienst

09/1992 – 09/1993 Allgemein-Chirurgie, Walter-Friedrich Krankenhaus, Magdeburg

Studium

10/1993 – 09/1997 Pharmazie, Martin Luther-Universität, Halle an der Saale
 09/1995 1. Pharmazeutisches Examen
 09/1997 2. Pharmazeutisches Examen

Praktische Tätigkeiten

1993/1994 8 Wochen Famulatur, Krankenhaus-Apotheke des Walter-Friedrich Krankenhauses und Löwen-Apotheke in Magdeburg
 11/1997 - 04/1998 Praktikum, Apotheke der Dr-Host-Schmidt-Kliniken, Wiesbaden
 05/1998 - 10/1998 Praktikum, Borkumer Kur-Apotheke, Insel Borkum
 02/1994 – 12/1995 Pflegerische Hilfskraft, allgem. Chirurgie, Walter-Friedrich-Krankenhaus, Magdeburg (395h)
 06/1996 – 05/1997 Pflegerische Hilfskraft, medizinische Klinik, Berufsgenossenschaftliche Kliniken, Bergmannstrost, Halle a. d. Saale (361h)

Approbation

01/1999 Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

01/1999 – 12/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt (Main), Fach: Pharmakologie (Prof. Dr. G. Lambrecht)
 01/2004 – 03/2004 Krankenhausapotheker in der Apotheke des Universitätsklinikums der Fridrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
 seit 03/2004 Krankenhausapotheker in der Apotheke des Universitätsklinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Zusatzqualifikationen

01/1999 – 08/2003 aktiver Kollegiat des Graduiertenkollegs „Arzneimittel-Entwicklung und Analytik“, Fachbereich 14 der Goethe-Universität Frankfurt/Main
 seit 01/2004 Weiterbildung zum „Fachapotheker für klinische Pharmazie“
