

**Pharmakologische Charakterisierung von NF449 als  
hochpotenten und subtypeselektiven P2X<sub>1</sub>  
Rezeptorantagonisten**

Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Analogen der P2 Rezeptorantagonisten  
Suramin, NF023 und NF449 an nativen P2 Rezeptorsubtypen

Dissertation

zu Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

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

von

Kirsten Menke, geb. Braun  
aus Tübingen/ Baden-Württemberg

Frankfurt am Main 2003

(DF1)

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

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller  
1. Gutachter: Prof. Dr. G. Lambrecht  
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Stark  
Datum der Disputation: 11.09.2003

Meinen Eltern und Robert

Suavis laborum est praeteritorum memoria

*Cicero*

(Süß ist die Erinnerung an vergangene Mühen)



Mein herzlicher Dank gilt:

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Günter Lambrecht, für die Überlassung des Themas, für seine herausragende Betreuung und stetige Unterstützung dieser Arbeit, für seine Begeisterungsfähigkeit und die Ermöglichung der außergewöhnlichen Kongressreisen, sowie für sein immer offenes Ohr.

Meinem zweiten Gutachter, Prof. Dr. Holger Stark, für die schnelle und unkomplizierte Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Jürgen Rettinger und den Bonner Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Peter Nickel, für die erfolgreiche und freundschaftliche Kooperation.

Dr. Martyn Mahaut-Smith für die unkomplizierte und freundschaftliche Einladung in seinen Cambridge-Arbeitskreis, ohne den die Thrombozyten-Methoden heute wahrscheinlich noch nicht stehen würde.

Prof. Dr. Sebastian Harder und seiner Arbeitsgruppe, v.a. Dr. Jochen Graff, im Institut für klinische Pharmakologie für die amüsanten, morgendlichen Blutabnahmen, die unter anderem das Material für diese Arbeit lieferten.

Unserer Tierpflegerin, Irma Bozyk, deren kontinuierliche und hingebungsvolle Betreuung der Versuchstiere diese Arbeit erleichtert hat.

Meinen Laborkollegen Susanne Horner, Caren Hildebrandt und Matthias Linder für das lustige und entspannte Klima im Labor und für viele aufrichtige und aufrichtende Worte sowie Matthias Ganso für die hervorragende Einarbeitung im Labor, seine fachliche Kompetenz und für den Spaß in Camerino und Madrid.

Meinen ehemaligen Kollegen Frau Dr. Christine Keim (für sportliche Momente im `Pump´ und auf der Piste, feucht-fröhliche Momente im Frankfurter Nachtleben, kulturelle Momente mit Ally und Carrie und so manche andere Momente...), Frau Dr. Susanne Damer (für die beste Führung im Camerino-Kongress-Leben; leider viel zu schnell aus Frankfurt wieder weg), Kai Kreuzmann (für kulinarische Feste, die besten Weinproben und den Spaß im Labor und auf dem Berg), Herrn Dr. Steffen Leutz (für wundervolle Cabrio-Touren, Grillen, Buchscheer und gemeinsame Stürze beim Snow-Boarden -

hang loose!), Andrea Kastl (für den intensiven Gedankenaustausch und ihre ansteckende Begeisterungsfähigkeit), Dr. Niko Klan (für die Motivation zum Segelschein, viele lustige Feste wie Quartier Latin oder After-Work) und Anja Altmann (ein einfach liebenswürdiger Mensch) für erholsame Kaffee-/Teemomente, phantastische Urlaube/Kongresse und ihre Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

Ulrike Hermanni/Hebbes für die vielen kurzweiligen Unterhaltungen, die gemeinsamen Kinoerlebnisse, ihre Fähigkeit zuzuhören, sich zu begeistern und Freude zu teilen sowie für ihre unterstützende Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts insbesondere den netten Damen unseres Sekretariats, sowie Kristina Treiber, Uta Keil und Susanne Horner, die mich das Leben an und außerhalb der Uni genießen ließen.

Meinen Freundinnen Alexandra Thornagel und Claudia Scheid, die mir immer wieder durch ihre Freundschaft den Rücken stärken.

Meinen Eltern, die durch ihre liebevolle Unterstützung und uneingeschränkten Rückhalt diese Arbeit erst ermöglichten.

Meinem Mann, Robert Menke, der mir durch seine Liebe und Zuversicht immer wieder die richtige Richtung weist und die Augen auf das Wesentliche im Leben lenkt.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. Geschichte der Nukleotidrezeptoren</b> .....	2
<b>1.2. Klassifizierung von Nukleotidrezeptoren und Ektonukleotidasen</b> .....	6
1.2.1. P1/Adenosin Rezeptoren.....	6
1.2.2. P2 Rezeptoren.....	7
1.2.2.1. Ionotrope P2X Rezeptoren.....	8
1.2.2.2. Metabotrope P2Y Rezeptoren .....	18
1.2.3. Ektonukleotidasen.....	25
1.2.4. Nukleotidrezeptoren und CD39 auf humanen Thrombozyten ....	26
<b>1.3. P2 Rezeptor-Liganden</b> .....	31
1.3.1. Agonisten.....	31
1.3.2. Antagonisten .....	36
1.3.2.1. Nukleotide .....	36
1.3.2.2. Histochemische Farbstoffe .....	38
1.3.2.3. PPADS und Analoge .....	38
1.3.2.4. Suramin und Analoga .....	50
1.3.3. Radioliganden.....	52
<b>1.4. Liganden an Ektonukleotidasen</b> .....	53

---

<b>1.5. Therapeutisches Potential von Liganden der Nukleotidrezeptoren</b> .....	53
1.5.1. P2X Rezeptoren .....	53
1.5.2. P2Y Rezeptoren .....	56
<b>2. Problemstellung und Ziel der Arbeit</b> .....	59
<b>3. Material und Methoden</b> .....	65
<b>3.1. Material</b> .....	66
3.1.1. Substanzen .....	66
3.1.1.1. Kommerziell erhältliche Substanzen .....	66
3.1.1.2. Zur Verfügung gestellte Substanzen.....	67
3.1.2. Herstellung von Stammlösungen.....	68
3.1.3. Puffer und Lösungen .....	68
3.1.4. Tiere .....	69
<b>3.2. Methoden</b> .....	70
3.2.1. Isoliertes Vas deferens der Ratte .....	70
3.2.1.1. Modell des P2X <sub>1</sub> Rezeptors .....	70
3.2.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....	75
3.2.2.1. Modell des P2Y <sub>1</sub> Rezeptors .....	75
3.2.2.2. Modell des P2X <sub>3</sub> Rezeptors .....	77
3.2.2.3. Rezeptorspezifität.....	78
3.2.3. Ektonukleotidasen von <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	80
3.2.4. Humane Thrombozyten.....	82



---

3.2.5. Auswertung und Statistik .....	88
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>89</b>
<b>4.1. Inhibitorische Potenz von Suramin-Analoga mit Biphenyl- struktur an nativen P2 Rezeptoren.....</b>	<b>90</b>
4.1.1. Vas deferens der Ratte .....	92
4.1.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....	94
<b>4.2. Screening von Suramin-Analoga an nativen P2 Rezeptoren .....</b>	<b>97</b>
4.2.1. Große Harnstoffe .....	98
4.2.1.1. Variation des zentralen Harnstoffes .....	99
4.2.1.2. Variation der Phenylringe .....	99
4.2.1.3. Variation der Aminonaphthalinringe .....	100
4.2.2. Kleine Harnstoffe .....	102
4.2.2.1. Variation der Phenylringe .....	102
4.2.2.2. Variation der Aminonaphthalinringe .....	103
4.2.2.3. `Schmetterling´-Strukturen .....	104
<b>4.3. Screening von NF110-Analoga.....</b>	<b>107</b>
4.3.1. Variation der Sulfonsäurenposition .....	108
4.3.1.1. Sulfonsäurenposition.....	108
4.3.1.2. Variation des zentralen Harnstoffes .....	108
4.3.2. Variation durch Einführen von Methylenbrücken.....	109
4.3.2.1. Einführen von Methylenbrücken.....	109
4.3.2.2. Variation der Sulfonsäurenposition .....	109
4.3.2.3. Variation des zentralen Harnstoffes .....	110

---

4.3.2.4.	Variation im Verknüpfungsmuster der zentralen Phenylyringe .....	110
<b>4.4.</b>	<b>Screening von NF449-Analoga an nativen P2 Rezeptoren</b> .....	<b>113</b>
4.4.1.	Variation der Sulfonsäurenposition .....	113
4.4.2.	Variation des zentralen Harnstoffes .....	114
4.4.3.	Austausch der Sulfonsäure-substituierten Phenylyringe .....	114
4.4.4.	Monomere der `Schmetterling´-Verbindungen.....	115
<b>4.5.</b>	<b>Detaillierte Charakterisierung von NF449 Analoga</b> .....	<b>118</b>
4.5.1.	Inhibitionskurven an P2X <sub>1</sub> Rezeptoren.....	118
4.5.2.	Inhibitionskurven an P2X <sub>3</sub> Rezeptoren.....	120
4.5.3.	Inhibitionskurven an P2Y <sub>1</sub> Rezeptoren.....	122
4.5.4.	Hemmung von Ektonukleotidasen.....	125
<b>4.6.</b>	<b>Pharmakologische Charakterisierung von NF449</b> .....	<b>127</b>
4.6.1.	Inhibitionskurven an P2X <sub>1</sub> Rezeptoren des Vas deferens der Ratte .....	127
4.6.2.	Effekt von NF449 auf $\alpha\beta$ meATP-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven am Vas deferens der Ratte .....	128
4.6.3.	Kinetik und Reversibilität an P2X <sub>1</sub> Rezeptoren .....	130
4.6.4.	Inhibitionskurven an P2Y <sub>1</sub> Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum .....	131
4.6.5.	Effekt von NF449 auf ADP $\beta$ S-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....	132
4.6.6.	Kinetik und Reversibilität an P2Y <sub>1</sub> Rezeptoren .....	135

---

4.6.7. Rezeptorspezifität .....	136
<b>4.7. Inhibitionskurven von MRS2179 an der Longitudinal- muskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....</b>	<b>137</b>
<b>4.8. Schild-Analyse von MRS2179 an der Longitudinal- muskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....</b>	<b>138</b>
<b>4.9. Untersuchungen zur Kurvenversteilung am Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen pIC<sub>50</sub>-Werten an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens .....</b>	<b>141</b>
4.9.1. Hemmung eines Relaxation-vermittelnden Kaliumkanals durch Apamin.....	141
4.9.2. Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen.....	143
4.9.3. Längsschnitt und Deepithelisieren der Organe .....	146
4.9.4. Variation der Organbadgröße .....	148
<b>4.10. Thrombozyten-Fluoreszenzspektroskopie .....</b>	<b>149</b>
4.10.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von $\alpha\beta$ meATP .....	149
4.10.2. Hemmung der P2X <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort.....	152
4.10.3. Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP-freiem ADP.....	158
4.10.4. Hemmung der P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort durch NF449 .....	160
4.10.5. Hemmung der P2Y <sub>1</sub> -Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort durch MRS2179 .....	161

---

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	163
<b>5.1.</b>	<b>Auswahl der verwendeten Modelle</b> .....	164
5.1.1.	Vas deferens der Ratte (P2X <sub>1</sub> Rezeptor) .....	164
5.1.2.	Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2X <sub>3</sub> Rezeptor).....	166
5.1.3.	Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2Y <sub>1</sub> Rezeptor).....	168
5.1.4.	Humane Thrombozyten (P2X <sub>1</sub> Rezeptor).....	169
5.1.5.	Humane Thrombozyten (P2Y <sub>1</sub> Rezeptor).....	171
<b>5.2.</b>	<b>Inhibitorische Potenz von Suramin-Analoga mit Biphenylstruktur an nativen P2 Rezeptoren</b> .....	173
<b>5.3.</b>	<b>Screening von Suramin-Analoga an nativen P2 Rezeptoren</b> .....	178
5.3.1.	Große Harnstoffe .....	178
5.3.2.	Kleine Harnstoffe .....	179
<b>5.4.</b>	<b>Screening von NF110-Analoga an nativen P2 Rezeptoren</b> .....	181
5.4.1.	Variation der Sulfonsäurenposition .....	181
5.4.2.	Variation durch Einführen einer Methylenbrücke .....	182
<b>5.5.</b>	<b>Screening von NF449-Analoga an nativen P2 Rezeptoren</b> .....	182
<b>5.6.</b>	<b>Detaillierte Charakterisierung von NF449-Analoga</b> .....	184
5.6.1.	Inhibitionskurven an P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>3</sub> und P2Y <sub>1</sub> Rezeptoren.....	184
5.6.2.	Hemmung von Ektonukleotidasen.....	187

---

<b>5.7. Pharmakologische Charakterisierung von NF449</b> .....	188
5.7.1. Effekt von NF449 auf $\alpha\beta$ meATP-induzierte Dosis- Wirkungs-Kurven am Vas deferens der Ratte .....	188
5.7.2. Effekte von NF449 und MRS2179 auf ADP $\beta$ S-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum .....	189
5.7.3. Rezeptor-Spezifität .....	190
5.7.4. Effekte von NF449 an weiteren nativen und rekombinanten P2 Rezeptoren.....	191
<b>5.8. Untersuchungen zur Kurvenversteilung am Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen pIC<sub>50</sub>-Werten an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens</b> .....	194
5.8.1. Desensibilisierungs-Effekte .....	196
5.8.2. Hemmung eines Relaxations-vermittelnden Kaliumkanals durch Apamin.....	196
5.8.3. Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.....	198
5.8.4. Längsschnitt und Deepithelisieren der Organe .....	199
5.8.5. Variation der Organbadgröße .....	200
<b>5.9. Thrombozyten-Fluoreszenzspektroskopie</b> .....	201
5.9.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von $\alpha\beta$ meATP.....	201
5.9.2. Inhibitionskurven von NF449 an humanen P2X <sub>1</sub> Rezeptoren.....	202
5.9.3. Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP-freiem ADP .....	204
5.9.4. Inhibitionskurven an humanen P2Y <sub>1</sub> Rezeptoren .....	204

---

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	207
6.1.	<b>Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Suramin- und NF023-Analoga</b> .....	208
6.2.	<b>Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF449-Analoga</b> .....	210
6.3.	<b>Pharmakologische Charakterisierung von NF449</b> .....	213
6.4.	<b>Untersuchungen zur Kurvenverteilung des Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen pIC<sub>50</sub>-Werten an <i>Xenopus laevis</i> Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens</b> .....	214
6.5.	<b>Vergleich der Ergebnisse aus Experimenten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens und rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren mit den Ergebnissen an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten</b> .....	215
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	217
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	243
<b>9.</b>	<b>Publikationen, Teilnahme an Kongressen und Symposien</b> .....	246
<b>10.</b>	<b>Curriculum Vitae</b> .....	249

# 1. Einleitung

## 1.1. Geschichte der Nukleotidrezeptoren

Auch wenn bereits seit über 70 Jahren Effekte von extrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) bekannt sind (Drury und Szent-Györgyi, 1929), kam der erste Hinweis darauf, dass ATP einen Neurotransmitter darstellen könnte, erst im Jahre 1959 von Holton, der die Freisetzung von ATP aus primären, afferenten, sensorischen Nervenfasern schilderte. Er berichtete, dass ATP in Konzentrationen ausgeschüttet werde, die ausreichten, um die Gefäße in der Ohrarterie von Kaninchen zur Dilatation zu bringen (Holton, 1959).

Anfang 1960 zeichneten Geoffrey Burnstock und seine Kollegen an der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes hemmende Potentiale (inhibitory junction potentials; IJP's) nach Stimulation sogenannter nicht-adrenerger, nicht-cholinerg (nonadrenergic, noncholinergic nerves; NANC) Nerven auf (Burnstock, 1999). Nach weiteren 10 Jahren wurde durch Geoffrey Burnstock erstmalig ATP als verantwortlicher Neurotransmitter dieser Nerven vermutet und der Begriff 'purinerg' geboren (Burnstock, 1972). Mit seiner 'purinergen Theorie' schlug Burnstock vor, dass ATP alle Kriterien erfüllen könnte, die eine Substanz als Neurotransmitter charakterisieren:

1. ATP wird in Neuronen synthetisiert und als Transmitter in Vesikeln gespeichert.
2. Nach elektrischer Stimulation erfolgt die synaptische Freisetzung von ATP.
3. Postsynaptische Effekte nach exogener Gabe von ATP imitieren die Reaktionen nach Nervenreizung.
4. Die Effekte von ATP werden durch abbauende Enzyme zeitlich begrenzt.
5. ATP führt über Aktivierung spezifischer postsynaptischer Rezeptoren zur Signalweiterleitung.

Es war erneut Burnstock, der im Jahre 1978 die erste Unterteilung von purinergen Rezeptoren auf der Basis von Wirkstärken von Agonisten und



Antagonisten in P1 Rezeptoren und P2 Rezeptoren vornahm (Burnstock, 1978).  
Dabei galt:

P1 Rezeptoren: Agonisten-Rangfolge: Adenosin  $\geq$  AMP  $>$  ADP  $\geq$  ATP

Antagonisten: Methylxanthine

Adenylatzyklase-Modulation

P2 Rezeptoren: Agonisten-Rangfolge: ATP  $\geq$  ADP  $>$  AMP  $>$  Adenosin

Stimulation der Prostaglandinsynthese.

### ***P2X und P2Y Purinozeptoren***

Im Jahre 1985 erfolgte durch Burnstock und Kennedy die weitere Untergliederung der P2 Rezeptoren in P<sub>2X</sub> und P<sub>2Y</sub> Rezeptoren, wiederum hauptsächlich auf pharmakologischer Basis von Agonisten-Rangfolgen (Burnstock und Kennedy, 1985):

**P<sub>2X</sub> Purinozeptor:** Agonisten-Rangfolge:

$\alpha\beta\text{meATP} = \beta\gamma\text{meATP} > \text{ATP} = 2\text{-meSATP}$

Antagonist: ANAPP<sub>3</sub>

Desensibilisierung durch  $\alpha\beta\text{meATP}$

**P<sub>2Y</sub> Purinozeptor:** Agonisten-Rangfolge:

$2\text{-meSATP} \gg \text{ATP} > \alpha\beta\text{meATP} = \beta\gamma\text{meATP}$

Kein Antagonismus durch ANAPP<sub>3</sub>

Kaum Desensibilisierung durch  $\alpha\beta\text{meATP}$

Es grenzt an ein Wunder, dass diese Einteilung, basierend auf Agonisten-Sensitivitäten, durch glücklichen Zufall die heute akzeptierte Einteilung der P2 Rezeptoren aufgrund von molekularen Strukturen widerspiegelt. So gehören die P2X Rezeptoren der Gruppe der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle und die P2Y Rezeptoren der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an.

### ***P<sub>2T</sub> und P<sub>2Z</sub> Rezeptoren***

Bereits ein Jahr nach der Einteilung in P<sub>2X</sub> und P<sub>2Y</sub> Rezeptoren wurden zwei weitere P<sub>2</sub> Rezeptor-Subtypen entdeckt, die nicht in dieses Klassifizierungsschema passten. Der eine Rezeptor wurde aufgrund seines Vorkommens auf Thrombozyten und Megakaryozyten P<sub>2T</sub> Rezeptor (aktiviert durch ADP, inhibiert durch ATP) (Born, 1962; Haslam und Cusack, 1981), der andere aufgrund alphabetischer Kontinuität P<sub>2Z</sub> Rezeptor genannt (Vorkommen: Mastzellen und Lymphozyten; aktivierbar durch hohe Konzentrationen von ATP) (Cockroft und Gomberts, 1979).

### ***P<sub>2U</sub> Rezeptoren***

Wenige Jahre später stellte sich heraus, dass extrazelluläre Uridin-Nukleotide vergleichbare Effekte wie ATP auslösen können. Der entsprechende Rezeptor unterschied sich hinsichtlich der Agonisten-Rangfolge: UTP = ATP > ADP >  $\alpha\beta$ meATP = 2-meSATP, von den bisher bekannten Rezeptor-Subtypen. Er ließ sich durch die Agonisten-Rangfolge UTP = UDP >> UMP = CMP und Kreuz-Desensibilisierungsexperimente von den ATP Rezeptoren differenzieren (von Kűgelgen und Starke, 1990).

### ***P<sub>2S</sub> Rezeptoren***

Dieser Rezeptor-Subtyp wurde als kontraktionsvermittelnder Rezeptor auf der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum identifiziert, der gleich potent von  $\alpha\beta$ meATP und 2-meSATP stimuliert wurde (Wiklund und Gustafsson, 1988). Neuere Befunde stellen allerdings die alleinige Existenz dieses Rezeptors in Frage. Durch Kennedy und Humphrey wurden zwei unterschiedliche  $\alpha\beta$ meATP-sensitive bzw. -insensitive Rezeptoren im Ileum beschrieben (Kennedy und Humphrey, 1994). Der eine Rezeptor befindet sich somatodendritisch auf cholinergen Neuronen, so dass nach dessen Stimulation axoterminal Acetylcholin als kontraktionsinduzierender Neurotransmitter ausgeschüttet wird. Der andere P<sub>2Y<sub>1</sub></sub>-ähnliche Rezeptor ist postsynaptisch auf den glatten Muskelzellen lokalisiert und führt dort direkt nach Aktivierung zur

Kontraktion des Gewebes (Kennedy und Humphrey, 1994; Lambrecht et al., 1999).

### ***P<sub>2D</sub> und P<sub>4</sub> Rezeptoren***

Ein neuer P2 Rezeptor-Subtyp wurde vermutet, nachdem sich die Hinweise auf Adenindinukleotide (Ap<sub>n</sub>A's; n = Anzahl der Phosphate zwischen den beiden terminalen Adeninresten) als Neurotransmitter oder -modulatoren häuften (Pintor und Miras-Portugal, 1995). In verschiedenen Geweben konnte gezeigt werden, dass Ap<sub>n</sub>A's und ATP den gleichen P2 Rezeptor-Subtyp aktivieren. Aufgrund von Radioligandbindungs- und Verdrängungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]Ap<sub>4</sub>A an Rattenhirn-Synaptosomen konnten zwei Bindungsstellen mit hoher und niedrigerer Affinität identifiziert werden. Basierend auf der Verdrängungsreihenfolge von Ap<sub>4</sub>A > ADPβS > βγ-imido-ATP > αβmeATP >> 2-meSATP an der hochaffinen Bindungsstelle wurde ein neuer P2 Rezeptor-Subtyp, P<sub>2D</sub>, vorgeschlagen (Pintor et al., 1993). Der ebenfalls in Maus- und Meerschweinchen-Synaptosomen nachgewiesene, ausschließlich durch Diadenosinpolyphosphate stimulierbare, P2 Rezeptor-Subtyp wurde P<sub>4</sub> Rezeptor genannt (Pintor et al., 2000). Durch die enge strukturelle Ähnlichkeit zwischen Diadenosinpolyphosphaten und ATP, muss allerdings sehr vorsichtig bei der Identifizierung der spezifischen Rezeptor-Subtypen sowie der Differenzierung ihrer physiologischen Effekten vorgegangen werden. Vor allem in Hinblick auf die vorhandenen Diadenosinpolyphosphatasen, die schnell Ap<sub>n</sub>A's in asymmetrische und Ap<sub>n-1</sub> Nukleotide wie z.B. ATP und ADP abbauen, die wiederum durch Ektonukleotidasen bis zum Adenosin hydrolysiert werden können, sind Effekte durch Ap<sub>n</sub>A's sehr kritisch zu bewerten.

### ***P<sub>3</sub> Rezeptoren***

Ein Rezeptor, der sowohl durch Nukleoside und Adenin wie auch durch Pyrimidinnukleotide aktiviert und sowohl durch Xanthine wie auch durch αβmeATP antagonisiert wird, wurde als P<sub>3</sub> Rezeptor vorgestellt. Er wurde präsynaptisch an verschiedenen Geweben vermutet (Forsyth et al., 1991; Shinozuka et al., 2002). Inzwischen häufen sich Befunde, nach denen es sich vermutlich um zwei unterschiedliche Nukleotidrezeptoren handelt, die

präsynaptisch gemischte Effekte vermitteln: ein  $P_1$  Rezeptor, der durch Nukleoside und Nukleotide aktiviert wird, vermutlich der  $A_1$  Rezeptor-Subtyp, und ein P2Y-ähnlicher Rezeptor, der ausschließlich durch Nukleotide stimuliert wird. Diese Vermutungen bedürfen aber weiterer Untersuchungen, bevor das International Union of Pharmacology Receptor Nomenclature Committee (IUPHAR) den  $P_3$  Rezeptor offiziell anerkennt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nukleotide sowohl als Neurotransmitter, Kotransmitter (siehe Burnstock, 1999), wie auch als autokrine und parakrine Botenstoffe anerkannt sind. Nukleotide können auf unterschiedlichstem Wege in den Extrazellularraum gelangen. Sie treten beispielsweise nach Verletzung bzw. Tod der Zellen aus, werden aus synaptischen Vesikeln verschiedener Neurone sezerniert, durch Transporterproteine der 'ATP-binding cassette' Familie oder durch aktivierte Thrombozyten oder Leukozyten freigesetzt (Zimmermann, 1996). Es wird auch von einer konstitutiven basalen Sekretion im Gleichgewicht von ca. 3 nM ATP gesprochen. (Lazarowski et al., 2001). Die Effekte der Nukleotide an ihren Rezeptoren werden mit ihrem Abbau durch zellmembranständige oder auch lösliche Ektonukleotidasen zeitlich begrenzt. Im Falle von Adenin-Nukleotiden kann das Hydrolyseprodukt Adenosin weitere  $P_1$ -Rezeptor-vermittelte Reaktionen initiieren.

## **1.2. Klassifizierung von Nukleotidrezeptoren und Ektonukleotidasen**

### **1.2.1. $P_1$ /Adenosin Rezeptoren**

Vier  $P_1$  Rezeptor-Subtypen ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$ ) wurden bisher pharmakologisch charakterisiert und kloniert. Sie sind Mitglieder der sieben-transmembranären, G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Familie und weisen eine breite Verteilung im Körper auf (Ralevic und Burnstock, 1998).

$A_1$  Rezeptoren zeigen eine hohe Affinität für Adenosin. Nach Aktivierung erfolgt über Kopplung an  $G_i$ -Proteine die Hemmung der Adenylatzyklase und somit ein

Abfall des cAMP-Spiegels. Weitere  $A_1$ -Effekte werden über Kalziumkanäle vom N-Typ, Kaliumkanäle und Phospholipase C sowie NO-Produktion ausgelöst. Allgemeine Antagonisten sind Xanthine, inklusive des psychostimulatorischen Koffeins und Cyclopentylxanthin (CPX;  $K_i = 0.46$  nM).  $A_1$  Rezeptoren werden selektiv durch Cyclopentyladenosin (CPA;  $K_i = 0.6$  nM) und 2-Chlorocyclopentyladenosin (CCPA;  $K_i = 0.6$  nM) stimuliert (Williams und Jarvis, 2000).

$A_{2A}$  Rezeptoren weisen ebenfalls eine hohe Affinität für Adenosin auf. Nach Stimulation führt die Aktivierung der Adenylatzyklase sowie die Beteiligung von N- und P-Typ Kalziumkanälen zur weiteren Signaltransduktion. Dieser Subtyp ist hauptsächlich im ZNS lokalisiert. Die Verbindung CGS21680C wird als Prototyp eines  $A_{2A}$  Rezeptor-Agonisten verwendet. Als selektive Antagonisten dienen die Verbindungen KF17837, CSC, SCH58261 und ZM241385 (siehe Williams und Jarvis, 2000).

$A_{2B}$  Rezeptoren zeigen eine deutlich geringere Affinität für Adenosin. Nach Stimulation erfolgt ebenfalls eine Aktivierung der Adenylatzyklase. Sie sind sowohl im ZNS wie auch in der Peripherie lokalisiert. Selektive Agonisten und Antagonisten sind bisher nur schwierig zu identifizieren. Manche Effekte, die durch den unselektiven Agonisten NECA ausgelöst werden, scheinen  $A_{2B}$  Rezeptor-vermittelt zu sein. Eine vielversprechende Verbindung stellt MRS1595 dar, die an humanen  $A_{2B}$  Rezeptoren einen  $K_i$ -Wert von 19 nM aufweist (Struktur siehe Williams und Jarvis, 2000).

$A_3$  Rezeptoren führen nach Aktivierung sowohl zur Hemmung der Adenylatzyklase wie auch zur Stimulation der Phospholipase C (Williams und Jarvis, 2000). Als selektive Agonisten werden IB-MECA und Cl-IB-MECA, als Antagonisten die Verbindungen L-268605 und MRS1220 (Struktur siehe Williams und Jarvis, 2000) verwendet.

### 1.2.2. P2 Rezeptoren

Wie oben bereits geschildert, wurden native P2 Rezeptoren ursprünglich aufgrund der Reihenfolge steigender agonistischer Potenz von Purin- und

Pyrimidin-Nukleotiden sowie deren Dinukleotidpolyphosphat-Analoga in die verschiedene Subtypen P<sub>2X</sub>, P<sub>2Y</sub>, P<sub>2U</sub>, P<sub>2T</sub>, P<sub>2Z</sub>, P<sub>2S</sub>, P<sub>2D</sub>, P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> untergliedert (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht et al., 1999). Davon wurden P<sub>2X</sub>, P<sub>2Y</sub>, P<sub>2U</sub>, P<sub>2T</sub> und P<sub>2Z</sub> Rezeptoren bisher kloniert. Da die alleinige Rezeptor-Subklassifizierung basierend auf pharmakologischen Kriterien von Agonisten nicht länger haltbar ist, bleibt die eigenständige Identität der übrigen Subtypen noch endgültig nachzuweisen (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht, 2000). Ausgehend von dem Vorschlag von Abbraccio und Burnstock wurde ein neues Klassifizierungsschema für P<sub>2</sub> Rezeptoren eingeführt, das die molekulare Struktur und die Signaltransduktionswege zu Grunde legt (Abbraccio und Burnstock, 1994). Danach werden 2 Klassen unterschieden: die G-Proteingekoppelten P<sub>2Y</sub> Rezeptoren, die die Subtypen P<sub>2Y</sub>, P<sub>2U</sub>, P<sub>2T</sub> beinhalten, und die ionotropen P<sub>2X</sub> Rezeptoren, zu denen die Subtypen P<sub>2X</sub> und P<sub>2Z</sub> gehören.

### 1.2.2.1. Ionotrope P<sub>2X</sub> Rezeptoren

Alle P<sub>2X</sub> Rezeptoren sind Kationen-selektive Kanäle, die für Natrium- und Kaliumionen nahezu äquivalent und für Kalziumionen signifikant permeabel sind. Sie vermitteln zum Beispiel die schnelle (<10 ms) exzitatorische Neurotransmission in Nervenzellen, Gliazellen oder glatten Muskelzellen. Die P<sub>2X</sub> Rezeptor-vermittelte Membrandepolarisation kann zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle vom L-Typ führen und die Ca<sup>2+</sup>-stimulierte Tyrosinkinase aktivieren. Diese kann wiederum MAP-Kinasen aktivieren (ERK1 und ERK2), die an der Modulation von Transkriptionsprozessen beteiligt sind (Jacobson et al., 2002). Ursprünglich wurde angenommen, dass der P<sub>2X<sub>7</sub></sub> Rezeptor in seiner Eigenschaft, bei andauernder Agonisten-Anwesenheit eine große Pore zu bilden, einzigartig ist. Neuere Studien konnten aber zeigen, dass sowohl rekombinante P<sub>2X<sub>2</sub></sub>, P<sub>2X<sub>4</sub></sub> und P<sub>2X<sub>2/3</sub></sub> Rezeptoren wie auch einige native Rezeptoren vergrößerte Poren bilden können (Robertson et al., 2001). Sieben Gene, die für die P<sub>2X</sub> Rezeptor-Untereinheiten (P<sub>2X<sub>1-7</sub></sub>) kodieren, wurden aus Geweben des Menschen, der Maus und der Ratte kloniert. Diese Untereinheiten weisen eine Sequenzidentität von 36 bis 48 Prozent auf. Ihre Größe rangiert von 379 bis

595 Aminosäuren. Ihre strukturellen Eigenschaften sind zwei transmembranäre Domänen aus jeweils ca. 20 Aminosäuren, die durch eine extrazelluläre, N-glykosylierte Schleife (aus ca. 300 Aminosäuren mit 10 hoch konservierten Cysteinresten) verbunden sind sowie intrazelluläre N- und C-Termini (Lambrecht, 2000).

P2X Rezeptoren sind oligomere Proteine, die aus mehreren Untereinheiten einen funktionellen Ionenkanal bilden. Einige Versuche wurden bereits unternommen, um die genaue Stöchiometrie der P2X Rezeptoren aufzuklären. Sowohl biochemische wie auch elektrophysiologische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Trimere das essentielle Strukturelement von P2X Rezeptorkanälen darstellen (Nicke et al., 1999, 2003; Stoop et al., 1999; Rettinger et al., 2000a). Die Untersuchung chimärer Rezeptoren zeigte, dass die zweite Transmembrandomäne des P2X Rezeptors für die Assemblierung der Untereinheiten essentiell ist (Robertson et al., 2001). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet die Bindungsstelle für Nukleotide und Antagonisten an P2X Rezeptoren, wobei konservierte Lysinreste eine bedeutende Rolle zu spielen scheinen (Mackenzie et al., 1999; Ennion et al., 2000; Jiang et al., 2000; Khakh et al., 2001). Durch Einzelpunkt-Mutationen der 4 hochkonservierten Tyrosine des humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptors konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäuren eine wichtige Rolle in der Funktionalität und der dreidimensionalen Struktur des P2X<sub>1</sub> Rezeptors spielen (Toth-Zsomboki et al., 2002). Durch gezielten Austausch bestimmter Cysteinreste konnten weiterhin Aminosäuren, die in der Kanalwand sitzen oder eine Rolle beim Kanaldurchgang spielen, identifiziert werden. So führt das Fehlen eines Leucins in der 2. Transmembrandomäne des P2X<sub>1</sub> Rezeptors, wie sie eine natürlich vorkommende Mutation aufweist, zu einem völlig unfunktionellen Rezeptor (Oury et al., 2000). Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Teil der P2X<sub>2</sub> Rezeptor-Pore durch die zweite hydrophobe Domäne gebildet wird (Egan et al., 1998) und Val<sup>48</sup>, das am äußeren Ende der ersten hydrophoben Domäne sitzt, an der Öffnung des Kanals beteiligt ist (Haines et al., 2001a, b).

P2X Rezeptoren unterscheiden sich untereinander deutlich bezüglich ihrer Eigenschaft, bei längerer Agonistenstimulation zu desensibilisieren. Experimente mit Punktmutationen deuten darauf hin, dass Aminosäuren am C-Terminus des Ratten-P2X<sub>2</sub>-Rezeptors eine bedeutende Rolle hinsichtlich des Ausmaßes an Desensibilisierung spielen. Weitere Domänen könnten ebenfalls zur Desensibilisierung beitragen (Koshimizu et al., 1999; Khakh et al., 2001). Ennion und seine Kollegen zeigten durch Entfernen der Proteinkinase-C-Bindungsstelle des N-Terminus humaner P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, dass Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung eine entscheidende Rolle in der Regulation der Kanalfunktion zu spielen scheint (Ennion und Evans, 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass neben der schnellen Desensibilisierung auch Internalisierungsprozesse für ein mangelndes Ansprechen von Zellen bzw. Geweben nach wiederholter Agonistengabe verantwortlich sein könnten (Dutton et al., 2000; Li et al., 2000; Ennion und Evans, 2001).

Neben der Assemblierung zu homomeren oder heteromeren P2X Rezeptoren scheinen P2X Untereinheiten auch in der Lage zu sein, mit anderen Ligand-gesteuerten Ionenkanälen funktionelle Einheiten zu bilden, wie z.B. den  $\alpha$ -Untereinheiten von neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (Khakh et al., 2000; Galligan, 2002). Eine aktuelle Arbeit zeigt die Kopplung von P2X<sub>2</sub> Rezeptor-Untereinheiten mit serotoninergen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in nativen Geweben wie auch nach heterologer Expression in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen. Dabei scheint die intrazelluläre C-terminale Domäne des P2X<sub>2</sub> Rezeptors für die Interaktion verantwortlich zu sein (Boue-Grabot et al., 2003).

P2X Rezeptoren weisen eine breite Verteilung sowohl im zentralen Nervensystem wie auch in der Körperperipherie auf, wo sie bei einer großen Anzahl biologischer Prozesse eine wichtige physiologische und pathophysiologische Rolle spielen (Ralevic und Burnstock, 1998). Diese beinhalten Muskelkontraktion, Modulation des kardiovaskulären, respiratorischen und immunologischen Systems, Entzündung und Zelltod, Entstehung und Weiterleitung von Schmerzsignalen, schnelle synaptische



Übertragung, Modulation der Transmitterfreisetzung und neuronale Erregbarkeit (Lambrecht, 2000).

Funktionelle Expression in heterologen Systemen führte zur Entdeckung verschiedener Phänotypen von homomeren und heteromeren P2X Rezeptoren, die sich hauptsächlich in der Kinetik der Desensibilisierung und dem pharmakologischen Profil der beiden Agonisten ATP und  $\alpha\beta$ meATP sowie der Antagonisten Suramin und PPADS (Pyridoxal-5'-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure) unterscheiden. Auf Basis kinetischer Parameter wurden die P2X Rezeptoren in drei Gruppen untergliedert (Ralevic und Burnstock, 1998):

Gruppe 1: homomere P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren

schnelle Aktivierung innerhalb von 0.01-0.1 Sekunden

schnelle Desensibilisierung innerhalb von 0.1 -10 Sekunden

Gruppe 2: P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/6</sub>, P2X<sub>5</sub> Rezeptoren

schnelle Aktivierung innerhalb von 0.1-1 Sekunden

langsame Desensibilisierung innerhalb von 10-100 Sekunden

Gruppe 3: P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>4/6</sub>, P2X<sub>7</sub>

gleiche Kinetik wie Gruppe 2 mit einer schnellen und einer

langsamen Desensibilisierungsphase

Der **P2X<sub>6</sub>** Rezeptor stellt eine Besonderheit dar, da er nicht als homomerer Rezeptor exprimiert zu werden scheint (Collo et al., 1996). Er bildet mit unterschiedlichen Untereinheiten heteromere P2 Rezeptor-Subtypen (North und Surprenant, 2000). Ursprünglich aus den oberen Halsganglien und dem Gehirn von Ratten kloniert, weist der P2X<sub>6</sub> Rezeptor eine breite Verteilung im ZNS und im Ratten-Nephron auf (Guile et al., 2001). In-situ-Analysenstudien von P2X Rezeptoren entdeckten eine neue Untereinheiten-Kombination, den möglichen heteromeren **P2X<sub>2/5</sub>** Rezeptor, der sich pharmakologisch von den Übrigen unterscheidet (Patel et al., 2001). Aktuelle Experimente weisen auf eine weitere Heteroassemblierung in Form von **P2X<sub>1/2</sub>** Rezeptoren hin (Torres et al., 1999;

Brown et al., 2002). Weitere Untersuchungen werden benötigt, um diese Ergebnisse zu untermauern.

### **Gruppe 1 Rezeptoren (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>)**

**P2X<sub>1</sub>** Rezeptoren wurden ursprünglich aus dem Samenleiter (Vas deferens) der Ratte (Valera et al., 1994) und der Harnblase des Menschen (Valera et al., 1995), der Ratte und der Maus kloniert. Messenger-RNA konnte neben dem Vas deferens und der Blase in glatten Muskelzellen kleiner Arterien und Arteriolen, der Lunge und Milz, Spinalganglien, Trigemini-Nervenstrang, Rückenmark und Gehirn, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen werden (Guile et al., 2001; Jacobson et al., 2002). Durch Ohkubo und seine Kollegen wurde eine Splice-Variante des P2X<sub>1</sub> Rezeptors in der glatten Gefäßmuskulatur von Ratten gefunden. Dieser P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Variante fehlen 27 Aminosäuren aus der Mitte der extrazellulären Schleife, was dazu führt, dass der Rezeptor nicht mehr an die Membran transportiert wird. Er gelangt nur als Heteromer mit Wildtyp-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren an die Membran, wo er den Wildtyp-Phänotyp aufweist (Ohkubo et al., 2000). Die Eigenschaften des P2X<sub>1</sub> Rezeptors, exprimiert auf glatten Muskelzellen, ähneln denen rekombinanter P2X<sub>1</sub> Rezeptoren stark, was die Vermutung nahe legt, dass es sich bei den nativen Rezeptoren glatter Muskelzellen um homomere P2X<sub>1</sub> Rezeptoren handelt (Lewis und Evans, 2000; Khakh et al., 2001). Der P2X<sub>1</sub> Rezeptor wird durch ATP ( $pEC_{50} = 5.96$ ; Rettinger et al., 2000b) und seine Analoga schnell aktiviert (0.01 – 1 s) und desensibilisiert fast ebenso schnell (0.1 – 10 s). Neben der schnellen Desensibilisierung erfolgt eine rasche Internalisierung des Rezeptors (Dutton et al., 2000). Ennion und Evans schlagen nach Untersuchungen zur Internalisierung des Ratten-Vas-deferens-P2X<sub>1</sub>-Rezeptors das folgende Modell vor: Nach Agonistenbindung öffnet sich der Kanal sofort und desensibilisiert beinahe ebenso schnell. In diesem Stadium kann der Rezeptor entweder internalisiert werden, wonach er im Zytosol einem schnellen Recycling-Prozess unterliegt, oder in der Membran erneut resensibilisieren (Ennion und Evans, 2001). Die Reihenfolge agonistischer Potenz an

rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren lautet: BzATP (pEC<sub>50</sub> = 8.8) >> 2-meSATP ≥ ATP > Ap<sub>4</sub>A > αβmeATP >> ADPβS > ADP (Guile et al., 2001). Während αβmeATP nahezu gleich potent an rekombinanten P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren ist, weist βγmeATP eine 30-fache Selektivität für P2X<sub>1</sub> Rezeptoren versus P2X<sub>3</sub> Rezeptoren auf (North und Surprenant, 2000). Zur weiteren Differenzierung der homomeren P2X<sub>1</sub> bis P2X<sub>4</sub> Rezeptoren der Ratte stehen Diadenosin-Polyphosphate (Ap<sub>n</sub>A) zur Verfügung. Dabei scheint die Anzahl an Phosphatgruppen von großer Bedeutung zu sein. So stellt Ap<sub>6</sub>A im Falle des Ratten P2X<sub>1</sub> Rezeptors einen vollen Agonisten dar, während Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>4</sub>A partielle Agonisten sind, Ap<sub>3</sub>A nur schwache Effekte aufweist und Ap<sub>2</sub>A unwirksam ist (North und Surprenant, 2000). Potente Antagonisten sind Ip<sub>5</sub>I (pIC<sub>50</sub> = 8.0), TNP-ATP, NF023, NF279, PPADS, MRS2159, PPNDS (siehe 1.3.2.) und die in dieser Arbeit vorgestellte und charakterisierte Verbindung NF449. **P2X<sub>3</sub>** Rezeptoren wurden erstmalig aus den Spinalganglien der Ratte kloniert (Lewis et al., 1995). Die Messenger-RNA für P2X<sub>3</sub> Rezeptoren ist im Vergleich zur RNA anderer P2X Rezeptoren im Körper relativ begrenzt verteilt. Sie lässt sich vor allem in einer Untergruppe sensorischer Neurone nachweisen (Guile et al., 2001). Kürzlich wurde auch von P2X<sub>3</sub> Rezeptor-spezifischer Immunoreaktivität im Nucleus tractus soletarius und anderen Hirnarealen berichtet (Yao et al., 2000). P2X<sub>3</sub>-Rezeptor-knock-out-Mäuse weisen keine schnelle Desensibilisierung elektrophysiologischer Antworten der Spinalganglien auf, zeigen keine kompensatorische Veränderung in der Expression anderer P2X Untereinheiten und lassen eine verminderte Nozizeption und geringere Harnblasenreflexe erkennen (Vlaskovska et al., 2001). Der verbleibende nozizeptive Effekt der knock-out-Tiere ist vermutlich auf ATP-stimulierte P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren zurückzuführen (Tominaga et al., 2001). Das pharmakologische Profil des P2X<sub>3</sub> Rezeptors ist dem des P2X<sub>1</sub> Rezeptors sehr ähnlich, wodurch die Differenzierung der beiden Subtypen erschwert wird. P2X<sub>3</sub> Rezeptoren unterliegen einer sehr schnellen Desensibilisierung (<100ms). Die Reihenfolge agonistischer Potenz am rekombinanten P2X<sub>3</sub> Rezeptor ist: BzATP (pEC<sub>50</sub> = 7.1) >> 2-meSATP > ATP = αβmeATP. Ap<sub>3</sub>A zeigt eine geringe Selektivität zugunsten des P2X<sub>3</sub> Rezeptors versus P2X<sub>1</sub> Rezeptoren

(North und Surprenant, 2000). Ein potenter P2X<sub>3</sub> Rezeptor-Antagonist ist TNP-ATP (pIC<sub>50</sub> = 7.8). Der Inhibitor von N-Typ-Kalziumkanälen, ω-Conotoxin, stellt einen allosterischen Modulator von P2X<sub>3</sub> Rezeptor-vermittelten Reaktionen in Ratten-Spinalganglien dar. Es inhibiert dabei homomere P2X<sub>3</sub> Rezeptoren potenter (IC<sub>50</sub> = 21 nM) als heteromere P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren (IC<sub>50</sub> = 3.8 μM) (Lalo et al., 2001). Kürzlich wurde ein neuer P2X<sub>3</sub> Rezeptor-Antagonist durch Jarvis und Kollegen vorgestellt, die Verbindung A-317491 (Jarvis et al., 2002) (chemische Strukturformel siehe Abb. 1.5). Es handelt sich dabei um eine chirale Verbindung, deren S-Enantiomer für die Wirkung verantwortlich ist. Das R-Enantiomer ist signifikant schwächer wirksam. Sowohl rekombinante P2X<sub>3</sub> (K<sub>i</sub> = 22 nM) und P2X<sub>2/3</sub> (K<sub>i</sub> = 9 - 92 nM) Rezeptoren des Menschen und der Ratte, transfiziert in 1321N1 Astrozytoma-Zellen, und native P2X<sub>3</sub> Rezeptoren in den Spinalganglien von Ratten (IC<sub>50</sub> = 15 nM) in vitro, wie auch chronische neuropathische Schmerzen in vivo in Ratten und Mäusen (ED<sub>50</sub> = 10 – 30 μM/kg s.c.), wurden durch A-317491 hoch potent, reversibel und selektiv inhibiert. Im Gegensatz zu TNP-ATP ist A-317491 100-fach selektiver für P2X<sub>3</sub> bzw. P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren versus P2X<sub>1</sub> Rezeptoren und weist keinen enzymatischen Abbau auf (Jarvis et al., 2002).

### **Gruppe 2 Rezeptoren (P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>2/6</sub>, P2X<sub>5</sub>)**

**P2X<sub>2</sub>** Rezeptoren wurden erstmalig aus dem Pankreas und der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 kloniert. Messenger-RNA wurde im Vas deferens, der Blase, dem Gehirn, dem Rückenmark, in den Ganglien, im Gastrointestinaltrakt und dem Nebennierenmark gefunden (Guile et al., 2001). Dieser Subtyp sowie funktionelle Splice-Varianten, die hinsichtlich ihrer Desensibilisierungskinetik Unterschiede aufweisen, wurden in der Cochlea und dem Cerebellum der Ratte nachgewiesen (Chen et al., 2000; Housley et al., 2002). Interessanterweise differieren die humanen Splice-Varianten des P2X<sub>2</sub> Rezeptors im Gegensatz zu den Ratten-Homologen nicht in ihrem Desensibilisierungsverhalten und sind in der Lage, heteromere Rezeptoren mit P2X<sub>3</sub> Untereinheiten zu bilden (Lynch et al., 1999). Am rekombinanten P2X<sub>2</sub> Rezeptor stellen 2-meSATP und ATPγS equipotente Agonisten (pEC<sub>50</sub> = 5.8)

dar, wohingegen  $\alpha\beta\text{meATP}$  und  $\beta\gamma\text{meATP}$  inaktiv sind. Es existieren derzeit keine Agonisten oder Antagonisten, die selektiv  $\text{P2X}_2$  Rezeptoren erkennen können (North und Surprenant, 2000). PPADS inhibiert  $\text{P2X}_2$  Rezeptoren mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2\ \mu\text{M}$  (Guile et al., 2001).  $\text{P2X}_2$  Rezeptoren sind weniger permeabel für Kalziumionen als die übrigen  $\text{P2X}$  Rezeptoren. Dieser Subtyp reagiert sehr sensibel auf unterschiedliche Ionenkonzentrationen sowie auf pH-Schwankungen. So ist die gesteigerte Antwort auf ATP nach Azidifizierung für diesen homomeren  $\text{P2X}$  Rezeptor-Subtyp einzigartig. Dies stellt einen Hinweis darauf dar, dass die Affinität für ATP durch Protonen moduliert werden kann (North und Surprenant, 2000). Heteromere  **$\text{P2X}_{2/3}$**  Rezeptoren vereinen die  $\alpha\beta\text{meATP}$ -Sensitivität des homomeren  $\text{P2X}_3$  Rezeptors und die langsame Kinetik der Desensibilisierung des homomeren  $\text{P2X}_2$  Rezeptors.  $\text{P2X}_{2/3}$  Rezeptor-vermittelte Vorgänge werden durch TNP-ATP antagonisiert ( $\text{P2X}_3$  Rezeptor analog) und durch Senken des pH-Wertes potenziert ( $\text{P2X}_2$  Rezeptor analog) (North und Surprenant, 2000). Dieser Rezeptor-Subtyp ist möglicherweise die natürliche Form des Rezeptors, der in die Schmerzerkennung und -weiterleitung involviert ist (Liu et al., 2001).  **$\text{P2X}_{2/6}$**  Rezeptoren werden erst durch höhere Konzentrationen von ATP ( $\text{EC}_{50} = 30\ \mu\text{M}$ ) und 2-meSATP ( $\text{EC}_{50} = 35\ \mu\text{M}$ ) stimuliert, während  $\alpha\beta\text{meATP}$  keinen Agonisten an diesem Subtyp darstellt ( $\text{EC}_{50} > 100\ \mu\text{M}$ ). Durch Zink-Ionen oder Azidifizierung können  $\text{P2X}_{2/6}$  Rezeptor-vermittelte Effekte potenziert sowie durch Suramin inhibiert ( $\text{IC}_{50} = 6\ \mu\text{M}$ ) werden (King et al., 2000).  **$\text{P2X}_5$**  Rezeptoren wurden ursprünglich aus dem Ratten-Herzen kloniert. Weiterhin wurden 2 Splice-Varianten des menschlichen  $\text{P2X}_5$  Rezeptors identifiziert (Guile et al., 2001). Messenger-RNA wurde im Vorderhorn der Halsganglien, im Trigemini-Nervenstrang und in den Spinalganglien gefunden. Sie sind durch die folgende Agonisten-Rangfolge charakterisiert:  $\text{ATP}\gamma\text{S} > \text{ATP} > 2\text{-meSATP} > \text{ADP}$ .  $\alpha\beta\text{meATP}$  ist inaktiv. Dabei sind die elektrophysiologisch ermittelten Ströme ca. 100-fach geringer verglichen mit den Subtypen  $\text{P2X}_1$  bis  $\text{P2X}_4$ . Suramin und PPADS weisen nur eine geringe antagonistische Aktivität auf (Collo et al., 1996).

### **Gruppe 3 Rezeptoren (*P2X<sub>1/5</sub>*, *P2X<sub>4</sub>*, *P2X<sub>4/6</sub>*, *P2X<sub>7</sub>*)**

**P2X<sub>1/5</sub>** Rezeptoren weisen eine hohe Sensitivität für ATP,  $\alpha\beta$ meATP ( $EC_{50} = 1.1 \mu\text{M}$ ) und TNP-ATP ( $IC_{50} = 64 \text{ nM}$ ) auf (Le et al., 1999). Im Gegensatz zu homomeren P2X<sub>1</sub> Rezeptoren erfolgt ein anhaltendes, nicht desensibilisierendes Signal nach Stimulation des Rezeptors (Haines et al., 1999). Es kommt weiterhin zu keiner Signalabnahme bei wiederholter Agonistenapplikation innerhalb weniger Minuten (North und Surprenant, 2000).

**P2X<sub>4</sub>** Rezeptoren wurden aus einer Vielzahl von Geweben des Menschen oder der Ratte kloniert (Soto et al., 1997). Die Messenger-RNA wurde im Gehirn, Rückenmark, sensorischen Ganglien, oberen Halsganglien, Lunge, Bronchialepithel, Blase, Thymus, Speicheldrüse, Hoden und Vas deferens nachgewiesen (Guile et al., 2001). Dabei ist die Expression der P2X<sub>4</sub> Untereinheiten häufig 100-fach höher als die der übrigen P2X Rezeptoren, vor allem in Regionen im Cerebellum oder Hippocampus, wo eine starke Kolokalisation mit AMPA-sensitiven glutamatergen Rezeptoren auffällt (Rubio und Soto, 2001). Der rekombinante P2X<sub>4</sub> Rezeptor ist für BzATP und ATP ( $pEC_{50} = 6.3$ ) am sensitivsten sowie insensitiv gegenüber Suramin und PPADS (Jones et al., 2000). Als schwache P2X<sub>4</sub> Rezeptor-Antagonisten fungieren Reactive blue 2 (Cibacron Blue;  $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) und Coomassie brilliant blue G ( $IC_{50} = 130 \mu\text{M}$ ; Guile et al., 2001). Die Funktion des rekombinanten P2X<sub>4</sub> Rezeptors wird durch  $Zn^{2+}$ -Ionen potenziert (Townsend-Nicholson et al., 1999; AcunaCastillo et al., 2000) und durch das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin inhibiert. Eine Besonderheit stellt die Potenzierung der Agonistenstimulation durch die Substanz Ivermectin dar. Ivermectin aktiviert den glutamatabhängigen Chloridkanal verschiedener wirbelloser Tiere, wie zum Beispiel Nematoden. Weiterhin moduliert es allosterisch GABA<sub>A</sub> und nikotinische  $\alpha_7$  Rezeptoren von Säugetieren. An rekombinanten P2X<sub>4</sub> Rezeptoren potenziert Ivermectin ATP-vermittelte Ströme selektiv und reversibel mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 250 nM (North und Surprenant, 2000). Es gibt Splice-Varianten, die mit den Wildtyp-Untereinheiten heteromere Rezeptoren bilden können (Jones et al., 2000).

**P2X<sub>4/6</sub>** Rezeptoren sind stark im zentralen Nervensystem vertreten. Während

P2X<sub>6</sub> Rezeptoren höchst wahrscheinlich nicht in der Lage sind homomere Rezeptoren zu bilden, fallen Ströme durch P2X<sub>4/6</sub> Rezeptoren deutlich höher als durch homomere P2X<sub>4</sub> Rezeptoren aus. Für 2-meSATP,  $\alpha\beta$ meATP, Suramin und Reactive blue sind P2X<sub>4/6</sub> Rezeptoren etwas sensitiver als P2X<sub>4</sub> Rezeptoren. Die Ergebnisse sind aber mit Vorsicht zu betrachten, da die Oozyten, denen cDNA für P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>6</sub> Rezeptoren injiziert wurde, stets auch homomere P2X<sub>4</sub> neben den heteromeren P2X<sub>4/6</sub> Rezeptoren exprimieren, wodurch die Daten schwieriger zu interpretieren sind (North und Surprenant, 2000). **P2X<sub>7</sub>** Rezeptoren wurden aus Hirn und Makrophagen der Ratte und des Menschen kloniert. In Makrophagen und Lymphozyten führt die Aktivierung des P2X<sub>7</sub> Rezeptors zur Stimulation der Phospholipase D, in menschlichen Makrophagen erfolgt weiterhin die Freisetzung inflammatorischer Zytokine über eine Caspase-Aktivierung. Neben den Zellen hämatopoetischen Ursprungs, besitzen auch Hepatozyten und Zellen der Ohr- und Speicheldrüsen P2X<sub>7</sub> Rezeptoren (Guile et al., 2001). Strukturell setzt sich der P2X<sub>7</sub> Rezeptor insofern von den anderen P2X Rezeptoren ab, da er einen längeren (240 Aminosäuren) intrazellulären C-Terminus aufweist (Guile et al., 2001). Kurze Aktivierung (<10 s) führt zu dem bekannten Einstrom von Natrium-, Kalium- und Kalziumionen. Bei andauernder Agonisten-Anwesenheit wandelt sich der P2X<sub>7</sub> Rezeptor in Anwesenheit geringer Konzentrationen an zweiwertigen Ionen in eine nicht-selektive, ca. 4 nm große Pore um, die für Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton durchlässig ist, wobei die letzten 177 Aminosäuren des intrazellulären C-Terminus für die Porenbildung von Bedeutung zu sein scheinen (Guile et al., 2001). Dieser Vorgang wird mit zytotoxischen Effekten wie beispielsweise Zellschwellung, Vakuolisierung, nekrotischem und apoptotischem Zelltod in Verbindung gebracht (Virgilio et al., 2001). Wie oben bereits erwähnt, ist aber nicht nur der P2X<sub>7</sub> Rezeptor zur Porenbildung befähigt. Die Reihenfolge agonistischer Potenz ist BzATP (pEC<sub>50</sub> = 5.3) >> ATP. 2-meSATP, ATP $\gamma$ S und ADP sind inaktiv (Jacobson et al., 2002), wobei der menschliche Rezeptor grundsätzlich eine geringere Sensitivität als der Ratten-Rezeptor aufweist. Effekte durch P2X<sub>7</sub> Rezeptoren werden durch Reduktion der Konzentration zweiwertiger Ionen potenziert (North und Surprenant, 2000). Als

Antagonisten dienen Brilliant blue G ( $pEC_{50} = 5.3$ , nicht-kompetitiv), oxidiertes oATP (irreversibel im Gegensatz zur reversiblen Blockade von P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>2</sub> Rezeptoren) und KN-62 (nicht-kompetitiv).

#### 1.2.2.2. Metabotrope P2Y Rezeptoren

P2Y Rezeptoren sind Purin- und Pyrimidin-Nukleotidrezeptoren aus der Gruppe der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die bezüglich der Sequenzhomologie nächsten Verwandten der P2Y Rezeptoren sind Angiotensin- und PAR-Rezeptoren, was zu der Hypothese geführt hat, dass eventuell ein endogenes Peptid als P2Y Rezeptor-Ligand existieren könnte (Jacobson et al., 2002). P2Y Rezeptoren beinhalten alle typischen Eigenschaften dieser Rezeptorklasse inklusive der sieben transmembranären Domänen. Der extrazelluläre N-Terminus beinhaltet verschiedene Konsensus-Regionen zur N-Glykosylierung, und in der intrazellulären Domäne befinden sich potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, die möglicherweise bei der Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung von Bedeutung sind (Ralevic und Burnstock, 1998; von Kűgelgen und Wetter, 2000; Ferguson, 2001).

Ein große Vielfalt an Geweben sowie peripheren und zentralen Zelltypen exprimieren mindesten einen der klonierten P2Y Rezeptoren, wo sie an unterschiedlichsten physiologischen Effekten beteiligt sind, zum Beispiel Thrombozyten-Aggregation, Stimulation des epithelialen Chlorid-Transporters, Granulozyten-Differenzierung, Regulation des Gefäßtonus, Modulation der Ionenkanalaktivität und Zell-zu-Zell-Kommunikation (Lambrecht et al., 2002).

Acht Gene, die für P2Y Rezeptor-Polypeptide kodieren (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> und P2Y<sub>14</sub>), wurden bisher aus Gewebe des Menschen, der Maus und der Ratte kloniert. Die fehlenden Nummern stellen zum Teil Spezieshomologe dar, die nicht aus Säugetieren kloniert wurden. Der p2y<sub>3</sub> Rezeptor (Huhn) repräsentiert eventuell das Geflügel-Orthologe des humanen P2Y<sub>6</sub> Rezeptors. Der tp2y (Truthahn) und der p2y<sub>8</sub> (*Xenopus laevis*) Rezeptor scheinen dem humanen P2Y<sub>4</sub> Rezeptor ähnlich zu sein (Boyer et al.,



2000). Andere Rezeptoren wurden irrtümlich der P2Y Familie zugeordnet. Der p2y7 Rezeptor ist ein Leukotrienrezeptor (B<sub>4</sub>) während p2y5, p2y9 und p2y10 Rezeptoren als 'orphan receptors' betrachtet werden müssen, d.h. Rezeptoren, die zwar eine P2 homologe Sequenz aufweisen, deren physiologischer Ligand aber bisher unbekannt ist (Abbracchio et al., 2003). Die menschlichen Subtypen weisen eine Sequenzidentität von 21 bis 57 Prozent auf (Abbracchio et al., 2003). Ihre Größe rangiert von 328 bis 377 Aminosäuren (Ralevic und Burnstock, 1998; Barnard und Simon, 2001; Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Zhang et al., 2002).

Positiv geladene Aminosäuren in den Transmembrandomänen scheinen durch elektrostatische Interaktionen mit den Phosphatresten der Nukleotide an der Ligandenbindung beteiligt zu sein. Gerichtete Mutagenese des P2Y<sub>2</sub> Rezeptors führte zu der Annahme, dass His<sup>262</sup> und Arg<sup>265</sup> in der Transmembrandomäne 6 (TM6) und Arg<sup>292</sup> in der TM7 möglicherweise für die Interaktion essentiell sind. Im Gegensatz dazu, scheinen die wichtigsten Reste für die Nukleotidbindung am humanen P2Y<sub>1</sub> Rezeptor in der TM3 (Arg<sup>128</sup>), TM5 (Thr<sup>222</sup>), TM6 (Lys<sup>280</sup>) und TM7 (Arg<sup>310</sup>) (Jiang et al., 1997; Moro et al., 1998; Guo et al., 2002) zu liegen. Für die Bindung des Liganden ADP am humanen P2Y<sub>1</sub> Rezeptor schlagen Hiramoto und Kollegen auf Basis der Fourier Transformation und empirischer Regeln folgende Aminosäuren vor: Tyr<sup>136</sup> (TM3) und Ser<sup>218</sup> (TM5) für die Interaktion mit dem Adeninrest sowie Tyr<sup>303</sup> (TM3), Glu<sup>307</sup> (TM7) und Arg<sup>310</sup> (TM7) für die Bindung der Phosphatgruppen (Hiramoto et al., 2002). Alle klonierten P2Y Rezeptoren haben in der TM6 das sogenannte H-X-X-R/K Motiv, das für die Bindung von Agonisten verantwortlich zu sein scheint. Für P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren könnte ein weiteres Aminosäuremotiv (Y-Q/K-X-X-R) der TM7 in die Ligandenbindung involviert sein (Abbracchio et al., 2003).

P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> Rezeptoren stimulieren via Kopplung an G<sub>q/11</sub> Proteine die Phospholipase C, woraus durch eine gesteigerte Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat eine Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium resultiert (Ralevic und Burnstock, 1998). Daraus wiederum kann die Aktivierung von Proteinkinase

C, Phospholipase A<sub>2</sub>, Kalzium-abhängigen Kaliumkanälen, NO-Synthase, spannungsabhängigen Kalziumkanälen und MAP-Kinase-Transduktionswegen resultieren (Ralevic und Burnstock, 1998; Sellers et al., 2001). Der P2Y<sub>11</sub> Rezeptor stellt eine Besonderheit unter den P2Y Rezeptoren dar, da er sowohl zur Stimulation des Phosphatidylinositol- wie auch des Adenylatzyklase-Signaltransduktionsweges führt (Communi et al., 1999; van der Weyden et al., 2000). Aktivierung von P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> oder P2Y<sub>14</sub> Rezeptoren führt zur Hemmung der Adenylatzyklase über G<sub>i/o</sub> Proteine (Jin et al., 2001; Müller, 2002).

P2Y Rezeptoren können aufgrund ihrer Antwort auf verschiedene Nukleotid-Agonisten und Subtyp-präferierende Antagonisten charakterisiert werden. Funktionelle Expressionsstudien in heterologen Zellsystemen zeigten drei Phänotypen von Säugetier-P2Y Rezeptoren auf: erstens selektive Purinozeptoren (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>13</sub> Rezeptoren des Menschen sowie von Nagern und der humane P2Y<sub>11</sub> und P2Y<sub>14</sub> Rezeptor), zweitens selektive Pyrimidinozeptoren (humane P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren) und drittens Rezeptoren mit gemischter Selektivität (P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren von Menschen und Nagern sowie P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren von Nagetieren) (Nicholas, 2001; Abbracchio et al., 2003).

Trotz der Vermutung, dass Heterooligomerisierung von GPCRs eher die Regel als die Ausnahme zu sein scheint (Overton und Blumer, 2000; Dean et al., 2001), existieren momentan nur wenige Informationen bezüglich oligomerer Rezeptoren, bei denen P2Y Rezeptoren beteiligt sind. Es gibt Hinweise auf eine Adenosin **A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub>** Rezeptor-Dimerisierung, deren resultierender oligomerer Rezeptor eine andere Pharmakologie von A<sub>1</sub> Agonisten und Antagonisten aufweist und eine 400-fach gesteigerte Affinität für den P2 Agonisten ADPβS zeigt (Yoshioka et al., 2002).

Der **P2Y<sub>1</sub>** Rezeptor war der erste klonierte P2Y Rezeptor. Die Reihenfolge agonistischer Potenz ist 2-meSADP > 2-meSATP ≥ ADP > ATP. αβmeATP, βγmeATP und UTP sind inaktiv (Jacobson und Knutsen, 2001). P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte und des Menschen stellen ADP- und 2-meSADP-

sensitive Rezeptoren dar, an denen ATP und 2-meSATP als kompetitive Antagonisten fungieren (Hechler et al., 1998b). Sak und Jarv zeigten, dass in Anwesenheit des ATP-Regenerationssystems Kreatininphosphat und Kreatininphosphokinase (CP/CPK) ATP als reiner Antagonist ( $IC_{50} = 5.3 \mu\text{M}$ ) an 1321N1 Astrozytomazellen, transfiziert mit dem humanen  $P2Y_1$  Rezeptor, auftrat (Sak und Jarv, 2000). In einer anderen Untersuchung wurde gezeigt, dass unter Bedingungen, die den Abbau von ATP minimieren, ATP zwar schwächer und mit geringerer Efficacy als ADP aber dennoch agonistisch an  $P2Y_1$  Rezeptoren wirkt (Palmer et al., 1998). MRS2279 ist zur Zeit der potenteste Antagonist. Suramin und Reactive blue 2 inhibieren  $P2Y_1$  Rezeptoren im mikromolaren Bereich. Nach Aktivierung des  $P2Y_1$  Rezeptors resultiert entweder die Stimulation der Phospholipase C über eine  $G_q$ -Protein-Kopplung oder die Hemmung der Adenylatzyklase über  $G_i$  Untereinheiten (Boarder und Webb, 2001).  $P2Y_1$  Rezeptoren können direkt die Funktion von Ionenkanälen beeinflussen, was einen G-Proteineffekt darstellt, der unabhängig von second-Messenger-Systemen ist.  $P2Y_1$  knock-out-Mäuse weisen eine verlängerte Blutungszeit und eine signifikante Reduktion der Thrombose-Lethalität auf (Leon et al., 1999).

**$P2Y_2$**  Rezeptoren, ursprünglich als  $P_{2U}$  Rezeptor beschrieben, wurden erstmalig aus der Mäuse-Neuroblastom-Zelllinie NG108-15 und nachfolgend aus Gewebe des Menschen und von Nagern kloniert (Jacobson et al., 2002). ATP und UTP sind gleich potente Agonisten, während ADP, UDP, 2-meSATP und  $\alpha\beta\text{meATP}$  eine schwache bis gar keine agonistische Aktivität besitzen. Es gibt Hinweise auf Suramin-sensitive und -insensitive sowie PPADS-sensitive wie auch -insensitive  $P2Y_2$  Rezeptor-vermittelte Prozesse, was eine Rezeptorheterogenität vermuten lässt (Insel et al., 2001). Ein genetischer Polymorphismus des humanen  $P2Y_2$  Rezeptors, charakterisiert durch den Austausch von  $\text{Arg}^{334}$  mit  $\text{Cys}^{334}$ , wurde gefunden (Janssens et al., 1999). Obwohl die Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP, UTP,  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und  $\text{Ap}_4\text{A}$  bei beiden Polymorphismusformen ähnlich und die  $EC_{50}$ -Werte nahezu identisch waren, zeigte sich eine leichte Zeitverschiebung der 'second messenger' Bildung: Die

Akkumulation von Inositoltriphosphat war bei der Arg<sup>334</sup> Variante schneller als bei der Cys<sup>334</sup> Variante. P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren koppeln an G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub> Proteine und vermitteln dadurch die Bildung von IP<sub>3</sub> und einen Kalziumanstieg. In Epithelzellen der Luftwege, Gallenzelllinien und exokrinen Salzdrüsen von Geflügel führt dies zur Öffnung Kalzium-sensitiver Chlorid-Kanäle, die an der epithelialen Flüssigkeitssekretion beteiligt sind. P2Y<sub>2</sub> Rezeptor knock-out-Mäuse weisen einen veränderten Chloridtransport in der Lunge sowie in anderen Geweben auf (Cressman et al., 1999).

Der **P2Y<sub>4</sub>** Rezeptor ist ein Uridin-Nukleotid spezifischer Rezeptor, der aus der humanen Plazenta, dem humanen X-Chromosom sowie dem Ratten-Herzen kloniert wurde (Guile et al., 2001). Die P2Y<sub>4</sub> Rezeptor-Verteilung im Körper schien in früheren Befunden lokal begrenzt zu sein. So wurde er neben der Plazenta und dem Herzen nur noch im Pankreas und in geringem Ausmaß in Lunge und glatter Gefäßmuskulatur nachgewiesen (Jacobson et al., 2002). Durch RT-PCR-Untersuchungen wurden P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren zusätzlich aber auch auf Osteoblasten-, Retinoblastom-, Astrocytoma-, Lungen- und Gliomazelllinien sowie Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen (Guile et al., 2001). Neuere Berichte über P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren des Menschen, der Maus und der Ratte legen die Vermutung nahe, dass P2Y<sub>4</sub> Rezeptor-Orthologe verschiedene pharmakologische Eigenschaften haben können (Communi et al., 2000; Kennedy et al., 2000). So stellt ATP an Ratten P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren einen Agonisten dar, während humane P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren durch ATP inhibiert werden (K<sub>B</sub> = 700 nM) (Kennedy et al., 2000). Der menschliche P2Y<sub>4</sub> Rezeptor ist für ADP und UDP insensitiv. Am P2Y<sub>4</sub> Rezeptor der Ratte sind ATP und UTP equipotente Agonisten, während ADP, ATP<sub>γ</sub>S, 2-meSATP und Ap<sub>4</sub>A als partielle Agonisten fungieren (Sak und Webb, 2002). Es gibt derzeit keine potenten P2Y<sub>4</sub> Rezeptor-Antagonisten. Suramin ist inaktiv und PPADS ein sehr schwacher Inhibitor des menschlichen P2Y<sub>4</sub> Rezeptors.

**P2Y<sub>6</sub>** Rezeptoren wurden erstmalig aus dem glatten Muskel der Aorta von Ratten, der menschlichen Plazenta und der menschlichen Milz isoliert. Die weit verteilte Messenger-RNA wurde im Herzen, der Lunge, dem Magen, den

Luftwegen und dem Nasenepithel nachgewiesen (Jacobson et al., 2002). Der potenteste Agonist an P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren ist UDP, während UTP, ATP, ADP oder 2-meSATP inaktiv sind.

**P2Y<sub>11</sub>** Rezeptoren wurden aus der menschlichen Plazenta kloniert und konnten in menschlichen Lymphozyten und Nierenzellen von Kaninchen nachgewiesen werden. In Lymphozyten interagiert der P2Y<sub>11</sub> Rezeptor mit Adenosin A<sub>2A</sub> Rezeptoren während der Entwicklung von B-Lymphozyten. Er ist innerhalb der P2 Rezeptoren einzigartig, da er nach Stimulation sowohl zur Aktivierung des Adenylatzyklase- wie auch des Phospholipase-C-Transduktionsweges führt. Die Rangfolge agonistischer Potenz lautet ATP > 2-meSATP >>> ADP. UTP und UDP sind inaktiv. Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft existieren keine P2Y<sub>11</sub> Rezeptor-selektiven Antagonisten. Interessanterweise stellt der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonist AR-C67085 an den nahe verwandten P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren den potentesten nukleotidischen Agonisten dar (Communi et al., 1999).

Der **P2Y<sub>12</sub>** Rezeptor wurde aus cDNA-Bibliotheken der Ratte und des Menschen kloniert und stellt den lange nicht greifbaren P<sub>2T</sub> Rezeptor dar (auch P2Y<sub>ADP</sub> oder P2Y<sub>AC</sub> genannt) (Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001). Irrtümlich für einen P2Y<sub>1</sub> Rezeptor gehalten, ist es heute bewiesen, dass er eine separate Rolle in der Thrombozytenphysiologie spielt (Barnard und Simon, 2001). Die Verwirrung resultierte nicht zuletzt daraus, dass beide P2Y Rezeptoren sich synergistisch bezüglich der Aggregation verhalten (Daniel et al., 1998; Hechler et al., 1998a; Jin und Kunapuli, 1998; Turner et al., 2001). P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren führen nach Kopplung an G<sub>i</sub>-Proteine zur Hemmung der Adenylatzyklase (Kunapuli, 1998; Trumel et al., 1999). ADP ist ein voller Agonist während ATP einen Antagonisten darstellt. Als Antagonisten werden die Verbindungen AR-C67085 (ARL 67085) und AR-C69931MX (ARL 69931MX) verwendet. CT50547 ist ein neuer, reversibler P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonist (IC<sub>50</sub> = 40 nM) mit vernachlässigbarer antagonistischer Aktivität an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (IC<sub>50</sub> > 100 nM) (Struktur siehe Jacobson et al., 2002). Die in der klinischen Praxis eingesetzten Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel inhibieren P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren irreversibel. Da beide Verbindungen nur in vivo

nach Umwandlung zu aktiven Metaboliten wirksam sind, wurden neue direkt wirksame Verbindungen entwickelt z.B. AR-C69931MX, die sich bereits in klinischer Prüfung befinden (Guile et al. 2001; Lambrecht et al., 2002). P2Y<sub>12</sub> knock-out-Mäuse zeigen eine verlängerte Blutungszeit und reduzierte Sensitivität auf ADP, Thrombin und Kollagen (Foster et al., 2001).

Der **P2Y<sub>13</sub>** Rezeptor wurde erst kürzlich als Mitglied der P2Y Rezeptor-Familie identifiziert (Communi et al., 2001). Ursprünglich als „verwaister“ GPCR namens GPR86, GPR94 oder SP174 kloniert, weist der P2Y<sub>13</sub> Rezeptor eine hohe Sequenzhomologie zum P2Y<sub>12</sub> Rezeptor auf. Basierend auf der Gewebeverteilung scheint der P2Y<sub>13</sub> Rezeptor Funktionen im Immunsystem, vor allem bei der T-Zell-Reifung zu erfüllen. Die Reihenfolge agonistischer Potenz lautet: 2-meSADP (EC<sub>50</sub> = 19 nM) > ADPβS > 2-meSATP > ADP > Ap<sub>3</sub>A > ATP > IDP (Zhang et al., 2002). Nach Stimulation des P2Y<sub>13</sub> Rezeptors erfolgt über Kopplung an ein G<sub>xi</sub>-Protein die Hemmung der Adenylatzyklase sowie Stimulation der MAP-Kinasen ERK-1 und -2. Spezifische Antagonisten wurden bisher nicht beschrieben.

Der **P2Y<sub>14</sub>** Rezeptor ist das jüngste Mitglied der P2Y Rezeptor-Familie. Ursprünglich als ein sogenannter 'orphan receptor' (siehe oben) aus einer menschlichen Myelom-Zelllinie kloniert, steht heute fest, dass es sich bei KIAA0001 bzw. GPR105 um den UDP-Glukose-stimulierten P2Y<sub>14</sub> Rezeptor handelt. Neben UDP-Glukose führen auch UDP-Galaktose, UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglukosamin zur Aktivierung dieses Rezeptor-Subtyps (EC<sub>50</sub> = 100-500 nM), während die anderen Nukleotide (UTP, UDP, UMP, ATP, ADP, AMP, CTP, CDP, TMP, IMP) ohne Effekt bleiben (Chambers et al., 2000; Abbracchio et al., 2003). Nach Aktivierung koppelt der Rezeptor an G Proteine der G<sub>i/o</sub>-Klasse, wobei der oder die folgenden Signaltransduktionswege bisher noch unbekannt sind. Dieser Rezeptor beinhaltet einerseits wichtige strukturelle Ähnlichkeiten zu den anderen Mitgliedern der P2Y Rezeptor-Familie, weist aber andererseits auch ein sehr unterschiedliches pharmakologisches Profil auf. P2Y<sub>14</sub> Rezeptoren zeigen eine breite Verteilung innerhalb des Gehirns sowie der Peripherie, wie z.B. der

Plazenta, dem Fettgewebe und dem Gastrointestinaltrakt (Abbraccio et al., 2003).

Drei weitere Gene (*GPR87*, *GPR91* und *H963*), die auf dem gleichen menschlichen Chromosom wie der  $P2Y_1$ ,  $P2Y_{12}$ ,  $P2Y_{13}$  und  $P2Y_{14}$  Rezeptor lokalisiert sind, könnten für weitere  $P2Y$  Rezeptoren kodieren, deren Identifizierung bislang noch aussteht (Abbraccio et al., 2003).

### 1.2.3. Ektonukleotidasen

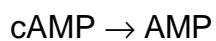
Nukleotide sind chemisch relativ stabil, werden aber schnell durch eine Vielzahl von extrazellulären Enzymen metabolisiert. Diese sind Ektonukleotidasen, Ektophosphatasen und Ektokinasen, die häufig eine breite Verteilung in unterschiedlichsten Geweben aufweisen. Die Ekto-Enzyme können sowohl in der Membran verankert vorliegen oder auch als Exonukleotidasen in freier, ungebundener Form vorkommen (Müller, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die synaptische Freisetzung von ATP nach Nervenstimulation der Vasa deferentia von Meerschweinchen oder Kaninchen mit einer Freisetzung von Nukleotidasen einher geht (Westfall et al., 2000a, b; Mihaylova-Todorova et al., 2001, 2002). Interessanterweise scheinen diese Nukleotidasen zeitgleich zu ATP nicht aber zu Noradrenalin sezerniert zu werden (Mihaylova-Todorova et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass eventuell sowohl Nukleotide wie auch Nukleotidasen in gemeinsamen Vesikeln gespeichert und nach Stimulation zusammen ausgeschüttet werden.

***Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen*** (E-NTPDasen, Ekto-Apyrasen) hydrolysieren Phosphatesterbrücken der Nukleotidtriphosphate (NTP) und Nukleotiddiphosphate (NDP) bis hinunter zu den Nukleosidmonophosphaten (NMP) (Zimmermann, 2000). Dabei existieren verschiedene Isoenzyme, die eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen (E-NTPdase 1 bis 6). Apyrase wird eingesetzt, um endogene Nukleotide, die während eines Experimentes freigesetzt werden und bestimmte Rezeptoren desensibilisieren können, schnell zu entfernen (Müller, 2002).



**Ekto-5'-Nukleotidasen** spalten wiederum NMPs zu Nukleosiden und  $\text{P}_i$ .

**Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen** (E-NPP) gehören in die Familie der Phosphodiesterasen und weisen ein breites Substratspektrum auf (Zimmermann, 2000):



**Alkalische Phosphatasen** sind ubiquitäre, unspezifische Ekto-Phosphomonoesterasen, die viele unterschiedliche Phosphorsäureester inklusive NTPs, NDPs, und NMPs unter Freisetzung von  $\text{P}_i$  spalten.

**Ekto-Nukleosid-Diphosphokinasen** katalysieren den Transfer der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von NTPs zu NDPs bzw. von NDPs zu NTPs.

Die **Ekto-Adenylatkinase** (Myokinase) ist eine Ekto-ATP:AMP-Phosphotransferase, die zwei Moleküle ADP zu ATP + AMP vice versa konvertiert.

Die Untersuchung des Effektes von Nukleotidrezeptor-Antagonisten auf Ektonukleotidasen ist von elementarer Bedeutung, da die antagonistische Aktivität von P2 Rezeptor-Antagonisten, wie beispielsweise Suramin, die neben der Hemmung der P2 Rezeptoren auch Ektonukleotidasen inhibieren, fälschlicherweise unterschätzt werden kann. Durch die Hemmung der Ektonukleotidasen wird ihr Antagonismus abgeschwächt, indem ungespaltene Nukleotide mit dem Antagonisten verstärkt um den Rezeptor konkurrieren können (Crack et al., 1994).

#### 1.2.4. Nukleotidrezeptoren und CD39 auf humanen Thrombozyten

Auf humanen Thrombozyten konnten die folgenden Nukleotidrezeptoren nachgewiesen werden.



**P2X<sub>1</sub> Rezeptor.** Die Stimulation des P2X<sub>1</sub> Rezeptors von Thrombozyten führt durch die Öffnung des Kationenkanals zu einem schnellen Anstieg an intrazellulären Kalzium- und Natriumionen. Eine aktuelle Arbeit berichtet weiterhin von der P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung der ERK 2 durch Kalzium- und Proteinkinase C-abhängige Wege (Oury et al., 2002). P2X<sub>1</sub> Rezeptor-knock-out-Mäuse zeigen eine 70-prozentig verlängerte Blutungszeit im Vergleich zu Wildtypmäusen (Vial et al., 2002).

**P2Y<sub>1</sub> Rezeptor.** Über Kopplung an G $\alpha_q$ -Proteine wird die Phospholipase C $\beta$  in Thrombozyten stimuliert und vermehrt DAG und IP<sub>3</sub> gebildet. Im Folgenden kann es über zwei verschiedene Wege zum Anstieg an intrazellulärem Kalzium kommen. Erstens wird über die Stimulation des IP<sub>3</sub>-Rezeptors Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Zweitens erfolgt durch DAG bzw. durch die entleerten Speicher die Öffnung eines Membrankanals, durch den Kalzium aus dem Extrazellularraum in die Zelle strömen kann. Der erhöhte Kalziumspiegel führt zur Aktivierung der Proteinkinase C sowie weiterer Kinasen (Contreres et al., 2003). Durch eine weitere Kopplung an G $\alpha_{12/13}$  erfolgt die Stimulation von Rho/Rho-Kinase (Paul et al., 1999). Diese beiden Signaltransduktionswege könnten für die ADP-ausgelöste Formveränderung von Thrombozyten verantwortlich sein, wobei der Schwerpunkt auf dem Anstieg an intrazellulärem Kalzium zu liegen scheint (Paul et al., 1999). Thrombozyten von knock-out-Mäusen, denen die  $\alpha_q$ -Untereinheit des G-Proteins fehlt, aggregierten nicht nach Stimulation mit ADP, was die Bedeutung des Phospholipase-C-Weges zur Erhöhung des intrazellulären Kalziums hervorhebt (Gachet, 2000). P2Y<sub>1</sub> Rezeptor knock-out-Mäuse zeigen eine verlängerte Blutungszeit und eine gesteigerte Resistenz gegenüber thromboembolischen Ereignissen (Leon et al., 1999, 2001). ADP war immer noch in der Lage die Adenylatzyklaseaktivität zu inhibieren, weshalb ein zweiter ADP-sensitiver Rezeptor vermutet wurde, der später als P2Y<sub>12</sub> Rezeptor identifiziert wurde (Fabre et al., 2001).

**P2Y<sub>12</sub> Rezeptor.** Die Stimulation dieses Rezeptor-Subtyps führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase über die Kopplung an G $\gamma_i$ -Proteine und zum

anderen zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Kunapuli, 1998; Trumel et al., 1999). Ob die Hemmung der Adenylatzyklase für die Aggregation essentiell ist, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (Daniel et al., 1999). P2Y<sub>12</sub> Rezeptor knock-out Mäuse zeigen eine verlängerte Blutungszeit und eine reduzierte Sensitivität für ADP, Thrombin und Kollagen (Foster et al., 2001).

**CD39.** Dieses membranständige Enzym von Thrombozyten stellt eine ATP-Diphosphohydrolase dar (NTPDase1), das sowohl ATP, wie auch ADP metabolisieren kann. Es konnte ein rekombinantes, lösliches Enzym (solCD39) synthetisiert werden, das als potentiell Antithrombotikum vorgeschlagen wurde (Birk et al., 2002). Während reines ATP nicht zur Aggregation führt, wird in Anwesenheit von solCD39 durch ATP-Gabe eine Aggregation ausgelöst. Dies lässt folglich den Schluss zu, dass aus ATP entstandenes ADP die Aggregation auslösen kann (Birk et al., 2002). Das entstandene ADP wird weiter abgebaut, so dass im Folgenden die Aggregation inhibiert wird (Zimmermann, 2000; Sevigny et al., 2002). CD39 knock-out-Mäuse zeigten interessanterweise entgegen der Vermutung einer verstärkten Thrombozyten-Aggregation eine verlängerte Blutungszeit mit Unfähigkeit zur Aggregation. Dies wurde auf die andauernde Desensibilisierung des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors (der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor desensibilisiert nicht) zurückgeführt, der durch die erhöhten ADP-Spiegel ständig stimuliert wurde. Durch Gabe von Apyrase konnte dieser Effekt aufgehoben werden (Di Virgilio et al., 2001).

**Adenosin A<sub>2A</sub> Rezeptor.** Durch Metabolisierung von ATP oder ADP durch die NTPDase CD39 entstandenes AMP und Adenosin können die Thrombozyten-Aggregation inhibieren (Birk et al., 2002). Adenosin stellt dabei als Agonist an A<sub>2A</sub> Rezeptoren einen starken Inhibitor der Plättchenaggregation dar (Birk et al., 2002).

**Physiologie der Thrombozyten-Aggregation.** Während der Hämostase können sowohl ADP, ATP wie auch die Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A in sehr hohen Konzentrationen (bis 1 M; Di Virgilio et al., 2001) aus den dichten Granula der Thrombozyten freigesetzt werden (Holmsen und Weiss, 1979). Dabei ist das Verhältnis von ATP zu ADP 2:1 (Oury et al., 2001).

Im Extrazellularraum kann der ADP Spiegel durch enzymatischen Abbau des ATPs und der Polyphosphate weiter ansteigen. Wenn es auch wenige gegenteilige Veröffentlichungen gibt, gilt ATP heute als Antagonist an P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren (Hourani und Hall, 1994; Kunapuli und Daniel, 1998), während es den stärksten physiologischen Agonisten an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten darstellt. P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren interagieren miteinander bei verschiedenen Phosphorylierungsvorgängen (Contreres et al., 2003). Für die Aktivierung von Glykoprotein GPIIb/IIIa sind sowohl P2Y<sub>1</sub> wie auch P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-vermittelte Signale nötig. Interessanterweise kann die Signaltransduktion durch den P2Y<sub>1</sub> Rezeptor, wenn er inhibiert bzw. genetisch entfernt wurde, durch andere G<sub>q</sub>-Transduktionswege, wie z.B. durch Stimulation mittels Serotonin ersetzt werden. Dies gilt in analoger Weise auch für P2Y<sub>12</sub>-vermittelte Signale, die durch Aktivierung der G<sub>i</sub>-Untereinheit mittels Adrenalin nachgeahmt werden können. Dabei scheint aber nicht der gesenkte cAMP-Spiegel ursächlich für die Aggregation zu sein, da die direkte Hemmung der Adenylatzyklase durch die Verbindung SQ22536 nicht zur Wiederherstellung der ADP-induzierten Aggregation führte (Gachet, 2001). Während für eine vollständige Aggregation die Stimulation sowohl des P2Y<sub>1</sub> wie auch des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors nötig ist (Daniel et al., 1998; Hechler et al., 1998a; Jin und Kunapuli, 1998; Turner et al., 2001), scheint für die initiale Formveränderung der Thrombozyten allein die Aktivierung des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors, aber nicht des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors verantwortlich zu sein (Jin et al., 1998; Contreres et al., 2003). Eine unvollständige Aggregation wird dennoch auch bis zu einem gewissen Ausmaß durch die alleinige Stimulation des P2Y<sub>1</sub> oder des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors erreicht (Leon et al., 1999; Jarvis et al., 2000). Die physiologische Rolle des P2X<sub>1</sub> Rezeptors auf humanen Thrombozyten ist nach wie vor unbekannt. Der Mangel an selektiven P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten sowie die schnelle Desensibilisierung dieses Subtyps erschweren die Aufklärung der physiologischen Funktion von P2X<sub>1</sub> Rezeptoren auf humanen Thrombozyten (Oury et al., 2001). Es wird spekuliert, dass der P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte, schnelle, initiale Kalziumeinstrom zur Sensibilisierung der IP<sub>3</sub>-Rezeptoren führt, die durch den P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelten Anstieg an IP<sub>3</sub> wiederum aktiviert

werden können (Sage et al., 2000). Durch Vial und ihre Kollegen konnte gezeigt werden, dass nach Kostimulation von P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren mittels Koapplikation von  $\alpha\beta$ meATP und ADP statt einem additiven Kalziumanstieg ein deutlicher, erhöhter Synergismus zu verzeichnen war, der sich in einer Beschleunigung und Potenzierung des Kalziumsignals widerspiegelte (Vial et al., 2002). Ein Synergismus von P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren mit P2X<sub>1</sub> Rezeptoren konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Weiterhin wird eine Beteiligung des P2X<sub>1</sub> Rezeptors an der Formveränderung der Thrombozyten vermutet (Oury et al., 2001; Rolf et al., 2001; Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Eine weitere Funktion des P2X<sub>1</sub> Rezeptors könnte die Verstärkung der Freisetzung zusätzlicher Stimulatoren aus den dichten Granula der Thrombozyten sein (Oury et al., 2002).

**Kasuistik.** Eine funktionelle Rolle des P2X<sub>1</sub> Rezeptors auf humanen Thrombozyten konnte durch den Fall eines Patienten bestätigt werden, der eine Punktmutation in der zweiten Transmembrandomäne des P2X<sub>1</sub> Rezeptors besaß, wodurch ein unfunktionaler Rezeptor entsteht. Dieser Patient wies eine schwere Blutungsstörung auf (Oury et al., 2000). Dies legt nahe, dass der P2X<sub>1</sub> Rezeptor in der Regulation der Blut-Homöostase eine bedeutende Rolle spielt.

Über einen Patienten mit genetischem Defekt des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors wurde kurz in einem Abstrakt berichtet (Oury et al., 1999). Eine genauere Beschreibung und weitere Berichte blieben aber bisher aus.

Hollopeter und seine Kollegen berichteten von einem Patienten mit milden Blutungsstörungen, dessen Thrombozyten eine verminderte ADP-vermittelte Aggregation, deutlich verringerte ADP-Bindung sowie die Unfähigkeit, cAMP-Spiegel nach Stimulation mit ADP zu senken, aufwiesen. PCR Untersuchungen deckten eine genetische Mutation des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors auf (Hollopeter et al., 2001).

### 1.3. P2 Rezeptor-Liganden

#### 1.3.1. Agonisten

Mit Ausnahme der 1999 beschriebenen Theobromin- und Theophyllin-Analoga (Fischer et al., 1999) basieren alle synthetischen Agonisten auf strukturellen Modifikationen von ATP, UTP und deren Dinukleosid-Polyphosphat-Analoga. Mit dem Ziel die Potenz, die enzymatische Stabilität und die Rezeptor-Subtypselektivität zu verbessern, wurden Variationen am Purin- bzw. Pyrimidinringsystem, an der Ribose oder der Triphosphate-Gruppe durchgeführt (siehe Abb. 1.1).

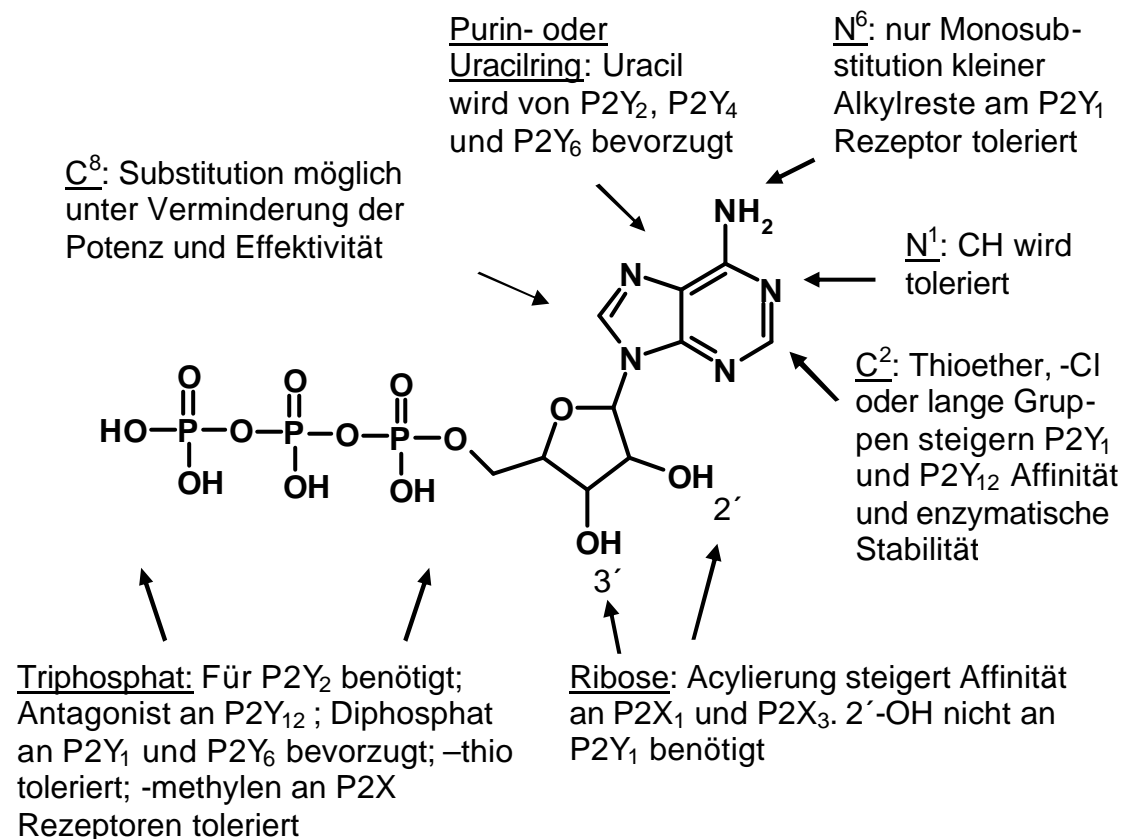


Abb. 1.1: Chemische Strukturformel von ATP sowie die Molekülbereiche, in denen strukturelle Variationen durchgeführt wurden.

Auch wenn in zunehmendem Maße Experimente an rekombinanten Rezeptoren in den Vordergrund rücken, wurden die meisten Struktur-Wirkungs-Beziehungen in der Vergangenheit hauptsächlich durch klassische funktionelle

Experimente erarbeitet. In vielen Fällen existieren aber Unterschiede bezüglich der Selektivität und Efficacy bestimmter Verbindungen an unterschiedlichen Geweben, sowie durch unterschiedliche Versuchsprotokolle, was ein allgemeines Problem bei Struktur-Wirkungs-Beziehungen an den verschiedenen P2 Rezeptor-Subtypen darstellt. Dennoch konnten in neueren Studien prinzipielle Struktur-Wirkungs-Beziehungen basierend auf Untersuchungen an nativen P2X und P2Y Rezeptoren der glatten Muskulatur durch Experimente an klonierten und dadurch definierten P2 Rezeptor-Subtypen bestätigt werden. Unglücklicherweise geht die Entwicklung von Agonisten mit ausreichender Subtypselektivität und metabolischer Stabilität nur sehr langsam voran. Daher existiert derzeit kein metabolisch stabiler, universeller oder subtypselektiver P2 Rezeptor-Agonist. Einige der nützlichsten Agonisten sind die metabolisch stabilen ATP- bzw. UTP-Analoga  $\alpha\beta\text{meATP}$ ,  $L\text{-}\beta\gamma\text{meATP}$ ,  $\text{ADP}\beta\text{S}$ ,  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  (chemische Strukturformeln siehe Abb. 1.2),  $\text{UDP}\beta\text{S}$  und  $\text{UTP}\gamma\text{S}$ .

### ***Modifikationen an der Triphosphatgruppe***

Die Phosphatgruppen der Nukleotide liegen bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 in deprotonierter Form vor ( $\text{pK}_{\text{a}1}$  ca. 1,  $\text{pK}_{\text{a}2}$  ca. 6), d.h. sie stellen Tetraanionen (Nukleotidtriphosphate) bzw. Trianionen (Nukleotiddiphosphate) dar. Diese Anionen können mit zweiwertigen Kationen wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  unter physiologischen Bedingungen Komplexe bilden. Es gibt Hinweise darauf, dass  $\text{ATP}^{4-}$  10-fach potenter an  $\text{P2Y}_2$  Rezeptoren bindet als  $\text{MgATP}^{2-}$ . Eventuell bindet die anionische Phosphatgruppe an positiv geladene Aminosäuren (Arginin, Lysin), die typischerweise in der TM6 und TM7 lokalisiert sind (Müller, 2002). Grundsätzlich werden P2X Rezeptoren nicht durch AMP oder Adenosin aktiviert. Ausnahmen stellen Ring-modifizierte Adenosinmonophosphate wie z.B. Hexyl-thio-AMP dar, die  $\text{P2X}_1$  bis  $\text{P2X}_4$  Rezeptoren in unterschiedlichem Ausmaß aktivieren können. Die 2-Thioether-5'-monophosphat-Derivate stellen potente  $\text{P2Y}_1$  Rezeptor-Agonisten dar (Jacobson et al., 2002). Der Ersatz einer Sauerstoffbrücke durch eine Methylengruppe oder eines geladenen Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom führt zu erhöhter enzymatischer

Stabilität bei hoher agonistischer Potenz. So stellt **abmeATP** einen hochpotenten Agonisten der schnell desensibilisierenden Gruppe 1 Rezeptoren ( $EC_{50} = 1-10 \mu\text{M}$ ) und heteromeren  $P2X_{1/5}$  Rezeptoren sowie der langsam desensibilisierenden heteromeren  $P2X_{2/3}$  Rezeptoren dar (Ralevic und Burnstock, 1998; Haines et al., 1999). An homomeren  $P2X_2$  und  $P2X_{4-7}$  sowie heteromeren  $P2X_{4/6}$  Rezeptoren ist  $\alpha\beta\text{meATP}$  ein schwacher partieller Agonist bzw. inaktiv. Speziesdifferenzen werden am Beispiel des  $P2X_4$  Rezeptors deutlich. Während  $\alpha\beta\text{meATP}$  an  $P2X_4$  Rezeptoren der Maus ( $EC_{50} = 7 \mu\text{M}$ ) und des Menschen ( $EC_{50} = 19 \mu\text{M}$ ) als schwacher partieller Agonist fungiert, werden  $P2X_4$  Rezeptoren der Ratte durch  $\alpha\beta\text{meATP}$  inhibiert ( $IC_{50} = 4.6 \mu\text{M}$ ) (Jones et al., 2000). An  $P2Y$  Rezeptoren ist  $\alpha\beta\text{meATP}$  schwach wirksam oder inaktiv (Yu et al., 1999). Bedingt durch die enzymatische Stabilität wurde  $\alpha\beta\text{meATP}$  lange für den potentesten  $P2X$  Rezeptor-Agonisten gehalten und damit im Vergleich zu hydrolysierbaren Agonisten in seiner intrinsischen Wirkstärke überschätzt. Ein weiterer stabiler Agonist ist **bgmeATP** (Lambrecht, 2000; North und Surprenant, 2000). Eine Schwefel-Substitution am terminalen Phosphatrest führt ebenfalls zu enzymatischer Stabilität. Verbindungen mit dieser Modifikation sind **ATPgS** (potenter Agonist an rekombinanten  $P2X_{1-6}$ ,  $P2X_{2/3}$ ,  $P2X_{1/5}$  sowie an rekombinanten  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$  und  $P2Y_{11}$  Rezeptoren), **ADPbS** (potenter Agonist an verschiedenen  $P2Y$  nicht aber  $P2X$  Rezeptor-Subtypen) und **UTPgS** (potenter Agonist an  $P2Y_2$  Rezeptoren) (zur Übersicht siehe Jacobson und Knutsen, 2001). Das korrespondierende  $\beta$ -Thiodiphosphat **UDPbS** aktiviert selektiv  $P2Y_6$  Rezeptoren (Jacobson et al., 2002).

### ***Adenin-Modifikationen***

Mit Ausnahme von CTP, das  $P2X_3$  sowie schwächer auch  $P2X_4$  und  $P2X_{1/5}$  Rezeptoren stimuliert und UTP, das ebenfalls an  $P2X_3$  Rezeptoren agonistisch aktiv ist, sind Pyrimidin-Nukleotide im Allgemeinen schwache  $P2X$  Rezeptor-Agonisten. Die Substitution in Position 2 des Adeninringes wird gut toleriert. So stellt **2-meSATP** einen der potentesten  $P2X$  und  $P2Y$  Rezeptor-Agonisten dar. An  $P2X_1$ ,  $P2X_2$  und  $P2X_3$  Rezeptoren ist 2-meSATP potenter als ATP (zur

Übersicht siehe Jacobson und Knutsen, 2001). 5'-Diphosphate sind generell potenter an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte oder des Menschen als ihre korrespondierenden 5'-Triphosphate. So stellen ADP und **2-meSADP** potente volle Agonisten dar, während ATP und 2-meSATP eine geringere Potenz mit reduzierter Efficacy aufweisen oder sogar an manchen P2 Rezeptoren als Antagonisten auftreten (Jacobson et al., 2002). Kettenverlängerung an der C<sup>2</sup>-Position verändert die Potenz an P2Y Rezeptoren nicht, was für eine große Toleranz hinsichtlich struktureller Variationen des Liganden an Position C<sup>2</sup> spricht. Eine längere Thioethergruppe in Position C<sup>2</sup> steigerte die Stabilität der Triphosphatgruppe gegenüber enzymatischen Abbau. Eventuell interferiert die längere Kette an C<sup>2</sup> mit der ATP-Bindungsstelle von Ektonukleotidasen. In Position 8 ist eine Substitution möglich, wenn auch die Potenz und Efficacy abfällt. Geringe Variationen der N<sup>6</sup>-Position, z.B. die Monosubstitution mit kleinen Alkylresten, werden an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren toleriert (Jacobson et al., 2002).

### ***Ribose-Modifikationen***

An diesem Molekülteil sind vielfältige Variationen möglich. Wird eine der Hydroxylgruppen von der Ribose entfernt, fällt die Potenz im Allgemeinen sowohl an P2X wie auch an P2Y Rezeptoren mit den folgenden Ausnahmen ab: 3'-Amino-3'-deoxy-ATP stellt an P2Y Rezeptoren von Truthahn-Erythrozyten einen potenteren Agonisten als ATP dar. Die Verbindung 3'-Benzoylamino-3'-deoxy-ATP dagegen ist ein potenter und selektiver P2X Rezeptor-Agonist (Jacobson et al., 2002). Durch weitere Variationen wie den Ersatz der Ribose durch karbozyklische Ringe konnten hochpotente P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Agonisten entwickelt werden (Jacobson et al., 2002).



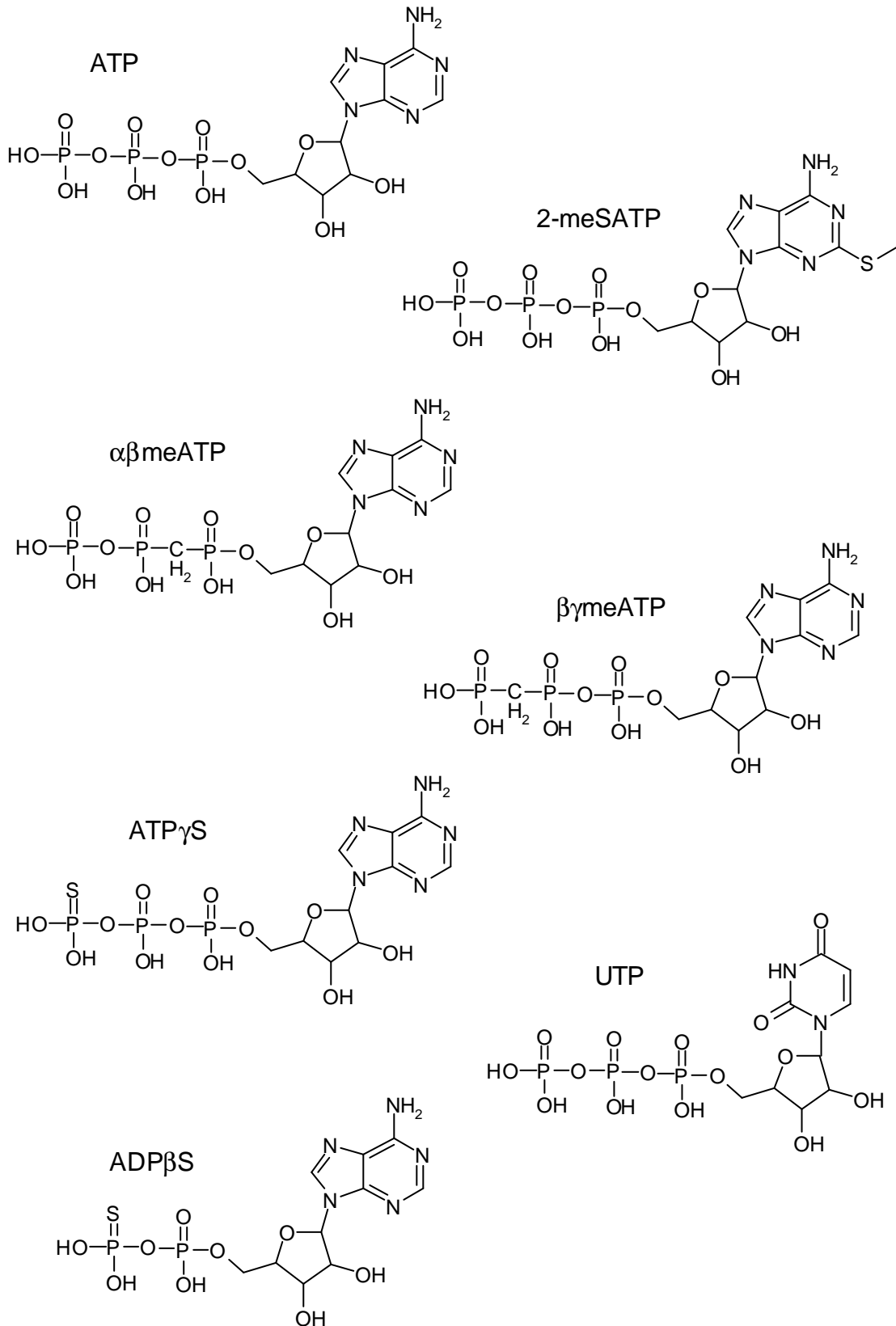


Abb. 1.2: Chemische Strukturformeln der P2 Agonisten ATP, 2-meSATP,  $\alpha\beta$ meATP,  $\beta\gamma$ meATP, ATP $\gamma$ S, UTP und ADP $\beta$ S.

### 1.3.2. Antagonisten

Selektive Antagonisten sind zur pharmakologischen Identifizierung von P2 Rezeptor-Subtypen den Agonist-Rangfolgen aufgrund der in Kapitel 2 genannten Probleme vorzuziehen (Fagura et al., 2000). Trotz der großen Anzahl an Verbindungen, die zur Blockade von P2X und P2Y Rezeptoren eingesetzt wurden, ist keine davon ideal. Alle Liganden sind aufgrund ihrer Kinetik, Rezeptoraffinität, Subtypselektivität oder P2 Rezeptor-Spezifität nur von beschränktem Nutzen. Ihre potentielle Fähigkeit, als Substrat für Ektonukleotidasen zu dienen oder diese Enzyme zu inhibieren und damit ATP und andere Nukleotide vor dem Abbau zu schützen, macht ihren Einsatz noch komplizierter (Fagura et al., 2000). Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den bekannten P2 Rezeptor-Antagonisten sind kaum vorhanden. Daher sind pharmakophore Strukturen für die Bindungsstellen der Antagonisten schwer zu definieren (Soto et al., 1997).

Alle Antagonisten sollten hinsichtlich ihrer Aktivität an Ektonukleotidasen, ihrer P2 Rezeptor-Spezifität und ihrer Selektivität gegenüber allen P2X und P2Y Rezeptor-Subtypen untersucht werden. Dies wurde bisher nur für PPADS und Suramin durchgeführt (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht et al., 2002).

#### 1.3.2.1. Nukleotide

P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte Effekte werden häufig durch die schnelle und andauernde Desensibilisierung nach Gabe des Agonisten **abmeATP** inhibiert. Dieses Vorgehen kann zu erheblichen Problemen führen, da durch die andauernde Rezeptorstimulation intrazelluläre Effekte ausgelöst werden, die großen Einfluss auf die Messung ausüben können. **TNP-ATP** (Abb. 1.5) sowie dessen Di- und Monophosphate stellen potente P2X Rezeptor-Antagonisten dar, die mit nanomolarer Potenz rekombinante P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren, exprimiert in HEK293 Zellen, inhibieren (Virginio et al., 1998). Diinosinpolyphosphate wie **Ip<sub>5</sub>I** sind hoch selektive Antagonisten der Gruppe 1 P2X Rezeptoren. Sie inhibieren P2X<sub>1</sub> Rezeptoren in nanomolaren

Konzentrationen, sowie P2X<sub>3</sub> Rezeptoren im mikromolaren Bereich, während sie an P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>2/3</sub> und P2X<sub>4</sub> Rezeptoren inaktiv sind (King et al., 1999; Dunn et al., 2000). Einen bedeutenden Nachteil stellt allerdings die enzymatische Instabilität dieser Substanzen dar. So lassen sich P2X Rezeptor-vermittelte Vorgänge in komplexeren Geweben nur unbefriedigend durch TNP-ATP oder I<sub>p</sub><sub>5</sub>I inhibieren (Lambrecht, 2000). **A3P5P** dient als kompetitiver Antagonist an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (Boyer et al., 1996) (Abb. 1.5). Durch Methylierung der Position N<sup>6</sup> wurde mit **MRS2179** (Abb. 1.5) die antagonistische Potenz und Selektivität an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren gesteigert (Boyer et al., 1998). An P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren menschlicher Thrombozyten wurde für MRS2179 ein pIC<sub>50</sub>-Wert von 6.59 ermittelt. Die Schild-Analyse der Aggregationshemmung durch MRS2179 ergab einen pA<sub>2</sub>-Wert von 6.55, und in Bindungsexperimenten an menschlichen Thrombozyten mit [<sup>33</sup>P]MRS2179 wurde ein pK<sub>d</sub>-Wert von 6.96 bestimmt (Baurand et al., 2001) (siehe Kapitel 1.3.3.). MRS2179 übte keinen Einfluss auf P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten aus. Durch intravenöse Gabe von MRS2179 wurde die Blutungszeit von Mäusen und Ratten deutlich verlängert. Dieser Effekt, der sich analog zu der verlängerten Blutungszeit in P2Y<sub>1</sub> Rezeptor knock-out-Mäusen verhält, ist ein weitere Beleg für die selektive Inhibition von P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren durch MRS2179. Da durch eine voluminösere Propylsubstitution an Position N<sup>6</sup> die antagonistische Wirkung völlig verloren geht, wird die N<sup>6</sup>-Bindungsstelle des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors eventuell durch eine kleine hydrophobe Tasche gebildet (Jacobson et al., 2002). Durch Ersatz der Ribose mit einem Bicyclo[3.1.0]hexan in der Verbindung **MRS2279** konnte die antagonistische Potenz an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren von Truthahn-Erythrozyten weiter gesteigert werden (IC<sub>50</sub> (MRS2179) = 100 nM, IC<sub>50</sub> (MRS2279) = 54 nM). Nach Transfektion des menschlichen P2Y<sub>1</sub> Rezeptors in 1321N1 Astrozytomazellen, inhibierte MRS2279 die Anreicherung von Inositoltriphosphat auf kompetitive Weise mit einem pK<sub>B</sub>-Wert von 8.10. Die Aggregation menschlicher Thrombozyten wurde ebenfalls kompetitiv inhibiert und ergab einen pK<sub>B</sub>-Wert von 8.05 (Boyer et al., 2002). Zu den Ergebnissen von tritiiertem MRS2279 siehe Kapitel 1.3.3.. Eine Vielzahl von Nukleotid-Analoga wurde in Hinblick auf P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonismus an Thrombozyten entwickelt. Die

Weiterentwicklung des Aggregationshemmers AR-C66096 (ARL66096) durch sein  $\beta,\gamma$ -Dichloromethylen-Derivat AR-C67085MX (ARL67085MX) führte zu einem 30000-fach selektiven P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonismus an diesem Subtyp. Diese Verbindung stimuliert aber gleichzeitig den menschlichen P2Y<sub>11</sub> Rezeptor-Subtyp. Das Derivat **AR-C69931MX** (ARL69931MX) stellt den derzeit potentesten und selektivsten P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonisten dar (IC<sub>50</sub> = 0.4 nM) (Jacobson et al., 2002).

### 1.3.2.2. Histochemische Farbstoffe

**Reactive blue 2** wurde lange Zeit als P2 Rezeptor-Antagonist verwendet, obwohl die erhältliche Substanz nur zu 40-50 % aus den aktiven Verbindungen bestand und die übrigen Inhaltstoffe unbekannt waren (Abb. 1.5). Erstere stellen ein Gemisch der meta- und para-Sulfonatisomere dar. Reactive blue 2 inhibiert P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren nicht-kompetitiv, ist an P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren inaktiv und inhibiert P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren potenter als P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren. An P2X<sub>2</sub> Rezeptoren ist Reactive blue 2 ein potenterer Antagonist als an P2X<sub>4</sub> Rezeptoren (Jacobson und Knutsen, 2001). **Cibachron blue 3GA** ist das reine ortho-Isomere (Abb. 1.5). Auch wenn beide Verbindungen häufig als P2Y-selektive Antagonisten betrachtet werden, konnten Tuluc und Kollegen zeigen, dass sie equipotente Antagonisten an P2X Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens sowie P2Y Rezeptoren der Taenia Coli des Meerschweinchens darstellen (Tuluc et al., 1998). **Trypan blue** und **Evans blue** unterscheiden sich lediglich in der Position der Sulfonsäuren an den Naphthalinringen (Abb. 1.5). Beide Verbindungen stellen relativ potente Inhibitoren an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren dar, wobei Evans blue zusätzlich der potentere Inhibitor von Ektonukleotidasen im Vas deferens der Ratte ist und Trypan blue effektiver P2Y Rezeptoren der Taenia Coli des Meerschweinchens inhibiert (Bültmann et al., 1994, 1996a).

### 1.3.2.3. PPADS und Analoge

Den Anfang für die Entwicklung dieser Verbindungen bildete eine Veröffentlichung zu einem ganz anderen Thema (Lambrecht et al., 2002). Es wurde berichtet, dass Suramin die Nukleotid-abhängige Kalziumpumpe im

sarcoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskeln des Kaninchens inhibiert, in dem die Kalziumaufnahme und die ATPase-Aktivität gehemmt wurden. Daraufhin fanden Bäumert und Heider heraus, dass Pyridoxalphosphat und eine Reihe von 6-Arylazo-Analoga ebenfalls die oben erwähnte Kalziumpumpe inhibierten, indem sie als Antagonisten die Adeninnukleotid-Bindungsstelle besetzten. Unter der Prämisse, dass Suramin auch als P2-Rezeptor-Antagonist agiert, stellte unsere Arbeitsgruppe die Hypothese auf, dass Pyridoxalphosphat und seine Analoga eventuell ebenfalls P2-Rezeptor-Antagonisten darstellen könnten. Daher wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer ganzen Reihe von Pyridoxalphosphat-Analoga durchgeführt (Lambrecht et al., 1996), die zum entscheidenden Durchbruch mit Einführung der Verbindung PPADS (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure; Abb. 1.5) führten. PPADS stellte den langersehnten ersten spezifischen P2-Rezeptor-Antagonisten dar (Lambrecht et al., 2002).

Ursprünglich als selektiver P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonist an Gewebepräparationen eingeführt, handelt es sich nach heutigen Erkenntnissen bei **PPADS** um einen nicht-selektiven P2X Rezeptor-Antagonisten mit leichter Präferenz für P2X<sub>1</sub> Rezeptoren (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht et al., 2002). PPADS inhibiert sowohl rekombinante homomere P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>5</sub> und heteromere P2X<sub>1/5</sub> und P2X<sub>2/3</sub> (IC<sub>50</sub> = 0.1 – 5 µM) wie auch P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (pA<sub>2</sub> ≅ 6.0) mit ähnlicher Potenz, ist aber ein schwacher oder ineffektiver Antagonist (IC<sub>50</sub> > 10 µM) an homomeren P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>, heteromeren P2X<sub>4/6</sub> und P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub> und P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren. Zwei unterschiedliche Kinetikverhalten wurden an PPADS-sensitiven P2X Rezeptoren beobachtet. An rekombinanten P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>2</sub> Rezeptoren stellt PPADS einen Antagonisten dar, der langsam anflutet und sich nur langsam wieder vom Rezeptor entfernt (pseudo-irreversibel). 15 bis 60 Minuten andauernde Perfusion mit PPADS-freiem Puffer ist nötig, bevor der Antagonismus vollständig beseitigt ist. Im Gegensatz dazu lässt sich der Antagonismus von PPADS an rekombinanten P2X<sub>3</sub> Rezeptoren schnell aufheben (Soto et al., 1997). Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten

liegt eventuell im Aminosäurenbesatz der unterschiedlichen Rezeptoren. So wird vermutet, dass über die Aldehydgruppe von PPADS eine Schiff'sche Base mit der Aminogruppe eines bestimmten Lysinrestes in der extrazellulären Schleife der P2X<sub>1</sub> bzw. P2X<sub>2</sub> Rezeptoren gebildet wird. Der P2X<sub>3</sub> Rezeptor hat anstelle des Lysins einen Threoninrest, wodurch die Bildung einer Schiff'sche Base nicht mehr möglich ist. Interessanterweise wird durch Mutation einer einzigen Aminosäure zu Lysin (E<sup>249</sup> an P2X<sub>4</sub>, L<sup>251</sup> an P2X<sub>6</sub> Rezeptoren) sowohl die PPADS-Insensitivität der P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>6</sub> Rezeptoren aufgehoben wie auch die Kinetik zu dem pseudo-irreversiblen Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>2</sub> Rezeptoren umgewandelt. Dies spricht für die Hypothese der Bildung einer Schiff'schen Base (Lambrecht et al., 2002). PPADS weist eine hohe P2 Rezeptor-Spezifität auf. Bis 100 µM trat keine nennenswerte Interaktion mit α<sub>1</sub> oder α<sub>2</sub> Adrenozeptoren, histaminergen H<sub>1</sub> oder muskarinergen M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> oder M<sub>3</sub> Rezeptoren, Adenosin A<sub>1</sub> oder A<sub>2</sub>, AMPA oder NMDA und 5-HT Rezeptoren auf. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Phosphatrest nicht durch Ektonukleotidasen gespalten wird und PPADS selbst nur eine geringe Hemmwirkung auf diese Enzyme ausübt (Lambrecht et al., 2002). Eine Hemmung ist auszuschließen, wenn PPADS in einem Konzentrationsbereich von 1-10 µM eingesetzt wird, in dem bereits eine effektive Blockade der sensitiven P2 Rezeptoren festzustellen ist.

Durch einen Fehler des Herstellers wurde PPADS ursprünglich nicht von seinem Isomeren **iso-PPADS** (Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',5'-disulfonsäure) unterschieden, obwohl beide Verbindungen eine unterschiedliche Pharmakologie aufweisen (Connolly, 1995). An P2X<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub> = 35 nM), P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub> (IC<sub>50</sub> = 79 nM) und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ist iso-PPADS 2- bis 3-fach potenter als PPADS (Brown et al., 2001). An nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Nervus-vagus wies iso-PPADS einen pK<sub>B</sub>-Wert von 6.0 auf (Trezise et al., 1994c).

Um die Potenz und Selektivität von PPADS zu steigern, wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer großen Vielzahl von Verbindungen an nativen und rekombinanten Rezeptoren durchgeführt (Lambrecht et al., 2002). Dabei

wurden strukturelle Modifikationen am Phenylring und der Phosphatgruppe durchgeführt. Auch Naphthalinderivate wurden untersucht. Anstelle der Sulfonsäuren wurden Variationen in Form von Methoxy-, Chloro-, Nitro- oder Carboxylsubstitutionen an dem Phenylring oder Naphthylring durchgeführt. Indem Phosphonate oder cyclische Phosphate anstelle der Phosphatgruppe eingeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Phosphatgruppe bzw. die Aldehydgruppe nicht zwingend essentiell für einen P2-Antagonismus ist. In kürzlich erschienenen Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Arbeiten von PPADS Analoga, konnten Kim und Brown zeigen, dass die Substitution des Phenylringes mit einer Carbonsäure in para-Position im Vergleich zu PPADS zur 11-fachen Wirkungssteigerung an rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren führt (Brown et al., 2001; Kim et al., 2001). Die einzelnen Strukturvariationen sowie deren antagonistische Potenz an P2 Rezeptoren ist in Tabelle 1.1 aufgeführt. In Abb. 1.3 sind die folgenden Ergebnisse graphisch zusammengefasst: Ausgehend von PPADS konnte die Potenz an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren durch Variation der Sulfonsäureposition mit iso-PPADS gesteigert werden. Die hohe Potenz von **MRS2143** an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren zeigt, dass die beiden polaren Sulfonsäuregruppen am Azophenylring für einen Antagonismus nicht essentiell zu sein scheinen. Dennoch führt die Substitution mit einer Karbonsäure in Position 4 des Azophenylringes (**MRS2159**) zu einer deutlichen Wirksteigerung an beiden Rezeptoren. Verglichen mit PPADS resultiert daraus ein 11-fach bzw. 2-fach stärkerer Antagonismus an P2X<sub>1</sub> (IC<sub>50</sub> = 9 nM) bzw. P2X<sub>3</sub> Rezeptoren (IC<sub>50</sub> = 140 nM). Nach Umwandlung von MRS2159 zu dem Phosphonat-Derivat **MRS2284** blieb das antagonistische Profil konstant. Trotz der leichten Abnahme an antagonistischer Potenz scheint eine Kettenverlängerung des Phosphatrestes am Pyridoxalring gut toleriert zu werden (**Verbindung 6**). Die Art der sauren Gruppe am Azophenylring scheint ebenfalls von Bedeutung zu sein, denn der Ersatz der Karbonsäure in MRS2284 mit einer Phosphonsäure in **MRS2273** führte zu einem leichten Abfall der antagonistischen Potenz an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, während die antagonistischen Potenz an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren zunahm. Mit dem Phosphonat-Derivat von iso-PPADS, **MRS2191**, konnte die P2X<sub>1</sub> Rezeptorselektivität

gesteigert werden ( $IC_{50}$  (P2X<sub>1</sub>) = 10 nM;  $IC_{50}$  (P2X<sub>3</sub>) = 340 nM). Mit Variation der Phosphonsäure- zur Karbonsäuresubstitution wird erneut deutlich, dass die Art der sauren Gruppen am Azophenylring von großer Bedeutung ist. So nimmt der Antagonismus durch die **Verbindung 8** an beiden Rezeptoren ab. Die Variation der Karbonsäureposition von Position 2-5 (Verbindung 8) zu Position 3-5 (Verbindung **MRS2285**) bleibt ohne Einfluss auf den Antagonismus. Erfolgt die 2-5-Substitution allerdings mit Methylphosphonatgruppen anstelle der Karbonsäuren, wird ein starker Antagonismus innerhalb dieser Gruppe mit der Verbindung **MRS2257** erzielt ( $IC_{50}$  (P2X<sub>1</sub>) = 10 nM;  $IC_{50}$  (P2X<sub>3</sub>) = 30 nM). An P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren von Truthahn-Erythrozyten sind alle untersuchten PPADS-Analoga deutlich schwächer antagonistisch wirksam als an rekombinanten P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren der Ratte, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten. Auffällig ist die eindeutige Verminderung des Antagonismus an Truthahn-P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren der Verbindung MRS2159 sowie der Verbindung 6, die jeweils eine Karbonsäure in Position 4 des Phenylringes aufweisen.

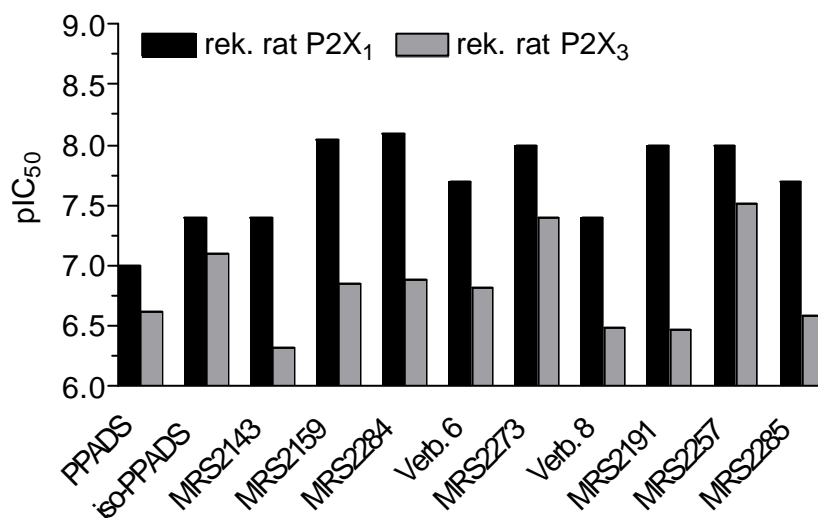


Abb. 1.3: Balkendiagramm der  $pIC_{50}$ -Werte von PPADS-Analoga nach Brown et al. (2001) und Kim et al. (2001) an rekombinanten Ratten P2X<sub>1</sub> (rek. rat P2X<sub>1</sub>) und P2X<sub>3</sub> (rek. rat P2X<sub>3</sub>) Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten. (Agonist für P2X<sub>1</sub>: 1  $\mu$ M und P2X<sub>3</sub>: 3  $\mu$ M ATP). Elektrophysiologisch gemessen wurde die Hemmung ATP-induzierter Einwärtsströme. Zur Struktur der PPADS-Analoga siehe Abb. 1.4 und Tabelle 1.1.



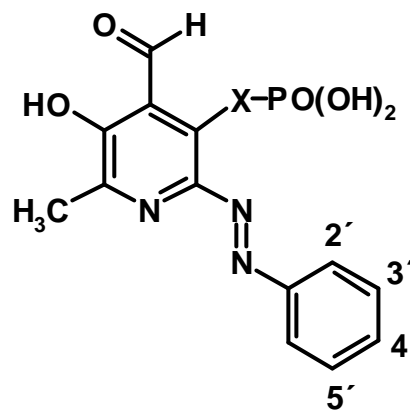


Abb. 1.4: Chemische Grundstruktur der PPADS-Analoga von Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: *Pharmakologische Eigenschaften von PPADS-Analoga an rekombinanten P2 Rezeptoren (Kim et al., 2001; Brown et al., 2001). Zur chemischen Grundstruktur siehe Abb. 1.4.*

Verbindung	Position					IC <sub>50</sub> (μM)		
	2'	3'	4'	5'	X	P2X <sub>1</sub> <sup>a</sup>	P2X <sub>3</sub> <sup>b</sup>	P2Y <sub>1</sub> <sup>c</sup>
PPADS	SO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	H	CH <sub>2</sub> O	0.10	0.24	16.6
iso-PPADS	SO <sub>3</sub> H	H	H	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> O	0.04	0.08	21.4
MRS2143	H	H	H	H	CH <sub>2</sub> O	0.04	0.48	54.0
MRS2159	H	H	COOH	H	CH <sub>2</sub> O	0.009	0.14	~ 100
MRS2284	H	H	COOH	H	CH <sub>2</sub>	0.008	0.13	n.b.
Verb. 6	H	H	COOH	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	0.02	0.15	~ 100
MRS2273	H	H	P(O)(OH) <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub>	0.01	0.04	27
Verb. 8	COOH	H	H	COOH	CH <sub>2</sub>	0.04	0.33	n.b.
MRS2191	SO <sub>3</sub> H	H	H	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub>	0.01	0.34	46.0
MRS2257	H	CH <sub>2</sub> P(O)(OH) <sub>2</sub>	H	CH <sub>2</sub> P(O)(OH) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>	0.01	0.03	14.5
MRS2285	H	COOH	H	COOH	CH <sub>2</sub>	0.02	0.26	n.b.

<sup>a</sup>Hemmung des Ionenstroms, ausgelöst durch 1 μM ATP, an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren exprimiert in *Xenopus* Oozyten.

<sup>b</sup>Hemmung des Ionenstroms, ausgelöst durch 3 μM ATP, an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren exprimiert in *Xenopus* Oozyten.

°Hemmung der durch 10 nM 2-meSADP stimulierten Phospholipase C in Truthahn-Erythrozytenmembranen (Messung von [<sup>3</sup>H]Inositolmonophosphat).

Die Synthesevorstufe von PPADS, **Pyridoxal-5-phosphat**, stellt einen nicht-selektiven Antagonisten an rekombinanten und nativen P2 Rezeptoren dar, der mindestens 10-fach schwächer als PPADS ist (Ralevic und Burnstock, 1998). An P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten- ( $pA_2 = 5.33$ ; Trezise et al., 1994b) und Kaninchen- ( $pA_2 = 5.20$ ; Lambrecht et al., 1996) –Vas-deferens scheint Pyridoxal-5-phosphat einen kompetitiven Antagonisten darzustellen. P2Y<sub>1</sub>-ähnliche Rezeptoren der Meerschweinchen-Aorta werden mit einem  $pA_2$ -Wert von 5.39 (Trezise et al., 1994a) ähnlich potent inhibiert. Pyridoxal, Pyridoxin, Pyridoxin-5- und Pyridoxamin-5-phosphat und dihydro-PPADS zeigten an nativen P2X und P2Y Rezeptoren des Vas deferens, des Vagus-Nerven, der Kardiomyozyten der Ratte und der Taenia coli des Meerschweinchens keinen antagonistischen Effekt bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M (Lambrecht et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass sowohl die Phosphat- wie auch die Aldehyd-Gruppe für den P2 Antagonismus von PPADS und Pyridoxal-5-phosphat von Bedeutung sind. Kim und Kollegen zeigten allerdings, dass die Phosphatgruppe nicht für einen Antagonismus an P2Y Rezeptoren von Truthahn-Erythrozyten essentiell ist (Kim et al., 1998). Neuere Befunde stellen die Existenz von P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren in Truthahn-Erythrozyten jedoch in Frage (Sak, 2000). Da die Vermutung besteht, dass es sich bei dem vermeintlichen P2Y<sub>1</sub> Rezeptor entweder um unterschiedliche P2 Rezeptoren oder einen neuen P2Y Rezeptor-Subtyp handelt, sollten Ergebnisse an diesem Rezeptormodell bis zur vollständigen Aufklärung kritisch betrachtet werden. Analog zu PPADS wird für Pyridoxal-5-phosphat die Bildung einer Schiff'schen Base vermutet. So konnten Untersuchungen von Kornecki und Feinberg (1980) zeigen, dass nach Reduktion der reversiblen Bindung zwischen der Aldehydgruppe von Pyridoxal-5-phosphat und Aminosäuren des P2Y Rezeptors auf humanen Thrombozyten mittels Natriumborhydrid, eine irreversible Aggregationshemmung durch die nun stabile Einfachbindung an P2Y Rezeptoren erfolgte.

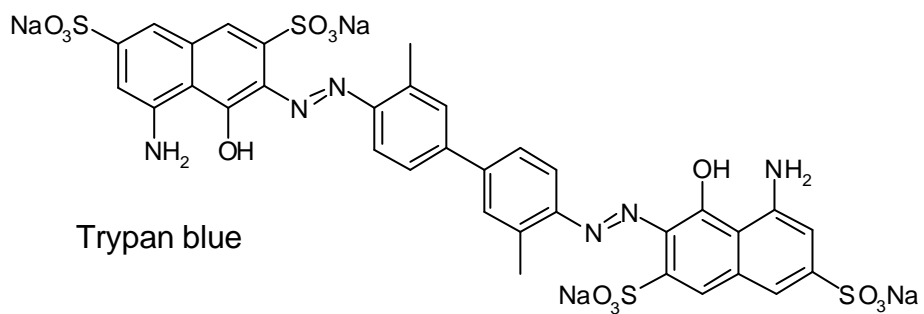
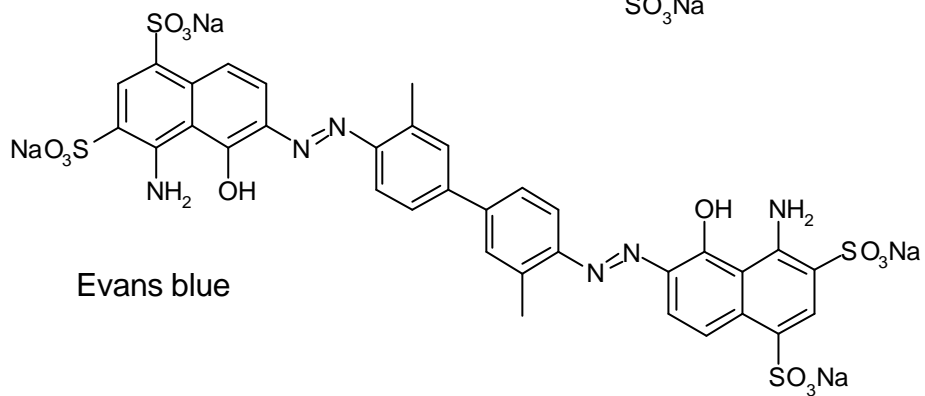
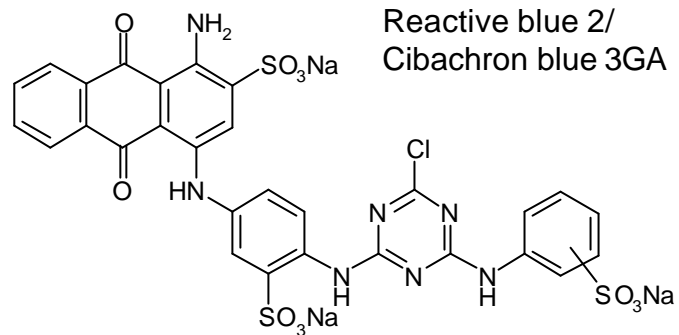
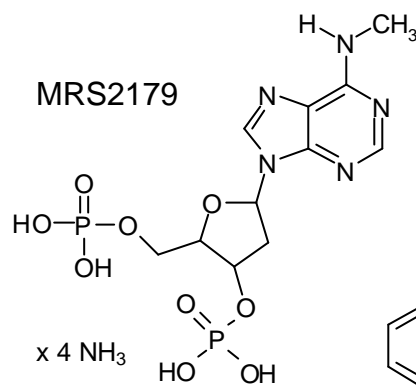
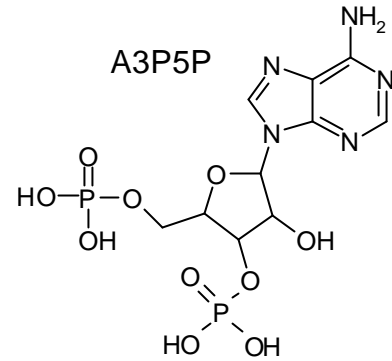
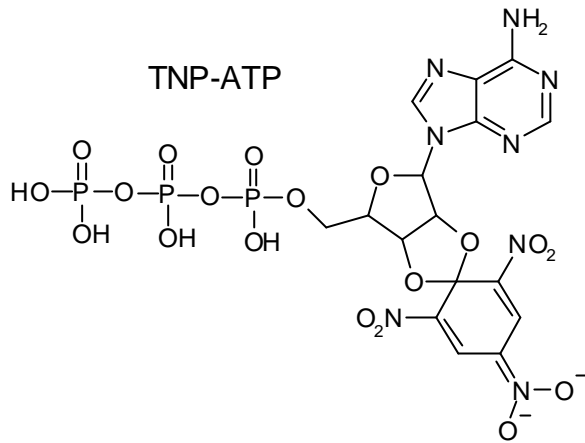
**PPNDS** (Abb. 1.5) ist an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens ( $K_B = 37$  nM) und an rekombinanten Ratten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten ( $IC_{50} = 15$  nM), 6- bis 7- fach potenter als PPADS

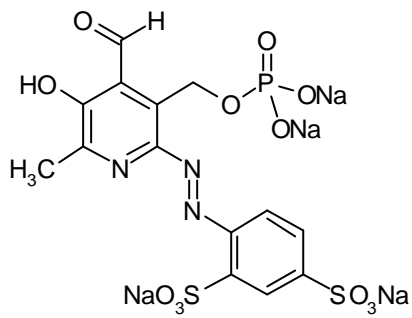
(Lambrecht et al., 2000b). Weiterhin ist PPADS bemerkenswert selektiv für P2X<sub>1</sub> Rezeptoren versus P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum (52-fach). Neben der hohen P2 Rezeptor-Spezifität, weist PPADS eine geringe Hemmung von Ektonukleotidasen der *Xenopus laevis* Oozyten auf (70 % Hemmung durch 300 µM).

Es wurden von unserer Arbeitsgruppe weitere Strukturvariationen durchgeführt, in denen eine Serie von Homodimeren des PPADS und Heterodimere aus Pyridoxal-5-phosphat mit einer Diazo-Gruppe als Verknüpfung zu einem zweiten pharmakophoren Element aus der Reihe der Monomere von Suramin und dessen Analoga untersucht wurden. Die beiden Homodimere **DIPS** und **CL-II** können als PPADS-Derivate angesehen werden, deren Pyridoxal-5-phosphatreste durch Platzhalter unterschiedlicher Flexibilität und Länge verbunden sind (Abb. 1.5). An nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens ergab sich aus Untersuchungen unseres Arbeitskreises die folgende Rangfolge antagonistischer Potenz: CL-II (pK<sub>B</sub> = 7.0) > DIPS (pK<sub>B</sub> = 6.7) > PPADS (pK<sub>B</sub> = 6.4). CL-II wurde bereits erfolgreich als Crosslinker eingesetzt, um an klonierten P2X<sub>1</sub> oder P2X<sub>3</sub> Rezeptoren in *Xenopus Oozyten* die trimere Quartärstruktur nachzuweisen (Nicke et al., 1999; Lambrecht et al., 2002).

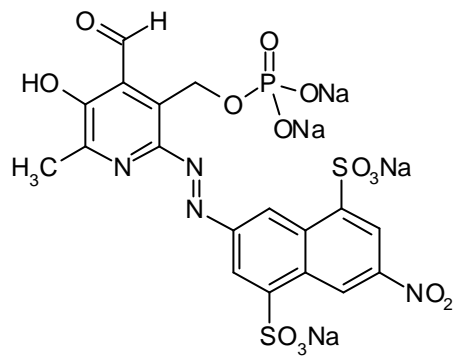
In der Serie der Heteromere rückte die Verbindung **SB9** (Abb. 1.5) in den Vordergrund, die die Verknüpfung von PPADS mit einem Suraminmonomeren repräsentiert. Im Gegensatz zu Suramin oder PPADS, erwies sich SB9 an nativen Geweben als potenter und selektiver P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonist. Es inhibierte P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum 10-fach potenter (pA<sub>2</sub> = 6.98) als P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens (pA<sub>2</sub> = 6.05) und 447-fach stärker als Ektonukleotidasen (pIC<sub>50</sub> = 4.33) (Lambrecht et al., 2000a). An beiden nativen Geweben verhält sich SB9 als Antagonist mit einer langsamen ON- wie auch OFF-Kinetik. An den rekombinanten Rezeptoren P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11</sub> war SB9 inaktiv (Lambrecht et al., 2002). Bemerkenswert ist auch, dass SB9 die gleiche Selektivität für und Potenz an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren besitzt wie das Nukleotid MRS2179 (Boyer et al., 1998). Gemeinsam mit der hohen P2 Rezeptor-Spezifität macht dies SB9 unter den Pyridoxal-5-phosphat-

und Suraminderivaten einzigartig (Bültmann et al., 1996b; Kim et al., 1998; Lambrecht et al., 1999, 2002). Analog zu dihydro-PPADS führt die Reduktion der Aldehydgruppe in eine Hydroxymethylgruppe zu einem dramatischen Wirkungsverlust sowohl an P2X<sub>1</sub> wie auch an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Vergleicht man die 3- bis 7-fach bzw. 39-fach schwächere Potenz des Monomeren Pyridoxal-5-phosphat an P2X<sub>1</sub> bzw. P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren und die Inaktivität des Suraminmonomeren an P2 Rezeptoren mit SB9, scheint die Heterodimerisierung bekannter Pharmakophore einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung selektiver P2 Rezeptor-Antagonisten darzustellen. In analoger Weise konnte ein deutlicher Anstieg der Affinität auch für die Kombination zweier weiterer Verbindungen, Acid blue 2 und MG02-2, zu Cibacron blue 3GA gezeigt werden (Tuluc et al., 1998).

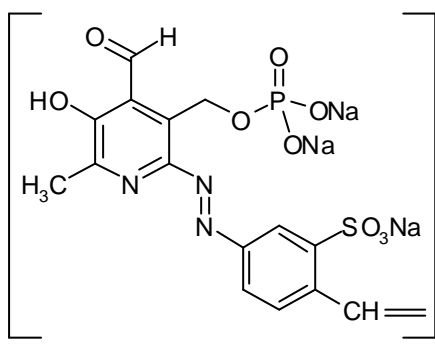




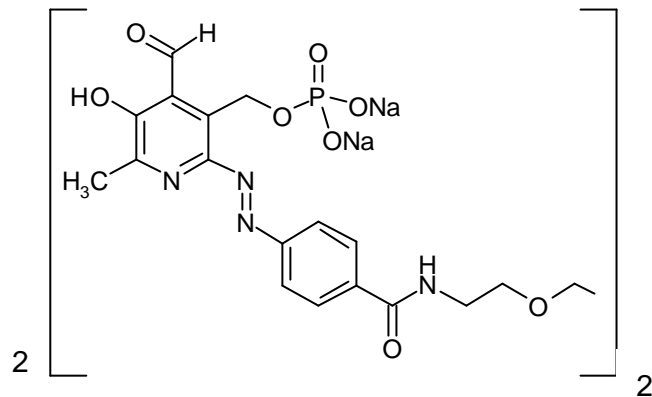
PPADS



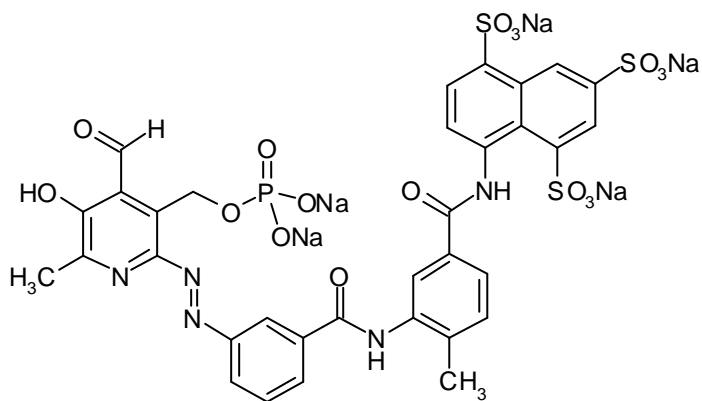
PPNDS



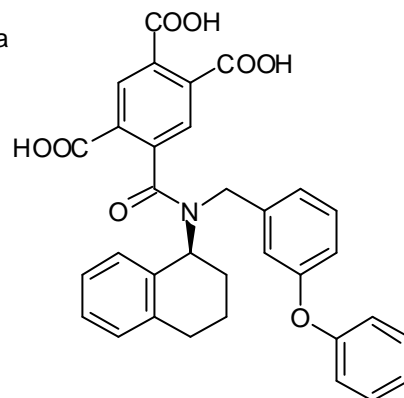
DIPS



CL-II



SB9



A-317491

Abb. 1.5: Chemische Strukturformeln der P2 Antagonisten TNP-ATP, A3P5P, MRS2179, Reactive blue 2/ Cibachron blue 3GA, Evans blue, Trypan blue, PPADS, PPNDS, DIPS, CL-II, SB und A-317491.



#### 1.3.2.4. Suramin und Analoga

1922 wurde das symmetrische, polysulfonierte **Suramin** (Abb. 4.1) zur Behandlung von Trypanosomenerkrankungen und Onchocerciasis eingeführt. Neuere, potentielle Einsatzgebiete sind die Behandlung von AIDS, Hepatitis B und Krebs. Suramin weist mit 44-92 Tagen eine außergewöhnlich lange Plasma-Halbwertszeit auf und zeigt eine starke Bindung an humanes Serumalbumin und Bindegewebsstrukturen, eventuell an Glykosaminoglykanhaltige Proteoglykane (Lambrecht et al., 2002). Dunn und Blakeley (1988) zeigten als Erste den P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonismus von Suramin auf. In vielen Folgestudien erwies sich Suramin als nicht kompetitiver, relativ schwacher Antagonist an nativen P2X und P2Y Rezeptoren ( $pA_2 \cong 5$  bis 5.5). Weiterhin ist Suramin für keinen der rekombinanten P2 Rezeptor-Subtypen selektiv. Es inhibiert homomere P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>5</sub> und heteromere P2X<sub>2/3</sub>, P2X<sub>1/5</sub> ( $IC_{50} = 1 - 15 \mu M$ ) und P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>11</sub> und P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren ( $pA_2 \cong 5.4 - 6.0$ ) in ähnlichem Ausmaß, wogegen es an homomeren P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>, heteromeren P2X<sub>4/6</sub> und P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> und P2Y<sub>6</sub> Rezeptoren unwirksam ist. Neben P2 Rezeptoren interagiert Suramin mit einer großen Anzahl anderer Proteine innerhalb der Konzentrationsbereiche, die auch für die Blockade von P2 Rezeptoren nötig sind. Dazu gehören Interleukin-, Glutamat-, Nikotin-, 5-HT- und GABA-Rezeptoren, verschiedene Proteasen, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-ATPasen, Ektonukleotidasen, G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor und reverse Transkriptase (Lambrecht et al., 2002). Suramin und seine Analoga wurden weiterhin als subtypselektive G-Protein-Inhibitoren beschrieben (Freissmuth et al., 1996, 1999). Aufgrund der hochpolaren Natur der Verbindungen sind sie aber nicht membranpermeabel. Daher kann eine Interaktion mit G-Proteinen bei Untersuchungen an ganzen Geweben oder intakten isolierten Zellen ausgeschlossen werden. Ergebnisse an Membranpräparationen sollten aber mit Vorsicht betrachtet werden. Aufgrund der oben genannten Eigenschaften eignet sich Suramin zur Charakterisierung von P2 Rezeptoren nur beschränkt.

Bei den zum Beginn meiner Arbeit untersuchten zahlreichen Suramin-Analoga scheint die Fähigkeit zur Blockade von P2 Rezeptor-Subtypen und zur Hemmung von Ektonukleotidasen von folgenden Parametern bestimmt zu werden (Lambrecht et al., 2002):

- der molekularen Größe der Verbindungen,
- der Position der Sulfonsäurereste in den Naphthalinringen,
- der Art und der Verknüpfungsweise der beiden aromatischen Phenylringe und
- der Struktur des zentralen Harnstoffes oder Diamid-Brücken.

Besonders zwei Suramin-Analoga, NF023 und NF279, erbrachten pharmakologische Fortschritte. **NF023** (Abb. 4.1) erwies sich als hochspezifischer, P2X<sub>1</sub> Rezeptor-selektiver Antagonist ( $pA_2 = 5.5 - 5.7$ ) (Bültmann et al., 1996b; Lambrecht et al., 1996, 2002). Native P2X<sub>3</sub> Rezeptoren wurden ebenso schwächer inhibiert ( $pA_2 = 4.45$ ) wie native P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ( $pA_2 = 4.74$ ) des Meerschweinchen-Ileum und Ektonukleotidasen. NF023 war an nativen P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>4</sub> Rezeptoren inaktiv. An rekombinanten Ratten-Rezeptoren konnte dies bestätigt werden ( $pIC_{50}$  Werte: P2X<sub>1</sub> = 6.62, P2X<sub>2</sub> < 4.3, P2X<sub>3</sub> = 5.1 und P2X<sub>4</sub> < 4.0 (Soto et al., 1999)). Interessanterweise inhibierte die Verbindung BSt101, ein unsymmetrisches NF023-Derivat, in dem die Sulfonsäuren an einem der beiden Naphthalinringe entfernt wurden, P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens, P2Y Rezeptoren der *Taenia coli* des Meerschweinchens und Ektonukleotidasen mit etwa gleicher Potenz wie NF023 (Bültmann et al., 1996b). Daher scheinen zwei Trisulfonsäuregruppen-tragende Naphthalinsysteme für den P2 Rezeptor-Antagonismus nicht essentiell zu sein.

Die Entdeckung von **NF279** (Abb. 4.53) durch Frau Dr. Susanne Damer in unserer Arbeitsgruppe stellte einen großen Fortschritt dar. NF279 inhibiert native P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens 6-fach potenter als NF023 ( $pIC_{50} = 5.71$ ) (Damer et al., 1998). In Experimenten an klonierten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, war der Antagonismus noch ausgeprägter ( $IC_{50} = 0.02 \mu M$ ) (Klapperstück et al., 2000; Rettinger et al.,

2000b). Es ergab sich die folgende Selektivitätsreihenfolge:  $P2X_1 > P2X_2$  ( $IC_{50} = 0.75 \mu M$ )  $\geq P2X_3$  ( $IC_{50} = 1.62 \mu M$ )  $\geq P2X_7 \gg P2X_4$  ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ). NF279 war an nativen  $P2Y_1$  Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum ( $pA_2 = 4.97$ ; Lambrecht et al., 1999) ähnlich schwach wirksam wie an rekombinanten  $P2Y_1$  Rezeptoren ( $pIC_{50} = 4.6$ ) und Ektonukleotidasen sowie inaktiv an rekombinanten  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  und  $P2Y_6$  Rezeptoren (Lambrecht et al., 2002). Neben der hohen P2 Rezeptor-Spezifität, stellt NF279 somit einen hochselektiven  $P2X_1$  Rezeptor-Antagonisten dar.

### 1.3.3. Radioliganden

Es gibt kontroverse Standpunkte für den Einsatz radioaktivmarkierter Agonisten wie z.B.  $[^3H]\alpha\beta meATP$ ,  $[^{35}S]ATP\gamma S$ ,  $[^{33}P]ATP$ ,  $[^{35}S]ATP\alpha S$ ,  $[^{35}S]ADP\beta S$ ,  $[^3H]2$ -methylthio ADP,  $[^3H]UTP$  oder  $[^3H]Ap_4A$  als Radioliganden zur Quantifizierung von  $P2X$  und  $P2Y$  Rezeptoren in Bindungsstudien. So wurden durch eine falsche Radioligand-Bindungsstudie irrtümlich  $p2y5$  und  $p2y7$  Rezeptoren als  $P2Y$  Rezeptoren identifiziert (Nicholas, 2001). Außerdem weisen  $P2$  Rezeptor-Agonisten in Bindungsexperimenten eine nanomolare Affinität auf, die im Kontrast zu der häufig schwachen Potenz in funktionellen Experimenten steht. Diese Diskrepanz reflektiert eventuell die Bindung des Agonisten mit hoher Affinität an die desensibilisierte Form des  $P2$  Rezeptors. Die radioaktiv markierten Nukleotide könnten aber auch an unbekannte, unspezifische Bindungsstellen der Membranpräparationen binden, die keine  $P2$  Rezeptoren darstellen (Yu et al., 1999). Daher ist es fraglich, ob überzeugende Daten aus Bindungsstudien erhalten werden können, solange keine hochaffinen  $P2$  Rezeptor-Antagonisten existieren, die als Radioliganden geeignet sind.

Vor kurzem wurde der  $P2Y_1$  Rezeptor-selektive Antagonist MRS2179 ( $N^6$ -methyl-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat) als  $[^{33}P]$ -markierter Radioligand eingeführt, der erfolgreich zur Markierung von  $P2Y_1$  Rezeptoren in humanen Thrombozyten ( $K_D = 110$  nM) eingesetzt werden konnte (Baurand et al., 2001). Die nicht-nukleotidische Verbindung  $[^3H]MRS2279$  stellt den Nachfolger des radioaktivmarkierten MRS2179 dar. In Bindungsexperimenten an humanen

P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren, transfiziert in der Insektenzelllinie Sf9, in CHO (chinese hamster ovary)-Zellen bzw. der menschlichen Astrozytomazelllinie 1321N1, resultierte ein K<sub>D</sub>-Wert von 7.8, 4.3 bzw. 8.4 nM. An nativen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren menschlicher Thrombozyten ergab sich ein durchschnittlicher K<sub>D</sub>-Wert von 23 nM (Waldo et al., 2002). Ob diese Radioliganden auch in komplexeren Geweben eingesetzt werden können, muss allerdings noch bewiesen werden. Auch ihre Spezifität und Selektivität ist noch ungenügend bekannt.

#### 1.4. Liganden an Ektonukleotidasen

Bis heute existiert lediglich ein ATP-Analogon, das eine gewisse Spezifität für Ektonukleotidasen über P2 Rezeptoren besitzt, die Verbindung **ARL67156** (Kennedy und Leff, 1995; Khakh et al., 1995; Westfall et al., 1996). Leider wurde diese Verbindung bisher nicht an rekombinanten, exakt definierten Ektonukleotidasen und P2 Rezeptor-Subtypen getestet, sondern lediglich an komplexen nativen Systemen untersucht.

Die 5'-Ektonukleotidase kann durch das Nukleotid-Analogon **abmeADP** inhibiert werden (Zimmermann, 2000).

#### 1.5. Therapeutisches Potential von Liganden der Nukleotidrezeptoren

Aufgrund der Tatsache, dass nur wenige stabile, potente und selektive P2X oder P2Y Liganden, die auch oral bioverfügbar sind, existieren, gibt es nur von wenigen P2 Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten in-vivo-Studien.

##### 1.5.1. P2X Rezeptoren

Obwohl P2X Rezeptoren mit einer großen Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, stellt momentan kein P2X Rezeptor ein Target in der klinischen Anwendung dar.

**Schmerz.** Nukleotide tragen wesentlich zur Schmerzentstehung bzw. dessen Weiterleitung bei. Sowohl periphere wie auch spinale Effekte konnten in

präklinischen Modellen nachgewiesen werden. Dabei scheinen P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren die verantwortlichen P2 Rezeptor-Subtypen darzustellen (Lambrecht, 2000). In Verhaltensstudien in vivo wie auch in elektrophysiologischen Experimenten konnten antinozizeptive Effekte der P2 Rezeptor-Antagonisten Suramin, Evans blue, Trypan blue, Reactive red 2, PPADS und TNP-ATP gezeigt werden, was die Beteiligung von P2 Rezeptoren an Schmerzentstehung und/oder –weiterleitung nahe legt. Weiter gestützt wird diese Theorie durch die Befunde an P2X<sub>3</sub> Rezeptor knock-out-Mäusen, die reduzierte nozizeptive Antworten auf die Gabe von exogenem ATP oder Formalin verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigten (Vlaskovska et al., 2001). Daher könnten P2X<sub>3</sub> und/oder P2X<sub>2/3</sub> Rezeptor-Antagonisten als neue Art von Schmerzmitteln mit innovativem Wirkmechanismus dienen.

**Pulmonale Vasokonstriktion und essentielle Hypertension.** ATP wird in sympathischen Neuronen mit Noradrenalin kosezerniert und löst so eine Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen aus, die in einer großen Vielzahl an Gefäßpräparationen durch  $\alpha\beta$ meATP-sensitive P2X<sub>1</sub> Rezeptoren vermittelt zu sein scheint. In-vivo-Untersuchungen wurden mit Suramin, NF023 und PPADS durchgeführt (Lambrecht, 2000). In spontan hypertensiven Ratten wurde eine signifikant größere Rolle für ATP verglichen mit Noradrenalin festgestellt. Wenn diese Befunde auf den Menschen übertragen werden können, stellen P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten interessante neue Therapeutika gegen pulmonale Vasokonstriktion oder essentielle Hypertonie dar. Der nicht-selektive Agonist Diadenosintetraphosphat wurde bereits erfolgreich in der kontrollierten Blutdrucksenkung während der Narkose eingesetzt (Kikuta et al., 1999).

**Blaseninkontinenz.** Über Aktivierung von muskarinergen M<sub>3</sub> und P2X<sub>1</sub> Rezeptoren und damit Kontraktion des Detrusor-Muskels, ahmen Acetylcholin und ATP die Effekte der parasympathischen Blasen-Innervierung nach (Ralevic und Burnstock, 1998; Lambrecht, 2000). Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass die purinerge Komponente im Zuge des Alterns und bei den Erkrankungsformen Interstitielle Zystitis und Neurogene Blase ansteigt. Dies

würde auch das schwache Ansprechen einer Anzahl von Patienten mit Detrusor-Instabilität auf Antimuskarinika erklären. Daher könnten P2X Rezeptor-Antagonisten, eventuell in Kombination mit M<sub>3</sub> selektiven Antimuskarinika, für die Therapie von Blaseninkontinenz geeignet sein.

**Männliche Kontrazeption.** Es konnte an männlichen P2X<sub>1</sub> Rezeptor knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass aufgrund der reduzierten Kontraktion des Vas deferens nach sympathischer Stimulation bei gleichbleibender Kopulationsfähigkeit die Fertilität um 90 % gesenkt wurde (Mulryan et al., 2000). Selektive P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten repräsentieren somit eventuell eine neue Form der männlichen Kontrazeption.

P2X Rezeptoren stellen weitere interessante therapeutische Ziele in Bezug auf Epilepsie, Entzündung, Psoriasis, Wundheilung, Restenosis, Sklerodermie und Basalzell-Karzinome dar (Lambrecht et al., 2002).

**Osteoporose.** In einer Anzahl von Studien konnten verschiedenen P2X und P2Y Rezeptoren auf Osteoklasten und Osteoblasten nachgewiesen werden (Hoebertz et al., 2001). Betrachtet man die Struktur des aktiven Metaboliten von Clodronat, einem Mitglied aus der Gruppe der Bisphosphonate, die weite klinische Anwendung bei der Paget'schen Krankheit und Osteoporose gefunden haben, ist die Beteiligung von P2X oder P2Y Rezeptor-Subtypen auf Osteoklasten für den Wirkmechanismus mehr als wahrscheinlich. So wurde für den Metaboliten  $\beta\gamma$ -Dichloromethylen-ATP bereits ein voller Agonismus an P2X Rezeptoren der Ohrarterie von Kaninchen sowie das Auslösen von Osteoklastenzelltod nach Induktion von Apoptose nachgewiesen. Daher existiert die Möglichkeit, Bisphosphonate zu entwickeln, die zu potenten und selektiven P2 Rezeptor-Agonisten oder -Antagonisten metabolisiert werden. Diese könnten dann wiederum selektiv Funktionen von Osteoklasten und/oder Osteoblasten modulieren. Solche Verbindungen würden für die Therapie von Osteoporose, Entzündungserkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis und Periodontitis, Tumor-induzierter Osteolyse und Osteopenie von erheblichem Nutzen sein (Lambrecht et al., 2002).

### 1.5.2. P2Y Rezeptoren

**Thrombozyten-Aggregationshemmung.** Momentan stellt allein der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor einen Angriffspunkt im klinischen Alltag dar. Die Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel hemmen spezifisch und potent die ADP-induzierte, P2Y<sub>12</sub>-vermittelte Thrombozyten-Aggregation. Beide Verbindungen werden dazu zunächst zum jeweiligen aktiven Metaboliten metabolisiert, der irreversibel über Disulfid-Brücken den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor blockiert (Gachet, 2000). Die chirale Verbindung, als S-Isomeres verwendet, wird prophylaktisch gegen atherosklerotische Vorfälle nach Schlaganfall, Herzinfarkt oder weiteren peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten eingesetzt. 1996 wurde in der CAPRIE Studie die Überlegenheit der Langzeitprophylaxe mit Clopidogrel im Vergleich zu Aspirin bezogen auf Herzinfarkt, Schlaganfall und Gefäßerkrankungen gezeigt (Gachet, 2000). Inzwischen wurden ATP Analoga synthetisiert, die keinen Metabolismus benötigen, sondern per se bereits aktiv sind. Dies sind die AR-C-Verbindungen, deren bekanntester Vertreter, AR-C69931MX, ein potenter und kompetitiver P2Y<sub>12</sub> Rezeptor-Antagonist ist (Guile et al., 2001), der die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, -aggregation und die Sekretion aus intrazellulären Granula inhibiert. Phase-II-Studien zeigen, dass Patienten mit akuten Koronarsymptomen die intravenöse Gabe dieser Verbindung gut tolerieren, sowie deutlich von dem schnellen Wirkungseintritt und der schnellen steady-state Hemmung der Thrombozyten-Aggregation mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten profitieren (Lambrecht et al. 2002).

**Chronische Bronchitis, Zystische Fibrose, Trockenes Auge, Retinaablösung.** ATP und UTP stimulieren über Aktivierung von P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren die Mucus- bzw. Tränen-Sekretion, erleichtern die mukoziliäre Reinigung, steuern die Zilienschlagfrequenz und modulieren Entzündungsvorgänge, die mit der Infiltration von Makrophagen einhergehen (Jacobson et al., 2002). Die Gabe von UTP wurde in kontrollierten klinischen Studien ATP vorgezogen, da aus UTP keine kardiovaskulär aktiven Metaboliten, wie z.B. Adenosin, entstehen können. In Tierversuchen und kontrollierten klinischen Studien wurden P2Y<sub>2</sub>-selektive Agonisten der zweiten

Generation, wie z.B. die enzymatisch stabile Verbindung INS365, als Therapeutika für die oben genannten Erkrankungen eingesetzt. Die Gabe von INS365 war unbedenklich und wurde gut vertragen. Es werden derzeit Phase-III-Studien im Rahmen der klinischen Prüfung durchgeführt (Lambrech et al., 2002).

**Neurodegenerative Erkrankungen.** Es gibt in Originalarbeiten und durch Patientenberichte Hinweise für den Einsatz von P2Y<sub>1</sub> Liganden bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose, bei Asthma, bei Allergien oder bei Diabetes. Die Veröffentlichung klinischer Studien blieb aber bisher aus (Lambrech et al., 2002).





## **2. Problemstellung und Ziel der Arbeit**

Die Untergliederung der P2 Rezeptoren in verschiedene Familien und Subtypen basierte in der Vergangenheit fast ausschließlich auf der Reihenfolge steigender agonistischer Potenz von Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden (Ralevic und Burnstock, 1998). Die daraus resultierenden Probleme sind für das P2 Rezeptor-Feld von großer Relevanz. Fehler können leicht resultieren, da viele Nukleotide mehr oder weniger metabolisch instabil sind und durch zellständige Ektonukleotidasen abgebaut werden können, woraus nicht nur eine reduzierte Potenz resultieren kann, sondern möglicherweise Interaktionen mit P1 Rezeptoren über die Bildung von Adenosin auftreten können (Fagura et al., 2000). Zusätzlich bauen Ektonukleosid-Diphosphokinasen Dinukleotide zu Trinukleotiden auf, was bei Untersuchungen mittels ADP oder UDP zu Missinterpretationen führen kann. Durch Freisetzung endogener Agonisten können indirekte Effekte hinzukommen, wie beispielsweise die Stimulation weiterer Rezeptoren. Endogene Nukleotide können auch als Phosphatquelle für diverse enzymatische Reaktionen dienen. Chemische Instabilität und eventuelle Kontamination mit Nukleotiden in kommerziellen Nukleotidquellen (z.B. ADP in ATP oder UDP in UTP) können weitere irreführende Effekte der vermeintlich beobachteten Agonistenaktivität und –selektivität an P2 Rezeptor-Subtypen hervorrufen (Fagura et al., 2000). Die heute bekannten Agonisten sind nicht selektiv für einen bestimmten Rezeptorsubtyp. P2 Rezeptor-Heterogenität in ein- und derselben Zelle oder im Gewebe, ebenso wie Desensibilisierung und Herabregulation der P2 Rezeptor-vermittelten Antworten durch die Freisetzung endogener Nukleotide können ebenso zu potentiellen Problemen führen wie Speziesunterschiede, die sowohl für Agonisten wie auch für Antagonisten deutlich werden können (Hibell et al., 2001a,b). Bisher ist nicht genau bekannt, wie die Eigenschaften der einzelnen P2X Untereinheiten den Phänotyp der heteromeren Kanäle beeinflussen. Die einzigartige Kombination an Eigenschaften, die durch Heteroassemblierung erzielt werden kann, stellt möglicherweise eine neue Ebene der physiologischen und pathophysiologischen Kontrolle dar, die noch weiterer Aufklärung bedarf. Die Heterogenität der P2X Rezeptoren wird noch durch alternative Splice-Formen erweitert (Mackenzie et al., 1999; Lambrecht, 2000; Greco et al., 2001).

Immunozytochemische Studien weisen darauf hin, dass Zellpopulationen in einer Vielzahl von Geweben multiple P2X Protein-Untereinheiten koexprimieren. Weiterhin wird die Zeit klären, ob P2X Rezeptoren ebenfalls Polymorphismen von pharmakologischer Relevanz aufweisen. Die überlappende Expression der unterschiedlichen P2X Rezeptoruntereinheiten wirft die Frage nach der Zusammensetzung und Stöchiometrie nativer P2X Rezeptoren auf. Weiterhin ist die Identifizierung von Speziesunterschieden der P2 Rezeptor-Pharmakologie von großer Bedeutung für die Entwicklung von P2-subtypselektiven Liganden in der Arzneistoffforschung (Jones et al., 2000; Hibell et al., 2001b).

Eine der größten Herausforderungen in der P2 Rezeptorforschung ist es heute, die physiologischen Reaktionen über native P2 Rezeptoren den jeweiligen Eigenschaften rekombinanter Rezeptoren zuordnen zu können. Es gibt in der Tat eine Reihe nativer P2 Rezeptor-Phänotypen, die bis heute kein exaktes Korrelat unter den rekombinanten homo- oder heteromeren P2X Kanälen oder P2Y Rezeptoren haben. Auch wenn die Generierung von knock-out-Mäusen einen bedeutenden Durchbruch darstellt und diese Technologie weitere Fortschritte zur Aufklärung der Relation nativer Phänotypen zu den klonierten P2 Rezeptor-Subtypen bringen wird, ist die Entwicklung subtypselektiver und potenter Antagonisten nach wie vor von entscheidender Bedeutung. Die schleppende Entwicklung dieser Verbindungen stellt einen wichtigen Hinderungsgrund für die Aufklärung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge dar. Auch wenn bereits eine Reihe von erfolgsversprechenden Verbindungen wie beispielsweise Suramin-Derivate, verschiedene Farbstoffe, PPADS, MRS2179, MRS2279, Ip<sub>5</sub>I und TNP-ATP entwickelt und untersucht wurden, ist keine davon ideal (Lambrecht et al., 2002). Die Nachteile dieser Verbindungen liegen in einem irreversiblen Antagonismus oder der mangelnden Potenz, Subtypselektivität und P2 Rezeptor-Spezifität. Die Fähigkeit zur Hemmung von Ektonukleotidasen und damit Schutz der metabolisch instabilen Nukleotide vor enzymatischem Abbau kompliziert ihren Einsatz weiter (Kennedy und Leff, 1995). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass ein anhaltender Bedarf an Antagonisten existiert, die frei von den Defiziten vorangegangener P2

Rezeptor-Antagonisten sind. Die Forschung in unserem Labor, die sich nun seit etwas über einer Dekade auf P2 Rezeptoren fokussiert, widmet sich der Entdeckung potenter, kompetitiver und subtypselektiver P2 Rezeptor-Antagonisten mit dem Ziel, potentielle Arzneistoffe für die Modulation von P2 Rezeptor-vermittelten Vorgängen zu entwickeln. In diesem Bereich ist meine Dissertation angesiedelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ausgewählter Suramin-Analoga, potente, kompetitive und subtypselektive P2 Rezeptor-Antagonisten zu entwickeln. Dazu wurden zunächst strukturelle Variationen von Suramin-, NF279- und NF023- Analoga im zentralen Harnstoff, an den überbrückenden Phenylringen und den terminalen Aminonaphthalinringen durchgeführt. Die weitere Entwicklung führte zu 'Schmetterling'-Verbindungen, d.h. Strukturen, die 4 identische, symmetrische, terminale Reste beinhalten. Die folgenden isolierten Organe bzw. Zellen wurden zu diesem Zweck als pharmakologische Modelle ausgewählt (Braun et al., 2001):

- Prostatistische Segmente des Ratten-Vas-deferens (P2X<sub>1</sub> Rezeptoren; Khakh et al., 1994),
- Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2X<sub>3</sub> Rezeptoren; Czeche et al., 1998a, b),
- Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren; Kennedy und Humphrey, 1994),
- *Xenopus laevis* Oozyten (Ektonukleotidasen; Ziganshin et al., 1995).

Unter all den untersuchten Strukturen stellt eine Verbindung, NF449, durch ihre außergewöhnliche antagonistische Potenz und Selektivität an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren den Höhepunkt unserer bisherigen Forschung dar. Diese Substanz wurde daher einer detaillierten pharmakologischen Prüfung unterzogen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Aufklärung der Differenz der antagonistischen Potenz von P2 Rezeptor-Antagonisten an isolierten komplexen Geweben im Vergleich zu rekombinanten Rezeptoren, exprimiert in

einfachen Zellsystemen ohne kinetische Barrieren. Dazu wurde ein weiteres Modell in unserem Labor etabliert, das eine Schnittstelle zwischen rekombinanten Rezeptoren und nativen Geweben darstellt.

- Humane Thrombozyten (P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren; Rolf und Mahaut-Smith, 2002).

Diese enthalten endogen u.a. native P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, vergleichbar mit nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens, stellen aber andererseits ein Zellsystem dar, dessen Rezeptoren ebenso leicht zugänglich sind, wie die rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert werden.



### **3. Material und Methoden**



### 3.1. Material

#### 3.1.1. Substanzen

##### 3.1.1.1. Kommerziell erhältliche Substanzen

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

2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin (CCPA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Acetylsalicylsäure (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland)

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

Adenosin-5'-O-(2-thiodisulfat)-Dilithiumsalz (ADP $\beta$ S; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Ammoniummolybdat-Tetrahydrat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Apamin (Alomone labs, Jerusalem, Israel)

Apyrase Typ VII (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Atropinsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Carbamoylcholinchlorid (Carbachol; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck, Darmstadt, Deutschland)

Ethylenglycol-bis ( $\beta$ -aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure-Acetat (EGTA; Merck, Darmstadt, Deutschland)

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

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

Hexokinase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Histamindihydrochlorid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Indomethacin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

L-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

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

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

N<sup>6</sup>-Methyl-2'-deoxyadenosin-2',5'-biphosphat (MRS2179; Tocris, Köln, Deutschland)

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

Physostigmin krist. (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Suramin (Germanin<sup>®</sup>; Bayer, Leverkusen, Deutschland)

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

Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

### 3.1.1.2. Zur Verfügung gestellte Substanzen

Arecaidinpropargylsäureester-Hydrobromid (APE; synthetisiert von Herrn Dr. U. Moser und Frau U. Hermanni, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Deutschland).

SB-Substanzen und Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS; synthetisiert von Herrn Dr. H. G. Bäumert und Mitarbeitern, Institut für Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main, Deutschland).

Alle NF-Substanzen sowie ANTS, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden von Herrn Prof. Dr. P. Nickel und Mitarbeitern synthetisiert, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Bonn, Bonn, Deutschland).

### 3.1.2. Herstellung von Stammlösungen

Die Testsubstanzen wurden im Allgemeinen in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0.9% m/v) gelöst und verdünnt. Indomethacin-Stammlösungen wurden in 96%-igem Ethanol hergestellt. Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen wurden in wasserfreiem DMSO hergestellt. Es wurde in allen Fällen experimentell ausgeschlossen, dass die höchste Lösungsmittelkonzentration allein einen pharmakologischen Effekt auf die Versuche ausübt.

### 3.1.3. Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden mit handelsüblichen Chemikalien (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit dem Reinheitsgrad 'zur Analyse' hergestellt.

#### Organ-abhängige Zusätze:

**Vas deferens:** Zugabe von 6  $\mu$ M Indomethacin um die Bildung von Prostaglandinen durch Blockade der Cyclooxygenase zu hemmen (Khakh et al., 1994).

**Meerschweinchen-Ileum:** In den Versuchen zur Untersuchung des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors wurde 300 nM Atropin zugegeben, um postsynaptische muskarinerge M<sub>3</sub> Rezeptoren zu blockieren (Lambrecht et al., 1999).

**Meerschweinchen-Ileum:** Für die Versuche am P2X<sub>3</sub> Rezeptor wurde der Nährlösung 70 nM Physostigmin zugesetzt, um durch Hemmung der Acetylcholinesterasen den Abbau von Acetylcholin zu vermindern und dadurch die Acetylcholin-vermittelten Kontraktionen zu verstärken (Lambrecht et al., 1999).

**Humane Thrombozyten:** Um Desensibilisierung der P2 Rezeptoren durch endogen freigesetzte Nukleotide zu vermeiden, wurden dem Puffer 0.32 U/ml Apyrase (Typ VII) zugesetzt (Rolf und Mahaut-Smith, 2002).

*Tabelle 3.1: Pufferzusammensetzung für die pharmakologischen Experimente am Ratten-Vas-deferens (ratVD), Meerschweinchen-Ileum (guinea-pig ileum, GPI) und humanen Thrombozyten sowie für Studien zum ATP-Abbau durch Ektonukleotidasen (EktoN) von Xenopus laevis Oozyten (XLO; Puffer I diente der Lagerung, Puffer II den Experimenten an XLO).*

	Konzentration (mM) der Pufferkomponenten							
	RatVD	GPI				XLO I (Lag.)	XLO II (Exp.)	Thrombo- zyten
	Modell P2X <sub>1</sub>	Modell P2X <sub>3</sub>	Modell P2Y <sub>1</sub>	Modell A <sub>1</sub>	Modell M <sub>3</sub> /H <sub>1</sub>	EktoN		Modell P2X <sub>1</sub> / P2Y <sub>1</sub>
CaCl <sub>2</sub>	1.3	1.3	1.3	1.0	1.8	1.0	1.8	
KCl	4.7	4.7	4.7	4.7	2.7	1.0	2.5	5.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	1.2	1.2	1.2				
MgCl <sub>2</sub>					1.05	1.0	1.8	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.6	0.6	0.6	0.6				
NaCl	118.0	118.0	118.0	118.0	137.0	90.0	110.0	145.0
NaHCO <sub>3</sub>	25.0	25.0	25.0	25.0	11.9			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>					0.42			
HEPES						5.0	5.0	10.0
Glukose	11.1	11.1	11.1	11.1	5.6			10.0
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4 (NaOH)	7.4 (NaOH)	7.35 (NaOH)

#### Antikoagulans-Lösung für die Blutabnahme

78.0 mM Zitronensäure

85.0 mM Tri-Natriumcitrat

111.0 mM Glucose

#### **3.1.4. Tiere**

Alle Versuchstiere waren in einem klimatisierten Tierstall bei einer Raumtemperatur von 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % untergebracht. Ein konstanter Hell-Dunkel-Rhythmus wurde durch künstliche Beleuchtung von jeweils 12 Stunden gewährleistet.

Männliche Dunkin-Hartley-Meerschweinchen (250 - 450 g Körpergewicht) und Sprague-Dawley-Ratten (250 - 350 g Körpergewicht) wurden von Harlan Winkelmann, Borken, Deutschland bezogen. Die Meerschweinchen erhielten Altromin® 3022 Standard-Diät, die Ratten erhielten Altromin® 1324 Standard-Diät, und beiden stand Wasser ad libitum zur Verfügung.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Isoliertes Vas deferens der Ratte

#### 3.2.1.1. Modell des P2X<sub>1</sub> Rezeptors

**Präparation.** Sprague-Dawley-Ratten wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub>, anschließender Dekapitation mittels Guillotine und Ausbluten getötet. Nach der Methode von Khakh (Khakh et al., 1994) wurde der Bauchraum geöffnet, die Vasa deferentia beginnend am Epididymis bis hin zur Prostata zügig herausgeschnitten und in eine Präparierschale überführt, die mit Indomethacin-haltigem Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7.4, 37°C, Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1) gefüllt und begast (Carbogen = 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) wurde. Dort wurden die Samenleiter sorgfältig von umgebendem Gewebe befreit. Die Samenleiter wurden durch Schnitt an der Übergangsstelle zwischen dem dickeren prostatistischen Segment und dem dünneren epididymalen Segment halbiert, d.h. pro Tier standen 2 prostatistische Segmente zur Verfügung. Diese wurden jeweils separat in 37°C warme, Puffer gefüllte und begaste 6-ml-Organbäder überführt. In den Organbädern wurden die Segmente an einem Organhalter vertikal zwischen dem Boden der Organbäder und isometrischen Aufnehmern (TF6V5, W. Fleck, Mainz, Deutschland) oberhalb der Organbäder mit Baumwollgarn fixiert und für die Dauer der Versuche unter eine Vorlast von 750 mg gebracht. Nach 1 Stunde Equilibrierungszeit und Austausch der Badflüssigkeit mit frischem Puffer alle 15 Minuten, wurden isometrische Kontraktionen ausgelöst, die mit Hilfe eines DMS DC-Verstärker (W. Fleck,

Mainz, Deutschland) auf einem Rikadenki-Schreiber (Hellige, Freiburg, Deutschland) registriert wurden.

**Allgemeine Bedingungen.** Zunächst wurden wiederholt Kontraktionen durch Einzelgaben von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  im Abstand von 15 (1  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ) bzw. 30 (10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ) Minuten ausgelöst, bis das Ausmaß der Kontraktion konstant blieb (Konditionierung). Der 15- bzw. 30-minütige Abstand zwischen den Einzelgaben wurde gewählt, um Desensibilisierungseffekte auszuschließen. Sobald das Maximum der Kontraktion erreicht war, wurde sofort gespült (durchschnittlich nach ca. 10-20 Sekunden). Der Spülrhythmus betrug in allen Experimenten 15 Minuten. Während der Inkubation von Antagonisten wurden diese unmittelbar nach jedem Spülvorgang erneut zugesetzt. Ein Organ diente in jedem Versuch als Kontrolle, um eventuelle zeitabhängige Veränderungen in der Reaktion auf  $\alpha\beta\text{meATP}$  aufzuzeigen. Am Ende des Versuches wurden die einzelnen Versuchsaapparaturen mittels verschiedener Gewichte geeicht, um den auf dem Schreiber markierten Kurvenverläufen in Zentimetern die jeweiligen Milligramm Zug zuordnen zu können. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Experimente mindestens dreimal an verschiedenen Versuchstierpräparationen durchgeführt.

**Screening-Daten.** Nach erfolgter Equilibrierung und Konditionierung der Organe wurden die Antagonisten (10  $\mu\text{M}$ ) unmittelbar nach der letzten Agonistengabe (10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ) dem Organbad zugesetzt und für mindestens 60 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde analog zur Referenz die gleiche Agonistenkonzentration zugegeben. Nach einer Auswaschphase von mindestens 60 Minuten und erneut konstanten Kontraktionen wurde die gleiche Konzentration eines anderen Antagonisten untersucht. Die antagonistische Stärke wurde ermittelt, indem die Inkubationskontraktion durch 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  in Anwesenheit der Testsubstanz auf die Referenzkontraktion in Abwesenheit der Testsubstanz am gleichen Organ normalisiert wurde. Die Hemmung wurde nach folgender Gleichung (3.1) errechnet:

$$\% \text{Hemmung} = 100 - \left( \frac{100 \cdot E_v}{E_c} \right) \quad (3.1)$$

$E_v$  = Ausmaß der Inkubationskontraktion

$E_c$  = Ausmaß der Referenzkontraktion

**Hemmkurven.** Nach erfolgter Equilibrierung und Konditionierung der Organe wurden unterschiedliche Antagonistenkonzentrationen unmittelbar nach der letzten Agonistengabe (1 bzw. 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ) (Referenzkontraktion) den verschiedenen Organbädern zugesetzt und für mindesten 60 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde analog zur Referenz die gleiche Agonistenkonzentration zugegeben (Inkubationskontraktion). Nach einer Auswaschphase von mindestens 60 Minuten und erneut konstanten Kontraktionen wurde eine um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Konzentration des gleichen Antagonisten untersucht. Um die Hemmwirkung der Antagonisten zu ermitteln, wurden  $\text{pIC}_{50}$ -Werte ( $\text{IC}_{50}$  = 50%-ige Hemmung der durch 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  hervorgerufenen Kontraktion;  $\text{pIC}_{50} = -\log \text{IC}_{50}$ ) aus der nichtlinearen Regression der Konzentrations-Hemm-Kurven (halblogarithmisch:  $\log_{10}$  Antagonistenkonzentration versus % Hemmung) abgelesen. Dazu wurde zunächst die prozentuale Hemmung jeder Antagonistenkonzentration bezogen auf die Referenzkontraktion ermittelt. Die nichtlineare Regression wurde durch Analyse der gemittelten normalisierten Einzeldaten unter Anwendung der logistischen 4-Parameter-Funktion (3.2) nach Parker und Waud (1971) mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism (Graphpad Software inc. 1996) ermittelt.

$$E_A = E_{\max} \cdot \frac{[A]^p}{[A]^p + EC_{50}^p} \quad (3.2)$$

- $E_A$  = Effekt bei einer bestimmten Konzentration [A] des Agonisten  
 $E_{\max}$  = maximal erreichbarer Effekt  
[A] = Konzentration des Agonisten  
 $p$  = Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve  
 $EC_{50}$  = Konzentration des Agonisten, die zur Auslösung eines halbmaximalen Effektes erforderlich ist

**Dosis-Wirkungs-Kurven.** Zur Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) wurden durch Einzelgabe steigende Konzentrationen von  $\alpha\beta$ meATP in das gleiche Organbad gegeben. Dabei wurden konzentrationsabhängig unterschiedliche Abstände zwischen den Agonistengaben gewählt, um eine vollständige Resensibilisierung des Organs vor Gabe der nächsten Agonistenkonzentration zu gewährleisten.

*Tabelle 3.2: Zeitabstände zwischen den Agonistengaben für die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven an prostatichen Segmenten des Vas deferens.*

Konzentration	0.1 $\mu$ M bis 10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	300 $\mu$ M (nur bei Inkubationskurven)
Zeitabstand	alle 15 min	30 min	45 min	60 min	

Nach Gabe der höchsten Agonistenkonzentration (100  $\mu$ M für die Referenzkurve) wurde der Antagonist für 60 Minuten inkubiert. Dann wurde erneut eine DWK am gleichen Organ, nun in Anwesenheit des vorinkubierten Antagonisten, bis zur höchsten eingesetzten Agonistenkonzentration von 300  $\mu$ M erstellt. Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden zunächst innerhalb der Einzelversuche die Kontraktionen sowohl in Ab- wie auch in Anwesenheit des Antagonisten auf die Kontraktion nach der höchsten



Agonistengabe der Referenzkurve normalisiert (100  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ). Anschließend wurde die aus den Mittelwerten der summierten Einzelversuche resultierende DWK mittels einer 4-Parameter-Gleichung, basierend auf der logistischen Funktion von Parker und Waud, dargestellt (siehe Gleichung 3.2). Dabei wurde  $\log_{10}$  Agonistenkonzentration gegen % der Kontrolle aufgetragen. Agonist-Konzentrations-Verhältnisse (DR = dose-ratio) wurden auf einem Niveau abgelesen, bei dem die Kurven parallel erschienen (bei 15 % Effekt =  $\text{EC}_{15}$ ), da DWK von  $\alpha\beta\text{meATP}$  am Vas deferens der Ratte kein klar definierbares Maximumplateau erreichen. DWK in Anwesenheit des Antagonisten versteilen sich (siehe Kapitel 4.6.2.), daher ist das Ablesen der DR auf dem  $\text{EC}_{50}$ -Niveau nicht sinnvoll. Die inhibitorische Potenz der Antagonisten wurde über eine lineare Regression nach Arunlakshana und Schild (3.3); 1959) sowie Tallarida und Murray (1986) quantifiziert.

$$\log(\text{DR} - 1) = m pA_x - \log K_D \quad (3.3)$$

- m = Steigung der Regressionsgeraden  
 $pA_x$  = negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration  
 $K_D$  = Dissoziationskonstante des Antagonisten  
 DR = 'dose ratio' = Quotient der  $\text{EC}_{50}$ -Werte des Standardagonisten in An- und Abwesenheit des zu untersuchenden Antagonisten (am Vas deferens der Ratte wurde die DR auf dem 15 %-Niveau abgelesen)

Der Antagonismus wurde als rein kompetitiv betrachtet, wenn die DWK der Agonisten parallel nach rechts verschoben wurden und die Steigung der Regressionsgeraden im Arunlakshana-Schild-Plot nicht signifikant von dem für einen kompetitiven Antagonisten zu fordernden theoretischen Wert von 1.0 abwich. War dies der Fall, wurde der  $pA_2$ -Wert (=  $-\log K_D$ ) des Antagonisten als Abszissenabschnitt der Regressionsgerade mit einer Steigung von 1 abgelesen.

### 3.2.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum

#### 3.2.2.1. Modell des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors

**Präparation.** Dunkin-Hartley-Meerschweinchen wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub>, anschließender Dekapitation mittels Guillotine und Ausbluten getötet. Nach der Methode von Kennedy und Humphrey (1994) wurde der Bauchraum geöffnet und ausgehend vom Caecum die ersten fünf bis zehn Zentimeter des Ileum vorsichtig vom umgebenden Mesenterium befreit. Daraufhin wurde mit gleichbleibendem Zug das Ileum vertikal aus dem Bauchraum gezogen, wobei das umgebende Gekröse abriss. Das Ileum wurde sofort in einen mit Atropin versetzten, 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7.4, 37°C, Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1) gefülltes Becherglas überführt. Mit Hilfe eines mit Puffer-getränkten Wattebausches wurde das Ileum auf eine 1-ml-Pipette aufgezogen und ständig feucht gehalten. Mit einem Skalpell wurde ein horizontaler Schnitt entlang des Ileum gezogen, so dass die nun aufgeschnittene Longitudinalmuskulatur mittels des Puffer-getränkten Wattebausches abgezogen werden konnte. Die Muskulatur wurde in eine Puffer-gefüllte, Carbogen-begaste Präparierschale überführt und dort zu ca. 1.5 cm langen Segmenten zugeschnitten, die jeweils mit dem einen Ende an einem Organhalter fixiert wurden. Diese wurden in ein auf 37°C temperiertes, mit Puffer gefülltes 6-ml-Organbad überführt, das während des ganzen Versuches mit Carbogen begast wurde. In den Organbädern wurde das andere Ende der Segmente mit Baumwollgarn vertikal an isometrischen Aufnehmern (TF6V5, W. Fleck, Mainz, Deutschland) oberhalb der Organbäder fixiert und unter eine Vorspannung von 1000 mg gesetzt. Nach 1 Stunde Equilibrierungszeit und Austausch der Badflüssigkeit mit frischem Puffer alle 15 Minuten wurden isometrische Kontraktionen ausgelöst, die über einen DMS DC-Verstärker (W. Fleck, Mainz, Deutschland) zur Aufzeichnung an einen Rikadenki-Schreiber (Hellige, Freiburg, Deutschland) weitergeleitet wurden.

**Allgemeine Bedingungen.** Zunächst wurden die Organe mit der Maximalkonzentration von 100 µM ADPβS zur vollständigen Kontraktion

gebracht (Priming). Nach einer weiteren Stunde Equilibrierungszeit wurden die Organe durch wiederholte Kontraktion mittels Einzelgaben von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$  im Abstand von 15 Minuten konditioniert, bis das Ausmaß der Kontraktionen konstant blieb. Der 15-minütige Abstand zwischen den Einzelgaben war ausreichend um Desensibilisierungseffekte auszuschließen. Sobald das Maximum der Kontraktion erreicht war, wurde sofort gespült (durchschnittlich nach ca. 20 Sekunden). Der Spülrhythmus betrug in allen Experimenten 15 Minuten. Während der Inkubation wurden die Antagonisten unmittelbar nach jedem Spülvorgang erneut zugesetzt. Ein Organ diente in jedem Versuch als Kontrolle, um eventuelle zeitabhängige Veränderungen in der Reaktion auf ADP $\beta\text{S}$  aufzuzeigen.

**Screening-Daten.** Das Versuchsprotokoll entsprach dem bei den Experimenten am Vas deferens der Ratte (siehe 3.2.1.1.) unter Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$  als Agonist.

**Hemmkurven.** Die Experimente erfolgten analog zu denen am Vas deferens der Ratte (siehe 3.2.1.1.) unter Verwendung von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$  als Agonist.

**Dosis-Wirkungs-Kurven.** Zur Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) wurden alle 15 Minuten durch Einzelgabe steigende Konzentrationen von ADP $\beta\text{S}$  in das Organbad gegeben. Im Gegensatz zum Vas deferens der Ratte reichten hier 15 Minuten aus, um Desensibilisierungseffekte an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren zu vermeiden. Nach Gabe der höchsten Agonistenkonzentration wurden die Antagonisten für 60 Minuten inkubiert. Dann wurde erneut eine DWK am gleichen Organ, nun in Anwesenheit des vorinkubierten Antagonisten, bis zur höchsten eingesetzten Agonistenkonzentration von 300  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Bei der Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden zunächst innerhalb der Einzelversuche die Kontraktionen sowohl in Ab- wie auch in Anwesenheit des Antagonisten auf die Kontraktion nach der höchsten Agonistengabe der Referenzkurve normalisiert (100  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$ ). Anschließend wurde die aus den Mittelwerten der summierten Einzelversuche resultierende

DWK mittels einer 4-Parameter-Gleichung, basierend auf der logistischen Funktion von Parker und Waud (1971), dargestellt (siehe 3.2.1.1.; Gleichung (3.2)). Dabei wurde  $\log_{10}$  Agonistenkonzentration gegen % der Kontrolle aufgetragen. Agonist-Konzentrations-Verhältnisse (DR = dose-ratio) wurden auf Höhe der  $EC_{50}$ , das heißt dem halbmaximalen Effekt abgelesen. Die inhibitorische Potenz der Antagonisten wurde über eine lineare Regression nach Arunlakshana und Schild (1959; Gleichung (3.3)) sowie Tallarida und Murray (1986) quantifiziert (siehe 3.2.1.1.). Der Antagonismus wurde als rein kompetitiv betrachtet, wenn die DWK der Agonisten parallel nach rechts verschoben wurden und die Steigung der Regressionsgeraden im Arunlakshana-Schild-Plot nicht signifikant von dem für einen kompetitiven Antagonisten zu fordernden theoretischen Wert von 1.0 abwich. War dies der Fall, wurden die  $pA_2$ -Werte ( $= -\log K_D$ ) des Antagonisten als Abszissenabschnitt der Regressionsgerade mit einer Steigung von 1 abgelesen.

### 3.2.2.2. Modell des P2X<sub>3</sub> Rezeptors

Die Präparation erfolgte wie oben bereits unter 3.2.2.1. beschrieben. Die Versuchsbedingungen entsprachen dem Versuchsprotokoll des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors mit der Ausnahme, dass der Puffer statt Atropin 70 nM Physostigmin enthielt (Czeche et al., 1998a).

**Allgemeine Bedingungen.** Zunächst wurden die Organe mit der Maximalkonzentration von 100  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP zur vollständigen Kontraktion gebracht (Priming). Nach einer weiteren Stunde Equilibrierungszeit wurden die Organe durch wiederholte Kontraktionen mittels Einzelgaben von 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP im Abstand von 15 Minuten konditioniert, bis das Ausmaß der Kontraktion konstant blieb. Der 15-minütige Abstand zwischen den Einzelgaben war ausreichend um Desensibilisierungseffekte auszuschließen. Sobald das Maximum der Kontraktion erreicht war, wurde sofort gespült (durchschnittlich nach ca. 20 Sekunden). Der Spülrhythmus betrug in allen Experimenten 15 Minuten. Während der Inkubation wurden die Antagonisten unmittelbar nach jedem Spülvorgang erneut zugesetzt. Ein Organ diente in jedem der Versuche

als Kontrolle, um eventuelle zeitabhängige Veränderungen in der Reaktion auf  $\alpha\beta$ meATP aufzuzeigen.

**Screening-Daten.** Die Experimente erfolgten analog zu denen am Vas deferens der Ratte (siehe 3.2.1.1.) unter Verwendung von 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP als Agonist.

**Hemmkurven.** Die Experimente erfolgten analog zu denen am Vas deferens der Ratte (siehe 3.2.1.1.) unter Verwendung von 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP als Agonist.

### 3.2.2.3. Rezeptorspezifität

**Adenosin  $A_1$  Rezeptor.** Die Präparation der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum erfolgte wie oben geschildert (siehe 3.2.2.1.). Es wurde ein 1.0 mM Calciumchlorid-haltiger Krebs-Henseleit-Puffer ohne Atropin-Zugabe verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1). Die Versuchstemperatur betrug 37°C. Zur elektrischen Feldstimulation wurden die Longitudinalmuskelstreifen vertikal an einer Platinelektrode fixiert, indem das eine Ende am unteren Ring der Elektrode festgeknotet wurde und der Faden durch den zweiten Elektrodenring hindurch an einem isometrischen Aufnehmer (TF6V5, W. Fleck, Mainz, Deutschland) oberhalb des Organbades befestigt wurde. Nach einer Equilibrierungszeit von einer Stunde unter einer Vorspannung von 500 mg, wurden die Organe alle 10 Sekunden elektrisch gereizt (Rechteckimpulse von 0.5 ms und 60 Volt aus einem Doppelreizgerät HSE Stimulator II, Firma Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland). Die so ausgelösten neurogenen Kontraktionen wurden isometrisch gemessen und nach Verstärkung durch einen DMS-DC-Verstärker (W. Fleck, Mainz, Deutschland) mit einem Rikadenki-Schreiber (Firma Hellige, Freiburg, Deutschland) aufgezeichnet. Nachdem die Kontraktionen, die durch das elektrisch freigesetzte Acetylcholin an muskarinergen  $M_3$  Rezeptoren ausgelöst wurden, ein stabiles Niveau erreicht hatten, wurde durch Zugabe von CCPA der präsynaptische, inhibitorische Adenosin  $A_1$  Rezeptor stimuliert. Dies hatte zur Folge, dass abhängig von der CCPA-Konzentration weniger Acetylcholin aus cholinergen Neuronen ausgeschüttet wurde, was zu einer geringeren

Kontraktion des Organs führte. Basierend auf diesem Versuchsdesign wurden kumulative DWK mit CCPA erstellt, wobei die nächst höhere Agonistenkonzentration zugegeben wurde, sobald die Wirkung der vorgehenden Agonistengabe ein Plateau erreichte. Sobald die DWK konstant waren, wurde nach Gabe der höchsten Agonistenkonzentration gespült und die Testsubstanz sofort für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut eine kumulative DWK mit CCPA durchgeführt. Der Spülrhythmus betrug in allen Experimenten 15 Minuten. Während der Inkubation wurde der Antagonist unmittelbar nach jedem Spülvorgang erneut zugesetzt. Ein Organ diente in jedem Versuch als Kontrolle um eventuelle zeitabhängige Veränderungen in der Reaktion auf CCPA aufzuzeigen. Zur Auswertung der Daten wurden beide DWK auf die durch elektrische Feldstimulation hervorgerufene maximale Kontraktion in Abwesenheit von CCPA normalisiert. Die Mittelwerte der prozentualen Einzelwerte der verschiedenen Versuche wurden mit Hilfe einer 4-Parameter-Gleichung, basierend auf der logistischen Funktion von Parker und Waud (1971), dargestellt (siehe 3.2.1.1.; Gleichung (3.2)). Dabei wurde  $\log_{10}$  Agonistenkonzentration gegen % der Kontrolle aufgetragen. Agonist-Konzentrations-Verhältnisse (DR = dose-ratio) wurden auf Höhe der  $EC_{50}$ , das heißt dem halbmaximalen Effekt abgelesen. Da in den Versuchen zur Rezeptor-Spezifität von NF449 die  $EC_{50}$ -Werte in An- und Abwesenheit des Antagonisten nur geringfügig voneinander abwichen, d.h. die DR zu gering war, entfiel die Ermittlung des  $pA_2$ -Wertes nach Arunlakshana und Schild (1959; Gleichung (3.3)).

**Histamin  $H_1$  Rezeptor und Muskarin  $M_3$  Rezeptor** Die Präparation der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum erfolgte wie oben geschildert (siehe 3.2.2.1.). Es wurde ein Tyrode-Puffer verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1). Die Versuchstemperatur betrug 32°C. Die Organe wurden an isotonischen Aufnehmern (TF6V5 iso, W. Fleck, Mainz, Deutschland) fixiert und unter eine Vorspannung von 500 mg gebracht. Nach einer Stunde Equilibrierungszeit wurden kumulative DWK mit steigenden Konzentrationen Histamindihydrochlorid für den Histamin  $H_1$  Rezeptor bzw. Arecaidinpropargylester (APE) für den Muskarin  $M_3$  Rezeptor durchgeführt.

Sobald die DWK konstant waren, wurde unmittelbar nach Gabe der höchsten Agonistenkonzentration gespült und die Testsubstanz hinzugefügt. Der Spülrhythmus betrug in allen Experimenten 15 Minuten. Während der Inkubation wurde der Antagonist unmittelbar nach jedem Spülvorgang erneut zugesetzt. Ein Organ diente in jedem Versuch als Kontrolle, um eventuelle zeitabhängige Veränderungen in der Reaktion auf Histamindihydrochlorid bzw. APE aufzuzeigen. Zur Auswertung der Daten wurden beide DWK (d.h. Referenz- und Inkubations-DWK) auf die Kontraktion, ausgelöst durch die höchste Agonistenkonzentration, normalisiert. Die Mittelwerte der prozentualen Einzelwerte der verschiedenen Versuche wurden mit Hilfe einer 4-Parameter-Gleichung, basierend auf der logistischen Funktion von Parker und Waud, dargestellt (siehe 3.2.1.1.; Gleichung (3.2)). Dabei wurde  $\log_{10}$  Agonistenkonzentration gegen % der Kontrolle aufgetragen. Agonistkonzentrations-Verhältnisse (DR = dose-ratio) wurden auf Höhe der  $EC_{50}$ , das heißt dem halbmaximalen Effekt abgelesen. Da in den Versuchen zur Rezeptor-Spezifität von NF449 die  $EC_{50}$ -Werte in An- und Abwesenheit des Antagonisten nur geringfügig voneinander abwichen, d.h. die DR zu gering war, entfiel die Ermittlung des  $pA_2$ -Wertes nach Arunlakshana und Schild (1959; Gleichung (3.3)).

### 3.2.3. Ektonukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten

**Präparation.** Die Ovarien von weiblichen Krallenfröschen, anästhesiert in 0.2 % (g/v) Tricain-Lösung, wurden operativ geöffnet und die Eizellen mechanisch von der inneren Ovariepithelschicht abgelöst. Die Oozyten wurden bei 19 °C bis zu 5 Tagen in Ringer-Lösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1; XLO I) aufbewahrt.

**Versuchsdesign.** Die Ektonukleotidase-Experimente wurden bei  $20 \pm 1$  °C in modifizierter Ringerlösung durchgeführt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1; XLO II) und folgten der Methode nach Ziganshin (Ziganshin et al., 1995). 24-well-Platten wurden mit jeweils 3 Oozyten in 250  $\mu$ l Puffer pro well beschickt. Nach zwei Waschschritten im Abstand von 15 Minuten, wurde der Waschpuffer

durch 300  $\mu\text{M}$  ATP-haltigen Puffer ersetzt und im Schüttelwasserbad 30 Minuten lang inkubiert (erste Inkubation). Danach wurde der Puffer pro well getrennt gesammelt und mit 1 ml einer 2.5% (g/v) Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) versetzt, um den ATP-Abbau durch lösliche Ektonukleotidasen zu stoppen. Die Oozyten in den wells wurden erneut für 15 Minuten gewaschen und danach mit 200  $\mu\text{l}$  Puffer versetzt, der 100  $\mu\text{M}$  der Testsubstanz enthielt. Nach einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten wurden nun 50  $\mu\text{l}$  ATP- und Testsubstanz-haltiger Puffer zugefügt, der dann im well eine Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  Testsubstanz und 300  $\mu\text{M}$  ATP ergab. Nach 30-minütiger zweiter Inkubation wurde erneut der Puffer gesammelt und mit SDS versetzt. Um das entstandene anorganische Phosphat zu bestimmen, wurde den Proben nun 1 ml einer 1.25 % (g/v) Ammoniummolybdat-Lösung in 2 M Salzsäure und 0.1 ml einer 16 % (g/v) Fiske und Subbarow Reduktionslösung zugefügt (Fiske und Subbarow, 1925). Die Proben wurden in Küvetten überführt und zur Farbentwicklung 30 Minuten lang bei Raumtemperatur stengelassen. Das blaue Reaktionsprodukt des anorganischen Phosphates wurde spektrophotometrisch bei 700 nm in einem Spectronic Genesis 5 Spektrophotometer gemessen.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  diente als Phosphatstandard für die Erstellung der Eichgerade.

**Auswertung.** Das bei der zweiten Inkubation (ATP + Testsubstanz) entstandene anorganische Phosphat wurde auf das bei der ersten (nur ATP) Inkubation entstandene anorganische Phosphat normalisiert. Wenn nicht anders vermerkt, stammen die Ergebnisse aus 2 Einzelversuchen in vierfacher Wiederholung. Oozyten, die in beiden Inkubationen mit ATP allein inkubiert wurden, dienten als Zeitkontrollen, um Änderungen der enzymatischen Aktivität über die Zeit auszuschließen. Anorganisches Phosphat aus verunreinigtem ATP oder durch spontanen Zerfall von ATP während des Versuches wurde in Abwesenheit der Eizellen ermittelt und von den Experimenten abgezogen, um ausschließlich die Produktion des anorganischen Phosphates durch enzymatische Aktivität zu erfassen.



### 3.2.4. Humane Thrombozyten

**Allgemeine Grundlagen der spektralphotometrischen Bestimmung intrazellulärer Ionenkonzentrationen.** Fluoreszenz kann als dreistufiger Prozess beschrieben werden, der vor allem bei Heterozyklen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen stattfinden kann. Der Prozess, der für die Fluoreszenz dieser sogenannten Fluorophore verantwortlich ist, kann im Jablonski-Diagramm dargestellt werden (siehe Abb. 3.1). Dabei wird als erster Schritt ein Energiephoton  $h\nu_{\text{ex}}$  (Extinktion) einer externen Energiequelle (z. B. einem Laser) von dem Fluorophor absorbiert, wodurch ein angeregter elektronischer Singulett-Zustand  $S_1'$  erreicht wird. Im zweiten Schritt fallen die Elektronen zunächst strahlungslos in den Schwingungszustand  $S_1$  zurück. Erst von hier erfolgt der Übergang in den Schwingungszustand der Grundposition ( $S_0$ ). Dabei wird die Energie in Form von Fluoreszenzlicht  $h\nu_{\text{em}}$  (Emission) freigesetzt. Durch den Energieverlust in Stufe 2 ist die Energie dieses Photons geringer und liegt damit in einer längeren Wellenlänge als das Anregungsphoton.

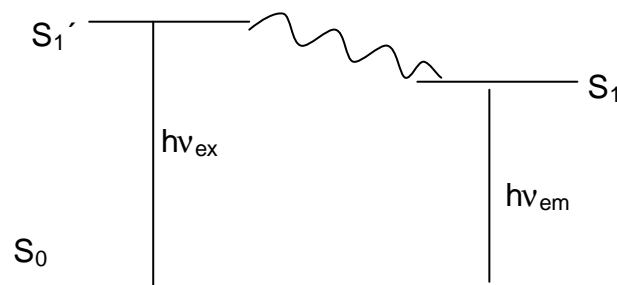


Abb. 3.1: Jablonski-Diagramm.

Bei manchen Fluorophoren ist es möglich, eine sogenannte Ratio-Messung durchzuführen. Dabei werden die freie und die Ionen-gebundene Form des Fluoreszenzfarbstoffs bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt, das heißt, dass bei der Messung das Verhältnis (englisch „ratio“) der Fluoreszenzintensität bei zwei verschiedenen Wellenlängen ermittelt wird. Dies hat den Vorteil, dass durch Artefakte bedingte Unterschiede im Fluoreszenzsignal beseitigt werden, die ansonsten zu Fehlinterpretationen der intrazellulären Ionenkonzentration

führen könnten. Eventuelle Fehlerquellen wie z. B. Unterschiede in der Farbstoffkonzentration oder -verteilung innerhalb der Zellen, Ausbleichen oder Ausströmen des Farbstoffes oder Schwankungen der Intensität der Energiequelle bzw. der Leistungsfähigkeit des Detektionssystems, werden mit Hilfe der Ratiomessung bereits während der Messung herausgerechnet. Zwei wichtige Voraussetzungen für die Messung intrazellulärer Ionenkonzentrationen sind, dass erstens der Farbstoff nach Beladung im untersuchten Zellkompartiment vorhanden ist (hier im Zytosol) und dass zweitens die Fluoreszenz des Indikators quantitativ mit der Konzentration des untersuchten Ions zusammenhängt. Eine Methode der Zellbeladung mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die Verwendung der Acetoxymethylester. Die Carboxylgruppen der Kationenfarbstoffe werden zu Acetoxymethylestern derivatisiert, wodurch der Farbstoff zellmembranpermeabel und insensitive für Ionen wird. Nach Passage der Zellmembran wird der Farbstoff durch intrazelluläre Esterasen gespalten, wodurch der Ionen-sensitive, polyanionische Fluoreszenzfarbstoff für die Membran impermeabel wird. Eine Komplikation kann bei sehr hohen Farbstoffkonzentrationen durch freigesetzten zytotoxischen Formaldehyd entstehen. Der Konzentrationsbereich, in dem die Farbstofffluoreszenz quantitativ von der Ionenkonzentration abhängt liegt bei ca.  $0.1$  bis  $10 \cdot K_d$ . Der  $K_d$ -Wert hängt stark von den Versuchsbedingungen sowie dem Medium, in dem der Farbstoff untersucht wird, ab. Fura-2 hat einen  $K_d$ -Wert für die Bindung von  $Ca^{2+}$ , der in der Nähe des typischen basalen Kalziumspiegel in Säugetierzellen von  $\sim 50$ - $100$  nM liegt und weist im Vergleich zur  $Mg^{2+}$ -Bindung eine hohe Selektivität für die  $Ca^{2+}$ -Bindung auf. Trotzdem ist der  $K_d$ -Wert stark von den physiologischen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen abhängig. So beträgt der  $K_d$ -Wert in magnesiumfreiem Kalziumpuffer ungefähr  $135$  nM, während er in magnesiumhaltigem Kalziumpuffer auf  $224$  nM ansteigt.

**Präparation.** Die Blutentnahme erfolgte in Kooperation mit Ärzten des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. S. Harder im Zentrum für klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Das Blut wurde von jungen, gesunden Probanden beiderlei Geschlechts gespendet, die für mindestens  $10$  Tage keine Arzneimittel (mit Ausnahme von oralen

Kontrazeptiva) eingenommen hatten. Die Blutabnahme sowie die Aufbereitung der Thrombozyten erfolgte nach der Methode von Rolf (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Es wurde ein Butterfly-Infusionsset mit 19 G Nadel und 30 cm Schlauch (Venofix<sup>®</sup>, Braun, Melsungen, Deutschland) zur Blutabnahme aus Venen der Armbeuge verwendet. Um die Aktivierung der Thrombozyten durch die Einstichverletzung so gering wie möglich zu halten, wurden die ersten 2-3 ml Blut verworfen. In eine 50-ml-Einmalspritze (Injectomat<sup>®</sup>-Spritze, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland), die mit 7 ml Antikoagulans-Lösung (Zusammensetzung siehe 3.1.3.) beschickt worden war, wurde nun bis zur Messmarke durch langsamen Zug Blut abgenommen, so dass das Blut mit dem Antikoagulans im Verhältnis von ca. 6:1 (v/v) gemischt vorlag. Das Vollblut wurde durch vorsichtiges Umkippen der Spritze mit dem Antikoagulans homogen vermischt. Nach Aliquotieren auf vier 15-ml Falcons, wurde bei 700 \* g für fünf Minuten in einer Zentrifuge (Megafuge 1.OR; Firma Haereus Sepatech) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das abgetrennte Plättchen-reiche Plasma (PRP) im Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Plastik-Pasteurpipette abgenommen und in zwei 15-ml Falcons überführt. Sofort wurde dem PRP Apyrase (Typ VII; Endkonzentration 0.32 U/ml) und Acetylsalicylsäure (Endkonzentration 100 µM) zugesetzt, um Desensibilisierungseffekten durch freigesetztes ATP oder ADP vorzubeugen, sowie die Aggregation der Thrombozyten über Aktivierung des Cyclooxygenase-Systems zu verhindern. Während das PRP des einen 15-ml Falcons sofort mit Fluoreszenzfarbstoff beladen wurde, kreiste das PRP im anderen Falcon fest verschlossen auf einem selbst konstruierten Rotor, um die Thrombozyten in Bewegung zu halten und so eine Aktivierung durch Sedimentationskontakt zu verhindern. Dadurch war eine Lagerung der Thrombozyten für spätere Messungen bis zu 4 Stunden nach Venenpunktion möglich. Die Beladung der Thrombozyten erfolgte direkt im PRP durch Vorlegen des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes (Fura-2/AM: Endkonzentration 2 µM; Oregon green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1/AM: Endkonzentration 1 µM) in ein weiteres 15-ml Falcon und Zufügen des PRPs, um das Farbstofflösungsmittel DMSO so schnell wie möglich zu verdünnen. Das PRP wurde nun bei 37 °C im Schüttelwasserbad für 45 Minuten mit dem Farbstoff

inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten durch 20-minütige Zentrifugation bei  $350 \times g$  und Raumtemperatur in einer Beckmann-Allegra 6 R-Zentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit nominell Kalzium-freiem, Apyrase-haltigem Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 3.1) auf ein Volumen resuspendiert, das zu einer Thrombozytenkonzentration von ca.  $1 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  führte. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Verdünnung mit Methylenblau (1:10 (v/v)) bestimmt. Die Endkonzentration von 2 mM  $\text{CaCl}_2$  wurde unmittelbar bei Beginn des Experiments am  $\text{P2X}_1$  Rezeptor der Küvette zugesetzt. Analog zu Calciumchlorid dienten 2 mM  $\text{MgCl}_2$  als osmotische Kontrolle in den Experimenten am  $\text{P2Y}_1$  Rezeptor.

**Versuchsdesign.** Alle Experimente wurden in einem Aminco Bowman Fluoreszenzspektrometer (Luminescence Spectrometer Series 2, SLM-Aminco, Spectronic Instruments, Rochester/NY, USA) bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Halbmikro-Quarzküvetten (Hellma<sup>®</sup>-Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil<sup>®</sup>, Deutschland), die mit Hilfe eines kleinen Rührfisches eine schnelle Verteilung der zugefügten Substanzen innerhalb der Zellsuspension ermöglichten. Die Zugabe von Substanzen erfolgte über ein im Deckel der Messkammer befindliches Septum, durch das mittels einer Hamilton Spritze (Bonaduz, Schweiz) das gewünschte Volumen in die Küvette injiziert werden konnte. Das Zellsuspensionsvolumen betrug in allen Experimenten 1 ml. Grundsätzlich wurde die Zellsuspension in der Küvette vor der Messung mindestens 3 Minuten lang auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmt. Testsubstanzen wurden für mindestens 15 Minuten vorinkubiert. Die Anregungswellenlänge von Fura-2/AM betrug 340 nm (Kalzium-gebundener Farbstoff) sowie 380 nm (Kalzium-freier Farbstoff). Die Emissionsfluoreszenz wurde bei 510 nm gemessen. Der Einwellenlängen-Farbstoff Oregon green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1/AM wurde bei 494 nm angeregt, die Emission wurde bei 523 nm ermittelt. Um das zeitabhängige Ansprechen der Rezeptoren zu kontrollieren, wurde ein Zeitverlauf ermittelt, indem jede zweite Küvette als Kontrolle ohne Testsubstanz vermessen wurde. Dies war besonders bei den Messungen am  $\text{P2X}_1$  Rezeptor von Bedeutung, da

der durch diesen Kanal erfolgende Kalzium-Einstrom zeitabhängig deutlich abnahm und Versuche an diesem Rezeptor nur maximal 1 Stunde nach Resuspendieren im Puffer möglich waren. Alternierend wurden Inkubationsküvetten, vortemperiert auf 37 °C und für mindestens 15 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz vorinkubiert, gemessen.

**Auswertung.** Bei den Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM wurden innerhalb eines Versuches 3-4 Küvetten *in situ* kalibriert sowie an 3-4 Küvetten die Autofluoreszenz ermittelt. Dazu wurde die Zellsuspension der entsprechenden Küvette am Ende der Messung zunächst durch Zugabe von 10 µl 10% Triton X-100 vollständig lysiert. Bei den Untersuchungen am P2X<sub>1</sub> Rezeptor lag bereits durch Zugabe zu Beginn der Messung eine extrazelluläre Kalzium-Konzentration von 2 mM vor. Bei den Versuchen am P2Y<sub>1</sub> Rezeptor, die im nominell Kalzium-freien Medium durchgeführt wurden, wurden 2 mM Kalziumchlorid unmittelbar vor der Lyse mit Triton X-100 zugefügt. Unter diesen Bedingungen lag der Farbstoff, der aus dem Intrazellularraum nach Lyse austreten konnte und mit dem intra- und extrazellulären Kalzium einen Komplex bildete, vollständig gesättigt vor, was in der Fluoreszenzmessung als Parameter  $R_{\max}$  abgelesen wurde. Bei der Kalibration wurde durch Zugabe von 6 mM EGTA und 30 mM TRIS das Kalzium chelatisiert und somit dem Kalzium-Farbstoff-Komplex entzogen, so dass der Parameter  $R_{\min}$ , d.h. die Fluoreszenz von Fura-2/AM unter minimaler Kalziumkonzentration, abgelesen wurde. Bei Messung der Autofluoreszenz wurde nach vollständiger Lyse, 10 mM Manganchlorid hinzugefügt. Die Autofluoreszenz wurde von den Messwerten abgezogen. Zur Umrechnung der gemessenen Autofluoreszenz-korrigierten Ratio-Werte in Geräte-Einheiten zu Kalziumkonzentrationen wurde die Gleichung nach Grynkiewicz (3.4) (Grynkiewicz et al., 1985) angewendet. Es wurde unter diesen Bedingungen der  $K_d$  (Fura-2) von 224 nM verwendet.

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \left( \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left( \frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right) \quad (3.4)$$

- $K_d$  = Dissoziationskonstante von Fura-2 für die Bindung von  $Ca^{2+}$   
 $R$  = Fluoreszenzratio  
 $R_{\min}$  = Fluoreszenzratio unter minimalen Kalziumkonzentrationen  
 $R_{\max}$  = Fluoreszenzratio unter sättigenden Kalziumkonzentrationen  
 $S_{f2}$  = Fluoreszenzintensität bei 380 nm Wellenlänge unter minimalen Kalziumkonzentrationen  
 $S_{b2}$  = Fluoreszenzintensität bei 380 nm Wellenlänge unter sättigenden Kalziumkonzentrationen

Die Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1/AM wurden als Werte in Geräte-Einheiten angegeben, da die Kalibration eines Farbstoffes, der nur bei einer Wellenlänge angeregt wird und nur bei einer Wellenlänge emittiert, zu erheblichen Fehlern in der absoluten Kalziumkonzentration führen kann. Die ermittelten Messdaten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism ausgewertet. Dazu wurde zunächst das zeitabhängige Verhalten der Kontrollen mit Hilfe der linearen Regression charakterisiert. Auf dieser Gerade wurde nun bei dem jeweiligen Messzeitpunkt, an dem die Agonistengabe in die Inkubationsküvette erfolgte, die theoretische Antwort in Abwesenheit des Antagonisten abgelesen. Auf diesen Wert wurde die tatsächlich gemessene Reaktion nach Agonistengabe in Anwesenheit des Antagonisten normalisiert. Die Auswertung zur Ermittlung von  $pIC_{50}$ -Werten erfolgte analog zu den Organversuchen (siehe Kapitel 3.2.1.1.; Gleichung (3.2)).

**ADP Aufreinigung.** Kommerzielles ADP wurde mit Hilfe des Enzyms Hexokinase von eventuellen Verunreinigungen mit ATP befreit. Hexokinase katalysiert die Reaktion:



ADP wurde zunächst in Puffer der folgenden Zusammensetzung auf eine Konzentration von 10 mM gelöst (in mM): 150 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 22 Glukose, pH 8.0 (bei Raumtemperatur). 3 U/ml Hexokinase wurden zugefügt und für eine Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die hohe Konzentration an Glukose verschob das Reaktionsgleichgewicht zur rechten Seite. Danach wurde das nun ATP-freie ADP in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei – 20 °C gelagert. Nach Rolf (Rolf, M., Thesis 2001, University of Cambridge, England) übt die höchste Konzentration an Hexokinase keinen Effekt auf die Versuche an Thrombozyten aus.

### **3.2.5. Auswertung und Statistik**

Die Angabe aller experimentell ermittelten Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M. = standard error of the mean) für die Anzahl „n“ der durchgeführten Versuche. Wenn in den Abbildungen bei einzelnen Datenpunkten keine S.E.M.-Werte dargestellt sind, dann sind diese Werte kleiner als die Symbole. Die Prüfung auf Signifikanz des Unterschiedes zweier Mittelwerte erfolgte mit dem t-test nach Student mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism. Alle Signifikanzprüfungen erfolgten auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$ .





## 4. Ergebnisse

#### 4.1. Inhibitorische Potenz von Suramin-Analoga mit Biphenylstruktur an nativen P2 Rezeptoren

Derivate der Muttersubstanz Suramin mit einer Biphenylstruktur im Molekül wurden in Hinblick auf ihre antagonistische Aktivität an nativen P2 Rezeptoren der prostatichen Segmente des Ratten-Vas-deferens (P2X<sub>1</sub> Rezeptor) sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2Y<sub>1</sub> Rezeptor) untersucht. Weiterhin wurde ihr Effekt auf den ATP-Abbau durch Ektonukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten getestet. Es wurden Variationen in der Molekülgröße (siehe Abb. 4.2), in der Verknüpfungsart der Biphenylringe (siehe Abb. 4.3), sowie durch die Bildung von Heteromeren aus einem Naphthalin-Monomer verknüpft mit Pyridoxalphosphat (siehe Abb. 4.4) untersucht. Die große Harnstoffverbindung Suramin und die kleine Harnstoffverbindung NF023 (siehe Abb. 4.1) dienten als Referenzsubstanzen.

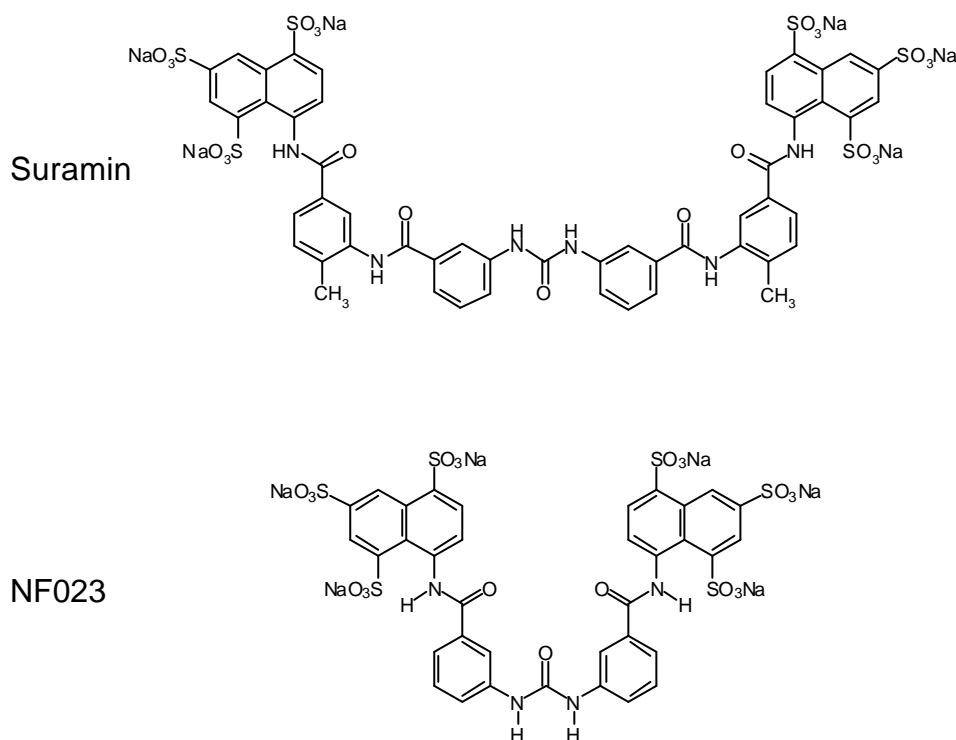


Abb. 4.1: Chemische Strukturformeln der Leitstrukturen Suramin und NF023.

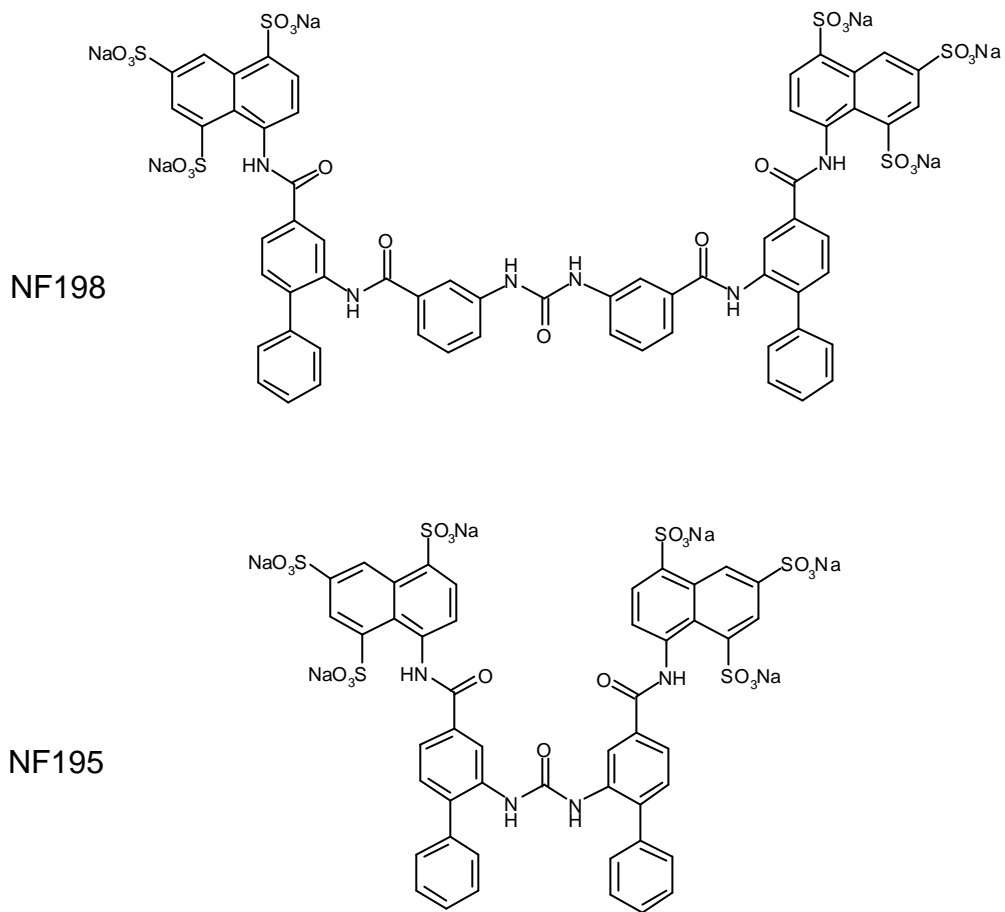


Abb. 4.2: Chemische Strukturformeln der Biphenylderivate NF195 und NF198.

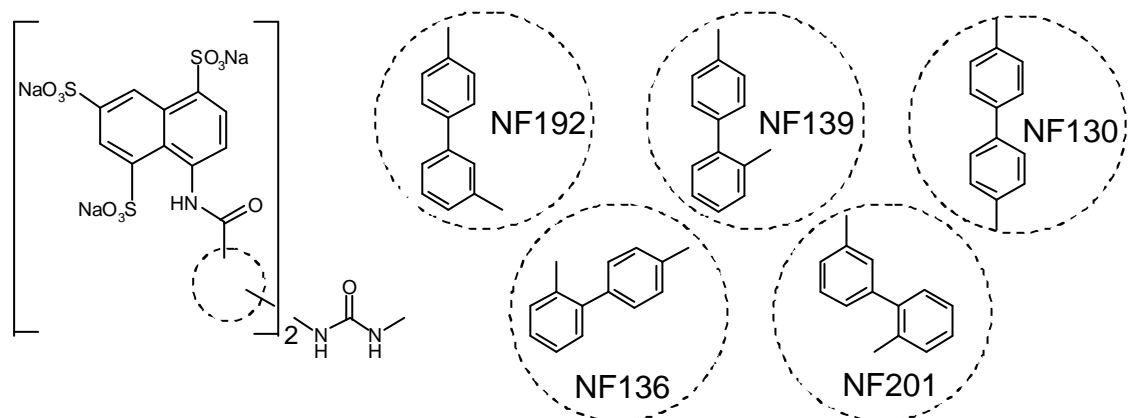


Abb. 4.3: Chemische Strukturformeln der Biphenylderivate NF192, NF139, NF130, NF136 und NF201.

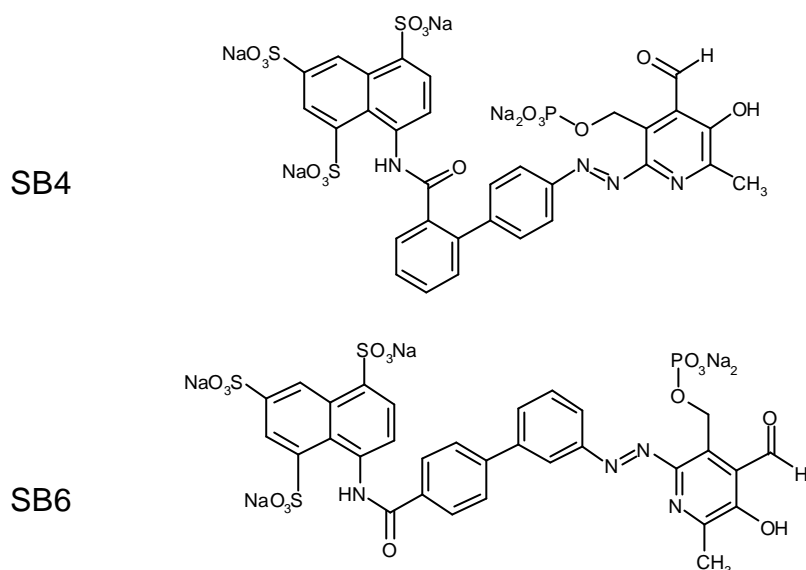
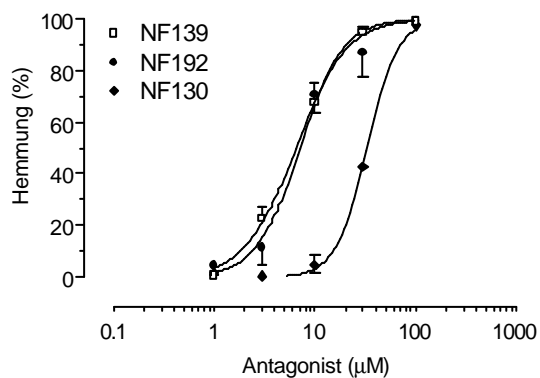


Abb. 4.4: Chemische Strukturformeln der heteromeren Biphenylderivate SB4 und SB6.

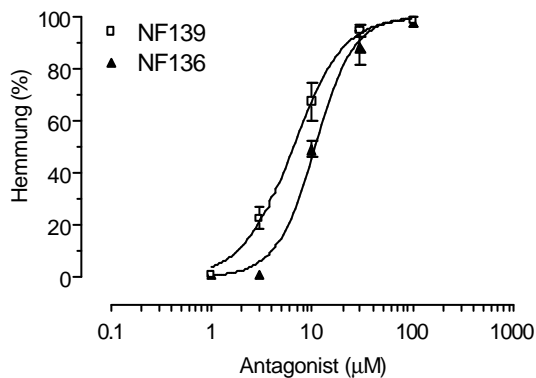
#### 4.1.1. Vas deferens der Ratte

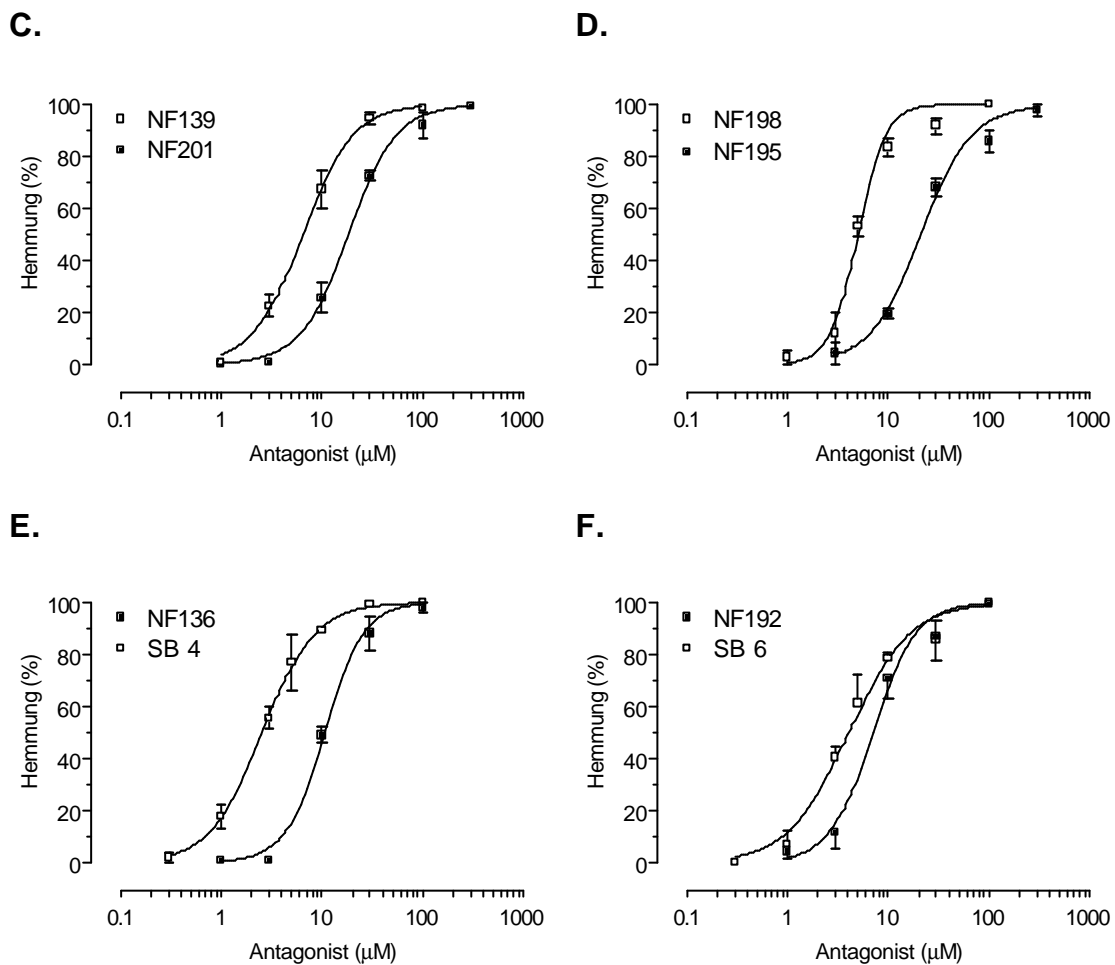
Die Gabe von 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  führte zu schnellen, transienten Kontraktionen des glatten Muskels des Vas deferens (durchschnittlicher Zug  $\pm$  S.E.M.: 1242  $\pm$  24 mg, n = 131), die konzentrationsabhängig von den Biphenylderivaten (NF130, NF136, NF139, NF192, NF195, NF198, NF201, SB4, SB6) bis zur vollständigen Blockade gehemmt wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse der resultierenden Inhibitionskurven (siehe Abb. 4.5) ergab die in Tabelle 4.1 und Abb. 4.7 aufgelisteten  $\text{pIC}_{50}$ -Werte.

A.



B.





**Abb. 4.5:** *P2X<sub>1</sub>-antagonistische Aktivität der Biphenyllderivate. Diese Abbildungen zeigen Inhibitionskurven der Substanzen (A.) NF130, NF139 und NF192, (B.) NF139 und NF136, (C.) NF139 und NF201, (D.) NF198 und NF195, (E.) NF136 und SB4, (F.) NF192 und SB6 an prostatichen Segmenten des Vas deferens der Ratte. Dargestellt sind die Mittelwerte (n = 2–5) der prozentualen Hemmung der Kontraktionen, die durch Einzelgaben von 10  $\mu$ M abmeATP hervorgerufen wurden. Die entsprechenden pIC<sub>50</sub>-Werte sind in Tabelle 4.1 und Abb. 4.7 aufgelistet.*

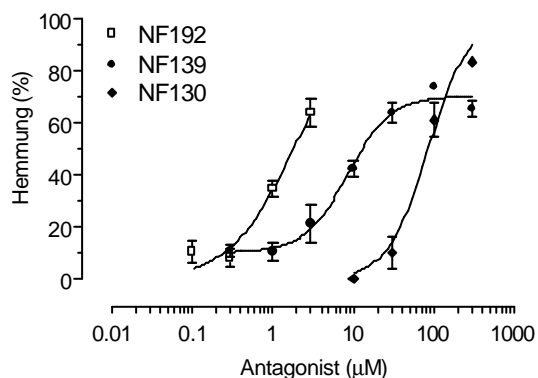
Die Verknüpfung eines Naphthalin-Monomers mit Pyridoxalphosphat erwies sich sowohl bei der Struktur von SB4 (Derivat von NF136) als auch bei SB6 (NF192-Abkömmling) von Vorteil zur Steigerung der antagonistischen Aktivität an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte. Innerhalb der symmetrischen Suraminanaloga erwies sich die Verbindung NF198, in dem die Methylgruppe des Suramins durch einen Phenylring ausgetauscht wurde, als potentester Antagonist von

P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens. Am ungünstigsten erwies sich die 1'-4'/1''-4''-verknüpfte Struktur von NF130. Zwischen der Hemmwirkung des 1'-4'/1''-3''-(NF192) sowie des 1'-4'/1''-2''-verknüpften Biphenyls NF139 zeigte sich kein Unterschied. Die umgekehrte Verknüpfungsvariante von 1'-4'/1''-2'' (NF139) zu 1'-2'/1''-4'' (NF136) führte ebenso zur Abnahme der antagonistischen Aktivität wie die Umwandlung von 1'-4'/1''-2'' (NF139) zu 1'-3'/1''-2'' (NF201).

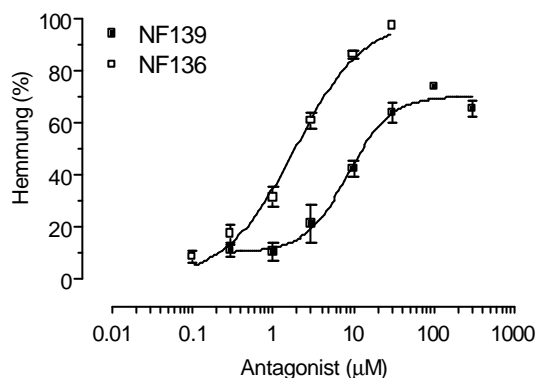
#### 4.1.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum

Die Gabe von 10  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$  führte zu transienten Kontraktionen der glatten Longitudinalmuskulatur des Ileum (durchschnittlicher Zug  $\pm$  S.E.M.: 1446  $\pm$  37 mg, n = 108), die konzentrationsabhängig von den Biphenylderivaten (NF130, NF136, NF139, NF192, NF195, NF198, NF201, SB4, SB6) gehemmt wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse der resultierenden Inhibitionskurven (siehe Abb. 4.6) ergab die in Tabelle 4.1 und Abb. 4.7 aufgelisteten pIC<sub>50</sub>-Werte.

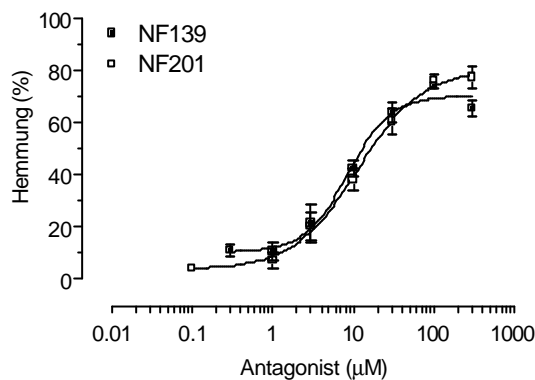
A.



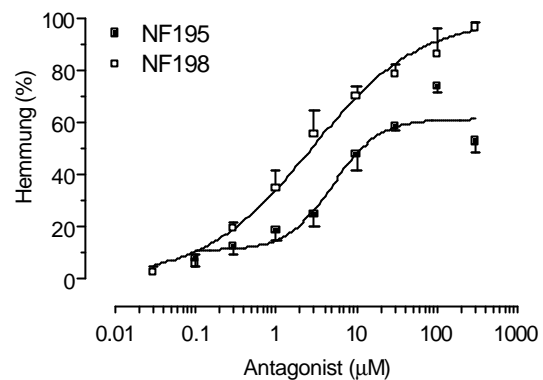
B.



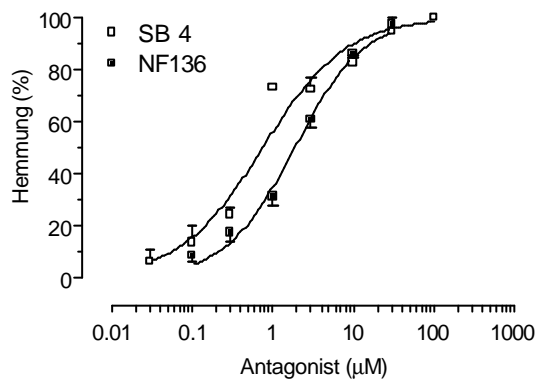
C.



D.



E.



F.

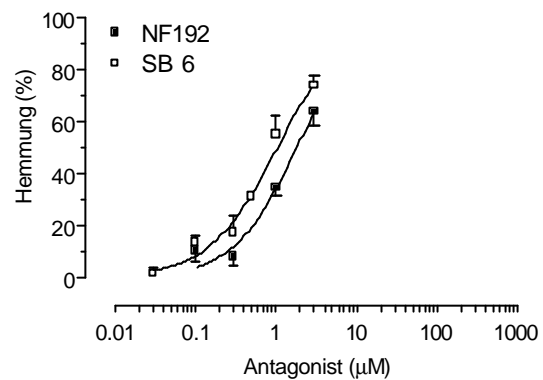


Abb. 4.6:  $P2Y_1$ -antagonistische Aktivität der Biphenylderivate. Diese Abbildungen zeigen Inhibitionskurven der Substanzen (A.) NF130, NF139 und NF192, (B.) NF139 und NF136, (C.) NF139 und NF201, (D.) NF198 und NF195, (E.) NF136 und SB4, (F.) NF192 und SB6 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n = 2-5$ ) der prozentualen Hemmung der Kontraktionen, die durch Einzelgaben von  $10 \mu\text{M}$  ADPbS hervorgerufen wurden. Die entsprechenden  $pIC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.1 und Abb. 4.7 aufgelistet.

Den stärksten Antagonismus zeigten die Heteromere SB4 und SB6, die die Hemmstärke ihrer jeweiligen bivalenten homomeren Analoga NF136 und NF192 übertrafen. Wie in Abb. 4.6 (F.) zu sehen ist, mussten die Inhibitionskurven abgebrochen werden, da nach weiterer Konzentrationssteigerung über  $3 \mu\text{M}$  NF192, wie auch das analoge Heterodimere SB6, zunehmend Spontankontraktionen hervorriefen. Dies

machte eine weitere Versuchsdurchführung unmöglich. Die Verbindungen NF139, NF195 und NF201 erreichten trotz Konzentrationssteigerung auf 300  $\mu\text{M}$  keine vollständige Hemmung der ADP $\beta\text{S}$ -induzierten Kontraktionen. Die maximale Hemmung betrug 70, 61 bzw. 80 %. Den schwächsten Antagonismus wies analog zu den Versuchen am Ratten-Vas-deferens die Verbindung NF130 auf.

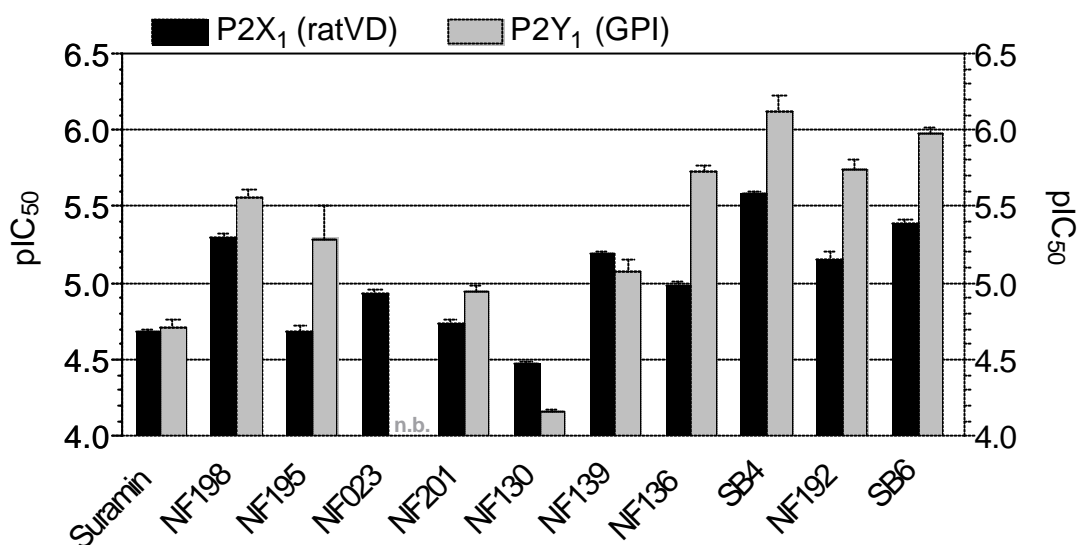


Abb. 4.7: Balkendiagramm der pIC<sub>50</sub>-Werte aus Tabelle 4.1.  
 ratVD = Vas deferens der Ratte.  
 GPI = Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.  
 n.b. = nicht bestimmt.

Tabelle 4.1: pIC<sub>50</sub>-Werte von Suramin, NF023 und Biphenylstrukturanalogen. Hemmung der Kontraktionen des Vas deferens der Ratte (ratVD) nach Einzelgaben von 10  $\mu\text{M}$  abmeATP, sowie der Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI) nach Einzelgaben von 10  $\mu\text{M}$  ADP $\beta\text{S}$ . (Chemische Strukturen: siehe Abb. 4.1 - Abb. 4.4; zugehörige Inhibitionskurven: siehe Abb. 4.5 und Abb. 4.6). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3 – 7 Einzelerperimenten.



Substanz	Verknüpfung	P2X <sub>1</sub> (ratVD) pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.	P2Y <sub>1</sub> (GPI) pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.
Suramin	1'-3' (4': CH <sub>3</sub> ) und 1''-3''	4.68 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.71 ± 0.05
NF198	1'-3' (4': C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) und 1''-3''	5.30 ± 0.02	5.56 ± 0.05
NF195	1'-3' (4': C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	4.68 ± 0.04	5.29 ± 0.21
NF023	1'-3' (4': H)	4.93 ± 0.03 <sup>a</sup>	n.b.
NF192	1'-4'/1''-3''	5.15 ± 0.05	5.74 ± 0.07
NF139	1'-4'/1''-2''	5.19 ± 0.02	5.07 ± 0.09
NF136	1'-2'/1''-4''	4.98 ± 0.03	5.73 ± 0.04
NF201	1'-3'/1''-2''	4.74 ± 0.02	4.94 ± 0.04
NF130	1'-4'/1''-4''	4.48 ± 0.01	4.16 ± 0.01
SB4	1'-2'/1''-4''/PP	5.59 ± 0.01	6.12 ± 0.10
SB6	1'-4'/1''-3''/PP	5.39 ± 0.03	5.98 ± 0.04

<sup>a</sup> Daten von Frau Dr. Susanne Damer (Dissertation 2002).

n.b. = nicht bestimmt.

PP = Pyridoxalphosphat.

Wie auch in Abb. 4.7 zu erkennen ist, ist die Selektivität zugunsten des P2Y<sub>1</sub> über den P2X<sub>1</sub> Rezeptor bei den Verbindungen NF192 und NF136, sowie den davon abgeleiteten Heteromeren SB4 und SB6 am ausgeprägtesten. Die Heteromere SB4 und SB6 stellen an beiden Rezeptoren die potentesten Antagonisten dar.

## 4.2. Screening von Suramin-Analoga an nativen P2 Rezeptoren

Die nachfolgenden Verbindungen wurden basierend auf ihren jeweiligen Leitstrukturen in zwei Gruppen unterteilt: große Harnstoffe, die sich strukturell

vom Suramin ableiten lassen, sowie kleine Harnstoffe, deren Vorläufer die Struktur des NF023 darstellt. Effekte der Verbindungen auf Kontraktionen sowohl des prostatichen Segments des Ratten-Vas-deferens, ausgelöst durch  $10 \mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  ( $\text{P2X}_1$  Rezeptor), wie auch der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum, ausgelöst durch  $10 \mu\text{M}$   $\text{ADP}\beta\text{S}$  ( $\text{P2Y}_1$  Rezeptor), wurden untersucht. Das Ausmaß der Kontraktion in Anwesenheit der Testsubstanz wurde auf die vorangegangene Referenzkontraktion in Abwesenheit der Substanz normalisiert und als prozentuale Hemmung in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgelistet.

#### 4.2.1. Große Harnstoffe

Ausgehend von der Leitstruktur des Suramin (siehe Abb. 4.8) wurden verschiedene Strukturvariationen untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Variation des zentralen Harnstoffs (siehe 4.2.1.1.), der Austausch der Phenylringe (siehe 4.2.1.2.), sowie der Ersatz des Aminonaphthylringes (siehe 4.2.1.3.).

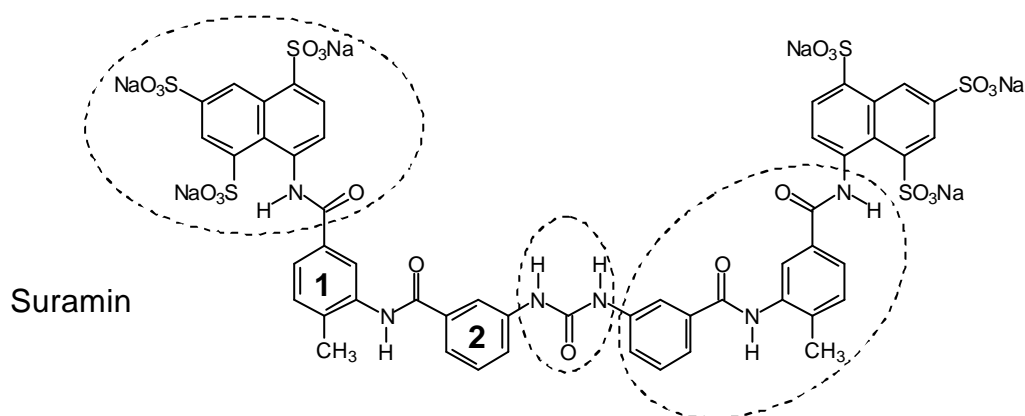


Abb. 4.8: Chemische Strukturformel der Leitsubstanz Suramin, Nummerierung der Phenylringe und exemplarisch die Variationsansätze im Molekül.

#### 4.2.1.1. Variation des zentralen Harnstoffes

Der zentrale Harnstoff in der Struktur des Suramins wurde wie in Abb. 4.9 dargestellt durch eine Ethylen- (NF061) bzw. Ethen-1,2-diyl-Diamidstruktur (NF066) ersetzt.

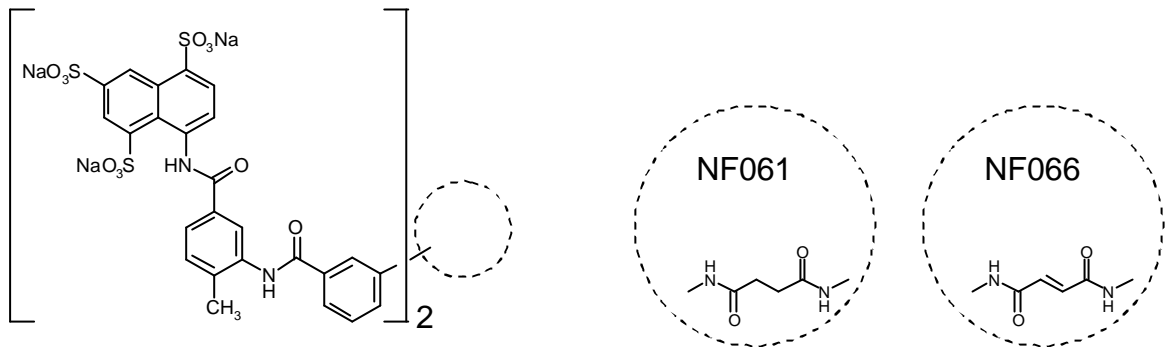
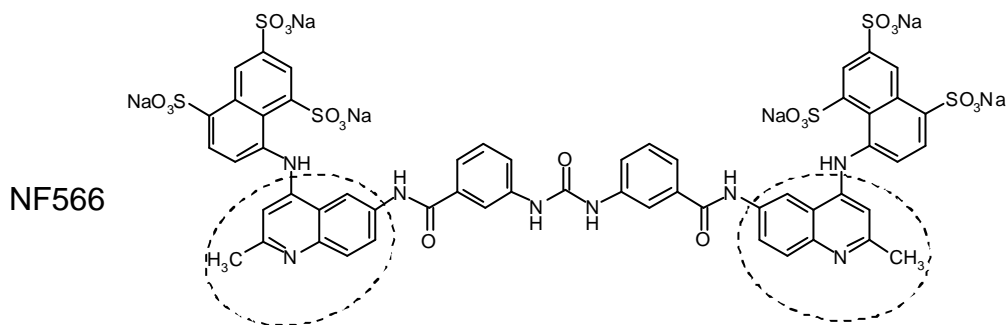


Abb. 4.9: Chemische Strukturformeln der Verbindungen NF061 und NF066, die in der zentralen Harnstoffstruktur von Suramin abweichen.

#### 4.2.1.2. Variation der Phenylringe

Die Phenylringe 1 des Suramins (Abb. 4.8) wurden durch Chinolinringe ersetzt (NF566). Außerdem wurde das Verknüpfungsmuster der Phenylringe 2 von 1''-3'' zu 1''-4'' verändert (NF567) (siehe Abb. 4.10).



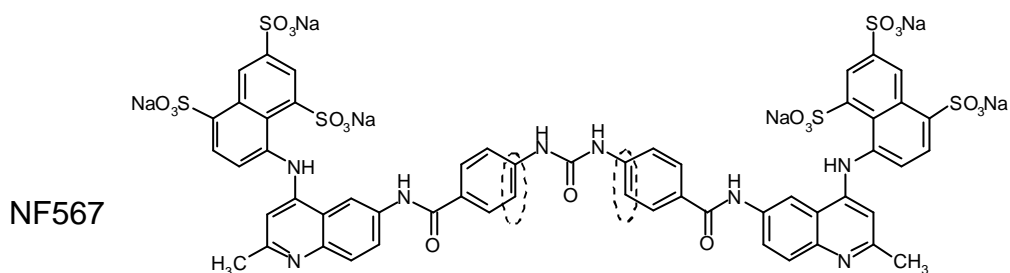


Abb. 4.10: Chemische Strukturformel von NF566 und NF567.

#### 4.2.1.3. Variation der Aminonaphthalinringe

In den folgenden Verbindungen wurden die Aminonaphthalinringe durch Aspartatgruppen ersetzt. Weiterhin wurden die Reste an Position 4' des ersten Phenylrings variiert (siehe Abb. 4.11). In der Verbindung NF186 wurden die Carbonylgruppen durch Sulfonylgruppen ersetzt (siehe Abb. 4.12).

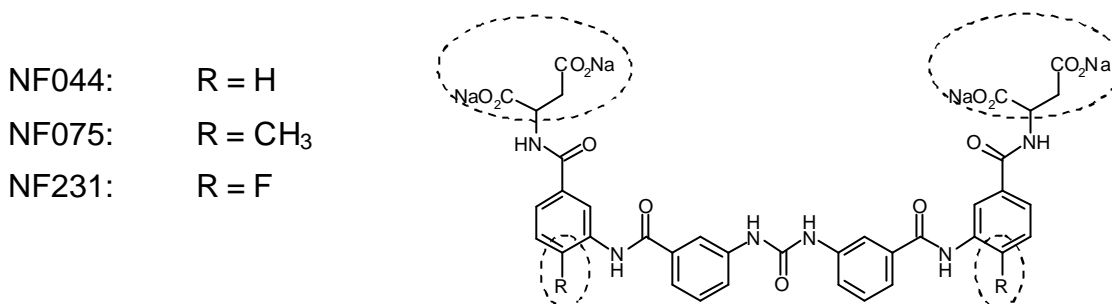


Abb. 4.11: Chemische Strukturformel der Suraminderivate, in denen die Aminonaphthalinringe durch Aspartatgruppen ersetzt wurden.

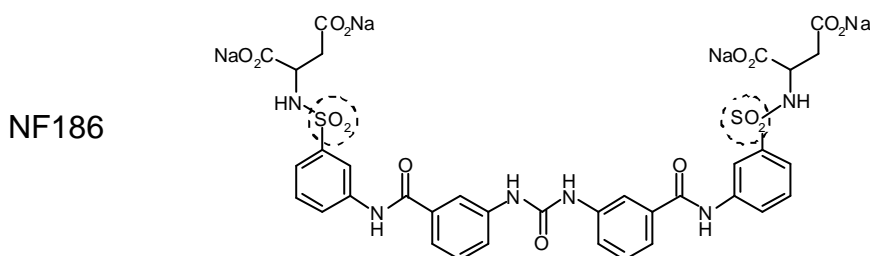


Abb. 4.12: Chemische Strukturformel der Verbindung NF186, in der Carbonylgruppen durch Sulfonylgruppen ersetzt wurden.

Die prozentuale Hemmung P2X<sub>1</sub>- und P2Y<sub>1</sub>-vermittelter Effekte der Verbindungen aus der Gruppe der großen Harnstoffe ist in Tabelle 4.2 aufgelistet. Im Vergleich zur Muttersubstanz Suramin führten alle untersuchten Variationen zu einer Abnahme der antagonistischen Wirkstärke an beiden Rezeptor-Modellen.

*Tabelle 4.2: Prozentuale Hemmung von Suramin und -Derivaten (10  $\mu$ M) auf Kontraktionen der prostatichen Segmente des Ratten-Vasdeferens (ratVD), ausgelöst durch Einzelgabe von 10  $\mu$ M abmeATP, sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI), ausgelöst durch 10  $\mu$ M ADP $\beta$ S. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-4 Einzelexperimenten.*

Große Harnstoffe	P2X <sub>1</sub> (ratVD)	P2Y <sub>1</sub> (GPI)
Suramin	22.0 $\pm$ 3.0	38.2 $\pm$ 14.2
NF061	3.7 $\pm$ 1.8	9.8 $\pm$ 8.3
NF066	2.3 $\pm$ 4.1	17.3 $\pm$ 6.7
NF566	3.0 $\pm$ 2.7	5.1 $\pm$ 4.6
NF567	0	5.8 $\pm$ 4.1
NF044	0	5.4 $\pm$ 5.7
NF075	15.2 $\pm$ 6.7	3.7 $\pm$ 6.5
NF231	2.6 $\pm$ 3.6	3.9 $\pm$ 5.8
NF186	11.5 $\pm$ 12.2	7.3 $\pm$ 5.1

### 4.2.2. Kleine Harnstoffe

Ausgehend von der Leitstruktur des NF023 (siehe Abb. 4.13) wurden verschiedene Strukturvariationen untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei der Austausch der Phenylringe (siehe 4.2.2.1.), der Ersatz der Aminonaphthalinringe (siehe 4.2.2.2.) und ein neuer Ansatz in Form von 'Schmetterling'-Strukturen (siehe 4.2.2.3.).

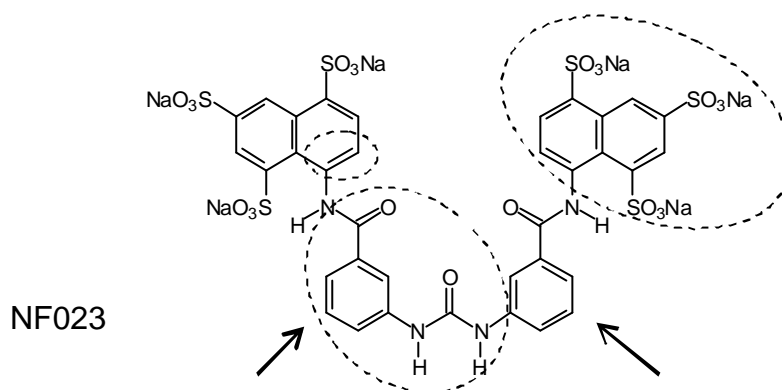


Abb. 4.13: Chemische Strukturformel der Leitstruktur NF023 und exemplarisch die Variationsansätze im Molekül.

#### 4.2.2.1. Variation der Phenylringe

Die Phenylringe im Molekül von NF023 wurden durch Chinolinringe ersetzt (NF565) (siehe Abb. 4.14).

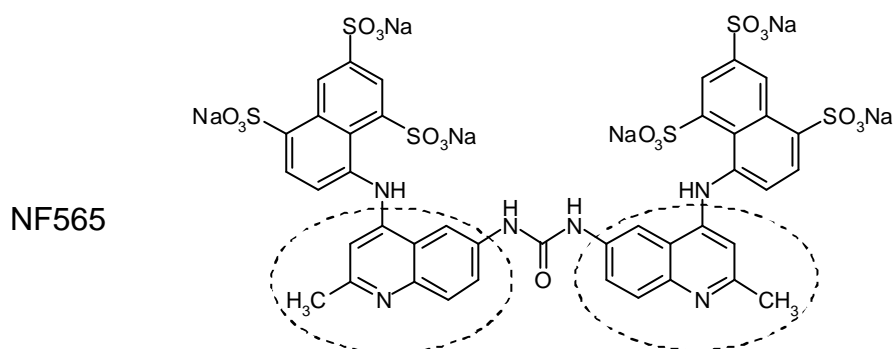


Abb. 4.14: Chemische Strukturformel von NF565.

In der Verbindung NF615 wurden die Phenylringe und der zentrale Harnstoff durch Kohlenwasserstoff-Brücken ersetzt (siehe Abb. 4.15).

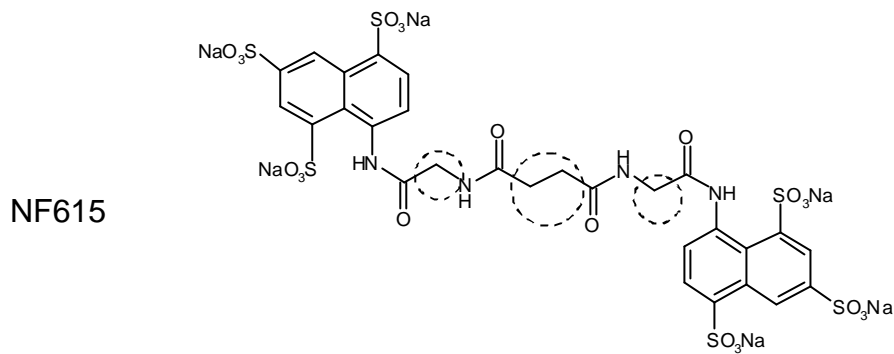


Abb. 4.15: Chemische Strukturformel von NF615.

#### 4.2.2.2. Variation der Aminonaphthalinringe

Die Änderung des Verknüpfungsmusters von 1'-3' in der Leitstruktur NF023 zu 1'-4' in der Verbindung NF278 wurde bereits durch Frau Dr. Susanne Damer in ihrer Dissertation beschrieben (Damer, 2002). Anknüpfend an ihre Arbeit wurde ausgehend von dem 8-Aminonaphthalinring in NF278 die Verbindung NF347 mit einem 7-Aminonaphthalinring untersucht (siehe Abb. 4.16).

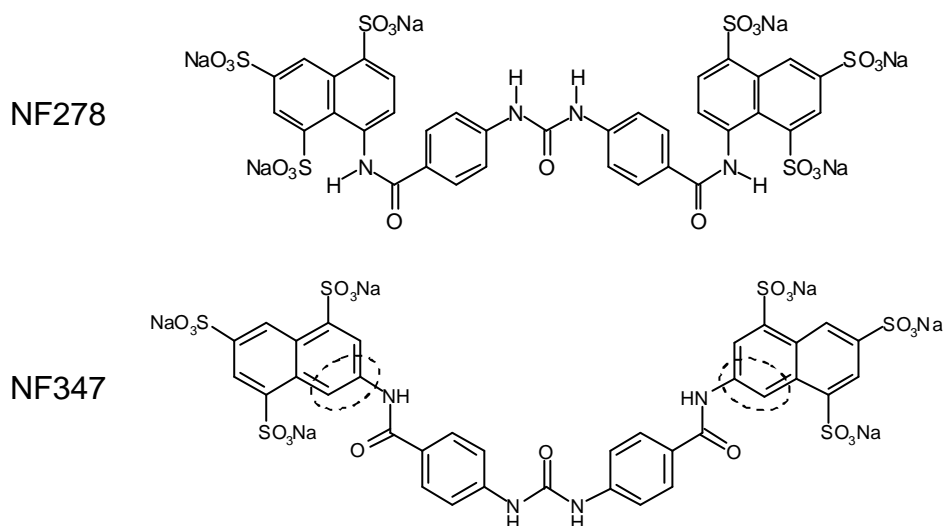


Abb. 4.16: Chemische Strukturformel der Verbindungen NF278 und NF347.

In den Verbindungen NF042, NF072 und NF230 wurde das Naphthalinringsystem durch eine Aspartatgruppe ersetzt, das

Verknüpfungsmuster von 1'-3' (NF042) zu 1'-4' (NF072) abgewandelt, sowie der Phenylring mit einem Fluoratom in 4'-Position substituiert (NF230) (siehe Abb. 4.17).

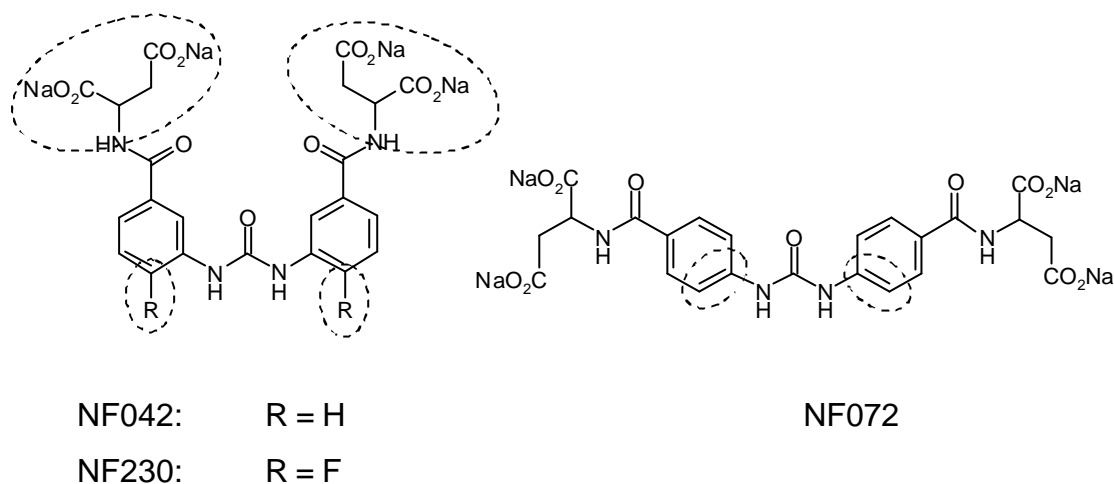
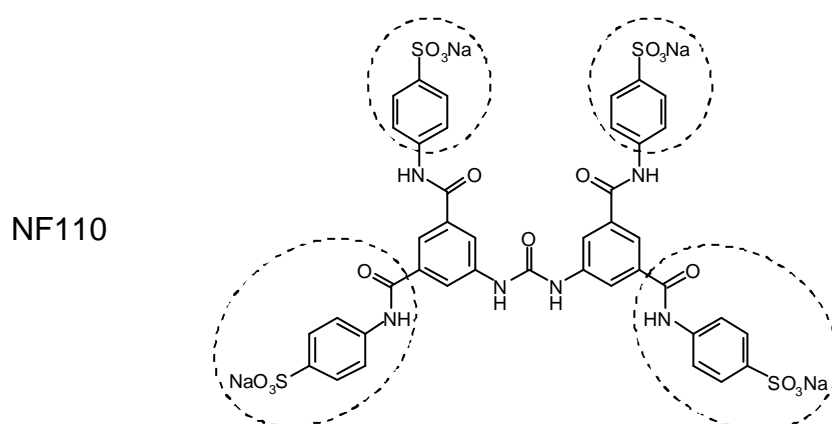


Abb. 4.17: Chemische Strukturformeln der Verbindungen NF042 (R = H), NF230 (R = F) und NF072.

#### 4.2.2.3. `Schmetterling'-Strukturen

Eine neue Strukturvariation in Form von symmetrischen Verbindungen, deren Phenylring mit zwei identischen Resten, statt wie bisher einem Rest substituiert ist, wurde untersucht (siehe Abb. 4.18). Weiterhin wurde der Einfluss der Anzahl an Sulfonsäureresten ermittelt.





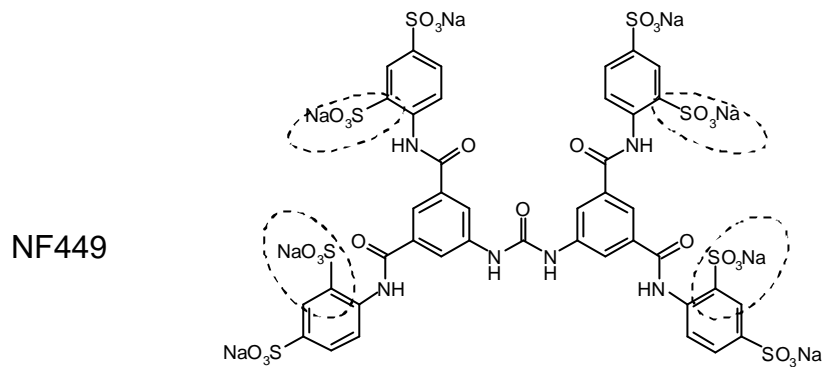


Abb. 4.18: Chemische Strukturformeln der 'Schmetterling'-Verbindungen NF110 und NF449.

Die P2X<sub>1</sub>- und P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-antagonistische Aktivität der oben aufgeführten kleinen Harnstoffe ist als prozentuale Hemmung der Kontrollkontraktionen in Tabelle 4.3 und Abb. 4.19 aufgelistet. Im Vergleich zur Muttersubstanz NF023 führten sowohl der Austausch der Phenylringe mit Chinolinringen (NF565), der Ersatz der Phenylringe und des zentralen Harnstoffes durch Kohlenwasserstoffgruppen (NF615), der Austausch der 8-Aminonaphthalinringe mit 7-Aminonaphthalinringen (NF347), wie auch der Ersatz der Naphthalinringe durch Aspartatgruppen zu einer Abnahme der antagonistischen Wirkstärke an beiden Rezeptor-Modellen. Der neue Strukturansatz der symmetrischen Substitution der Phenylringe mit zwei statt einem Rest führte zu einer deutlichen Steigerung der antagonistischen Aktivität, sowohl am P2X<sub>1</sub> wie auch am P2Y<sub>1</sub> Rezeptor (NF110). Zusätzliche Sulfonsäuren in Position 2 pro Phenylring (NF449) führte zur vollständigen Blockade des P2X<sub>1</sub> Rezeptors bei gleichzeitig schwächerer Zunahme des Antagonismus am P2Y<sub>1</sub> Rezeptor.

*Tabelle 4.3: Prozentuale Hemmung von NF023 und -Derivaten (10 mM) auf Kontraktionen der prostatichen Segmente des Ratten-Vasdeferens (ratVD), ausgelöst durch Einzelgabe von 10 mM abmeATP, sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI), ausgelöst durch 10 mM ADPbS. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von 3-4 Einzelerperimenten.*

Kleine Harnstoffe	P2X <sub>1</sub> (ratVD)	P2Y <sub>1</sub> (GPI)
NF023	44.0 <sup>a</sup>	18.1 <sup>a</sup>
NF565	6.5 $\pm$ 6.6	1.0 $\pm$ 1.2
NF615	2.4 $\pm$ 2.8	6.4 $\pm$ 6.1
NF278	7.3 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>	n.b.
NF347	0	12.3 $\pm$ 8.7
NF042	3.1 $\pm$ 2.9	6.8 $\pm$ 6.6
NF230	4.6 $\pm$ 7.9	5.0 $\pm$ 6.3
NF072	6.7 $\pm$ 6.5	6.8 $\pm$ 6.6
NF110	21.9 $\pm$ 2.3	15.3 $\pm$ 4.6
NF449	98.8 $\pm$ 1.2	54.6 $\pm$ 4.7

<sup>a</sup>Lambrecht et al., 2002.

<sup>b</sup>100  $\mu$ M NF278; Dissertation von Dr. Susanne Damer (2002).

n.b.: nicht bestimmt.

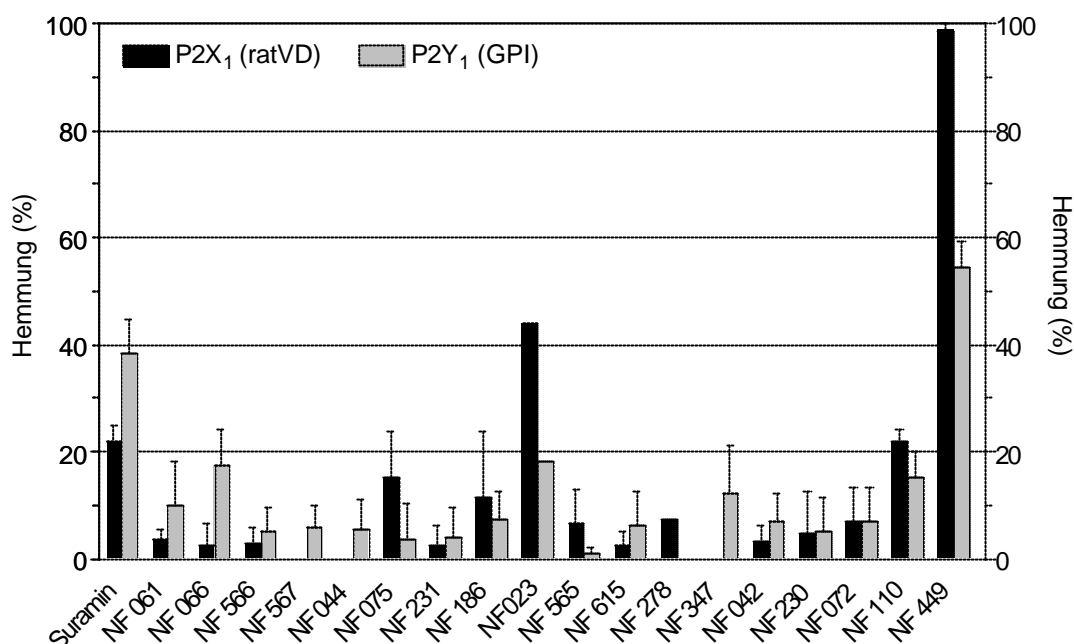


Abb. 4.19: Balkendiagramm der in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3 aufgelisteten prozentualen Hemmungen von Suramin- bzw. NF023-Derivaten. ratVD = Vas deferens der Ratte. GPI = Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.

### 4.3. Screening von NF110-Analoga

Ausgehend von der Schmetterlingsstruktur der Verbindung NF110, wurden 2 Gruppen von Derivaten untersucht. Die erste Gruppe stellt zwei NF110-Derivate dar, deren Sulfonsäuren aus Position 4 zu Position 3 der terminalen Phenylringe verschoben wurden (siehe 4.3.1.). In der zweiten Gruppe wurde die Verknüpfung der äußeren Phenylringe durch Methylenbrücken verlängert und nachfolgend weitere Umwandlungen im Molekül vorgenommen (siehe 4.3.2.). Effekte der Verbindungen auf Kontraktionen sowohl des prostatichen Segmentes des Ratten-Vas-deferens, ausgelöst durch 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP (P2X<sub>1</sub> Rezeptor), wie auch der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum, ausgelöst durch 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP (P2X<sub>3</sub> Rezeptor), beziehungsweise durch 10  $\mu$ M ADP $\beta$ S (P2Y<sub>1</sub> Rezeptor), wurden untersucht. Das Ausmaß der Kontraktionen in Anwesenheit der Testsubstanzen wurde auf die vorangegangenen Referenzkontraktionen in Abwesenheit der Substanz

normalisiert und als prozentuale Hemmungen in Tabelle 4.4 und Abb. 4.27 aufgelistet.

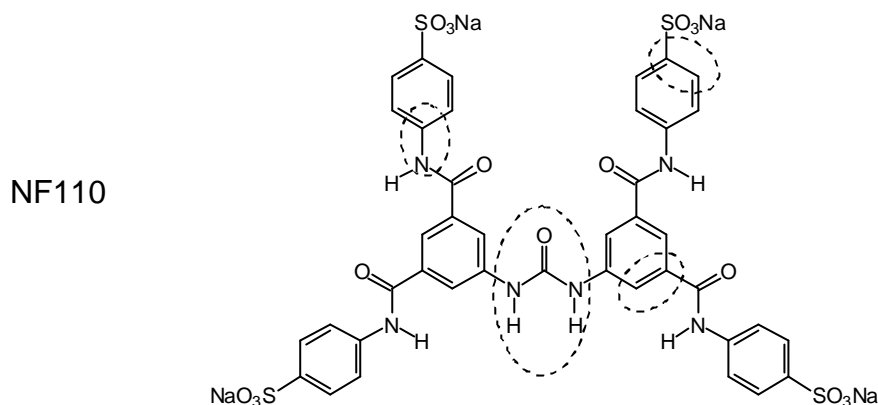


Abb. 4.20: Chemische Strukturformel der Leitsubstanz NF110 und exemplarisch die Variationsansätze im Molekül.

### 4.3.1. Variation der Sulfonsäurenposition

#### 4.3.1.1. Sulfonsäurenposition

Der Einfluss der Sulfonsäurenposition an den terminalen Phenylringen wurde durch Verschieben aus Position 4 (NF110) in die Position 3 (NF448) untersucht.

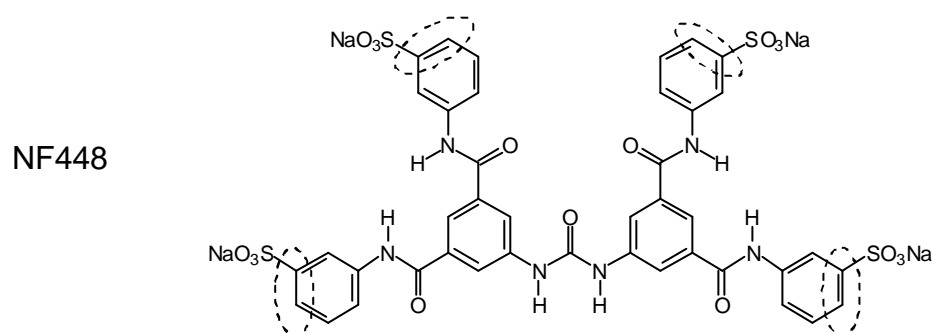


Abb. 4.21: Chemische Strukturformel der Verbindung NF448.

#### 4.3.1.2. Variation des zentralen Harnstoffes

Ausgehend von NF448, wurde der zentrale Harnstoff durch eine Isophthalsäurediamid-Struktur ersetzt (NF451).

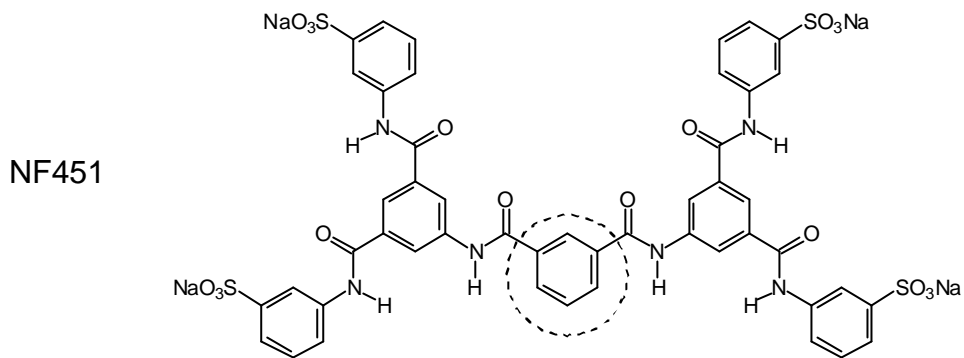


Abb. 4.22: Chemische Strukturformel der Verbindung NF451.

### 4.3.2. Variation durch Einführen von Methylenbrücken

#### 4.3.2.1. Einführen von Methylenbrücken

Der Einfluß der Verknüpfung der Phenylreste wurde durch Einführen von Methylenbrücken (NF436) untersucht.

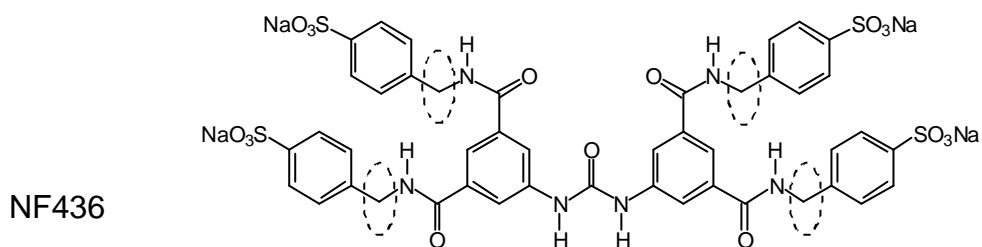


Abb. 4.23: Chemische Strukturformel der Verbindung NF436.

#### 4.3.2.2. Variation der Sulfonsäurenposition

Ausgehend von NF436 wurden die Sulfonsäuren der terminalen Phenylringe aus der Position 4 in die Position 3 verschoben (NF439).

NF439

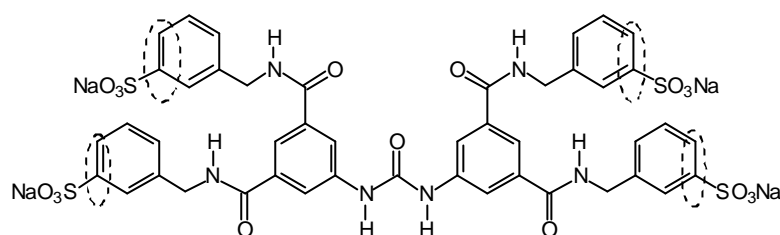


Abb. 4.24: Chemische Strukturformel der Verbindung NF439.

#### 4.3.2.3. Variation des zentralen Harnstoffes

Ausgehend von NF436 wurde der zentrale Harnstoff durch eine Isophthalsäurediamid-Struktur ersetzt (NF437).

NF437

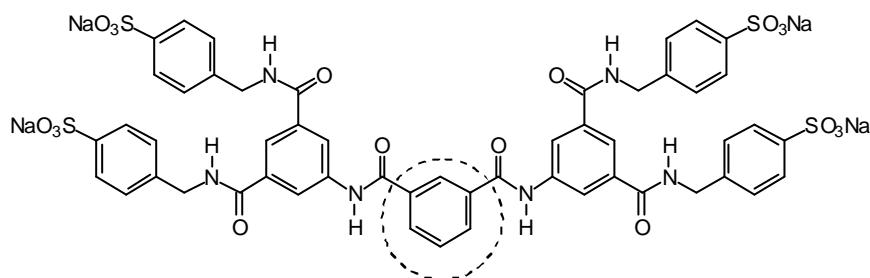


Abb. 4.25: Chemische Strukturformel der Verbindung NF437.

#### 4.3.2.4. Variation im Verknüpfungsmuster der zentralen Phenylringe

Ausgehend von NF436 wurden die Verknüpfungen der symmetrischen Reste an den zentralen Phenylringen von 1'-5' zu 1'-4' abgewandelt (NF445).

NF445

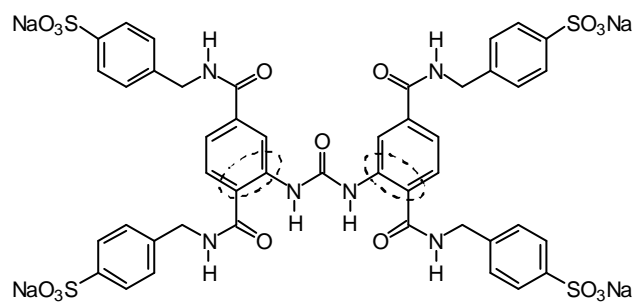


Abb. 4.26: Chemische Strukturformel der Verbindung NF445.

Die prozentualen Hemmungen P2-Rezeptor-vermittelter Effekte durch die Verbindungen sind in Tabelle 4.4 und Abb. 4.27 zusammengefasst. Am P2X<sub>1</sub> Rezeptor führten alle untersuchten Variationen zum Verlust der antagonistischen Aktivität. Aufgrund von Substanzmangel konnten nur die Verbindungen NF110 und NF445 am Modell des P2X<sub>3</sub> Rezeptors untersucht werden. NF110 zeigte einen starken P2X<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonismus. Die Einführung der Methylengruppen an den äußeren Phenylringen und die Abwandlung der zentralen Phenylringsubstitution (NF445) führte zum fast vollständigen Verlust der antagonistischen Eigenschaft am P2X<sub>3</sub> Rezeptor, während die Hemmung des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors konstant blieb. Die Abwandlung der Sulfonsäureposition von 4 zu 3 in den äußeren Phenylringen führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Hemmung des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors. Am ungünstigen für die Blockade des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors erwiesen sich Verbindungen mit einer Variation am zentralen Harnstoff (NF437), sowie den Sulfonsäuren in Position 3 gemeinsam mit der Einführung von Methylenbrücken (NF439).

*Tabelle 4.4: Prozentuale Hemmung von NF110 und dessen Derivate (10  $\mu$ M) der Kontraktionen der prostatistischen Segmente des Ratten-Vasdeferens (ratVD), ausgelöst durch 10  $\mu$ M abmeATP (P2X<sub>1</sub>), sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI), ausgelöst durch 1  $\mu$ M abmeATP (P2X<sub>3</sub>) oder 10  $\mu$ M ADPbS (P2Y<sub>1</sub>). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-4 Einzelexperimenten. (n.b.: nicht bestimmt aufgrund Substanzmangels).*

Verbindung	P2X <sub>1</sub> (ratVD)	P2X <sub>3</sub> (GPI)	P2Y <sub>1</sub> (GPI)
NF110	21.9 ± 2.3	83.3 ± 4.9	15.3 ± 4.6
NF448	3.3 ± 2.9	n.b.	16.9 ± 5.9
NF451	1.5 ± 2.6	n.b.	0
NF436	0	n.b.	11.7 ± 2.7
NF439	1.9 ± 3.4	n.b.	7.0 ± 6.7
NF437	1.6 ± 2.8	n.b.	5.6 ± 6.3
NF445	2.02 ± 1.2	6.46 ± 3.6	13.8 ± 7.6

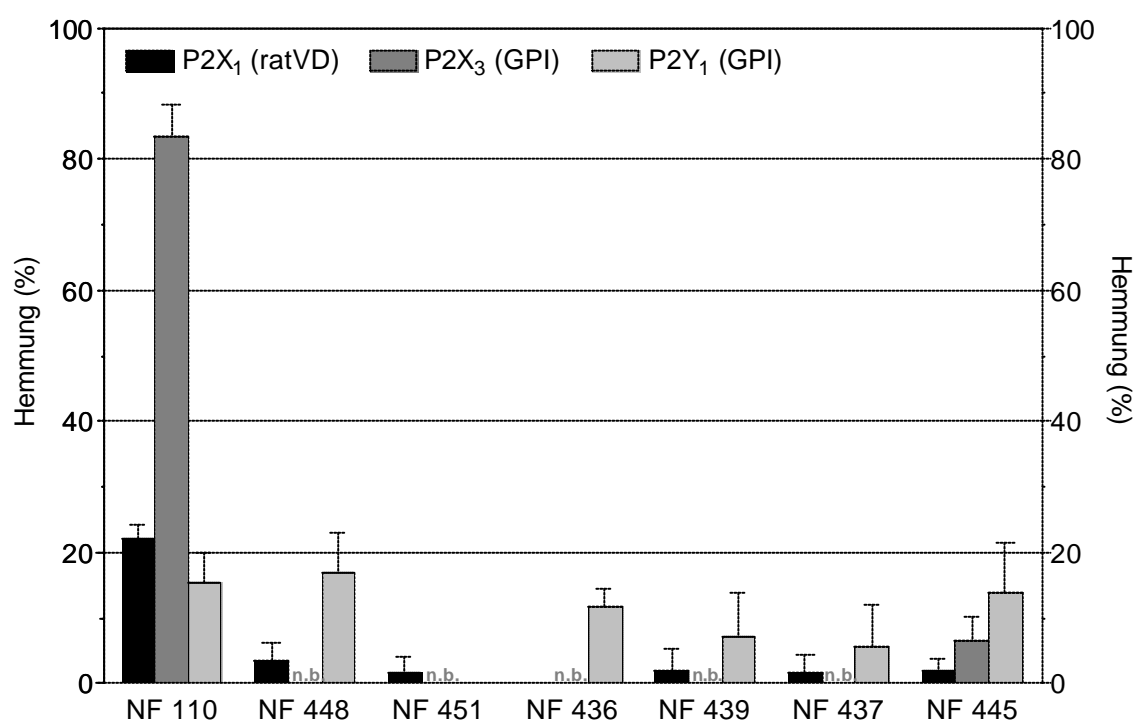


Abb. 4.27: Balkendiagramm der in Tabelle 4.4 aufgelisteten prozentualen Hemmungen von NF110 und dessen Derivaten. n.b. = nicht bestimmt. ratVD = Vas deferens der Ratte. GPI = Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.



#### 4.4. Screening von NF449-Analoga an nativen P2 Rezeptoren

Ausgehend von der Leitstruktur NF449 wurde die Bedeutung des zentralen Harnstoffes, der Einfluss der Sulfonsäurenposition der äußeren Phenylringe, sowie der Ersatz der Sulfonsäure-substituierten Phenylringe durch Sulfonsäure-substituierte Naphthalinringe auf die P2-antagonistische Aktivität untersucht. Da es sich bei den 'Schmetterling'-Strukturen um Verbindungen handelt, die sich aus zwei symmetrischen Monomeren bivalent zusammensetzen, wurden auch die Monomere auf antagonistische Eigenschaften an den Rezeptorsystemen P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> geprüft. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 und Abb. 4.33 zusammengestellt.

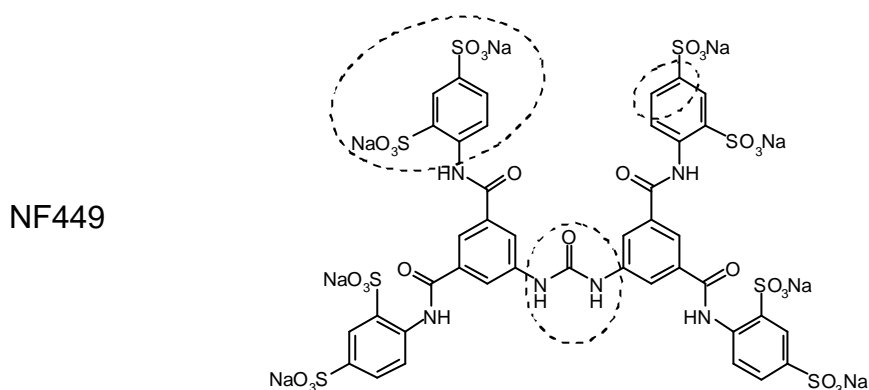


Abb. 4.28: Chemische Strukturformel der Verbindung NF449 und exemplarisch die Variationsansätze im Molekül.

##### 4.4.1. Variation der Sulfonsäurenposition

Die Sulfonsäurenposition wurde von Position 2-4 zu 2-5 umgewandelt (NF867).

NF867

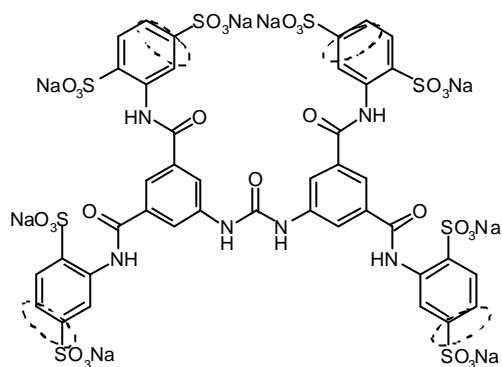


Abb. 4.29: Chemische Strukturformel von NF867.

#### 4.4.2. Variation des zentralen Harnstoffes

Der zentrale Harnstoff in der Verbindung NF449 wurde durch Einführung einer Terephthalsäure-Diamidstruktur ersetzt (NF450).

NF450

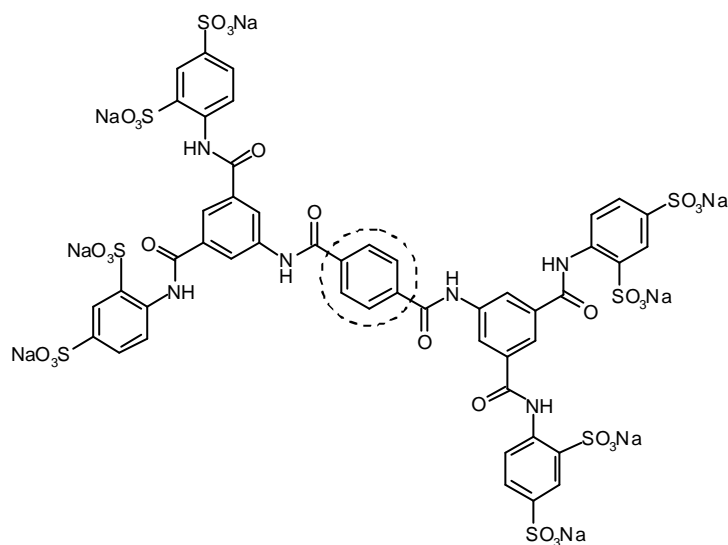


Abb. 4.30: Chemische Strukturformel von NF450.

#### 4.4.3. Austausch der Sulfonsäure-substituierten Phenylringe

Die zweifach Sulfonsäure-substituierten Phenylringe wurden durch dreifach Sulfonsäure-substituierte Naphthalinringe ersetzt (NF864).

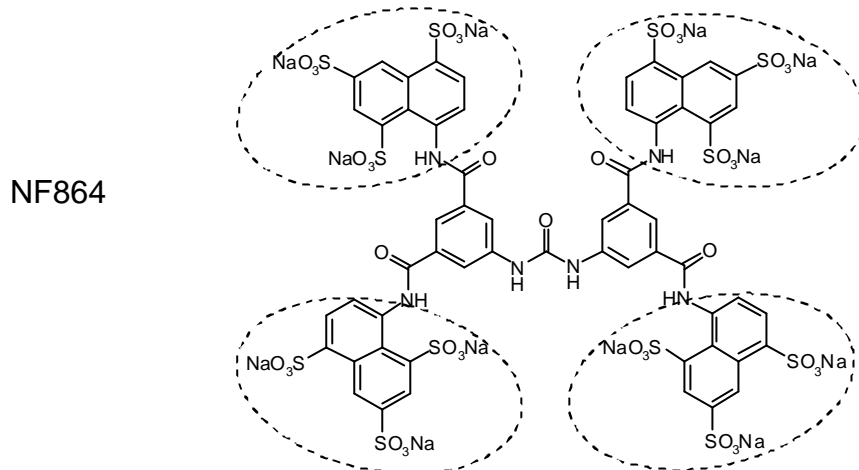
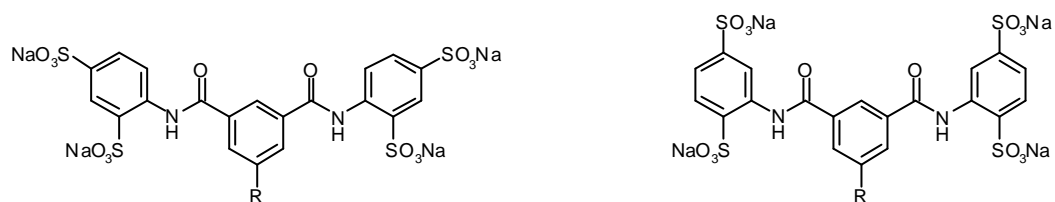


Abb. 4.31: Chemische Strukturformel von NF864.

#### 4.4.4. Monomere der 'Schmetterling'-Verbindungen

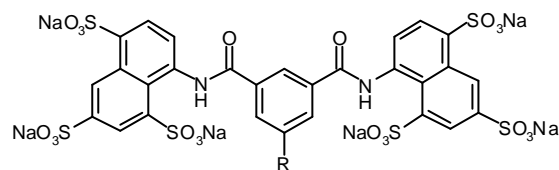


NF860: R = NO<sub>2</sub>

NF865: R = NO<sub>2</sub>

NF861: R = NH<sub>2</sub>

NF866: R = NH<sub>2</sub>



NF862: R = NO<sub>2</sub>

NF863: R = NH<sub>2</sub>

Abb. 4.32: Chemische Strukturformeln der monomeren Verbindungen NF860, NF861, NF862, NF863, NF865 und NF866.

NF449 stellte den potentesten P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten dar (Tabelle 4.5 und Abb. 4.33). Die Umwandlung der 1-4- zur 1-5-Substitution führte zu einer drastischen Reduktion der antagonistischen Aktivität (NF867) am P2X<sub>1</sub>

Rezeptor. Die Einführung einer Terephthalsäure-Diamidstruktur anstelle des zentralen Harnstoffes (NF450) oder der Ersatz der äußeren Phenylringe durch dreifach Sulfonsäure-substituierte Naphthalinringe führte zu einer geringen Abnahme des Antagonismus am P2X<sub>1</sub> Rezeptor. Während nach Variation der Sulfonsäurenposition analog zur Hemmung des P2X<sub>1</sub> Rezeptors auch die antagonistische Aktivität am P2X<sub>3</sub> Rezeptor fast vollständig abnahm, wurde durch den Ersatz des zentralen Harnstoffes durch Terephthalsäure die Hemmung des P2X<sub>3</sub> Rezeptors deutlich gesteigert. NF450 stellte innerhalb der untersuchten Substanzen den potentesten P2X<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten dar. Interessanterweise blockierte die Amino-Vorstufe des Naphthalin-substituierten Derivates (NF863) im gleichen Ausmaß P2X<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen wie sein Dimeres (NF864). Die Variation der Sulfonsäurenposition führte zu keiner Änderung des Antagonismus am P2Y<sub>1</sub> Rezeptor, während der Ersatz des zentralen Harnstoffes durch Terephthalsäure zu einer deutlichen Abnahme der antagonistischen Aktivität führte. Der Ersatz der äußeren Phenylringe mit dreifach Sulfonsäure-substituierten Naphthalinringen steigerte sowohl die Hemmwirkung der Monomeren wie auch der dimeren Verbindung NF864, als potentesten P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten.

*Tabelle 4.5: Prozentuale Hemmung von NF449 und dessen Derivaten (10  $\mu$ M) der Kontraktionen der prostatistischen Segmente des Ratten-Vas-deferens (ratVD), ausgelöst durch 10  $\mu$ M abmeATP (P2X<sub>1</sub>), sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI), ausgelöst durch 1  $\mu$ M abmeATP (P2X<sub>3</sub>) oder 10  $\mu$ M ADPbS (P2Y<sub>1</sub>). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-4 Einzelerperimenten.*

Verbindung	P2X <sub>1</sub> (ratVD)	P2X <sub>3</sub> (GPI)	P2Y <sub>1</sub> (GPI)
NF450	85.8 $\pm$ 0.01	78.7 $\pm$ 5.3	19.9 $\pm$ 11.0
NF449	98.8 $\pm$ 1.2	61.7 $\pm$ 8.9	54.6 $\pm$ 4.7
NF861	1.8 $\pm$ 0.4	0	14.4 $\pm$ 1.5
NF860	0.1 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 5.8	14.3 $\pm$ 4.9
NF867	11.8 $\pm$ 5.8	4.6 $\pm$ 2.7	55.0 $\pm$ 3.0
NF866	0	0	6.5 $\pm$ 3.3
NF865	3.2 $\pm$ 1.7	5.1 $\pm$ 5.1	7.8 $\pm$ 3.5
NF864	86.8 $\pm$ 3.2	31.9 $\pm$ 9.5	75.8 $\pm$ 4.9
NF863	3.6 $\pm$ 2.0	32.9 $\pm$ 2.9	35.6 $\pm$ 8.5
NF862	9.0 $\pm$ 4.5	15.4 $\pm$ 1.3	47.7 $\pm$ 11.1

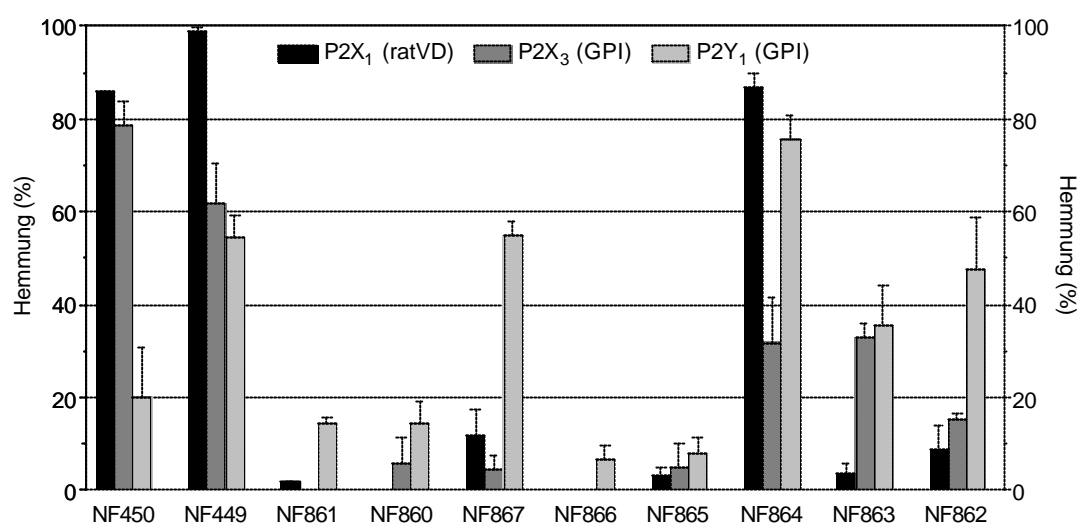


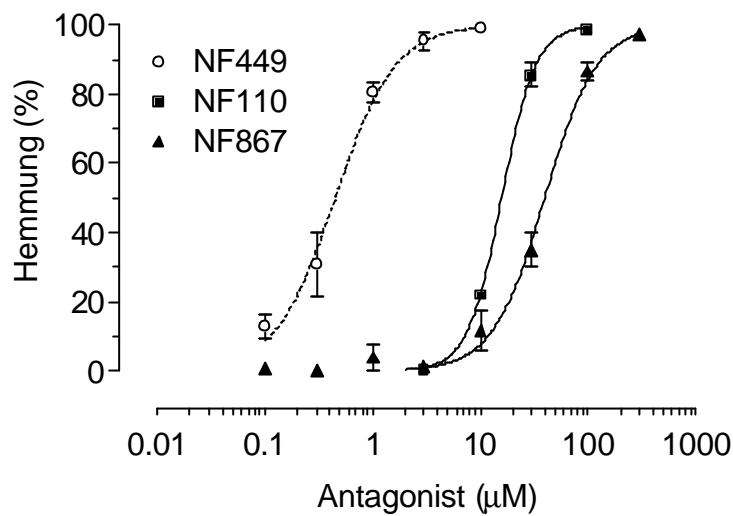
Abb. 4.33: Balkendiagramm der in Tabelle 4.5 aufgelisteten prozentualen Hemmungen von NF449 und dessen Derivaten. ratVD = Vas deferens der Ratte. GPI = Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.

## 4.5. Detaillierte Charakterisierung von NF449 Analoga

### 4.5.1. Inhibitionskurven an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren

$\alpha\beta$ meATP (10  $\mu$ M) löste schnelle transiente Kontraktionen der prostatistischen Segmente des Ratten-Vas-deferens aus (durchschnittlicher Zug  $\pm$  S.E.M.: 1369  $\pm$  27 mg, n = 87), die konzentrationsabhängig durch die Verbindungen NF110, NF449, NF450, NF864 und NF867 vollständig gehemmt wurden (Abb. 4.34). Die nichtlineare Regressionsanalyse der gemittelten Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelisteten pIC<sub>50</sub>-Werte. Als Referenzsubstanz für das trisulfonierte Naphthalinring-Derivat NF864 diente die 2- statt 4-armige Verbindung NF023.

A.



B.

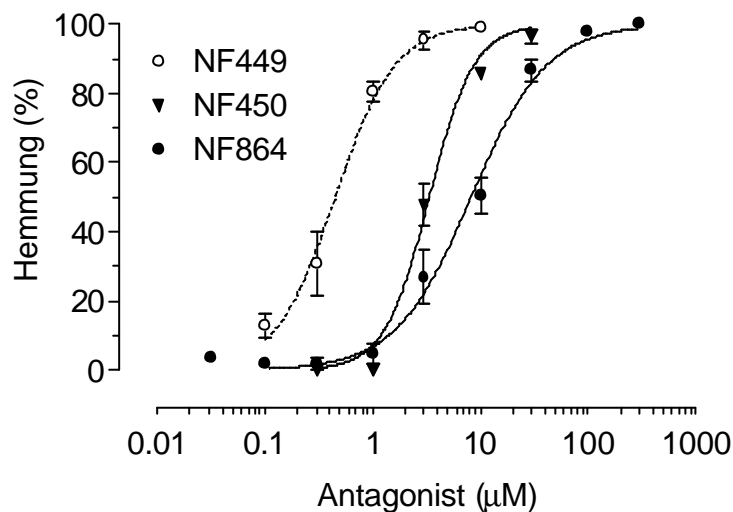
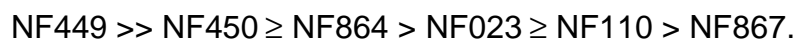


Abb. 4.34: Inhibitionskurven von NF449, sowie der Verbindungen (A.) NF110 und NF867 und (B.) NF450 und NF864 an prostatischen Segmenten des Vas deferens der Ratte. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n = 3$ ) der prozentualen Hemmung der Kontraktionen, die durch Einzelgaben von 10 mM abmeATP hervorgerufen wurden. Die entsprechenden  $pIC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelistet.

Alle Strukturvariationen von NF449 führten zu einer verminderten Hemmung des  $P2X_1$  Rezeptors. Die Sulfonsäureanzahl und -position ist von entscheidender Bedeutung für die antagonistische Potenz an  $P2X_1$  Rezeptoren.

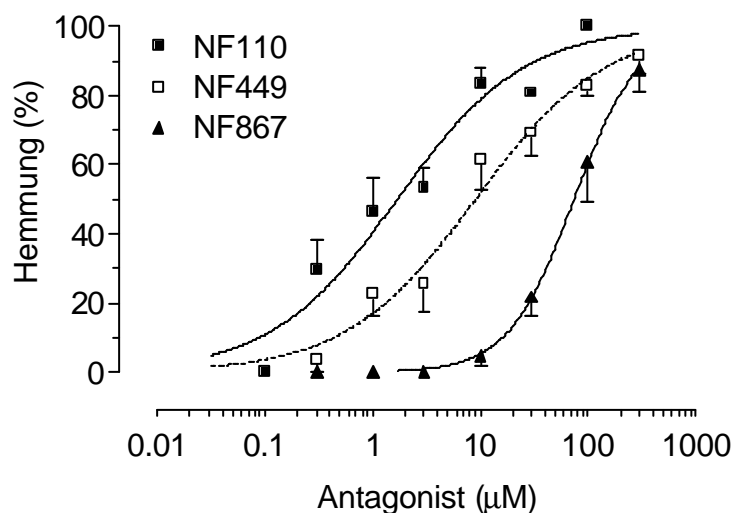
Im Vergleich zu NF449 führte die Entfernung der Sulfonsäuren in Position 2 (NF110) zu einem drastischen Wirkungsverlust (32-fach). Noch schwächer (81-fach) wirksam ist die Verbindung NF867, in der die Sulfonsäuresubstitution der terminalen Phenylringe zu Position 2-5 variiert wurde. Wird anstelle des zentralen Harnstoffes eine Terephthalsäurediamid-Gruppe eingeführt (NF450), werden P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte Kontraktionen 7-fach schwächer gehemmt. Die Trisulfonaphthalinring-substituierte Verbindung NF864 ist am P2X<sub>1</sub> Rezeptor ca. 10-fach weniger potent als NF449. NF864 ist 2.5-fach potenter als NF023, das die gleiche Struktur ohne die zwei zusätzlichen Arme der 'Schmetterling'-Verbindung NF864 besitzt. Es ergibt sich folgende Rangfolge der inhibitorischen Potenz:



#### 4.5.2. Inhibitionskurven an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren

$\alpha\beta\text{meATP}$  (1  $\mu\text{M}$ ) löste schnelle transiente Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum aus (durchschnittlicher Zug  $\pm$  S.E.M.:  $1277 \pm 47$  mg, n = 112), die konzentrationsabhängig durch die Verbindungen NF110, NF449, NF450, NF864 und NF867 vollständig gehemmt wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse der gemittelten Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelisteten pIC<sub>50</sub>-Werte.

A.





B.

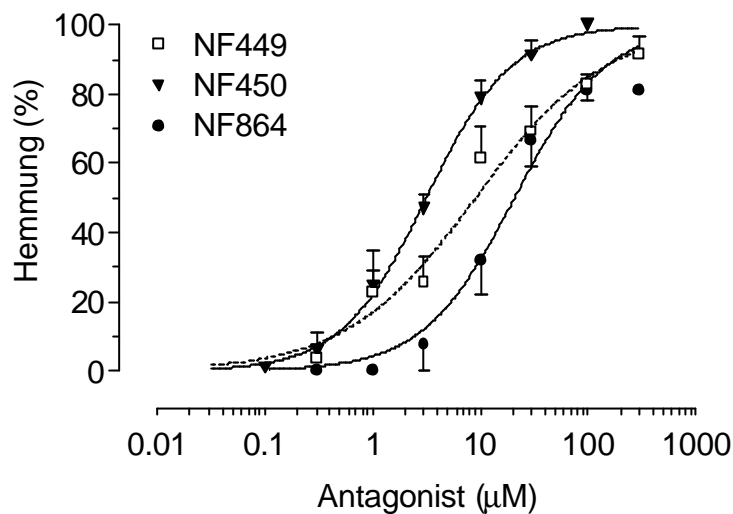
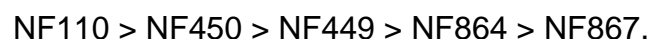


Abb. 4.35: Inhibitionskurven von NF449, sowie der Verbindungen (A.) NF110 und NF867 und (B.) NF450 und NF864 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n = 4-6$ ) der prozentualen Hemmung der Kontraktionen, die durch Einzelgaben von 1  $\mu\text{M}$  abmeATP hervorgerufen wurden. Die entsprechenden  $p\text{IC}_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelistet.

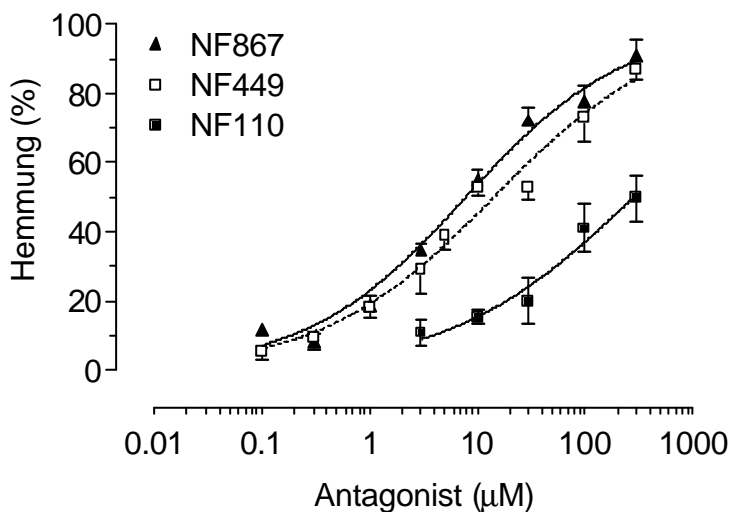
Auch am  $\text{P2X}_3$  Rezeptor ist die Stellung und Anzahl der Sulfonsäuren an den terminalen Phenylringen von großem Einfluss auf den Antagonismus. Das 4-Monosulfophenylderivat NF110 war an  $\text{P2X}_3$  Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum der potenteste Antagonist. Im Vergleich zu NF449 mit weiteren Sulfonsäuren in Position 2 stieg die antagonistische Potenz von NF110 5-fach an. Die Variation der Sulfonsäuresubstitution von 2-4 zu 2-5 in der Verbindung NF867 führte zu einem 8-fachen Wirkungsverlust. Der Austausch der Disulfophenylringe mit Trisulfonaphthylringen (NF864) führt lediglich zu einem schwachen, 1.5-fachen Verlust der antagonistischen Potenz an  $\text{P2X}_3$  Rezeptoren. Somit ergibt sich die folgende inhibitorische Rangfolge:



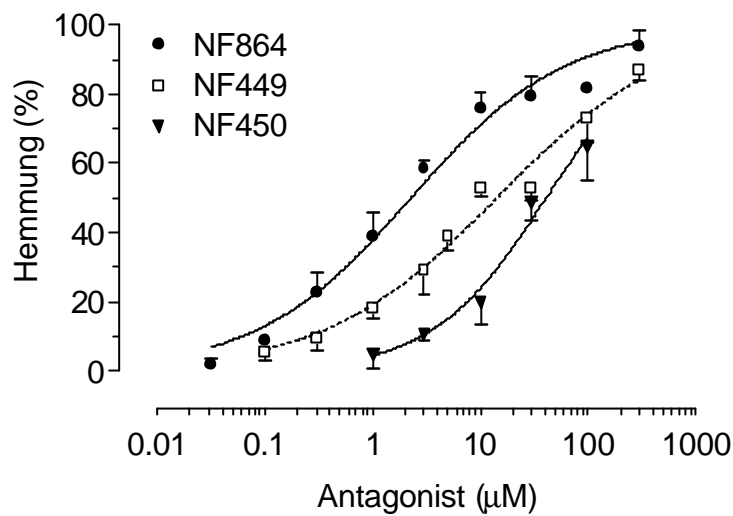
### 4.5.3. Inhibitionskurven an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren

ADP $\beta$ S (10  $\mu$ M) löste schnelle transiente Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum aus (durchschnittlicher Zug  $\pm$  S.E.M: 1476  $\pm$  30 mg, n = 172), die konzentrationsabhängig durch die Verbindungen NF110, NF449, NF450, NF862, NF863, NF864 und NF867 gehemmt wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse der gemittelten Inhibitionskurven ergab die in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelisteten pIC<sub>50</sub>-Werte. Bei der Durchführung der Inhibitionskurve von NF449 fiel auf, dass sich der Kurvenverlauf leicht biphasisch verhielt. Dies führte zu weiteren, in Kapitel 4.6 beschriebenen Untersuchungen. Vereinfacht wurde in den folgenden Abbildungen ein monophasischer Kurvenverlauf der Inhibitionskurve von NF449 dargestellt.

A.



B.



C.

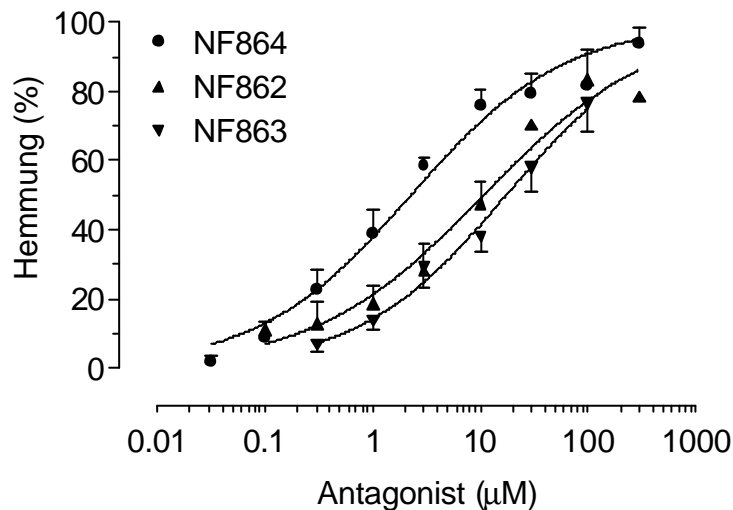


Abb. 4.36: Inhibitionskurven der Verbindungen (A.) NF110 und NF867, (B.) NF450 und NF864, sowie der Leitstruktur NF449 (gestrichelte Linie) und (C.) NF864, NF862 und NF863 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $n = 3-4$ ) der prozentualen Hemmung der Kontraktionen, die durch Einzelgaben von  $10 \text{ mM ADP}\beta\text{S}$  hervorgerufen wurden. Die entsprechenden  $pIC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.6 und Abb. 4.37 aufgelistet.

Der potenteste Antagonist an  $P2Y_1$  Rezeptoren war die Trisulfonsäure-substituierte Naphthyl-Verbindung NF864. Sie antagonisierte die  $ADP\beta\text{S}$ -

ausgelösten Kontraktionen 13-fach stärker als NF449. Auch die monomeren Vorstufen NF862 und NF863 der Verbindung NF864 inhibierten den P2Y<sub>1</sub> Rezeptor. Ihre inhibitorische Wirkstärke war equivalent zur Leitstruktur NF449. Interessanterweise blieb die Hemmung nach Variation der Sulfonsäuresubstitution konstant, d.h. NF867 inhibierte nur ca. 2-fach stärker P2Y<sub>1</sub>-vermittelte Kontraktionen der Meerschweinchen-Ileum Longitudinalmuskulatur als NF449. Nach Ersatz des zentralen Harnstoffes durch Einführen einer Terephthalsäuredieamid-Struktur (NF450) erfolgte ein Wirkverlust um den Faktor 3. Am drastischsten ließ die inhibitorische Potenz durch Entfernen der Sulfonsäure in Position 2 (NF110) nach. NF110 stellte einen 20-fach schwächeren Antagonisten an nativen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren dar als NF449. Somit ergab sich eine inhibitorische Rangfolge von:

NF864 >> NF867 = NF862 = NF863 = NF449 > NF450 >> NF110.

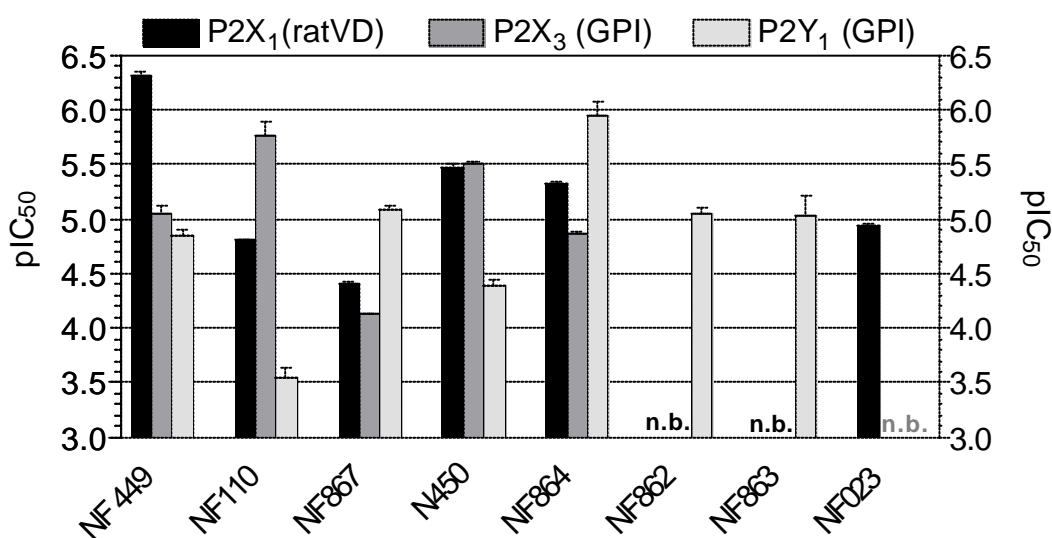


Abb. 4.37: Balkendiagramm der  $pIC_{50}$ -Werte aus Tabelle 4.6 von NF449 und seinen Analoga. n.b. = nicht bestimmt. ratVD = Vas deferens der Ratte. GPI = Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.

*Tabelle 4.6: pIC<sub>50</sub>-Werte von NF449 und seiner Analoga an prostatiscen Segmenten des Ratten-Vas-deferens [P2X<sub>1</sub> (ratVD); Kontraktionen ausgelöst durch Einzelgaben von 10 mM abmeATP], sowie der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum [P2X<sub>3</sub> (GPI); Kontraktionen ausgelöst durch Einzelgaben von 1 mM abmeATP] bzw. [P2Y<sub>1</sub> (GPI); Kontraktionen ausgelöst durch Einzelgaben von 10 mM ADPbS]. Die Daten sind Mittelwerte ± S.E.M. aus 3-6 Einzelexperimenten. n.b.: nicht bestimmt.*

Verbindung	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.
	P2X <sub>1</sub> (ratVD)	P2X <sub>3</sub> (GPI)	P2Y <sub>1</sub> (GPI)
NF449	6.31 ± 0.04	5.04 ± 0.08	4.85 ± 0.06
NF110	4.80 ± 0.01	5.77 ± 0.12	3.55 ± 0.09
NF867	4.40 ± 0.02	4.13 ± 0.01	5.08 ± 0.04
NF450	5.47 ± 0.04	5.50 ± 0.02	4.39 ± 0.06
NF864	5.32 ± 0.02	4.87 ± 0.02	5.95 ± 0.13
NF862	n.b.	n.b.	5.05 ± 0.06
NF863	n.b.	n.b.	5.03 ± 0.19
NF023	4.93 ± 0.03	n.b.	n.b.

#### 4.5.4. Hemmung von Ektonukleotidasen

Die hemmende Aktivität von NF449 und seinen Analoga (300 bzw. zusätzlich 100 µM bei der Verbindung NF450) auf den ATP Metabolismus durch Ektonukleotidasen von *Xenopus leavis* Oozyten wurde untersucht. In Abwesenheit der Antagonisten wurden im Durchschnitt  $3.01 \pm 0.15$  nmol P<sub>i</sub>/Oozyte (Kontrolle) und  $2.54 \pm 0.12$  nmol P<sub>i</sub>/Oozyten (Zeitkontrolle) in 30-minütiger Inkubation mit 100 µM ATP gebildet (n =23). Mit der berechneten Ratio daraus,  $1.19 \pm 0.05$ , wurde die enzymatische Aktivität in Anwesenheit der Testsubstanzen korrigiert (siehe 3.2.3.). Die in Anwesenheit der

Testsubstanzen verminderte Bildung von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) aus 100  $\mu\text{M}$  ATP ist in Tabelle 4.7 aufgelistet.

*Tabelle 4.7: Hemmung des ATP-Abbaus durch Ektonukleotidasen von *Xenopus leavis* Oozyten durch NF449 und Analoga (300nM). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 8-12 Einzelbeobachtungen.*

Verbindung	Wichtiges Strukturelement	% Hemmung der $P_i$ -Bildung
NF110	4-Monosulfophenyl-	$32.3 \pm 0.19$
NF450 (100 $\mu\text{M}$ )	Terephtalsäurediamid-	$18.9 \pm 0.00$
NF450	Terephtalsäurediamid-	$77.3 \pm 12.3$
NF860	NF449-Nitro-Monomer	$28.9 \pm 2.8$
NF861	NF449-Amino-Monomer	$10.9 \pm 3.9$
NF449	2,4-Disulfophenyl-	$24.7 \pm 2.8$
NF865	NF867-Nitro-Monomer-	$15.2 \pm 0.6$
NF866	NF867-Amino-Monomer	$5.08 \pm 0.04$
NF867	2,5-Disulfophenyl-	$45.4 \pm 2.5$
NF862	NF864-Nitro-Monomer	$42.5 \pm 8.6$
NF863	NF864-Amino-Monomer	$22.9 \pm 3.9$
NF864	Trisulfonaphthalin-	$40.6 \pm 1.1$
NF023	2-armiges NF864	$71.8 \pm 3.4$

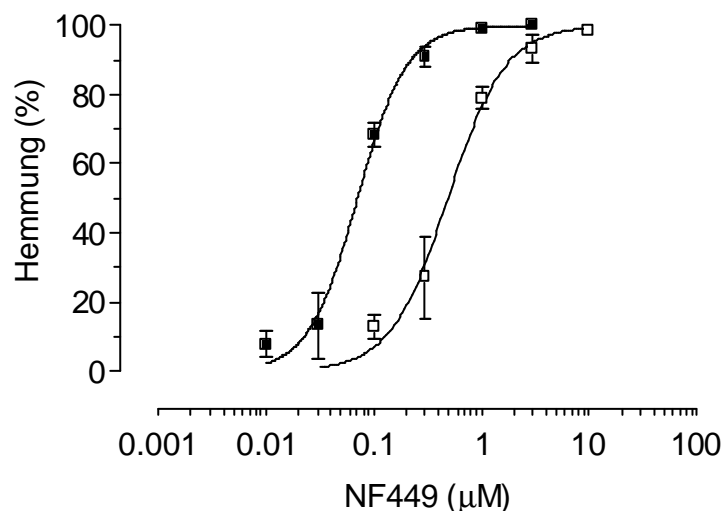
Alle Verbindungen hemmten *Xenopus leavis* Ektonukleotidasen. Am potentesten inhibierte das Terephtalsäure-Derivat NF450 den enzymatischen ATP-Abbau. Daher wurde diese Verbindung zusätzlich in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  untersucht. In dieser Konzentration stellte NF450 einen sehr schwachen Inhibitor des ATP-Metabolismus dar. Das Monosulfonsäure-Derivat NF110 inhibierte ebenso schwach wie die Leitstruktur NF449.

Interessanterweise führte die Variation der Sulfonsäure-Substitution in NF867, ebenso wie der Austausch durch das Trisulfonsäure-substituierte Naphthalinringsystem zu einer leichten Steigerung der inhibitorischen Potenz. Das zwei-armige Derivat NF023 stellte im Gegensatz dazu einen deutlich potenteren Hemmstoff dar. Betrachtet man die monomeren Vorstufen, so fällt die durchwegs stärkere inhibitorische Potenz der Nitro- im Vergleich zu den Amino-Vorstufen auf. Die Nitro-Monomere inhibierten den enzymatischen ATP-Abbau ungefähr im gleichen Ausmaß wie die daraus abgeleiteten dimeren Strukturen, während die Amino-Vorstufen eine deutlich geringere Hemmung aufzeigten. Da alle Testsubstanzen in der sehr hohen Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  lediglich zu einer Hemmung von ca. 10-77 % führten, stellen sie schwache Ekto-Nukleotidase-Inhibitoren dar.

#### 4.6. Pharmakologische Charakterisierung von NF449

Aufgrund der außergewöhnlichen Potenz von NF449 an  $\text{P2X}_1$  Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens wurden detaillierte pharmakologische Untersuchungen mit dieser Substanz durchgeführt.

##### 4.6.1. Inhibitionskurven an $\text{P2X}_1$ Rezeptoren des Vas deferens der Ratte



*Abb. 4.38: Inhibitionskurven von NF449 an prostatichen Segmenten des Ratten-Vas-deferens. Die Kontraktionen wurden durch 1 (■) bzw 10 (□)  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP ausgelöst. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. (n = 3) der prozentualen Hemmung der durch  $\alpha\beta$ meATP-ausgelösten Kontrollkontraktionen.*

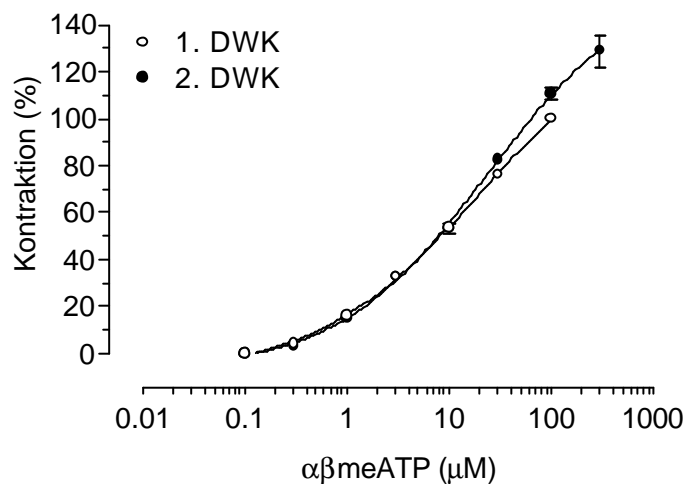
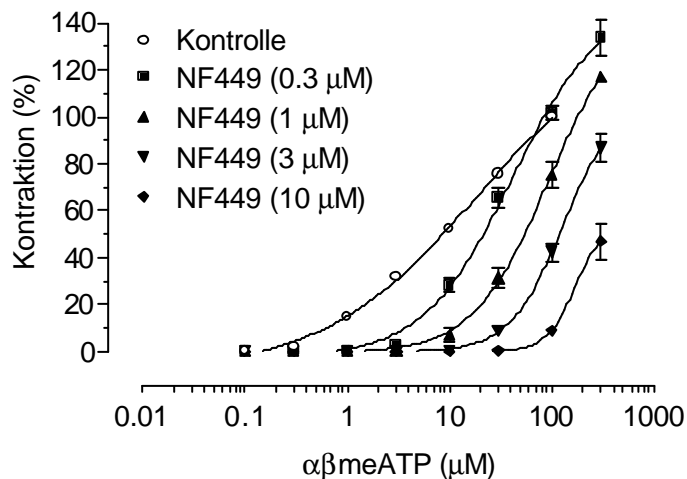
Die Inhibitionskurve verschob sich parallel nach links, nachdem die Agonistenkonzentration von 10  $\mu$ M auf 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP gesenkt wurde. Die resultierenden  $pIC_{50}$ -Werte betragen gegen 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP  $6.31 \pm 0.04$  (n = 3; siehe Tabelle 4.6 und Abb. 4.34) sowie gegen 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP  $7.15 \pm 0.03$  (n = 3).

#### **4.6.2. Effekt von NF449 auf $\alpha\beta$ meATP-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven am Vas deferens der Ratte**

Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) wurden, wie in Kapitel 3.2.1.1. beschrieben, an prostatichen Segmenten des Ratten-Vas-deferens durchgeführt. Einzelgaben steigender Konzentrationen von  $\alpha\beta$ meATP führten zu zunehmender Kontraktion des Organs, aber zu keinem klar definierbaren Maximum. Daher konnte der  $EC_{50}$ -Wert des Agonisten nicht bestimmt werden. Der nach Gabe von 100  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP maximal erreichbare Zug betrug  $2461 \pm 103$  mg (n = 12). Die DWK zeigten keine zeitabhängigen Veränderungen innerhalb der Versuchsdurchführung, da die Zeitkontrollen nahezu deckungsgleich verliefen (siehe Abb. 4.39 (A.)), daher wurde keine Korrektur aufgrund zeitabhängiger Veränderungen durchgeführt. Die Inkubation mit 0.3, 1.0, 3.0 oder 10  $\mu$ M NF449 bewirkte eine konzentrationsabhängige, parallele Rechtsverschiebung der DWK (siehe Abb. 4.39 (B.)). Zusätzlich trat eine konzentrationsunabhängige Versteilung der jeweiligen DWK in Anwesenheit des Antagonisten auf. Um zu ermitteln, ob der Antagonismus von NF449 kompetitiver Natur war, wurden  $pA_2$ -Werte nach der Schild-Gleichung ermittelt, indem die equieffektiven Konzentrationen von  $\alpha\beta$ meATP, die zu einer 15-prozentigen Kontraktion in Ab- und Anwesenheit des Antagonisten führten, abgelesen wurden. Dieses Niveau wurde gewählt, da bei 15 Prozent Kontraktion die Kurven parallel erschienen. Der entsprechende  $EC_{15}$ -Wert der DWK von  $\alpha\beta$ meATP in Abwesenheit des



Antagonisten am Vas deferens der Ratte betrug  $6.01 \pm 0.02$  (entspricht  $369 \pm 15$  mg Zug;  $n= 12$ ). Die ermittelten  $pA_2$ -Werte sind in Tabelle 4.8 aufgelistet. Wie deutlich zu erkennen ist, unterliegen die Einzel- $pA_2$ -Werte keiner Konzentrationsabhängigkeit und weichen nicht voneinander ab. Zusätzlich wurde eine komplette Schild-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 4.39 (C.)). Die Regression nach Arunlakshana und Schild (Arunlakshana et al., 1959) war linear mit einer Steigung von  $0.97 \pm 0.05$  (nicht signifikant von 1 verschieden) und ergab einen  $pA_2$ -Wert von  $7.15 \pm 0.03$  (Steigung = 1). Alle diesen Daten sprechen dafür, dass NF449 einen kompetitiven Antagonisten an  $P2X_1$  Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens darstellt.

**A.****B.**

C.

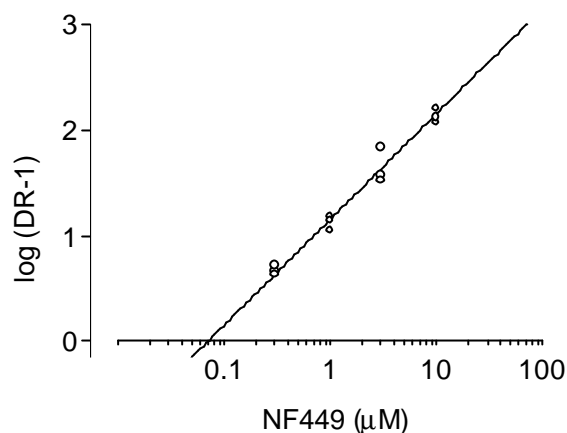


Abb. 4.39: (A., B.) DWK der  $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktionen von prostatistischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens. (A.) Zeigt die Zeitkontrollen, (B.) zeigt den konzentrationsabhängigen Antagonismus von NF449. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 4 Einzelerperimenten. Die Schild-Analyse (C.) ergab eine Steigung von  $0.97 \pm 0.05$  (nicht signifikant von 1 verschieden) und einen  $pA_2$ -Wert (Steigung = 1) von  $7.15 \pm 0.03$ .

Tabelle 4.8: Einzel- $pA_2$ -Werte der Verbindung NF449 für die Hemmung der  $\alpha\beta$ meATP-induzierten Kontraktionen der prostatistischen Segmente des Ratten-Vas-deferens, ermittelt auf dem 15%-Niveau der Kontraktion. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 4 Einzelerperimenten.

NF449	0.3 $\mu$ M	1.0 $\mu$ M	3.0 $\mu$ M	10 $\mu$ M
$pA_2$ -Wert	$7.19 \pm 0.03$	$7.12 \pm 0.04$	$7.17 \pm 0.10$	$7.13 \pm 0.04$

#### 4.6.3. Kinetik und Reversibilität an $P2X_1$ Rezeptoren

Die Kinetik des Antagonismus von 10  $\mu$ M NF449 wurde am Ratten-Vas-deferens untersucht. Die folgende Abbildung 4.40 zeigt eine vollständige Hemmung der durch Einzelgaben von 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP-ausgelösten und  $P2X_1$ -Rezeptor-vermittelten Kontraktionen innerhalb der ersten dreißig Minuten und eine vollständige Reversibilität durch Auswaschen der Substanz nach 90-120

Minuten. NF449 stellt damit einen P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten dar, der schnell anflutet und sich, zwar langsam, aber vollständig auswaschen lässt.

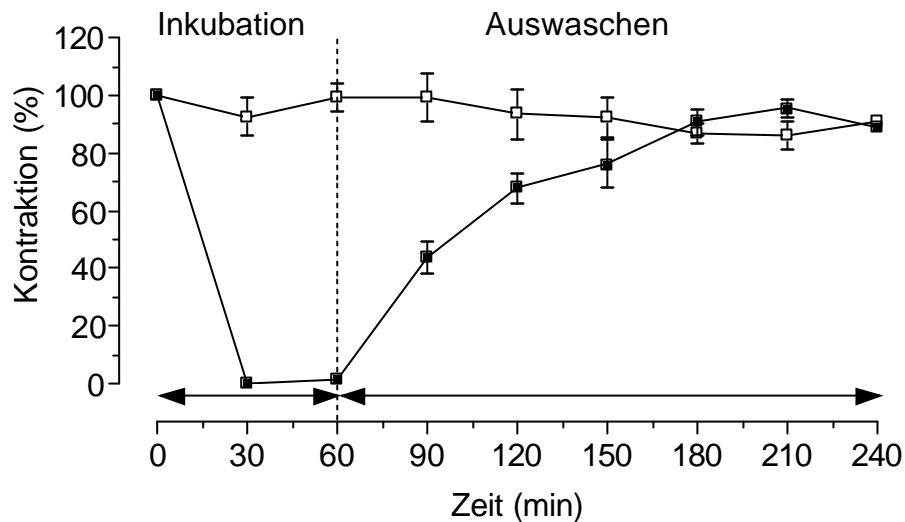


Abb. 4.40: Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 10  $\mu$ M NF449 (■) für durch Einzelgaben von *abme*ATP (10  $\mu$ M, alle 30 Minuten) induzierte Kontraktionen der prostatichen Segmente des Ratten-Vas-deferens. Die offenen Quadrate (□) beschreiben die kontraktile Antwort der Organe in den Zeitkontrollen. Die Daten sind Mittelwerte S.E.M. aus 3 Einzelexperimenten.

#### 4.6.4. Inhibitionskurven an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum

Um den unter 4.5.3. erwähnten, leicht biphasischen Kurvenverlauf der Hemmung von NF449 an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren näher aufzuklären, wurde die Agonistenkonzentration von 10 auf 1  $\mu$ M ADP $\beta$ S gesenkt. Unter der Annahme, dass eventuell zwei unterschiedliche, Kontraktions-vermittelnde Rezeptor-Subtypen für ADP $\beta$ S konzentrationsabhängig durch NF449 gehemmt werden, sollte der Subtyp, der durch geringere Konzentrationen von NF449 inhibiert wird, isoliert betrachtet werden, indem eine geringere Agonistenkonzentration verwendet wurde. Die nach links verschobene Inhibitionskurve gegen 1  $\mu$ M ADP $\beta$ S wies keinen biphasischen Kurvenverlauf mehr auf (siehe Abb. 4.41).

Die resultierenden  $pIC_{50}$ -Werte betragen gegen  $10 \mu M$  ADP $\beta$ S  $4.85 \pm 0.06$  ( $n = 2-10$ ) bei Auswertung als monophasische Kurve,  $5.86 \pm 0.15$  ( $pIC_{501}$ ) und  $4.02 \pm 0.12$  ( $pIC_{502}$ ) bei Auswertung als biphasische Kurve, sowie gegen  $1 \mu M$  ADP $\beta$ S  $5.67 \pm 0.16$  ( $n = 24$ ). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zwei verschiedene ADP $\beta$ S-sensitive Rezeptor-Subtypen mit unterschiedlicher Affinität konzentrationsabhängig von NF449 inhibiert werden. Der eine Rezeptor-Subtyp wird dabei von geringeren NF449-Konzentrationen bereits inhibiert ( $pIC_{501} = 5.86$  bzw.  $pIC_{50} = 5.67$ ), während der zweite Rezeptor-Subtyp erst durch höhere Konzentrationen an NF449 gehemmt wird ( $pIC_{502} = 4.02$ ).

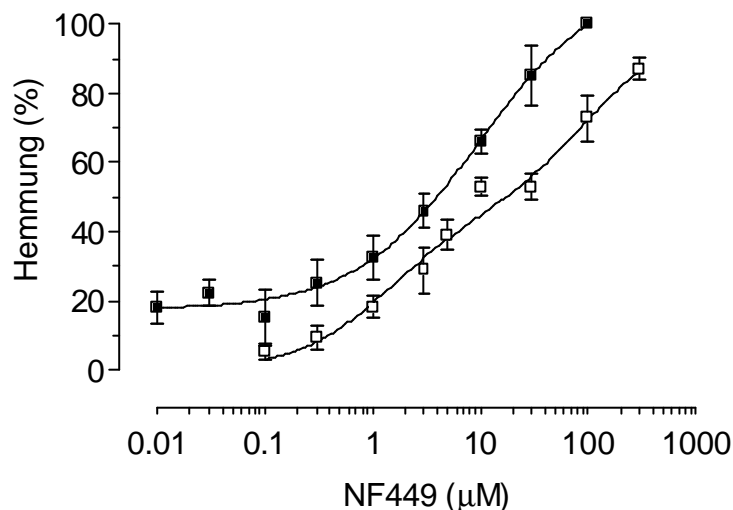
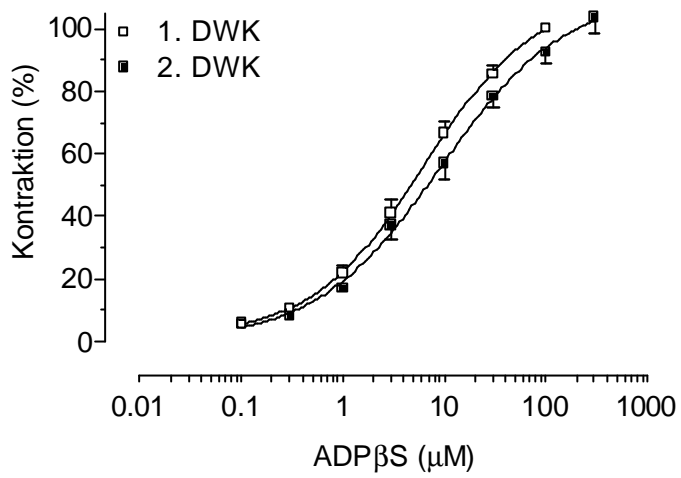
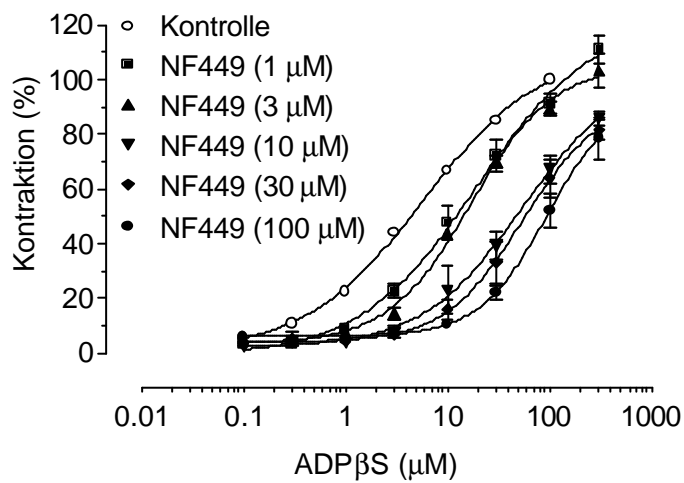
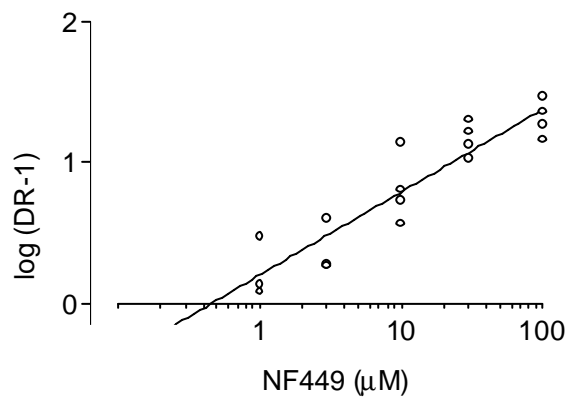


Abb. 4.41: Inhibitionskurven von NF449 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Die Kontraktionen wurden durch  $1$  (■)  $mM$  (monophasischer Kurvenverlauf) bzw.  $10$  (□)  $mM$  (biphasischer Kurvenverlauf) ADP $\beta$ S ausgelöst. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3-4$ ) für die prozentuale Hemmung der durch ADP $\beta$ S-ausgelösten Kontraktionen.

#### 4.6.5. Effekt von NF449 auf ADP $\beta$ S-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum

Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) wurden, wie in Kapitel 3.2.2.1. beschrieben, an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum durchgeführt.

Einzelgaben steigender Konzentrationen von ADP $\beta$ S führten zu zunehmender Kontraktion des Organs. Der nach Gabe von 100  $\mu$ M ADP $\beta$ S maximal erreichbare Zug betrug  $2255 \pm 123$  mg ( $n = 16$ ). Die DWK zeigten keine zeitabhängigen Veränderungen innerhalb der Versuchsdurchführung, da die Zeitkontrollen nahezu deckungsgleich verliefen (siehe Abb. 4.42 (A.)). Daher wurde keine Korrektur aufgrund zeitabhängiger Veränderungen durchgeführt. Die Inkubation mit 1, 3, 10, 30 oder 100  $\mu$ M NF449 bewirkte eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der DWK in Anwesenheit des Antagonisten (siehe Abb. 4.42 (B.)) Um zu ermitteln, ob der Antagonismus von NF449 kompetitiver Natur war, wurden zunächst EinzelpA $_2$ -Werte nach der Schild-Gleichung berechnet, in dem die EC $_{50}$ -Werte von ADP $\beta$ S sowohl in Abwesenheit wie auch in Anwesenheit des Antagonisten abgelesen wurden. Der entsprechende EC $_{50}$ -Wert der DWK von ADP $\beta$ S in Abwesenheit des Antagonisten an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum betrug  $5.36 \pm 0.03$  (entspricht  $1127 \pm 62$  mg Zug;  $n = 16$ ). Die ermittelten pA $_2$ -Werte sind in Tabelle 4.9 aufgelistet. Die pA $_2$ -Werte wichen signifikant voneinander ab und nahmen mit steigender Konzentration ab (siehe Tabelle 4.9). Anschließend wurde eine komplette Schild-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 4.42 (C.)). Die Steigung des resultierenden Schild-Plots betrug  $0.59 \pm 0.06$  und war signifikant von 1 verschieden. Der Schnittpunkt mit der X-Achse ergab einen pA $_2$ -Wert von  $6.34 \pm 0.16$ . Wurde eine Gerade mit der Steigung 1 angelegt, ergab sich ein pA $_2$ -Wert von  $5.76 \pm 0.08$ . Gemeinsam mit der biphasischen Inhibitionskurve sprechen diese Daten für eine potentielle Rezeptor-Subtyp-Heterogenität in der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.

**A.****B.****C.**

*Abb. 4.42: ADP $\beta$ S-induzierte Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. (A.) Zeigt die DWK der Zeitkontrollen. (B.) Zeigt den konzentrationsabhängigen Antagonismus von NF449. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 6 Einzelerperimenten. Die Schild-Analyse (C.) ergab eine Steigung von  $0.59 \pm 0.06$  (signifikant von 1 verschieden) und einen  $pA_2$ -Wert (= Schnittpunkt mit der Abszisse) von  $6.34 \pm 0.16$ .*

*Tabelle 4.9: Einzel- $pA_2$ -Werte der Verbindung NF449, entsprechend der Hemmung von ADP $\beta$ S-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 6 Einzelerperimenten.*

NF449	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M
$pA_2$ -Werte	$6.23 \pm 0.12$	$5.90 \pm 0.11$	$5.81 \pm 0.12$	$5.69 \pm 0.06$	$5.32 \pm 0.07$

#### 4.6.6. Kinetik und Reversibilität an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren

Die Kinetik des Antagonismus von 10  $\mu$ M NF449 auf Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum, ausgelöst durch Einzelgaben von 10  $\mu$ M ADP $\beta$ S, wurde untersucht. Die folgende Abbildung 4.43 zeigt eine konstante Hemmung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Kontraktionen nach dreißig-minütiger Inkubation und eine weitgehende Reversibilität durch Auswaschen der Substanz, ebenfalls nach 30 Minuten. NF449 stellt damit einen P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten dar, der schnell anflutet und sich sehr leicht auswaschen lässt.

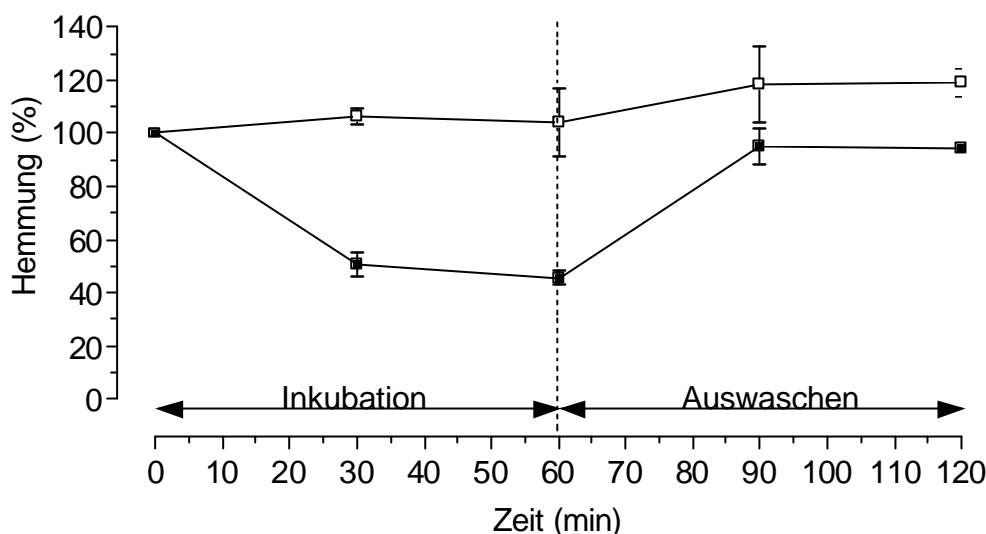


Abb. 4.43: Kinetik des Antagonismus und der Reversibilität von 10  $\mu\text{M}$  NF449 (■) auf ADPbS (10  $\mu\text{M}$ )-induzierte Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Die offenen Quadrate (□) symbolisieren die entsprechenden Daten aus den Zeitkontrollen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3 Einzelexperimenten.

#### 4.6.7. Rezeptorspezifität

Die Effekte von 100  $\mu\text{M}$  NF449 auf die durch verschiedene Agonisten ausgelösten Reaktionen der prostatistischen Segmente des Ratten-Vas-deferens ( $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor) und der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (histaminerge  $H_1$ - und muskarinerge  $M_3$ -Rezeptoren) wurden untersucht. Wie die  $pEC_{50}$ -Werte der nachfolgenden Tabelle 4.10 zeigen, weist NF449 eine sehr gute P2-Rezeptorspezifität auf. Darüber hinaus wurde durch Hohenegger und Kollegen gezeigt, dass die Bindungsaffinität von NF449 an  $\beta_1$ -Adrenozeptoren des Rattenherzens, an Adenosine  $A_1$ -Rezeptoren des humanen zerebralen Cortex sowie an Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren der Ratten Nierenrinde sehr gering ist ( $IC_{50} \gg 100 \mu\text{M}$ ) (Hohenegger et al., 1997).



*Tabelle 4.10: P2-Rezeptor-Spezifität von NF449. pEC<sub>50</sub>-Werte der Agonisten Noradrenalin (Ratten-Vas-deferens; ratVD), Histamin und Arecaidinpropargylester (APE) (Meerschweinchen-Ileum; GPI), sowohl in Abwesenheit (Kontrolle), wie auch in Anwesenheit von NF449 (100  $\mu$ M). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-4 Experimenten.*

Rezeptor/ Agonist/ Gewebe	Kontrolle	NF449 (100 $\mu$ M)
$\alpha_{1A}$ / Noradrenalin/ ratVD*	5.29 $\pm$ 0.06	5.37 $\pm$ 0.05
H <sub>1</sub> / Histamin/ GPI	6.50 $\pm$ 0.04	6.63 $\pm$ 0.03
M <sub>3</sub> / APE/ GPI	7.81 $\pm$ 0.01	7.97 $\pm$ 0.01

\* Experimente wurden von M. Ganso durchgeführt.

#### **4.7. Inhibitionskurven von MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum**

Frau Dr. Sittah Czeche hatte bereits im Rahmen ihrer Doktorarbeit, den inhibitorischen Effekt des als P2Y<sub>1</sub>-selektiv eingeführten P2 Antagonisten MRS2179 an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum untersucht (Czeche, 2001). Analog zu den Versuchen mit NF449 (siehe 4.6.4.), wurde die Agonistenkonzentration von 10 auf 1  $\mu$ M ADP $\beta$ S gesenkt (siehe Abb. 4.44). Beide Inhibitionskurven wurden zwar rechnerisch durch einen monophasischen Kurvenverlauf am besten beschrieben, die Einzelwerte wichen aber besonders im niedrigen Konzentrationsbereich sichtbar von einem idealen sigmoidalen Verlauf ab. Die resultierenden pIC<sub>50</sub>-Werte betragen gegen 10  $\mu$ M ADP $\beta$ S 5.37  $\pm$  0.06 (n = 4), sowie gegen 1  $\mu$ M ADP $\beta$ S 6.34  $\pm$  0.07 (n = 2-4). Um die Natur des Antagonismus von MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum näher zu untersuchen, wurde eine komplette Schild-Analyse von MRS2179 durchgeführt.

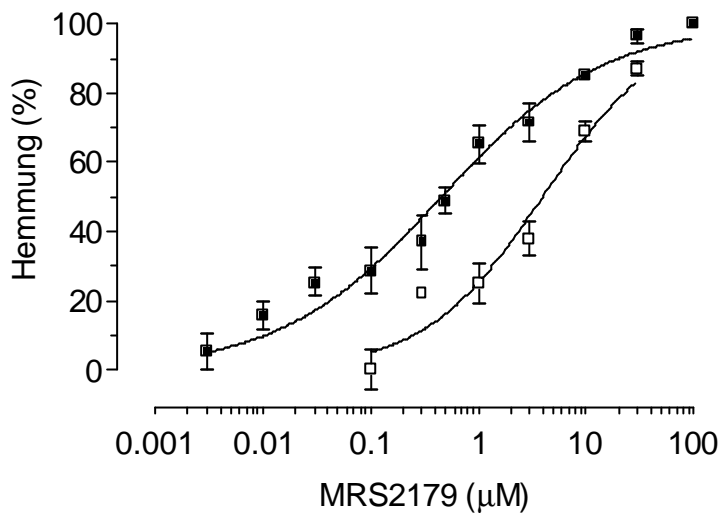


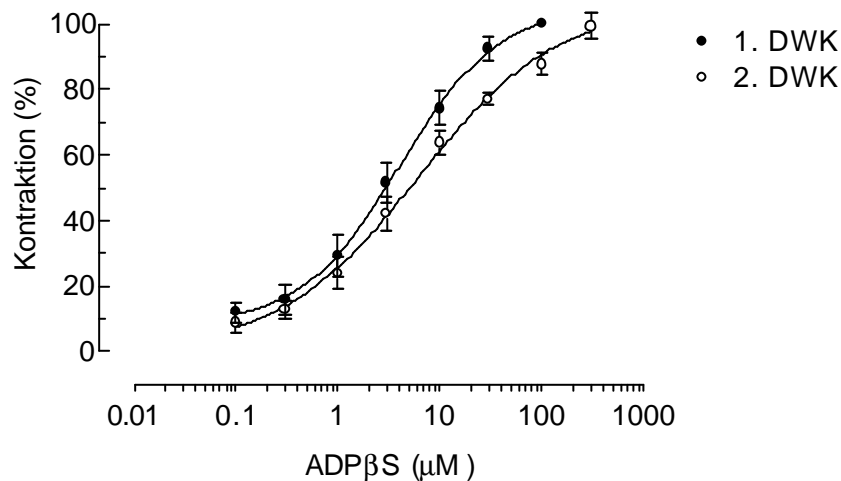
Abb. 4.44: Inhibitionskurven von MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Die Kontraktionen wurden durch 1 (■) mM bzw 10 (□) mM ADPβS (Daten: Czeche, 2001) ausgelöst. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n = 2-4$ ) für die prozentuale Hemmung der durch ADPβS-ausgelösten Kontraktionen.

#### 4.8. Schild-Analyse von MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum

MRS 2179 stellt an mit P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren-transfizierten Zelllinien einen reinen, kompetitiven P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten dar (Boyer et al. 1998). Daher wurde, zum Vergleich der Ergebnisse von NF449 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum, eine komplette Schild-Analyse der Verbindung MRS2179 durchgeführt. Einzelgaben steigender Konzentrationen von ADPβS führten zu zunehmender Kontraktion des Organs. Der nach Gabe von 100 µM ADPβS maximal erreichbare Zug betrug  $2037 \pm 76$  mg ( $n = 18$ ). Die DWK zeigten keine zeitabhängigen Veränderungen innerhalb der Versuchsdurchführung, da die Zeitkontrollen nahezu deckungsgleich verliefen (siehe Abb. 4.45 (A.)). Daher wurde keine Korrektur aufgrund zeitabhängiger Veränderungen durchgeführt. Die Inkubation mit 0.3, 1, 3, 10 oder 30 µM MRS2179 bewirkte eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der DWK in Anwesenheit des Antagonisten (siehe Abb.

4.45 (B.) Um zu ermitteln, ob der Antagonismus von MRS2179 kompetitiver Natur war, wurden zunächst Einzel- $pA_2$ -Werte nach der Schild-Gleichung berechnet, in dem die  $EC_{50}$ -Werte von  $ADP\beta S$  sowohl in Abwesenheit wie auch in Anwesenheit des Antagonisten abgelesen wurden. Der entsprechende  $EC_{50}$ -Wert der DWK von  $ADP\beta S$  in Abwesenheit des Antagonisten an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum betrug  $5.53 \pm 0.02$  (entspricht  $1019 \pm 38$  mg Zug;  $n = 18$ ). Die  $pA_2$ -Werte nahmen mit steigender Konzentration ab (siehe Tabelle 4.11). Anschließend wurde eine Schild-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 4.45 (C.)). Der resultierende Schild-Plot wies eine Steigung von  $0.72 \pm 0.06$  auf, die signifikant von 1 verschieden war. Der Schnittpunkt mit der X-Achse ergab einen  $pA_2$ -Wert von  $6.90 \pm 0.14$ . Wurde eine Gerade mit Steigung von 1 angelegt, resultierte ein  $pA_2$ -Wert von  $6.50 \pm 0.06$ . Diese Daten sprechen, wie auch die Daten von NF449, für eine potentielle Rezeptor-Subtyp-Heterogenität in der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum.

A.



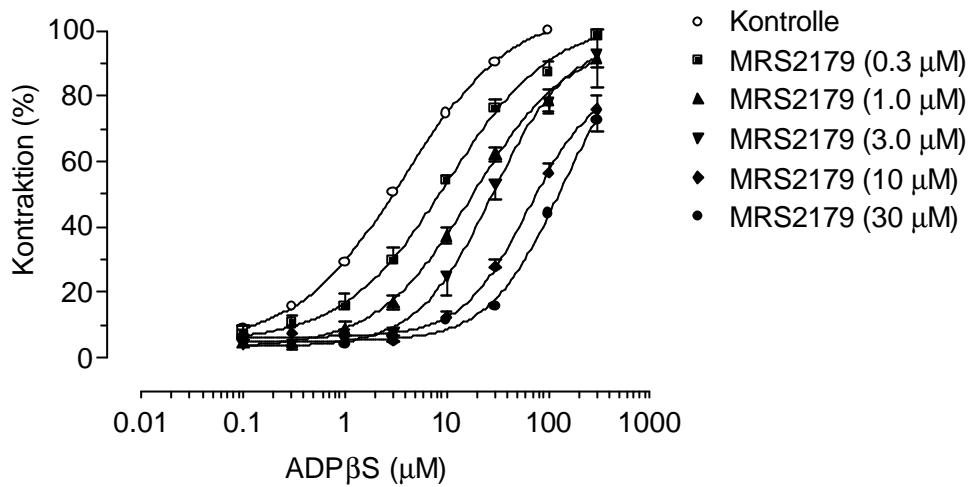
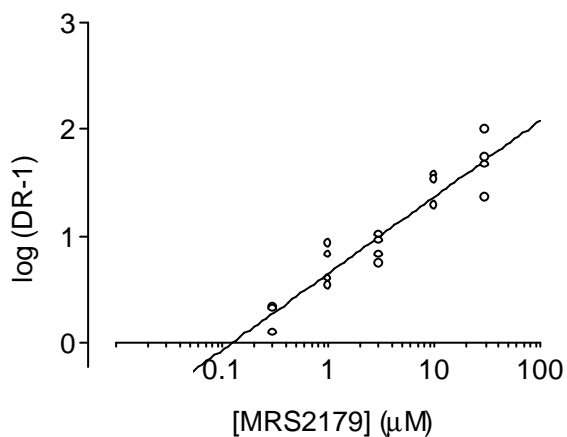
**B.****C.**

Abb. 4.45: (A., B.) ADP $\beta$ S-induzierte Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. (A.) Zeigt die DWK der Zeitkontrollen. (B.) Zeigt den konzentrations-abhängigen Antagonismus von MRS2179 (korrespondierende  $pA_2$ -Werte, siehe Tabelle 4.11). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 4 Einzelexperimenten. Die Schild-Analyse (C.) ergab eine Steigung von  $0.72 \pm 0.06$  (signifikant von 1 verschieden) und einen  $pA_2$ -Wert (= Schnittpunkt mit der Abszisse) von  $6.90 \pm 0.14$ .

*Tabelle 4.11: Einzel-pA<sub>2</sub>-Werte der Verbindung MRS2179 für die Hemmung von ADPbS-induzierten Kontraktionen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum. Die Daten sind Mittelwerte ± S.E.M. aus 4 Einzelerperimenten.*

MRS2179	0.3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	30 µM
pA <sub>2</sub> -Werte	6.77 ± 0.08	6.72 ± 0.09	6.41 ± 0.06	6.47 ± 0.09	6.21 ± 0.13

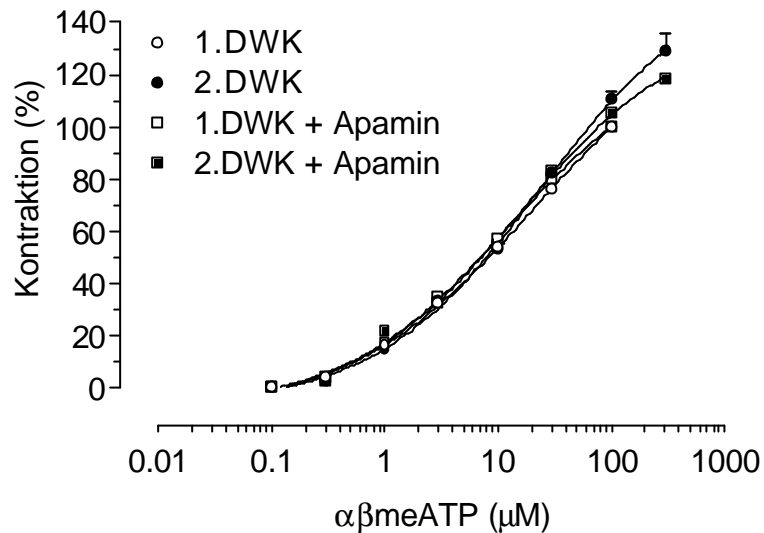
#### **4.9. Untersuchungen zur Kurvenversteilung am Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen pIC<sub>50</sub>-Werten an *Xenopus laevis* Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens**

##### **4.9.1. Hemmung eines Relaxation-vermittelnden Kaliumkanals durch Apamin**

Eine mögliche Ursache für die Versteilung der Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\alpha\beta$ meATP am Vas deferens der Ratte in Anwesenheit von P2 Antagonisten sowie für den Unterschied zwischen den an nativen Rezeptoren gewonnenen Ergebnissen im Vergleich zu den Daten an rekombinanten Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden, könnte die Aktivierung eines Relaxation-vermittelnden Kaliumkanals sein (siehe 5.8). Angenommen die P2 Antagonisten inhibieren diesen Kanal, resultiert daraus dann eine steilere DWK in Anwesenheit der Antagonisten. Daher wurden DWK an prostatichen Segmenten des Ratten-Vas-deferens durch Einzelgaben von  $\alpha\beta$ meATP durchgeführt. Während ein Organ als Zeitkontrolle ohne Apamin fungierte, wurde ein weiteres Organ mit 0.3 µM Apamin versetzt und ebenfalls als Zeitkontrolle verwendet. Weiterhin wurde der Einfluss von Apamin auf den Antagonismus von NF449 untersucht (siehe Abb. 4.46). Als Positivkontrolle für den Antagonismus von Apamin an Relaxations-vermittelnden Kalium-Kanälen,

moduliert durch  $\alpha\beta\text{meATP}$ , diente das Ratten-Ileum (nach Storr et al., 2000; Daten nicht gezeigt).

**A.**



**B.**

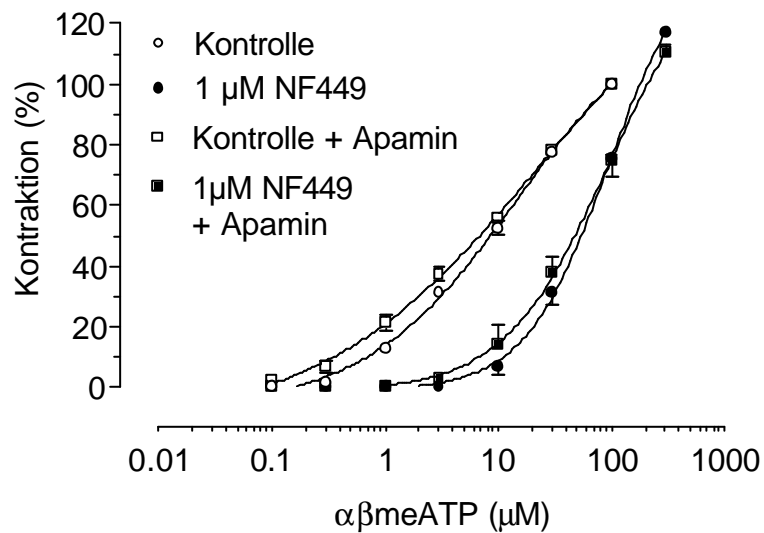


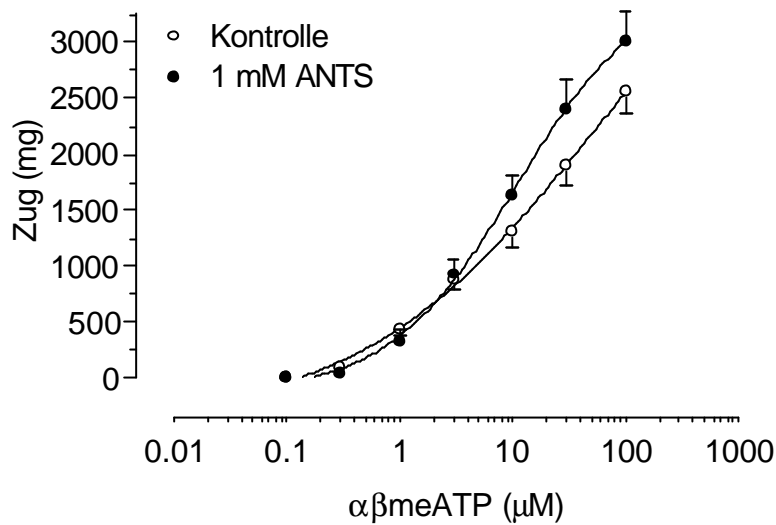
Abb. 4.46: DWK an prostatischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens durch Einzelgaben von  $\alpha\beta\text{meATP}$ . (A.) Zeigt die Zeitkontrollen mit und ohne  $0.3 \mu\text{M}$  Apamin. (B.) Zeigt den Einfluss von  $0.3 \mu\text{M}$  Apamin auf die Kontrollkurven und den Antagonismus von  $1 \mu\text{M}$  NF449. Daten sind Mittelwerte aus 3-4 Einzelerperimenten  $\pm$  S.E.M.. Fehlerbalken werden eventuell durch die Symbole überdeckt.

Apamin führte zu keiner Veränderung der DWK durch  $\alpha\beta$ meATP. Ebenso übte Apamin keinen signifikanten Effekt auf den Antagonismus durch NF449 am Vas deferens der Ratte aus.

#### 4.9.2. Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen

Eine weitere Möglichkeit für die Diskrepanz der Ergebnissen an nativen Rezeptoren im Gewebe und rekombinanten Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, bzw. für die Verteilung der DWK im Vas deferens der Ratte in Anwesenheit des Antagonisten, könnte eventuell eine Depletion des Antagonisten oder auch Agonisten durch unspezifische Bindung im Gewebe sein. Daher wurde versucht, diese potentiellen, unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation mit verschiedenen Verbindungen abzusättigen. Dies erfolgte, indem eine Konzentration der jeweiligen Verbindung eingesetzt wurde, die nachweislich keinen antagonistischen Effekt auf P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ausübte. Es wurden DWK an prostatichen Segmenten des Ratten-Vas-deferens durch Einzelgaben von  $\alpha\beta$ meATP durchgeführt. Da die DWK in Anwesenheit von Suramin bzw. ANTS (8-Amino-1,3,5-naphthalentrisulfonat, Trinatriumsalz) an unterschiedlichen Organpräparationen durchgeführt wurden, erfolgte die Angabe in mg Zug, statt wie sonst als Prozent der Kontrollkontraktion nach Gabe von 100  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP. Zur Untersuchung des Einflusses von ANTS bzw. Suramin auf den Antagonismus von NF449, wurden 1 mM ANTS oder 1  $\mu$ M Suramin dem Puffer zugesetzt, so dass diese Verbindungen ständig im Nährmedium vorhanden waren. Während ein Organ als Zeitkontrolle fungierte, wurde ein weiteres Organ nach der Referenz-DWK mit 0.03  $\mu$ M NF449 für 60 Minuten inkubiert und anschließend eine weitere DWK in Anwesenheit des Antagonisten erstellt.

A.



B.

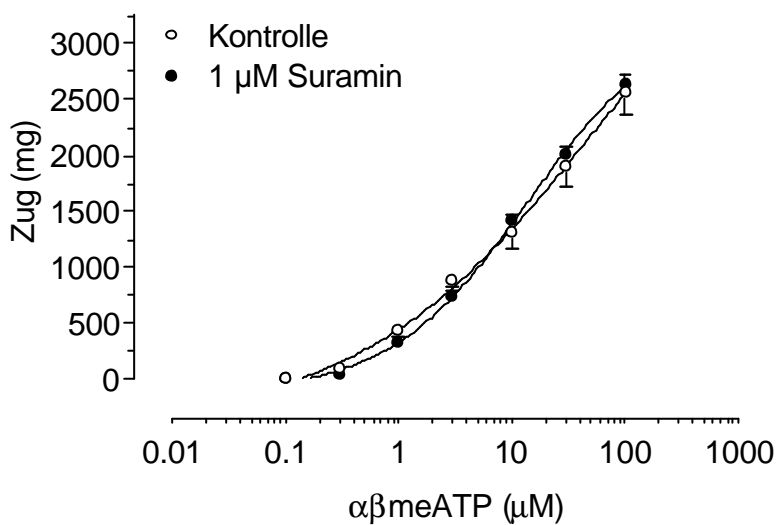
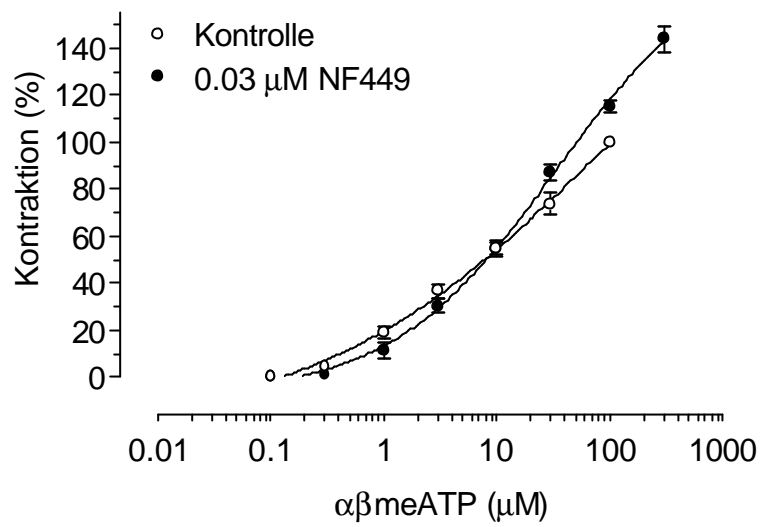


Abb. 4.47: Einfluss von (A.) 1 mM ANTS und (B.) 1  $\mu\text{M}$  Suramin auf die DWK an prostatischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens erzeugt durch Einzelgaben von  $\alpha\beta\text{meATP}$ . Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-8 Einzelerperimenten.

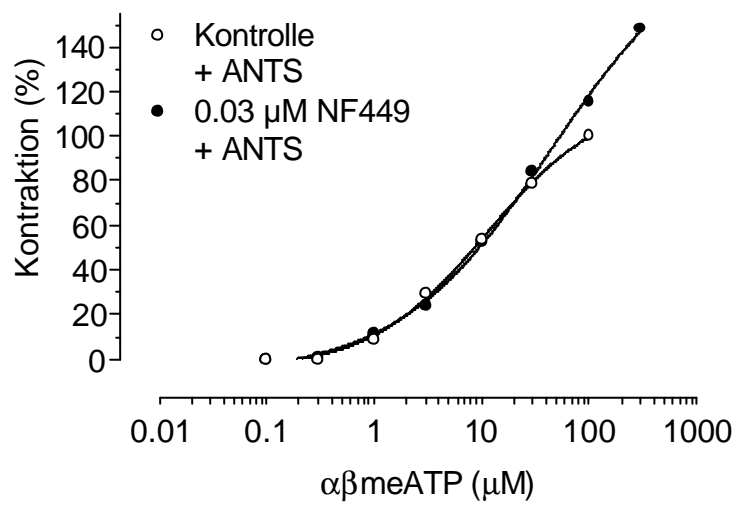
Weder die Inkubation mit 1 mM ANTS noch mit 1  $\mu\text{M}$  Suramin führten zu einer deutlichen Linksverschiebung oder ausgeprägten Versteilung der DWK von  $\alpha\beta\text{meATP}$  an prostatischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens (siehe Abb. 4.47).



A.



B.



C.

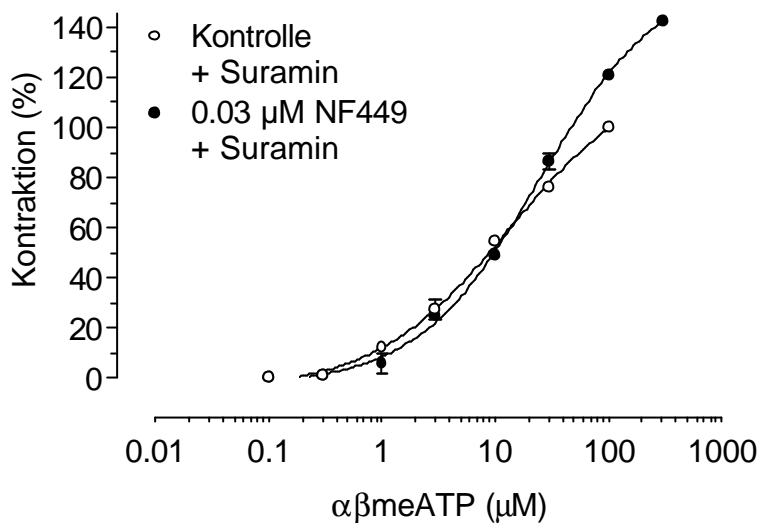


Abb. 4.48: Einfluss von 0.03  $\mu\text{M}$  NF449 auf die DWK an prostatischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens erzeugt durch Einzelgaben von  $\alpha,\beta\text{meATP}$ . Die Nährlösung enthält (A.) keine weiteren Substanzen, (B.) 1 mM ANTS und (C) 1  $\mu\text{M}$  Suramin. Die Daten sind Mittelwerte aus 2-3 Einzelerperimenten  $\pm$  S.E.M.

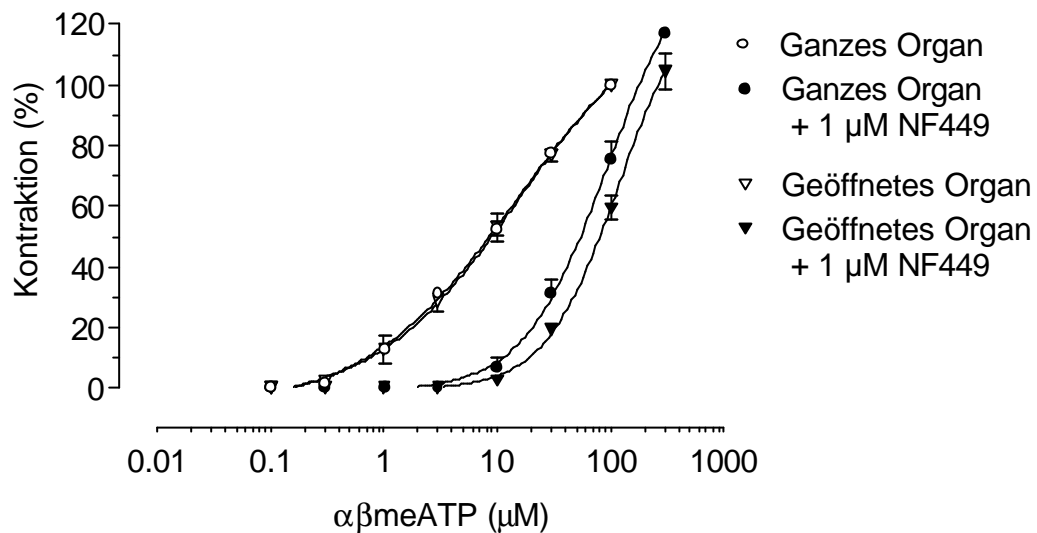
Weder die Inkubation mit 1 mM ANTS noch mit 1  $\mu\text{M}$  Suramin führte zu einer deutlichen Steigerung des Antagonismus von NF449. Die geringe Konzentration von 0.03  $\mu\text{M}$  NF449 verschob die DWK weder in An- noch in Abwesenheit von ANTS oder Suramin nach links, führte aber zu der bekannten Verteilung der Kurve bei gleichzeitiger Zunahme der Kontraktibilität des Organs (siehe Abb. 4.48). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen weder zu einer Veränderung der DWK in Abwesenheit des Antagonisten führt, noch einen Einfluss auf die Verteilung der DWK in Anwesenheit des Antagonisten hat oder die Diskrepanz der Ergebnissen an nativen Rezeptoren im Gewebe und rekombinanten Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, aufgeklärt.

#### 4.9.3. Längsschnitt und Deepithelisieren der Organe

Um den Zutritt des Agonisten und des Antagonisten in das Rezeptorkompartiment zu erleichtern, wurden die prostatischen Segmente des

Ratten-Vas-deferens durch einen Längsschnitt geöffnet. Eine weitere Variation stellte die mechanische Entfernung der inneren Epithelzellschicht der Organe dar.

**A.**



**B.**

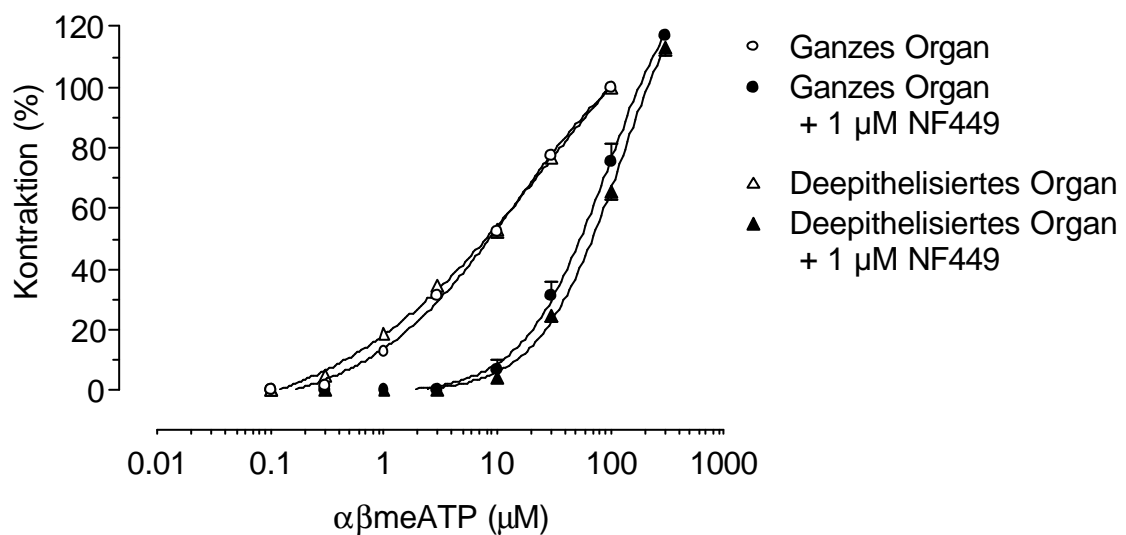


Abb. 4.49: DWK an prostatichen Segmenten des Ratten-Vas-deferens für Einzelgaben von  $\alpha\beta\text{meATP}$ . Der Einfluss des Öffnens der Organe (A.) bzw. des Deepithelisierens (B.) auf die DWK, sowie auf den Antagonismus durch 1  $\mu\text{M}$  NF449 wurde untersucht. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3-4 Einzelerperimenten.

Weder das Öffnen der Organe noch die mechanische Entfernung der inneren Epithelzellschicht hatte einen Einfluss auf die DWK von  $\alpha\beta$ meATP an prostatistischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens (Abb. 4.49). Die antagonistische Potenz von 1  $\mu$ M NF449 wurde durch Öffnen der Organe unwesentlich verstärkt, wie durch die leichte Rechtsverschiebung der DWK in Anwesenheit des Antagonisten deutlich wird. Das Entfernen der inneren Epithelzellschicht führt zu keiner Wirkungssteigerung von NF449. Daraus kann geschlossen werden, dass der Antagonist durch Öffnen der Organe nicht leichter in das Rezeptorkompartiment gelangen kann. Das Epithel stellt dabei ebenfalls keine bedeutende Hürde dar.

#### **4.9.4. Variation der Organbadgröße**

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Kurvenverteilung am Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen  $pIC_{50}$ -Werten an *Xenopus laevis* Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens, stellt der Austausch der 6-ml-Organbäder mit 60-ml-Organbädern dar. Dadurch wurde den Vasa deferentia bei gleicher Antagonistenkonzentration eine 10-fach höhere Menge an NF449 angeboten. In 60-ml-Organbädern wurde der Effekt von 0.03 und 0.3  $\mu$ M NF449 auf Kontraktionen prostatistischer Segmente des Ratten-Vas-deferens nach Einzelgabe von 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP untersucht. Die Variation der Organbadgröße führte zu keiner Steigerung der inhibitorischen Aktivität von NF449 (siehe Abb. 4.50).

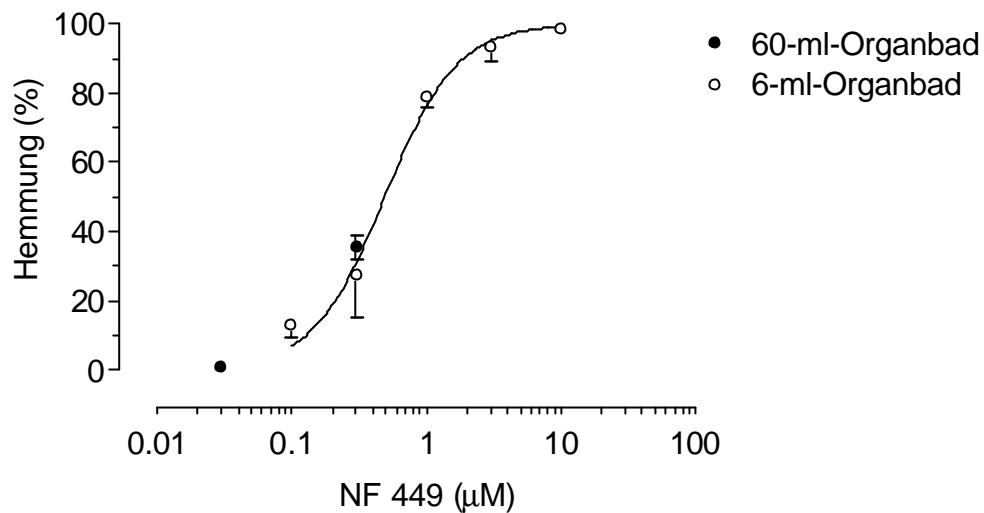
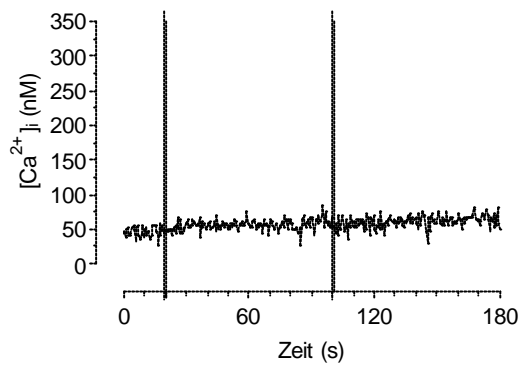
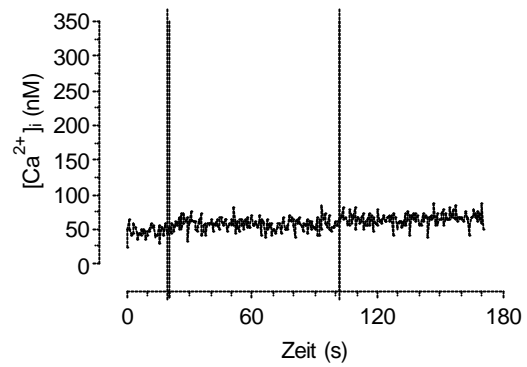
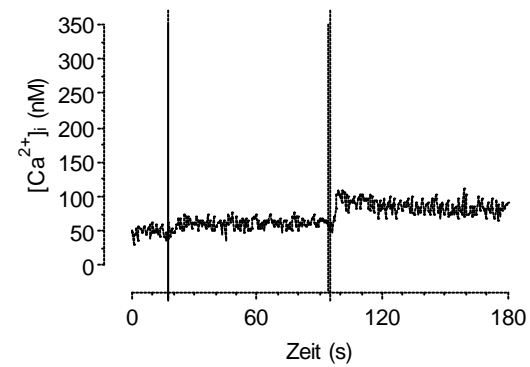
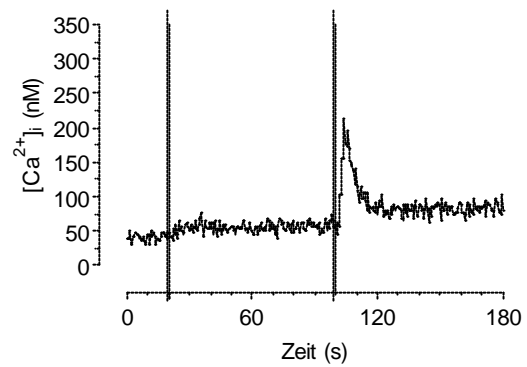
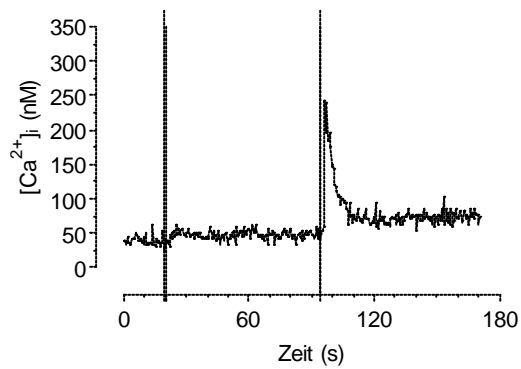
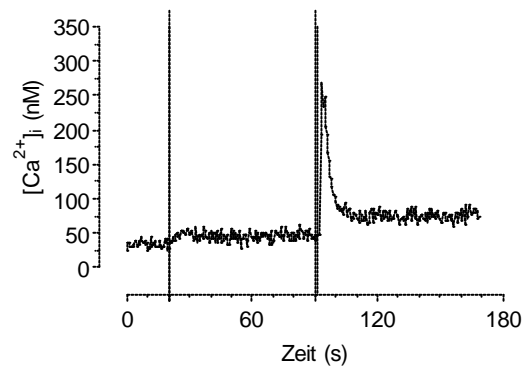


Abb. 4.50: Inhibitionskurve von NF449 an prostatischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens in einem 6-ml-Organbad, sowie der Effekt von 0,03 und 0,3 mM NF449 in einem 60-ml-Organbad. Die Kontraktionen wurden durch 10 mM abmeATP ausgelöst. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

## 4.10. Thrombozyten-Fluoreszenzspektroskopie

### 4.10.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von abmeATP

Dosis-Wirkungs-Kurven wurden bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 2 mM durchgeführt. Die Gabe steigender Konzentrationen von  $\alpha\beta$ meATP führte zu einem schnellen und transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  (siehe Abb. 4.51). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration, die basal bei  $66,5 \pm 17,3$  nM ( $n = 54$ ) lag, stieg nach Gabe der höchsten eingesetzten Konzentration von 30  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP auf  $306,2 \pm 42,9$  nM an. Die nichtlineare Regressionsanalyse der auf den jeweiligen höchsten Kalziumanstieg normalisierten Werte ergab einen  $pEC_{50}$ -Wert von  $6,02 \pm 0,05$  ( $n = 4 - 6$ ) (siehe Abb. 4.52).

**A.****B.****C.****D.****E.****F.**

## G.

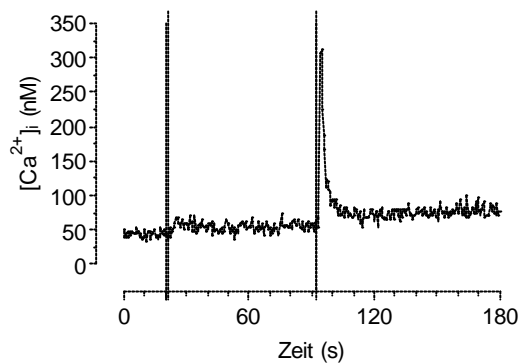


Abb. 4.51: Zeitverlauf des intrazellulären Kalziumanstieges  $[Ca^{2+}]_i$  in Sekunden (s) nach Gabe von (A.) 0.03, (B.) 0.1, (C.) 0.3, (D.) 1, (E.) 3, (F.) 10 und (G.) 30  $\mu M$   $\alpha\beta meATP$ , ermittelt durch Anstieg der Fluoreszenz von 2  $\mu M$  Fura-2 in humanen Thrombozyten. Dargestellt sind repräsentative Einzelexperimente. Die erste gestrichelte Linie stellt den Zeitpunkt der Gabe von 2 mM Kalziumchlorid dar, die Zweite die Gabe der jeweiligen Konzentration an  $\alpha\beta meATP$ . 0.32 U/ml Apyrase war ständig im Medium vorhanden.

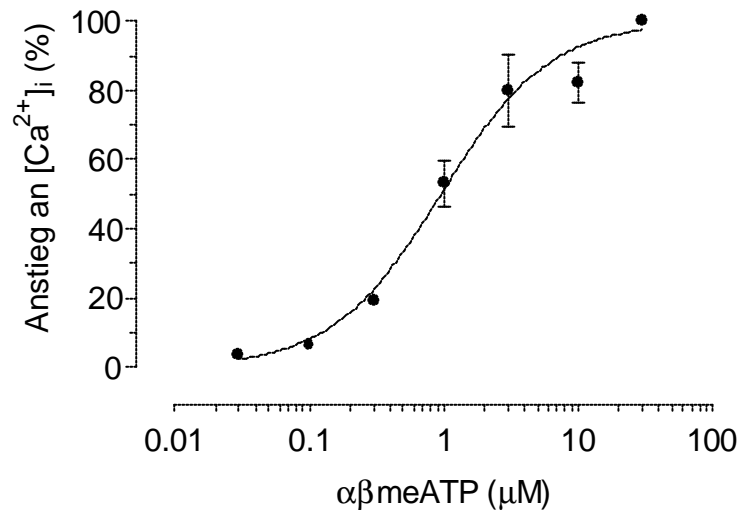


Abb. 4.52: DWK des intrazellulären Kalziumanstieges  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch  $\alpha\beta meATP$ . Der Anstieg an Kalzium wurde mittels Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus 4-6 Experimenten  $\pm$  S.E.M.. Der resultierende  $pEC_{50}$ -Wert betrug  $6.02 \pm 0.05$ .

#### 4.10.2. Hemmung der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort

Der Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$ , ausgelöst durch 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP wurde von den untersuchten Antagonisten konzentrationsabhängig gehemmt. Weiterhin wurde der Effekt von NF449 auf  $[Ca^{2+}]_i$ , ausgelöst durch 0.3 und 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP, untersucht.

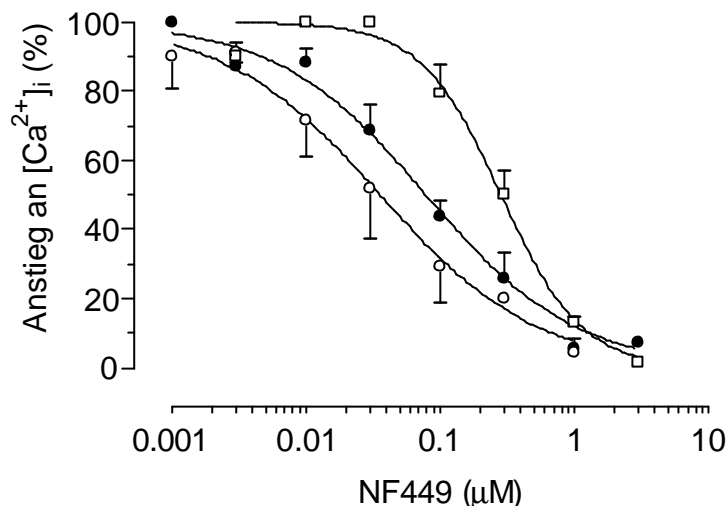


Abb. 4.53: Inhibitionskurven von NF449 auf den P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch 0.3 (○), 1 (●) oder 10 (◻)  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP. Der Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mittels Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-7 Einzelexperimenten.

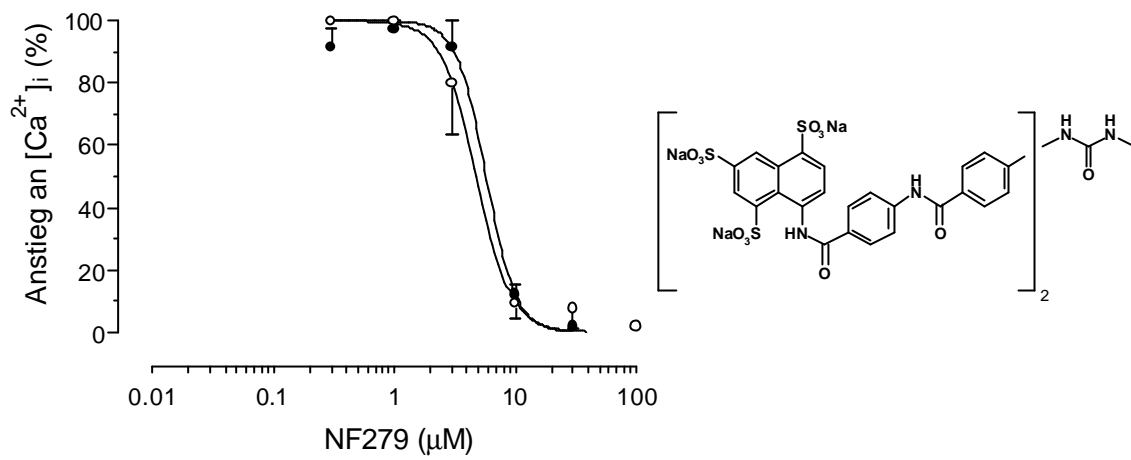
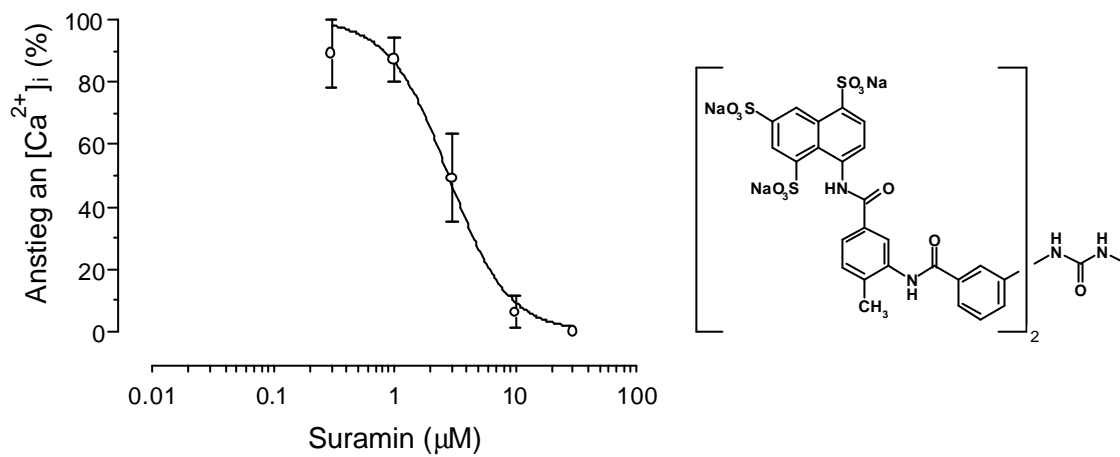
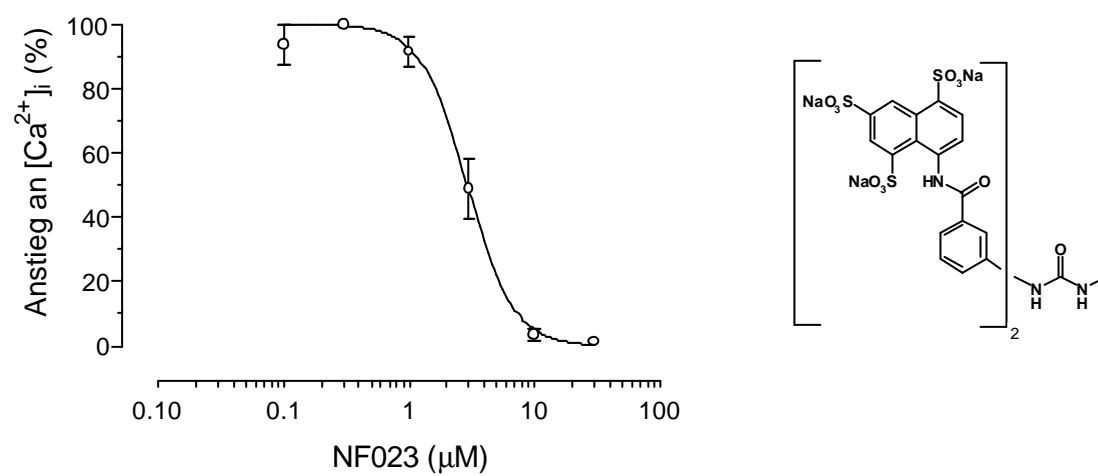
NF449 inhibierte den durch  $\alpha\beta$ meATP-ausgelösten Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  konzentrationsabhängig bis zur vollständigen Hemmung. Die Inhibitionskurven verschoben sich mit steigender Agonistenkonzentration nach rechts, was für einen kompetitiven Antagonismus sprach (siehe Abb. 4.53). Die resultierenden  $pIC_{50}$ -Werte betragen  $7.45 \pm 0.06$  (0.3  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP),  $7.11 \pm 0.07$  (1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP) sowie  $6.55 \pm 0.07$  (10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP). Weitere Standardantagonisten wurden hinsichtlich ihres P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonismus an humanen Thrombozyten untersucht (siehe Abb. 4.54). Da einige Verbindungen in bestimmten Bereichen des UV-Spektrums Licht absorbierten (siehe Tabelle 4.12), wurden die Inhibitionskurven sowohl mit Fura-2 (Exzitation: 340 und 380 nm; Emission: 510 nm) als auch zur Kontrolle mit



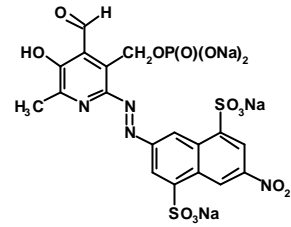
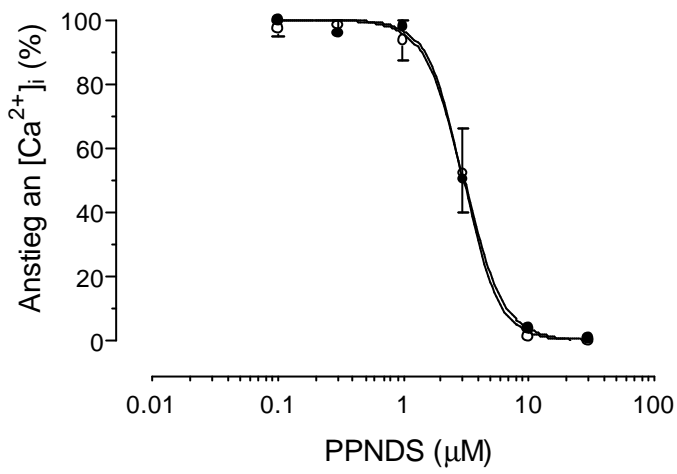
Oregon green-488/BAPTA-1 (Exzitation: 494 nm; Emission: 523 nm) durchgeführt, um Artefakte durch Lichtabsorption auszuschließen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.54, sowie in Tabelle 4.12 zusammengestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Inhibitionskurven, die mit Oregon-green-488/BAPTA-1 gemessen wurden, gemeinsam mit den Inhibitionskurven, die mit Fura-2 gemessen wurden, in einer Abbildung dargestellt. Es ist aber darauf hinzuweisen, dass im Falle der Oregon-green-488/BAPTA-1-Experimente, in denen keine Umrechnung der Fluoreszenzintensität zu  $[Ca^{2+}]_i$  durchgeführt wurde (siehe 3.2.4.), die Beschriftung der Ordinate (Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$ ) nicht völlig zutrifft, da nicht direkt der Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen wurde, sondern lediglich der durch den Anstieg an intrazellulärem  $[Ca^{2+}]_i$  ausgelöste Anstieg an Fluoreszenzintensität.

Wie die Inhibitionskurven zeigen, wurde der  $P2X_1$ -Rezeptor-vermittelte Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  bzw. der  $P2X_1$ -Rezeptor-vermittelte Fluoreszenzanstieg durch alle untersuchten Antagonisten mit Ausnahme von MRS2179 vollständig inhibiert, das bis zu einer Konzentration von 300  $\mu$ M fast keine Hemmung zeigt. Die Inhibitionskurven der jeweiligen Verbindung, die mit beiden unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen ermittelt wurden, verhielten sich nahezu deckungsgleich. Das bedeutet, dass potentielle Artefakte durch Lichtabsorption in diesen Untersuchungen ausgeschlossen werden können. Die resultierende Rangfolge antagonistischer Potenz lautet:

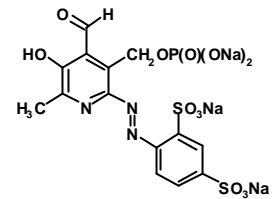
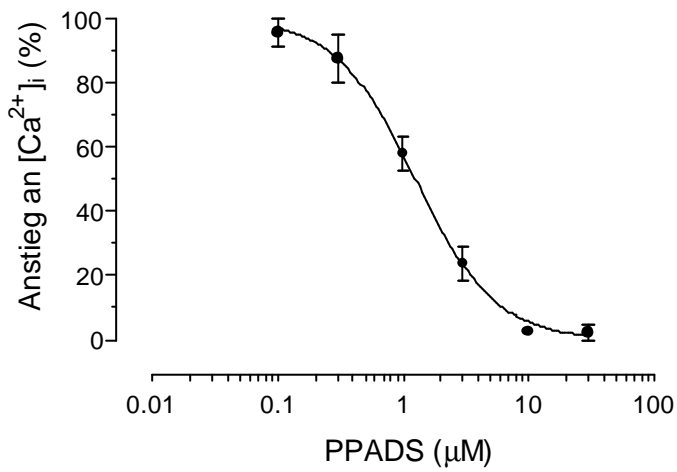
NF449 >> MRS2159  $\geq$  PPADS > Suramin = NF023 = PPNSD  $\geq$  NF279 >>> MRS2179.

**A.****B.****C.**

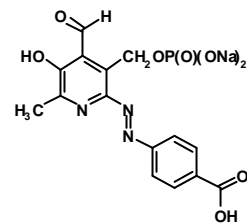
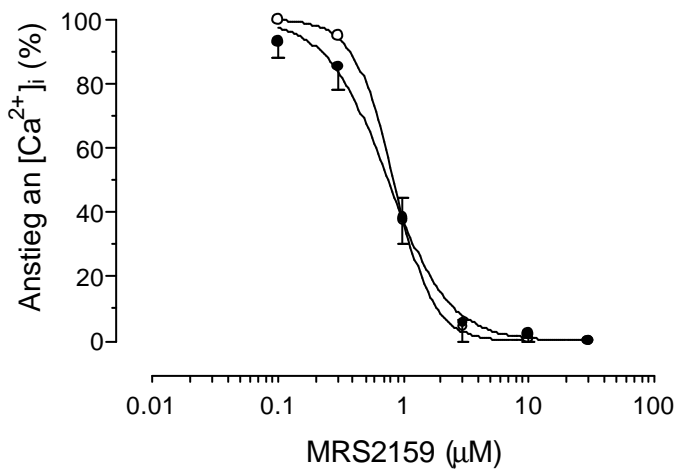
D.



E.



F.



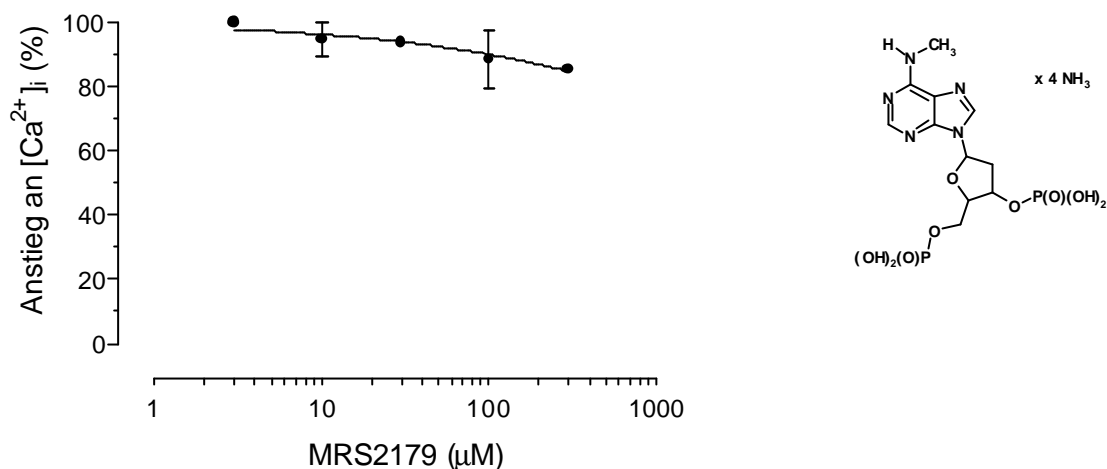
**G.**

Abb. 4.54: Inhibitionskurven und chemische Strukturformeln von (A.) NF279, (B.) Suramin, (C.) NF023, (D.) PPNDS, (E.) PPADS, (F.) MRS2159 und (G.) MRS2179. Gemessen wurde der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch 1 mM abmeATP. Der Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurde mittels (●) Fura-2- und/oder (○) Oregon green-488/BAPTA-1-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus 3-7 Einzelexperimenten.

Tabelle 4.12: pI<sub>C</sub><sub>50</sub>-Werte von NF449 und Standardantagonisten. Die Hemmung des P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, ausgelöst durch 1 mM abmeATP in humanen Thrombozyten, wurde mittels Fura-2- und/oder Oregon green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1-Fluoreszenz ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte ± S.E.M. aus 3-7 Einzelexperimenten. n.b. = nicht bestimmt.

Verbindung	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M. (Fura-2)	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M. (Oregon green)	Absorptions- maximum
NF449	7.11 ± 0.07	6.93 ± 0.05	290 nm
PPADS	5.90 ± 0.02	n. b.	290 nm + 412 nm
MRS2159	6.04 ± 0.02	6.12 ± 0.03	290 nm + 406 nm
MRS2179	< 3.5	n. b.	290 nm
PPNDS	5.52 ± 0.01	5.51 ± 0.01	290 nm + 473 nm
NF279	5.24 ± 0.05	5.32 ± 0.03	316 nm
Suramin	n. b.	5.55 ± 0.06	n.b.
NF023	n. b.	5.54 ± 0.03	n.b.

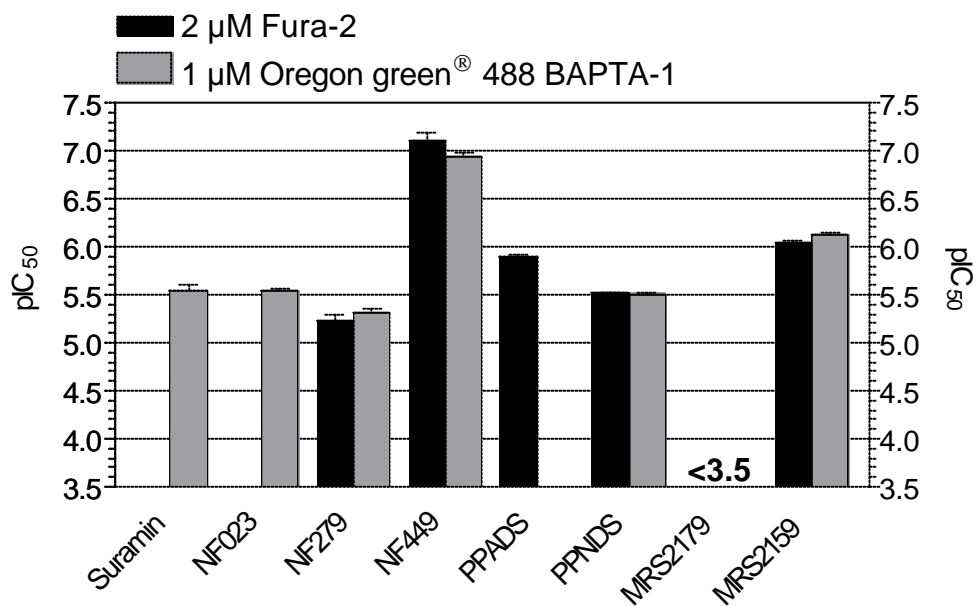
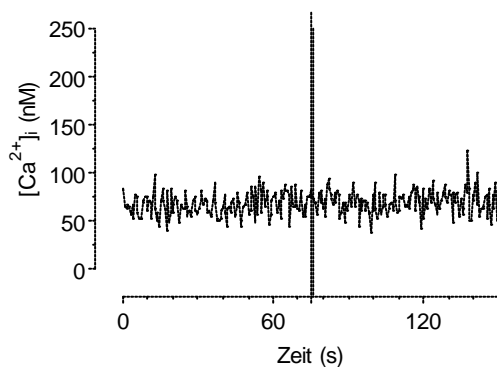
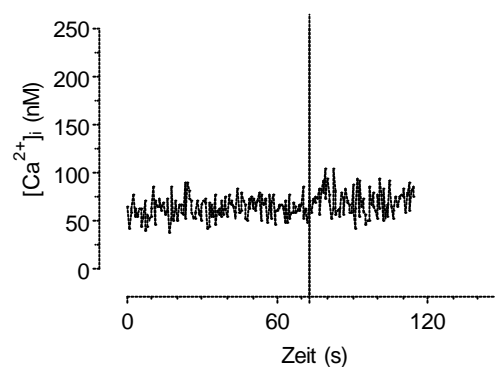
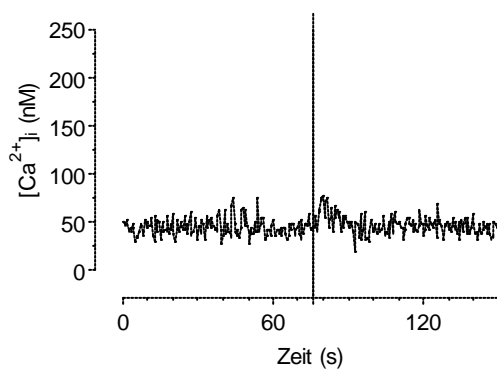
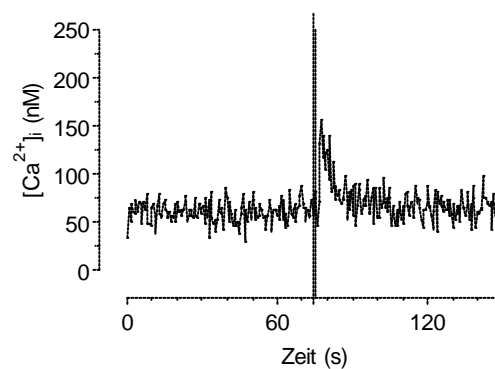


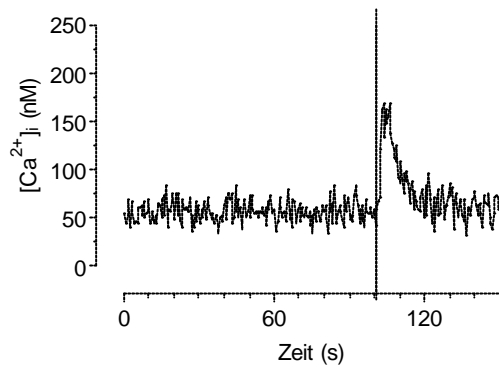
Abb. 4.55: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte aus Tabelle 4.12 von NF449 und Standardantagonisten. Die Hemmung des P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Anstiegs an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, ausgelöst durch 1 nM abmeATP in humanen Thrombozyten, wurde mittels Fura-2- und/ oder Oregon green<sup>®</sup> 488 BAPTA-1 -Fluoreszenz ermittelt.

### 4.10.3. Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP-freiem ADP

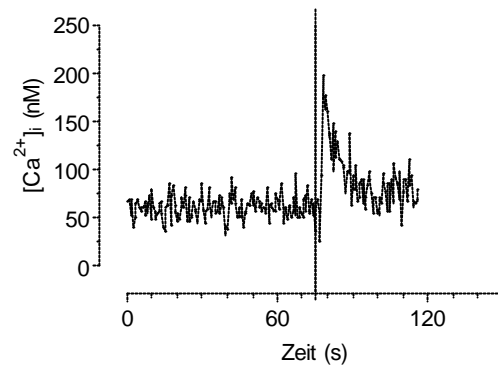
Dosis-Wirkungs-Kurven wurden in nominell Kalzium-freiem Medium durchgeführt. Die Gabe steigender Konzentrationen von Hexokinase-aufgereinigtem ADP ( $\text{ADP}_{\text{HEX}}$ ) führte zu einem schnellen und transienten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (siehe Abb. 4.56). Die basale intrazelluläre Kalziumkonzentration betrug  $60.7 \pm 10.4 \text{ nM}$  ( $n = 39$ ). Die maximale intrazelluläre Kalziumkonzentration wurde nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  ADP erreicht, die zu einem Anstieg auf  $188.7 \pm 26.4 \text{ nM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $n = 4$ ) in den Zellen führte. Die nichtlineare Regressionsanalyse der auf den jeweiligen maximalen Kalziumanstieg normalisierten Werte ergab einen  $\text{pEC}_{50}$ -Wert von  $6.10 \pm 0.05$  ( $n = 3$ ) (Abb. 4.57).

**A.****B.****C.****D.**

E.



F.



G.

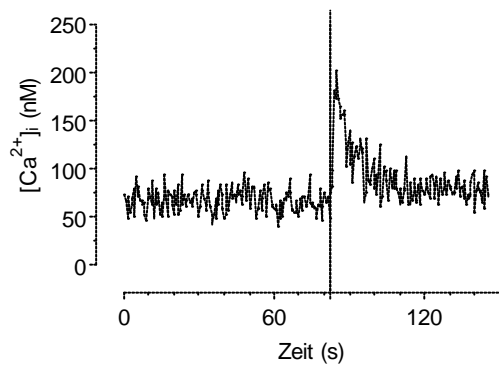


Abb. 4.56: Zeitverlauf des Anstiegs an intrazellulärem Kalzium in Sekunden (s) nach Gabe von (A.) 0.03, (B.) 0.1, (C.) 0.3, (D.) 1, (E.) 3, (F.) 10 und (G.) 30  $\mu\text{M}$   $\text{ADP}_{\text{HEX}}$ , ermittelt durch Anstieg der Fluoreszenz von 2  $\mu\text{M}$  Fura-2. Dargestellt sind repräsentative Einzelexperimente. Die gestrichelten Linien stellen den Zeitpunkt der Agonisten-Gabe dar. 0.32 U/ml Apyrase waren ständig im Medium vorhanden.

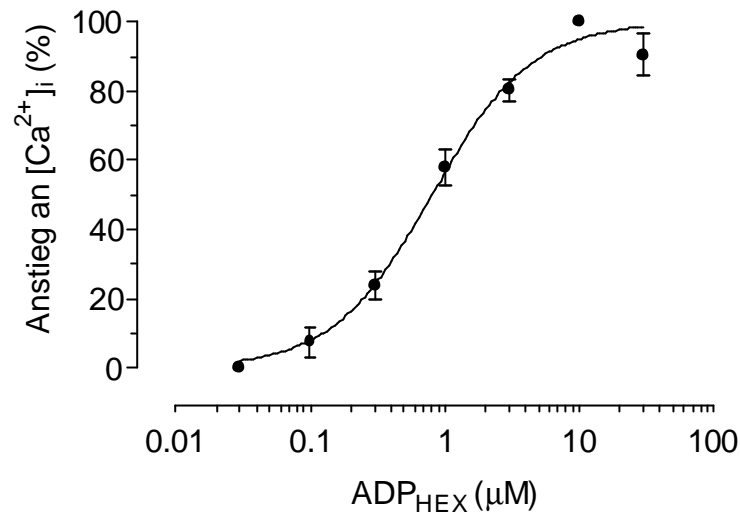


Abb. 4.57: DWK des Kalziumanstieges in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch Hexokinase-gereinigtes ADP ( $ADP_{HEX}$ ). Der Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mittels Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 3 Einzelerperimenten. Der resultierende  $pEC_{50}$ -Wert betrug  $6.10 \pm 0.05$ .

#### 4.10.4. Hemmung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort durch NF449

Die Hemmung des Anstiegs an  $[Ca^{2+}]_i$  durch NF449, ausgelöst durch 1  $\mu$ M Hexokinase-gereinigtes ADP ( $ADP_{HEX}$ ) in humanen Thrombozyten, in nominell Kalzium-freiem Medium wurde untersucht.



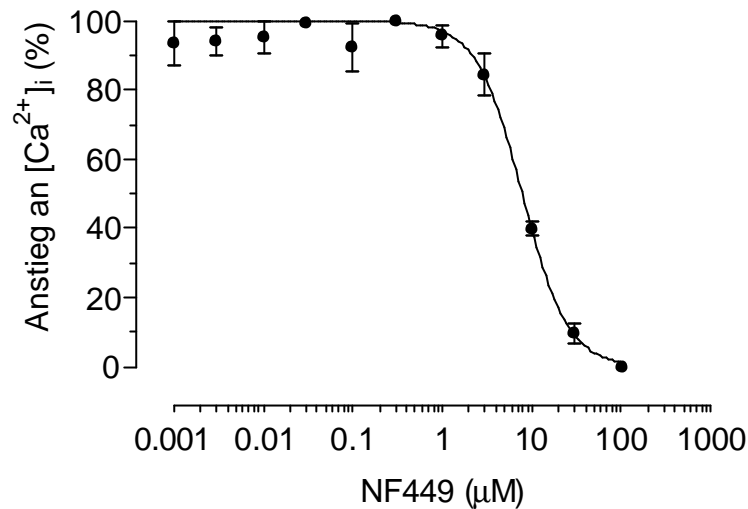


Abb. 4.58: Inhibitionskurve von NF449 auf den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch 1 mM ADP<sub>HEX</sub>. Der Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> wurde mittels Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte ± S.E.M. aus 3-4 Einzelerperimenten.

NF449 inhibierte den ADP<sub>HEX</sub>-vermittelten Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in humanen Thrombozyten konzentrationsabhängig bis zur vollständigen Hemmung (siehe Abb. 4.58). Der resultierende pIC<sub>50</sub>-Wert betrug  $5.10 \pm 0.04$ .

#### 4.10.5. Hemmung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Kalziumantwort durch MRS2179

Die Hemmung des Anstiegs an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch MRS2179, ausgelöst durch 1 µM Hexokinase-gereinigtes ADP (ADP<sub>HEX</sub>) in humanen Thrombozyten, in nominell Kalzium-freiem Medium wurde untersucht. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Susanne Horner durchgeführt. MRS2179 inhibierte den ADP<sub>HEX</sub>-vermittelten Anstieg an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in humanen Thrombozyten konzentrationsabhängig bis zur vollständigen Hemmung (siehe Abb. 4.59). Der resultierende pIC<sub>50</sub>-Wert betrug  $6.46 \pm 0.09$ .

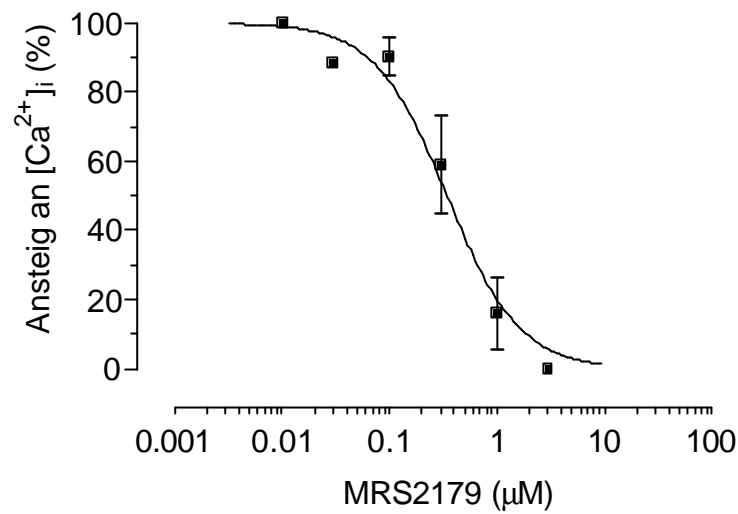


Abb. 4.59: Inhibitionskurven von MRS2179 auf den  $P2Y_1$ -Rezeptor-vermittelten Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  in humanen Thrombozyten, ausgelöst durch 1  $\mu$ M  $ADP_{HEX}$ . Der Anstieg an  $[Ca^{2+}]_i$  wurde mittels Fura-2-Fluoreszenz gemessen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus 1-4 Einzelexperimenten.

## **5. Diskussion**

## 5.1. Auswahl der verwendeten Modelle

### 5.1.1. Vas deferens der Ratte (P2X<sub>1</sub> Rezeptor)

Bereits im Jahr 1978 wurde durch McGrath (McGrath, 1978) gezeigt, dass das Vas deferens der Ratte nach elektrischer Feldstimulation mit einer biphasischen Kontraktion reagiert (Westfall und Westfall, 2001). Diese Beobachtung konnte in den Folgejahren durch viele Arbeitsgruppen bestätigt werden. 1985 charakterisierten Burnstock und Kennedy die Neurotransmitter ATP und Noradrenalin als die kontraktionsvermittelnden Agonisten, wobei ATP die erste schnelle (P2X Rezeptor) und Noradrenalin ( $\alpha_1$ -Adrenozeptor) die zweite andauernde Kontraktion auslöste (Burnstock und Kennedy, 1985; Westfall et al., 2002). Für die Überlegung, dass die erste purinerge Phase der Kontraktion über P2X<sub>1</sub> Rezeptoren vermittelt wurde, sprachen die im folgenden ermittelten Fakten:

1. Die erste purinerge Phase nach Feldstimulation konnte durch Desensibilisierung mit dem P2X<sub>1</sub>/ P2X<sub>3</sub>-selektiven Agonisten  $\alpha\beta$ meATP oder durch Suramin blockiert werden.
2. Durch exogene Gabe von  $\alpha\beta$ meATP konnte eine mit der ersten Phase der Kontraktion nach Feldstimulation vergleichbare monophasische Kontraktion des Ratten-Vas-deferens ausgelöst werden.
3. Die Reihenfolge der agonistischen Potenz von  $\alpha\beta$ meATP >  $\beta\gamma$ meATP > ATP $\gamma$ S > ADP $\beta$ S sprach für P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen (zum Vergleich mit Daten an rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren, siehe North und Surprenant, 2000).
4. Khakh und Kollegen zeigten an isolierten glatten Muskelzellen des Ratten-Vas-deferens mittels elektrophysiologischer Untersuchungen, dass  $\alpha\beta$ meATP schnelle Einwärtsströme über P2X Kanäle auslöst (Khakh et al., 1995).  $\alpha\beta$ meATP war dabei equipotent an isolierten glatten Muskelzellen und dem intakten Ratten-Vas-deferens.

5. Der P2X<sub>1</sub> Rezeptor konnte aus dem Ratten-Vas-deferens kloniert werden. (Valera et al., 1994)
6. Die Reihenfolge der antagonistischen Potenz verschiedener Substanzen auf  $\alpha\beta$ meATP-vermittelte Kontraktionen des Ratten-Vas-deferens korrelierte mit den Daten, die an rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, ermittelt wurden (siehe Tabelle 5.1).

*Tabelle 5.1: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Standardantagonisten an nativen (Ratten-Vas-deferens (ratVD); Kontraktionen ausgelöst durch 10  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP) und rekombinanten (rek. rP2X<sub>1</sub>; exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten (XLO); Einwärtsströme ausgelöst durch 1  $\mu$ M ATP) P2X<sub>1</sub> Rezeptoren.*

Verbindung	P2X <sub>1</sub> (ratVD) pIC <sub>50</sub>	rek. rP2X <sub>1</sub> (XLO) pIC <sub>50</sub>
Suramin	4.7 <sup>a</sup>	5.6 <sup>b</sup>
NF023	4.9 <sup>a</sup>	6.6 <sup>b</sup>
PPADS	5.4 <sup>a</sup>	7.0 <sup>b</sup>
NF279	5.7 <sup>a</sup>	7.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Lambrecht et al., 1999.

<sup>b</sup> Lambrecht et al., 2002.

<sup>c</sup> Rettinger et al., 2000b.

7. Immunohistochemische Befunde sprachen für eine hohe Dichte von P2X<sub>1</sub> Rezeptoren an glatten Muskelzellen des Ratten-Vas-deferens (Worthington et al., 1999; Lee et al., 2000).
8. Die Vasa deferentia von P2X<sub>1</sub>-Rezeptor- Knockout-Mäusen kontrahierten nicht mehr nach Gabe von  $\alpha\beta$ meATP (Mulryan et al., 2000).

Zur eindeutigen Messung von P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Effekten erschien die elektrische Feldstimulation des Ratte-Vas-deferens aus den folgenden Gründen eine ungeeignete Methode zu sein: Erstens führt die elektrische Stimulation zur Freisetzung verschiedener Neurotransmitter und dadurch zu

unterschiedlichsten Effekten durch mehrere Rezeptorsysteme. Hinzu kommt, dass durch ATP-Abbau entstandene Dinukleotide bzw. Adenosin an weiteren Rezeptoren Effekte auslösen können. Dinukleotide können wiederum durch Ektonukleosid-Diphosphokinasen zu Trinukleotiden konvertiert werden (Harden et al., 1998). Zweitens muss neben den Effekten der Testsubstanz auf den Rezeptor ihr Einfluss auf die ATP-metabolisierenden Enzyme berücksichtigt werden, wenn der endogene Ligand als Stimulus eingesetzt wird. Werden diese Enzyme durch die Testsubstanz inhibiert, kann ein antagonistischer Effekt auf den Rezeptor durch die erhöhte Konzentration an endogenem Liganden soweit vermindert werden, dass die Antagonisten die Antwort auf den Agonisten sogar noch potenzieren (Crack et al., 1994; Bültmann et al., 1999).

Daher erschien die exogene Gabe des metabolisch stabilen P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten  $\alpha\beta$ meATP zur Auslösung von Kontraktionen des Ratten-Vasdeferens die geeignete Methode, um Verbindungen auf ihre antagonistischen Effekte an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren zu untersuchen und daraus Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten.

### **5.1.2. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2X<sub>3</sub> Rezeptor)**

Bereits 1994 wurde durch Kennedy und Humphrey ein P2X-ähnlicher Rezeptor auf cholinergen Neuronen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum nachgewiesen (Kennedy und Humphrey, 1994). Nach Stimulation dieses somatodendritischen Rezeptors mit  $\alpha\beta$ meATP wird ein Aktionspotential ausgelöst, das an der Präsynapse zur Freisetzung von Acetylcholin führt. Als klassischer Neurotransmitter stimuliert Acetylcholin postsynaptische muskarinerge M<sub>3</sub> Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen. Dies führt zur Kontraktion des Organs. Wie in unserer Arbeitsgruppe durch funktionelle Experimente gezeigt werden konnte, sind die Kontraktionen wie erwartet sowohl Tetrodotoxin- wie auch Atropin-sensitiv (Czeche et al., 1998a). Die pharmakologischen Eigenschaften des neuronalen P2X Rezeptors im Meerschweinchen-Ileum (Sensitivität für und schnelle Desensibilisierung durch

$\alpha\beta$ meATP, Reihenfolge der antagonistischen Potenz von Standardantagonisten; Tabelle 5.2) korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen an rekombinanten homomultimeren P2X<sub>3</sub> Rezeptoren des Menschen oder der Ratte.

*Tabelle 5.2: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Standardantagonisten an nativen (Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI); Kontraktionen ausgelöst durch  $\alpha\beta$ meATP) und rekombinanten P2X<sub>3</sub> Rezeptoren der Ratte (rek. rP2X<sub>3</sub>) und des Menschen (rek. hP2X<sub>3</sub>), exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten (XLO); Einwärtsströme ausgelöst durch 3  $\mu$ M ATP. n.b. = nicht bestimmt.*

Verbindung	P2X <sub>3</sub> (GPI) pA <sub>2</sub> <sup>a</sup>	rek. rP2X <sub>3</sub> (XLO) pIC <sub>50</sub>	rek. hP2X <sub>3</sub> (XLO) pIC <sub>50</sub>
NF023	4.5	5.1 <sup>b</sup>	4.5 <sup>e</sup>
Suramin	4.9	5.5 <sup>b</sup>	4.8 <sup>f</sup>
NF279	6.0	5.8 <sup>c</sup>	n.b.
PPADS	6.3	6.6 <sup>d</sup>	5.8 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>Lambrecht et al., 1999.

<sup>b</sup>Lambrecht, 2000.

<sup>c</sup>Rettinger et al., 2000b.

<sup>d</sup>Lambrecht et al., 2002.

<sup>e</sup>Soto et al., 1999.

<sup>f</sup>Soto et al., 1997.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesem nativen Gewebe eventuell Heteromere der klonierten Untereinheiten, wie z.B. P2X<sub>2</sub>/P2X<sub>3</sub> Rezeptoren (Lewis et al., 1995; Ralevic und Burnstock, 1998) vorliegen könnten (siehe auch Galligan, 2002). Wenn auch der P2X<sub>3</sub> Rezeptor bisher noch nicht aus dem Meerschweinchen-Ileum kloniert wurde, so wurden dennoch kürzlich bereits sowohl P2X<sub>2</sub> wie auch P2X<sub>3</sub> Rezeptoren immunozytochemisch im Meerschweinchen-Ileum nachgewiesen (Castelucci et al., 2002; Nassauw et al., 2002).

Insgesamt erscheint daher die Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum geeignet zu sein, um Verbindungen auf ihren antagonistischen Einfluss auf  $\alpha\beta$ meATP-sensitive P2X<sub>3</sub>-ähnliche Rezeptoren zu untersuchen.

### **5.1.3. Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (P2Y<sub>1</sub> Rezeptor)**

In einer kürzlich erschienen Arbeit wurde der P2Y<sub>1</sub> Rezeptor auf der glatten Muskulatur des Maus-Ileum nachgewiesen (Giaroni et al., 2002). Präparationen der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum antworteten nach Gabe des metabolisch stabilen P2 Agonisten ADP $\beta$ S mit einer Kontraktion, die zu 32 % durch 1  $\mu$ M Tetrodotoxin und zu 45 % durch 300 nM Atropin inhibiert wird (Lambrecht et al., 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass ADP $\beta$ S zwei verschiedene P2 Rezeptoren stimuliert, einen Rezeptor auf cholinergen Neuronen (siehe 5.1.2), sowie einen Rezeptor postsynaptisch auf glatten Muskelzellen. Um Effekte am postsynaptischen P2 Rezeptor zu untersuchen, wurde der Nährlösung 300 nM Atropin zugesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten keine Kontraktionen durch Gabe von  $\alpha\beta$ meATP bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M ausgelöst werden (Czeche et al., 1998b). Die Reihenfolge der inhibitorischen Potenz der Standardantagonisten an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum korreliert recht gut mit den Daten an rekombinanten und nativen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (Tabelle 5.3).



*Tabelle 5.3: Vergleich der inhibitorischen Potenz von Standardantagonisten an nativen (<sup>a</sup>Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI); Kontraktionen ausgelöst durch ADP $\beta$ S bzw. <sup>c</sup>Truthahn-Erythrozyten) und rekombinanten, humanen (rek. hP2Y<sub>1</sub>; exprimiert in <sup>\*</sup>Xenopus laevis Oozyten (XLO) bzw. in <sup>#</sup>humanen 1321N1-Astrozytomazellen) P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren.*

Verbindung	P2Y <sub>1</sub> (GPI) pA <sub>2</sub> <sup>a</sup>	rek. hP2Y <sub>1</sub> pK <sub>B</sub> <sup>b</sup>
NF023	4.7	pIC <sub>50</sub> : 4.6 <sup>c</sup>
NF279	5.0	pIC <sub>50</sub> : 4.6 <sup>c</sup>
Suramin	5.7	5.5*
PPADS	6.2	5.4 <sup>#</sup>

<sup>a</sup>Lambrecht et al., 1999.

<sup>b</sup>von Kugelgen und Wetter, 2000.

<sup>c</sup>J.L. Boyer und T.K. Harden (persönliche Mitteilung): nativer P2Y<sub>1</sub> Rezeptor in Truthahn-Erythrozytenmembranen. Gemessen wurde die Hemmung der durch 10 nM 2-meSATP stimulierten Phospholipase C; Messparameter: [<sup>3</sup>H]Inositolmonophosphat.

Die pharmakologischen Eigenschaften des postsynaptischen P2 Rezeptors in der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (Sensitivität für ADP $\beta$ S, Insensitivität für  $\alpha\beta$ meATP, hohe antagonistische Potenz von PPADS und Suramin), unterstützten die Wahl dieses Präparates als Modell für die Entwicklung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen an nativen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Dies wurde durch die submikromolare Affinität des P2Y<sub>1</sub>-selektiven Antagonisten MRS2179 (Boyer et al., 1998) an den postsynaptischen ADP $\beta$ S-sensitiven P2-Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum bestätigt (siehe Kapitel 4.7).

#### 5.1.4. Humane Thrombozyten (P2X<sub>1</sub> Rezeptor)

1998 konnte der P2X<sub>1</sub> Rezeptor aus menschlichen Thrombozyten kloniert werden (Vial et al., 1997; Clifford et al., 1998) und heterolog in der menschlichen 1321N1 Astrozytoma-Zelllinie exprimiert werden (Sun et al.,

1998). Es wurden keine weiteren homologen P2X Rezeptor-Subtypen gefunden. Funktionell konnte der P2X<sub>1</sub> Rezeptor menschlicher Thrombozyten lange Zeit nicht nachgewiesen werden, da in den frühen Studien keine methodischen Vorkehrungen getroffen wurden, um die schnelle Desensibilisierung durch freigesetzte, endogene Nukleotide zu verhindern. Dadurch lag der Rezeptor in seiner desensibilisierten Form vor und konnte somit auf keinen geeigneten Liganden ansprechen (Savi et al., 1997; Jin und Kunapuli, 1998). Dieses Problem war gelöst, nachdem durch Arbeiten von der Arbeitsgruppe um Sage und Mahaut-Smith in Cambridge das Tri- und Dinukleotid-abbauende Enzym Apyrase dem Medium hinzugefügt wurde. Apyrase verhinderte die schnelle und andauernde Desensibilisierung des P2X<sub>1</sub> Rezeptors, in dem endogen freigesetztes ATP und ADP metabolisiert wurden (Mackenzie et al., 1996). Erst der Zusatz von Apyrase ermöglichte es, P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Untersuchungen durchzuführen (Fagura et al., 2000). Die Gabe von  $\alpha\beta$ meATP führt zu einer schnell desensibilisierenden Reaktion, die dem Vorgang an rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren stark ähnelt (Valera et al., 1994; Mackenzie et al., 1996). Die Agonisten Reihenfolge, geordnet nach steigender Potenz, war:  $\alpha\beta$ meATP > ATP > ADP. Diese Reihenfolge stimmt zwar nicht völlig mit den Daten an rekombinanten, in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren überein, an denen ATP potenter als  $\alpha\beta$ meATP ist, korreliert aber gut mit Ergebnissen aus Experimenten an ganzen Geweben (Kennedy und Leff, 1995). Von Greco und Kollegen wurde eine Mutation des P2X<sub>1</sub> Rezeptors in humanen Thrombozyten gefunden (P2X<sub>1del</sub>), die zu einer  $\alpha\beta$ meATP-Insensitivität sowie einer ADP-Sensitivität führt (Greco et al., 2001). Die Funktionalität dieser Mutation konnte bisher aber nicht gezeigt werden.  $\alpha\beta$ meATP führte in Untersuchungen anderer, sowie unserer Arbeitsgruppe (Mahaut-Smith et al., 2000) stets zu einem schnellen transienten Anstieg an intrazellulärem Kalzium nach Öffnung des Ionenkanals in der Plasmamembran (siehe Kapitel 4.10.1.), wohingegen ATP-freies ADP einen etwas langsameren, transienten P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelten Anstieg auslöste (siehe Kapitel 4.10.3.). Daher bildet der P2X<sub>1del</sub> allenfalls einen heteromeren P2X<sub>1</sub> Rezeptor, der durch die Eigenschaften der nicht mutierten P2X<sub>1</sub> Untereinheit dominiert wird (Vial et

al., 2002). Es gibt keine Hinweise auf einen weiteren  $\alpha\beta$ meATP-sensitiven P2X Rezeptor auf humanen Thrombozyten. Wird der P2X<sub>1</sub> Rezeptor mittels  $\alpha\beta$ meATP in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium stimuliert, erfolgt kein mit Fura-2 zu detektierendes intrazelluläres Kalziumsignal. Dies erlaubt den Schluss, dass keine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern erfolgt, wenn der P2X<sub>1</sub>/P2X<sub>3</sub>-selektive Agonist  $\alpha\beta$ meATP als Stimulus verwendet wird. Ein weiterer Beleg für den reinen Kalziumeinstrom durch einen Kanal in der Membran ist die Tatsache, dass das  $\alpha\beta$ meATP-vermittelte Kalziumsignal mit steigenden extrazellulären Kalziumkonzentrationen zunimmt (Rolf und Mahaut-Smith, 2002). Der intrazelluläre Kalziumanstieg nach Stimulation mit  $\alpha\beta$ meATP stellt daher eine geeignete Messgröße zur Untersuchung von Effekten an humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren dar.

#### 5.1.5. Humane Thrombozyten (P2Y<sub>1</sub> Rezeptor)

Mindestens zwei ADP-sensitive P2Y Rezeptoren sind auf humanen Thrombozyten exprimiert (Kunapuli, 1998): P2Y<sub>1</sub> sowie P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren. Der P2Y<sub>1</sub> Rezeptor wurde 1997 durch PCR in menschlichen Thrombozyten nachgewiesen (Leon et al., 1997). Stimulation dieses Rezeptors führt zur Aktivierung von Phospholipase C und damit zu einem Anstieg von Diacylglycerol (DAG), sowie Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). Während IP<sub>3</sub> zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern führt, wird vermutet, dass DAG zur Öffnung von nicht-selektiven Kationenkanälen, insbesondere des ('transient receptor potential') TRP6-Kanals, führen kann. Weiterhin wird angenommen, dass mit zunehmender Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, Speicher-abhängige Kanäle in der Plasmamembran geöffnet werden (SOCE = store operated calcium entry) (Hassock et al., 2002). Das bedeutet, dass der intrazelluläre Kalziumanstieg nach Stimulation des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors sowohl durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, wie auch durch Einstrom aus dem extrazellulären Medium erfolgen kann. Um die Effekte der Testsubstanzen auf den P2Y<sub>1</sub> Rezeptor isoliert betrachten zu können, wurden zwei methodische Variationen durchgeführt. Erstens wurde das

kommerziell erhältliche ADP von eventuellen Verunreinigungen mit ATP durch Behandlung mit Hexokinase (siehe Kapitel 3.2.4.) aufgereinigt. Die Arbeitsgruppe von Mahaut-Smith konnte zeigen, dass gereinigtes ADP keinen Agonisten an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren auf humanen Thrombozyten darstellt (Mahaut-Smith et al., 2000). Zur weiteren Absicherung wurde die Messung in nominell Kalzium-freiem Medium durchgeführt, so dass nach Stimulation des Rezeptors der Kalziumanstieg ausschließlich durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern erfolgte. Unter diesen Bedingungen führt die Öffnung eines Ionenkanals in der Plasmamembran (z.B. P2X<sub>1</sub>, siehe oben) zu keinem mit Fura-2 detektierbaren Kalziumsignal. Der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor wurde im Jahr 2001 von Hollopeter und Kollegen (2001) aus menschlichen Thrombozyten kloniert. Da nach Stimulation dieses Rezeptor-Subtyps kein Anstieg an intrazellulärem Kalzium erfolgt, sind Effekte der Testsubstanzen auf P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren unter diesen experimentellen Bedingungen ebenfalls nicht von Bedeutung, da sie keinen Einfluss auf die Messgröße Kalzium haben. Die Gabe von ATP-freiem ADP führt somit zur Stimulation des P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> Rezeptors, wobei lediglich über P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ein intrazellulärer Kalziumanstieg vermittelt wird. Daher stellt dieser Versuchsaufbau ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen an humanen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren dar.

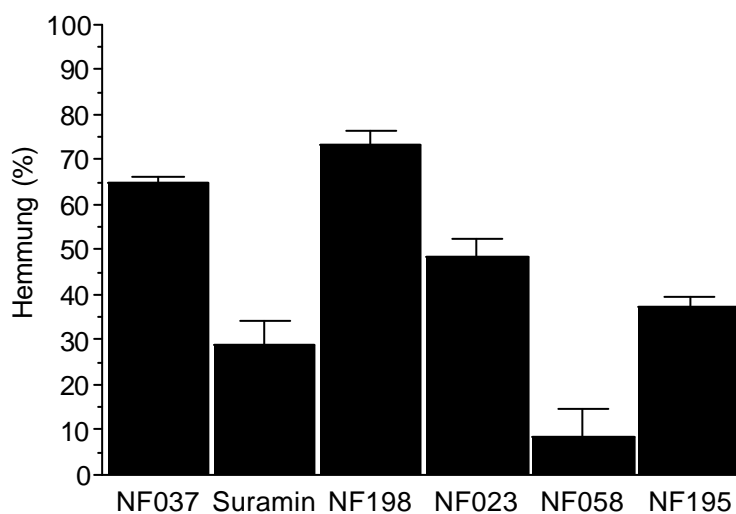
***Fura-2- versus Oregon-green-488/BAPTA-1-Fluoreszenz.*** Es wurden deshalb zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gewählt, da einige Substanzen aufgrund ihres Absorptionsprofils mit den Anregungswellenlängen (340 und 380 nm) von Fura-2 interferierten. Um potentielle optische Artefakte auszuschließen, wurde zusätzlich Oregon green-488/BAPTA-1, ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich (494 nm) liegt, verwendet.

## 5.2. Inhibitorische Potenz von Suramin-Analoga mit Biphenylstruktur an nativen P2 Rezeptoren

Die Gruppe der Biphenyle stellte insofern eine interessante Substanzserie dar, als durch diese spezielle Verknüpfung zweier Phenylringe eine Verbindungsklasse geschaffen wurde, die sich zwischen die großen Harnstoffe, abgeleitet von Suramin, und die kleinen Harnstoffe, abgeleitet von NF023, einordnen lässt. Durch die rigide Verknüpfung der Phenylringe bot sich eine neue Strukturvariation zur Weiterentwicklung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.

Anknüpfend an die Arbeit von Frau Dr. Susanne Damer (Damer, 2002), die im Zuge eines Substanz-Screenings eine Reihe von Suramin-Derivaten mit Biphenyl-Struktur auf ihre antagonistische Aktivität an nativen P2X Rezeptoren des Kaninchen-Vas-deferens sowie P2Y Rezeptoren der *Taenia Coli* des Meerschweinchens untersucht hatte, wurden Inhibitionskurven dieser, sowie weiterer Biphenyl-Derivate durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.). Die Ergebnisse der Vorversuche von Frau Dr. Susanne Damer (prozentuale Hemmung am Vas deferens des Kaninchens) korrelieren gut mit den Ergebnissen am Vas deferens der Ratte ( $IC_{50}$ -Werte) (siehe Abb. 5.1).

A.



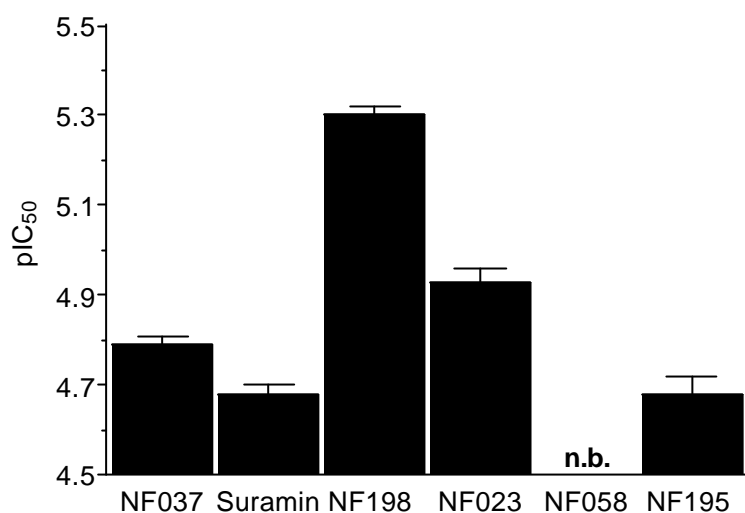
**B.**

Abb. 5.1: Vergleich der Experimente mit Biphenyl-Verbindungen. Daten aus Kontraktionen der prostatistischen Segmente des (A.) Kaninchen-Vas-deferens, ausgelöst durch 1  $\mu\text{M}$  *abmeATP* (Korrespondierende Daten der Kontraktionshemmung siehe Damer, 2002), sowie (B.) des Ratten-Vas-deferens, ausgelöst durch 10  $\mu\text{M}$  *abmeATP*. Korrespondierende  $\text{pIC}_{50}$ -Werte  $\pm$  S.E.M., siehe Kapitel 4.1.1.; n.b.: nicht bestimmt.

Durch die Experimente mit den Biphenylstrukturen konnten die folgenden Molekülbereiche identifiziert werden, deren Veränderung starke Auswirkungen auf die Bindung an P2 Rezeptoren ausübt:

1. Substitution der 4'-Position: Ausgehend von der unsubstituierten Form NF037 führte die Substitution mit einer Methylgruppe (Suramin) sowohl am Kaninchen wie auch am Ratten-Vas-deferens zu einer Verminderung der antagonistischen Aktivität an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren (siehe Abb. 5.1). Wie Frau Dr. Damer zeigen konnte, erfolgte die Verminderung des Antagonismus sowohl nach Substitution mit einer elektronegativen Gruppe (Fluoratom) wie auch mit einer Elektronen-liefernden Gruppe (Methylgruppe). Die Substitution mit einer elektronenreichen und voluminösen Gruppe, wie einem Phenylring (NF198), führte dagegen zur deutlichen Steigerung der antagonistischen Potenz an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Vas deferens. Analog verhalten sich die Struktur-Wirkungs-

Beziehungen an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren der Taenia Coli oder der Longitudinalmuskulatur des Ileum vom Meerschweinchen (Abb. 4.7).

Bei den kleinen Harnstoffen (NF023) führt die Substitution mit einer Methylgruppe (NF058) analog zu den großen Harnstoffen zu einer Verminderung des Antagonismus, während die Substitution mit einem Phenylring (NF195) im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung NF023 zu keiner Steigerung des Antagonismus am Vas deferens führt (siehe Abb. 5.1). An P2Y Rezeptoren der Taenia Coli wie auch an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum führte die Substitution mit einem Phenylring zu einem starken Anstieg der antagonistischen Potenz.

2. Variation in der Molekülgröße: NF195, als kleiner Harnstoff, inhibiert P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte Kontraktionen sowohl in Experimenten am Vas deferens des Kaninchens wie auch der Ratte deutlich geringer als das große Harnstoff-Derivat NF198. Auch für die Paare Suramin/NF058 sowie NF037/NF023 ließ sich eine Abnahme der antagonistischen Potenz mit Abnahme der Molekülgröße an P2X Rezeptoren des Kaninchen Vas deferens durch Frau Dr. Damer zeigen. Eine Steigerung der P2X Affinität mit steigender Molekülgröße, wurde auch für noch kleinere NF023-Derivate gezeigt (Bültmann et al., 1996b). Die Daten an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens korrelierten mit denen, die am Vas deferens des Kaninchens erhalten wurden, mit einer Ausnahme sehr gut. Der Antagonismus von NF023 nahm mit steigender statt abnehmender Molekülgröße (NF037) ab. Eine mögliche Ursache neben den Speziesunterschieden könnte sein, dass in den Experimenten am Kaninchen-Vas-deferens lediglich der Effekt einer Konzentration an Antagonist auf eine Konzentration an Agonist untersucht wurde, während am Ratten-Vas-deferens vollständige Inhibitionskurven ermittelt wurden. Wenn eine Inhibitionskurve sehr steil verläuft, kann die Punktmessung durch eine einzige Konzentration an Agonist und Antagonist zu möglichen Fehlinterpretationen führen.

An P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum konnte bezüglich der antagonistischen Potenz kein signifikanter Unterschied

zwischen dem großen Harnstoff-Derivat NF198 und dem kleinen Harnstoff-Derivat NF195 festgestellt werden (Abb. 4.7).

3. Variation der Phenylring-Verknüpfung: Wie bereits durch Frau Dr. Damer in ihrer Dissertation eingehend untersucht (Damer, 2002), stellt die Verknüpfung der zwei Phenylringe einen bezüglich der antagonistischen Wirkung äußerst sensiblen Strukturbereich dar. Die dreidimensionale Faltung des Moleküls scheint dabei von entscheidender Bedeutung zu sein. Besonders deutlich wird dies, vergleicht man das gestreckte Molekül NF130 (Biphenylringe para-para verknüpft) mit NF279 (1. und 2. Phenylring jeweils para-para verknüpft), das durch die peptidische Verknüpfung der beiden Phenylringe wesentlich flexibler ist (siehe Abb. 5.2).

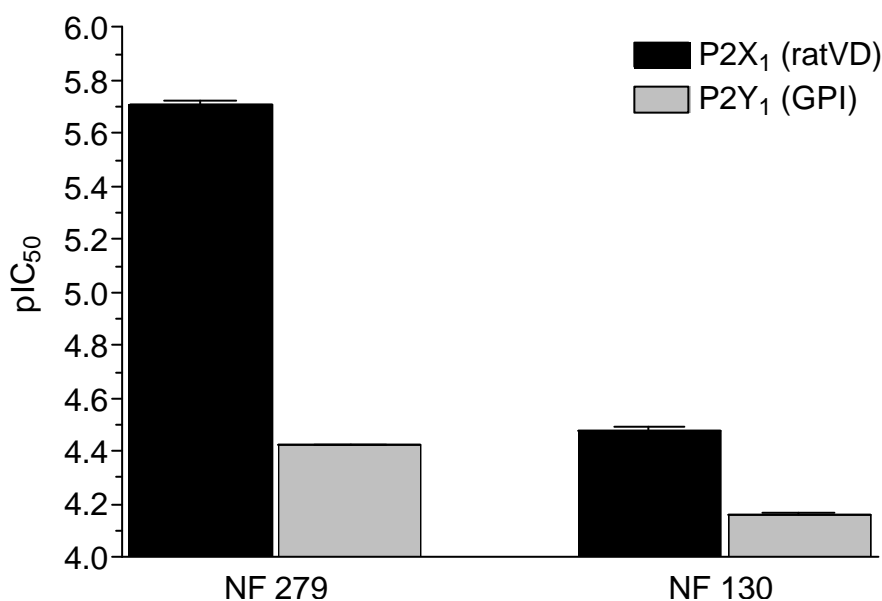


Abb. 5.2:  $pIC_{50}$ -Werte der Verbindungen NF279 und NF130, ermittelt aus Inhibitionskurven der Kontraktionen von prostatistischen Segmenten des Ratten-Vas-deferens (ratVD; P2X<sub>1</sub>; ausgelöst durch 10  $\mu$ M abmeATP) und der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI; P2Y<sub>1</sub>; ausgelöst durch 10  $\mu$ M ADPbS).

Die Reihenfolge der steigenden antagonistischen Potenz am P2X<sub>1</sub> Rezeptor des Ratten-Vas-deferens (NF139 = NF192 > NF136 > NF201 > NF130) zeigte,



dass eine para-Verknüpfung kombiniert mit einer meta- oder ortho-Verknüpfung für einen antagonistischen Effekt an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens am geeignetsten ist. Das Antagonistenprofil an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (NF192 = NF136 >> NF139 ≅ NF201 >> NF130) zeigte ebenfalls, dass auch hier aus den unterschiedlichen Verknüpfungen der Phenylringe drastische Wirkungsunterschiede resultieren (Abb. 4.7).

4. Bildung von Heterodimeren. Nach Bildung von Heterodimeren durch Kombination der Monomere von NF136 bzw. NF192 mit Pyridoxalphosphat (SB4 bzw. SB6) konnte sowohl an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren sowie an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren die antagonistische Potenz gesteigert werden (Abb. 5.3). Trotz unterschiedlicher Verknüpfung der Biphenylringe weisen sowohl SB4 wie auch SB6, analog zu den homomeren NF-Substanzen, eine vergleichbare antagonistische Potenz an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren auf. Deutlich stärker, aber ebenfalls gleich potent, werden P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelte Kontraktionen durch SB4 und SB6 inhibiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Symmetrie im Molekül nicht zwingend essentiell ist. Dennoch scheinen zwei pharmakophore Gruppen zur Inhibition der Rezeptoren benötigt zu werden. Experimente mit Pyridoxalphosphat allein zeigten nur eine geringe antagonistische Wirkung auf (Ralevic und Burnstock, 1998) (siehe Kapitel 1.3.2.). Aber nicht nur die Existenz zweier pharmakophorer Gruppen ist dabei von alleiniger Bedeutung: In der Verbindung SB9 wurde, analog zu NF279/NF130, die rigide Verknüpfung der Biphenyle durch die flexiblere, peptidische Verknüpfung des Suramins variiert. Während die antagonistische Potenz von SB9 an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren im Vergleich zu SB4 und SB6 etwas geringer ist (Lambrecht et al., 2000a; Abb. 5.3), nimmt der Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren zu. Hieraus resultiert die größere P2X<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Selektivität von SB9 gegenüber SB4 und SB6. Die flexible Peptidverknüpfung im Molekül von SB9 scheint somit ein wichtiges Strukturelement zu sein.

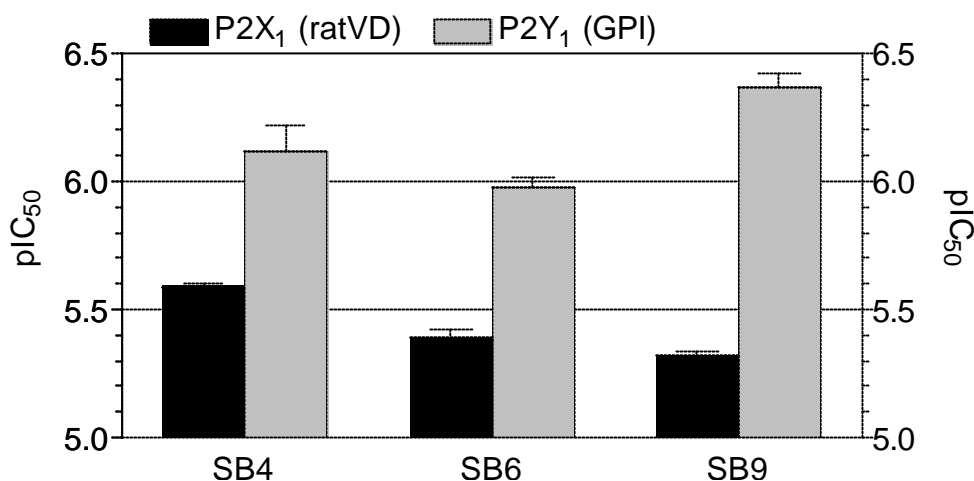


Abb. 5.3: Vergleich der  $pIC_{50}$ -Werte der Verbindungen SB4, SB6 und SB9 an  $P2X_1$  Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens (ratVD; Kontraktionen ausgelöst durch 10  $\mu$ M abmeATP) und  $P2Y_1$  Rezeptoren der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum (GPI; Kontraktionen ausgelöst durch 10  $\mu$ M ADPbS).

### 5.3. Screening von Suramin-Analoga an nativen P2 Rezeptoren

#### 5.3.1. Große Harnstoffe

Alle Variationen führten im Vergleich zur Muttersubstanz Suramin zu einer Abnahme der antagonistischen Aktivität an beiden Rezeptor-Modellen. Das bedeutet, dass alle untersuchten Molekülbereiche einen Einfluss auf den Antagonismus sowohl  $P2X_1$  Rezeptor- wie auch  $P2Y_1$  Rezeptor-vermittelter Kontraktionen ausübten. Die in Kapitel 4.2.1. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.4 graphisch zusammengefasst. Im Gegensatz zum  $P2Y_1$  Rezeptor, an dem mit der Ethen-1,2-diyl-Diamid-überbrückten Verbindung NF066 eine schwache Hemmung erzielt wurde, war für die Blockade des  $P2X_1$  Rezeptors der zentrale Harnstoff ein wesentliches Strukturelement, da die Verbindungen NF061 und NF066 nahezu wirkungslos blieben. An beiden Rezeptoren nahm die antagonistische Aktivität drastisch ab, wenn die ersten Phenylringe durch Chinolinringe ersetzt wurden. Das Verknüpfungsmuster der

zweiten Phenylringe blieb ohne Einfluss. In der Gruppe der Aspartate schien die Methylgruppe in 4'-Position (NF075) für einen schwachen Antagonismus am P2X<sub>1</sub> Rezeptor ebenso von Vorteil zu sein wie der Austausch der Carbonylgruppe gegen eine Sulfonylgruppe (NF186). Am P2Y<sub>1</sub> Rezeptor führte keine dieser Variationen zu einer deutlichen Hemmung.

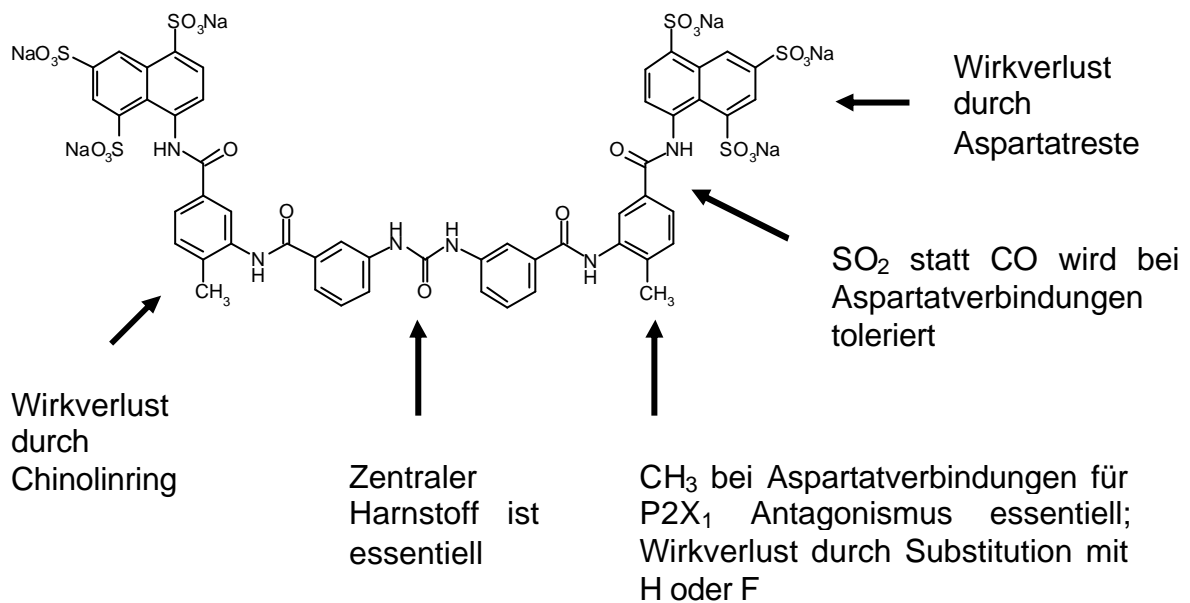


Abb. 5.4: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Serie großer Harnstoffe aus Screening-Experimenten.

### 5.3.2. Kleine Harnstoffe

Alle Variationen führten im Vergleich zur Muttersubstanz NF023 zu einer Abnahme der antagonistischen Aktivität an beiden Rezeptor-Modellen. Das bedeutet, dass alle untersuchten Molekülbereiche einen Einfluss auf den Antagonismus sowohl P2X<sub>1</sub> Rezeptor- wie auch P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelter Kontraktionen ausüben. Die in Kapitel 4.2.2. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.5 graphisch zusammengefasst.

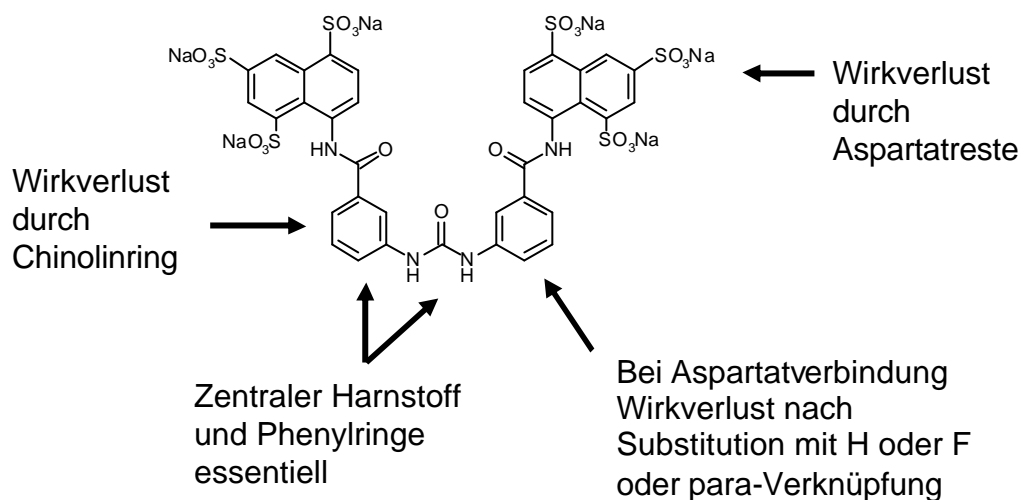


Abb. 5.5: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Serie kleiner Harnstoffe aus Screening-Experimenten.

Ein entscheidender Durchbruch gelang mit den sogenannten 'Schmetterling'-Strukturen. Diese doppelt symmetrischen Verbindungen beinhalten an den zentralen Phenylringen in Position 5' jeweils den identischen Rest der 1'-Position, was zu ihrer Schmetterlings-artigen Struktur führt. Die Anzahl der vier terminalen Phenylringe ist für die antagonistische Aktivität dabei von entscheidender Bedeutung. NF449 (Abb. 4.18), mit jeweils einer zusätzlichen Sulfonsäure in Position 2, inhibierte P2X<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte Effekte unter diesen Screeningbedingungen vollständig und P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelte Effekte zu etwa 50 Prozent, während das Monosulfonsäure-Derivat NF110 (Abb. 4.18) einen deutlich schwächeren Antagonismus an beiden Rezeptormodellen aufweist. Diese vielversprechende Strukturvariation der 'Schmetterling'-Verbindungen wurde intensiver untersucht. Da die folgenden Verbindungen aufgrund ihrer neuartigen Struktur und der interessanten Ergebnisse aus den Screening-Experimenten richtungsweisend für die P2 Forschung sein könnten, wurden die Verbindungen an einem weiteren Rezeptormodell, den P2X<sub>3</sub> Rezeptoren der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum untersucht. Leider konnten nicht alle Verbindungen aufgrund Substanzmangels an allen drei Rezeptorsystemen charakterisiert werden.

## 5.4. Screening von NF110-Analoga an nativen P2 Rezeptoren

Die durchgeführten Strukturvariationen führten zu keinen bedeutenden Unterschieden hinsichtlich des schwachen Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren mit Ausnahme des zentralen Harnstoffes, der für den Antagonismus der Verbindungen essentiell zu sein scheint. An P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ist die Sulfonsäure in Position 4 für einen Antagonismus ebenso essentiell wie die direkte peptidische Verknüpfung der Phenylringe, denn das Einführen einer Methylengruppe (Abb. 5.7) führt zu einem deutlich schwächeren Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren. An P2X<sub>3</sub> Rezeptoren fiel der starke Antagonismus der Verbindung NF110 auf, der in Kapitel 4.5.2. detaillierter untersucht wurde.

### 5.4.1. Variation der Sulfonsäurenposition

Die in Kapitel 4.3.1. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.6 graphisch zusammengefasst.

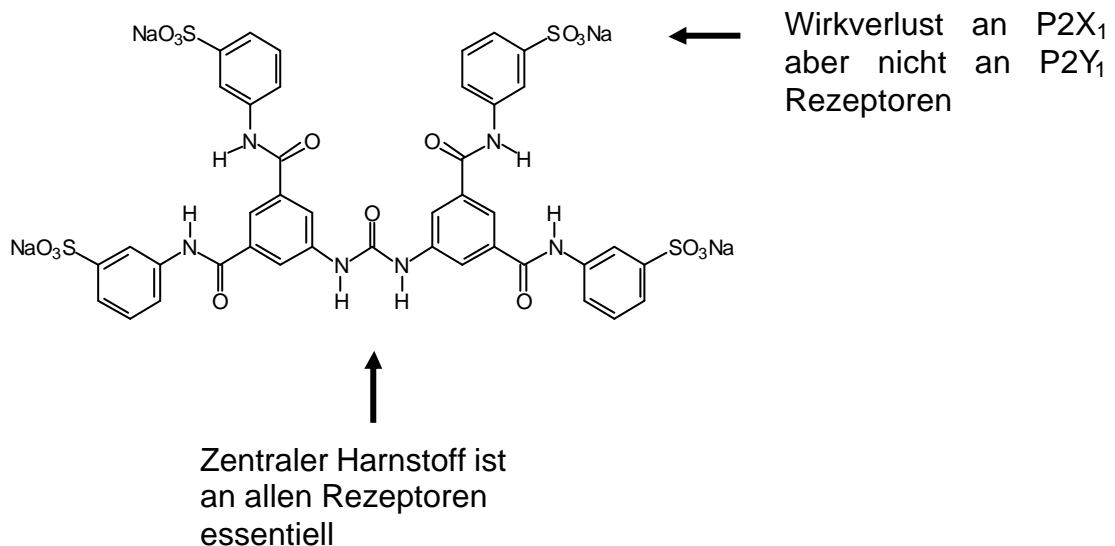


Abb. 5.6: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF110-Analoga mit Variation in der Sulfonsäureposition aus Screening-Experimenten.

### 5.4.2. Variation durch Einführen einer Methylenbrücke

Die Einführung einer Methylenbrücke führte zum Wirkverlust an allen Rezeptoren. Die in Kapitel 4.3.2. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.7 graphisch zusammengefasst.

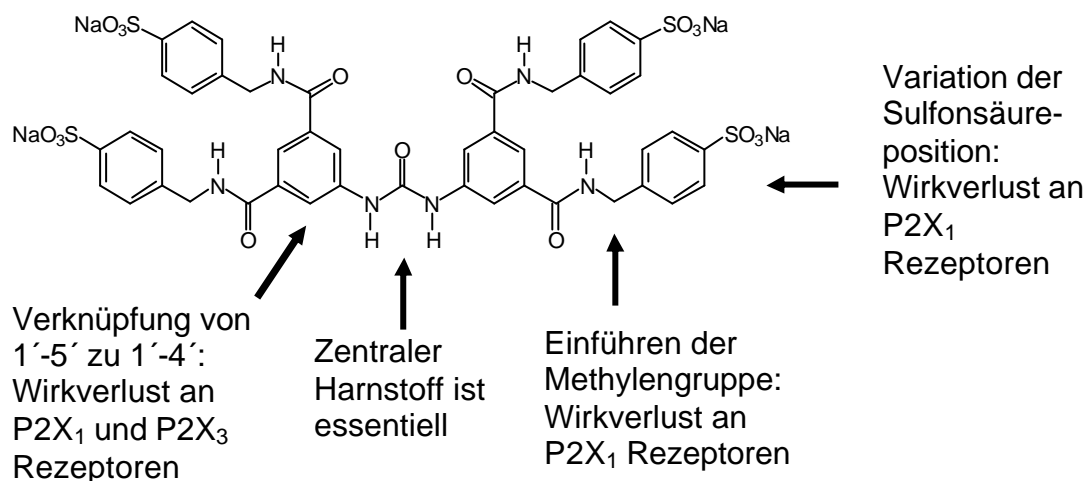


Abb. 5.7: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF110-Analoga mit Einführen einer Methylengruppe aus Screening-Experimenten.

## 5.5. Screening von NF449-Analoga an nativen P2 Rezeptoren

Als pharmakophore Elemente erwiesen sich die terminalen Sulfonsäure-substituierten Phenylringe. Sowohl die Entfernung der Sulfonsäuren in Position 2 wie auch die Umwandlung der 2-4 zur 2-5 Substitution führt zum drastischen Wirkverlust an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren. Die Substitution mit trisulfonierten Aminonaphthalinringen anstelle der disulfonierten Phenylringe führt ebenfalls zur verminderten antagonistischen Aktivität an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren, während die inhibitorische Potenz an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren deutlich zunimmt. Ein zweites pharmakophores Element stellte der zentrale Harnstoff dar. Wird er durch die Einführung einer Terephthalsäurediamid-Struktur ersetzt, so resultiert daraus eine Abnahme des Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, ein dramatischer Wirkungsverlust an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren, sowie ein deutlicher

Anstieg der antagonistischen Aktivität an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren. Die in Kapitel 4.4. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.8 zusammengefasst.

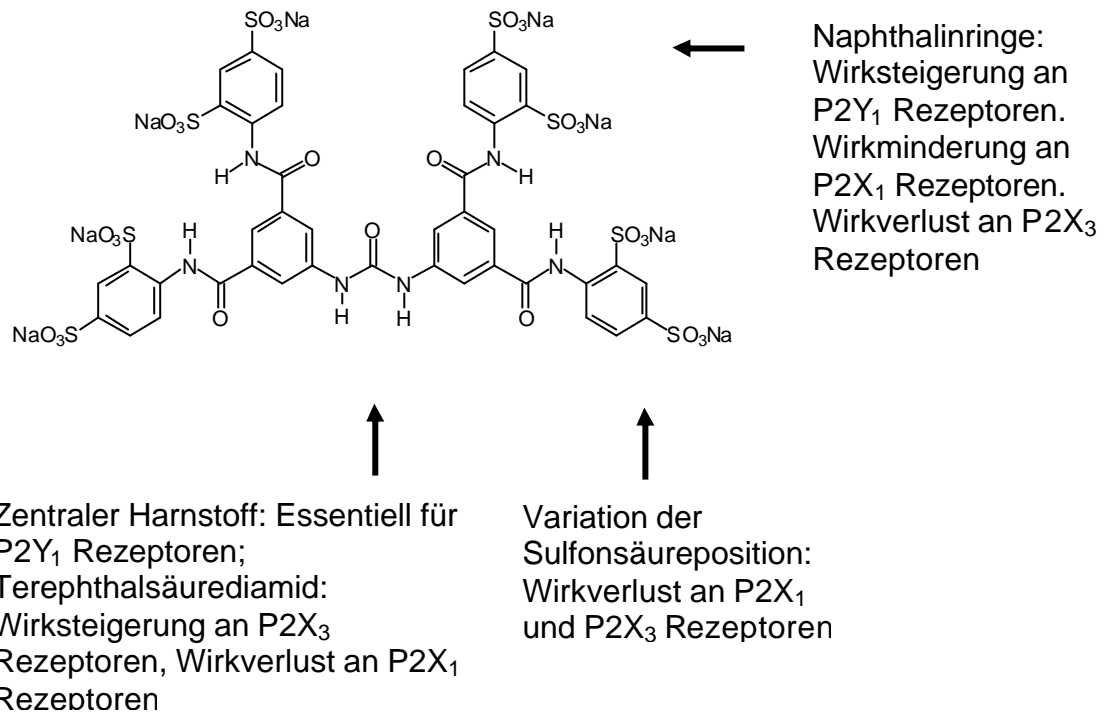


Abb. 5.8: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF449-Analoga aus Screening-Experimenten.

### Monomere der NF449-Analoga

Die Inhibition der monomeren Vorstufen von NF449 an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ist vergleichbar gering wie die antagonistische Aktivität von NF450 (Abb. 4.33). Dies erlaubt den Schluss, dass eine dimere Verbindung ohne zentralen Harnstoff (NF450) ebenso wenig für die Bindung am P2Y<sub>1</sub> Rezeptorprotein geeignet ist, wie die einzelnen Monomere. Eine Sonderstellung nehmen aber die Aminonaphthalinring-Derivate ein (Abb. 4.33). Erstaunlicherweise antagonisieren die Monomere mit Aminonaphthalinring-Struktur P2Y<sub>1</sub> Rezeptorvermittelte Kontraktionen mit erheblicher Potenz. Auch an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren ist die antagonistische Aktivität der monomeren Aminonaphthalinderivate mit der dimeren Verbindungen vergleichbar. Lediglich an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren sind ausschließlich die dimeren Verbindungen antagonistisch aktiv. Ein analoger

Zusammenhang wurde bei der Verbindung Trypan blue, sowie dessen Monomeren gefunden. Die dimere Verbindung Trypan blue ist ca. 300-fach potenter an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens als die monomere Struktur (Bültmann et al., 1994). Im Gegensatz zu den Aminonaphthalinring-Monomeren zeigen die Monomere der Disulfophenylring-Verbindungen nur eine äußerst schwache antagonistische Potenz an P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Dies spricht dafür, dass eine Verknüpfung zweier Monomerstrukturen über eine geeignete Brücke, zu einem starken Anstieg des Antagonismus an P2 Rezeptoren führt. Bei Aminonaphthalinring-substituierten Verbindungen scheint eine dimere, symmetrische Struktur für den Antagonismus an P2 Rezeptoren nicht zwingend essentiell zu sein. Bültmann und Kollegen konnten zeigen, dass das unsymmetrische NF023 Derivat BSt101, in dem einer der beiden Aminonaphthalinringe ohne Sulfonsäuren vorliegt, mit NF023 vergleichbare antagonistische Eigenschaften an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens, sowie an P2Y Rezeptoren der Taenia Coli des Meerschweinchens besitzt (Bültmann et al., 1996b). Somit kann spekuliert werden, dass nur eine der terminalen sulfonierten Aminonaphthalinring-Strukturen an der Bindung mit P2 Rezeptoren beteiligt ist. Um die durch Screening-Methoden mit NF449-Analoga erhaltenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untermauern, wurden die Verbindungen detaillierter charakterisiert.

## **5.6. Detaillierte Charakterisierung von NF449-Analoga**

### **5.6.1. Inhibitionskurven an P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren**

Die aus den Screening-Experimenten erhaltenen Daten, konnten durch die Ermittlung von Inhibitionskurven an nativen P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren bestätigt werden. Für einen starken Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren ist sowohl die Anzahl der Sulfonsäuren, wie auch deren Position an den Phenylringen von entscheidender Bedeutung. So ist für eine Blockade des P2X<sub>1</sub> Rezeptors das Optimum mit jeweils 2 Sulfonsäuren in Position 2 und 4



erreicht (NF449), während der Antagonismus an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren durch die Entfernung der Sulfonsäuren in Position 2 gesteigert werden kann (NF110). Für die Inhibition P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-vermittelter Kontraktionen bleibt die Verschiebung der Sulfonsäuren aus Position 4 zu Position 5 bei Erhalt der Sulfonsäuren in Position 2 ohne Einfluss. Werden die Sulfonsäuren in Position 2 entfernt, resultiert ein drastischer Verlust der antagonistischen Potenz an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Die Position 2 der Sulfonsäuren an den Phenylringen stellt somit einen sensiblen Molekülbereich dar. Durch Ersatz der terminalen Phenylringe mit Trisulfonsäure-substituierten Aminonaphthalinringen erfolgt die entgegengesetzte Verschiebung der Rezeptorselektivitäten: Während die Entfernung der Sulfonsäuren in Position 2 des Phenylringes zu einer Abnahme der antagonistischen Potenz an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren und zu einer Steigerung an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren führt (NF110), lässt sich die inhibitorische Aktivität an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren durch den Ersatz der Phenylringe mit Aminonaphthalinringen steigern, während sie an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren abnimmt (NF864). Eine weitere interessante Struktur-Wirkungs-Beziehung ergab sich zwischen den Verbindungen NF867 und NF864. Beide Verbindungen zeigen identische Rezeptorselektivitäten, wobei NF867 an allen Rezeptoren knapp eine Zehnerpotenz schwächer potent als NF864 ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass in beiden Verbindungen ähnliche pharmakophore Elemente für die Bindung an allen drei untersuchten Rezeptormodellen vorhanden sind. Die Position der Sulfonsäuren an den terminalen aromatischen Ringen ist möglicherweise dabei das Strukturelement, das für die Korrelation der beiden unterschiedlichen Verbindungen entscheidend ist. Weitergehende Untersuchungen mit Verbindungen mit variiertem Sulfonsäureposition, bzw. mit unterschiedlichen Substituenten werden benötigt, um diesen Sachverhalt weiter aufzuklären. Die in Kapitel 4.5. ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sind in Abb. 5.9 graphisch zusammengefasst.

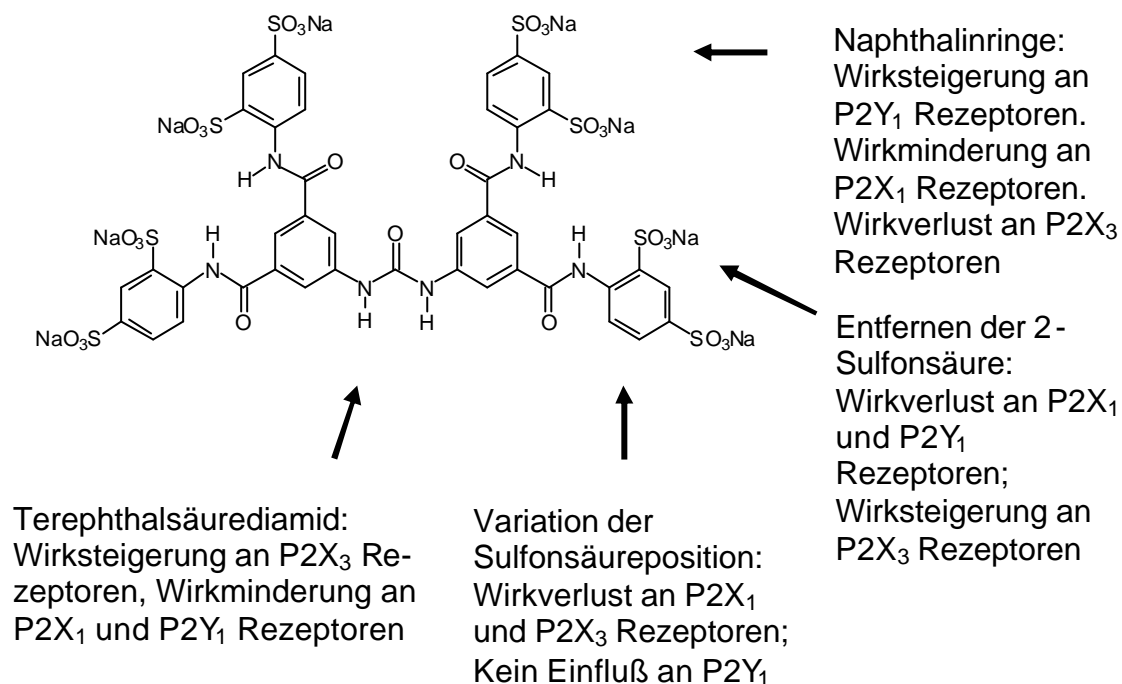


Abb. 5.9: Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF449-Analoga auf der Basis von Inhibitionskurven.

Dass die Position von Sulfonsäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von P2-Antagonisten an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ausübt, konnte auch in anderen Strukturklassen gezeigt werden. Durch die Sulfonsäure in Position 2 am terminalen Phenylring steigt die Affinität von Cibacron blue 3GA im Vergleich zu Reactive blue 2 um ca. eine Zehnerpotenz an (Tuluc et al., 1998). Dies korreliert mit dem Anstieg der antagonistischen Potenz von der monosulfonylierten Verbindung NF110 zu NF449, das ebenfalls Sulfonsäuren in Position 2 an den terminalen Phenylringen aufweist. Die durch (Kim et al., 2001) untersuchten Struktur-Wirkungs-Beziehungen von PPADS-Derivaten (siehe Kapitel 1.3.2.) korrelieren allerdings nicht mit den Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die an den 'Schmetterling'-Verbindungen ermittelt wurden (siehe Abb. 5.10). Während die isomere Sulfonsäure-Substitution von iso-PPADS die antagonistische Potenz im Vergleich zu PPADS noch etwas steigert (Abb. 1.4 und Tabelle 1.1), führt der Wechsel der Sulfonsäurenposition bei den 'Schmetterling'-Verbindungen NF449 und NF867 zum deutlichen

Wirkverlust an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens. Die Substitution des PPADS-Derivates MRS2159 mit nur einer Carboxylgruppe in Position 4 führt zu einem starken Antagonismus (Abb. 1.4 und Tabelle 1.1), während die Schmetterlingverbindung NF110 mit jeweils einer Sulfonsäure in Position 4 nur einen schwachen P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten darstellt. Dies bedeutet, dass sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Suramin-abgeleiteten Derivaten auf PPADS-Analoga nur schwer übertragen lassen. Wenn auch gleiche Variationen der betrachteten pharmakophoren Gruppe durchgeführt wurden, scheint die Eigenschaft des restlichen Molekülbereichs für den Antagonismus an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren von großem Einfluss zu sein.

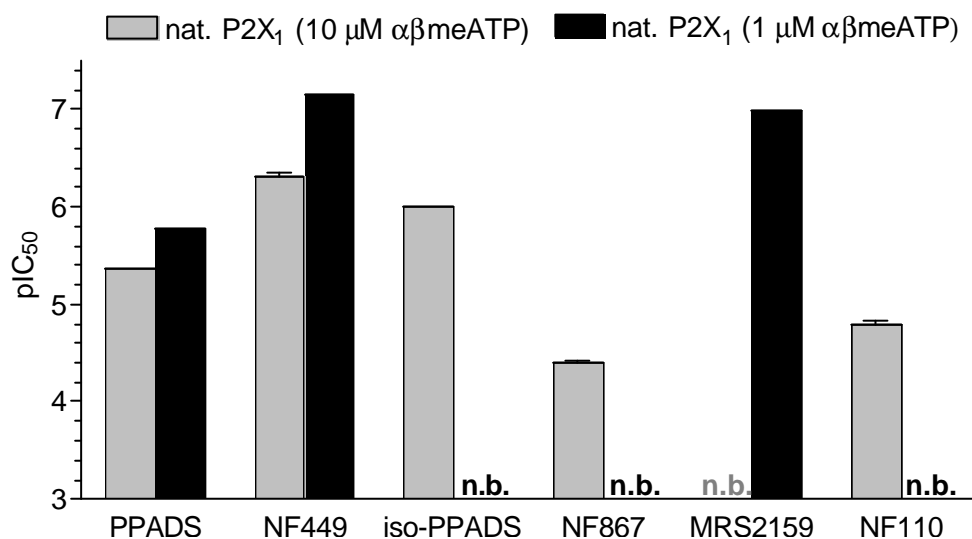


Abb. 5.10: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte von Suramin- und PPADS-Analoga an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens (Kontraktionen wurden durch 1 bzw. 10 μM αβmeATP ausgelöst). n.b. = nicht bestimmt; Daten von MRS2159 durch Susanne Horner ermittelt.

### 5.6.2. Hemmung von Ektonukleotidasen

Alle Verbindungen (siehe Tabelle 4.7) stellten schwache Inhibitoren der Ektonukleotidasen von *Xenopus laevis* Oozyten dar. Durch ihren schwachen Antagonismus auf den ATP-Metabolismus im Vergleich zu ihrer antagonistischen Potenz an nativen P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> oder P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren, sind sie

als Leitstrukturen zur Entwicklung selektiver Ektonukleotidase-Inhibitoren ungeeignet.

## 5.7. Pharmakologische Charakterisierung von NF449

### 5.7.1. Effekt von NF449 auf $\alpha\beta$ meATP-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven am Vas deferens der Ratte

Einen ersten Hinweis darauf, dass NF449 einen kompetitiven Antagonisten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens darstellt, lieferte die parallele Linksverschiebung der Inhibitionskurve nach Senkung der Agonistenkonzentration um eine Zehnerpotenz (siehe Kapitel 4.6.1., Abb. 4.38). Die kompetitive Natur des Antagonismus von NF449 wurde nach Durchführung von Dosis-Wirkungs-Kurven bestätigt. NF449 verschob konzentrationsabhängig die Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\alpha\beta$ meATP nach links (Abb. 4.39). Gleichzeitig trat eine konzentrationsunabhängige Versteilung der Dosis-Wirkungs-Kurven des Agonisten in Anwesenheit von NF449 auf; das bedeutet, dass in Anwesenheit von NF449 eine stärkere Kontraktion nach Gabe der gleichen Agonistenkonzentration verglichen mit der Kontrollkurve (in Abwesenheit des Antagonisten) auftrat (siehe Kapitel 4.6.2.). Diese Kurvenversteilung durch P2-Antagonisten stellt ein bekanntes und nach wie vor ungeklärtes Phänomen an Präparationen von glattmuskulären Organen nach Stimulation von P2X<sub>1</sub> Rezeptoren dar (Tuluc et al., 1998). Um dieses Phänomen aufzuklären, wurden weitere Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt (siehe Kapitel 5.8.).

Aufgrund der Tatsache, dass mit  $\alpha\beta$ meATP kein klar definierbares Maximum der Kontraktion erreicht werden konnte und sich die Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von NF449 versteilen, wurden die Daten für die Schild-Analyse auf einem Niveau der Dosis-Wirkungs-Kurven abgelesen, auf dem die Kurven parallel erschienen. Wie die Schild-Analyse (siehe Kapitel 4.6.2., Abb. 4.39) zeigte, stellt NF449 einen kompetitiven Antagonisten mit einem pA<sub>2</sub>-Wert von 7.15 an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens dar. Damit ist NF449 in

funktionellen Experimenten an isolierten Organen der bis heute weltweit potenteste, kompetitive Antagonist an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren. Die Substanz flutet im Rezeptorkompartiment schnell an und lässt sich, wenn auch langsam, vollständig auswaschen (Abb. 4.40).

### **5.7.2. Effekte von NF449 und MRS2179 auf ADPbS-induzierte Dosis-Wirkungs-Kurven an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum**

Wie sich bereits durch die biphasische Inhibitionskurve von NF449 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum vermuten ließ (siehe Kapitel 4.6.4., Abb. 4.41), zeigte NF449 gegenüber ADPβS einen nicht-kompetitiven Antagonismus auf der Basis von Dosis-Wirkungs-Kurven. Die einzelnen pA<sub>2</sub>-Werte aus den rechts-verschobenen Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 4.42) nahmen mit steigender Konzentration von NF449 ab (siehe Kapitel 4.6.5., Tabelle 4.9). Die Steigung des Schildplots war mit 0.59 signifikant von 1 verschieden. Der Schnittpunkt mit der X-Achse ergab einen pA<sub>2</sub>-Wert von 6.34. Da die Kinetik von NF449 ein schnelles Eintreten des Antagonismus aufzeigte, ist eine unzureichende Inkubationsdauer als Ursache auszuschließen (siehe Kapitel 4.6.6.).

Zum Vergleich der Ergebnisse von NF449 wurde der selektive und kompetitive P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonist MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum untersucht (siehe Kapitel 4.7. und 4.8.). MRS2179 stellt an mit P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren-transfizierten Zelllinien einen reinen kompetitiven P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten dar (Boyer et al., 1998). Interessanterweise weist MRS2179 an der Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum ein vergleichbares Verhalten wie NF449 auf. Die prozentualen Hemmungen mit steigender Konzentration von MRS2179 weichen von der idealen sigmoidalen Kurve vor allem in niedrigen Konzentrationen sichtbar ab (Abb. 4.44). Die im Rahmen von Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelten Einzel-pA<sub>2</sub>-Werte sind signifikant unterschiedlich und nehmen mit steigender Konzentration von MRS2179 ab (siehe Kapitel 4.8., Tab. 4.11). Die Schild-Analyse ergab einen

$pA_2$ -Wert von 6.90, bei einer Steigung des Schild-Plots von 0.72. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass ADP $\beta$ S eventuell noch weitere Rezeptoren im Meerschweinchen-Ileum stimuliert. Wie bereits in Kapitel 1.2. beschrieben, scheint Rezeptorheterogenität in isolierten Organen eher die Regel als die Ausnahme zu sein. Da die heute verfügbaren Agonisten keine sehr ausgeprägte Subtyp-Selektivität besitzen, könnte die Stimulation verschiedener Rezeptor-Subtypen eine mögliche Ursache darstellen. Bei selektiver Inhibition des P2Y<sub>1</sub> Rezeptors durch NF449 oder MRS2179 würde dann ein nicht-kompetitiver Antagonismus durch die Schild-Analyse ermittelt werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Aggregationsexperimenten mit MRS2179 an humanen Thrombozyten ermittelt. Die Schild-Analyse der Aggregationshemmung durch MRS2179 ergab einen  $pA_2$ -Wert von 6.55 bei einer Steigung von 0.64. Dieser Befund wurde durch die Tatsache erklärt, dass die Aggregation über zwei unterschiedliche ADP-stimulierbare P2Y Rezeptoren (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>) erfolgte, wodurch der falsche Eindruck eines vermeintlich nicht-kompetitiven Antagonismus entsteht (Baurand et al., 2001; Raboisson et al., 2002). Die dringend benötigte Untersuchung des Antagonismus von NF449 an verschiedenen rekombinanten P2Y Rezeptor-Subtypen ist für die weitere Charakterisierung von NF449 essentiell.

### 5.7.3. Rezeptor-Spezifität

Wie in Kapitel 4.6.7. beschrieben, weist NF449 eine hohe Rezeptor-Spezifität auf. Weder  $\alpha_{1A}$ - und  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, Adenosin A<sub>1</sub>, histaminerge H<sub>1</sub> und muskarinerge M<sub>3</sub> Rezeptoren noch Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren wurden nennenswert inhibiert. Durch Hohenegger und Kollegen berichtet, inhibiert NF449 die Bindung von GTP $\gamma$ S an die G<sub>s $\alpha$</sub> -Untereinheit von G-Proteinen sowie die Interaktion des Adenosin A<sub>1</sub> Rezeptors mit den jeweiligen G-Proteinen, (G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>) (Hohenegger et al., 1997). Diese Inhibition wurde auch für Suramin und andere Analoga beschrieben (Beindl et al., 1996; Freissmuth et al., 1996, 1999; Holler et al., 1999). Diese Ergebnisse wurden jedoch an Membranpräparationen erhalten. Da aufgrund der Molekülgröße und der hohen Polarität von Suramin-Analoga, wie NF449, eine Permeation der Zellmembran in intakten Geweben

oder Thrombozyten äußerst unwahrscheinlich ist, kann ein solcher Effekt in unseren Modellen ausgeschlossen werden. Vorsichtig sollte allerdings mit Ergebnissen von Experimenten an Membranpräparationen umgegangen werden, in denen die Verbindungen freien Zugang zu G-Proteinen haben können.

#### **5.7.4. Effekte von NF449 an weiteren nativen und rekombinanten P2 Rezeptoren**

Aufgrund der außergewöhnlichen Potenz von NF449 an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens wurde diese Verbindung durch unsere Kooperationspartner Herrn Dr. Jürgen Rettinger, Prof. Dr. Günther Schmalzing und Prof. Dr. Fritz Markwardt elektrophysiologisch (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme) an rekombinanten P2X Rezeptoren der Ratte sowie des Menschen, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, untersucht. Herr Dr. Matthias Kassack und Prof. Dr. Peter Nickel untersuchten fluoreszenzspektroskopisch den Effekt von NF449 an endogenen P2Y<sub>2</sub> Rezeptoren von HEK-(human embryonic kidney)-293-Zellen, sowie an rekombinanten P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren, exprimiert in CHO (chinese hamster ovary)-Zellen.

**Präinkubation.** Um an den rekombinanten, schnell desensibilisierenden P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren, sowie an den heteromeren P2X<sub>1/5</sub> Rezeptoren der Ratte einen Gleichgewichtszustand des Antagonisten zu erhalten, war eine Präinkubationszeit von 60 und 30, sowie 60 Sekunden nötig. Im Gegensatz dazu, konnte NF449 an den nicht desensibilisierenden P2X<sub>2</sub> und P2X<sub>4</sub> Rezeptoren, sowie den heteromeren P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren mit dem Agonisten koappliziert werden. An humanen P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>7</sub> Rezeptoren war lediglich eine Präinkubationszeit von 16 bzw. 5 Sekunden nötig. An humanen nativen P2Y<sub>1</sub> und rekombinanten P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren wurde NF449 für 30 Minuten vorinkubiert.

**Reversibilität.** An allen untersuchten P2X Rezeptoren war der Antagonismus von NF449 vollständig reversibel. An P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2X<sub>1/5</sub> Rezeptoren der Ratte wurde eine 3-minütige Auswaschphase benötigt, während das

vollständige Auswaschen an P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> und P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren gleich schnell wie der Austausch der Spülflüssigkeit erfolgte. An humanen P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>7</sub> Rezeptoren wurden 4 Minuten bzw. 10 Sekunden zur vollständigen Reversibilität des Antagonismus benötigt. An humanen nativen P2Y<sub>1</sub> und rekombinanten P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren wurde keine OFF-Kinetik untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst und zeigen, dass NF449 eine außergewöhnlich hohe Potenz an und Selektivität für P2X<sub>1</sub> Rezeptoren besitzt. Dies steht weitgehend im Einklang mit den Befunden, die im Rahmen dieser Arbeit an isolierten Organen erhoben wurden. NF449 könnte daher der ideale Kandidat zur Entwicklung eines für die P2-Rezeptor-Forschung lang ersehnten Radioliganden sein.



*Tabelle 5.4: Inhibitorische Eigenschaften von NF449 an homomeren und heteromeren, rekombinanten P2X Rezeptoren der Ratte (rP2X) und des Menschen (hP2X), sowie an humanen nativen (hP2Y<sub>2</sub>) und rekombinanten (hP2Y<sub>11</sub>) P2Y Rezeptoren.*

Rezeptor	Präinkubationszeit	Konz. [ATP]	pIC <sub>50</sub> ± S.E.M.
rP2X <sub>1</sub> <sup>a,b</sup>	60 Sekunden	1 µM	9.55 ± 0.01
rP2X <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Koapplikation	10 µM	~ 4.33
rP2X <sub>3</sub> <sup>a,b</sup>	30 Sekunden	1 µM	5.74 ± 0.2
rP2X <sub>4</sub> <sup>a</sup>	Koapplikation	10 µM	<< 3.52
rP2X <sub>1/5</sub> <sup>a</sup>	60 Sekunden	1 µM αβmeATP	9.17 ± 0.05
rP2X <sub>2/3</sub> <sup>a</sup>	Koapplikation	1 µM αβmeATP	6.54 ± 0.01
hP2X <sub>1</sub> <sup>c</sup>	60 Sekunden	1 µM	10.27 ± 0.04
hP2X <sub>1</sub> <sup>c</sup>	60 Sekunden	100 µM	9.39 ± 0.07
hP2X <sub>7</sub> <sup>c</sup>	60 Sekunden	100 µM	4.29 ± 0.13
hP2Y <sub>2</sub> <sup>d</sup>	30 min	3 µM	4.47 ± 0.22
hP2Y <sub>11</sub> <sup>d</sup>	30 min	3 µM ATP <sub>γ</sub> S	< 4

<sup>a</sup>Rettinger et al., 2003. <sup>b</sup>Braun et al., 2001. <sup>c</sup>Hülsmann et al., 2003. <sup>d</sup>Kassack et al., 2003.

Wie aus den Ergebnissen weiterhin deutlich wird, weist der humane P2X<sub>1</sub> Rezeptor eine höhere Sensitivität für NF449 auf als der Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptor. Dies könnte in einer unterschiedlichen Proteinstruktur der beiden Rezeptorhomologen begründet sein, da die cDNA-Sequenzen der rP2X<sub>1</sub> und hP2X<sub>1</sub> Rezeptoren keine 100-prozentige sondern nur eine 89-prozentige Homologie aufweisen (Soto et al. 1997). Andererseits korrelieren die Ergebnisse anderer, strukturell verwandter P2 Rezeptor-Antagonisten nicht hinsichtlich einer durchgängig höheren Sensitivität für humane P2X<sub>1</sub> Rezeptoren (siehe Abb. 5.11). So inhibieren Suramin und NF449 humane P2X<sub>1</sub>

Rezeptoren potenter als P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte, NF023 inhibiert beide Rezeptorhomologe in gleicher Weise, während NF279 und PPADS eine höhere inhibitorische Potenz für P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte im Vergleich zu den humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren aufweisen.

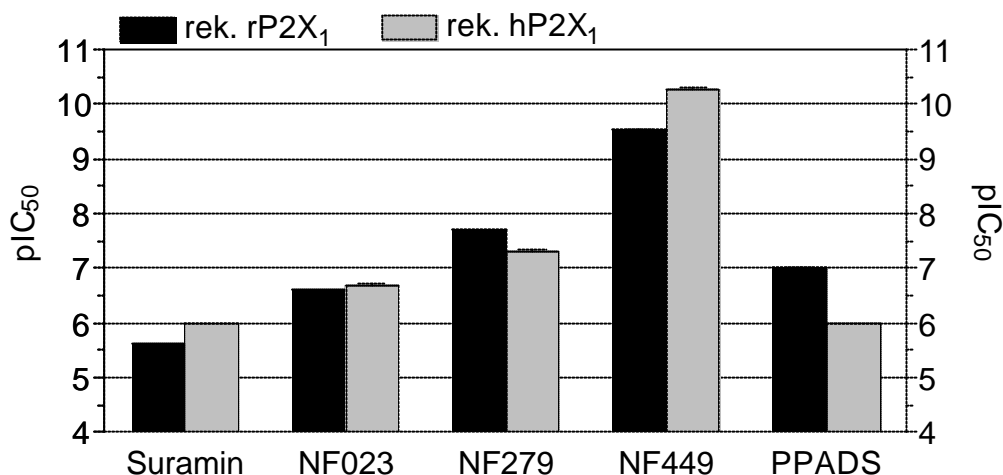


Abb. 5.11: Vergleich der pIC<sub>50</sub>-Werte von NF449 und Standardantagonisten an rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der Ratte (rek. rP2X<sub>1</sub>) und des Menschen (rek. hP2X<sub>1</sub>) (Soto et al., 1997; Lambrecht, 2000; Lambrecht et al., 2002; Hülsmann et al., 2003).

### 5.8. Untersuchungen zur Kurvenversteilung am Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen pIC<sub>50</sub>-Werten an *Xenopus laevis* Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens

Neben dem bekannten Phänomen der Versteilung der Dosis-Wirkungs-Kurven von αβmeATP bzw. der Maximumzunahme in Anwesenheit von P2 Antagonisten am Vas deferens der Ratte wurde eine weitere Besonderheit im Rahmen der Entwicklung von potenteren P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten deutlich: der Unterschied zwischen den an nativen Rezeptoren gewonnenen Ergebnissen im Vergleich zu den Daten an rekombinanten Rezeptoren, die in

*Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden, nahm mit steigender Potenz der Antagonisten überproportional zu (siehe Abb. 5.12).

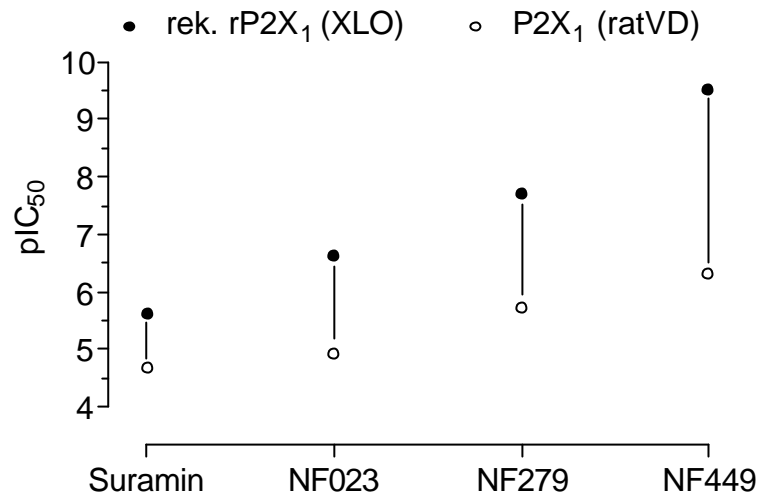


Abb. 5.12: Zunahme der Differenz zwischen  $pIC_{50}$ -Werten von P2 Rezeptor-Antagonisten aus Experimenten an rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten ((•); rek. rP2X<sub>1</sub> (XLO)) und nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens ((◦); P2X<sub>1</sub> (ratVD)) (Lambrecht et al., 1999, 2000).

Interessanterweise tritt die oben erwähnte Kurvenversteilung am Vas deferens der Ratte in Anwesenheit diverser strukturell unterschiedlicher P2 Antagonisten, wie z.B. Suramin und NF023 sowie deren Derivate, Evans blue, Trypan blue oder Reactive blue 2 (Bültmann et al., 1994, 1996a; Tuluc et al., 1998) und NF279 (Lambrecht et al., 1999) auf. Darüber hinaus wurde diese auch an anderen glattmuskulären Organen, die P2X Rezeptoren tragen (Hoyle et al., 1990; von Kügelgen et al., 1990; Blakeley et al., 1991; Trezise et al., 1994b) beobachtet. Die Kurvenversteilung war bei den Untersuchungen mit Trypan blue Agonisten-spezifisch. Sie trat ausschließlich bei  $\alpha\beta$ meATP-vermittelten nicht aber bei Noradrenalin-vermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven am Ratten-Vas-deferens auf (Bültmann et al., 1994). Dies macht einen unspezifischen Effekt der Antagonisten am Organ unwahrscheinlich. Verantwortlich für die Versteilung war der 1-Amino-8-naphthyl-3,6-disulfonsäure-Rest, der allein bereits für eine mit Trypan blue vergleichbare Kurvenversteilung ausreichte.

Ebenso konnte mit dem 8-Amino-1,3,5-trisulfonsäure-Rest von Suramin, NF023, sowie deren Derivaten die gleiche Kurvenverteilung wie in Anwesenheit der vollständigen, dimeren Verbindungen beobachtet werden (Bültmann et al., 1996b). Dies lässt den Schluss zu, dass die polyanionischen Reste der Verbindungen für die Verteilung verantwortlich sein könnten. Aufgrund der Tatsache, dass unterschiedliche Verbindungen in unterschiedlichen Geweben zur gleichen Kurvenverteilung führen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine gemeinsame Eigenschaft reversibler P2 Rezeptor-Antagonisten handelt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist unklar. Die folgenden Möglichkeiten könnten eventuell der Grund dafür sein.

#### **5.8.1. Desensibilisierungs-Effekte**

Erstens könnte eine Ursache für diese Kurvenverteilung ein eventueller Schutz des P2X<sub>1</sub> Rezeptors durch die Antagonisten vor der schnellen Desensibilisierung sein, die in höheren Agonistenkonzentrationen zu einer verminderten Kontraktibilität führen könnte. Dies bedeutet, dass die P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ungeschützt bei hohen Agonisten Konzentrationen so schnell desensibilisieren, dass sie am glatten Muskel keine vollständige Kontraktion auslösen können (von Kügelgen et al., 1990). Für Suramin sowie NF279 wurde dieser Schutz vor vollständiger Desensibilisierung von P2X Rezeptoren bereits vermutet (Klapperstück et al., 2000; Ralevic et al., 2001). Weitere Untersuchungen werden benötigt, um diese Theorie zu belegen.

#### **5.8.2. Hemmung eines Relaxations-vermittelnden Kaliumkanals durch Apamin**

Zweitens könnten die Antagonisten im nativen Gewebe einen Relaxations-vermittelnden Rezeptor oder Kanal inhibieren, der in der Kontrollkurve zusätzlich zum Kontraktions-vermittelnden Rezeptor stimuliert wird. Dadurch würde die Kontrollkurve, als Mischung der Kontraktion und Relaxation im Vergleich zu den `reinen´ Kontraktionskurven in Anwesenheit der Antagonisten flacher erscheinen und ein geringeres Maximum aufweisen (Rovati und Nicosia,

1994). Somit wäre auch die antagonistische Potenz deutlich herabgesetzt. Im Vas deferens der Maus schlagen Blakeley und Kollegen dafür einen postsynaptischen P2Y Rezeptor vor, dessen Stimulation die Kontraktion, vermittelt durch den kostimulierten, postsynaptischen P2X Rezeptor, zeitgleich inhibiert (Blakeley et al., 1991). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde auf einen neuen Relaxations-vermittelnden P2Y Rezeptor an der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes von Mäusen hingewiesen, der durch  $\alpha\beta$ meATP stimuliert werden kann (Giaroni et al., 2002). Untersuchungen von  $\alpha\beta$ meATP an rekombinanten Rezeptoren stehen dieser Hypothese allerdings entgegen.  $\alpha\beta$ meATP zeigt folgendes Selektivitätsprofil (Lambrecht, 2000):  $P2X_1 = P2X_3 = P2X_{2/3} = P2X_{1/5}$  ( $EC_{50} \sim 1 \mu M$ ) >  $P2X_2$  ( $EC_{50} > 10 \mu M$ ) ; inaktiv an  $P2X_{4-7}$  und  $P2X_{4/6}$  ; Antagonist an Ratten  $P2X_4$  ( $IC_{50} = 4.6 \mu M$ ). Bis heute gibt es keinen Beleg dafür, dass  $\alpha\beta$ meATP an P2Y Rezeptoren bindet (Yu et al., 1999). Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Existenz eines Relaxations-vermittelnden  $\alpha\beta$ meATP-sensitiven P2 Rezeptors im Vas deferens der Ratte nachzuweisen. Da  $\alpha\beta$ meATP für mindestens 2 Stunden enzymatisch stabil ist (Khakh et al., 1995), kann ein Effekt durch Metabolisierungsprodukte ausgeschlossen werden. Beim Einsatz von [ $^3H$ ] $\alpha\beta$ meATP am Ratten-Vas-deferens wurden 2 unterschiedliche Bindungsstellen für  $\alpha\beta$ meATP identifiziert. Ob die Bindungsstelle mit niedriger Affinität eventuell einen zweiten  $\alpha\beta$ meATP-sensitiven Rezeptor darstellt ist unklar (Khakh et al., 1994). Im Mesenterialbett der Ratte konnte durch Stimulation mit  $\alpha\beta$ meATP ein biphasischer Kurvenverlauf aus einer initialen Kontraktion, gefolgt von einer längeren Relaxation gezeigt werden. Es wird ein Relaxations-vermittelnder,  $\alpha\beta$ meATP-sensitiver P2X Rezeptor vermutet (Ralevic, 2002). Durch Bültmann und Kollegen konnte allerdings gezeigt werden, dass weder  $\alpha\beta$ meATP noch ADP $\beta$ S, das vorkontrahierte Ratten-Vas-deferens relaxieren (Bültmann und Starke, 2001; Bültmann et al., 2002).

Neben einem  $\alpha\beta$ meATP-sensitiven, relaxierenden P2 Rezeptor, könnte auch ein Kalzium-abhängiger Kaliumkanal für die Relaxation verantwortlich sein. Nach Einstrom von Natrium und Kalzium durch Aktivierung des  $P2X_1$

Rezeptors, anschließender Depolarisation und weiterem Kalziumeinstrom, könnte dieser Kanal durch Ausstrom von Kaliumionen eine folgende Relaxation initiieren und aufrecht erhalten. Im Ratten-Ileum wurde ein solcher Kanal, der durch Apamin, einem Neurotoxin aus Bienengift, das als Blocker des Kalzium-abhängigen Kaliumkanals eingesetzt wird, inhibiert werden kann, identifiziert. Nach Stimulation des P2X<sub>1</sub> Rezeptors mittels  $\alpha\beta$ meATP wird die Relaxation des Ileum durch diesen Kanal gesteuert (Storr et al., 2000). Durch den Apamin-sensitiven Kanal erfolgt auch in der Ringmuskulatur des Meerschweinchen-Kolon eine  $\alpha\beta$ meATP-induzierte Relaxation (Zagorodnyuk et al., 1996). Im Vas deferens des Meerschweinchens wurde bereits gezeigt, dass die ATP-induzierte Relaxation durch Apamin inhibiert und die ATP-induzierte Kontraktion noch potenziert werden kann (Fedan et al., 1984). Ein solcher Kaliumkanal könnte eventuell auch am Vas deferens der Ratte eine zur Kontraktion zeitgleiche Relaxation bewirken.

**Fazit.** Es wurde versucht, durch Apamin die mögliche Relaxation des Ratten-Vas-deferens zu inhibieren und somit die Kontrollkurve zu einer reinen Kontraktionskurve zu transformieren (siehe Kapitel 4.9.1.). Als Positivkontrolle konnte der im Ratten-Ileum identifizierte Relaxations-vermittelnde, Kalzium-abhängige Kaliumkanal durch Apamin deutlich inhibiert werden. Da Apamin in unseren Versuchen am Vas deferens der Ratte zu keiner Veränderung der DWK weder in Ab- noch in Anwesenheit des Antagonisten führte, kann ein Apamin-sensitiver Kaliumkanal als Ursache ausgeschlossen werden.

### 5.8.3. Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Drittens könnte  $\alpha\beta$ meATP an unspezifische Bindungsstellen im Ratten-Vas-deferens binden, die in Anwesenheit der Antagonisten abgesättigt werden. Dadurch könnte der Agonist besser in das Rezeptorkompartiment gelangen und somit stärkere Kontraktionen auslösen. Analog zu unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe wurde diese 'Chromatographie im Gewebe' durch Kenakin für die Entfernung von Noradrenalin durch Wiederaufnahme am Ratten-Vas-deferens beschrieben (Kenakin, 1980). Wurde diese Art der

Entfernung durch Kokain unterbunden, resultierte eine linksverschobene Dosis-Wirkungs-Kurve mit deutlicher Kurvenversteilung. Es ist bekannt, dass Suramin sowie seine Analoga eine sehr hohe Eiweißbindung besitzen (Müller und Wollert, 1976). Auch für Agonisten wie ATP oder BzATP konnte gezeigt werden, dass die Potenz dieser Agonisten stark von der vorhandenen BSA-Konzentration abhängt (Bauer et al., 1992). So führen steigende Konzentrationen an BSA zu einer ausgeprägten, konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve von BzATP. BzATP konnte aus der Bindung an BSA mit der strukturell zu Suramin ähnlichen Verbindung DAUDA (11-((5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulphonyl)amino)undecansäure) verdrängt werden, wodurch die Potenz von BzATP gesteigert wurde (Michel et al., 2001). Eine Depletion der Antagonisten könnte daher auch der Grund für den Unterschied zu den Daten an rekombinanten Rezeptoren sein, da dort der Antagonist ebenso wie der Agonist durch Superfusion der Oozyten direkt an den Rezeptor gelangen kann.

**Fazit.** Es wurde versucht, unspezifische Bindungsstellen im Vas deferens der Ratte durch unterschiedliche Verbindungen abzusättigen und somit dem Agonisten und dem Antagonisten den Durchtritt bis in das Rezeptorkompartiment zu erleichtern (siehe Kapitel 4.9.2.). In diesen Versuchen wurde weder die Agonistenkurve verändert noch die Kurvenversteilung unterbunden oder ein mit den Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren vergleichbarer Antagonismus festgestellt.

#### 5.8.4. Längsschnitt und Deepithelisieren der Organe

Viertens wurde mechanisch das Epithel der Vasa deferentia entfernt, um eventuell den Zutritt des Agonisten und des Antagonisten NF449 zu erleichtern. Dadurch wurden auch eventuell vorhandene Relaxations-vermittelnde Rezeptoren im Epithel entfernt. Für Clonidin, wenn auch nicht für andere Kontraktions-vermittelnde Agonisten, wie z. B. Noradrenalin und ATP, konnte gezeigt werden, dass durch die Entfernung des Epithels im Vas deferens der Ratte, eine Versteilung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit Zunahme des Maximum

eintrat (Okpalaugo et al., 2002). In weiteren Versuchen wurden die Organe längs aufgeschnitten.

**Fazit.** Auch wenn der Antagonismus durch NF449 geringfügig verstärkt wurde, wie an der leichten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve in Anwesenheit des Antagonisten zu erkennen ist (Abb. 4.49), so konnte dennoch durch das Öffnen der Organe bzw. das Entfernen der Epithelschicht kein mit den Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren vergleichbarer Antagonismus erreicht oder die Kurvenversteilung erklärt werden (siehe Kapitel 4.9.3.).

### 5.8.5. Variation der Organbadgröße

Fünftens wurde das Volumen des Organbades 10-fach vergrößert, wodurch relativ zur konstanten Organgröße eine 10-fach größere Menge an Agonist bzw. Antagonist vorhanden war.

**Fazit.** Diese Variation blieb ebenfalls ohne Einfluss bezüglich einer deutlichen Steigerung der antagonistischen Potenz (siehe Kapitel 4.9.4.).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass weder ein Apamin-sensitiver Kaliumkanal noch eine Depletion der untersuchten P2 Antagonisten die Ursache für den Unterschied zwischen  $pIC_{50}$ -Werten an rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden, und den Daten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens zu sein scheint. Auch das Vorhandensein eines  $\alpha\beta$ meATP-sensitiven, direkt Relaxations-vermittelnden P2 Rezeptors erscheint unwahrscheinlich, genau wie ein erschwerter Zugang der Antagonisten in das Rezeptorkompartiment im Vas deferens. Für das Phänomen der Kurvenversteilung sind die oben genannten Möglichkeiten ebenfalls als Ursache weitgehend auszuschließen.

Eine in diesem Zusammenhang dringend benötigte Untersuchungsmethode wäre, NF449, sowie weitere Antagonisten, deren antagonistische Potenz an nativen Systemen deutlich von der an rekombinanten Systemen abweicht, an isolierten glatten Muskelzellen des Ratten-Vas-deferens elektrophysiologisch zu untersuchen. Da unserer Arbeitsgruppe diese Methoden zur Isolierung glatter Muskelzellen, sowie der elektrophysiologischen Untersuchung nicht zur



Verfügung standen, wurde nach einem anderen einfachen Zellsystem gesucht, in dem native P2 Rezeptoren exprimiert werden: humane Thrombozyten. Diese haben mehrere Vorteile, sowohl gegenüber isolierten Organen wie auch *Xenopus laevis* Oozyten: Erstens stellen sie ein Zellsystem dar, in dem der Zutritt von Agonisten sowie Antagonisten vergleichbar zu den Oozyten erfolgen kann. Zweitens exprimieren sie endogen native P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub> sowie P2Y<sub>12</sub> Rezeptoren, im Gegensatz zum Expressionssystem Oozyten, die keinerlei P2 Rezeptoren endogen besitzen und damit das Problem potentieller Artefakte beinhalten, beispielsweise durch spezies-spezifisch veränderte Glykosylierung der Rezeptoren. Drittens sind humane Thrombozyten ein leicht zugängliches Modell, das hinsichtlich des P2 Rezeptor-Besatzes bereits hinreichend validiert ist (siehe 5.1.4). Um nun den Unterschied der Ergebnisse von rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren von *Xenopus* Oozyten und nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Vas deferens weiter aufzuklären, wurde NF449, sowie eine Reihe von Standardantagonisten auf ihre inhibitorischen Eigenschaften an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht. Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen an thrombozytären P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren.

## 5.9. Thrombozyten-Fluoreszenzspektroskopie

### 5.9.1. Dosis-Wirkungs-Kurven von $\alpha\beta$ meATP

Der pEC<sub>50</sub>-Wert der fluoreszenzspektroskopisch ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven von  $\alpha\beta$ meATP an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten ( $6.02 \pm 0.05$ ) korrelierte sehr gut mit den elektrophysiologisch ermittelten pEC<sub>50</sub>-Werten von ATP ( $5.96 \pm 0.12$ ; Rettinger et al., 2000b) und  $\alpha\beta$ meATP (ca. 6.0; North und Surprenant, 2000), die an rekombinanten rP2X<sub>1</sub> Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus* Oozyten bestimmt wurden. An nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Vas deferens war die Ermittlung eines pEC<sub>50</sub>-wertes nicht möglich, da selbst nach Gabe der höchsten Konzentration von  $\alpha\beta$ meATP (300  $\mu$ M) kein Plateau zu erreichen war.

### 5.9.2. Inhibitionskurven von NF449 an humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren

Wie für einen kompetitiven Antagonisten erwartet, verschob sich die Inhibitionskurve von NF449 nach links, wenn die Agonistenkonzentration von 10 über 1 bis zu 0.3  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$  gesenkt wurde. Der Vergleich der  $\text{pIC}_{50}$ -Werte von Standardantagonisten aus fluoreszenzspektroskopischen Experimenten an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der humanen Thrombozyten, aus funktionellen Experimenten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, sowie aus elektrophysiologischen Experimenten an rekombinanten humanen und Ratten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ist in Abb. 5.13 dargestellt.

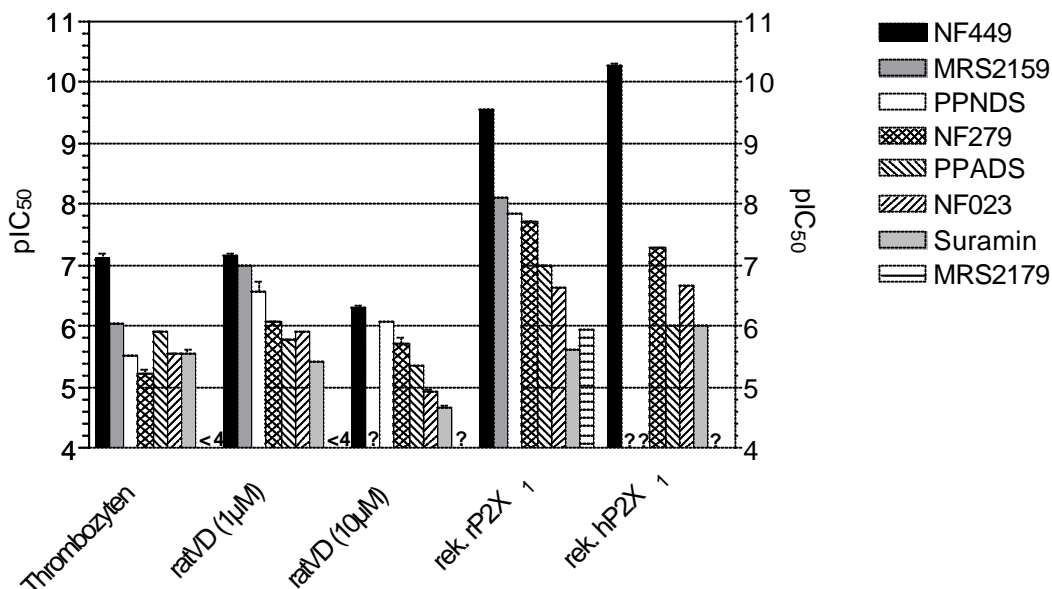


Abb. 5.13: Vergleich der  $\text{pIC}_{50}$ -Werte von P2 Antagonisten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten (Kalziumanstieg ausgelöst durch 1  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ) und des Ratten-Vas-deferens (ratVD; Kontraktionen ausgelöst durch 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta\text{meATP}$ ), sowie an rekombinanten Ratten (rek. rP2X<sub>1</sub>) bzw. humanen (rek. hP2X<sub>1</sub>) P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten (Einwärtsströme ausgelöst durch 1  $\mu\text{M}$  ATP). ? = nicht bekannt. Die Daten entstammen dieser Arbeit und Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, bzw. wurden der Literatur entnommen (Soto et al. 1997; Lambrecht 2000; Lambrecht et al. 1999, 2002; Hülsmann et al. 2003).

Wie in Abb. 5.13 zu erkennen ist, zeigt sich keine durchgängige Korrelation der Antagonisten-Reihenfolge zwischen den untersuchten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren. Der P2X<sub>1</sub> Rezeptor humaner Thrombozyten weist eine eigene Pharmakologie auf. Während die Daten aus den Untersuchungen an humanen Thrombozyten für die Verbindungen NF449, PPADS, NF023, Suramin und MRS2179 gut mit den Ergebnissen aus Experimenten am Ratten-Vas-deferens, stimuliert mit 1  $\mu$ M  $\alpha\beta$ meATP, korrelieren, zeigen die Verbindungen NF279, PPNDS und MRS2159 ein deutlich unterschiedliches Verhalten. Die antagonistische Reihenfolge innerhalb dieser Verbindungen an humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren von Thrombozyten stimmt zwar mit der Reihenfolge an Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren überein, liegt aber ungefähr eine Zehnerpotenz niedriger. Auffällig bleibt dennoch die große Diskrepanz zu den Ergebnissen an rekombinanten Modellen. Die Daten, die an einem Zellsystem mit nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, den Thrombozyten, erhoben wurden, liegen eindeutig im Rahmen der Ergebnisse an Gewebemodellen, anstatt an rekombinanten Zellsystemen. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass der Unterschied zwischen ganzen Gewebemodellen (ratVD) und einzelnen Zellen, die rekombinante Rezeptoren exprimieren (XLO), nicht aus einer erschwerten Diffusion bzw. Depletion der Antagonisten im Gewebe resultiert. Der Unterschied zwischen den Daten an rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Menschen und der Ratte, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, der vor allem für Suramin und PPADS deutlich wird, könnte eventuell auf die nicht 100-prozentige sondern nur 89-prozentige Sequenzhomologie der humanen und Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren zurückzuführen sein (Soto et al. 1997). Im Gegensatz dazu ist der aus den humanen Thrombozyten klonierte P2X<sub>1</sub> Rezeptor mit dem P2X<sub>1</sub> Rezeptor der humanen Blase zu 100 Prozent identisch (Vial et al., 1997; Scase et al. 1998). Die Aminosäure-Sequenz des aus der Blase klonierten P2X<sub>1</sub> Rezeptors ist wiederum mit derjenigen, des hier verwendeten P2X<sub>1</sub> Rezeptors, kloniert aus humanen B-Lymphozyten identisch (Klapperstück et al. 2000; Hülsmann et al. 2003). Daher ist die Differenz zwischen den Daten an nativen, humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren der Thrombozyten und rekombinanten, humanen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, nicht durch einen Sequenzunterschied zu

erklären. Die Frage liegt nahe, ob die mögliche Ursache für die bestehende Diskrepanz darin begründet liegen könnte, dass P2 Rezeptoren, die nach heterologer statt endogener Expression in der Membran präsentiert werden, z.B. durch unterschiedliche Glykosylierungen oder unspezifische Membraneffekte, in ihren Eigenschaften verändert werden. Moore und Kollegen konnten z.B. zeigen, dass der endogen exprimierte P2Y<sub>1</sub> Rezeptor in humanen Ntera-Zellen Unterschiede im Vergleich zu rekombinant exprimierten P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren hinsichtlich der Selektivität für Nukleotide aufweist (Moore et al., 2002). Die Beantwortung der hier offen bleibenden Fragen, muss weiteren Untersuchungen überlassen werden.

### **5.9.3. Dosis-Wirkungs-Kurven von ATP-freiem ADP**

Der pEC<sub>50</sub>-Wert der in unserem Labor fluoreszenzspektroskopisch ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven von ADP an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten ( $6.10 \pm 0.05$ ) korreliert gut mit dem Literaturwert (pEC<sub>50</sub> =  $6.54 \pm 0.1$ ; Hechler et al., 1998a), beziehungsweise dem pEC<sub>50</sub>-Wert von ADP an nativen Ratten-P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren von humanen Ntera-2/D1-Zellen (pEC<sub>50</sub> = 6.36; Moore et al., 2002).

### **5.9.4. Inhibitionskurven an humanen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren**

Da die Inhibitionskurven von NF449 und MRS2179 gegen 10 μM ADPβS an P2Y Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum einen biphasischen Kurvenverlauf aufwiesen (siehe Abb. 4.41 und Abb. 4.44) und der Antagonismus gemäß Schild-Analyse nicht-kompetitiv zu sein schien, wurden beide Verbindungen zur weiteren Charakterisierung an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten untersucht.

Beide Verbindungen zeigten monophasische Inhibitionskurven an den thrombozytären P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Während der resultierende pIC<sub>50</sub>-Wert von MRS2179 (6.46) sowohl mit den Ergebnissen am Meerschweinchen-Ileum (pIC<sub>50</sub> = 6.34; 1 μM ADPβS; Daten von Frau Susanne Horner), wie auch mit den Ergebnissen an rekombinanten humanen P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren übereinstimmt

( $pK_B = 6.75$ ; Moro et al., 1998), korreliert der  $pIC_{50}$ -Wert von NF449, ermittelt an Thrombozyten (5.10), weder mit einem der  $pIC_{50}$ -Werte, ermittelt am Meerschweinchen-Ileum, aus der biphasischen Kurve gegen  $10 \mu M$  ADP $\beta$ S (5.86 und 4.02) noch mit dem  $pIC_{50}$ -Wert aus der monophasischen Kurve gegen  $1 \mu M$  ADP $\beta$ S ( $5.67 \pm 0.16$ ). Die aus den Experimenten mit MRS2179 erhaltenen Ergebnisse sprechen für eine Rezeptorheterogenität im Meerschweinchen-Ileum, da MRS2179 einen reinen P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten darzustellen scheint und die Schild-Analyse am isolierten Organ dennoch einen nicht-kompetitiven Antagonismus ergab. Ob NF449 einen kompetitiven Antagonisten an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren darstellt, ist weiter unklar. Untersuchungen an rekombinanten P2Y Rezeptoren sind essentiell, um diesen Sachverhalt aufzuklären.



## **6. Zusammenfassung**

Ausgehend von den Leitstrukturen Suramin und NF023 wurden Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer Vielzahl von Verbindungen in dieser Arbeit abgeleitet. Ziel war es, potente, kompetitive und subtypselektive P2 Rezeptor-Antagonisten zu entwickeln, die frei von den bekannten Defiziten vorangegangener Verbindungen sind, sowie potentielle pharmakophore Strukturelemente zu identifizieren. Dazu wurden zunächst strukturelle Variationen von Suramin- und NF023-Analoga im zentralen Harnstoff, an den überbrückenden Phenylringen und den terminalen Aminonaphthalinringen durchgeführt.

### 6.1. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Suramin- und NF023-Analoga

Die folgenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Suramin- und NF023-Analoga konnten an nativen P2X<sub>1</sub> (prostatische Segmente des Ratten-Vasdeferens), P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> (Longitudinalmuskulatur des Meerschweinchen-Ileum) Rezeptoren ermittelt werden:

- **4'-Position der äußeren Phenylringe:**

Suramin-Derivate: Die inhibitorische Potenz sowohl an P2X<sub>1</sub> wie auch an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren stieg mit der folgenden Substitution an:  
-CH<sub>3</sub> < -H < -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

NF023-Derivate: Die inhibitorische Potenz stieg an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren mit der folgenden Substitution an: -H < -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, während P2X<sub>1</sub> Rezeptoren von der unsubstituierten Verbindung potenter inhibiert wurden als von dem Phenylring-substituierten Derivat.

**Fazit:** Mit Variation der Substitution der 4'-Position an den Phenylringen von NF023 ergibt sich die Möglichkeit, P2Y<sub>1</sub>-selektive Antagonisten zu entwickeln.



- **Variation der Molekülgröße:**

Während die Steigerung der Molekülgröße nur einen geringen Einfluss auf den Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ausübte, konnte durch Vergrößerung der Moleküle der Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren deutlich gesteigert werden.

**Fazit:** Für die Entwicklung von potenten P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten scheinen größere Verbindungen, abgeleitet von Suramin, im Vergleich zu kleineren NF023-Derivaten geeigneter zu sein.

- **Variation der Phenylring-Verknüpfung:**

Die rigide Verknüpfung der Biphenylringe zeigte, daß die überbrückenden Phenylringe ein sensibles pharmakophores Element darstellten. Aus unterschiedlichen Verknüpfungsvariationen resultierten drastische Effekte auf den Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren, wobei P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren von den Biphenylverbindungen grundsätzlich stärker inhibiert wurden als P2X<sub>1</sub> Rezeptoren.

**Fazit:** Generell scheint eine flexible Verknüpfung der Phenylringe für den Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren benötigt zu werden. Um eine abschließende Beurteilung der potentiellen Strukturelemente, die für die Bindung an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren essentiell sind, abgeben zu können, wäre eine Darstellung der dreidimensionalen Konformation der Verbindungen im Raum, bzw. im wässrigen Medium nötig.

- **Ersatz der Phenylringe:**

Der Ersatz der Phenylringe mit Chinolinringen führte sowohl bei Suramin- wie auch bei NF023-Analoga zum Wirkverlust an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren.

**Fazit:** Die überbrückenden Phenylringe sind für den Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren essentiell.

- **Heterodimerisierung:**

Wie bereits durch frühere Untersuchungen mit der heterodimeren Verbindung SB9 gezeigt wurde, konnte durch die Kombination zweier Pharmkophore eine

deutliche Steigerung des Antagonismus an P2 Rezeptoren erzielt werden. Dies wurde durch die untersuchten heterodimeren Biphenylverbindungen bestätigt.

**Fazit:** Die Verknüpfung von Suramin-Monomeren mit Pyridoxalphosphat führt zur Steigerung des Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren. Durch die geeignete Auswahl des Suramin-Monomeren, läßt sich zusätzlich die Rezeptorselektivität beeinflussen.

- **Ersatz der Aminonaphthalinringe:**

Der Ersatz der Aminonaphthalinringe sowohl von Suramin- wie auch von NF023-Derivaten mit Aspartatresten führte zum drastischen Wirkverlust an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren

**Fazit:** Die polyanionischen aromatischen Reste stellen sensible und essentielle pharmakophore Elemente dar.

- **Ersatz des zentralen Harnstoffes:**

Der Ersatz des zentralen Harnstoffes mit Ethylen- oder Ethen-1,2-diyldiamidgruppen führte sowohl bei Suramin- wie auch bei NF023-Derivaten zum Verlust der antagonistischen Potenz an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren.

**Fazit:** Der zentrale Harnstoff stellt ein essentielles Strukturelement für den Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren dar.

## 6.2. Struktur-Wirkungs-Beziehungen von NF449-Analoga

Innerhalb des ersten Substanz-Screenings trat eine neue Strukturklasse aufgrund ihrer ungewöhnlichen Struktur, sowie ihres außergewöhnlichen Potentials zur Entwicklung von P2 Rezeptor-Antagonisten in den Mittelpunkt unserer Untersuchungen: durch Substitution mit jeweils zwei identischen Resten an Position 1' und 5' der zentralen Phenylringe kleiner Harnstoffe entstanden die sogenannten 'Schmetterling'-Verbindungen.

Alle untersuchten Verbindungen stellten schwache Inhibitoren von Ektonukleotidasen dar. Aufgrund ihres schwachen Antagonismus an Ektonukleotidasen im Vergleich zu dem potenten Antagonismus an P2

Rezeptoren, sind sie als Leitstrukturen zur Entwicklung von Ektonukleotidase-Inhibitoren ungeeignet.

In dieser neuen Strukturklasse konnten die folgenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und pharmakophore Elemente identifiziert werden:

- ***Einführen einer Methylenbrücke an der Verknüpfung der terminalen Phenylringe:***

Durch Einführen von Methylenbrücken an die terminalen Phenylringe wurde der Antagonismus an P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren deutlich vermindert. Die nachfolgenden Molekülvariationen blieben ohne Einfluss.

**Fazit:** Die direkte Amid-Verknüpfung der terminalen Phenylringe ist für den Antagonismus an P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren essentiell.

- ***Anzahl der Sulfonsäuren an den terminalen Phenylringen:***

Das 4-Monosulfonsäure-Derivat NF110 stellt einen schwachen Antagonisten an P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren dar, während P2X<sub>3</sub> Rezeptoren sehr potent inhibiert werden. Mit der Verbindung NF449 wurde durch Hinzufügen jeweils einer weiteren Sulfonsäure in Position 2 der Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren drastisch gesteigert, an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren erhöht und an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren gesenkt.

**Fazit:** Für einen potenten Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren sind jeweils zwei Sulfonsäuren in Position 2 und 4 der terminalen Phenylringe essentiell. P2X<sub>3</sub> Rezeptoren werden dagegen am potentesten durch die Verbindung mit jeweils nur einer Sulfonsäure in Position 4 inhibiert. Die Verbindung NF110 stellt eine interessante Leitstruktur zur Entwicklung von selektiven P2X<sub>3</sub> Rezeptor-Antagonisten dar.

- ***Position der Sulfonsäuren an den terminalen Phenylringen:***

Durch Verschieben der Monosulfonsäuren aus Position 4 zu Position 3 fiel die antagonistische Potenz an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ab, während der sehr schwache Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren konstant blieb. Ausgehend von der Verbindung NF449 mit einer 2,4-Disulfonsäure-Substitution an den jeweiligen

Phenylringen, ist das Optimum für einen außergewöhnlich hohen P2X<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonismus erreicht. P2X<sub>3</sub> und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren werden von NF449 ungefähr gleich potent inhibiert. Die isomere Verbindung mit einer 2,5-Substitution weist einen drastischen Wirkverlust an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren auf, während der Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren im Vergleich zu NF449 konstant blieb.

**Fazit:** Die Position der Sulfonsäuren an den terminalen Ringen stellt ein sensibles pharmakophores Element für den Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>3</sub> Rezeptoren aber nicht an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren dar. Der potenteste Antagonist an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren ist die Verbindung NF449.

- ***Ersatz der terminalen disulfonierten Phenylringe mit trisulfonierten Aminonaphthalinringen***

Der Ersatz der terminalen disulfonierten Phenylringe (NF449) mit trisulfonierten Aminonaphthalinringen führte zu einer Verminderung des Antagonismus an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren, einem gleichbleibenden Antagonismus an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren und einem gesteigerten Antagonismus an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren.

**Fazit:** Für einen starken P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonismus sind trisulfonierte Aminonaphthalinringe anstelle der terminalen, disulfonierten Phenylringe von Vorteil. Die Verbindung NF864 stellt eine interessante Leitstruktur zur Entwicklung von selektiven P2Y<sub>1</sub> Rezeptor-Antagonisten dar.

- ***Ersatz des zentralen Harnstoffes***

Durch Ersatz des zentralen Harnstoffes sowohl mit Terephthalsäurediamid- wie auch mit Isophthalsäurediamid-Strukturen nahm der Antagonismus an P2X<sub>1</sub> und an P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ab. An P2X<sub>3</sub> Rezeptoren dagegen, konnte der Antagonismus deutlich gesteigert werden. Wie die monomeren Aminonaphthalinring-Verbindungen zeigen konnten, ist der zentrale Harnstoff für den Antagonismus an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren nicht essentiell.

**Fazit:** Für einen starken Antagonismus an P2X<sub>3</sub> Rezeptoren ist der Ersatz des zentralen Harnstoffes mit einer Terephthalsäurediamid-Struktur von Vorteil.

P2X<sub>1</sub> Rezeptoren werden gleich potent inhibiert. Für P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren ist der zentrale Harnstoff essentiell.

### 6.3. Pharmakologische Charakterisierung von NF449

Aufgrund der außergewöhnlichen Potenz an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren wurde die Verbindung NF449 detaillierter pharmakologisch charakterisiert.

NF449 stellt einen hochpotenten, stabilen, kompetitiven und vollständig reversiblen Antagonisten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren mit einem pA<sub>2</sub>-Wert von 7.15 dar. NF449 weist eine hohe Rezeptorselektivität (pIC<sub>50</sub> (P2X<sub>1</sub>) = 6.31) gegenüber nativen P2X<sub>3</sub> (pIC<sub>50</sub> = 5.04) und P2Y<sub>1</sub> Rezeptoren (pIC<sub>50</sub> = 4.85) auf. Die Experimente an rekombinanten P2X<sub>1</sub> bis P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>1/5</sub>, P2X<sub>2/3</sub> Rezeptoren der Ratte, humanen P2X<sub>1</sub> und P2X<sub>7</sub> Rezeptoren sowie humanen P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>11</sub> Rezeptoren bestätigten die außergewöhnliche Potenz im subnanomolaren Konzentrationsbereich an P2X<sub>1</sub> Rezeptoren (pIC<sub>50</sub> (humaner P2X<sub>1</sub> Rezeptor) = 10.3). NF449 stellt damit den derzeit weltweit potentesten und selektivsten Antagonisten sowohl an nativen wie auch an rekombinanten P2X<sub>1</sub> Rezeptoren dar. Durch die hohe Rezeptorspezifität gegenüber nativen adrenergen  $\alpha_{1A}$  und  $\beta_1$ , histaminergen H<sub>1</sub>, muskarinergen M<sub>3</sub>, Adenosin A<sub>1</sub> und Angiotensin II Typ 1 Rezeptoren sind Effekte durch NF449 auf andere Rezeptoren unwahrscheinlich. Ob NF449 an P2Y Rezeptoren des Meerschweinchen-Ileum einen nicht-kompetitiven Antagonismus aufweist, bzw. eine Rezeptorheterogenität des Gewebes vorliegt, bleibt weiter aufzuklären. Als hochpotenter, stabiler, reversibler, P2-spezifischer und subtypselektiver Antagonist bietet NF449 die ideale Voraussetzung zur Entwicklung eines dringend benötigten P2X<sub>1</sub>-Rezeptor-Radioliganden.

#### **6.4. Untersuchungen zur Kurvenversteilung des Vas deferens der Ratte, sowie zur Klärung des Unterschiedes zwischen $pIC_{50}$ -Werten an *Xenopus laevis* Oozyten versus Ratten-Vas-deferens**

Als mögliche Ursachen für das bekannte Phänomen der Versteilung der Dosis-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit von P2 Antagonisten, sowie für den Unterschied zwischen  $pIC_{50}$ -Werten an *Xenopus laevis* Oozyten vs. Ratten-Vas-deferens wurden 1.) eine potentielle Relaxation des Vas deferens durch Öffnung eines Kalzium-abhängigen, Apamin-sensitiven Kalium-Kanals nach  $\alpha\beta$ meATP-Stimulation und 2.) eine potentielle Depletion des Agonisten oder Antagonisten im Gewebe untersucht.

**ad 1.)** Da Apamin in unseren Versuchen am Vas deferens der Ratte zu keiner Veränderung der DWK von  $\alpha\beta$ meATP weder in Ab- noch in Anwesenheit von Antagonisten führte, kann ein Apamin-sensitiver Kaliumkanal als Ursache ausgeschlossen werden.

**ad 2.)** Es wurde versucht, unspezifische Bindungsstellen im Gewebe durch unterschiedliche Verbindungen abzusättigen und somit dem Agonisten und Antagonisten den Durchtritt bis in das Rezeptorkompartiment zu erleichtern. Dadurch wurde weder die Agonistenkurve verändert noch die Kurvenversteilung unterbunden oder ein mit den Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren vergleichbarer Antagonismus festgestellt.

Die Vasa deferentia wurden geöffnet bzw. das Epithel mechanisch entfernt. Auch wenn der Antagonismus von NF449 geringfügig verstärkt wurde, so konnte dennoch durch diese Veränderungen kein mit den Ergebnissen an rekombinanten Rezeptoren vergleichbarer Antagonismus erreicht oder die Kurvenversteilung erklärt werden.

Das Volumen des Organbades wurde 10-fach vergrößert, wodurch relativ zur konstanten Organgröße eine 10-fach größere Menge an Agonist bzw. Antagonist vorhanden war. Diese Variation blieb ebenfalls ohne Einfluss bezüglich einer deutlichen Steigerung der antagonistischen Potenz.

### **6.5. Vergleich der Ergebnisse aus Experimenten an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren des Ratten-Vas-deferens und rekombinanten Ratten-P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren mit den Ergebnissen an nativen P2X<sub>1</sub> Rezeptoren humaner Thrombozyten**

Der P2X<sub>1</sub> Rezeptor humaner Thrombozyten wies eine eigene Pharmakologie auf, da die Reihenfolge der Wirkstärke von Antagonisten zwischen den unterschiedlichen Rezeptormodellen (humane Thrombozyten, Ratten-Vas-deferens und rekombinante Rezeptoren, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten) variierte. Die von NF449, sowie von anderen untersuchten Standardantagonisten ermittelten pIC<sub>50</sub>-Werte lagen dennoch eindeutig im Rahmen der Ergebnisse an Gewebemodellen im Vergleich zu rekombinanten Zellsystemen und stehen damit weiterhin in großer Diskrepanz zu den Ergebnissen an rekombinanten Modellen. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass der Unterschied zwischen ganzen Gewebemodellen (ratVD) und einzelnen Zellen, die rekombinante Rezeptoren exprimieren (XLO), nicht aus einer erschwerten Diffusion bzw. Depletion der Antagonisten im Gewebe resultiert. Die Frage liegt nahe, ob die mögliche Ursache für diese Diskrepanz darin begründet liegen könnte, dass P2 Rezeptoren, die nach heterologer statt endogener Expression in der Membran präsentiert werden, z.B. durch unterschiedliche Glykosylierungen oder unspezifische Membraneffekte in ihren Eigenschaften verändert werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diesen Sachverhalt aufzuklären.





## **7. Literaturverzeichnis**

- Abbracchio, M. P. und Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445-475.
- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J.-M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. und Burnstock, G. (2003). Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 52-55.
- AcunaCastillo, C., Morales, B. und HuidobroToro, J. P. (2000). Zinc and copper modulate differentially the P2X<sub>4</sub> receptor. *J. Neurochem.* 74, 1529-1537.
- Arunlakshana, O. und Schild, H. O. (1959). Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14, 48-58.
- Barnard, E. A. und Simon, J. (2001). An elusive receptor is finally caught: P2Y<sub>12</sub>, an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 388-391.
- Bauer, M., Baumann, J. und Trommer, W. E. (1992). ATP binding to bovine serum albumin. *FEBS Lett.* 313, 288-290.
- Baurand, A., Raboisson, P., Freund, M., Leon, C., Cazenave, J. P., Bourguignon, J. J. und Gachet, C. (2001). Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 412, 213-221.
- Beindl, W., Mitterauer, T., Hohenegger, M., Ijzerman, A. P., Nanoff, C. und Freissmuth, M. (1996). Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol. Pharmacol.* 50, 415-423.
- Birk, A. V., Broekman, M. J., Gladek, E. M., Robertson, H. D., Drosopoulos, J. H. F., Marcus, A. J. und Szeto, H. H. (2002). Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *J. Lab. Clin. Medicine* 140, 166-175.
- Blakeley, A. G. H., Brockbank, J. E., Kelly, S. S. und Petersen, S. A. (1991). Effects of suramin on the contraction-response relationship of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP on the mouse vas deferens. *J. Auton. Pharmacol.* 11, 45-49.
- Boarder, M. R. und Webb, T. (2001). P2Y receptors: structure and function. In *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. Editors Abbracchio, M. P., Williams, M.. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 151, Part I:*

*Molecular, Nervous and Urogenitary System Function. Springer Verlag, Heidelberg, 65-88.*

- Born, G. V. R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927-928.
- Boue-Grabot, E., Barajas-Lopez, C., Chakfe, Y., Blais, D., Belanger, D., Emerit, M. B. und Seguela, P. (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J. Neurosci.* 23, 1246-1253.
- Boyer, J. L., Adams, M., Ravi, R. G., Jacobson, K. A. und Harden, T. K. (2002). 2-chloro N-6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate is a selective high affinity P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 135, 2004-2010.
- Boyer, J. L., Delaney, S. M., Villaneuva, D. und Harden, T. K. (2000). A molecularly identified P2Y receptor simultaneously activates phospholipase C and inhibits adenylatcyclase and is nonselectively activated by all nucleoside triphosphates. *Mol. Pharmacol.* 57, 805-810.
- Boyer, J. L., Mohanram, A., Camaioni, E., Jacobson, K. A. und Harden, T. K. (1998). Competitive and selective antagonism of P2Y<sub>1</sub> receptors by N<sup>6</sup>-methyl 2'- deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1-3.
- Boyer, J. L., Siddiqi, S., Fischer, B., Romera-Avila, T., Jacobson, K. A. und Harden, T. K. (1996). Identification of potent P2Y purinoceptor agonists that are derivatives of adenosine 5'-monophosphate. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1959-1964.
- Braun, K., Rettinger, J., Ganso, M., Kassack, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G. und Lambrecht, G. (2001). NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364, 285-290.
- Brown, S. G., Kim, Y.-C., Kim, S.-A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. und King, B. F. (2001). Actions of a series of PPADS analogs at P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors. *Drug Dev. Res.* 53, 281-291.
- Brown, S. G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. A., Burnstock, G. und King, B. F. (2002). Heteromultimeric P2X<sub>1/2</sub> receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 673-680.

- Bültmann, R., Dudeck, O. und 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., Klebroff, W. und Starke, K. (2002). Nucleotide-evoked relaxation of rat vas deferens: possible mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 436, 135-143.
- Bültmann, R., Trendelenburg, M. und Starke, K. (1994). Blockade of P2X-purinoceptors by trypan blue in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 113, 349-354.
- Bültmann, R., Trendelenburg, M., Tuluc, F., Wittenburg, H. und Starke, K. (1999). 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.
- Bültmann, R. und Starke, K. (2001). Nucleotide-evoked relaxation of rat vas deferens-a possible role for endogenous ATP released upon  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 422, 197-202.
- Bültmann, R., Wittenburg, H., Pause, B., Kurz, G., Nickel, P. und 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.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509-581.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Editors Straub R.W., Bolis L., Raven Press, New York, 107-118.
- Burnstock, G. (1999). Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50, 355-357.
- Burnstock, G. und Kennedy, C. (1985). Is there a basis for distinguishing two types of purinoceptor. *Gen. Pharmacol.* 16, 433-440.
- Castelucci, P., Robbins, H. L., Poole, D. P., und Furness, J. B. (2002). The distribution of purine P2X<sub>2</sub> receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem. Cell Biol.* 117, 415-422.
- 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. und Livi, G. P. (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* 275, 10767-10771.
- Chen, C., Parker, M. S., Barnes, A. P., Deininger, P. und Bobbin, R. P. (2000). Functional expression of three P2X<sub>2</sub> receptor splice variants from guinea pig cochlea. *J. Neurophysiol.* 83, 1502-1509.
- Clifford, E. E., Parker, K., Humphreys, B. D., Kertesy, S. B. und Dubyak, G. R. (1998). The P2X<sub>1</sub> receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes. *Blood* 91, 3172-3181.
- Cockroft, S. und Gomberts, B. D. (1979). ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279, 541-542.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A. und Buell, G. (1996). Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16, 2495-2507.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M. und Boeynaems, J. M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G<sub>i</sub>. *J. Biol. Chem.* 276, 41479-41485.
- Communi, D., Janssens, R., SuarezHuerta, N., Robaye, B. und Boeynaems, J. M. (2000). Advances in signalling by extracellular nucleotides: the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal.* 12, 351-360.
- Communi, D., Robaye, B. und Boeynaems, J.-M. (1999). Pharmacological characterization of the human P2Y<sub>11</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1199-1206.
- Connolly, G. P. (1995). Differentiation by pyridoxal-5-phosphate, PPADS and isoPPADS between responses mediated by UTP and those evoked by  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP on rat sympathetic ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 114, 727-731.
- Contreres, J. O., Dupuy, E., Job, B., Habib, A., Bryckaert, M., Rosa, J. P., Simoneau, G., Herbert, J. M., Savi, P. und Levy-Toledano, S. (2003). Effect of clopidogrel administration to healthy volunteers on platelet phosphorylation events triggered by ADP. *Br. J. Haematol.* 120, 633-642.

- Crack, B. E., Beukers, M. W., McKechnie, K. C. W., Ijzerman, A. P. und Leff, P. (1994). Pharmacological analysis of ecto-ATPase inhibition: evidence for combined enzyme inhibition and receptor antagonism in P<sub>2X</sub>-purinoceptor ligands. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1432-1438.
- Cressman, V. L., Lazarowski, E., Homolya, L., Boucher, R. C., Koller, B. H. und Grubb, B. R. (1999). Effekt of loss of P2Y<sub>2</sub> receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl<sup>-</sup> Transport. *J. Biol. Chem.* 274, 26461-26468.
- Czeche, S. (2001). Pharmacological investigations on muscarinic and P2 receptor subtypes. Pharmacological characterisation of the stereoisomers of glycopyrronium bromide and their tertiary analogues and evaluation of the isolated guinea-pig and rat ileal longitudinal smooth muscle as novel P2 receptor subtype models. *Dissertationsschrift*.
- Czeche, S., Niebel, B., Mutschler, E., Nickel, P. und Lambrecht, G. (1998b). P2-receptor heterogeneity in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Drug Dev. Res.* 43, 52.
- Czeche, S., Niebel, B., Mutschler, E. und Lambrecht, G. (1998a). Neuronal P2X-like receptors mediate cholinergic contraction via postjunctional muscarinic M<sub>3</sub>-receptors in guinea-pig ileal longitudinal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357 (Suppl.), R23.
- Damer, S. (2002). Pharmacological evaluation of NF279 as a P2 receptor antagonist. Structure-activity relationship studies of analogues of the P2 receptor antagonists suramin and NF023 at native P2 receptor subtypes and ecto-nucleotidases. *Dissertationsschrift*.
- Damer, S., Niebel, B., Czeche, S., Nickel, P., Ardanuy, U., Schmalzing, G., Rettinger, J., Mutschler, E. und Lambrecht, G. (1998). NF279: a novel potent and selective antagonist of P2X receptor-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 350, R5-R6.
- Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J. B. und Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 2024-2029.
- Daniel, J. L., Dangelmaier, C., Jin, J., Kim, Y. B. und Kunapuli, S. P. (1999). Role of intracellular signalling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* 82, 1322-1326.

- Dean, M. K., Higgs, C., Smith, R. E., Bywater, R. P., Snell, C. R., Scott, P. D., Upton, G. J. G., Howe, T. J. und Reynolds, C. A. (2001). Dimerization of G-protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.* 44, 4595-4614.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni, S., Sanz, J. M., Morelli, A., Torboli, M., Bolognesi, G. und Baricordi, O. R. (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 97, 587-600.
- Drury, A. N. und Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)* 68, 213-237.
- Dunn, P. M. und Blakeley, A. G. H. (1988). Suramin: a reversible P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 93, 243-245.
- Dunn, P. M., Liu, M., Zhong, Y., King, B. F. und Burnstock, G. (2000). Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1378-1384.
- Dutton, J. L., Poronnik, P., Li, G. H., Holding, C. A., Worthington, R. A., Vandenberg, R. J., Cook, D. I., Barden, J. A. und Bennett, M. R. (2000). P2X<sub>1</sub> receptor membrane redistribution and down-regulation visualized by using receptor-coupled green fluorescent protein chimeras. *Neuropharmacology* 39, 2054-2066.
- Egan, T. M., Haines, W. R. und Voigt, M. M. (1998). A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X<sub>2</sub> receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. *J. Neurosci.* 18, 2350-2359.
- Ennion, S. J. und Evans, R. J. (2001). Agonist-stimulated internalisation of the ligand-gated ion channel P2X<sub>1</sub> in rat vas deferens. *FEBS Lett.* 489, 154-158.
- Ennion, S. J. und Evans, R. J. (2002). P2X<sub>1</sub> receptor subunit contribution to gating revealed by a dominant negative PKC mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 611-616.
- Ennion, S., Hagan, S. und Evans, R. J. (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X<sub>1</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 29361-29367.

- Fabre, J.-E., King, B. F. und Koller, B. H. (2001). Study of aggregation of platelets lacking the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Drug Dev. Res.* 52, 150-155.
- Fagura, M. S., Jarvis, G. E., Dougall, I. G. und Leff, P. (2000). Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 178-186.
- Fedan, J. S., Hogaboom, G. K. und O'Donnell, J. P. (1984). Comparison of the effects of apamin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel blocker, and arylazido aminopropionyl ATP (ANAPP<sub>3</sub>), a P2-purinergic receptor antagonist, in the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 104, 327-334.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.
- Fischer, B., Yefidoff, R., Major, D. T., Rutman-Halili, I., Shneyvays, v., Zinman, T., Jacobson, K. A. und Shainberg, A. (1999). Characterization of "mini-nucleotides" as P2X receptor agonists in rat cardiomyocyte cultures. An integrated synthetic, biochemical and theoretical study. *J. Med. Chem.* 42, 2685-2696.
- Fiske, C. H. und Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
- Forsyth, K. M., Bjur, R. A. und Westfall, D. P. (1991). Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256, 821-826.
- Foster, C. J., Prosser, D. N., Agans, J. M., Zhai, Y., Smith, M. D., Lachowicz, J. E., Zhang, F. L., Gustafson, E., Monsma, F. J., Wiekowski, M. T., Abbondanzo, S. J., Cook, D. N., Bayn, M. L., Lira, S. A. und Chintala, M. S. (2001). Molecular identification and characterisation of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest.* 107, 1591-1598.
- Freissmuth, M., Boehm, S., Beindl, W., Nickel, P., Ijzerman, A. P., Hohenegger, M. und Nanoff, C. (1996). Suramin analogues as subtype-selective G protein inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 49, 602-611.
- Freissmuth, M., Waldhoer, M., Bofill-Cardona, E. und Nanoff, C. (1999). G protein antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 237-245.
- Gachet, C. (2000). Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists. *Ann. Med.* 32 (Suppl. 1), 15-20.



- Gachet, C. (2001). ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost.* 86, 222-232.
- Galligan, J. J. (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility* 14, 611-623.
- Giaroni, C., Knight, G. E., Ruan, H.-Z., Glass, R., Bardini, M., Lecchini, S., Frigo, G. und Burnstock, G. (2002). P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 43, 1313-1323.
- Greco, N. J., Tonon, G., Chen, W., Luo, X., Dalal, R. und Jamieson, G. A. (2001). Novel structurally altered P2X<sub>1</sub> receptor is preferentially activated by adenosine diphosphate in platelets and megakaryocytic cells. *Blood* 98, 100-107.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Guile, S. D., Ince, F., Ingall, A. H., Kindon, N. D., Meghani, P. und Mortimore, M. P. (2001). The Medicinal Chemistry of the P2 Receptor Family. *Progr. Med. Chem.* 38, 115-187.
- Guo, D., von, K., I, Moro, S., Kim, Y.-C. und Jacobson, K. A. (2002). Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Drug Dev. Res.* 57, 173-181.
- Haines, W. R., Migita, K., Cox, J. A., Egan, T. M. und Voigt, M. M. (2001a). The first transmembrane domain of the P2X receptor subunit participates in the agonist-induced gating of the channel. *J. Biol. Chem.* 276, 32793-32798.
- Haines, W. R., Torres, G. E., Voigt, M. M. und Egan, T. M. (1999). Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> isoforms. *Mol. Pharmacol.* 56, 720-727.
- Haines, W. R., Voigt, M. M., Migita, K., Torres, G. E. und Egan, T. M. (2001b). On the contribution of the first transmembrane domain to whole-cell current through an ATP-gated ionotropic P2X receptor. *J. Neurosci.* 21, 5885-5892.
- Harden, T. K., Nicholas, R. A., Schachter, J. B., Lazarowski, E. R. und Boyer, J. L. (1998). Pharmacological selectivities of molecularly defined subtypes

- of P2Y receptors. In: *The P2 nucleotide receptors*. Editors Turner J.T., Weismann, G.A., Fedan J.S. Humana press, Totowa, 109-134.
- Haslam, R. J. und Cusack, N. J. (1981). Blood platelet receptors for ADP and for adenosine. In: *Purinergic receptors*. Editor Burnstock G., Chapman and Hall, London, 221-285.
- Hassock, S., Zhu, M. X., Trost, C., Flockerzi, V. und Authi, K. S. (2002). Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry. *Blood* 100, 2801-2811.
- Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1998a). The P2Y<sub>1</sub> receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 92, 152-159.
- Hechler, B., Vigne, P., Leon, C., Breitmayer, J. P., Gachet, C. und Frelin, C. (1998b). ATP derivatives are antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor: similarities to the platelet ADP receptor. *Mol. Pharmacol.* 53, 727-733.
- Hibell, A. D., Thompson, K. M., Simon, J., Xing, M., Humphrey, P. P. und Michel, A. D. (2001a). Species- and agonist-dependent differences in the deactivation-kinetics of P2X<sub>7</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363, 639-648.
- Hibell, A. D., Thompson, K. M., Xing, M., Humphrey, P. P. und Michel, A. D. (2001b). Complexities of measuring antagonist potency at P2X<sub>7</sub> receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 947-957.
- Hiramoto, T., Nemoto, W., Kikuchi, T. und Fujita, N. (2002). Construction of hypothetical three-dimensional structure of P2Y<sub>1</sub> receptor based on Fourier transform analysis. *J. Protein Chem.* 21, 537-545.
- Hoebertz, A., Meghji, S., Burnstock, G. und Arnett, T. R. (2001). Extracellular ADP is a powerful osteolytic agent: evidence for signaling through the P2Y<sub>1</sub> receptor on bone cells. *FASEB J.* 15, 1139-1148.
- Hohenegger, M., Waldhoer, M., Beindl, B., Boing, B., Kreimeyer, A., Nickel, P., Nanoff, C. und Freissmuth, M. (1997). G<sub>sα</sub>-selective G protein antagonists. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 346-351.
- Holler, C., Freissmuth, M. und Nanoff, C. (1999). G proteins as drug targets. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 257-270.

- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. und Conley, P. B. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202-207.
- Holmsen, H. und Weiss, H. J. (1979). Secretable storage pools in platelets. *Annu. Rev. Med.* 30, 119-134.
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol. (London)* 68, 213-237.
- Hourani, S. M. O. und Hall, D. A. (1994). Receptors for ADP on human blood platelets. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 103-108.
- Housley, G. D., Jagger, D. J., Greenwood, D., Raybould, N. P., Salih, S. G., Jarlebark, L. E., Vlajkovic, S. M., Kanjhan, R., Nikolic, P., Munoz, D. J. M. und Thorne, P. R. (2002). Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission. *Audiol. Neurootol.* 7, 55-61.
- Hoyle, C. H., Knight, G. E. und Burnstock, G. (1990). Suramin antagonizes responses to P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br. J. Pharmacol.* 99, 617-621.
- Hülsmann, M., Nickel, P., Kassack, M., Schmalzing, G., Lambrecht, G. und Markwardt, F. (2003). NF449, a novel picomolar potency antagonist at human P<sub>2X</sub><sub>1</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 470, 1-7.
- Insel, P. A., Ostrom, R. S., Zambon, A. C., Hughes, R. J., Balboa, M. A., Shehnaz, D., Gregorian, C., Torres, B., Firestein, B. L., Xing, M. und Post, S. R. (2001). P<sub>2Y</sub> receptors of MDCK cells: epithelial cell regulation by extracellular nucleotides. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 28, 351-354.
- Jacobson, K. A. und Knutsen, L. J. S. (2001). P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> purine and pyrimidine receptor ligands. In *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. Editors Abbracchio, M. P., Williams, M.. Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 151, Part I: Molecular, Nervous and Urogenitary System Function. Springer Verlag, Heidelberg, 129-175.*
- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. und Williams, M. (2002). Purine and pyrimidine (P<sub>2</sub>) receptors as drug targets. *J. Med. Chem.* 45, 4057-4093.
- Janssens, R., Painsavoine, P., Parmentier, M., Boeynaems, J. M. (1999). Human P<sub>2Y</sub><sub>2</sub> receptor polymorphism: identification and pharmacological characterization of two allelic variants. *Br. J. Pharmacol.* 127, 709-716.

- Jarvis, G. E., Humphries, R. G., Robertson, M. J. und Leff, P. (2000). ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y<sub>1</sub> and P2<sub>T</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129, 275-282.
- Jarvis, M. F., Burgard, E. C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T. J., Subieta, A., Van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., Niforatos, W., Kage, K., Yu, H., Mikusa, J., Wismer, C. T., Zhu, C. Z., Chu, K., Lee, C.-H., Stewart, A. O., Polakowski, J., Cox, B., Kowaluk, E., Williams, M., Sullivan, J. und Faltynek, C. (2002). A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2/3</sub> receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1-6.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. und North, R. A. (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 34190-34196.
- Jiang, Q., Guo, D., Lee, B. X., Van Rhee, A. M., Kim, Y. C., Nicholas, R. A., Schachter, J. B., Harden, T. K. und Jacobson, K. A. (1997). A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 52, 499-507.
- Jin, J. und Kunapuli, S. P. (1998). Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8070-8074.
- Jin, J., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P. (1998). Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y<sub>1</sub> receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 2030-2034.
- Jin, J., Tomlinson, W., Kirk, I. P., Kim, Y. B., Humphries, R. G. und Kunapuli, S. P. (2001). The C6-2B glioma cell P2Y<sub>AC</sub> receptor is pharmacologically and molecularly identical to the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* 133, 521-528.
- Jones, C. A., Chessell, I. P., Simon, J., Barnard, E. A., Miller, K. J., Michel, A. D. und Humphrey, P. P. A. (2000). Functional characterization of the P2X<sub>4</sub> receptor orthologues. *Br. J. Pharmacol.* 129, 388-394.
- Kassack, M. U., Braun, K., Ganso, M., Ullmann, H., Nickel, P., Böing, B., Müller, G. und Lambrecht, G. (2003). Structure-activity relationships of analogues of NF449, a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub> receptors, *submitted*.

- Kenakin, T. P. (1980). 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.
- Kennedy, C. und 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. und Nicholas, R. A. (2000). ATP, an agonist at the rat P2Y<sub>4</sub> receptor, is an antagonist at the human P2Y<sub>4</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 57, 926-931.
- Kennedy, I. und Humphrey, P. P. (1994). Evidence for the presence of two types of P2 purinoceptor in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Eur. J. Pharmacol.* 261, 273-280.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. und 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.
- Khakh, B. S., Michel, A. und Humphrey, P. P. A. (1994). Estimates of antagonist affinities at P2X purinoceptors in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 263, 301-309.
- Khakh, B. S., Surprenant, A. und Humphrey, P. P. A. (1995). A study on P<sub>2X</sub> purinoceptors mediating the electrophysiological and contractile effects of purine nucleotides in rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 115, 177-185.
- Khakh, B. S., Zhou, X. P., Sydes, J., Galligan, J. J. und Lester, H. A. (2000). State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406, 405-410.
- Kikuta, Y., Ohiwa, E., Okada, K., Watanabe, A., Haruki, S. (1999). Clinical application of diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A:F-1500) for controlled hypotension. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 43, 82-86.
- Kim, Y.-C., Brown, S. G., Harden, T. K., Boyer, J. L., Dubyak, G. R., King, B. F., Burnstock, G. und Jacobson, K. (2001). Structure-activity relationships of pyridoxal phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X<sub>1</sub> receptors. *J. Med. Chem.* 44, 340-349.
- Kim, Y.-C., Camaioni, E., Ziganshin, A. U., Ji, X. J., King, B. F., Wildman, S. S., Rychkov, A., Yoburn, J., Kim, H. und Mohanram, A. (1998). Synthesis and structure activity relationships of pyridoxal-6-azoaryl-5'-phosphate

- and phosphonate derivatives as P2 receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* 45, 52-66.
- King, B. F., Liu, M., Gualix, J., Miras, M. T. und Burnstock, G. (1999). Diinosine pentaphosphat (IP<sub>5</sub>I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 128, 981-988.
- King, B. F., TownsendNicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M. und Burnstock, G. (2000). Coexpression of rat P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>6</sub> subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 20, 4871-4877.
- Klapperstück, M., Büttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G. und Markwardt, F. (2000). Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>7</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 245-252.
- Kornecki, E. und Feinberg, H. (1980). Pyridoxal phosphate inhibition of platelet function. *Am. J. Physiol.* 238, H54-H60.
- Koshimizu, T., Koshimizu, M. und Stojilkovic, S. S. (1999). Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 37651-37657.
- Kunapuli, S. P. (1998). Multiple P2 receptor subtypes on platelets: a new interpretation of their function. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 391-394.
- Kunapuli, S. P. und Daniel, J. L. (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem. J.* 336, 513-523.
- Lalo, U. V., Pankratov, Y. V., Arndts, D. und Krishtal, O. A. (2001).  $\omega$ -Conotoxin GVIA potently inhibits the currents mediated by P2X receptors in rat DRG neurons. *Brain Res. Bull.* 54, 507-512.
- 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., Ardanuy, U., Bäumert, H. G., Bo, X. N., Hoyle, C. H., Nickel, P., Pfaff, O., Ralevic, V., Windscheif, U., Ziganshin, A. U., Ziyal, R., Mutschler, E. und Burnstock, G. (1996). Design and pharmacological characterization of selective P2-purinoreceptor antagonists. In: *Perspectives in Receptor Research. Proceedings of the 10th Camerino-Noordwijkerhout Symposium. Editors Giardinà, D., Piergentili, A., Pignini, M., Elsevier, Amsterdam, 337-350.*

- Lambrecht, G., Braun, K., Damer, S., Ganso, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Kassack, M. U. und Nickel, P. (2002). Structure-activity relationships of suramin and pyridoxal-5'-phosphate derivatives as P2 receptor antagonists. *Curr. Pharm. Des.* 8, 2371-2399.
- Lambrecht, G., Damer, S., Niebel, B., Czeche, S., Nickel, P., Rettinger, J., Schmalzing, G. und Mutschler, E. (1999). Novel ligands for P2 receptor subtypes in innervated tissues. *Prog. Brain Res.* 120, 107-117.
- Lambrecht, G., Ganso, M., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G., Hildebrandt, C., Braun, K. und Mutschler, E. (2000a). The novel heteromeric bivalent ligand SB9 potently antagonizes P2Y<sub>1</sub> receptor-mediated responses. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 171-177.
- Lambrecht, G., Rettinger, J., Bäumert, H. G., Czeche, S., Damer, S., Ganso, M., Hildebrandt, C., Niebel, B., Spatz-Kümbel, G., Schmalzing, G. und Mutschler, E. (2000b). The novel pyridoxal-5'-phosphate derivative PPNDS potently antagonizes activation of P2X<sub>1</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 387, R19-R21.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. und Harden, T. K. (2001). Interplay of constitutively released nucleotides, nucleotide metabolism and activity of P2Y receptors. *Drug Dev. Res.* 53, 66-71.
- Le, K.-T., Boué-Grabot, E., Archambault, V. und Seguela, P. (1999). Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>5</sub> subunits. *J. Biol. Chem.* 274, 15415-15419.
- Lee, H. Y., Bardini, M. und Burnstock, G. (2000). P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res.* 300, 321-330.
- Leon, C., Freund, M., Ravanat, C., Baurand, A., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (2001). Key role of the P2Y<sub>1</sub> receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y<sub>1</sub>-knockout mice and mice treated with a P2Y<sub>1</sub> antagonist. *Circulation* 103, 718-723.
- Leon, C., Hechler, B., Freund, M., Eckly, A., Vial, C., Ohlmann, P., Dierich, A., LeMeur, M., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1999). Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y<sub>1</sub> receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* 104, 1731-1737.
- Leon, C., Hechler, B., Vial, C., Leray, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1997). The P2Y<sub>1</sub> receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* 403, 26-30.

- Lewis, C. J. und Evans, R. J. (2000). Comparison of P2X receptors in rat mesenteric, basilar and septal (coronary) arteries. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 69-74.
- Lewis, C. J., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. und Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435.
- Li, G. H., Lee, E. M., Blair, D., Holding, C., Poronnik, P., Cook, D. I., Barden, J. A. und Bennett, M. R. (2000). The distribution of P2X receptor clusters on individual neurons in sympathetic ganglia and their redistribution on agonist activation. *J. Biol. Chem.* 275, 29107-29112.
- Liu, M., King, B. F., Dunn, P. M., Rong, W., Townsend-Nicholson, A. und Burnstock, G. (2001). Coexpression of P2X<sub>3</sub> and P2X<sub>2</sub> receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 1043-1050.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., Van Biesen, T., Kowaluk, E. A. und Jarvis, M. F. (1999). Molecular and functional characterization of human P2X<sub>2</sub> receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 1171-1181.
- Mackenzie, A. B., Mahaut-Smith, M. P. und Sage, S. O. (1996). Activation of receptor-operated cation channels via P2X<sub>1</sub> not P2<sub>T</sub> purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.* 271, 2879-2881.
- Mackenzie, A. B., Surprenant, A. und 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. und Evans, R. J. (2000). ADP is not an agonist at P2X<sub>1</sub> receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 131, 108-114.
- McGrath, J. C. (1978). Adrenergic and non-adrenergic components in the contractile response of the rat vas deferens to a single indirect stimulus. *J. Physiol. (London)* 283, 23
- Michel, A. D., Xing, M. und Humphrey, P. P. (2001). Serum constituents can affect 2'-& 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP potency at P2X<sub>7</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1501-1508.



- Mihaylova-Todorova, S. T., Todorov, L. D. und Westfall, D. P. (2002). Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: Evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 992-1001.
- Mihaylova-Todorova, S., Todorov, L. D. und 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.
- Moore, D. J., Chambers, J. K., Murdock, P. R. und Emson, P. C. (2002). Human Ntera-2/D1 neuronal progenitor cells endogenously express a functional P2Y<sub>1</sub> receptor. *Neuropharmacology* 43, 966-978.
- Moro, S., Guo, D., Camaioni, E., Boyer, J. L., Harden, T. K. und Jacobson, K. A. (1998). Human P2Y<sub>1</sub> receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J. Med. Chem.* 41, 1456-1466.
- Müller, C. E. (2002). P2-pyrimidinergergic receptors and their ligands. *Curr. Pharm. Des.* 8, 2353-2369.
- Müller, W. und Wollert, U. (1976). Spectroscopic studies on the complex formation of suramin with bovine and serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 427, 465-480.
- Mulryan, K., Gitterman, D. P., Lewis, C. J., Vial, C., Leckie, B. J., Cobb, A. L., Brown, J. E., Conley, E. C., Buell, G., Pritchard, C. A. und Evans, R. J. (2000). Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X<sub>1</sub> receptors. *Nature* 403, 86-89.
- Nassauw, L. V., Brouns, I., Adriaensen, D., Burnstock, G. und Timmermans, J. P. (2002). Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X<sub>3</sub> receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem. Cell Biol.* 118, 193-203.
- Nicholas, R. A. (2001). Identification of the P2Y<sub>12</sub> receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 60, 416-420.
- Nicke, A., Rettinger, J., Büttner, C., Eichele, A., Lambrecht, G. und Schmalzing, G. (1999). Evolving view of quaternary structures of ligand-gated ion channels. *Prog. Brain Res.* 120, 61-80.

- Nicke, A., Rettinger, J. und Schmalzing, G. (2003). Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X<sub>1</sub> concatamers. *Mol. Pharmacol.* 63, 243-252.
- North, R. A. und Surprenant, A. (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 563-580.
- Ohkubo, T., Yamazaki, J., Nakashima, Y. und Kitamura, K. (2000). Presence and possible role of the spliced isoform of the P2X<sub>1</sub> receptor in rat vascular smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* 441, 57-64.
- Okpalaugo, E. O., Garcez-do-Carmo, L., Jurkiewicz, N. H. und Jurkiewicz, A. (2002). Contractile responses of the rat vas deferens after epithelium removal. *Life Sci.* 70, 2943-2951.
- Oury, C., Lenaerts, T., Peerlinck, K., Vermylen, J. und Hoylaerts, M. F. (1999). Congenital deficiency of the phospholipase C coupled platelet P2Y<sub>1</sub> receptor leads to a mild bleeding disorder. *Thromb. Haemost.* 82 (Suppl.), Abstract 20.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Thys, C., Tytgat, J., Vermylen, J. und Hoylaerts, M. F. (2001). The ATP-gated P2X<sub>1</sub> ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb. Haemost.* 86, 1264-1271.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Van Geet, C., Thys, C., Wei, L., Nilius, B., Vermylen, J. und Hoylaerts, M. F. (2000). A natural dominant negative P2X<sub>1</sub> receptor due to deletion of a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* 275, 22611-22614.
- Oury, C., Toth-Zsamboki, E., Vermylen, J. und Hoylaerts, M. F. (2002). P2X<sub>1</sub>-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood* 100, 2499-2505.
- Overton, M. C. und Blumer, K. J. (2000). G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr. Biol.* 10, 341-344.
- Palmer, R. K., Boyer, J. L., Schachter, J. B., Nicholas, R. A. und Harden, T. K. (1998). Agonist action of adenosine triphosphate at the human P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 54, 1118-1123.
- Parker, R. B. und Waud, D. R. (1971). Pharmacological estimation of drug-receptor dissociation constants. Statistical evaluation. I. Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177, 1-12.

- Patel, M. K., Khakh, B. S. und Henderson, G. (2001). Properties of native P2X receptors in rat trigeminal mesencephalic nucleus neurons: lack of correlation with known, heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 40, 96-105.
- Paul, B. Z., Daniel, J. L. und Kunapuli, S. P. (1999). Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J. Biol. Chem.* 274, 28293-28300.
- Pintor, J. und Miras-Portugal, M. T. (1995). P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Gen. Pharmacol.* 26, 229-235.
- Pintor, J., Diaz-Hernandez, M., Gualix, J., Gomez-Villafuertes, R., Hernando, F. und Miras-Portugal, M. T. (2000). Diadenosine polyphosphate receptors from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol. Ther.* 87, 103-115.
- Pintor, J., Diaz-Rey, M. A. und Miras-Portugal, M. T. (1993). Ap<sub>4</sub>A and ADP-β-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br. J. Pharmacol.* 108, 1094-1099.
- Raboisson, P., Baurand, A., Cazenave, J. P., Gachet, C., Retat, M., Spiess, B. und Bourguignon, J. J. (2002). Novel antagonists acting at the P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor: synthesis and conformational analysis using potentiometric and nuclear magnetic resonance titration techniques. *J. Med. Chem.* 45, 962-972.
- Ralevic, V. (2002). The involvement of smooth muscle P2X receptors in the prolonged vasorelaxation response to purine nucleotides in the rat mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1988-1994.
- Ralevic, V. und Burnstock, G. (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413-475.
- Ralevic, V., Jankowski, J. und Schlüter, H. (2001). Structure-activity relationships of diadenosin polyphosphates (Ap<sub>n</sub>As), adenosine polyphospho guanosines (Ap<sub>n</sub>Gs) and guanosine polyphospho guanosines (Gp<sub>n</sub>Gs) at P2 receptors in the rat mesenteric arterial bed. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1073-1083.
- Rettinger, J., Aschrafi, A. und Schmalzing, G. (2000a). Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X<sub>1</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 33542-33547.

- Rettinger, J., Braun, K., Schmalzing, G., Hochmann, H., Kassack, M., Ullmann, H., Nickel, P. und Lambrecht, G. (2003). Selective antagonism by the suramin analogue NF449 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology*, submitted.
- Rettinger, J., Schmalzing, G., Damer, S., Müller, G., Nickel, P. und Lambrecht, G. (2000b). The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X<sub>1</sub> receptor. *Neuropharmacology* 39, 2044-2053.
- Robertson, S. J., Ennion, S. J., Evans, R. J. und Edwards, F. A. (2001). Synaptic P2X receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 378-386.
- Rolf, M. G. und Mahaut-Smith, M. P. (2002). Effects of enhanced P2X<sub>1</sub> receptor Ca<sup>2+</sup> influx on functional responses in human platelets. *Thromb. Haemost.* 88, 495-502.
- Rolf, M. G., Brearley, C. A. und Mahaut-Smith, M. P. (2001). Platelet shape change evoked by selective activation of P2X<sub>1</sub> purinoreceptors with  $\alpha,\beta$ -methylene ATP. *Thromb. Haemost.* 85, 303-308.
- Rovati, G. E. und Nicosia, S. (1994). Lower efficacy: interaction with an inhibitory receptor or partial agonism? *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 140-144.
- Rubio, M. E. und Soto, F. (2001). Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J. Neurosci.* 21, 641-653.
- Sage, S. O., Yamoah, E. H. und Heemskerk, J. W. M. (2000). The roles of P2X<sub>1</sub> and P2T<sub>AC</sub> receptors in ADP-evoked calcium signalling in human platelets. *Cell Calcium* 28, 119-126.
- Sak, K. (2000). Are P2Y<sub>1</sub> purinoceptors expressed in turkey erythrocytes? *Neurosci. Lett.* 293, 78-80.
- Sak, K. und Jarv, J. (2000). Adenosine triphosphate is full antagonist at human P2Y<sub>1</sub> purinoceptors. *Neurosci. Lett.* 284, 179-181.
- Sak, K. und Webb, T. E. (2002). A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 131-136.

- Savi, P., Bornia, J., Salel, V., Delfaud, M. und Herbert, J. M. (1997). Characterization of P2X<sub>1</sub> purinoreceptors on rat platelets: effect of clopidogrel. *Br. J. Haematol.* 98, 880-886.
- Scase, T. J., Heath, M. F., Allen, J. M., Sage, S. O., Evans, R. J. (1998). Identification of a P<sub>2X1</sub> purinoceptor expressed on human platelets. *Biochem. Biophys. Research Communications.* 242, 525-528.
- Sellers, L. A., Simon, J., Lundahl, T. S., Cousens, D. J., Humphrey, P. P. und Barnard, E. A. (2001). Adenosine nucleotides acting at the human P2Y<sub>1</sub> receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 16379-16390.
- Sevigny, J., Sundberg, C., Braun, N., Guckelberger, O., Csizmadia, E., Qawi, I., Imai, M., Zimmermann, H. und 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.
- Shinozuka, K., Mizuno, H., Nakamura, K. und Kunitomo, M. (2002). Purinergic modulation of vascular sympathetic neurotransmission. *Jap. J. Pharmacol.* 88, 19-25.
- Soto, F., Garcia-Guzman, M. und Stühmer, W. (1997). Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membrane Biol.* 160, 91-100.
- Soto, F., Lambrecht, G., Nickel, P., Stühmer, W. und Busch, A. E. (1999). Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38, 141-149.
- Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A. und North, R. A. (1999). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X<sub>2</sub> receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol. Pharmacol.* 56, 973-981.
- Storr, M., Franck, H., Saur, D., Schusdziarra, V. und Allescher, H. D. (2000). Mechanisms of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP-induced inhibition in rat ileal smooth muscle: Involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in purinergic inhibition. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 771-779.
- Sun, B., Li, J., Okahara, K. und Kambayashi, J. (1998). P2X<sub>1</sub> purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression. *J. Biol. Chem.* 273, 11544-11547.

- Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H. und Furuichi, K. (2001). Molecular cloning of the platelet P2T<sub>AC</sub> ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Mol. Pharmacol.* 60, 432-439.
- Tallarida, R. J. und Murray, R. B. (1986). Manual of pharmacologic calculations with computer programs. *2nd Edition, Springer Verlag, Berlin*
- Tominaga, M., Wada, M. und Masu, M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 6951-6956.
- Torres, G. E., Egan, T. M. und Voigt, M. M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274, 6653-6659.
- Toth-Zsomboki, E., Oury, C., Watanabe, H., Nilius, B., Vermylen, J. und Hoylaerts, M. F. (2002). The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X<sub>1</sub> ion channel are essential for its function. *FEBS Letters* 524, 15-19.
- Townsend-Nicholson, A., King, B. F., Wildman, S. S. und Burnstock, G. (1999). Molecular cloning, functional characterisation and possible cooperativity between the murine P2X<sub>4</sub> and P2X<sub>4a</sub> receptors. *Mol. Brain Res.* 64, 246-254.
- Trezise, D. J., Bell, N. J., Khakh, B. S., Michel, A. D. und Humphrey, P., P., A. (1994b). P2 purinoceptor antagonist properties of pyridoxal-5-phosphate. *Eur. J. Pharmacol.* 259, 295-300.
- Trezise, D. J., Bell, N. J. und Humphrey, P. P. A. (1994a). P2 purinoceptor antagonist effects of pyridoxal-5-phosphate in rat vagus nerve and guinea-pig aorta. *Br. J. Pharmacol.* 113, 463-470.
- Trezise, D. J., Kennedy, I. und Humphrey, P. P. A. (1994c). The use of antagonists to characterize the receptors mediating depolarization of the rat isolated vagus nerve by  $\alpha,\beta$ -methylene adenosine 5'-triphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 112, 282-288.
- Trumel, C., Payraastre, B., Plantavid, M., Hechler, B., Viala, C., Presek, P., Martinson, E. A., Cazenave, J. P., Chap, H. und Gachet, C. (1999). A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood* 94, 4156-4165.

- Tuluc, F., Bültmann, R., Glänzel, M., Frahm, A. W. und Starke, K. (1998). P2-receptor antagonists: IV. Blockade of P2-receptor subtypes and ectonucleotidases by compounds related to reactive blue 2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, 111-120.
- Turner, N. A., Moake, J. L. und McIntire, L. V. (2001). Blockade of adenosine diphosphate receptors P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>1</sub> is required to inhibit platelet aggregation in whole blood under flow. *Blood* 98, 3340-3345.
- Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A. und Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516-519.
- Valera, S., Talabot, F., Evans, R. J., Gos, A., Antonarakis, S. E., Morris, M. A. und Buell, G. (1995). Characterisation and chromosomal localisation of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Receptors Channels* 3, 283-289.
- van der Weyden, L., Adams, D. J., Luttrell, B. M., Conigrave, A. D. und Morris, M. B. (2000). Pharmacological characterisation of the P2Y<sub>11</sub> receptor in stably transfected haematological cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* 213, 75-81.
- Vial, C., Hechler, B., Leon, C., Cazenave, J. P. und Gachet, C. (1997). Presence of P2X<sub>1</sub> purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines. *Thromb. Haemost.* 78, 1500-1504.
- Vial, C., Rolf, M. G., Mahaut-Smith, M. P. und Evans, R. J. (2002). A study of P2X<sub>1</sub> receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 135, 363-372.
- Virgilio, F. D., Vishawanath, V. und Ferrari, D. (2001). On the role of the P2X<sub>7</sub> receptor in the immune system. In *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. Editors Abbraccio, M. P., Williams, M.. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 151, Part II. Cardiovascular, Respiratory, Immune, Metabolic and Gastrointestinal Tract Function, Springer Verlag, Heidelberg, 355-373.*
- Virginio, C., Robertson, G., Surprenant, A. und North, R. A. (1998). Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> and heteromeric P2X<sub>2/3</sub> receptors. *Mol. Pharmacol.* 53, 969-973.
- Vlaskovska, M., Kasakov, L., Rong, W., Bodin, P., Bardini, M., Cockayne, D. A., Ford, A. P. und Burnstock, G. (2001). P2X<sub>3</sub> knock-out mice reveal a

- major sensory role for urothelially released ATP. *J. Neurosci.* 21, 5670-5677.
- von Kügelgen, I. und Starke, K. (1990). Evidence for two separate vasoconstriction-mediating nucleotide receptors, both distinct from the P2X-receptor in rabbit basilar artery: a receptor for pyrimidine nucleotides and a receptor for purine nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341, 538-546.
- von Kügelgen, I. und Wetter, A. (2000). Molecular Pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 310-323.
- von Kügelgen, I., Bültmann, R. und Starke, K. (1990). Interaction of adenine nucleotides, UTP and suramin in mouse vas deferens: suramin-sensitive and suramin-insensitive components in the contractile effect of ATP. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342, 198-205.
- Waldo, G. L., Corbitt, J., Boyer, J. L., Ravi, G., Kim, H. S., Ji, X. D., Lacy, J., Jacobson, K. A. und Harden, T. K. (2002). Quantitation of the P2Y<sub>1</sub> receptor with a high affinity radiolabeled antagonist. *Mol. Pharmacol.* 62, 1249-1257.
- Westfall, D. P., Todorov, L. D. und Mihaylova-Todorova, S. T. (2002). ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 439-444.
- Westfall, T. D. und Westfall, D. P. (2001). Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 45, 109-122.
- Westfall, T. D., Kennedy, C. und 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., Menzies, J. R. W., Liberman, R., Waterston, S., Ramphir, N., Westfall, D. P., Sneddon, P. und Kennedy, C. (2000a). Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 131, 909-914.
- Westfall, T. D., Sarkar, S., Ramphir, N., Westfall, D. P., Sneddon, P. und Kennedy, C. (2000b). Characterization of the ATPase released during sympathetic nerve stimulation of the guinea-pig isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1684-1688.



- Wiklund, N. P. und Gustafsson, L. E. (1988). Indications for P2-purinoceptor subtypes in guinea-pig smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 148, 361-370.
- Williams, M. und Jarvis, M. F. (2000). Purinergic and pyrimidinerger receptors as potential drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1173-1185.
- Worthington, R. A., Hansen, M. A., Balcar, V. J., Bennett, M. R. und Barden, J. A. (1999). Analysis of novel P2X subunit-specific antibodies in rat cardiac and smooth muscle. *Electrophoresis* 20, 2081-2085.
- Yao, S. T., Barden, J. A., Finkelstein, D. I., Bennett, M. R. und Lawrence, A. J. (2000). Comparative study on the distribution patterns of P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>6</sub> receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Association with catecholamine cell groups. *J. Comp. Neurol.* 427, 485-507.
- Yoshioka, K., Saitoh, O. und Nakata, H. (2002). Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors in living cells. *FEBS Letters* 523, 147-151.
- Yu, H. X., Bianchi, B., Metzger, R., Lynch, K. J., Kowaluk, E. A., Jawis, M. F. und Biesen, T. V. (1999). Lack of specificity of (<sup>35</sup>S)-ATP<sub>γ</sub>S and (<sup>35</sup>S)-ADPβS as radioligands for ionotropic and metabotropic P2 receptor binding. *Drug Dev. Res.* 48, 84-93.
- Zagorodnyuk, V., Santicoli, P., Maggi, C. A. und Giachetti, A. (1996). The possible role of ATP and PACAP as mediators of apaminsensitive NANC inhibitory junction potentials in circular muscle of guinea-pig colon. *Br. J. Pharmacol.* 119, 779-786.
- Zhang, F. L., Luo, L., Gustafson, E., Palmer, K., Qiao, X. D., Fan, X. D., Yang, S. J., Laz, T. M., Bayne, M. und Monsma, F. (2002). P2Y<sub>13</sub>: Identification and characterization of a novel G<sub>o</sub>i-coupled ADP receptor from human and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 705-713.
- Ziganshin, A. U., Ziganshina, L. E., King, B. F. und Burnstock, G. (1995). Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and the inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflügers Arch.* 429, 412-418.
- Zimmermann, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progr. Neurobiol.* 49, 589-618.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 299-309.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha\beta$ meADP	$\alpha,\beta$ -Methylen-ADP
2-meSADP	2-Methylthio-ADP
5-HT	Serotonin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP $\beta$ S	Adenosin-5'-O-(2-thiodiphosphat)
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol- propionsäure
ANAPP <sub>3</sub>	Arylazidoaminopropionyl-ATP
Ap <sub>n</sub> A	Adenin-Dinukleotide (n: Anzahl an Phosphaten zwischen den beiden Adenosingruppen)
AR-C66096MX	2-Propylthio-D- $\beta,\gamma$ -difluoromethylen-ATP
AR-C67085MX	2-Propylthio-D- $\beta,\gamma$ -dichloromethylen-ATP
AR-C69931MX	2-(3,3,3-Trifluoropropylthio)-N <sup>6</sup> -methylthioethyl-D- $\beta,\gamma$ - dichloromethylen-ATP
AR-C-Verbindungen	werden in der Literatur auch als ARL-Verbindungen bezeichnet
ARL67156	6-N,N-diethyl-D- $\beta,\gamma$ -dibromomethylen-ATP
ATP $\alpha$ S	Adenosin-5'-O-(1-thiotriphosphat)
BSA	Rinder-Serumalbumin
Bst101	N-[3-(N-(1,3,5-Trisulfo-8-naphthyl)carbamoyl)- phenyl]-N'-[3-(N-(1-naphthyl)-carbamoyl)phenyl]- Harnstoff
BzATP	2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP
cAMP	cyclisches AMP
CDP	Cytidin-5'-diphosphat

CGS21680	2-[ <i>p</i> -(2-carbonyl-ethyl)-phenylethylamino]-5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
CHO	Follikelzelllinie des chinesischen Hamsters (chinese hamster ovary)
CI-IB-MECA	2-Chloro-N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-5'-(N-methylcarbamoyl)-adenosin
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CSC	8-(3-chlorostyryl)-Koffein
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	Molare Konzentration, die 50 % des Maximaleffektes auslöst
ERK1 und 2	extracellular signal-regulated kinase 1 und 2
G Protein	Guanyl-Nukleotid-bindendes Protein
GABA	γ-Aminobuttersäure
HEK293	Humane Nierenzelllinie (human embryonic kidney)
HIV	Human immunodeficiency virus
IB-MECA	N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-5'-(N-methylcarbamoyl)-Adenosin
IC <sub>50</sub>	Molare Konzentration, die 50 % des Maximaleffektes inhibiert
IDP	Inosindiphosphat
INS-365	Diuridin-tetraphosphat
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
Ip <sub>5</sub> I	Diinosin-pentaphosphat
KF17837	1,3-Dipropyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthin
KN-62	1-[N,O-bis(5-isochinolinsulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-Phenylpiperazin
L-268605	3-(4-methoxyphenyl)-5-amino-7-oxo-Thiazolo[3,2]pyrimidin
MAP	Mitogen activated peptide
MG02-2	2,4-Bis[(2-sulfophenyl)amino]-6-chloro-1,3,5-triazin-Dinatriumsalz

---

MRS2279	2-Chloro-N <sup>6</sup> -methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat
NECA	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
NF037	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1,-phenylencarbonylimino-3,1-phenylencarbonylimino))bis-naphthalen-1,3,5-trisulfonsäure
NF058	8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-(4-methylphenyl)carbonylbisimino))bis-naphthalen-1,3,5-trisulfonsäure
NG108-15	Neuroblastom-Zelllinie von Mäusen
NO	Stickstoffmonoxid
Ntera2/D1	Neuronale Vorläuferzelllinie des Menschen
oATP	2',3'-dialdehyd-ATP
pA <sub>2</sub>	Negativer dekadischer Logarithmus der Antagonistenkonzentration, die zu einer 2-fachen Verschiebung der Agonistenkurve nach rechts führt
PC12	humane Phäochromozytom-Zelllinie
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SCH58261	5-Amino-7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)-pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidin
TM	Transmembrandomäne
TMP	Tymin-5'-monophosphat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPβS	Uridin-5'-O-(2-thiodiphosphat)
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTPγS	Uridin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)]1,2,4-triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino)ethylphenol

## 9. Publikationen, Teilnahme an Kongressen und Symposien

### Publikationen

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 P2Y<sub>1</sub> receptor-mediated responses. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 171-177.

Braun, K., Rettinger, J., Ganso, M., Kassack, M., Hildebrandt, C., Ullmann, H., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G. (2001) NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364, 285-290.

Lambrecht, G., Braun, K., Damer, S., 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.

Rettinger, J., Braun, K., Schmalzing, G., Hochmann, H., Kassack, M., Ullmann, H., Nickel, P., Lambrecht, G. (2003) Selective antagonism by the suramin analogue NF449 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology*, submitted.

Kassack, M. U., Braun, K., Ganso, M., Ullmann, H., Nickel, P., Böing, B., Müller, G., Lambrecht, G. (2003) Structure-activity relationships of analogues of NF449, a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X<sub>1</sub> receptors. *J. Med. Chem.*, submitted.

**Teilnahme an Kongressen und Symposien**

*12th Camerino-Noordwijkerhout Symposium, "Receptor Chemistry Towards the Third Millenium", Camerino/ Italien, 5.- 9. September 1999,*

passive Teilnahme.

*International Symposium of Nucleosides and Nucleotides – Purines 2000, Madrid/ Spanien, 9.- 13. July 2000.*

Ganso, M., Bäumert, H. G., Spatz-Kümbel, G., Hildebrandt, C., Braun, K., Mutschler, E., Lambrecht, G. (2000) Heterodimerisation of suramin and pyridoxalphosphate pharmacophores as a novel approach in the design of selective P2 receptor antagonists. *Drug Dev. Res.* 50, Seite 62.

*42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz/ Deutschland, 13.- 15. März 2001.*

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 P2X<sub>1</sub> receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363 (Suppl.), R35.

*7th International Symposium on Adenosine & Adenine Nucleotides (ISAAN 2002), Surfers Paradise/ Australien, 24.- 31.05.2002.*

Braun, K., Ullmann, H., Kassack, M., Nickel, P., Lambrecht, G. (2002) Structure-activity relationships of NF449 analogues. *Drug Dev. Res.* 56, Seite 574.

*XVIIth Platelet Meeting, Eltville/ Deutschland, 10.- 12. Oktober 2002,*

passive Teilnahme.

44. *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz/ Deutschland, 17.- 20. März 2003.*

Menke, K., Horner, S., Mahaut-Smith, M., Hildebrandt, C., Kassack, M., Nickel, P., Lambrecht, G. (2003) NF449 and MRS2179 are usefull tools to distinguish between P2X<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors in human platelets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367 (Suppl.), R35.



## 10. Curriculum Vitae

### Kirsten Bettina Menke, geb. Braun

19. Dezember 1973	geboren in Tübingen am Neckar/ Baden-Württemberg als Tochter von Birgit Heidrun Braun geb. Hepper (Apothekerin) und Dr. rer. nat. Diethard Fritz Leo Arthur Braun (Apotheker) und Schwester von Dirk Henning Braun (Dipl. Ing. Freier Architekt)
1980 – 1984	Grundschule Winkelwiese in Tübingen
1984 – 1993	Umland-Gymnasium (hum.) in Tübingen
April 1989	14 Tage Sprachcollege in Oxford/ England
März – Juni 1990	College-Aufenthalt in der Leighton Park School in Reading/ England
Oktober 1993- April 1994	1. Semester Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin an der Fresenius Akademie in Wiesbaden
April 1994 – Oktober 1998	Pharmaziestudium an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
März/ August 1999	Famulatur in der Nordring-Apotheke; Dr. D. Braun; Tübingen
21. März 1996	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
6. Oktober 1998	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

---

1. November 1998 – 31. Juli 1999	Pharmaziepraktikum in der Löwen-Apotheke; Dr. B. Kreutzer; Dreieich
1. August- 31. Oktober 1999	Pharmaziepraktikum/Beginn der vorliegenden Dissertation am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. G. Lambrecht
seit 1. August 1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler, Universität Frankfurt am Main; Mitglied des Graduiertenkollegs für Arzneimittelentwicklung und Analytik
26. November 1999	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
29. November 1999	Approbation als Apothekerin
März 2002	Forschungsaufenthalt in Cambridge/ England
23./ 31. August 2002	Heirat mit Robert Menke