

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Charakterisierung von P2-Purinozeptoren am Herzen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

.....

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Daniel Rothkirch
geboren am 06.01.1983 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter:
Prof. Dr. med. Joachim Neumann
Prof. Dr. med. Stefan Dhein (Altenburg)
Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann (Göttingen)

03.12.2019

19.08.2020

Referat

Die Nukleosidtriphosphate ATP und UTP bewirken über die Bindung an P2-Rezeptoren verschiedene regulatorische Effekte innerhalb des kardiovaskulären Systems. Dazu zählen u. a. die Thrombozyten-Aggregation, die Angiogenese sowie die Regulation des Blutdruckes. Zudem vermitteln sie in den Kardiomyozyten von verschiedenen Säugetieren einen Anstieg der Kontraktilität und eine Hypertrophie. Innerhalb dieser Arbeit wurde sowohl der Einfluss des ATP- als auch des UTP-Signalweges auf die Aktivierung der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) in Säugetier-Kardiomyozyten untersucht. Das Interesse konzentrierte sich dabei auf die Extracellular signal-regulated protein kinases 1 und 2 (ERK 1/2) und die p38-MAPK, die ihrerseits an der Regulation wichtiger Zellfunktionen, wie der Proliferation und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, beteiligt sind. Die Untersuchungen des ATP- und UTP-Signalweges in isolierten adulten Maus- und neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ergaben, durch beide Nukleotide kommt es zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Aktivierung der p38- sowie der ERK 1/2-MAPK. Durch den Einsatz von UTP und Rezeptorantagonisten konnte für adulte Mauskardiomyozyten eine Aktivierung bzw. Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges (p38 und ERK 1/2) gezeigt werden, die eine Vermittlung der Effekte von UTP auf Mauskardiomyozyten durch den P2Y₄-Rezeptor nahelegt. Der Einsatz von Signalkaskadehemmstoffen zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von p38 und ERK 1/2 durch UTP konnte eine Beteiligung von Adenylatcyclasen, Phospholipase C sowie der MAPK-Kinasen MEK 1 und 2 wahrscheinlich machen. In weiteren Untersuchungen ergab sich möglicherweise eine Aktivierung der MAPK durch UTP über einen weiteren Rezeptortyp, da in den Kontraktionsuntersuchungen an menschlichen sowie Mausvorhöfen kein Unterschied in der Kontraktionskraft bei P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Knock-out-Mäusen sowie nach Einsatz spezifischer Rezeptorantagonisten (AR-C118925, PSB-1454) kein Unterschied bei der Inotropie festgestellt werden konnte. ATP und UTP erhöhen den Phosphorylierungszustand von p38- und ERK 1/2-MAPK in isolierten menschlichen rechten Vorhöfen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenliste	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Extrazelluläres ATP und UTP	1
1.2 Wirkung und Funktion von Trinukleotiden am Herzen	2
1.2.1 Funktion von ATP am Herzen	2
1.2.2 Funktion von UTP am Herzen	3
1.3 P2-Rezeptoren.....	4
1.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade	6
1.5 Therapeutischer Nutzen der P2Y- bzw. P2X-Rezeptoren.....	8
2. Fragestellung.....	10
3. Material und Methoden	11
3.1 Zellisolation neonataler Rattenkardiomyozyten	11
3.2 Zellisolation adulter Mauskardiomyozyten.....	11
3.3 Knock-out-Mäuse.....	12
3.4 Untersuchung humaner Gewebeproben	12
3.5 Untersuchung von Proben zur Zeitabhängigkeit der ATP/UTP-Wirkung.....	13
3.6 Untersuchung von Proben zur Konzentrationsabhängigkeit der ATP/UTP- Wirkung	13
3.7 Untersuchung von Proben mit Rezeptorantagonisten oder Hemmstoffen der Signalkaskade	14
3.7.1 DPCPX	14
3.7.2 PPADS	14

3.7.3 Reactive blue 2	15
3.7.4 Suramin	15
3.7.5 SQ22563	16
3.7.6 U73122	16
3.7.7 U0126	16
3.8 Untersuchung von Homogenaten zur Western Blot Analyse	17
3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
3.9 Immunologische Identifizierung von Proteinen	18
3.10 Kontraktionskraftmessungen an isolierten Herzvorhöfen.....	19
3.10.1 AR-C118925	20
3.10.2 PSB-1454	20
3.11 Auswertung.....	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK in neonatalen Rattenkardiomyozyten	21
4.1.1.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP	21
4.1.1.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP	23
4.1.2.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP	25
4.1.2.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP	27
4.2 Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK in adulten Mauskardiomyozyten	29
4.2.1.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP	29
4.2.1.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP	31
4.2.2.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP	33
4.2.2.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP	35

4.3 Wirkung von Rezeptorantagonisten auf die Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP	37
4.4 Wirkung von Hemmstoffen der Signalkaskade auf die Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP.....	39
4.5 Effekt von UTP auf Vorhofpräparate in Wildtyp und P2Y-Knock-out-Mäusen....	41
4.6 Wirkung von P2Y-Rezeptorantagonisten auf den Effekt von UTP in menschlichen und Mausvorhöfen	43
4.7 Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK in adulten humanen Vorhofpräparaten.....	45
5. Diskussion	47
5.1 Klinischer Ausblick.....	52
6. Zusammenfassung.....	55
7. Literaturverzeichnis	56
8. Thesen	71
9. Anhang.....	72
9.1 Puffer und Lösungen.....	72
9.2 Substanzen.....	74
9.3 Zellisolationsystem, Antikörper, Rezeptorantagonisten und Hemmstoffe	75
9.4 Geräteliste und Bezugsquellen	77
10. Lebenslauf	X
11. Selbstständigkeitserklärung.....	XI
12. Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	XII
13. Danksagung.....	XIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Signalkaskade MAPK-aktivierter Proteinkinasen (MK)

Abbildung 2:

Strukturformeln von DPCPX, PPADS, RB2 und Suramin

Abbildung 3:

Strukturformeln von SQ22563, U0126 und U73122

Abbildung 4:

Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 5:

Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 6:

Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 7:

Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 8:

Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP in adulten Mauscardiomyozyten

Abbildung 9:

Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP in adulten Mauscardiomyozyten

Abbildung 10:

Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP in adulten Mauscardiomyozyten

Abbildung 11:

Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP in adulten Mauscardiomyozyten

Abbildung 12:

Antagonisierung der UTP-abhängigen (100 μ M) Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch unterschiedliche Rezeptorantagonisten

Abbildung 13:

Hemmung der UTP-abhängigen (100 μ M) Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 durch unterschiedliche Hemmstoffe der Signalkaskade

Abbildung 14:

Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₂-KO-Mäusen

Abbildung 15:

Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₄-KO-Mäusen

Abbildung 16:

Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₆-KO-Mäusen

Abbildung 17:

Auswirkungen von P2Y-Rezeptorantagonisten auf die Inotropie von UTP in Mausvorhofpräparaten

Abbildung 18:

Auswirkungen von P2Y-Rezeptorantagonisten auf die Inotropie von UTP in menschlichen Vorhofpräparaten

Abbildung 19:

Darstellung der Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP bzw. UTP in menschlichen Vorhofzellen

Abbildung 20:

Schematische Darstellung der Signalkaskaden des P2Y-Rezeptor

Tabellenliste

Tabelle 1:

P2Y-Rezeptornomenklatur und Pharmakologie

Tabelle 2:

Übersicht über verwendete Antikörper

Tabelle 3:

Größenbereich für Proteinnachweise im Western Blot

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindende Kasette („ATP binding cassette“)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-Puffer	Alkalische Phosphatase-Puffer
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CFTR	Regulator der Transmembran-Leitfähigkeit bei cystischer Fibrose („Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSQ	Calsequestrin
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-Cyclopentylxanthin
DUSP	Zweifach spezifische MAPK Phosphatasen („dual-specificity MAPK phosphatases“)
EDHF	Endothelabhängiger Hyperpolarisierender Faktor („Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK 1/2	Extrazelluläre signalregulierte Proteinkinasen 1 und 2 („Extracellular signal-regulated protein kinases 1 und 2“)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HBSS	Bilanzierte Salzlösung mit Hanks Salzen („Hank's Balanced Salt Solution“)
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
Ktr.	Kontrolle
KO	Knock-out
Konz.	Konzentration

Log	Logarithmus
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK 1/2	MAPK/ERK Kinasen 1 und 2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mN	Millinewton
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBCS	Fetales Kälberserum („Newborn calf serum“)
NO	Stickstoffmonoxid
p	Wahrscheinlichkeit (<0,05)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	PhosphorImager
PK	Proteinkinase
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
RB2	Reactive blue 2
RNA	Ribonukleinsäure („Ribonucleic acid“)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 („Tris-buffered saline with Tween20“)
TE	Tris-EDTA-Puffer
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator („tissue-type plasminogen activator“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Extrazelluläres ATP und UTP

Das Purinnukleotid ATP hat neben seiner Schlüsselrolle im Zellmetabolismus als enzymatischer Kofaktor und als intrazelluläre Hauptenergiequelle eine Funktion als extrazelluläres Signalmolekül. Das Pyrimidinnukleotid UTP sowie die Dinukleotide ADP und UDP wirken ebenfalls als extrazelluläre Signalmoleküle. Ihre Wirkung entfalten diese über Purinozeptoren vom Typ 2 (P2-Rezeptoren) (Ralevic und Burnstock, 1998). UTP ist zudem an der DNA-Synthese beteiligt und kommt wohl in jeder Zell-RNA vor. Jede Zelle kann Trinukleotide in den Extrazellularraum transportieren sowie P2-Rezeptoren exprimieren (Verkhatsky und Burnstock, 2014).

ATP wird in den Extrazellularraum als auto- bzw. parakrines Molekül, unter anderem als Antwort auf neuronale Stimulation, Plättchenaktivierung, Stress, mechanische Stimulation sowie durch andere Rezeptoragonisten sezerniert (Ostrom et al., 2000). Zur Rezeptoraktivierung werden zwischen 0,1 und 10 μM der Tri- und Dinukleotide benötigt (Abbraccio et al., 2006). Jedoch ist die Bestimmung der „in vivo“ extrazellulären Tri- und Dinukleotidkonzentration umstritten. Häufig wird sie bis zum 20fachen unterschätzt (Joseph et al., 2003). ATP existiert im unteren Millimolarbereich in allen Zelltypen und durch die Nettonegativladung sowie Molekülgröße können ATP und die anderen Nukleotide (UTP, ADP, UDP) die Zellmembran nur eingeschränkt passiv passieren (Gordon, 1986). Die intrazelluläre Konzentration von UTP entspricht etwa einem Zehntel der Konzentration von ATP (Lazarowski und Harden, 1999; Wihlborg et al., 2006). Die intrazelluläre Konzentration von ATP und UTP wird hauptsächlich durch Wiederverwertung von Adenosin und Uracil aufrechterhalten. Ein geringer Anteil wird durch „de novo“ Synthese gewonnen (Anderson und Parkinson, 1997). Stress oder mechanische Stimulation sorgen für einen raschen Anstieg sowie raschen Abfall der Extrazellulärkonzentration von ATP auf das basale Niveau. Dies liegt in den meisten Zelltypen bei 0,5 bis 10 nM (Lazarowski et al., 2000). Die physiologische Rolle dieser basalen Konzentration bleibt unklar. Teilweise wird eine Funktion in der Kaskade anderer Signaltransduktionen bzw. als Verstärkerprozess angenommen (Corriden und Insel, 2010).

Die Freisetzung von ATP aus exzitatorischen Zellen in Vesikeln ist die bis heute am besten verstandene Quelle von extrazellulärem ATP. Die intravesikale Konzentration kann bis zu 1.000 mM betragen (Sperlágh und Vizi, 1996). Die Freisetzung von ATP aus

nicht-exzitatorischen Zellen geschieht hauptsächlich durch Stress, Hypoxie, mechanischer Stimulation, agonistenvermittelt sowie Vesikeltransport (Literatur siehe Abbracchio et al., 2006). Eine Zellzerstörung muss bei mechanischer Stimulation oder Scherstress nicht zwingend vorliegen. Hier erfolgt eine Freisetzung von ATP durch Aktivierung verschiedener Kanäle und Transporter (ABC-Transporter, Scherstress- sowie spannungsabhängige Kanäle) (Bodin und Burnstock, 2001; Knight et al., 2002; Lazarowski et al., 2003). Vor allem der scherstressabhängige Kanal ist mit dem CFTR-Kanal assoziiert (Braunstein et al., 2001). Der Vesikeltransport kann beispielweise durch Scherstress ausgelöst werden (Knight et al., 2002). Agonisten zur ATP- Freisetzung, die hauptsächlich aus Endothelzellen erfolgt, können Bradykinin, Acetylcholin und Serotonin sein. Eine weitere Freisetzung erfolgt durch Zellzerstörung (Ostrom et al., 2000).

Der extrazelluläre Abbau von ATP und UTP erfolgt durch Ektonukleotidasen (Corriden et al., 2010). Der Effekt des extrazellulären ATP und UTP hängt von der Abbaugeschwindigkeit der Ektonukleotidasen sowie der vorhandenen Subrezeptorverteilung ab (Zimmermann et al., 2012). Die resultierenden Metabolite sind ADP, AMP, Adenosin sowie UDP, UMP und konsekutiv Uridin. Uridin kann die Zellmembran passieren und wird zur Herstellung von UTP durch Wiederverwertung (Salvage Pathway) benötigt. Die Konversion zu ADP bzw. UDP erfolgt durch die Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (CD39) oder durch Ekto-ATPasen (Giuliani et al., 2018).

1.2 Wirkung und Funktion von Trinukleotiden am Herzen

1.2.1 Funktion von ATP am Herzen

Purine als extrazelluläre Signalmoleküle wurden erstmals von Drury und Szent-Györgyi 1929 beschrieben. Gillespie gelang 1934 ein differenzierter Nachweis des Effektes von ATP gegenüber AMP im Meerschweinchenuterus. Hiermit war klar, dass es unterschiedliche Purinrezeptoren geben müsste. In den folgenden Jahrzehnten gab es vor allem Untersuchungen zum Effekt von ATP auf das kardiovaskuläre System (Ralevic und Burnstock, 1998).

ATP ist ambiphil, es hat hydrophile sowie hydrophobe Eigenschaften (Vassort, 2001). Vor allem autonome Nervenendigungen enthalten ATP als Ko-Transmitter (Burnstock, 2014). ATP hat eine koronare intraplasmale Konzentration von weniger als 1 nM (Burnstock und Pelleg, 2015). Dies ist sehr wahrscheinlich der schnellen Degradation

durch Ektonukleasen geschuldet (Giuliani et al., 2018). Die Konzentration steigt durch Hypoxie, Ischämie, mechanischen Stress und erhöhte Durchblutung. Weitere Quellen des ATP-Anstiegs können ischämische Myozyten, aktivierte Thrombozyten, Nervenendigungen, Entzündungs-, Endothel- sowie glatte Muskelzellen sein (Burnstock, 2017). Der Mechanismus mit dem ATP über die Zellgrenzen transportiert wird ist aktuell nicht vollständig verstanden (Vassort, 2001). Unter anderem ist die Anwesenheit des P-Glykoproteintransporter oder CFTR mit einer ATP-Freilassung assoziiert (Corriden et al., 2010). Der elektrochemische Gradient für den ATP-Ausstrom ist neunfach im Vergleich zum Einstrom, sodass die intra- und extrazelluläre Konzentration 10 mM bzw. 10 nM beträgt. Die Permeabilität von ATP ist aufgrund der Molekülgröße sehr gering (Vassort, 2001).

1.2.2 Funktion von UTP am Herzen

Das intrazelluläre UTP ist neben unterschiedlichen metabolischen Prozessen vor allem für die RNA-Synthese verantwortlich und neu gebildetes UTP ist für die Synthese von UDP-Zucker bzw. CDP-Phospholipid verantwortlich (Slingerland et al., 1995). Die Neubildung bzw. intrazelluläre Wiederverwendung bildet vermutlich einen gemeinsamen extrazellulären Pool an verfügbarem UTP (Anderson und Parkinson, 1997). UTP als extrazellulärer Stimulus sorgt zudem für die Ausschüttung von ATP (Ostrom et al., 2000). Die vesikulären Wiederaufnahmetransporter von ATP wirken in gleicher Weise für UTP sowie die Freisetzungsmechanismen ähneln denen von ATP (Lazarowski, 2012). Auch in Kardiomyozyten kann deutlich weniger UTP mit 1,7 µmol/g Protein im Vergleich zu ATP (27 µmol/g Protein) nachgewiesen werden (Vassort, 2001).

Extrazelluläres UTP stimuliert über Diacylglycerin (DAG) die Proteinkinase C und p38-MAPK in Kardiomyozyten, sodass UTP eine Rolle in der Präkonditionierung spielen könnte (Schulz et al., 2001). UTP-sensitive P2Y₂-Rezeptoren induzieren eine Vasodilatation via Prostaglandin-, NO- und EDHF-Freisetzung und können zur Ausschüttung von t-PA aus Endothelzellen führen (Erlinge et al., 2005).

Ein kardioprotektiver Effekt von UTP ist an der Langendorff-Apparatur bei Ischämie in vitro an Wildtyp-Mäuseherzen nachgewiesen (Wee et al., 2007). Dieser Effekt kommt vielleicht vom positiv inotropen Effekt der schon in vielen Spezies, inklusive Ratten-, Maus-, Meerschweinchenvorhof, isolierten ventrikulären Myozyten der Ratte, Maus, Huhn, papillärem Muskel vom Meerschweinchen sowie Ventrikel der Maus in vivo nachgewiesen wurde (Foldi et al., 1994, 1997, 2001; Gergs et al., 2008, 2013b;

Podrasky et al., 1997). Beim rechten Vorhof des Menschen ist der positiv inotrope Effekt ebenfalls nachgewiesen (Gergs et al., 2014).

1.3 P2-Rezeptoren

Die P2-Rezeptoren wurden erstmals von Burnstock beschrieben (Burnstock, 1976). Wobei hier schon eine Differenzierung zwischen P1-Purinozeptoren, welche vor allem durch Adenosin aktiviert werden, sowie P2-Purinozeptoren, die nach damaliger Sicht durch ATP und AMP aktiviert werden, erfolgte (Burnstock, 1978). Diese Differenzierung war durch die relative Potenz der Nukleotide sowie Rezeptorantagonisten erfolgt (Burnstock, 2010). 1996 wurde die Wirkung von extrazellulärem UTP den P2-Rezeptoren zugeschrieben sowie eine neue Nomenklatur empfohlen. Die P1-Rezeptoren sowie die P2Y-Rezeptoren agieren G-Protein-gekoppelt und die P2X-Rezeptoren als Liganden-gesteuerte Kationenkanäle (P2X) (Burnstock, 2014). ATP und seine Metabolite agieren vor allem via P2X. Hier sind sieben verschiedene Subrezeptoren (P2X₁₋₇) bekannt (Khakh et al., 2001). Auch extrazelluläres UTP ist ein Agonist an P2-Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben. UTP ist vorallem ein Agonist an P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆- Rezeptoren. Weitere Subrezeptoren sind P2Y₁ und P2Y₁₁ (von Kügelgen und Hoffmann, 2015) (Tab. 1). Die EC₅₀ von ATP bzw. UTP zur Aktivierung der Rezeptoren ist maximal 17,3 µM (Jacobsen et al., 2014).

Tabelle 1: P2Y-Rezeptornomenklatur und Pharmakologie (nach Erlinge und Burnstock, 2008; von Kügelgen, 2016)

Rezeptorsubereinheit	Rangordnung der Agonisten	Signalkaskade
P2Y ₁	ADP > ATP (partieller Agonist)	IP3 ↑
P2Y ₂	UTP = ATP	IP3 ↑
P2Y ₄	UTP (Mensch) UTP = ATP (Ratte)	IP3 ↑
P2Y ₆	UDP > UTP >> ATP	IP3 ↑
P2Y ₁₁	ATP (Mensch) ADP > ATP (Kaninchen)	IP3 ↑, cAMP ↑
P2Y ₁₂	ADP	cAMP ↓

P2Y₁ wird mehr durch ADP als durch ATP aktiviert und ATP wirkt als partieller Agonist (Waldo und Harden, 2004). Nach Aktivierung kommt es zum IP₃-Anstieg und zur Ca²⁺-Freisetzung (Abbracchio et al., 2006). Der humane sowie murine P2Y₁-Rezeptor ist auf

RNA-Ebene via Northern Blot in allen menschlichen Geweben nachgewiesen worden (Tokuyama et al., 1995; Ayyanathan et al., 1996). P2Y₁-Knock-out-Mäuse haben einen normalen Phänotyp sowie milde Veränderungen in der Blutgerinnung wurden beobachtet (Léon et al., 1999a).

Der P2Y₂-Rezeptor ist in den verschiedenen Geweben (Skelettmuskel, Herz, Hirn, Milz, Lymphozyten, Makrophagen, Knochenmark, Lunge, Leber, Magen und Pankreas) der Maus, Ratte und des Menschen nachgewiesen worden (Moore et al., 2001). Er wird gleichermaßen durch ATP und UTP aktiviert, wohingegen ADP und UDP weniger potent sind (Lustig et al., 1993; Parr et al., 1994; Lazarowski et al., 1995; Moore et al., 2002). Über G-Proteine wird die Phospholipase C aktiviert und hierüber IP₃ sowie DAG erhöht und somit die Calciumionen- und Proteinkinase C-Freisetzung aktiviert. Durch P2Y₂-Rezeptoraktivierung kommt es zur erhöhten Freisetzung bzw. Synthese von Arachidonsäure, Prostaglandinen und NO (Lustig et al., 1992; Xing et al., 1999; Buvinic et al., 2002; Welch et al., 2003). In Astrozyten der Maus wurde die Calcium-abhängige sowie -unabhängige Aktivierung der PKC sowie ERK 1/2 mit konsekutiver Aktivierung der Phospholipase A2 nachgewiesen (Xu et al., 2002). Neben ERK 1/2 kommt es auch zur Aktivierung der JNK und p38 MAPK (Gendron et al., 2003). Aufgrund einer P2Y₂-Rezeptor-Knock-out-Maus gibt es Hinweise auf eine Rolle in der Nukleotid-stimulierten Ionensekretion in pulmonalen Epithelzellen (Cressman et al., 1999).

Der P2Y₄-Rezeptor wird in erster Linie durch UTP aktiviert (Communi et al., 2005). Der P2Y₄-Rezeptor der Maus wird äquipotent von ATP und UTP aktiviert (von Kügelgen, 2016). Beim Menschen ist ATP ein Antagonist am P2Y₄-Rezeptor (Hou et al., 1999; Kennedy et al., 2000). Der Unterschied liegt wahrscheinlich in der N-terminalen Domäne sowie der extrazellulären Schleife des Rezeptors (Herold et al., 2004). Der Nachweis von P2Y₂ und P2Y₄ im fetalen Herzen wurde gezeigt, der P2Y₄-Rezeptornachweis im adulten Herzen gelang nur eingeschränkt (Horckmans et al., 2012). Der Hemmstoff „Reactive Blue 2“ blockiert den murinen P2Y₄-Rezeptor vollständig, jedoch nur teilweise den humanen Rezeptor (Bogdanov et al., 1998). Der humane Rezeptor koppelt hauptsächlich an Gq/11 und Gi/o während das Differenzieren zwischen dem P2Y₂- und P2Y₄-Mausrezeptor aufgrund von fehlenden spezifischen Antagonisten schwierig ist (Wildman et al., 2003). P2Y₄-Knock-out-Mäuse zeigen ein normales Verhalten, normales Wachstum und eine normale Vermehrung (Robaye et al., 2003). Ausführlich untersucht ist die Beteiligung des P2Y₄-Rezeptors an der intestinalen Chloridsekretion (Ghanem et al., 2005).

Der murine sowie humane P2Y₆-Rezeptor wird durch UDP aktiviert. Mit geringerer Potenz folgt dann UTP, ADP und ATP (Communi et al., 1996). Vermutlich wird hierdurch konsekutiv Gq/11 aktiviert (Nicholas et al., 1996). Ein Anstieg von cAMP ist möglich (Köttgen et al., 2003). Die Rezeptor-mRNA wurde ubiquitär detektiert und UDP kann hierüber bspw. Zellwachstum induzieren (Hou et al., 2002; von Kügelgen, 2016). Zudem wird ein kontraktiler Effekt auf die Gefäßzellen sowie eine intestinale Chloridsekretion durch P2Y₆-Aktivierung beschrieben (Malmsjö et al., 2000; Köttgen et al., 2003).

Der P2Y₁₁-Rezeptor wird durch ATP und in geringerer Affinität durch ADP aktiviert und koppelt anschließend an Phospholipase C (PLC) und Adenylatcyclase. Dies führt zum Anstieg von IP₃ und cAMP (Communi et al., 1999; Qi et al., 2001). Der cAMP-Anstieg erfolgt möglicherweise unabhängig durch Gq/11 wie auch Gs (Suh et al., 2000). Es gibt sehr wahrscheinlich kein Äquivalent in Nagetieren (Abbracchio et al., 2006). UTP ist möglicherweise ein Agonist und Suramin ein kompetitiver Antagonist (Communi et al., 1999; White et al., 2003). Die Rezeptor-mRNA wurde ubiquitär nachgewiesen. Die geringste Rezeptordichte herrscht in Leber, Knochen und Knorpel (Moore et al., 2001). Zudem wurde an diesem Rezeptor eine unterschiedliche Signalkaskade durch differente Agonisten nachgewiesen (White et al., 2003).

ADP ist der physiologische Agonist am P2Y₁₂-Rezeptor, der wohl über Gi-Proteine die Aktivität der Adenylatcyclase hemmt (Zhang et al., 2001). Der Rezeptor wird in Megakaryozyten, Thrombozyten sowie neuronalem Gewebe exprimiert (Abbracchio et al., 2006). ATP kann ebenfalls als Antagonist am P2Y₁₂-Rezeptor von humanen und murinen Thrombozyten wirken sowie die aktivierende Wirkung von ADP aufheben (Kauffenstein et al., 2004). Dieser Mechanismus wird aktuell noch diskutiert und ist möglicherweise zelltypabhängig (Abbracchio et al., 2006). P2Y₁₂-Knock-out-Mäuse haben dementsprechend eine verlängerte Blutungszeit, fehlende Thrombozytenaggregation sowie eine geringere Rate an arteriellen Thrombosen (Conley und Delaney, 2003).

1.4 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) kommen wohl in allen eukaryontischen Zellen vor (Errede und Levin, 1993; Roux und Blenis, 2004). Extrazelluläre Stimuli aktivieren drei Ebenen der MAPK, eine MAPK Kinase Kinase, diese wiederum aktiviert eine MAPK Kinase sowie abschließend eine MAPK (Abb. 1). Daraus ergibt sich z.B. eine Induktion und Regulation des Zellzykluses (Roux und Blenis, 2004). Die 12 gegenwärtig

bekannten MAPK werden in drei Familien eingeteilt: Die ERK-Familie, die p38-Kinase-Familie sowie die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)-Familie. Das Herzgewebe verschiedener Spezies (Ratte, Maus, Mensch, u. a.) exprimiert alle bekannten MAPK-Familien (Michel et al., 2001). Die MAPK-Aktivität hängt von der dualen Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung ab, während die Inaktivierung über 11 verschiedene MAPK-Phosphatasen (Liu und Molkentin, 2016) abläuft. Die Mehrzahl der Substrate die mittels MAPK aktiviert werden sind Transkriptionsfaktoren (Widmann et al. 1999). Deren Aktivierung geschieht mittels Phosphorylierung entweder direkt im Zellkern oder im Zytoplasma gefolgt von einer Translokation in den Zellkern. Die Substrate der JNK-Familie befinden sich teilweise im Zellkern (Bogoyevitch und Kobe, 2006).

Erstmals 1980 entdeckt, ist der ERK-Signalweg einer der am meisten untersuchten Signalwege. ERK1 und ERK2 sind zu 83 % identisch (Chen et al., 2001). Es besteht keine vollständige funktionelle Redundanz. ERK1/2 wird ubiquitär exprimiert und hat auf Zellebene verschiedene Funktionen. Zellzyklusproliferation, Zytogenese, Transkription und Differenzierung sind nur einige Beispiele. Auch in den pathologischen Abläufen kardiovaskulärer Erkrankungen spielt diese Kinase wohl eine Rolle. Der Effekt erfolgt über Phosphorylierung mindestens 100 möglicher Substrate (Rose et al., 2010). Aktiviert wird die ERK 1/2 durch die Phosphorylierung der MAPK-Kinase MEK 1/2 (Roux und Blenis, 2004).

Zehn Jahre nach der Entdeckung von ERK, wurde die JNK als weitere Subfamilie der MAPK entdeckt. Die drei Subeinheiten werden durch separate Gene kodiert und können aus etwa zehn verschiedenen Proteineinheiten mit 80 % Homologie bestehen. Sie kommen ubiquitär vor und spielen vor allem in der Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Zellmobilität und -metabolismus eine Rolle. Der JNK- Signalweg wird durch Wärme, Hyperosmolarität, Ischämie, UV-Strahlung und G- Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Sehr unterschiedliche zytosolische sowie nukleäre genomische sowie nicht-genomische Substrate werden durch die JNK aktiviert (Rose et al., 2010).

Ebenfalls 1990 wurde p38 als weitere Subfamilie der MAPK identifiziert. p38 gibt es in vier Isoformen (α , β , γ , δ) und sie kommt ebenfalls ubiquitär vor. Die Isoformen und ihre Substrate sind zu 60 % homolog. Unklar ist, welche Substrate durch welche Isoform phosphoryliert werden (Rose et al., 2010). Wie andere MAP-Kinasen spielt p38 eine Rolle in der Immunantwort sowie in der Zellproliferation und -differenzierung. Die aktivierenden Mechanismen sind der JNK sehr ähnlich. Bisher sind mindestens 60 verschiedene extrazelluläre Stimuli zur Aktivierung der p38- Kinase bekannt (Ono und

Han, 2000). p38 hat ebenfalls zytosolische sowie nukleäre Funktionen und die Substrate beinhalten Transkriptionsfaktoren, nukleäre sowie zytosolische Proteine (Rose et al., 2010). Die p38-MAPK scheint auch eine Rolle bei der Herzinsuffizienz zu spielen (See et al., 2004, Wenzel et al., 2005). Die Phosphorylierung der p38-MAPK-Isoformen erfolgt durch die MAPK-Kinasen MEK 3/6 (Roux und Blenis, 2004).

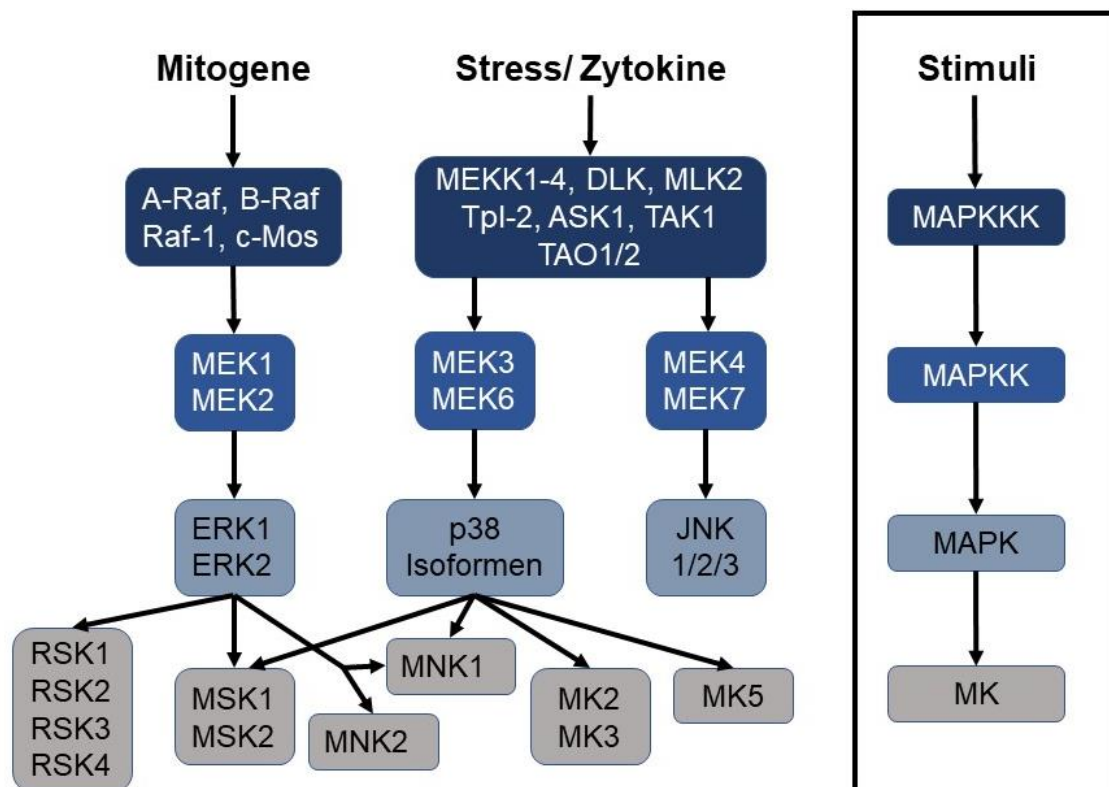


Abb. 1: Signalkaskade MAPK-aktivierter Proteinkinasen (MK). ERK 1/2 und p38 wird durch Mitogene und Zellstress ausgelöst und dies führt konsekutiv zur Aktivierung der MKs (modifiziert nach Roux und Blenis, 2004 und Rose et al., 2010).

1.5 Therapeutischer Nutzen der P2Y- bzw. P2X-Rezeptoren

Aktuell wird hauptsächlich die Verteilung der P2Y₁- bzw. P2Y₁₂-Rezeptoren auf Thrombozyten zur Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Ereignissen genutzt. Verwendet werden hier die irreversiblen P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten Ticlopidin, Clopidogrel (Savi und Herbert, 2005) und Prasugrel (Niitsu et al., 2005). Ticagrelor hingegen ist ein nicht-kompetitiver reversibler P2Y₁₂-Rezeptorantagonist (Savi und Herbert, 2005).

P2Y₂-, P2Y₆- und P2Y₁₁-Rezeptorantagonisten können eine Rolle in der antihypertensiven sowie Herzinsuffizienztherapie spielen (Hou et al., 1999; Balogh et al., 2005). Zudem wurde beispielsweise eine Veränderung in der Expression des P2Y₆-

Rezeptors auf T-Zellen bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung gefunden (Wang et al., 2004). Ein P2Y-Rezeptorantagonismus kann neuroprotektiv wirken (Zona et al., 2000). Untersuchungen mit Applikation von UTP bzw. UDP in Mausschmerzmodellen hat zur Reduktion des Schmerzes geführt (Okada et al., 2002). Die inhalative Verabreichung von ATP und UTP soll zur Sekretolyse in akuten und chronischen Lungenprozessen führen. Teilweise ist die Surfactantsekretion P2-Rezeptor-vermittelt (Abbracchio et al., 2006).

2. Fragestellung

Anhand von Zellkulturen und Western Blot-Analysen sollte eine zeit- und konzentrationsabhängige Signalkaskade durch Einsatz von ATP und UTP in Maus-, Ratten- sowie menschlichen Kardiomyozyten untersucht werden.

Um die Signalkaskade von ATP und UTP besser zu charakterisieren, wurde mittels Antikörpern für verschiedene MAP-Kinasen die Zellkulturen nach Behandlung mit den Purin- und Pyrimidinrezeptoragonisten sowie zusätzlichen Rezeptorantagonisten sowie Hemmstoffen der Signalkaskade behandelt. Vergleichend wurde dies für Maus- sowie humane Kardiomyozyten geprüft. Ein Ziel war die zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAP-Kinasen mittels Antikörpern nachzuweisen. Durch Einsatz der Rezeptorantagonisten sowie Hemmstoffen der Signalkaskade sollte der spezifische Rezeptoragonismus an Kardiomyozyten untersucht werden. Unterstützend erfolgten Kontraktionsversuche an Wildtyp- bzw. Knock-out-Mausvorhöfen bzw. an menschlichen Vorhöfen und Mausvorhöfen mit spezifischen Rezeptorantagonisten.

Die wichtigste Frage, die im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand, war die nach der Subrezeptoraktivierung durch UTP in Mauskardiomyozyten sowie die Aktivierung der MAPK durch ATP und UTP in humanen Kardiomyozyten. Grundlage ist das aktuelle Wissen über den Rezeptoragonismus von ATP und UTP an anderen Zelltypen. Neue Erkenntnisse könnten dazu beitragen, die physiologische und pathophysiologische Rolle von UTP im Herzen besser zu verstehen, um dies perspektivisch bei der Herzinsuffizienztherapie oder Myokardinfarktbehandlung zu nutzen.

3. Material und Methoden

3.1 Zellisolation neonataler Rattenkardiomyozyten

Die Versorgung und Handhabung der Tiere entsprach der Leitlinie für Pflege und Gebrauch von Labortieren des US Nationalen Institutes für Gesundheit (2011) sowie bestätigten Protokollen der Tierschutzabteilung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Zellisolation der neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte nach den Anleitungen des Worthington Zellisolationssystems (Worthington Neonatal Cardiomyocyte Isolation System) und wurde bereits beschrieben (Gergs et al., 2007). Im Folgenden eine kurze Beschreibung der Zellisolation. Zur Untersuchung der Kardiomyozyten, von ein bis drei Tage alten Rattenherzen, erfolgte die Entnahme der Herzen der getöteten Tiere nach Dekapitation. Durch Sternumöffnung konnte das Herz entnommen und in eine Schale mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gelegt werden, um das Gewebe weiterhin mit notwendigen Ionen zu versorgen. In der Schale wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel in eine neue Schale mit HBSS überführt. Im Anschluss wurden die Ventrikel bei ca. 4 °C in acht etwa gleich große Teile zerschnitten und in 2 ml Trypsinlösung (0,1 %) je Herz zur Proteolyse für 16 Stunden bei 4 °C inkubiert, um den Gewebeverband weiter aufzulösen. Am Folgetag wurden die Herzen mittels Pipette ohne Trypsinlösung aufgesogen und in einen Kolben mit Medium 199, 10 % Newborn calf serum (NCS) und 1 % Penicillin – Streptomycin (Pen/Strep) gegeben und 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das zusätzlich verabreichte Serum enthält Wachstumsfaktoren. Anschließend wurden die Zellen durch ein Sieb mit 70 µm Maschenweite in ein steriles Röhrchen überführt, um unverdaute Gewebereste zu entfernen und in einer Zellkulturflasche für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde können die noch in Suspension vorliegenden Kardiomyozyten abgenommen und weiter verarbeitet werden. Im Folgenden wurden die Zellen mit 10 µl/ml Demecolcine (Mitose-Hemmstoff) versetzt und in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt, sodass pro 3,5 cm-Kulturschale circa 10⁶ Zellen ausgebracht werden konnten. Die Zellen wurden dann in Medium 199 mit 10 % NCS und 1 % Pen/Strep für zwei Tage kultiviert. Weitere Verwendungen sind dann in den Kapiteln 3.5, 3.6, 3.7 und 3.8 beschrieben.

3.2 Zellisolation adulter Mauskardiomyozyten

Die ventrikulären Myozyten wurden von adulten Mausherzen nach einem bereits publizierten Protokoll isoliert (Kirchhefer et al. 2001). Nachfolgend eine kurze Beschreibung des Ablaufs. Den mit 50-75 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal

narkotisierten Mäusen wurde der Brustkorb geöffnet und das Herz entnommen. Zunächst wurde die Aorta auf eine Kanüle gefädelt und mit 10 ml Tyrode bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurde das Herz an der Pumpvorrichtung unterhalb des Wärmeaustauschers, der alle Lösungen für die Perfusion auf 37 °C erwärmte, angebracht. Zuerst wurde vier Minuten mit Tyrode gespült. Um das Gewebe von Calciumionen zu befreien, folgten nun 10 Minuten Perfusion mit Ca^{2+} -freier Tyrode. Nun konnte das Gewebe mittels Enzymlösung verdaut werden, um die einzelnen Kardiomyozyten zu isolieren, der Verdau erfolgte über 8-10 Minuten in Abhängigkeit der Herzgröße. Zum Beenden der Enzymaktivität wurde die Enzymlösung mit Tyrode 10 Minuten lang ausgespült. Anschließend wurden die Vorhöfe abgeschnitten, das Herz von der Pumpe abgenommen und in Tyrode bei Raumtemperatur überführt. Zur Gewinnung der Myozyten wurde das Gewebe vorsichtig mechanisch zerkleinert und in einem frischen Gefäß mit Tyrode mindestens eine Minute lang ausgeschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch ein Sieb mit 70 µm Maschenweite in ein steriles Röhrchen überführt und danach konnten sich die Kardiomyozyten mindestens eine Stunde von der Isolationsprozedur erholen, bevor sich die verschiedenen Experimente anschlossen. Alle Lösungen zur Perfusion wurden sterilfiltriert. Tyrode, die zur Perfusion bei 37 °C bestimmt war, wurde bei Raumtemperatur auf pH 7,6 und alle bei Raumtemperatur verwendeten Lösungen auf pH 7,4 eingestellt. Weitere Verwendungen sind dann in den Kapiteln 3.5, 3.6, 3.7 und 3.8 beschrieben.

3.3 Knock-out-Mäuse

Die untersuchten P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Knock-out-Mäuse sind bereits beschrieben (Homolya et al., 1999; Robaye et al., 2003; Bar et al., 2008). Bei den P2Y₂-Knock-out-Mäusen wurden nur weibliche Mäuse untersucht. Bei den P2Y₄- sowie P2Y₆-Knock-out-Mäusen wurden nur männliche Mäuse untersucht. Die Mäuse waren jeweils ca. 6 Monate alt. Um experimentelle Fehler zu minimieren, wurden die Knock-out- sowie Wildtypmäuse am selben Tag parallel untersucht.

3.4 Untersuchung humaner Gewebeproben

Die Herzmuskelpräparate wurden, wie bereits beschrieben, intraoperativ während arteriokoronarer Bypassoperationen gewonnen (Gergs et al., 2008). Eine kurze detaillierte Beschreibung dieser Methodik im Folgenden. Direkt postoperativ wurden die Vorhofpräparate in vorgekühlte (4 °C) Tyrode überführt. Die Muskelstücken wurden anschließend in kleine Proben zu etwa 20 mg Feuchtgewicht je Probe geschnitten und in separate Probengefäße mit Tyrode überführt. Bei 37 °C wurden die Gewebeproben

dann für fünf Minuten nur mit Tyrode (Kontrolle) oder jeweils zusätzlich 100 μM UTP oder 100 μM ATP inkubiert. Die Präparate wurden dann aus dem Röhrchen genommen, kurz abgetupft und mittels flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der Homogenisation wurde den Proben 100 μl Homogenisationspuffer hinzugefügt. Dann wurden die Proben, wie in Kapitel 3.8 beschrieben, homogenisiert und weiterverwendet. Die Deklaration von Helsinki wurde eingehalten und es gab ein positives Votum des Ethikkomitee (hm-bü 04.08.2005). Alle Patienten gaben eine Einverständniserklärung ab.

3.5 Untersuchung von Proben zur Zeitabhängigkeit der ATP/UTP-Wirkung

Die Zellen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur (20 °C) vorinkubiert und lagen in 1 ml Medium 199 in Form einer Suspensionskultur (adulte Kardiomyozyten) oder als adhärenente Zellen (neonatale Kardiomyozyten) vor. Auf die Zellkulturen, die sich jeweils auf Schalen oder in Probenröhrchen befanden, wurde eine ATP- oder UTP-Stammlösung (100 μM) bei 20 °C gegeben und geschwenkt. Nach 1, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten wurden die Reaktionen gestoppt. Dazu wurden die Suspensions-Zellkulturen eine Minute bei Raumtemperatur mit 4.000 U/min in einer Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellmaterial wurde mit 100 μl Lysispuffer durch auf- und abpipettieren bei Raumtemperatur aufgelöst. Parallel verblieb zu jeder Versuchsreihe eine Suspensionskultur als Kontrolle unbehandelt. Bei adhärenenten Zellkulturen wurde das Medium zu den entsprechenden Zeitpunkten abgegossen, die Zellen mit kalter (4 °C) physiologischer NaCl-Lösung kurz gewaschen und abschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl Lysispuffer bei Raumtemperatur pro 3,5 cm-Schale. Diese Lösungen wurde im Anschluss homogenisiert (siehe Kapitel 3.8).

3.6 Untersuchung von Proben zur Konzentrationsabhängigkeit der ATP/UTP-Wirkung

Die Zellen wurden wie oben eine Stunde vorinkubiert und lagen in 1 ml Medium 199 vor. Auf die Zellkulturen, die als adhärenente Zellen in Schälchen bzw. als Suspensionskultur in Probenröhrchen vorlagen, wurde ATP oder UTP in 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM oder 100 μM in Form einer Verdünnungsreihe, ausgehend von einer ATP beziehungsweise UTP Stammlösung (100 μM), gegeben und wie in den Abbildungen beschrieben bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollen blieben jeweils in 1 ml Medium 199 unbehandelt. Diese Lösungen wurden im Anschluss homogenisiert (siehe Kapitel 3.8).

3.7 Untersuchung von Proben mit Rezeptorantagonisten oder Hemmstoffen der Signalkaskade

Die isolierten adulten Mauskardiomyozyten lagen als Suspensionskultur in Probenröhrchen mit 1 ml Medium 199 vor, die neonatalen Rattenkardiomyozyten als adhärenzte Zellen in 3,5 cm Schälchen. Zuvor verlief die Isolation wie in Kapitel 3.1 und 3.2 beschrieben. Die Zellkulturen wurden aus dem Inkubator genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Im Anschluss wurde den Probenröhrchen/Schalen die A₁- bzw. P₂- Rezeptorantagonisten DPCPX, PPADS, Reactive blue 2 und Suramin hinzugefügt und für 20 Minuten inkubiert bzw. die Hemmstoffe SQ22563, U73122 und U0126 hinzugefügt und für eine Stunde inkubiert. Dann wurde entweder 100 µM ATP oder UTP als Stammlösung dazugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es blieben jeweils 1-2 Proben ohne Zugabe von Hemmstoffen der Signalkaskade, Rezeptorantagonisten oder Nukleosidtriphosphaten in Medium 199 als Kontrolle bzw. Proben ohne Zugabe von Nukleosidtriphosphaten. Das verbliebene Zellmaterial wurde auf Eis gekühlt und anschließend homogenisiert (siehe Kapitel 3.8).

3.7.1 DPCPX

DPCPX ist ein seit Ende der 1980er synthetisierter selektiver A₁-Adenosinrezeptorantagonist und steht für 1,3-Dipropyl-8-Cyclopentylxanthin (Martinson et al., 1987; Lohse et al., 1987) (Abb. 2A). Der Einsatz von DPCPX diente als Negativkontrolle, da die P₂-Rezeptoren nicht von dem Wirkstoff inhibiert werden sollten (Huxtable et al., 2009). Außerdem konnte somit gezeigt werden, dass nicht etwa Abbauprodukte von UTP oder ATP (z. B. Adenosin) für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Für die Versuche kam eine 100 µM Stammlösung des Wirkstoffes zum Einsatz, die Endkonzentration betrug 1 µM.

3.7.2 PPADS

Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS) ist eine unselektiver P₂X- und P₂Y-Rezeptorantagonist mit einer diffizilen Subrezeptoraffinität (Abb. 2B). PPADS ist vor allem ein potenter Inhibitor am P₂Y₁-, eine schwächere Inhibition erfolgt am P₂Y_{4,6,13}-Rezeptor und keine Inhibition am P₂Y_{2,11,12}-Rezeptor (von Kügelgen, 2006). Bei den P₂X-Rezeptoren erfolgt am P₂X_{1,2,3,5}- eine potente, eine schwächere Inhibition erfolgt am P₂X_{4,6,7}-Rezeptor bzw. keine Inhibition erfolgt am P₂X_{4,6,7}-Rezeptor (Khakh et al., 2001). Für die durchgeführten Stimulationsversuche wurde eine 5 mM Stocklösung des Wirkstoffes PPADS verwendet, die Endkonzentration betrug 50 µM.

3.7.3 Reactive blue 2

Zu den nicht-selektiven P2X- bzw. P2Y-Rezeptor-Antagonisten zählend ist Reactive Blue 2 (RB2) ein histochemischer Farbstoff mit einer hohen Affinität zu ATP-Bindungsstellen (Abbraccio et al., 2006) (Abb. 2C). Die Inhibierung von humanen P2Y-Rezeptoren durch RB2 ist am P2Y_{1,6}-Rezeptor potenter als am P2Y_{4,11,12,13}-Rezeptor (von Kügelgen, 2006). Wohingegen am P2Y₂-Rezeptor eine schwache inhibitorische Aktivität bzw. antagonistische Wirkung beschrieben wird (Widmann et al., 2003; Hillmann et al., 2009). Eine ähnliche Reihenfolge der Potenz existiert auch für die Inhibierung der P2X-Rezeptoren. Der P2X₂-Rezeptor wird durch RB2 effektiver (IC₅₀ = 0,36 Mmol/l) als der P2X₄-Rezeptor inhibiert (Khakh et al., 2001). Für die Versuche wurde eine 10 mM Stammlösung verwendet, die Endkonzentration betrug jeweils 500 µM.

3.7.4 Suramin

Suramin ist ein polysulfonierter Naphthylharnstoffderivat und weist eine komplexe Strukturformel auf (Abb. 2D). Aufgrund der endständigen Aminonaphthyltrisulfonsäuren ist es gut wasserlöslich und wird als weißes bzw. blassrosa-farbenes Natriumsalz verwendet. In Bezug auf die Wirkung auf P2-Rezeptoren handelt es sich bei Suramin um einen nichtselektiven, nicht-kompetitiven P2-Rezeptor-Antagonisten, der zur Identifizierung von verschiedenen Rezeptor-Typen verwendet wird (Ralevic und Burnstock, 1998). Für die Inhibierung der P2Y-Rezeptoren, insbesondere die Blockierung des G-Proteins sind Suramin-Konzentrationen im mikromolaren Bereich (30 – 100 µM) notwendig, sodass alle Nukleotid-sensitiven P2Y-Rezeptoren, bis auf den P2Y₄-Rezeptor, blockiert werden (von Kügelgen et al., 2006). Für die Sensitivität von Suramin innerhalb der Familie der P2Y-Rezeptoren ergibt sich demnach die folgende Rangordnung: P2Y₁ > P2Y₂ > P2Y₄ (von Kügelgen et al., 2016). Im Bereich der P2X-Rezeptoren inhibiert Suramin u. a. die homomeren P2X₁-, P2X₂-, P2X₃- und P2X₅-Rezeptoren (Khakh et al., 2001). Suramin inhibiert jedoch auch die Ektonukleasen (Abbraccio et al., 2006). Für die durchgeführten Stimulationsversuche wurde eine 50 mM Stammlösung des Wirkstoffes verwendet, die Endkonzentration betrug 500 µM.

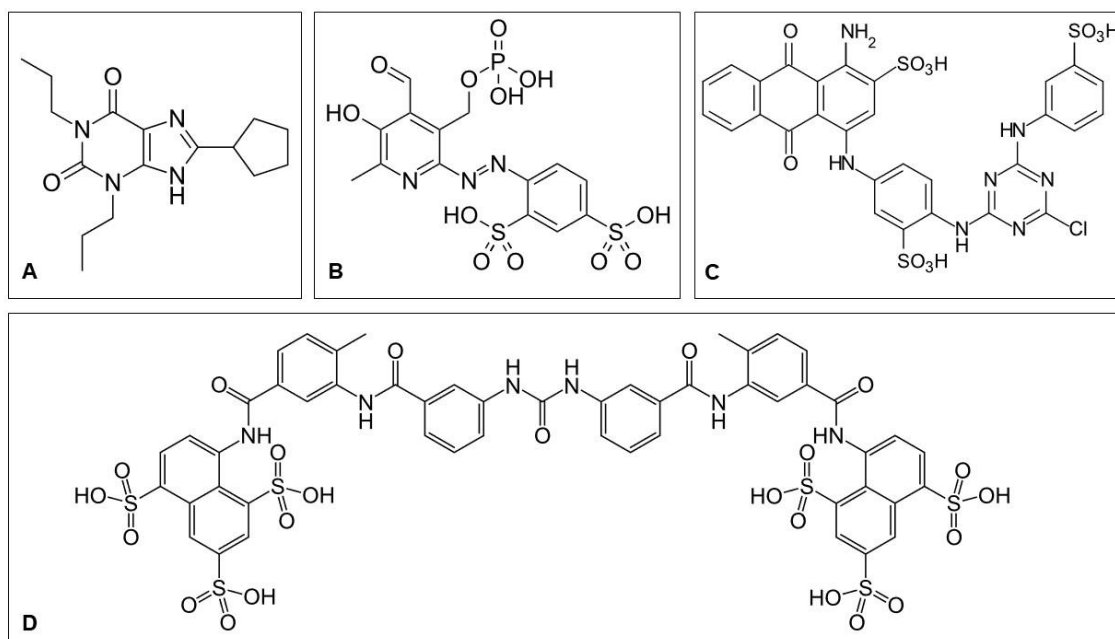


Abb. 2: Strukturformeln von DPCPX (A), PPADS (B), RB2 (C) und Suramin (D)

3.7.5 SQ22536

Der Wirkstoff SQ22536 ist ein Hemmstoff der Adenylatcyclaseaktivität mit einem IC_{50} -Wert von 1,4 μM . Aus chemischer Sicht handelt es sich bei SQ22536 um die Verbindung 9-[Tetrahydro-2-furanyl]-9H-purin-6-amin (Abb. 3A). Für die Versuche wurde eine 10 mM SQ22536-Stocklösung in DMSO hergestellt. Die Endkonzentration betrug 10 μM .

3.7.6 U73122

U73122 ist ein Phosphoinositid-Phospholipase C- Hemmstoff (Bleasdale et al., 1989; Bleasdale et al., 1990). Die Abkürzung U73122 steht hierbei für (1-(6-((17 β -3-Methoxyestra-1, 3, 5 (10)-trein-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dion (Abb. 3C). Der Wirkstoff inhibiert über die Blockierung der PLC die Hydrolyse von Phosphatidylinositol zu IP_3 , was zu einem Abfall des frei im Cytosol vorkommenden Ca^{2+} führt (Wihlborg et al., 2006). Zusätzlich bewirkt er die Hemmung der PLC-Aktivierung, die aus der Kopplung an G-Proteine resultiert (MacMillan et al., 2010). Für die Versuche wurde die Endkonzentration von 10 μM des Hemmstoffes in DMSO verwendet.

3.7.7 U0126

U0126 ist ein funktioneller AP-1 Transkriptionsfaktorinhibitor via nicht-kompetitiver Hemmung der MEKinase mit einer IC_{50} von 0,07 μM für MEK 1 und 0,06 μM für MEK 2 (Duncia et al., 1998) (Abb. 3B). Die MEK 1/2-Inhibition ist selektiv (Favata et al., 1998).

MEK phosphoryliert die Threonin- und Tyrosinreste an ERK 1/2 und aktiviert diese damit (Michel et al., 2001). Über Elk-1 werden die cFos- und cJUN-Gene aktiviert und wiederum AP-1 aktiviert. Die Abbauprodukte von U0126 sind nur noch im geringen Maß antagonistisch wirksam (Duncia et al., 1998). Für die Stimulationsversuche wurde eine 5 mM Stammlösung (in DMSO) eingesetzt, die Endkonzentration betrug 10 μ M.

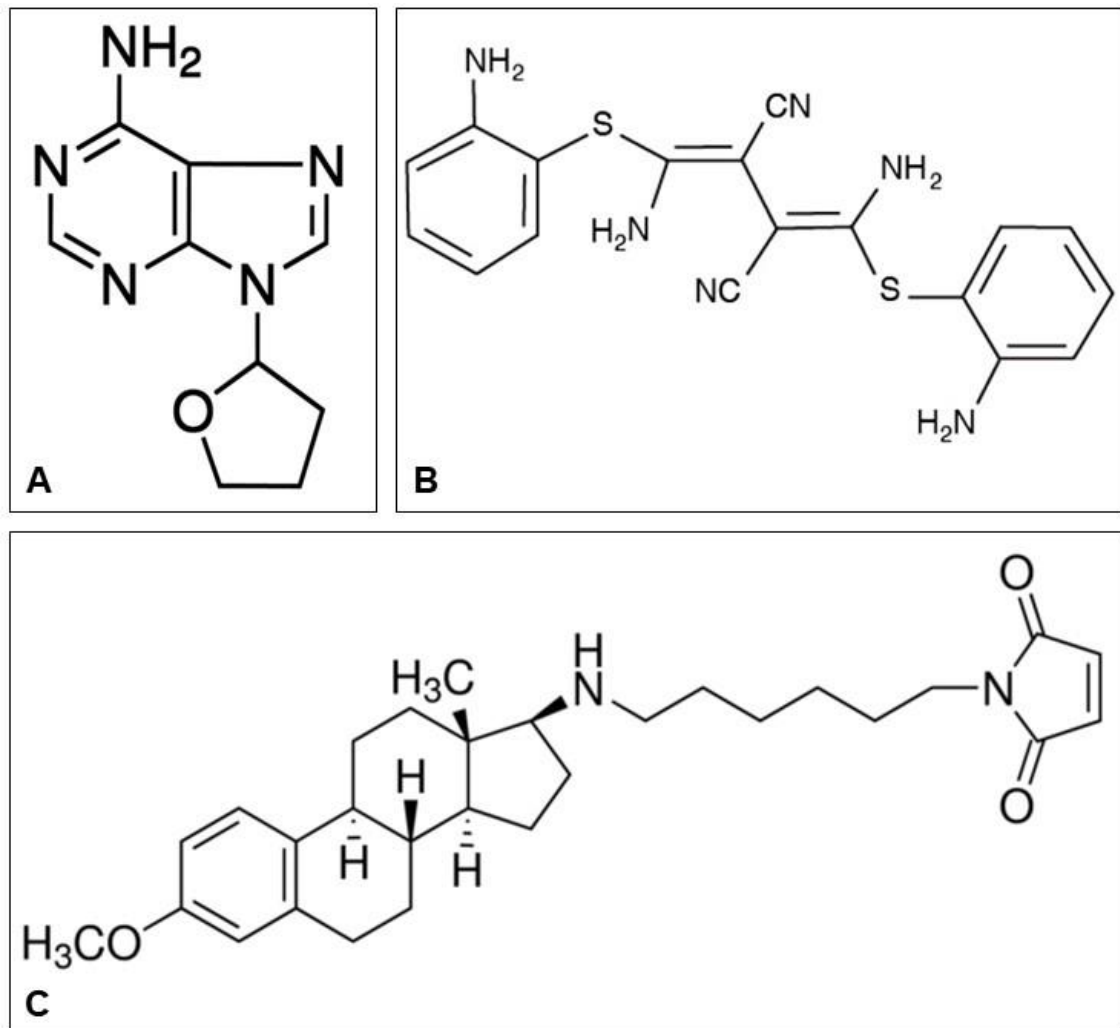


Abb. 3: Strukturformeln von SQ-22563 (A), U0126 (B) und U73122 (C)

3.8 Untersuchung von Homogenaten zur Western Blot Analyse

Die hergestellten Zell- und Gewebeproben wurden jeweils vor der SDS-PAGE mit einem Ultraschallhomogenisator dreimal 30 Sekunden bei 75% Leistung auf Eis homogenisiert. Anschließend inkubierten die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden sie 30 Minuten bei 4°C bei 14.000 U/min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (Homogenat genannt) wurde in ein neues Probenröhrchen überführt und der Proteingehalt mit dem Verfahren nach Lowry (Lowry et al., 1951) am Photometer bei

einer Extinktion von 595 nm bestimmt. Die Western Blot Analyse wurde wie bereits beschreiben durchgeführt (Gergs et al., 2007).

3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter den denaturierenden Bedingungen der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli, 1970). Es wurden 10 %ige Trenngele (Porzio und Pearson, 1977) und 4 %ige Sammelgele verwendet. Erst erfolgte die Herstellung des Trenngels. Um einen glatten oberen Rand zu erhalten und das Austrocknen des Trenngels zu verhindern, wurde dieses nach dem Gießen mit Propanol überschichtet und die anschließende Polymerisation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde das 4 %ige Sammelgel auf das zuvor mit bidestilliertem Wasser gereinigte Trenngel gegossen. Es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur. Es wurde je Spur 50 µl von den zu analysierenden Proben mit 50 µl zweifach Probenpuffer nach Lämmli (siehe Anhang) im Verhältnis 1:1 hergestellt und mittels Pipette auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Auf jedes Gel wurde ebenfalls ein Protein-Größenmarker (Tab. 3) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 40 mA bei 4 °C über vier Stunden in einer vertikalen Elektrophoresekammer in Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Farbfront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Der Transfer der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte stromkonstant mittels Western Blot im Transferpuffer bei 4,5 Ah bei 4 °C in einer Transferkammer. Als Transferkontrolle diente jeweils eine reversible Ponceaurot-Färbung.

3.9 Immunologische Identifizierung von Proteinen

Zur Detektion der MAPK-Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden monoklonale Antikörper gegen p38 und ERK 1/2 in Blockierungspuffer eingesetzt. Kardiales Calsequestrin wurde als Beladungskontrolle auf einem anderem Membranabschnitt jeweils derselben Membran bestimmt. Die Nitrocellulosemembran wurde im Bereich von 30 - 49 kDa bzw. 50 - 60 kDa ausgeschnitten (Tab. 2). Dies war durch den Protein-Größenmarker möglich, welcher Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielt. Nach dem Zuschnitt wurden die entsprechenden Membranen zum Abwaschen der Ponceau-Lösung dreimal 10 Minuten in TBST-Lösung bei Raumtemperatur gespült. Anschließend wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer zur Besetzung von unspezifischen Bindungsstellen inkubiert. Wurde diese Membran auf Phospho-38- und Phospho-ERK 1/2-MAPK-Phosphorylierung untersucht, dann geschah dies mit 5 % BSA in TBST-Puffer und beim Calsequestrin

(CSQ) wurde die Membran mit 5 % Milchkpulver in TBST-Puffer geblockt. CSQ diene als Beladungskontrolle für jede Probe. Dies geschah, da bekannt ist, dass die kardiale Proteinexpression von CSQ konstant und unabhängig von Erkrankungen sein soll (Münch et al., 1998). So wurden die Signalintensitäten von p38 und ERK 1/2 auch durch den CSQ-Wert der entsprechenden Probe dividiert und analysiert. Anschließend wurde der Blockierungspuffer abgeschüttet und die Membranstreifen über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden dazu in dem entsprechenden Blockierungspuffer verdünnt. Am Folgetag wurden die Antikörperlösungen mittels Pipette abgenommen. Anschließend wurde die Membran, wieder bei Raumtemperatur, dreimal mit TBST-Puffer je 10 Minuten gespült. Die folgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper geschah unabhängig vom Primärantikörper über zwei Stunden mit 5 % Milchkpulver in TBST-Puffer und dem passenden 2. Antikörper. Anschließend wurde die Membran erneut mit TBST dreimal 10 Minuten gespült und zweimal mit AP-Puffer für zwei Minuten äquilibriert. Zur quantitativen Auswertung wurden die Blots mit dem Fluoreszenz-Substrat ECF für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert und die Signale im Multimode Imager ausgelesen. Die Detektion des Fluoreszenz-Substrats erfolgt im Fluoreszenz-Modus (Emission Filter: 526 SP Fluorescein, Cy2, AlexaFluor488; PMT: 600 (V); Laser: Green (532); Sensitivity: Normal).

3.10 Kontraktionskraftmessungen an isolierten Herzvorhöfen

Die Kontraktionskraftmessungen wurden an elektrisch gereizten linken Vorhöfen sowie an spontan schlagenden rechten Vorhöfen von P2Y₂-, P2Y₄- sowie P2Y₆-Knock-out- und Wildtyp (WT)-Mäusen sowie an elektrisch gereizten Trabekel aus der rechten Vorhofwand des Menschen, wie bereits beschrieben, durchgeführt (Böhm et al., 1986, Gergs et al., 2013a). Eine kurze Beschreibung im Folgenden. Vor jedem Versuch wurde das Organbad neu hergestellt und es enthielt 119,8 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1,05 mM MgCl₂, 0,42 NaH₂PO₄, 22,6 mM NaHCO₃, 0,05 mM Na₂EDTA, 0,28 mM Ascorbinsäure und 5,05 mM Glukose. Die Lösung wurde kontinuierlich mit 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid begast sowie konstant mit 37°C temperiert und ein pH von 7,4 eingestellt. Die atrialen Präparationen wurden in 10 ml großen, beheizbaren Organbäder an zwei starren Metalldrähten in einer Tyrode-Lösung aufgehangen. Durch einen Kraftmesser wurde die Kontraktionskraft über einen Verstärker auf einen Schreiber weitergeleitet. In jedem Glasgefäß befanden sich zwei Reizelektroden, zwischen denen die Vorhöfe platziert wurden. Die linken Vorhöfe der Maus sowie die Trabekel aus dem menschlichen Vorhof wurden mit 1 Hz und einer Pulsdauer von 5 ms elektrisch stimuliert. Die Spannung lag etwa 10 % über der Reizschwelle. Die rechten

Vorhöfe mussten nicht gereizt werden und schlugen mit Sinusknotenfrequenz. Die Kalibrierung ermöglichte die Einstellung der Zugspannung auf die Vorhöfe und die Kontrolle dieser anhand des Schreiberausschlages. Die Zugspannung wurde auf die maximale Kontraktionskraft eingestellt. Nach etwa 30 Minuten Adaptationszeit und dreimaligem Spülen der Vorhöfe mit frischer Tyrode-Lösung begannen die Versuche mit Applikation von ATP oder UTP allein für 10 Minuten bzw. bei Einsatz der Rezeptorantagonisten (siehe auch 3.10.1 und 3.10.2) für 30 Minuten präinkubiert. Die Messung der Kontraktionskraft aller Präparate erfolgte mittels Standardprozeduren.

3.10.1 AR-C118925

AR-C118925 ist ein kompetitiver P2Y₂-Rezeptorantagonist und er wurde durch chemische Modifikation von UTP entwickelt (Meghani, 2002). Mit Ausnahme des P2X₁- und P2X₃-Rezeptor besteht eine 50fache Selektivität für die Inhibition von P2Y₂-Rezeptor gegenüber den anderen P2Y-Rezeptoren. Hierfür war eine Konzentration von 1 µM notwendig. Die Stammlösung muss einen pH von 7,4 haben. Die Substanz ist metabolisch sehr stabil und peroral nur einschränkt verfügbar (Rafehi et al., 2017a).

3.10.2 PSB-1454

PSB-1454 ist ein selektiver P2Y₄-Rezeptorantagonist und RB2-assoziiertes Atrachinonabkömmling mit einem IC₅₀ von 0,746 µM und 20fach selektiver gegenüber dem menschlichen P2Y₂-Rezeptor (Rafehi et al., 2017b).

3.11 Auswertung

Die entstandenen Bilder wurden mittels der Software ImageQuant TL analysiert und die Intensität der entsprechenden Proteinbanden quantifiziert. Die Calsequestrinsignale dienten als Beladungskontrolle und die p38- und ERK 1/2-Signale wurden auf die jeweilige Calsequestrinbande bezogen. Im Fall der Messungen an den Herzvorhöfen wurde jeweils die Kontraktionskraft in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Ausgangssituation bzw. in mN angegeben. Alle aufgeführten Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Die Werte wurden je nach Protokoll des Versuchs durch einen ein- oder zweiseitigen, ungepaarten t-Test sowie ANOVA mit Bonferroni-Korrektur als Post-hoc Test ermittelt, ein signifikanter Unterschied wurde angenommen wenn ein p-Wert kleiner als 5 % war („p < 0,05“).

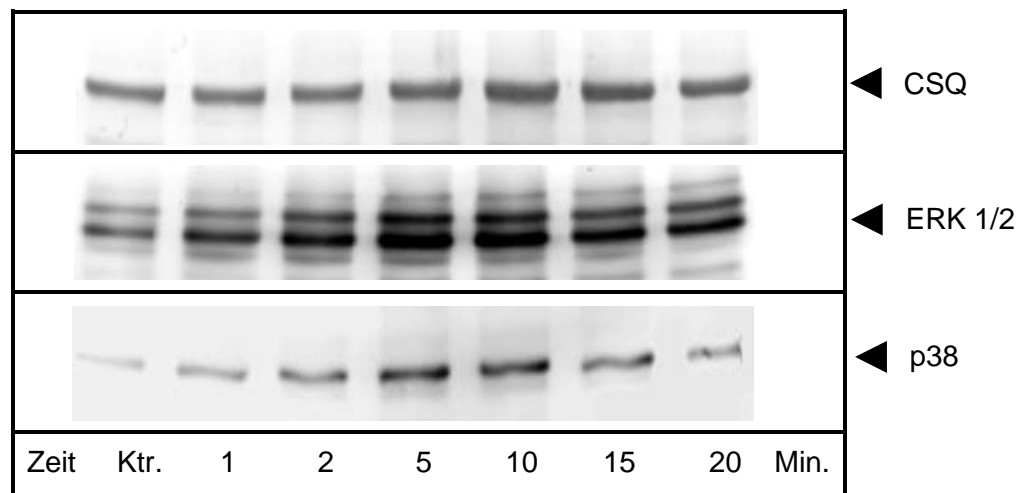
4. Ergebnisse

4.1 Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK in neonatalen Rattenkardiomyozyten

4.1.1.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurden die isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 100 μM ATP für 1, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten inkubiert, um eine mögliche zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinasen zu untersuchen. Durch anschließende immunologische Identifizierung mittels Phosphorylierungsspezifischer Antikörper und darauffolgender Quantifizierung im PhosphorImager (siehe Kapitel 3.10) wurde der Phosphorylierungszustand bestimmt. Nach statistischer Auswertung konnte für 100 μM ATP eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAPK in den isolierten Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich bei der p38-MAPK ein Anstieg der Phosphorylierung bis zu einem Maximum bei 10 Minuten. Danach folgte ein Abfall des Phosphorylierungszustand zurück auf das Ausgangsniveau. Das Maximum des Phosphorylierungszustand der p38 lag bei 10 Minuten und betrug $215\% \pm 36\%$ zum Kontrollwert ($p < 0,05$; Abb. 4 A/B). Die phosphorylierte Form der ERK 1/2-MAPK erreichte nach einem raschen Anstieg dagegen ihr Maximum bereits nach 5 Minuten und erreichte mit $206\% \pm 25\%$ einen ähnlich hohen Anstieg zum Kontrollwert wie die p38-MAP-Kinase nach Stimulation mit ATP ($p < 0,05$; Abb. 4 A/B). Es folgte ein Abfall des Phosphorylierungszustand auf das Ausgangsniveau. Nach 20 Minuten entsprach der Phosphorylierungszustand wieder dem Kontrollwert beziehungsweise dem Ausgangswert. Als Beladungskontrolle für jede Probe diente die Expression von CSQ. Dies geschah, da bekannt ist, dass die kardiale Expression von CSQ konstant und unabhängig von Erkrankungen sein soll (Münch et al., 1998). So wurden die Signalintensitäten von p38 und ERK 1/2 auch durch den CSQ-Wert der entsprechenden Probe dividiert und analysiert. Es wurden jeweils vier unabhängige Versuche je MAPK durchgeführt.

A



B

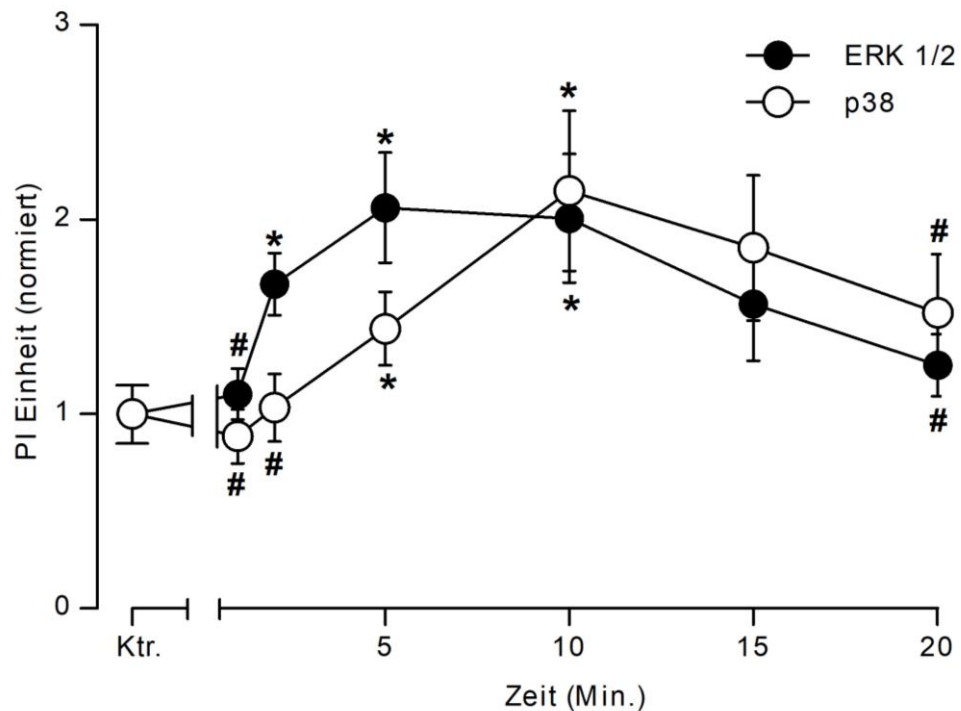
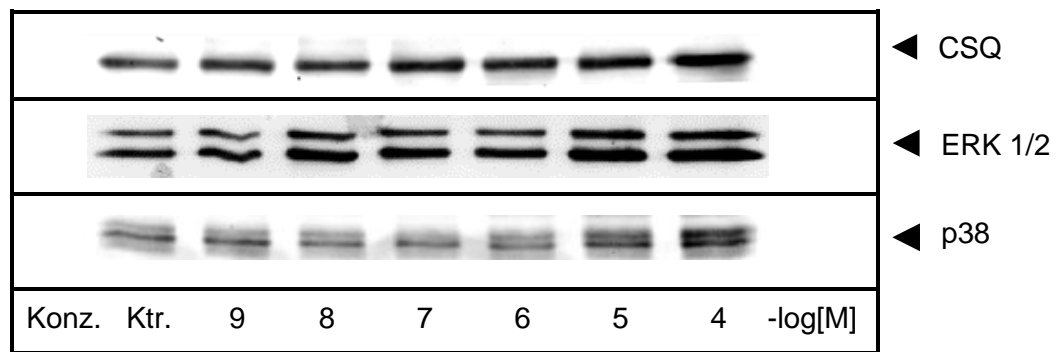


Abb. 4: Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2- MAPK durch 100 μ M ATP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und in der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2-MAPK (B) in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die Zeit dargestellt, in der die neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 100 μ M ATP inkubierten. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Im Diagramm ist auf der Ordinate der Phosphorylierungszustand in normierten Werten (PI Einheit) im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Versuchen ($n=4$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. Maximum.

4.1.1.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP

Für die Untersuchung des MAPK-Signalweges in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden neben der zeitabhängigen auch die konzentrationsabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinase untersucht. Es sollte die optimale ATP-Konzentration zur Durchführung weiterer Versuche herausgefunden werden. Zeitgleich konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt der Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, die adhärenenten Zellkulturen in unterschiedlicher Konzentration für fünf Minuten mit ATP inkubiert und anschließend quantitativ untersucht. Nach fünf Minuten Inkubation mit ansteigenden ATP-Konzentrationen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK in den neonatalen Rattenkardiomyozyten. Bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich war kaum ein Unterschied im Vergleich zum Kontrollwert zu sehen. Ab einer Konzentration von 1 μM ATP ist ein Phosphorylierungseffekt von $123\% \pm 20\%$ bei p38 und $132\% \pm 13\%$ bei ERK 1/2 zu sehen. Der Anstieg der Phosphorylierung setzte sich bis zu einem Konzentrationsmaximum von 100 μM ATP für die beiden MAP-Kinasen fort. Die p38-MAPK erreichte bei 100 μM ATP $196\% \pm 4\%$ vom Kontrollwert ($p < 0,05$; Abb. 5 A/B). Bei der ERK 1/2-MAP-Kinase waren das $233\% \pm 21\%$ vom Kontrollwert ($p < 0,05$; Abb. 5 A/B). Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente auch hier die Proteinexpression von Calsequestrin.

A



B

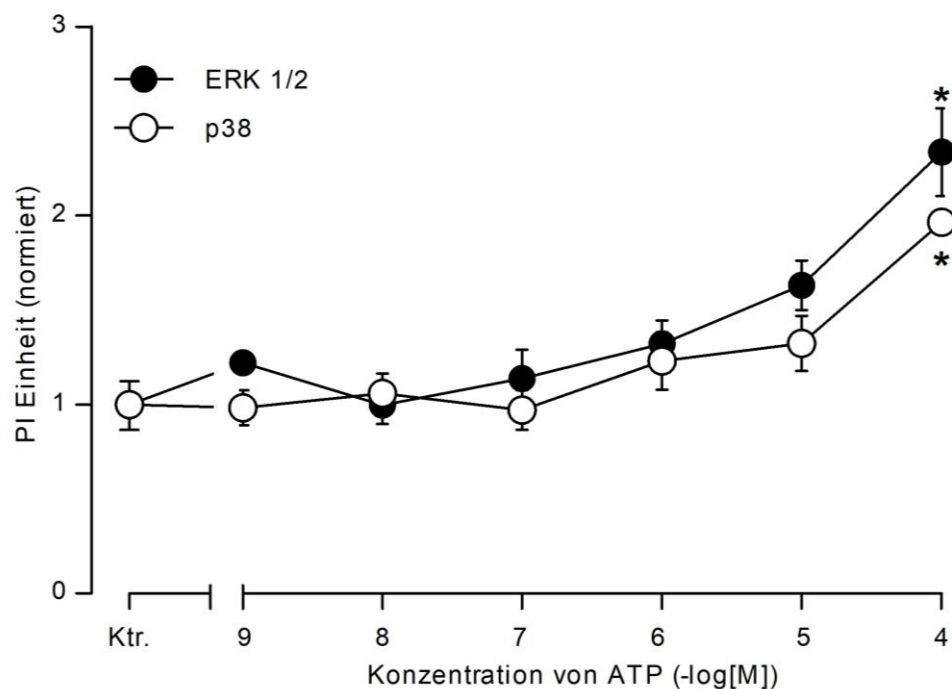
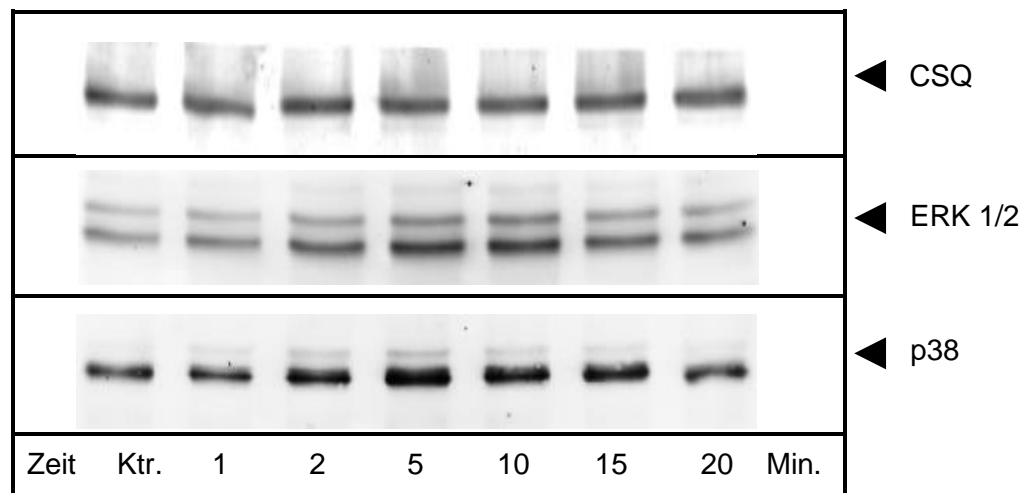


Abb. 5: Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2- MAPK (B) in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die konzentrationsabhängige Wirkung (1, 10 und 100 nM sowie 1, 10 und 100 μ M) von ATP auf die Phosphorylierungszustände von p38 und ERK 1/2 nach Inkubation für 5 Minuten als negativer dekadischer Logarithmus dargestellt. Die Daten sind in Bezug auf die Werte der unbehandelten Kontrolle in Proben in normierten Einheiten (Ordinate) angegeben. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei beziehungsweise vier unabhängigen Versuchen ($n=3-4$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr.

4.1.2.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurden die isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten auch mit 100 μ M UTP für 1, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten inkubiert, um eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinasen nachzuweisen. Durch anschließende immunologische Identifizierung mittels Phosphorylierungs-spezifischer Antikörper und darauffolgender Quantifizierung im PhosphorImager auf einer Nitrocellulosemembran (siehe Kapitel 3.10) wurde der Phosphorylierungszustand detektiert. Dabei konnte für UTP eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAPK in den isolierten Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der p38-MAPK erreichte ihr Maximum bei fünf Minuten und betrug 204 % \pm 21 % im Vergleich zum Kontrollwert ($p < 0,05$; $n=4$). Es folgte ein langsamer Abfall des Phosphorylierungsniveaus auf den Ausgangswert (Abb. 6 A/B). Die phosphorylierte ERK 1/2 MAP-Kinase erreichte bereits nach fünf Minuten ein Phosphorylierungszustand von 310 % \pm 6 %, um nach weiteren fünf Minuten ihr Maximum bei 10 Minuten von 352 % \pm 22% zum Kontrollwert zu erreichen ($p < 0,05$; $n=4$). Der anschließende Abfall des Phosphorylierungsgrads verlief steil abfallend und entsprach nach 20 Minuten dann wieder dem Ausgangswert. Als Beladungskontrolle diente die Expression von CSQ.

A



B

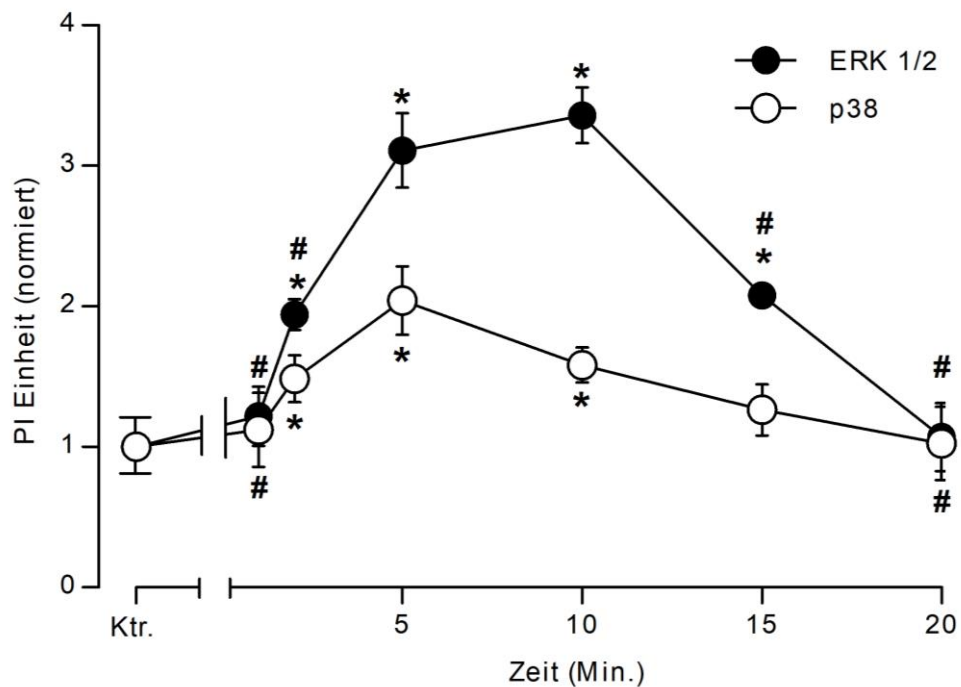
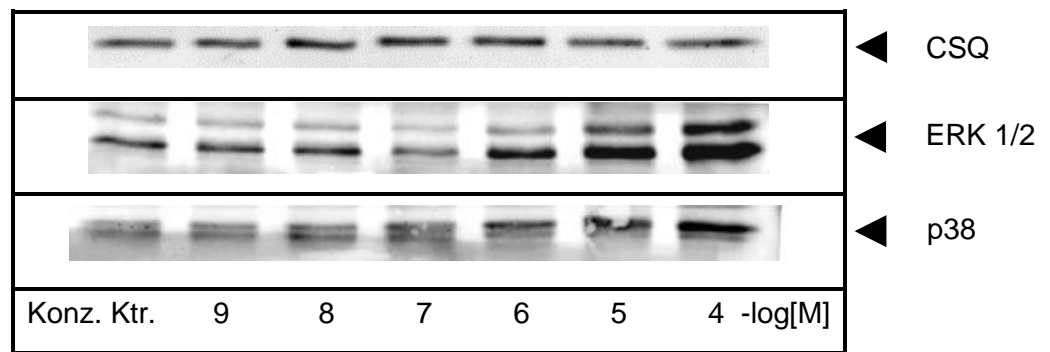


Abb. 6: Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2- MAPK durch 100 μ M UTP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und in der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2- MAPK (B) in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die Zeit dargestellt, in der die neonatalen Rattenkardiomyozyten mit 100 μ M UTP inkubierten. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Im Diagramm ist auf der Ordinate der Phosphorylierungszustand in normierten Werten (PI Einheit) im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Versuchen ($n=4$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. Maximum.

4.1.2.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Für die Untersuchung des MAPK-Signalweges in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden auch für UTP neben der zeitabhängigen auch die konzentrationsabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinase untersucht. Es sollte die optimale UTP-Konzentration zur Durchführung weiterer Versuche herausgefunden werden. Zeitgleich konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt der Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben die adhärenenten Zellkulturen für 5 Minuten mit unterschiedlichen UTP-Konzentrationen inkubiert und anschließend quantitativ untersucht. Nach fünf Minuten Inkubation mit ansteigenden UTP-Konzentrationen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK in den isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. Bei der phosphorylierten Form der p38- MAPK zeigte sich bei 100 μ M UTP ein maximaler Wert von $223\% \pm 28\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Bei der ERK 1/2-MAPK gab es ab einer Konzentration von 100 nM UTP einen stetigen Anstieg des Phosphorylierungsniveaus im Vergleich zum Kontrollwert. Bei 100 μ M UTP wurde das Maximum mit $250\% \pm 50\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erreicht. Die Maxima für beide MAPK bei 100 μ M UTP sowie für 10 μ M UTP bei der ERK 1/2- MAPK waren jeweils erhöht zum Kontrollwert ($p < 0,05$; Abb. 7 A/B). Es erfolgten drei separate Präparationen für die p38-beziehungsweise fünf separate Präparationen für die ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von Calsequestrin.

A



B

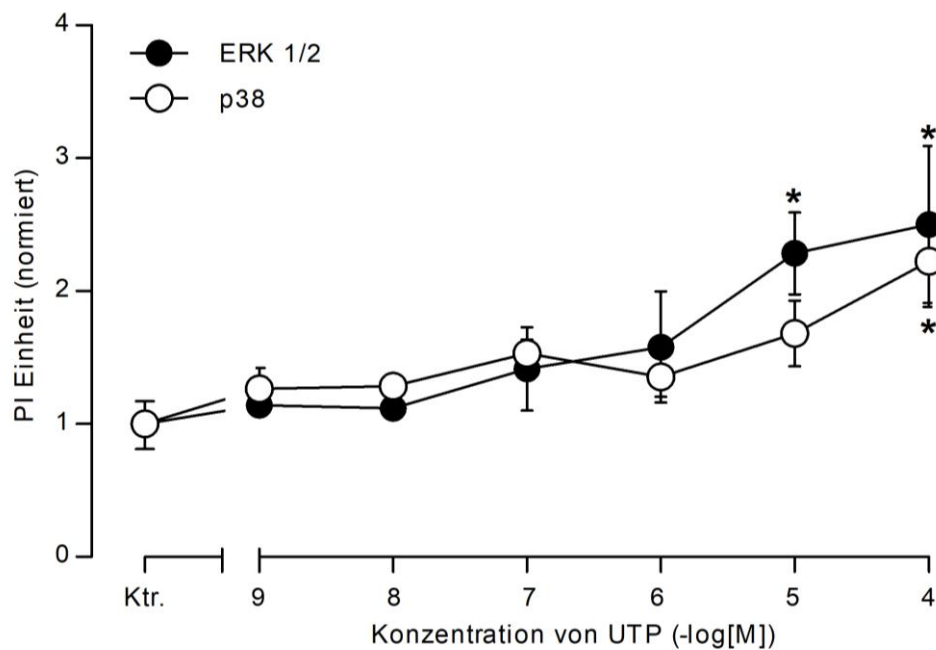


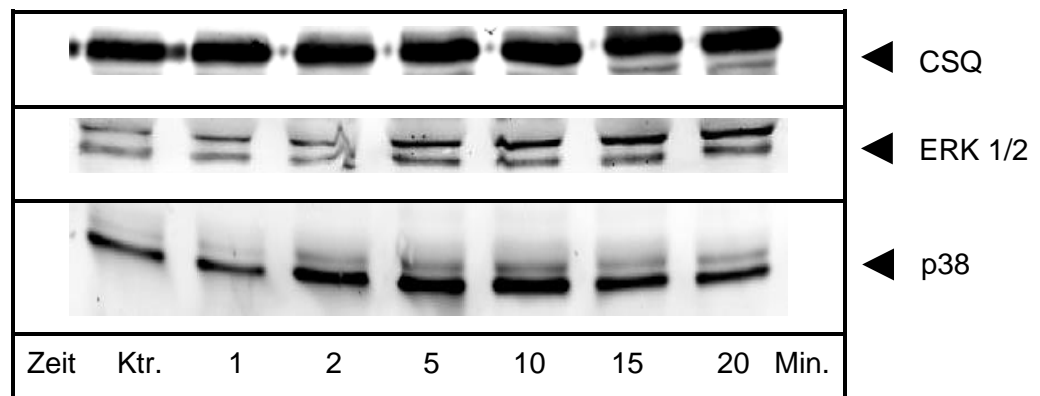
Abb. 7: Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2- MAPK (B) in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die konzentrationsabhängige Wirkung (1, 10 und 100 nM sowie 1, 10 und 100 μ M) von UTP auf die Phosphorylierungszustände von p38 und ERK 1/2 nach Inkubation für 5 Minuten als negativer dekadischer Logarithmus dargestellt. Die Daten sind in Bezug auf die Werte der unbehandelten Kontrolle in normierten Einheiten (PI Einheit) auf der Ordinate angegeben. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei (p38) beziehungsweise fünf (ERK 1/2) unabhängigen Versuchen ($n=3-5$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr.

4.2 Zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK in adulten Mauscardiomyozyten

4.2.1.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP

Die isolierten adulten Mauscardiomyozyten wurden mit 100 μ M ATP für 1, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten inkubiert (siehe auch Kapitel 3.5), um eine zeitabhängige Veränderung des Phosphorylierungszustandes der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinasen zu untersuchen. Wie in Kapitel 3.7 beschrieben, wurden mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern die phosphorylierten Formen der p38- und ERK 1/2-MAPK im Western Blot bestimmt um eine zeitabhängige Phosphorylierung durch ATP in isolierten adulten Mauscardiomyozyten nachzuweisen. Nach statistischer Auswertung konnte für 100 μ M ATP eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAPK in den isolierten Mauscardiomyozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich für die p38-MAPK ein konstanter, aber schwacher Anstieg des Phosphorylierungszustand, der sein Maximum bei 10 Minuten hatte und 183 % \pm 21 % des Kontrollwertes betrug. Die anschließende Dephosphorylierung verlief im gleichen Zeitraum von 10 Minuten und der Phosphorylierungszustand erreichte somit bei 20 Minuten wieder seinen Ausgangskontrollwert. Die ERK 1/2-MAPK erreichte dagegen ein deutlich höheres Maximum von 319% \pm 47% zum Kontrollwert aber erst nach 15 Minuten. Das erste Maximum nach einer Minute ist wahrscheinlich fehlerbedingt. Aufgrund des späten Maximums wurde in diesem Fall nach 20 Minuten das Ausgangsniveau im Vergleich zum unbehandelten Ausgangswert nicht erreicht (Abb. 8 A/B). Die Maxima waren jeweils erhöht zum Kontrollwert. Nach 20 Minuten entsprach nur der p38-MAPK-Wert dem Ausgangswert. Als Beladungskontrolle für jede Probe diente die Proteinexpression von CSQ. Es waren jeweils drei bzw. vier unabhängige Versuche je MAPK.

A



B

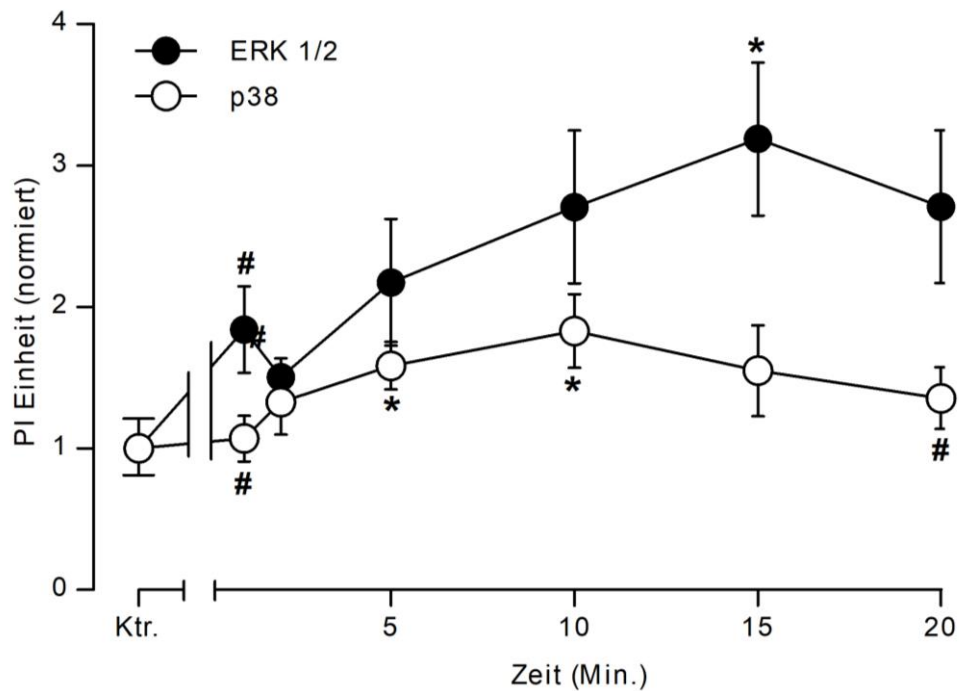
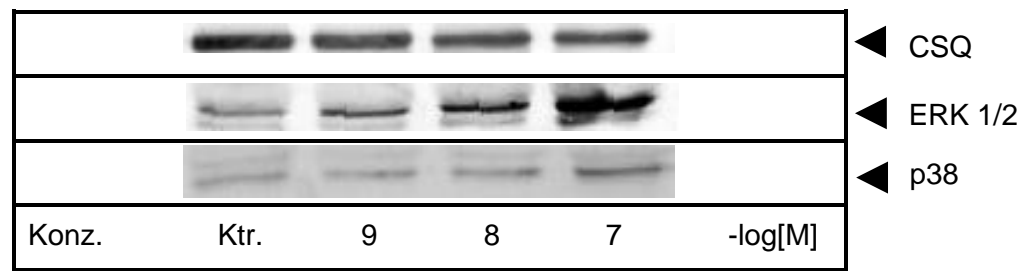


Abb. 8: Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2- MAPK durch 100 μ M ATP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und in der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2-MAPK (B) in isolierten adulten Mauscardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die Zeit dargestellt, in der die adulten Mauscardiomyozyten mit 100 μ M ATP inkubierten. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Im Diagramm ist auf der Ordinate der Phosphorylierungszustand in normierten Werten (PI Einheit) im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei bis vier unabhängigen Versuchen ($n=3-4$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. Maximum.

4.2.1.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres ATP

Für die Untersuchung des MAPK-Signalweges in adulten Mausekardiomyozyten wurden wie schon für die neonatalen Zellen neben der zeitabhängigen auch die konzentrationsabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinase untersucht. Es sollte die optimale ATP-Konzentration zur Durchführung weiterer Versuche herausgefunden werden. Zeitgleich konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt der Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, die in Suspension vorliegenden Kardiomyozyten mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen für fünf Minuten inkubiert und anschließend quantitativ im Western Blot untersucht. Es erfolgte eine Staffelung in 1, 10 und 100 μM . Es gab einen Anstieg des Phosphorylierungszustandes mit einem Maximum für die phosphorylierte Form der p38-MAPK von $151\% \pm 12\%$ beim Einsatz von 100 μM ATP im Vergleich zum Kontrollwert ($p < 0,05$, $n=3$; Abb. 9 A/B). Bei der ERK 1/2-MAP Kinase sorgte 100 μM ATP für einen $145\% \pm 14\%$ höheren Phosphorylierungsgrad im Vergleich zum Kontrollwert ($p < 0,05$, $n=3$, Abb. 9 A/B). Es erfolgten drei separate Präparationen für die p38-beziehungsweise ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von CSQ.

A



B

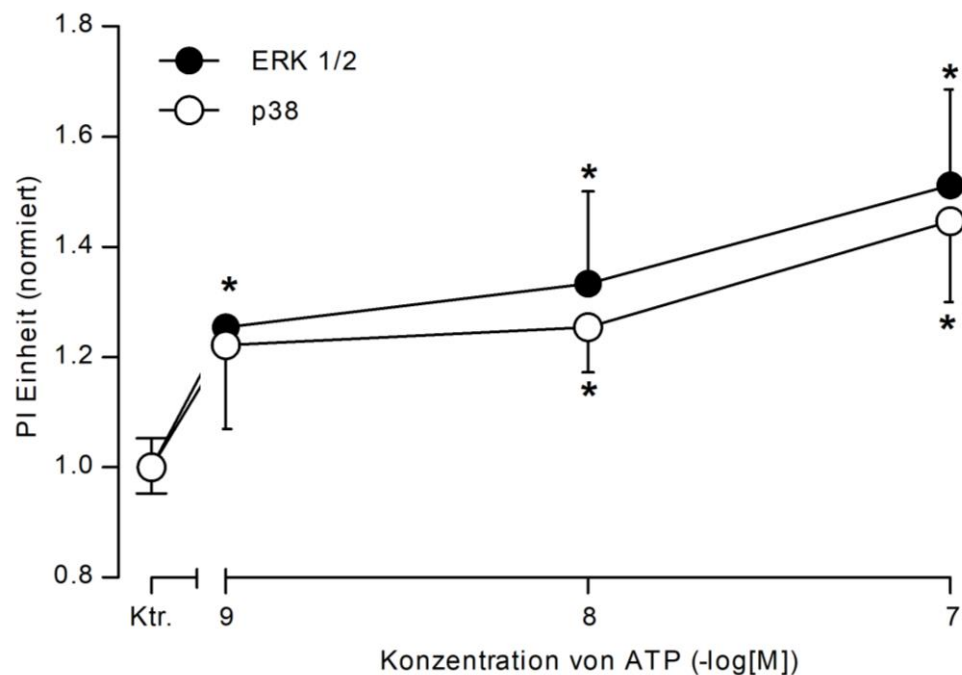
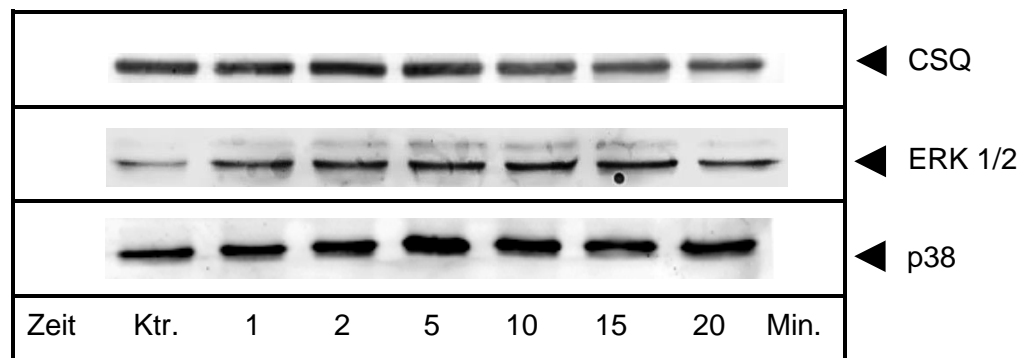


Abb. 9: Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2-MAPK (B) in isolierten adulten Mauscardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die konzentrationsabhängige Wirkung (1, 10 und 100 μ M) von ATP auf die Phosphorylierungszustände von p38 und ERK 1/2 nach Inkubation für fünf Minuten in adulten Mauscardiomyozyten als negativer dekadischer Logarithmus dargestellt. Die Daten sind in Bezug auf die Werte der unbehandelten Kontrolle in normierten Einheiten (PI Einheit) auf der Ordinate angegeben. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr.

4.2.2.1 Zeitabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, wurden die isolierten adulten Mausekardiomyozyten auch mit 100 μ M UTP für 1, 2, 5, 10, 15 und 20 Minuten inkubiert, um eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinasen nachzuweisen. Durch anschließende immunologische Identifizierung mittels monoklonaler Antikörper und darauffolgender Quantifizierung im Phosphorimager auf einer Nitrocellulosemembran (siehe Kapitel 3.10) wurde der Phosphorylierungszustand detektiert. Dabei konnte für UTP eine zeitabhängige Phosphorylierung der p38- und ERK 1/2-MAPK in den isolierten adulten Mausekardiomyozyten nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg des Phosphorylierungszustandes beider untersuchter MAP-Kinasen. Die maximale Phosphorylierung von p38 war bei fünf Minuten und betrug $201\% \pm 6\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Phosphorylierungsniveau der ERK 1/2-MAPK lag beständig über der von p38 und erreichte ein Maximum von $238\% \pm 21\%$ ebenfalls nach fünf Minuten. Es erfolgte ein Abfall des Phosphorylierungszustandes beider MAPK und nach 20 Minuten entsprach dieser wieder dem Ausgangskontrollwert. (Abb. 10 A/B). Die Maxima waren jeweils erhöht zum Kontrollwert. Als Beladungskontrolle diente die Expression von CSQ.

A



B

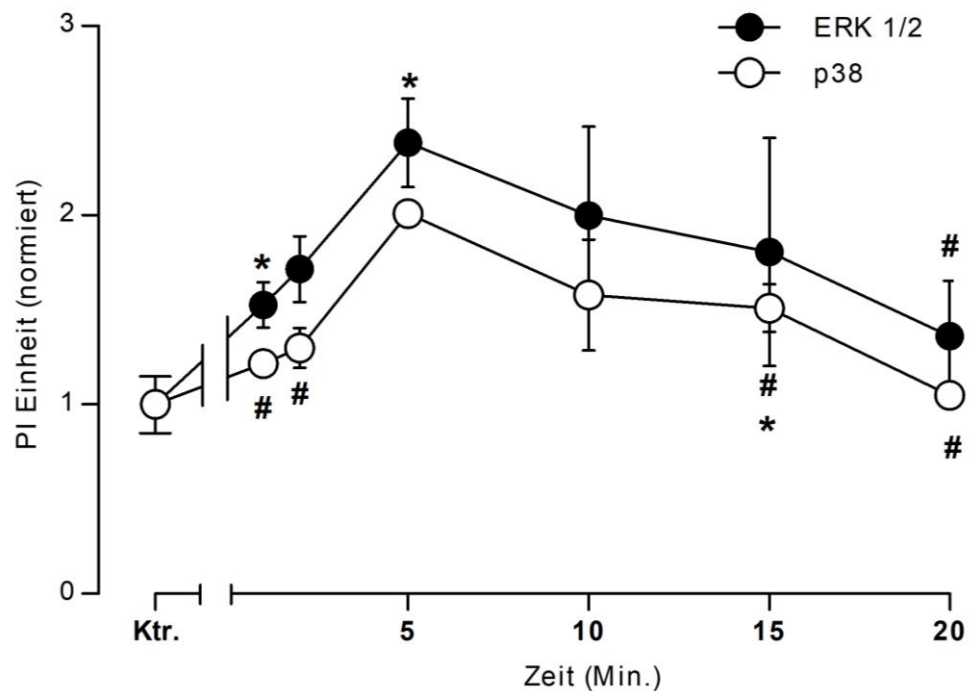
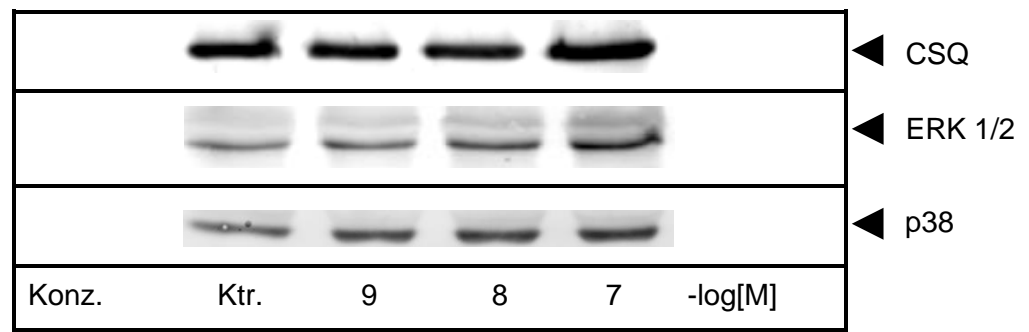


Abb. 10: Darstellung der zeitabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP und die Proteinexpression von CSQ im Western Blot (A) und in der statistischen Auswertung als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2-MAPK (B) in isolierten adulten Mauscardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die Zeit dargestellt, in der die adulten Mauscardiomyozyten mit 100 μ M UTP inkubierten. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Im Diagramm ist auf der Ordinate der Phosphorylierungszustand in normierten Werten (PI Einheit) im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. Maximum.

4.2.2.2 Konzentrationsabhängige Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Entsprechend den Versuchen mit ATP wurde für die Untersuchung des UTP-abhängigen MAPK-Signalweges in adulten Mausekardiomyozyten neben der zeitabhängigen auch der konzentrationsabhängige Phosphorylierungszustand der p38- und ERK 1/2-MAP-Kinase untersucht. Es sollte die optimale UTP-Konzentration zur Durchführung weiterer Versuche herausgefunden werden. Zeitgleich konnte ein konzentrationsabhängiger Effekt auf die Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, die in Suspension vorliegenden Kardiomyozyten mit unterschiedlichen UTP-Konzentrationen für fünf Minuten inkubiert und anschließend quantitativ im Western Blot untersucht. Es erfolgte eine Staffelung in 1, 10 und 100 μM . Es ergab sich für die verwendeten MAPK-Antikörper ein differenter Verlauf. Jedoch gab es für beide ein Maximum der phosphorylierte Form der MAPK von $158\% \pm 24\%$ für p38 und respektive $168\% \pm 28\%$ für ERK 1/2 beim Einsatz von 100 μM UTP im Vergleich zum Kontrollwert. Bei der ERK 1/2-MAPK kam es schon beim Einsatz von 10 μM UTP zu einem Anstieg von $145\% \pm 14\%$ zum Kontrollwert. Die Maxima waren jeweils erhöht zum Kontrollwert (Abb. 11 A/B). Es erfolgten drei separate Präparationen für die p38- beziehungsweise ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von CSQ.

A



B

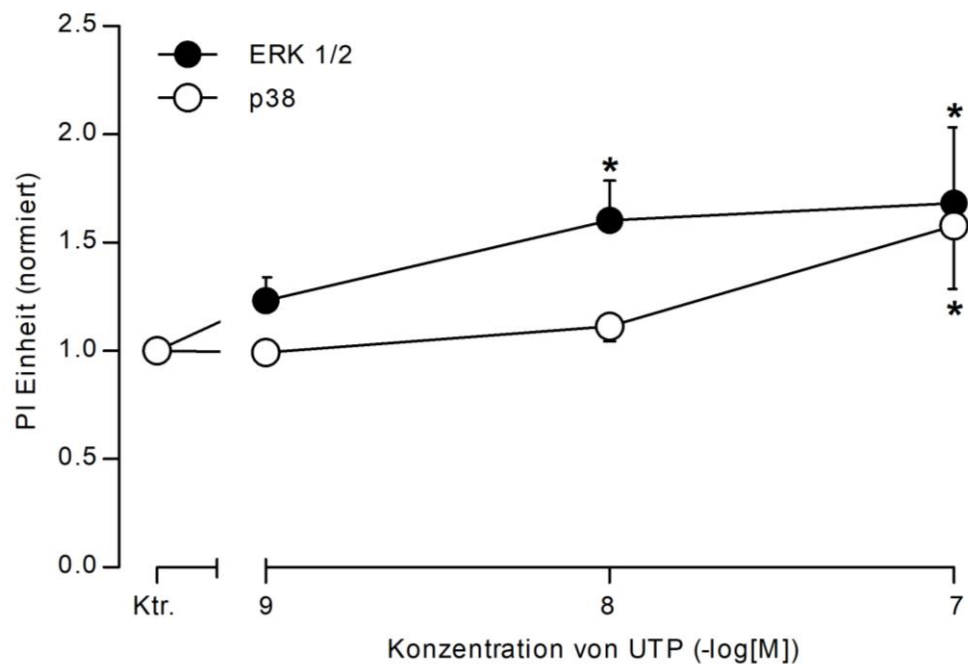
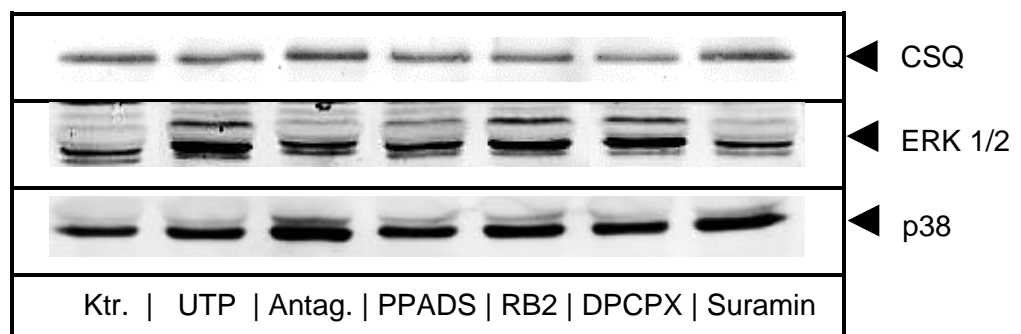


Abb. 11: Darstellung der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M UTP im Western Blot (A) oder als Liniendiagramm für p38- oder ERK 1/2-MAPK (B) in isolierten adulten Mauskardiomyozyten. CSQ diente als Ladungskontrolle. Auf der Abszisse ist die konzentrationsabhängige Wirkung (1, 10 und 100 μ M) von UTP auf die Phosphorylierungszustände von p38 und ERK 1/2 nach Inkubation für fünf Minuten in adulten Mauskardiomyozyten als negativer dekadischer Logarithmus dargestellt. Die Daten sind in Bezug auf die Werte der unbehandelten Kontrolle in normierten Einheiten (PI Einheit) auf der Ordinate angegeben. Im Western Blot sind rechts die entsprechenden Proteine dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$) und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr.

4.3 Wirkung von Rezeptorantagonisten auf die Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Im Folgenden wurde die Wirkung von Rezeptorantagonisten auf die UTP-vermittelte ERK 1/2- und p38-MAPK-Phosphorylierung untersucht, um Hinweise auf die beteiligten Rezeptorsubtypen zu bekommen. Dazu wurden die adulten Mauscardiomyozyten entsprechend mit 100 μ M UTP und den jeweiligen Antagonisten PPADS, Reactive blue 2 (RB2), DPCPX und Suramin behandelt (siehe auch Kapitel 3.7). Im Kontrollversuch zeigte sich, wie bereits bei den zeitabhängigen Versuchen, dass es zu einem Anstieg der Phosphorylierung durch UTP nach 5 Minuten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kommt. Es zeigte sich, dass PPADS die Phosphorylierung sowohl von p38- als auch von ERK 1/2-MAPK antagonisiert. Suramin hatte nur bei ERK 1/2 hemmende Effekte auf die UTP-induzierte MAPK-Phosphorylierung. Nach der Behandlung mit PPADS lag der Phosphorylierungsgrad der p38-MAP-Kinase bei $92 \% \pm 22 \%$ gegenüber dem Kontrollwert. Die Phosphorylierung von ERK 1/2 lag mit PPADS bei $103 \% \pm 16 \%$ und bei Suramin bei $108 \% \pm 13 \%$ im Vergleich zum Kontrollwert. Die Werte lagen damit unterhalb des UTP-Wertes von $150 \% \pm 22 \%$ für p38 und $140 \% \pm 19 \%$ für ERK 1/2. Dementgegen gab es bei der gleichzeitigen Inkubation von 100 μ M UTP mit RB2 und DPCPX keine Minderung des Phosphorylierungszustand im Vergleich zur Positivkontrolle, die nur mit 100 μ M UTP behandelt wurde. Bei der p38-MAPK war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei Reactive blue 2 ein Wert von $153 \% \pm 19 \%$ und bei DPCPX ein Wert von $142 \% \pm 20 \%$ erreicht worden (Abb. 12 A/B) Zusätzlich wurde in Anwesenheit von Suramin ein Wert von $156 \% \pm 26 \%$ erreicht und somit keine Verminderung der Phosphorylierung durch UTP. Die entsprechenden Werte für ERK 1/2 waren bei Reactive blue 2 $151 \% \pm 10 \%$ und für DPCPX $175 \% \pm 8 \%$ (Abb. 12 A/C). Es erfolgten drei bzw. fünf separate Präparationen für die p38- beziehungsweise ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von CSQ.

A



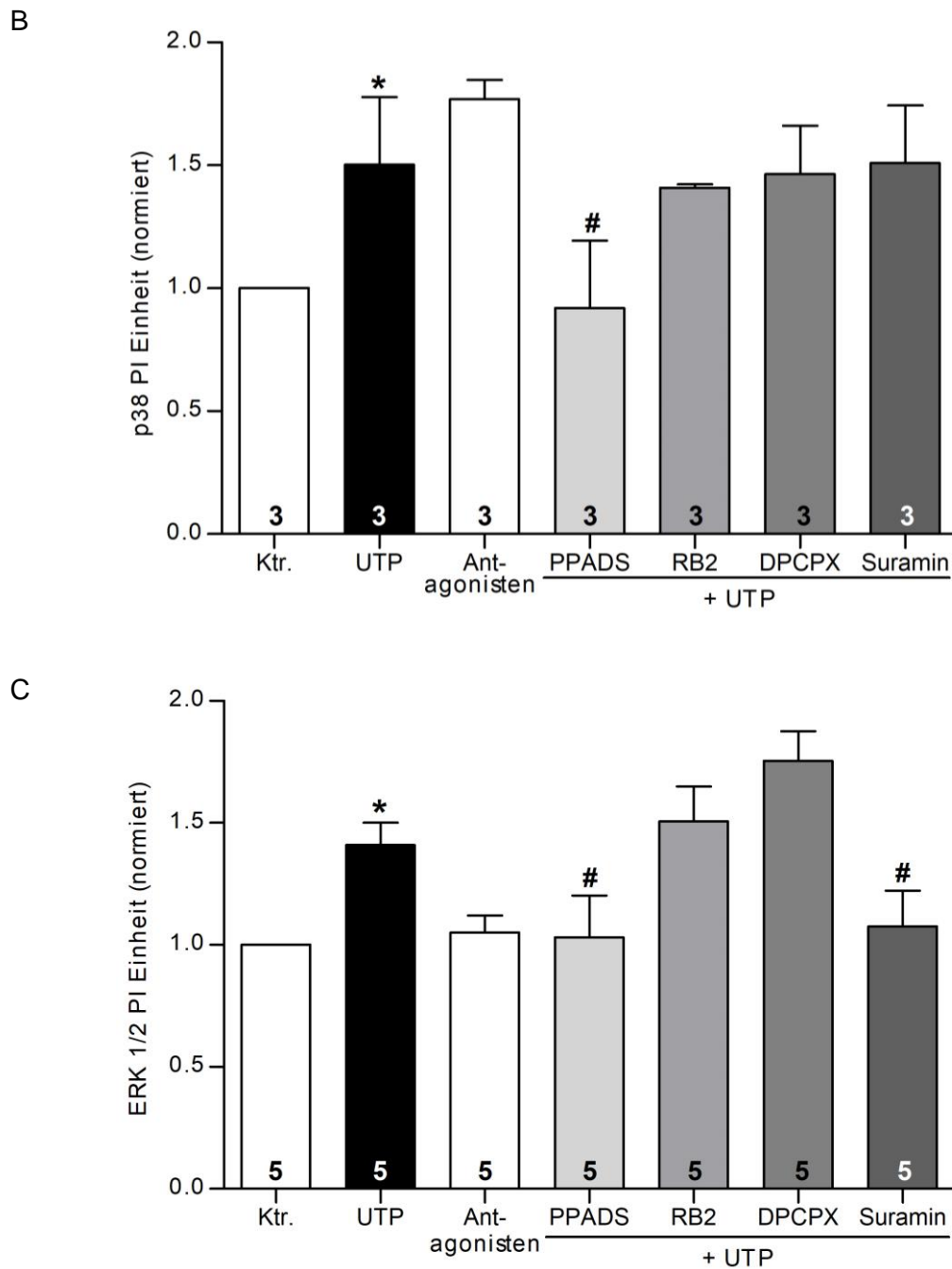
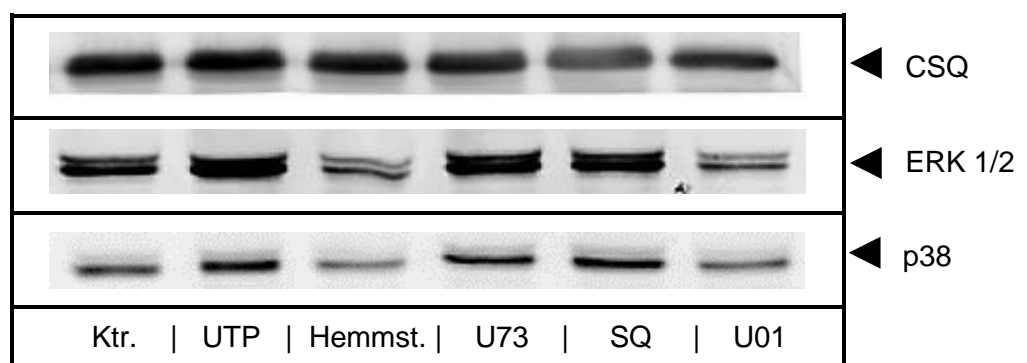


Abb. 12: Antagonisierung der UTP-abhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch unterschiedliche Rezeptorantagonisten, dargestellt im Western Blot (A) oder als Säulendiagramm für p38 (B) bzw. ERK 1/2 (C). Die adulten Mauscardiomyozyten wurden neben 100 μ M UTP nach fünf Minuten Inkubation allein auch mit den angezeigten Rezeptorantagonisten (PPADS, RB2, DPCPX, Suramin) sowie nach Vorinkubation für 30 Minuten mit den Rezeptorantagonisten im Anschluss mit 100 μ M UTP untersucht (Abszisse). Der reine Antagonisteneinsatz erfolgte zur Quantifizierung des Phosphorylierungszustandes ohne entsprechenden Agonist (UTP). Die Proteinexpression von CSQ diente als Ladungskontrolle. Der Phosphorylierungszustand ist auf der Ordinate dargestellt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Phosphorylierungszustand von unbehandelten Zellen und stammen aus drei (p38) bzw. fünf (ERK 1/2) unabhängigen Versuchen ($n=3-5$) und sind als normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der durchgeführten Messungen. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. UTP.

4.4 Wirkung von Hemmstoffen der Signalkaskade auf die Phosphorylierung von MAPK durch extrazelluläres UTP

Es erfolgte ebenfalls eine Untersuchung der Wirkung von Hemmstoffen der Signalkaskade auf die UTP-vermittelte ERK 1/2- und p38-MAPK-Phosphorylierung, um mögliche Komponenten der MAPK-Kaskade zu ermitteln. Eingesetzt wurden der PLC-Inhibitor U73122, der Hemmstoff der Adenylatcyclaseaktivität SQ22536 und der MEK-Inhibitor U0126. Dazu wurden die adulten Mauskardiomyozyten mit 100 μ M UTP und den jeweiligen Signalkaskadeinhibitoren inkubiert (Abb. 13 A). Beim gleichzeitigen Einsatz von UTP und U0126 ergab sich für die p38-Phosphorylierung eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades im Vergleich zur Probe die nur mit UTP behandelt wurde. Eine reine UTP-Stimulation über 5 Minuten ergab 156 % \pm 17 % im Vergleich zum unbehandelten Kontrollwert. Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem MEK 1/2-Inhibitor U0126 wurde nur noch ein Wert von 46 % \pm 8 % erreicht. Bei SQ22526 wurde eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades auf 101 % \pm 24 % erreicht. Bei U73122 fand sich ebenfalls eine Reduktion auf 103 % \pm 22 % ausgehend vom UTP-Phosphorylierungsgrad. Jedoch waren die Effekte von SQ22526 und U73122 aufgrund der hohen Varianz nicht statistisch verschieden von der Positivkontrolle mit UTP alleine oder der unbehandelten Kontrolle (Abb. 13 B). Dagegen konnte die ERK 1/2-MAPK Phosphorylierung durch alle eingesetzten Signalkaskadeinhibitoren reduziert werden ($p < 0,05$). Es zeigte sich, dass U0126 ein Niveau von 72% \pm 19% ausgehend vom Kontrollwert hatte. Die ERK 1/2-MAPK Phosphorylierung wurde durch den PLC-Inhibitor U73122 auf ein Niveau von 107% \pm 11% reduziert und der Hemmstoff der Adenylatcyclaseaktivität SQ22536 reduzierte das Niveau auf 120% \pm 14% im Vergleich zum Kontrollwert. Die Werte lagen damit unterhalb des UTP-Grades von 151% \pm 18% für ERK 1/2-MAPK (Abb. 13 C). Es erfolgten mindestens drei separate Präparationen für die p38- beziehungsweise ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von CSQ.

A



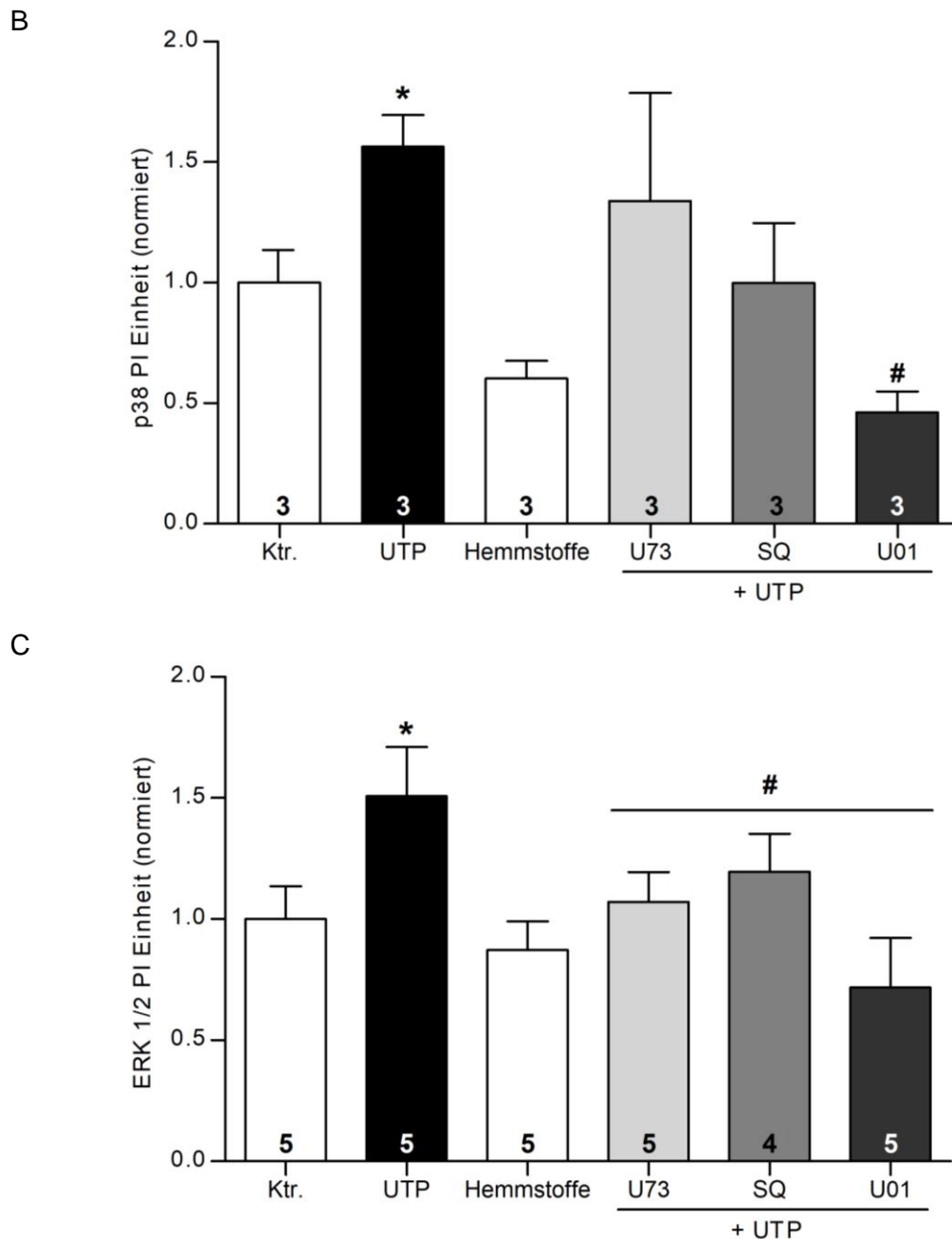


Abb 13: Hemmung der UTP-abhängigen Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch unterschiedliche Hemmstoffe der Signalkaskade dargestellt im Western Blot (A) oder als Säulendiagramm für p38 (B) und ERK 1/2 (C). Die adulten Mauscardiomyozyten wurden neben 100 μ M UTP nach fünf Minuten Inkubation allein auch mit den angezeigten Hemmstoffen (U73122, SQ22536, U0126) sowie nach Vorinkubation für 30 Minuten mit den Hemmstoffen im Anschluss mit 100 μ M UTP untersucht (Abszisse). Der reine Hemmstoffeinsatz erfolgte zur Quantifizierung des Phosphorylierungszustandes ohne entsprechenden Agonist (UTP). Die Proteinexpression von CSQ diente als Ladungskontrolle. Der Phosphorylierungszustand ist auf der Ordinate dargestellt. Die Ergebnisse sind im Vergleich zum Phosphorylierungszustand von unbehandelten Zellen und stammen aus mindestens drei (p38) bzw. fünf (ERK 1/2) unabhängigen Versuchen und sind als normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der durchgeführten Messungen. * $p < 0,05$ vs. Ktr., # $p < 0,05$ vs. UTP.

4.5 Effekt von UTP auf Vorhofpräparate in Wildtyp und P2Y-Knock-out-Mäusen

Zum Vergleich mit den biochemischen Untersuchungen erfolgte ebenfalls eine Messung der Kontraktionskraft der Vorhöfe von Wildtyp- und P2Y-Knock-out-Mäusen (P2Y_{2,4,6}). Dazu wurden die WT- sowie Knock-out-Mäusevorhöfe wie beschrieben gewonnen und präpariert sowie mit 100 μ M UTP behandelt. Währenddessen wurde die Kontraktionskraft gemessen (siehe auch Kapitel 3.10). Bei den Wildtyp- sowie P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Knock-out-Mäusen konnte ein positiv inotroper Effekt gemessen werden (Abb. 14 A/B, Abb. 15 A/B und Abb. 16 A/B). Bei den P2Y₂-Knock-out-Mäusen fehlte jedoch der initial negativ inotrope Effekt.

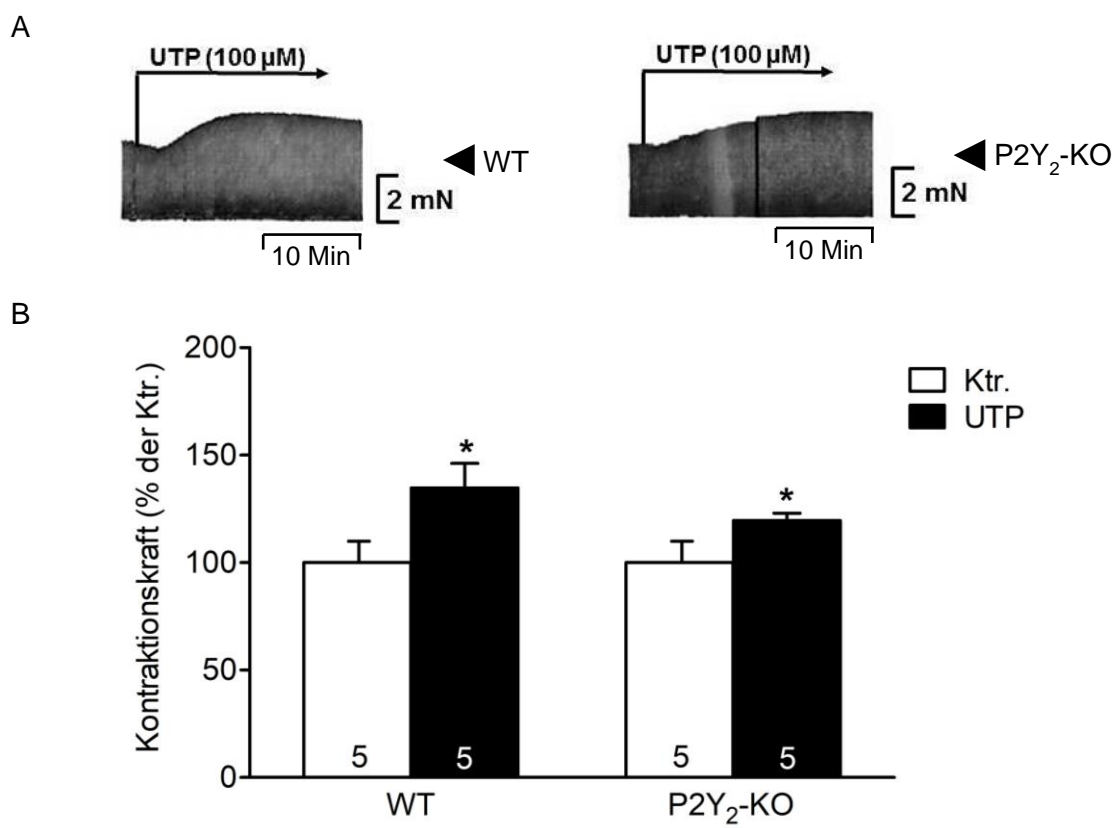


Abb. 14: Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₂-KO-Mäusen. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Mechanogramm (A) bzw. ein Säulendiagramm (B). In dieser Abbildung ist die Kontraktionskraft (in % der Ktr.) vor (Ktr.) und nach UTP-Gabe abgebildet. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in % von der unbehandelten Kontrolle sowie auf der Abszisse ist die Quantifikation des positiv inotropen Effekts von UTP bei WT- vs. KO-Mäusevorhöfen im Vergleich vor und nach UTP-Gabe abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus fünf unabhängigen Versuchen und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der durchgeführten Messungen. * $p < 0,05$ vs. Ktr. (einseitiger t-Test)

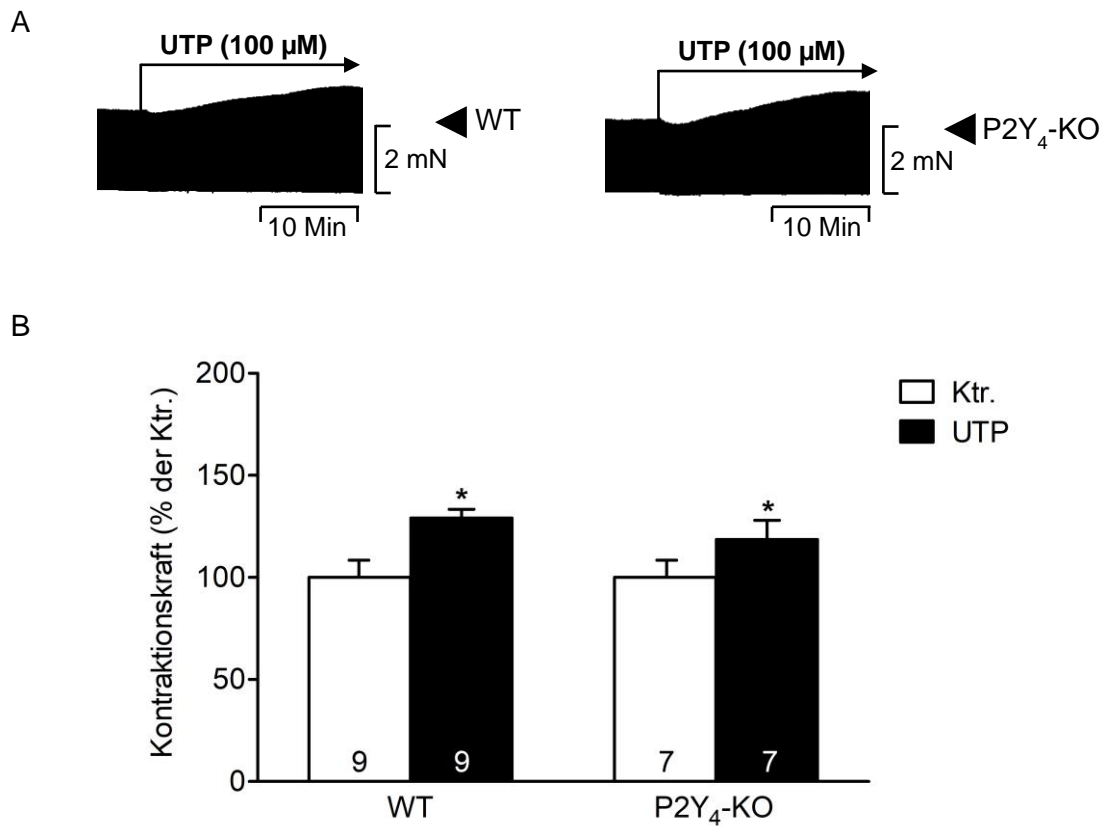


Abb. 15: Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₄-KO-Mäusen. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Mechanogramm (A) bzw. ein Säulendiagramm (B). In dieser Abbildung ist die Kontraktionskraft (in % der Ktr.) vor (Ktr.) und nach UTP-Gabe abgebildet. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in % von der unbehandelten Kontrolle sowie auf der Abszisse ist die Quantifikation des positiv inotropen Effekts von UTP bei WT- vs. KO-Mäusevorhöfen im Vergleich vor und nach UTP-Gabe abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus neun bzw. sieben unabhängigen Versuchen und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der durchgeführten Messungen. * $p < 0,05$ vs. Ktr. (einseitiger t-Test)

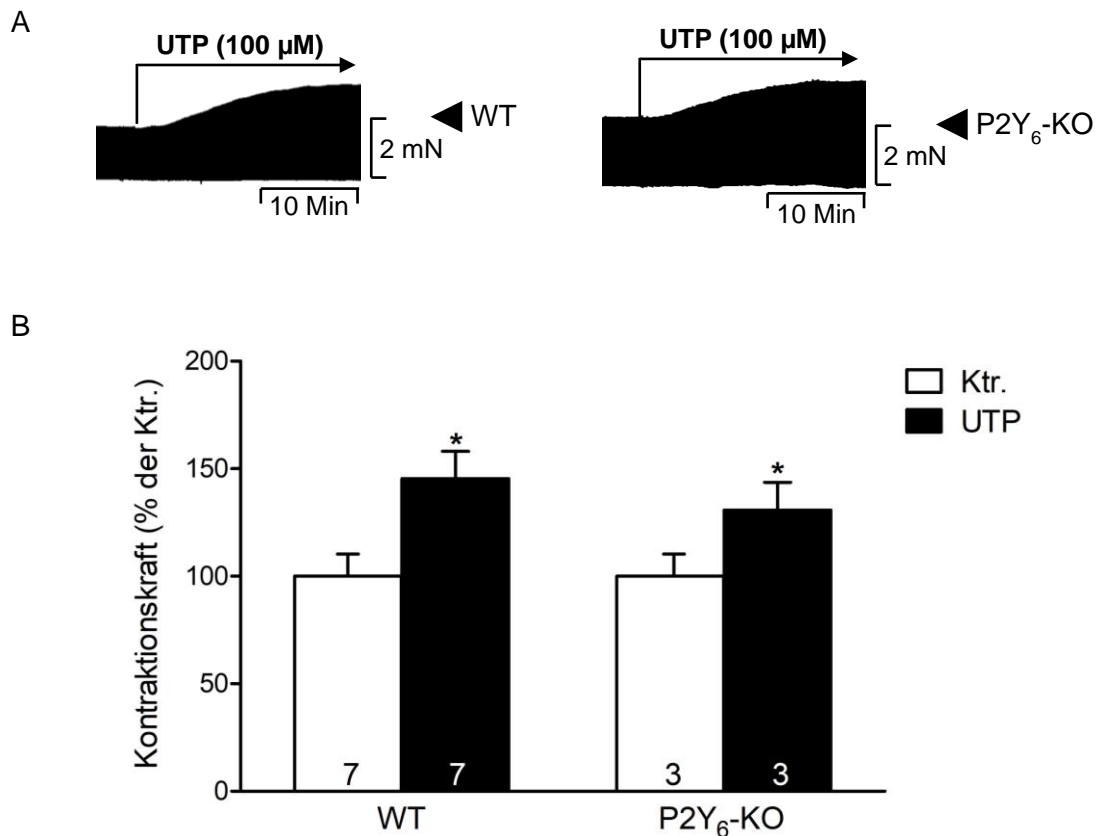


Abb. 16: Positiv inotroper Effekt von 100 μ M UTP im Vorhof von WT- bzw. P2Y₆-KO-Mäusen. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Mechanogramm (A) bzw. ein Säulendiagramm (B). In dieser Abbildung ist die Kontraktionskraft (in % der Ktr.) vor (Ktr.) und nach UTP-Gabe abgebildet. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in % von der unbehandelten Kontrolle sowie auf der Abszisse ist die Quantifikation des positiv inotropen Effekts von UTP bei WT- vs. KO-Mäusevorhöfen im Vergleich vor und nach UTP-Gabe abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus sieben bzw. drei unabhängigen Versuchen und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der durchgeführten Messungen. * $p < 0,05$ vs. Ktr. (einseitiger t-Test)

4.6 Wirkung von P2Y-Rezeptorantagonisten auf den Effekt von UTP in menschlichen und Mausvorhöfen

In weiteren Kontraktionsexperimenten mit zwei kürzlich entwickelten P2Y₂- oder P2Y₄-Rezeptorantagonisten (AR-C118925: Rafehi et al., 2017a; PSB-1454: Rafehi et al., 2017b) schwächte 1 μ M AR-C118925 (IC₅₀ = 0,1–1 μ M für den P2Y₂-Rezeptor) die positive inotrope Wirkung von 100 μ M UTP in rechten Vorhofproben nicht. Ebenso konnte 1 μ M PSB-1454 (IC₅₀ = 0,75–1 μ M für den P2Y₄-Rezeptor) die positive inotrope Wirkung von 100 μ M UTP in Präparaten des rechten Vorhofs nicht blockieren (n = 4–6 bei drei bis vier Patienten, Abb. 17 A/B). Zum Vergleich wurden die gleichen Experimente

an linken Vorhofpräparaten von Mäusen durchgeführt, und es wurden dieselben Ergebnisse wie bei menschlichen Präparaten gefunden (Abb. 18 A/B).

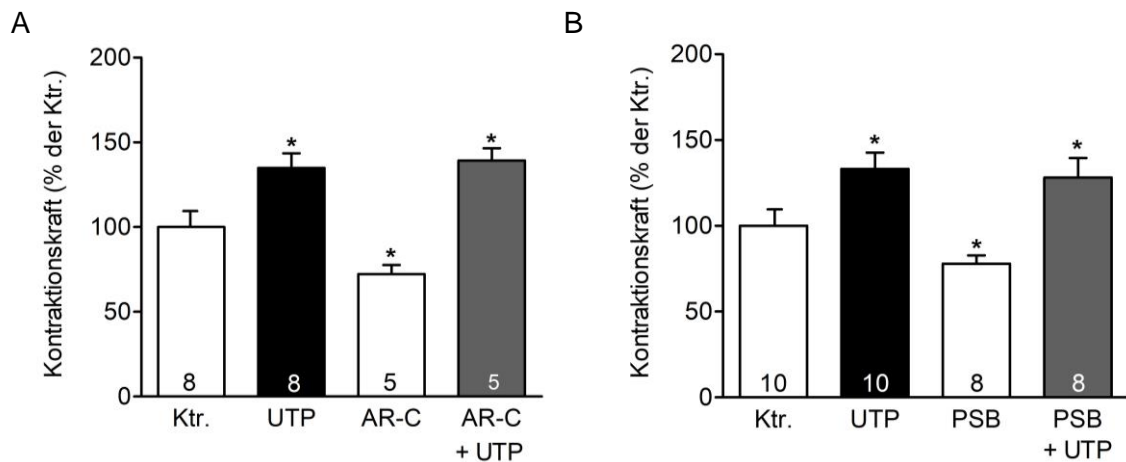


Abb. 17: Auswirkungen von P2Y-Rezeptorantagonisten auf die Inotropie von UTP in Mausvorhofpräparaten. Weder der P2Y₂-Rezeptorantagonist AR-C118925 (1 μ M) (A) noch der P2Y₄-Rezeptorantagonist PSB-1454 (1 μ M) (B) schwächte die positiv inotrope Wirkung von 100 μ M UTP in linken Vorhofpräparaten von Mäusen. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in % von der unbehandelten Kontrolle (Ktr.) sowie auf der Abszisse ist die Quantifikation des positiv inotropen Effekts von UTP bei WT-Mäusevorhöfen im Vergleich vor und nach UTP-Gabe sowie nach Inkubation mit den Rezeptorantagonisten abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus 5-10 unabhängigen Versuchen (n=5-10) und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *p < 0,05 vs. Ktr.

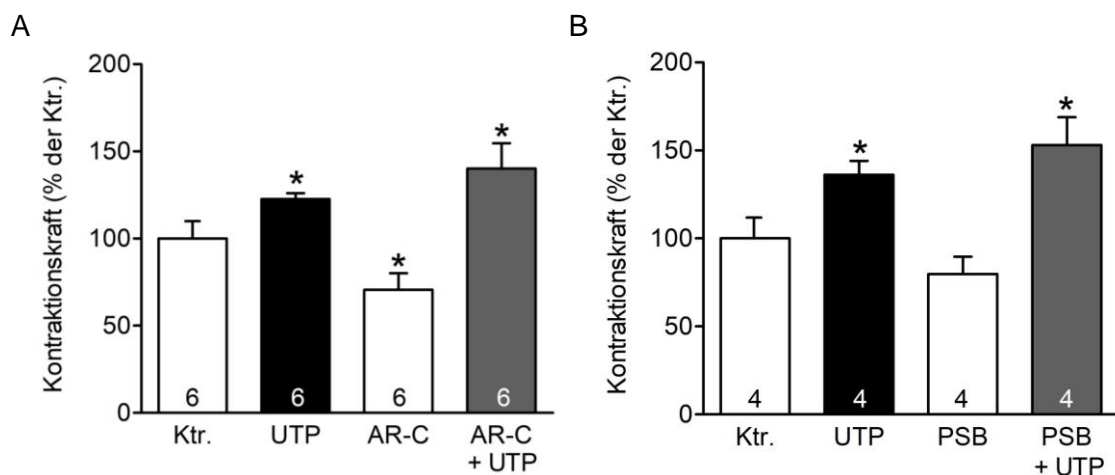
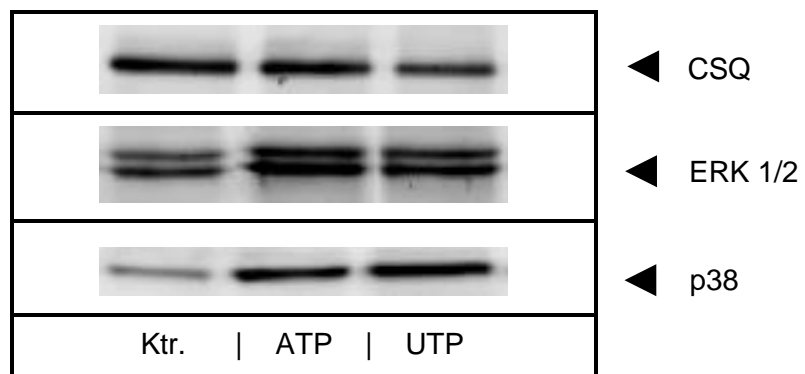


Abb. 18: Auswirkungen von P2Y-Rezeptorantagonisten auf die Inotropie von UTP in menschlichen Vorhofpräparaten. Weder der P2Y₂-Rezeptorantagonist AR-C118925 (1 μ M) (A) noch der P2Y₄-Rezeptorantagonist PSB-1454 (1 μ M) (B) schwächte die positiv inotrope Wirkung von 100 μ M UTP in menschlichen Vorhofpräparaten. Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in % von der unbehandelten Kontrolle (Ktr.) sowie auf der Abszisse ist die Quantifikation des positiv inotropen Effekts von UTP bei den menschlichen Vorhofpräparaten im Vergleich vor und nach UTP-Gabe sowie nach Inkubation mit den Rezeptorantagonisten abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus vier bis sechs unabhängigen Versuchen (n=4-6 von 3-4 Patienten) und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *p < 0,05 vs. Ktr.

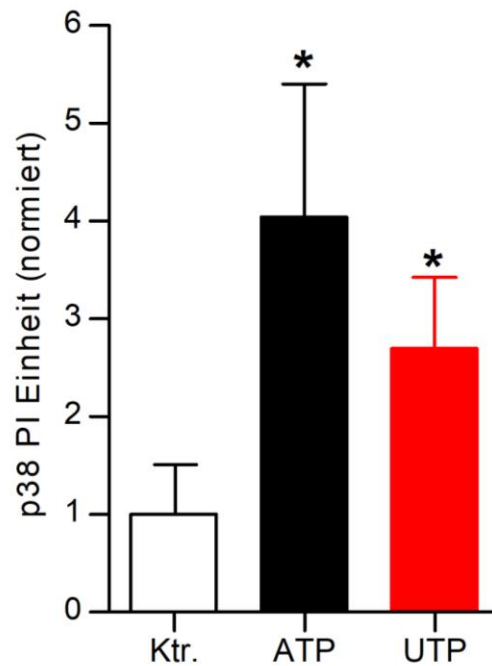
4.7 Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK in adulten humanen Vorhofpräparaten

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die mögliche Beteiligung von p38- und ERK 1/2-MAPK in der Signaltransduktion von ATP und UTP in humanen Vorhofpräparaten untersucht. Die Vorhofpräparate wurden jeweils fünf Minuten mit 100 μ M ATP und UTP inkubiert (siehe Kapitel 3.4). In der anschließenden Quantifizierung des Western Blots konnte für 100 μ M ATP und UTP eine Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 im menschlichen Vorhof nachgewiesen werden (Abb. 14 A). Dabei lag der maximale Phosphorylierungszustand von p38 durch ATP bei $404\% \pm 116\%$ und durch UTP bei $270\% \pm 68\%$ im Vergleich zum Kontrollwert. Die Phosphorylierung von ERK 1/2 durch ATP lag bei $184\% \pm 11\%$ und durch UTP bei $181\% \pm 44\%$ (Abb. 14 B/C). Es erfolgten drei separate Präparationen für die p38- beziehungsweise ERK 1/2-MAPK. Als Beladungskontrolle für jeden Versuch diente die Proteinexpression von CSQ.

A



B



C

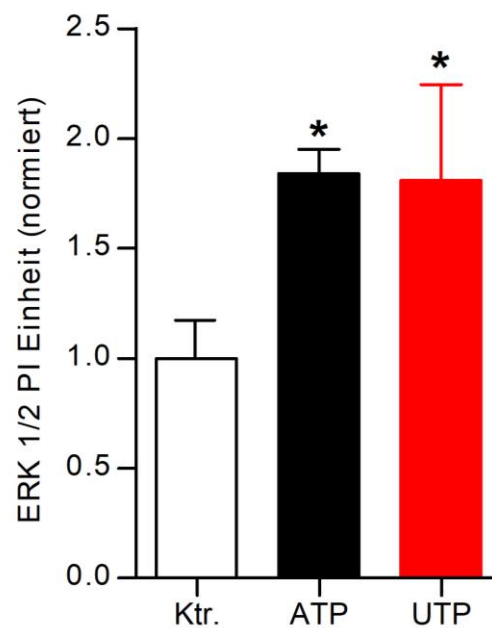


Abb. 19: Darstellung der Phosphorylierung von p38- und ERK 1/2-MAPK durch 100 μ M ATP bzw. UTP im Western Blot (A) oder als Säulendiagramm für p38- (B) oder ERK 1/2-MAPK (C) in adulten humanen Vorhofpräparaten. Die Vorhofpräparate wurden mit 100 μ M ATP bzw. UTP für fünf Minuten inkubiert und es erfolgte der Vergleich des Phosphorylierungszustand zu unbehandelten Zellen (Ktr.) (Abszisse). Der Phosphorylierungszustand ist auf der Ordinate dargestellt. Die Proteinexpression von CSQ diente als Ladungskontrolle. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$) und sind als auf die Kontrolle normierte Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p < 0,05$ vs. Ktr.

5. Diskussion

Bis heute hat man die mRNA aller ionotropen (P2X1-7) sowie metabotropen (P2Y1,2,4,6,11,12) Rezeptoren in Kardiomyozyten nachgewiesen (Khakh et al., 2001; Abbracchio et al., 2006). Zwischen den Spezies gibt es erhebliche Unterschiede in der Subrezeptorexpression (Moore et al., 2001). Die P2Y-Rezeptoren sind im Vergleich zu den P2X-Rezeptoren G-Protein-gekoppelt und aktivieren davon die Adenylatcyclase und vermitteln die Rezeptoraktivität via cAMP sowie Phospholipase C (Vassort, 2001). Das purinerge System spielt eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Regulation (Erlinge et al., 2008). Für ATP und UTP sind positiv-inotrope Effekte am Myokard von Ratte, Maus sowie beim Menschen nachgewiesen worden (Gergs et al., 2008; Gergs et al., 2014).

Eine Aktivierung der MAPK innerhalb der Signalkaskade durch extrazelluläres ATP und UTP ist bereits beschrieben worden (Abbracchio et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit gelang es, eine zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 in Maus- und Rattenkardiomyozyten sowie eine MAPK-Phosphorylierung durch ATP und UTP in menschlichen Vorhöfen nachzuweisen.

Die aktuellen Ergebnisse der zeitabhängigen Phosphorylierung konnte bekannte Daten für neonatale Rattenkardiomyozyten (Pham et al., 2003; Shainberg et al., 2009) sowie adulte Mauskardiomyozyten sowie menschlichen Vorhofzellen erweitern. Insgesamt zeigt sich eine maximale Phosphorylierung nach 5-10 Minuten. Mit einer Ausnahme erreichten alle zeitabhängigen Versuchskonstellationen ihr Ausgangsniveau. Dies konnte im vorliegenden Fall erstmals auch für UTP nachgewiesen werden. Eine zeit- und konzentrationsabhängige Phosphorylierung der MAPK durch ATP ist bereits für andere, hauptsächlich andere Zelltypen (Caco-2-, EAhy 926-Endothelzellen, PC12-Zellen) bekannt und hierbei zeigte sich auch ein unterschiedliches Konzentrations- und Zeitmaximum (Soltoff et al., 1998, Swanson et al., 1998, Markou et al., 2003; Vázquez-Cuevas et al., 2010). Für ATP wird beispielsweise eine maximale Phosphorylierung der MAPK innerhalb von zwei bis fünf Minuten nach entsprechender Inkubation beschrieben (Buzzi et al., 2009). Frühere Studien beschrieben einen Anstieg der ERK 1/2-Phosphorylierung in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Gegenwart von 100 μ M UTP nach 10 Minuten (Morris et al., 2004). Zudem sind maximale Stimulationen der MAPK nach Applikation von Trinukleotiden in Zellkulturen nach 10-20 Minuten nachgewiesen (Huwiler et al., 1997).

Bei der konzentrationsabhängigen Phosphorylierung ergab sich ein einheitlicheres Ergebnis. Der Phosphorylierungszustand verdoppelt sich bei den neonatalen Ratten- und adulten Mausekardiomyozyten nach fünf Minuten sowie der maximalen Konzentration von 100 μ M ATP und UTP im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 5, 7, 9 und 11). Das Konzentrationsmaximum lag hierbei bei 100 μ M ATP bzw. UTP. Höhere Konzentrationen wären sehr unphysiologisch bzw. haben in anderen Untersuchungen zu keiner zusätzlichen Phosphorylierungen der MAPK geführt (Soltoff et al., 1998; Swanson et al., 1998; Sellers et al., 2001).

Der Effekt der P2-Rezeptoraktivierung wird durch G-Proteine und konsekutivem PLC/IP₃-Signalweg sowie Adenylatcyclase/cAMP-Signalweg mediert (Abbraccio et al., 2006). Die konsekutive Ca²⁺-Erhöhung aktiviert weitere Signalkaskaden wie die Proteinkinase C, Phospholipase A₂, NO-Synthetase sowie Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (Vassort, 2001). Die Mehrzahl der P2Y-Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C/IP₃-Signalkaskade. Die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren ist im allgemeinen mit einer Stimulation unterschiedlicher MAPK, insbesondere ERK 1/2, assoziiert (Santiago-Pérez et al., 2001; Sellers et al., 2001). In kardialen Fibroblasten konnte der rasche Anstieg der ERK durch den Gq-assoziierten Phospholipase C-Inhibitor U73122 aufgehoben werden (Murasawa et al., 1998).

Die Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 durch 100 μ M UTP konnte im Vergleich zur Phosphorylierung nach Inkubation mit dem Hemmstoff der Adenylatcyclaseaktivität SQ22526, dem PLC-Hemmstoff U73122 sowie dem AP-1 Transkriptionsfaktorinhibitor U0126 reduziert werden (Abb. 13). Mit U0126 erreichte das Phosphorylierungsniveau von p38 und ERK 1/2 einen Wert, der sogar unterhalb des Kontrollniveaus lag (Abb. 13 A/B/C). Die anderen Hemmstoffe erreichten jeweils das Kontrollniveau (Abb. 13 A/B/C).

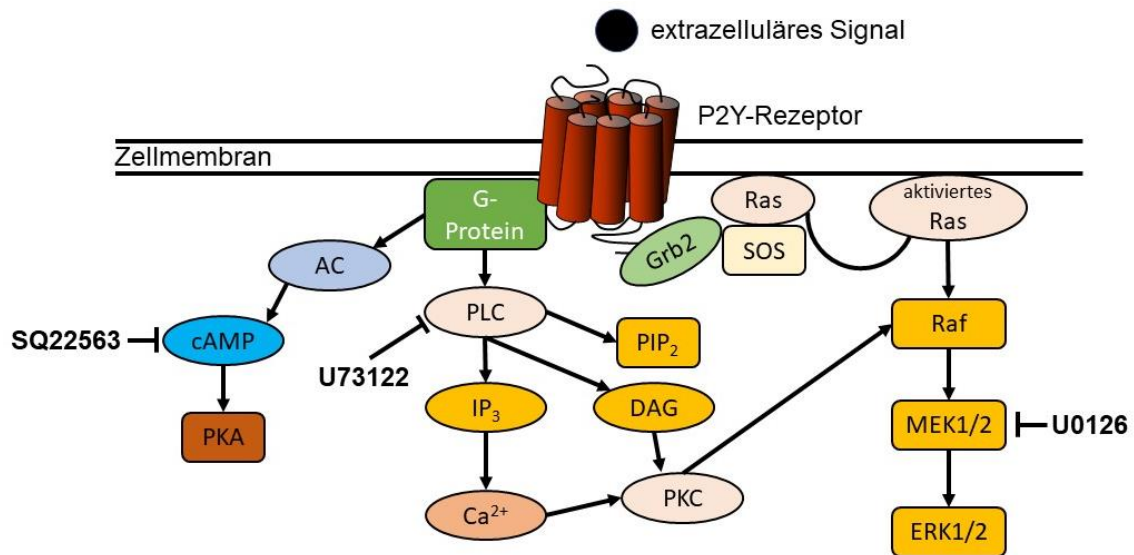


Abb. 20: Schematische Darstellung der Signalkaskaden nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli des P2Y-Rezeptors mit Wirkort der Signalkaskadeinhibitoren (SQ22563, U73122, U0126) (modifiziert nach Karlson et. al., 2005; Burnstock, 2014)

U0126 als MEK 1/2-Inhibitor inhibiert die Phosphorylierung der ERK 1/2-MAPK. Eine Inhibierung der p38-MAPK war bei einer eigenständigen und MEK 1/2-unabhängigen Signalkaskade weniger wahrscheinlich (Han et al., 1994; Lee et al., 1994). Nichtsdestotrotz ergab sich dies in der aktuellen Arbeit sowie in weiteren Untersuchungen (Gergs et al., 2018). Möglicherweise gibt es hier eine Verbindung der MAPK-Kaskaden über Gerüstproteine wie β -Arrestin oder G-Proteine (Brown und Sacks, 2009), MAPK-Phosphatasen (Liu und Molkentin, 2016), MAPK-KIM (Kinase Interactions Motif) (Peti und Page, 2013) oder die spezifischen Inhibitoren haben jeweils auch unspezifische inhibitorische Effekte. So wurde für die spezifischen MEK1 bzw. MEK1/2-Hemmstoffe SB203580 und U0126 ebenfalls eine Hemmung der p38-MAPK bereits nachgewiesen (Daum et al., 1998; Huth et al., 2016). Die Relevanz dieser gegenseitigen Beeinflussung erscheint aktuell unklar. So könnte dies einen gegenseitigen Regulierungsmechanismus repräsentieren (Dickinson et al., 2011). Die nahezu gleichwertige Inhibition der durch UTP induzierten p38- sowie ERK 1/2-MAPK-Phosphorylierung durch den PLC-Inhibitor U73122 bzw. den Hemmstoff der Adenylatcyclaseaktivität SQ22563 spricht jedenfalls für eine Vernetzung der Signalkaskadewege nach Aktivierung durch einen extrazellulären Stimulus. Die Aktivierung des P2Y₁₁-Rezeptors durch ATP führt zu einem Anstieg von IP₃ sowie cAMP und konsekutiv zu einer intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung, wohingegen die Aktivierung des gleichen Rezeptors durch UTP cAMP- bzw. IP₃-unabhängig verläuft (White et al., 2003).

Zur Bestimmung der Subrezeptorspezifität erfolgte zunächst eine Inkubation mit den Rezeptorantagonisten gefolgt von einer Stimulation mit UTP. Der Effekt von UTP wird nach bisherigen Erkenntnissen allgemein über P2Y₂-, P2Y₄-, P2Y₆-Rezeptoren (Erlinge, 2008) oder P2Y₁₁-Rezeptoren (White et al., 2003) vermittelt. In einer PC12-Zelllinie wird der Effekt von UTP vor allem durch den P2Y₂-Rezeptor vermutet (Soltoff et al., 1998). Diese Annahme erfolgte jedoch nicht durch Untersuchungen mit Antagonisten, sondern durch die für den P2Y₂-Rezeptor bekannte äquipotente Stimulation der MAPK durch ATP und UTP (Burnstock und Williams, 2000). In menschlichen Herzmuskelzellen ist vor allem der P2Y₂-Rezeptor vorhanden (Hou et al., 1999). In deutlich geringerer Konzentration wurde der P2Y₄-Rezeptor nachgewiesen. Allerdings gelang der Nachweis des P2Y₄-Rezeptor mittels PCR nicht immer (Wihlborg et al., 2006), sodass ein positiv inotroper Effekt in menschlichen Herzmuskelzellen durch den P2Y₂-Rezeptor angenommen werden könnte.

Die UTP-abhängige Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 konnte durch PPADS unterdrückt werden. PPADS ist ein schwacher Inhibitor des P2Y₂-Rezeptors in Mauscardiomyozyten, aber ein effektiver Inhibitor des P2Y₄-Rezeptors (Communi et al., 1996a; von Kügelgen et al., 2006). Dies deutet auf eine Vermittlung der UTP-Effekte an Mauscardiomyozyten eher durch den P2Y₄-Rezeptor. Durch Suramin konnte hier die UTP-abhängige Phosphorylierung von ERK 1/2 aber nicht von p38 geblockt werden. Da Suramin ein kompetitiver Antagonist am P2Y₂-, jedoch nicht am P2Y₄-Rezeptor ist, kann aufgrund der unterschiedlichen Antagonisierung der verschiedenen Signalkaskaden von der Beteiligung mehrerer Rezeptortypen ausgegangen werden (von Kügelgen et al., 2006). Reactive blue 2 und DPCPX hatten keinen Effekt auf die Phosphorylierung der MAPK. Zudem fiel ein hoher Phosphorylierungszustand in Gegenwart der reinen Antagonisten auf. Reactive blue 2 hat eigentlich den gleichen Antagonismus an P2-Rezeptoren wie Suramin. Die Inhibition durch Reactive blue 2 ist aufgrund einer engen Konzentrationsbreite und Wirkzeit sehr variabel (Ralevic und Burnstock, 1998). Das eingesetzte UTP kann rasch degradiert worden sein und somit zur Aktivierung des P2Y₆-Rezeptors führen, der insbesondere durch UDP aktiviert wird. Zudem ist eine unterschiedlich starke Inhibition der Exonukleasen durch die Rezeptorantagonisten bekannt (Chen et al., 1996). Im Mausherz wird ERK 1/2 durch DUSP1, DUSP4 und DUSP10 und p38 wird durch DUSP6 dephosphoryliert (Liu und Molkentin, 2016). PKA kann DUSP phosphorylieren und die Wirkung von DUSP auf ERK 1/2 und p38 hemmen, sofern ERK 1/2 nicht phosphoryliert und damit weniger aktiv ist, was zu einer Stimulierung der Aktivierung von Proteinkinasen führt (Saxena et al., 1999). Dies macht eine Interpretation des Antagonisteneffekt beim Einsatz von natürlichen Agonisten und

der möglichen zusätzlichen Wirkung ihrer Abbauprodukte schwierig (Ralevic und Burnstock, 1998). Durch den Einsatz stabiler Agonisten könnte diesem Effekt vorgebeugt werden (Malmsjö et al., 2000). Die Interpretation von P2-Rezeptoren in der Zellkultur sollte vorsichtig erfolgen (Ralevic und Burnstock, 1998). Die Stimulation von Astrozyten in vivo nur eingeschränkt bzw. teilweise gar nicht möglich ist. Wohingegen die Stimulation in der Zellkultur nach Isolation aus dem Rattenhirn durch ATP möglich ist (Jabs et al., 1997; Kimelberg et al., 1997). Ähnliches ergibt sich durch eine Hochregulation von P2Y₂-Rezeptoren in Zellen der Rattenspeicheldrüse im Laufe der Zellkultur im Vergleich zu frisch isolierten Zellen (Turner et al., 1997). Zudem kann der Antagonismus an P2-Rezeptoren zwischen verschiedenen Spezies unterschiedlich sein (von Kügelgen et al., 2006).

Die MAPK-Phosphorylierung durch ATP bzw. UTP erfolgt möglicherweise nicht via P2-Rezeptoren oder ob hier eine Vernetzung der Signalwege bzw. ein Agonismus an anderen Rezeptoren besteht (Lenz et al., 2009). Während der kardioprotektive Effekt von UTP via P2-Rezeptoren mediiert wird (Yitzhaki et al., 2005), konnte dies durch Golan et al. (2011) später in der Zellkultur nicht mehr nachgewiesen werden. Wir wollten wissen, welcher P2-Rezeptor den positiv inotropen Effekt von UTP vermittelt durch Untersuchungen der Kontraktionskraft an Vorhöfen. Der positiv inotrope Effekt von UTP im menschlichen Herzen nicht auf Suramin oder PPADS anspricht (Gergs et al., 2013b, 2014a, b). In der aktuellen Untersuchung konnte der positiv inotrope Effekt durch UTP und Einsatz der Rezeptorantagonisten bzw. bei den P2Y_{2,4,6}-Knock-out-Mäusen nicht aufgehoben werden. Suramin und PPADS weisen unterschiedliche Rezeptorsensitivitäten für verschiedene Spezies oder unspezifische Wirkungen auf Proteinkinasen und -phosphatasen auf. In der Arbeit von Shainberg et al. (2009) erreichte die Wirkung von UTP auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 nach 5 Minuten ein Maximum und U0126 blockierte die ERK 1/2-Phosphorylierung. UTP (300 µM, 5 min) erhöhte die ERK-Phosphorylierung in glatten Gefäßmuskelzellen in Kultur und eine Vorinkubation (20 min) mit dem MAP-Kinaseinhibitor PD098059 (10 µM) hob die ERK-Phosphorylierung auf (Harper et al. 1998). Unterschiedliche Studien haben einen positiv inotropen Effekt durch pharmakologische (U0126) oder genetische Inhibition der MAPK-Kinasen gezeigt (Kaikkonen et al., 2014; Liao et al., 2002). Dieser positiv inotrope Effekt wurde auf die Hemmung der Aktivität von PP2A (Kaikkonen et al., 2014) und eine erhöhte Ca²⁺-Empfindlichkeit von Myofilamenten zurückgeführt (Liao et al., 2002). Das eben Genannte ist ggf. eine Folge der Aktivierung einer Kinase der leichten Kette von Myosin und der Hemmung einer Phosphatase der leichten Kette von Myosin (Kwon et al., 2015). In der vorliegenden Studie war die Auswirkung von UTP auf die ERK 1/2-

Phosphorylierung vorübergehend, wohingegen die Auswirkung von UTP auf die Kontraktionskraft dauerhaft war. Der anfängliche positiv inotrope Effekt von UTP kann von der transienten ERK-Phosphorylierung abhängen. Ebenso induzierte die Aktivierung von PKA nach Stimulierung von β -Adrenozeptoren durch Isoprenalin einen vorübergehenden Anstieg der p38-Phosphorylierung in isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten und dieser Anstieg wurde durch SB203580 blockiert (Zheng et al., 2000). Darüber hinaus potenzierte SB203580 die kontraktile Reaktion auf Isoprenalin in adulten Maus-Kardiomyozyten (Zheng et al., 2000). p38 stimuliert eine negative Rückkopplungsschleife bei PKA-vermittelten kontraktile Reaktionen oder Apoptose (Communal et al., 2000; Zheng et al., 2000).

Der Effekt von UTP ist nicht allein durch die P2Y_{2,4,6}- Rezeptoren bedingt. Im ZNS der Maus, der Schweineohrarterie sowie in menschlichen Enterochromaffinen-Zellen (Calvert et al., 2004; Rayment et al., 2007, Liñán-Rico et al., 2017) gibt es Hinweise auf Purin- bzw. Pyrimidin-rezeptorunabhängige Effekte. Beispielsweise zeigten Liñán-Rico et al., dass UTP wahrscheinlich einen direkten, P2Y-unabhängigen, Einfluss auf einen bisher unbekannten Kaliumkanal hat (Liñán-Rico et al., 2017). Ebenso ist eine Aktivierung des P2X₁-Rezeptor durch UTP diskutiert worden (Froldi et al., 1997). In weiteren Versuchen sollte man überprüfen, ob UTP ein Agonist an P2X-Rezeptoren ist oder ob heteromere P2-Rezeptoren hierfür verantwortlich sind (Ecke et al., 2008; Ribeiro-Filho et al., 2016).

Die Phosphorylierung von p38 bzw. ERK 1/2 nach Stimulation mit ATP oder UTP konnte auch in menschlichen Vorhöfen nachgewiesen werden. Dies offenbart die Möglichkeit für zukünftige klinische Einsätze. Beispielsweise könnte man einen lokalen Einsatz von UTP während der Herzkatheteruntersuchung nach Herzinfarkt zur Besserung der Postkonditionierung erwägen.

5.1 Klinischer Ausblick

Neben den bereits etablierten P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten Prasugrel, Clopidogrel und Ticagrelor (Cattaneo et al., 2011) und deren weit verbreiteten Einsatz bei der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen (Zeidner et al., 2008) und P2Y₂-Rezeptoragonisten Diquafosol (Koh et al., 2013) bei trockenem Auge und Denufosol bei zystischer Fibrose (Ratjen et al., 2012) gibt es weitere Untersuchungen bezüglich der P2-Rezeptoren, ihrer Agonisten und Antagonisten sowie der Signalkaskade.

Antihypertensive Effekte sind in vivo bei der Maus nachgewiesen. Nach intravenöser Applikation von INS45973, ein P2Y_{2,4}-Rezeptoragonist und UTP-Analogon kam es zur Reduktion des Blutdrucks und zur vermehrten Natriumexkretion bei der WT-Maus im Vergleich zur P2Y₂-Knock-out-Maus (Rieg et al., 2011). Aufgrund der vermehrten mRNA-Expression des P2X₁- und P2Y₂-Rezeptors bei an Herzinsuffizienz erkrankten Ratten- und Menschenmyokard, wird eine Rolle in der Herzinsuffizienz angenommen (Hou et al., 1999). Zudem wurden verschiedene Agonisten für den Einsatz am P2Y₁₁-Rezeptor zur Verbesserung des Herzzeitvolumens bei Patienten mit Kreislaufschock und P2Y₁₁-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit Herzinsuffizienz erwogen (Balogh et al., 2005). In vivo konnte durch lokale Applikation von ATP-MgCl₂ während einer Herzkatheteruntersuchung an Kindern eine vergleichbare Reduktion des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) wie durch Tolazolin (α_2 -Adrenozeptor-Antagonist) nachgewiesen werden (Brook et al., 1994). Bei der ischämischen Postkonditionierung sind neben UTP (siehe unten) auch die MAPK untersucht. So konnte in vivo bei der Maus eine Reduktion der Infarktgröße durch den Einsatz von spezifischen MAP-Kinaseinhibitoren (PD098059) nachgewiesen werden (Darling et al., 2005). Weitere Untersuchungen decken die Grundlage für die P2Y-gekoppelte Kontrolle des endothelialen Gewebefaktors (Tissue factor) auf und weisen darauf hin, dass das eine attraktive neue Strategie zur Kontrolle von Gefäßentzündungen und Thrombogenität im Zusammenhang mit endothelialen Dysfunktionen sein könnte (Liu et al., 2016).

Die klinischen sowie pathophysiologischen Effekte von ATP und Adenosin sind vielfach untersucht worden, wohingegen die Effekte von UTP auf das kardiovaskuläre System noch nicht im Detail bekannt sind (Abbracchio und Burnstock 1998; Reid et al., 2005). Pathophysiologisch wurde durch UTP ein hypertropher Effekt auf Kardiomyozyten beobachtet, der durch ATP nicht nachgewiesen werden konnte (Pham et al., 2003). Der durch UTP und ATP gleichermaßen aktivierte P2Y₂-Rezeptor spielt eine Rolle in der Atherosklerose durch Stimulation proinflammatorischer Zelladhäsionsmoleküle und erhöhter Adhäsion von Monozyten (Seye et al., 2002). Wohingegen UTP einen prä- sowie postischämisch protektiven Effekt auf Kardiomyozyten zu haben scheint, dies konnte durch in vivo behandelte Mauskardiomyozyten mit UTP mittels Verkleinerung des Ischämieareals sowie eine schnellere postischämische Erholung erreicht werden (Yitzhaki et al., 2005; Yitzhaki et al., 2006). ATP sowie UTP aktivieren jeweils ein Gq-Protein und nachfolgend MAP-Kinasen (Gendron et al., 2003). Die unterschiedliche Antwort trotz gleicher Signalkaskade wird über eine unterschiedliche Rezeptoraktivierung erklärt (Pham et al., 2003). Ein weiterer kardialer Effekt von UTP ist ein positiv inotroper Effekt (Gergs et al., 2014). Dies wurde in vivo in Maus- und

Rattenkardiomyozyten nachgewiesen sowie ein möglicher Zusammenhang durch Anstieg von UTP in der kardialen Ischämie (Wihlborg et al., 2006). Kardiale vasodilatative Effekte scheinen durch UTP via P2Y₂- und P2Y₄-Rezeptor vermittelt (Wihlborg et al., 2003; Burnstock, 2017). Vasokonstriktive Effekte durch UTP in den koronaren Gefäßen wurden in vitro ebenfalls diskutiert (Malmjö et al., 2000). Es werden nicht nur neue klinische Therapiemöglichkeiten untersucht, sondern auch neue Effekt von bereits etablierten Therapien. Es wird eine Reduktion des pulmonalen Vasospasmus bei der pulmonalen Hypertonie durch P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten angenommen (Kennedy et al., 2013). Aufgrund der relativen Rezeptoraffinität von UTP und UDP könnte ein klinischer Einsatz denkbar sein.

6. Zusammenfassung

UTP ist als intra- sowie extrazelluläres Molekül in allen Geweben von Säugetieren vorhanden. Intrazellulär ist es neben unterschiedlichen metabolischen Prozessen vor allem für die RNA-Synthese zuständig. Das extrazelluläre Vorkommen ist hauptsächlich durch Hypoxie, Ischämie, mechanischen Stress und erhöhte Durchblutung bedingt. Die extrazelluläre Wirkung von UTP wird durch P2Y-Rezeptoren vermittelt. Die Purinozeptoren unterteilt man in die P1-Rezeptoren sowie die P2Y-Rezeptoren, die G-Protein-gekoppelt sind und die P2X-Rezeptoren als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle. UTP ist vor allem ein Agonist an P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Rezeptoren. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) kommen in allen eukaryontischen Zellen vor. Extrazelluläre Stimuli aktivieren drei Ebenen der MAPK. Daraus ergibt sich z.B. eine Induktion und Regulation des Zellzyklus. Die MAPK werden in drei Familien eingeteilt. Die ERK-Familie, die p38-Kinase-Familie sowie die JNK-Familie.

Extrazelluläres ATP und UTP aktiviert konzentrations- und zeitabhängig MAP-Kinasen in neonatalen Ratten- sowie adulten Mauscardiomyozyten. Es wurden Antikörper für die phosphorylierte Form von p38 und ERK 1/2 eingesetzt. Durch den Einsatz von UTP und der Rezeptorantagonisten PPADS, Suramin, RB2 sowie DPCPX konnte für die adulten Mauscardiomyozyten eine spezifische Aktivierung bzw. Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges (p38 und ERK 1/2) gezeigt werden, die eine Vermittlung der Effekte von UTP auf Mauscardiomyozyten durch den P2Y₄-Rezeptor nahelegt. Der Phosphorylierungszustand von p38 und ERK 1/2 durch UTP konnte im Vergleich zum Phosphorylierungszustand nach Inkubation mit den Signalkaskadehemmstoffen SQ22526, U73122 sowie U0126 reduziert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beeinflussung der Signalkaskadewege nach Aktivierung durch einen extrazellulären Stimulus. Möglicherweise aktiviert UTP die MAPK über einen weiteren Rezeptortyp, da in den Kontraktionsuntersuchungen an menschlichen sowie Mausvorhöfen kein Unterschied in der Kontraktionskraft bei P2Y₂-, P2Y₄- und P2Y₆-Knock-out-Mäusen sowie nach Einsatz spezifischer Rezeptorantagonisten (AR-C118925, PSB-1454) kein Unterschied bei der Inotropie festgestellt werden konnte.

ATP und UTP erhöhen den Phosphorylierungszustand von p38- und ERK 1/2-MAPK in isolierten menschlichen rechten Vorhöfen.

7. Literaturverzeichnis

- Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Japanese Journal of Pharmacology* 78: 113-45.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological Reviews* 58: 281–341.
- Aharon A (2004) Cerebral activation of mitogen-activated protein kinases after circulatory arrest and low flow cardiopulmonary bypass*1. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 26: 912–919.
- Aimond F (2000) Simultaneous Activation of p38 MAPK and p42/44 MAPK by ATP Stimulates the K⁺ Current ITREK in Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 39110–39116.
- Anderson CM, Parkinson FE (1997) Potential signalling roles for utp and udp: sources, regulation and release of uracil nucleotides. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 387–392.
- Asrih M, Pellioux C, Papageorgiou I, Lerch R, Montessuit C (2011) Role of ERK1/2 activation in microtubule stabilization and glucose transport in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301: E836-E843.
- Ayyanathan K, Webb TE, Sandhu AK, Athwal RS, Barnard EA, Kunapuli SP (1996) Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218:783–788.
- Balogh J, Wihlborg AK, Isackson H, Joshi BV, Jacobson KA, Arner A, Erlinge D (2005) Phospholipase C and cAMP-dependent positive inotropic effects of ATP in mouse cardiomyocytes via P2Y1-like receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39: 223–230.
- Banfi C, Ferrario S, Vincenti O de, Ceruti S, Fumagalli M, Mazzola A, D' Ambrosi N, Volontè C, Fratto P, Vitali E, Burnstock G, Beltrami E, Parolari A, Polvani G, Biglioli P, Tremoli E, Abbracchio MP (2005): P2 receptors in human heart: upregulation of P2X6 in patients undergoing heart transplantation, interaction with TNFalpha and potential role in myocardial cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39: 929–939.
- Bar I, Guns PJ, Metallo J, Cammarata D, Wilkin F, Boeynaems JM, Bult H, Robaye, B (2008) Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 74: 777–784.
- Bleasdale JE, Bundy GL, Bunting S, Fitzpatrick FA, Huff RM, Sun FF, Pike JE (1989) Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73, 122. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research* 19: 590–593.
- Bleasdale JE, Thakur, NR, Gremban RS, Bundy GL, Fitzpatrick FA, Smith RJ, Bunting S (1990) Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255: 756–768.
- Blouse GE, Guang L, Hilderman RH (1998) Characterization of ATP and P2 agonists binding to the cardiac plasma membrane Ap4A receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1375: 61–72.
- Bodin P, Burnstock G (2001) Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 38: 900–908.

- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G (1998) Molecular cloning and characterization of rat P2Y₄ nucleotide receptor. *British Journal of Pharmacology* 124: 428–430.
- Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK. The many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 1061–1095.
- Böhm M, Brückner R, Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Starbatty J (1986) Role of guanine nucleotide-binding protein in the regulation by adenosine of cardiac potassium conductance and force of contraction. Evaluation with pertussis toxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 332: 403–405.
- Börsch-Haubold AG, Ghomashchi F, Pasquet S, Goedert M, Cohen P, Gelb MH, Watson SP (1999) Phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in platelets is mediated by multiple stress-activated protein kinase pathways. *European Journal of Biochemistry* 265: 195–203.
- Borst MM, Schrader J (1991) Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circulation Research* 68: 797–806.
- Braun OÖ, Lu D, Aroonsakool N, Insel PA (2010) Uridine triphosphate (UTP) induces profibrotic responses in cardiac fibroblasts by activation of P2Y₂ receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49: 362–369.
- Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG, Schwiebert EM (2001) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 6621–6630.
- Brook MM, Fineman JR, Bolinger AM, Wong AF, Heymann MA, Soifer SJ (1994) Use of ATP-MgCl₂ in the evaluation and treatment of children with pulmonary hypertension secondary to congenital heart defects. *Circulation* 90: 1287–1293.
- Brown MD, Sacks DB (2009) Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular Signaling* 21: 462–469.
- Burnstock G (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*: 239–248.
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*: 107–118.
- Burnstock G, Williams M (2000) P₂ Purinergic Receptors: Modulation of Cell Function and Therapeutic Potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295: 862–869.
- Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 1471–1483.
- Burnstock G (2014) The Erasmus Lecture 2012. The concept of cotransmission: focus on ATP as a cotransmitter and its significance in health and disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22: 1–17.
- Burnstock G (2014) Purinergic signalling. From discovery to current developments. *Experimental physiology* 99: 16–34.
- Burnstock G, Pelleg A (2015) Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic Signalling* 11: 1–46.
- Burnstock G (2017) Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research* 120: 207–228.

- Buvinic S, Briones R, Huidobro-Toro JP (2002) P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *British Journal of Pharmacology* 136: 847–856
- Buzzi N, Bilbao PS, Boland R, Boland AR de (2009) Extracellular ATP activates MAP kinase cascades through a P2Y purinergic receptor in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790: 1651–1659.
- Calvert JA, Atterbury-Thomas AE, Leon C, Forsythe ID, Gachet C, Evans RJ (2004) Evidence for P2Y1, P2Y2, P2Y6 and atypical UTP-sensitive receptors coupled to rises in intracellular calcium in mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia. *British Journal of Pharmacology* 143: 525–532.
- Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 117–122.
- Cattaneo M (2011) The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood* 117: 2102–2112.
- Charlton SJ, Brown CA, Weisman GA, Turner JT, Erb L, Boarder MR (1996) PPADS and suramin as antagonists at cloned P2Y- and P2U-purinoceptors. *British Journal of Pharmacology* 118: 704–710.
- Chen BC, Lee CM, Lin WW (1996) Inhibition of ecto-ATPase by PPADS, suramin and reactive blue in endothelial cells, C6 glioma cells and RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Pharmacology* 119: 1628–34.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chemical reviews* 101: 2449–2476.
- Communal C, Colucci WS, Singh K (2000) p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *Journal of Biological Chemistry* 275: 19395–19400.
- Communi D, Parmentier M, and Boeynaems JM (1996) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 222: 303–308.
- Communi D, Boeynaems JM (1997) Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends in Pharmacological Science* 18: 83–86.
- Communi D, Robaye B, Boeynaems JM (1999) Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *British Journal of Pharmacology* 128: 1199–1206.
- Conley PB, Delaney SM (2003) Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y12 receptor in thrombosis. *Current opinion in hematology* 10: 333–338.
- Corriden R, Insel PA (2010) Basal release of ATP. An autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science Signaling* 3: re1.
- Cosentino S, Banfi C, Burbiel JC, Luo H, Tremoli E, Abbracchio MP (2012) Cardiomyocyte death induced by ischaemic/hypoxic stress is differentially affected by distinct purinergic P2 receptors. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 16: 1074–1084.
- Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR (1999) Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport. *Journal of Biological Chemistry* 274: 26461–26468.
- Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K (2005) Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts:

role of ERK1/2. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289: 26.

Daum G, Kalmes A, Levkau B, Wang Y, Davies MG, Clowes AW (1998) Pervanadate inhibits mitogen-activated protein kinase kinase-1 in a p38MAPK-dependent manner. *FEBS letters* 427: 271–274.

Davis RJ (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Molecular Reproduction and Development* 42: 459–467.

Dickinson RJ, Delavaine L, Cejudo-Marín R, Stewart G, Staples CJ, Didmon MP, Trinidad AG, Alonso A, Pulido R, Keyse SM (2011) Phosphorylation of the kinase interaction motif in mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-4 mediates cross-talk between protein kinase A and MAP kinase signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 38018–38026.

Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of Adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology* 68: 213–237.

Duncia JV, Santella JB, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE (1998) MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8: 2839–2844.

Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G (2008) Hetero-oligomerization of the P2Y₁₁ receptor with the P2Y₁ receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y₁₁ receptor. *The Biochemical Journal* 409: 107–116.

Erlinge D, Burnstock G (2008) P₂ receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling* 4: 1–20.

Erlinge D, Harnek J, van Heusden C, Olivecrona G, Jern S, Lazarowski E (2005) Uridine triphosphate (UTP) is released during cardiac ischemia. *International Journal of Cardiology* 100: 427–433.

Errede B, Levin DE (1993) A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Cell Biology* 254–260.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 18623–18632.

Folin O, Ciocalteu V (1927) On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 627–650.

Franke H, Krügel U, Illes P (2006) P₂ receptors and neuronal injury. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 452: 622–644.

Froldi G, Pandolfo L, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, Fassina G (1994) Dual effect of ATP and UTP on rat atria: which types of receptors are involved? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 349: 381–386.

Froldi G, Varani K, Chinellato A, Ragazzi E, Caparrotta L, Borea PA (1997) P_{2X}-purinoceptors in the heart: actions of ATP and UTP. *Life sciences* 60: 1419–1430.

Froldi G, Ragazzi E, Caparrotta L (2001) Do ATP and UTP involve cGMP in positive inotropism on rat atria? *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* 128: 265–274.

- Gendron FP, Newbold NL, Vivas-Mejia PE, Wang M, Neary JT, Sun GY, Gonzalez FA, and Weisman GA (2003) Signal transduction pathways for P2Y₂ and P2X₇ nucleotide receptors that mediate neuroinflammatory responses in astrocytes and microglial cells. *Biomedical Research* 14: 47–61.
- Gergs U (2004) Overexpression of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A Impairs Cardiac Function. *Journal of Biological Chemistry* 279: 40827–40834.
- Gergs U, Berndt T, Buskase J, Jones LR, Kirchhefer U, Müller FU, Schlüter KD, Schmitz W, Neumann J (2007) On the role of junctin in cardiac Ca²⁺ handling, contractility, and heart failure. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293: H728-H734.
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2008) A positive inotropic effect of ATP in the human cardiac atrium. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294: H1716-H1723.
- Gergs U, Boknik P, Schmitz W, Simm A, Silber RE, Neumann J (2009) A positive inotropic effect of adenosine in cardiac preparations of right atria from diseased human hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379: 533–540.
- Gergs U, Kirchhefer U, Buskase J, Kiele-Dunsche K, Buchwalow IB, Jones LR, Schmitz W, Traub O, Neumann J (2011) Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in neonatal rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51: 682–688.
- Gergs U, Böckler A, Ebelt H, Hauptmann S, Keller N, Otto V, Pönicke K, Schmitz W, Neumann J (2013a) Human 5-HT₄ receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386: 357–367.
- Gergs U, Dhein S, Rothkirch D, Neumann J (2013b) UTP and ATP induce transient target phosphorylation in cardiac myocytes. *Purinergic Signaling* 10: 389-390 (Abstract).
- Gergs U, Simm A, Bushnaq H, Silber RE, Neumann J (2014) A positive inotropic effect of UTP in the human cardiac atrium. *European Journal of Pharmacology* 724: 24–30.
- Gergs U, Rothkirch D, Hofmann B, Treede H, Robaye B, Simm A, Müller CE, Neumann J (2018) Mechanism underlying the contractile activity of UTP in the mammalian heart. *European Journal of Pharmacology*.
- Ghanem E, Robaye B, Leal T, Leipziger J, van Driessche W, Beauwens R, Boeynaems JM (2005) The role of epithelial P2Y₂ and P2Y₄ receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *British Journal of Pharmacology* 146: 364–369.
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *Journal of Physiologie* 80: 345–359.
- Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F (2018) Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology letters*.
- Goding JW, Grobбен B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1638: 1–19.
- Golan O, Issan Y, Isak A, Leipziger J, Robaye B, Shainberg A (2011) Extracellular nucleotide derivatives protect cardiomyocytes against hypoxic stress. *Biochemical Pharmacology* 81: 1219–1227.
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemistry Journal* 233: 309–319.
- Graham A, McLees A, Kennedy C, Gould GW, Plevin R (1996) Stimulation by the nucleotides, ATP and UTP of mitogen-activated protein kinase in EAhy 926 endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 117: 1341–1347.

- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808–811.
- Harper S, Webb TE, Charlton SJ, Ng LL, Boarder MR (1998) Evidence that P2Y₄ nucleotide receptors are involved in the regulation of rat aortic smooth muscle cells by UTP and ATP. *British Journal of Pharmacology* 124: 703–710.
- Hechler B, Nonne C, Roh EJ, Cattaneo M, Cazenave JP, Lanza F, Jacobson KA, Gachet C (2006) MRS2500 2-iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate, a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y₁ receptor with strong antithrombotic activity in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316: 556–563.
- Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A (2008) Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cardiovascular Research* 78: 108–115.
- Herold CL, Qi AD, Harden TK, Nicholas RA (2004) Agonist versus antagonist action of ATP at the P2Y₄ receptor is determined by the second extracellular loop. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 11456–11464.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL (1997) International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacological Reviews* 49: 253–278.
- Hiller G, Sundler R (1999) Activation of arachidonate release and cytosolic phospholipase A₂ via extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in macrophages stimulated by bacteria or zymosan. *Cellular Signalling* 11: 863–869.
- Hillmann P, Ko GY, Spinrath A, Raulf A, von Kügelgen I, Wolff SC, Nicholas RA, Kostenis E, Höltje HD, Müller CE (2009) Key determinants of nucleotide-activated G protein-coupled P2Y₂ receptor function revealed by chemical and pharmacological experiments, mutagenesis and homology modeling. *Journal of Medicinal Chemistry* 52: 2762–2775.
- Homolya L, Watt WC, Lazarowski ER, Koller BH, Boucher RC (1999) Nucleotide-regulated calcium signaling in lung fibroblasts and epithelial cells from normal and P2Y₂ receptor (-/-) mice. *Journal of Biological Chemistry* 274: 26454–26460.
- Horckmans M, Robaye B, Léon-Gómez E, Lantz N, Unger P, Dol-Gleizes F, Clouet S, Cammarata D (2012) P2Y₄ nucleotide receptor. A novel actor in post-natal cardiac development. *Angiogenesis* 15: 349–360.
- Hourani SM, Boon K, Fooks HM, Prentice DJ (2001) Role of cyclic nucleotides in vasodilations of the rat thoracic aorta induced by adenosine analogues. *British Journal of Pharmacology* 133: 833–840.
- Hou M, Malmsjö M, Möller S, Pantev E, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D (1999) Increase in cardiac P2X₁- and P2Y₂-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life sciences* 65: 1195–1206.
- Hou M, Harden TK, Kuhn CM, Baldetorp B, Lazarowski E, Pendergast W, Möller S, Edvinsson L, Erlinge D (2002) UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y₆ receptors. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 282: H784-92.
- Hrafnkelsdóttir T, Erlinge D, Jern S (2001) Extracellular nucleotides ATP and UTP induce a marked acute release of tissue-type plasminogen activator in vivo in man. *Thrombosis and Haemostasis* 85: 875–881.

- Huth HW, Albarnaz JD, Torres AA, Bonjardim CA, Ropert C (2016) MEK2 controls the activation of MKK3/MKK6-p38 axis involved in the MDA-MB-231 breast cancer cell survival. Correlation with cyclin D1 expression. *Cellular Signalling* 28: 1283–1291.
- Huwiler A, van Rossum G, Wartmann M, Pfeilschifter J (1997) Stimulation by extracellular ATP and UTP of the stress-activated protein kinase cascade in rat renal mesangial cells. *British Journal of Pharmacology* 120: 807–812.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Poon BY, Pagliardini S, Vrouwe SQ, Greer JJ, Funk, GD (2009) Tripartite purinergic modulation of central respiratory networks during perinatal development. The influence of ATP, ectonucleotidases, and ATP metabolites. *The Journal of Neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 14713–14725.
- Inoue K, Nakazawa K, Ohara-Imaizumi M, Obama T, Fujimori K, Takanaka A (1991) Antagonism by reactive blue 2 but not by brilliant blue G of extracellular ATP-evoked responses in PC12 pheochromocytoma cells. *British Journal of Pharmacology* 102: 851–854.
- Jabs R, Paterson IA, Walz W (1997) Qualitative analysis of membrane currents in glial cells from normal and gliotic tissue in situ. Down-regulation of Na⁺ current and lack of P2 purinergic responses. *Neuroscience* 81: 847–860.
- Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR (2003) Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23331–23342.
- Kaikkonen L, Magga J, Ronkainen VP, Koivisto E, Perjes Á, Chuprun JK, Vinge LE, Kilpiö T, Aro J, Ulvila J, Alakoski T, Bibb JA, Szokodi I, Koch WJ, Ruskoaho H, Kerkelä R (2014) p38 α regulates SERCA2a function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 67: 86–93.
- Karlson P: *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart, 2005, S. 473-507.
- Kauffmanstein G, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C (2004) Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2: 1980–1988.
- Kennedy C, Chootip K, Mitchell C, Syed NH, Tengah A (2013) P2X and P2Y nucleotide receptors as targets in cardiovascular disease. *Future Medicinal Chemistry* 5: 431–449.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews* 53: 107–118.
- Kimelberg HK, Cai Z, Rastogi P, Charniga CJ, Goderie S, Dave V, Jalonon TO (1997) Transmitter-induced calcium responses differ in astrocytes acutely isolated from rat brain and in culture. *Journal of Neurochemistry* 68: 1088–1098.
- Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac Hypertrophy and Impaired Relaxation in Transgenic Mice Overexpressing Triadin 1. *Journal of Biological Chemistry* 276: 4142–4149.
- Klingenberg D (2004) MEK/MAPK as a signaling element in ATP control of endothelial myosin light chain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286: 807.
- Knight GE, Bodin P, De Groat WC, Burnstock G (2002) ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *American Journal of Physiology* 282: F281–F288.

- Koh S, Ikeda C, Takai Y, Watanabe H, Maeda N, Nishida K (2013) Long-term results of treatment with diquafosol ophthalmic solution for aqueous-deficient dry eye. *Japanese Journal of Ophthalmology* 57: 440–6.
- Köttgen M, Löffler T, Jacobi C, Nitschke R, Pavenstädt H, Schreiber R, Frische S, Nielsen S, Leipziger J (2003) P2Y₆ receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 371–379.
- Köles L, Leichsenring A, Rubini P, Illes P (2011) P2 receptor signaling in neurons and glial cells of the central nervous system. *Advances in Pharmacology* 61: 441–493.
- Kudirka JC, Panupinthu N, Tesseyman MA, Dixon SJ, Bernie SM (2007) P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins. *The Journal of Cellular Physiology* 213: 54–64.
- Kügelgen von I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 110: 415–432.
- Kwon TH, Jung H, Cho EJ, Jeong JH, Sohn UD (2015) The Signaling Mechanism of Contraction Induced by ATP and UTP in Feline Esophageal Smooth Muscle Cells. *Molecules and Cells* 38: 616–623.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lambrecht G (2000) Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 340–350.
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK (1995) Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor. Potent activation by diadenosine tetraphosphate. *British Journal of Pharmacology* 116: 1619–1627.
- Lazarowski ER, Harden TK (1999) Quantitation of extracellular UTP using a sensitive enzymatic assay. *British Journal of Pharmacology* 127: 1272–1278.
- Lazarowski ER, Bouche RC, Harden TK (2000) Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31061–31068.
- Lazarowski ER, Boucher RC, and Harden TK (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular Pharmacology* 64:785–795.
- Lazarowski ER (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signalling* 8: 359–373.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739–746.
- Legssyer A, Poggioli J, Renard D, Vassort G (1988) ATP and other adenine compounds increase mechanical activity and inositol trisphosphate production in rat heart. *The Journal of Physiology* 401: 185–199.
- Lenz G, Gottfried C, Luo Z, Avruch J, Rodnight R, Nie WJ, Kang Y, Neary JT (2000) P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different mek activators in astrocytes. *British Journal of Pharmacology* 129: 927–936.

- Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich M, LeMeur M, Cazenave JP (1999a) Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *The Journal of Clinical Investigation* 104: 1731–1737.
- Léon C, Vial C, Gachet C, Ohlmann P, Hechler B, Cazenave JP, Lecchi A, Cattaneo M (1999b) The P2Y1 receptor is normal in a patient presenting a severe deficiency of ADP-induced platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis* 81: 775–781.
- Léon C, Freund M, Ravanat C, Baurand A, Cazenave JP, Gachet C (2001) Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism. Studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 103: 718–723.
- Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J (1995): Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376: 737–745.
- Leyen H von der, Schmitz W, Scholz H, Scholz J, Lohse MJ, Schwabe U (1989) Effects of 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX), a highly selective adenosine receptor antagonist, on force of contraction in guinea-pig atrial and ventricular cardiac preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 340: 204–209.
- Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y, Xiao RP (2002) p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes. *Circulation Research* 90: 190–196.
- Liñán-Rico A, Ochoa-Cortes F, Zuleta-Alarcon A, Alhaj M, Tili E, Enneking J, Harzman A, Grants I, Bergese S, Christofi FL (2017) UTP - Gated Signaling Pathways of 5-HT Release from BON Cells as a Model of Human Enterochromaffin Cells. *Frontiers in Pharmacology* 8: 429.
- Liu R, Molkentin JD (2016) Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual-specificity MAPK phosphatases (DUSPs). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 101: 44–49.
- Liu Y, Zhang L, Wang C, Roy S, Shen J (2016) Purinergic P2Y2 Receptor Control of Tissue Factor Transcription in Human Coronary Artery Endothelial Cells. NEW AP-1 TRANSCRIPTION FACTOR SITE AND NEGATIVE REGULATOR. *The Journal of Biological Chemistry* 291: 1553–1563.
- Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U, Olsson RA (1987) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)-a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 336: 204–210.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.
- Lustig KD, Erb L, Landis DM, Hicks-Taylor CS, Zhang X, Sportiello MG, Weisman GA (1992) Mechanisms by which extracellular ATP and UTP stimulate the release of prostacyclin from bovine pulmonary artery endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1134: 61–72.
- Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D (1993) Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 5113–5117.
- Malmsjö M, Hou M, Harden TK, Pendergast W, Pantev E, Edvinsson L, Erlinge D (2000) Characterization of contractile P2 receptors in human coronary arteries by use of the stable pyrimidines uridine 5'-O-thiodiphosphate and uridine 5'-O-3-thiotriphosphate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293: 755–760.

- Markou T, Vassort G, Lazou A (2003) Regulation of MAPK pathways in response to purinergic stimulation of adult rat cardiac myocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 242: 163–171.
- Martinson EA, Johnson RA, Wells JN (1987) Potent adenosine receptor antagonists that are selective for the A1 receptor subtype. *Molecular Pharmacology* 31: 247–252.
- McLaren GJ, Lambrecht G, Mutschler E, Bäumert HG, Sneddon P, Kennedy C (1994) Investigation of the actions of PPADS, a novel P2x-purinoceptor antagonist, in the guinea-pig isolated vas deferens. *British Journal of Pharmacology* 111: 913–917.
- Meghani P (2002) The design of P2Y2 antagonists for the treatment of inflammatory diseases. American Chemical Society Division of Medicinal Chemistry Abstracts of 224th ACS National Meeting.
- Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363: 245–266.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC, Murdock PR (2001) Expression pattern of human P2Y receptor subtypes. A quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1521: 107–119.
- Morris JB, Pham TM, Kenney B, Sheppard KE, Woodcock EA (2004) UTP transactivates epidermal growth factor receptors and promotes cardiomyocyte hypertrophy despite inhibiting transcription of the hypertrophic marker gene, atrial natriuretic peptide. *Journal of Biological Chemistry* 279: 8740–8746.
- Münch G, Böck B, Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RH (1998) Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. *Journal of Molecular Medicine* 76: 434–441.
- Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y, Masaki H, Maruyama K, Tsutsumi Y, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H (1998): Role of Calcium-Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2/CAK /RAFTK in Angiotensin II Induced Ras/ERK Signaling. *Hypertension* 32: 668–675.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K (1996) Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors. Identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Molecular Pharmacology* 50: 224–229.
- Niitsu Y, Jakubowski JA, Sugidachi A, Asai F (2005) Pharmacology of CS-747 (prasugrel, LY640315), a novel, potent antiplatelet agent with in vivo P2Y₁₂ receptor antagonist activity. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31: 184–194.
- Okada M, Nakagawa T, Minami M, Satoh M (2002) Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303: 66–73.
- Ono K, Han J (2000) The p38 signal transduction pathway. Activation and function. *Cellular Signalling* 12: 1–13.
- Ostrom RS, Gregorian C, Insel PA (2000) Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry* 275: 11735–11739.
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT (1994): Cloning and expression of a human P2U

nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3275–3279.

Pelleg A, Kutalek SP, Flammang D, Benditt D (2012) ATPace™: injectable adenosine 5'-triphosphate. *Purinergic Signalling* 8: 57–60.

Peters SLM, Sand C, Michel MC, Pfaffendorf M, van Zwieten PA (2002) A mitogen-activated protein kinase is involved in the inotropic but not chronotropic actions of adrenoceptor agonists and endothelin-1. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 366: 189–191.

Pham T (2003) UTP but not ATP causes hypertrophic growth in neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35: 287–292.

Podrasky E, Xu D, Liang BT (1997) A novel phospholipase C- and cAMP-independent positive inotropic mechanism via a P2 purinoceptor. *American Journal of Physiology* 273: 7.

Pöncke K, Gergs U, Buchwalow I, Hauptmann S, Neumann J (2012) On the presence of serotonin in mammalian cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 365: 301–312.

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta* 490: 27–34.

Post GR, Goldstein D, Thuerauf D, Glembotski CC, Brown JH (1996) Dissociation of p44 and p42 MAPK activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 8452–8457.

Qi AD, Kennedy C, Harden TK, and Nicholas RA (2001) Differential coupling of the human P2Y₁₁ receptor to phospholipase C and adenylyl cyclase. *British Journal of Pharmacology* 132:3 18–326.

Rafehi M, Burbiel JC, Attah IY, Abdelrahman A, Müller CE (2017a) Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y₂ receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signalling* 13: 89–103.

Rafehi M, Malik EM, Neumann A, Abdelrahman A, Hanck T, Namasivayam V, Müller CE, Baqi Y (2017b) Development of Potent and Selective Antagonists for the UTP-Activated P2Y₄ Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 60: 3020–3038.

Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50: 415–492.

Ratje F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, Barnes M, Moss RB (2012) Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 11: 539–549.

Rayment SJ, Latif ML, Ralevic V, Alexander SPH (2007) Evidence for the expression of multiple uracil nucleotide-stimulated P2 receptors coupled to smooth muscle contraction in porcine isolated arteries. *British Journal of Pharmacology* 150: 604–612.

Reid EA, Kristo G, Yoshimura Y, Ballard-Croft C, Keith BJ, Mentzer RM Jr, Lasley RD (2005) In vivo adenosine receptor preconditioning reduces myocardial infarct size via subcellular ERK signaling. *American Journal of Physiology–Heart and Circulatory Physiology* 288: H2253-9.

Ribeiro-Filho AC, Buri MV, Barros CC, Dreyfuss JL, Nader HB, Justo GZ, Craveiro RB, Pesquero JB, Miranda A, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ (2016) Functional and molecular evidence for heteromeric association of P2Y₁ receptor with P2Y₂ and P2Y₄ receptors in mouse granulocytes. *BMC Pharmacology & Toxicology* 17: 29.

- Rieg T, Gerasimova M, Boyer JL, Insel PA, Vallon V (2011) P2Y₂ receptor activation decreases blood pressure and increases renal Na⁺ excretion. *American Journal of Physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology* 301: R510-8.
- Robaye B, Ghanem E, Wilkin F, Fokan D, van Driessche W, Schurmans S, Boeynaems JM, Beauwens R (2003) Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Molecular Pharmacology* 63: 777–783.
- Rose BA, Force T, Wang Y (2010) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiological Reviews* 90: 1507–1546.
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 320–344.
- Santiago-Pérez LI, Flores RV, Santos-Berríos C, Chorna NE, Krugh B, Garrad RC, Erb L, Weisman GA, González FA (2001) P2Y₂ nucleotide receptor signaling in human monocytic cells. Activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. *Journal of Cellular Physiology* 187: 196–208.
- Savi P, Herbert JM (2005) Clopidogrel and ticlopidine. P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31: 174–183.
- Saxena M, Williams S, Taskén K, Mustelin T (1999) Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nature Cell Biology* 1: 305–311.
- Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G (2001) Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovascular Research* 52: 181–198.
- Scodelaro Bilbao P, Boland R, Santillán G (2010) ATP modulates transcription factors through P2Y₂ and P2Y₄ receptors via PKC/MAPKs and PKC/Src pathways in MCF-7 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 494: 7–14.
- See F, Thomas W, Way K, Tzanidis A, Kompa A, Lewis D, Itescu S, Krum H (2004) p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and attenuates left ventricular remodeling following myocardial infarction in the rat. *Journal of the American College of Cardiology* 44: 1679–1689.
- Seifert R, Schultz G (1989) Involvement of pyrimidinoreceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends in Pharmacological Sciences* 10: 365–369.
- Sellers LA (2001) Adenosine Nucleotides Acting at the Human P2Y₁ Receptor Stimulate Mitogen-activated Protein Kinases and Induce Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 276: 16379–16390.
- Seye CI, Kong Q, Erb L, Garrad RC, Krugh B, Wang M, Turner JT, Sturek M, González FA, Weisman GA (2002) Functional P2Y₂ nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation* 106: 2720–2726.
- Shainberg A, Yitzhaki S, Golan O, Jacobson KA, Hochhauser E (2009) Involvement of UTP in protection of cardiomyocytes from hypoxic stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87: 287–299.
- Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, Hanatani A, Kim S, Takeuchi K, Iwao H, Yoshikawa J (1998) Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovascular Research* 38: 116–124.

- Slingerland RJ, van Gennip AH, Bodlaender JM, Voûte PA, van Kuilenburg AB (1995) Quantitative analysis of the pyrimidine metabolism in pheochromocytoma PC-12 cells. *European Journal of Biochemistry* 233: 538–543.
- Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC (1998) Activation of P2Y2 receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2653–2660.
- Soulet C, Sauzeau V, Plantavid M, Herbert JM, Pacaud P, Payrastre B, Savi P (2004) Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y12 ADP-receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2: 135–146.
- Sperlágh B, Vizi SE (1996) Neuronal synthesis, storage and release of ATP. *Seminars in Neuroscience* 8: 175–186.
- Suarez-Huerta N, Pouillon V, Boeynaems J, Robaye B (2001) Molecular cloning and characterization of the mouse P2Y4 nucleotide receptor. *European Journal of Pharmacology* 416: 197–202.
- Suh BC, Kim TD, Lee IS, Kim KT (2000) Differential regulation of P2Y11 receptor-mediated signalling to phospholipase C and adenylyl cyclase by protein kinase C in HL-60 promyelocytes. *British Journal of Pharmacology* 131: 489–497.
- Swanson KD, Reigh C, Landreth GE (1998) ATP-stimulated activation of the mitogen-activated protein kinases through ionotropic P2X2 purinoreceptors in PC12 cells. Difference in purinoreceptor sensitivity in two PC12 cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 19965–19971.
- Tokuyama Y, Hara M, Jones EM, Fan Z, Bell GI (1995) Cloning of rat and mouse P2Y purinoreceptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211: 211–218.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350–4354.
- Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 140: 1–22.
- Turner JT, Weisman GA, Camden, J. M. (1997) Upregulation of P2Y2 nucleotide receptors in rat salivary gland cells during short-term culture. *American Journal of Physiology* 273: C1100–7.
- Vallon V, Rieg T (2011) Regulation of renal NaCl and water transport by the ATP/UTP/P2Y2 receptor system. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 301: 75.
- Vassort G (2001) Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergic agonist in the myocardium. *Physiological Reviews* 81: 767–806.
- Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E, Arellano RO (2010) Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8: 1–11.
- Verkhatsky A, Burnstock G (2014) Biology of purinergic signalling. Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36: 697–705.
- Voogd TE, Vansterkenburg EL, Wilting J, Janssen LH (1993) Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacological Reviews* 45: 177–203.

- Waldo GL, Harden TK (2004) Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y₁ receptor. *Molecular Pharmacology* 65: 426–436.
- Wang L, Yao H, Yang YE, Song I, Owyang C (2004) Enhanced purinergic pathway occurs in postoperative ileus: reversal by orphanin FQ. *Gastroenterology* 126:75.
- Wee S, Peart JN, Headrick JP (2007) P2 purinoceptor-mediated cardioprotection in ischemic-reperfused mouse heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323: 861–867.
- Welch BD, Carlson NG, Shi H, Myatt L, Kishore BK (2003) P2Y₂ receptor-stimulated release of prostaglandin E₂ by rat inner medullary collecting duct preparations. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 285: F711–21.
- Wenzel S, Muller C, Piper H, Schluter K (2005) p38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in hypertrophic signalling. *European Journal of Heart Failure* 7: 453–460.
- White PJ, Webb TE, Boarder MR (2003) Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Molecular Pharmacology* 63: 1356–1363.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* 79: 143–180.
- Wildman SS, Unwin RJ, King BF (2003) Extended pharmacological profiles of rat P2Y₂ and rat P2Y₄ receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *British Journal of Pharmacology* 140: 1177–1186.
- Wihlborg AK, Malmsjö M, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Jacobson K, Erlinge D (2003) Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *British Journal of Pharmacology* 138: 1451–1458.
- Wihlborg AK (2006) Positive Inotropic Effects by Uridine Triphosphate (UTP) and Uridine Diphosphate (UDP) via P2Y₂ and P2Y₆ Receptors on Cardiomyocytes and Release of UTP in Man During Myocardial Infarction. *Circulation Research* 98: 970–976.
- Xing M, Post S, Ostrom RS, Samardzija M, Insel PA (1999) Inhibition of phospholipase A₂-mediated arachidonic acid release by cyclic AMP defines a negative feedback loop for P2Y receptor activation in Madin-Darby canine kidney D1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 274: 10035–10038.
- Xu J, Weng YI, Simonyi A, Krugh BW, Liao Z, Weisman GA, Sun GY (2002) Role of PKC and MAPK in cytosolic PLA₂ phosphorylation and arachidonic acid release in primary murine astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 83: 259–270.
- Yan L, Jia Z, Cui J, Yang H, Yang H, Zhang Y, Zhou C (2011) Beta-adrenergic signals regulate cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Development, Growth & Differentiation* 53: 772–779.
- Yitzhaki S, Shneyvays V, Jacobson KA, Shainberg A (2005) Involvement of uracil nucleotides in protection of cardiomyocytes from hypoxic stress. *Biochemical Pharmacology* 69: 1215–1223.
- Yitzhaki S, Shainberg A, Cheporko Y, Vidne BA, Sagie A, Jacobson KA, Hochhauser E (2006) Uridine-5'-triphosphate (UTP) reduces infarct size and improves rat heart function after myocardial infarct. *Biochemical Pharmacology* 72: 949–55.
- Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka BK, Xiao RP (2000) beta 2-adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi

or $\text{g}\beta\text{g}\gamma$ in adult mouse cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 40635–40640.

Zeidner JF, Frishman WH, Lerner RG (2008) Investigational antiplatelet drugs for the treatment and prevention of coronary artery disease. *Cardiology in review* 16: 250–259.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling* 8: 437–502.

Zona C, Marchetti C, Volonté C, Mercuri NB, Bernardi G (2000) Effect of P2 purinoceptor antagonists on kainate-induced currents in rat cultured neurons. *Brain Research* 882:26–35.

8. Thesen

- 1.) Extrazelluläres ATP und UTP aktiviert zeit- und konzentrationsabhängig MAPK in neonatalen Rattenkardiomyozyten
- 2.) Extrazelluläres ATP und UTP aktiviert zeit- und konzentrationsabhängig MAPK in adulten Mauskardiomyozyten.
- 3.) Die MAP-Kinase-Aktivierung von extrazellulärem UTP in adulten Mauskardiomyozyten wird nicht via P2Y₂-Rezeptor vermittelt.
- 4.) Der MEK 1/2-Signalkaskadehemmstoff U0126 inhibiert die Phosphorylierung von ERK1/2 durch extrazelluläres UTP.
- 5.) Der MEK 1/2-Signalkaskadehemmstoff U0126 inhibiert nicht die Phosphorylierung von p38 durch extrazelluläres UTP.
- 6.) Der positiv inotrope Effekt von UTP kann auch in P2Y₂-Knock-out-Mausvorhöfen nachgewiesen werden.
- 7.) Der positiv inotrope Effekt von UTP kann nicht in P2Y₄-Knock-out-Mausvorhöfen nachgewiesen werden.
- 8.) Der positiv inotrope Effekt von UTP kann nach Einsatz eines spezifischen P2Y₂-Rezeptorantagonisten in Kontraktionsuntersuchungen nachgewiesen werden.
- 9.) Der positiv inotrope Effekt von UTP kann nach Einsatz eines spezifischen P2Y₄-Rezeptorantagonisten in Kontraktionsuntersuchungen nicht nachgewiesen werden.
- 10.) Extrazelluläres ATP und UTP aktiviert den MAP-Kinase-Signalweg in humanen Vorhofzellen.

9. Anhang

9.1 Puffer und Lösungen

AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1,49 % (v/v) Triethanolamin pH 9,4
APS 10 %:	1g Ammoniumpersulfat / 10 ml H_2O
Blockierungspuffer:	5 % (w/v) BSA im TBST-Puffer 5 % (w/v) Milchpulver im TBST-Puffer
Elektrophoresepuffer:	51,6 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Homogenisierungspuffer (Gewebe):	10 mM NaHCO_3 5 % (w/v) SDS pH 7,4
Lämmli 2 x ohne SDS:	20 mM Tris-Base 2 mM EDTA 10 % (w/v) DTT pH 7,8 Spur Bromphenolblau
Lysis-Puffer (Zellen):	50 mM NaHPO_4 10 mM EDTA 25 mM NaF 2% (w/v) SDS pH 7
Badlösung	119,8 mM NaCl 5,4 mM KCl

	1,8 mM CaCl_2
	1,05 mM MgCl_2
	0,42 NaH_2PO_4
	22,6 mM NaHCO_3
	0,05 mM Na_2EDTA
	0,28 mM Ascorbinsäure
	5,05 mM Glukose
	pH 7,4
Ponceaurot-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S
	3 % (w/v) TCA
Porziopuffer 2 x:	0,4 % (w/v) Polyacrylamid
	0,2 M Tris-Base
	0,6 M Glycin
	0,12 mM EDTA
	0,2 % (w/v) SDS
	10 % (v/v) Glycerin
	pH 8,8
Porzio-Trenngel (10 %):	37,5 ml Porziopuffer 2 x
	25 ml Rotiphorese® Gel 30
	6,23 ml Glycerin
	10 ml H_2O
	65 μl TEMED
	300 μl 10 % (w/v) APS
Sammelgel:	4,7 ml Sammelgelpuffer
	2,5 ml Rotiphorese® Gel 30
	11, 6 ml H_2O
	12 μl TEMED
	190 μl 10 % (w/v) APS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-Base
	0,4 % (w/v) SDS
	pH 6,8

TBST-Puffer:	10 mM Tris-Base 154 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 pH 7,4
Transferpuffer:	210 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 40 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Tyrode	NaCl 119,90 mmol/l KCl 5,40 mmol/l MgCl ₂ 1,10 mmol/l NaHCO ₃ 22,60 mmol/l NaH ₂ PO ₄ 0,42 mmol/l CaCl ₂ 1,80 mmol/l Glucose 5,05 mmol/l Ascorbinsäure 0,28 mmol/l Na ₂ -EDTA 0,05 mmol/l pH 7,4

9.2 Substanzen

Acrylamid 30%: Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, BRD
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, BRD
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
ECF	GE HealthCare, Uppsala, Schweden
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, BRD
Folin-Ciocalteu-Lösung	Merck, Darmstadt, BRD
Glycerol	Roth, Karlsruhe, BRD
Glycin	AmpliChem, Darmstadt, BRD
HBSS	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, BRD
M199-Medium	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, BRD
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt, BRD
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, BRD
Demecolcine (Mitose-Hemmstoff)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumchlorid (NaCl)	AmpliChem, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad Labortories, Hercules, CA
Newborn calf serum (10%)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Roth, Karlsruhe, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt, BRD
Nitrocellulosemembran	Whatman, Dassel, BRD
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, BRD
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, BRD
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe, BRD
Ponceaurot S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Protein-Größenmarker	Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Triethanolamin	Roth, Karlsruhe, BRD
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	ApliChem, Darmstadt, BRD
Tween 20	Merck, Darmstadt, BRD

9.3 Zellisolationsystem, Antikörper, Rezeptorantagonisten und Hemmstoffe

Zellisolationssystem

Worthington Neonatales

Kardiomyozyten Isolationssystem CellSystems, Troisdorf, BRD

Antikörper

Anti-CSQ	Acris Antibodies, SP5340P
Anti-Phospho-ERK 1/2 MAPK	Cell Signaling Technology, #9101
Anti-Phospho-p38 MAPK	Cell Signaling Technology, #8690
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrich, A3687

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Antikörper

Antikörper	Medium 1. Antikörper	Verdünnung 1. Antikörper	Medium 2. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper
Anti-ERK 1/2	5% (W/V) BSA in TBST	1:1000	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
Anti-p38	5% (W/V) BSA in TBST	1:1000	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000
Anti-CSQ	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000	5% (W/V) Milchpulver in TBST	1:1000

Tabelle 3: Größenbereich für Proteinnachweise im Western Blot

Größenbereich (kDa)	nachzuweisendes Protein	Größe des Proteins (kDa)
50 - 60	Calsequestrin	55
30 - 49	p38-MAPK	43
30 - 49	ERK 1/2 -MAPK	44, 42

Rezeptorantagonisten

DPCPX	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
PPADS	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
RB2	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Suramin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
AR-C118925	Prof. Dr. Christa E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Bonn, BRD
PSB-1454	Prof. Dr. Christa E. Müller, Pharmazeutisches Institut, Bonn, BRD

Signalkaskadehemmstoffe

SQ-22563	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
U-0126	Cell Signaling Technology, USA
U-73122	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

9.4 Geräteliste und Bezugsquellen

Bandelin Sonopuls;	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Biophotometer;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophorese-Einheit SE 600;	Hofer, San Francisco, USA
Prism 5;	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageQuant TL 1D Version 7.0;	GE Healthcare, Piscataway, USA
Transfer-Einheit TE 62;	Hofer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Variable Mark Imager;	Amersham Biosciences, Freiburg
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Zentrifuge Modell 5415 C;	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rothkirch

Vorname: Daniel

Geburtsdatum/-ort: 6. Januar 1983 in Lutherstadt Wittenberg

Ausbildung

10/2007 - 05/2014 Studium Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Abschluss: Approbation

Seit 10/2010 Dissertation: „Charakterisierung von P2-Purinozeptoren
am Herzen“ am Institut für Pharmakologie und
Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg

10/2003 - 09/2006 Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger in der
Uniklinik Düsseldorf
Abschluss: Gesundheits- und Krankenpfleger

09/1994 - 06/2002 Martin-Luther-Gymnasium Wittenberg
Abschluss: Abitur

Berufserfahrungen

07/2014 – 09/2018 Assistenzarzt für Neurologie in den Kliniken für
seit 10/2019 Neurologie und fachübergreifende Frührehabilitation des
BG Klinikum Bergmannstrost

10/2018 – 09/2019 Assistenzarzt für Psychiatrie (Rotationsjahr) im
Universitätsklinikum für Psychiatrie, Psychotherapie und
Psychosomatik

Publikationen

Gergs U, Rothkirch D, Hofmann B, Treede H, Robaye B, Simm A, Müller CE, Neumann J (2018) Mechanism underlying the contractile activity of UTP in the mammalian heart. European journal of pharmacology 830: 47 – 58.

Rothkirch D, Gergs U, Dhein S, Neumann J (2014) Extracellular UTP and ATP induce p38 and ERK1/2 MAPK phosphorylation in cardiac myocytes. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 387(Suppl 1): 79–80 (Abstract).

Rothkirch D, Gergs U, Neumann J (2012) Signal transduction pathway of ATP and UTP in neonatal rat cardiac myocytes. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 385 (Suppl 1): 77 (Abstract).

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Rothkirch, die eingereichte Dissertation zum Thema:

Charakterisierung von P2-Purinozeptoren am Herzen

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

selbstständig und ohne fremde Hilfe, angefertigt habe. Ich habe keine anderen Hilfsmittel verwendet, als die hier angegebenen. Fremdes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht und Quellen ordnungsgemäß zitiert. Die Dissertation wurde von mir selbst geschrieben. Dritte haben nicht zur Erstellung der Arbeit geholfen.

Ich versichere, keine Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen zu haben. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle (Saale), den 30.08.2020

Daniel Rothkirch

12. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, Daniel Rothkirch, dass dies meine erste Dissertation ist. Ich habe nie, weder im Inland noch im Ausland eine Dissertation eingereicht, erstellt oder daran gearbeitet. Die vorliegende Arbeit wird erstmalig und nur an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, eingereicht.

Halle (Saale), den 30.08.2020

Daniel Rothkirch

13. Danksagung

Allen voran möchte ich Prof. Dr. med. Joachim Neumann ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und das in mich gelegte Vertrauen danken. Seine Betreuung, Diskussionsbereitschaft und ständige Ansprechbarkeit waren eine große Hilfe und führten schließlich zum Abschluss dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die sehr gute Betreuung. Er stand mir bei jeglichen Fragen und Problemen immer geduldig mit Feedback und Anregungen zur Seite.

Allen Mitarbeiterinnen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die freundliche und familiäre Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bei experimentellen und technischen Schwierigkeiten. Insbesondere seien hier Pia Willmy und Sonja Reber erwähnt.

Ein abschließender Dank geht an meine Familie, meine Freunde und ganz besonders an meine Frau Juliane, die durch ständiges Nachfragen dafür gesorgt habe, dass ich diese Arbeit auch wirklich beendet habe.