

3. Ergebnisse

3.1 *Expressionsuntersuchungen*

3.1.1 Ergebnis der RNA-Extraktion

Abbildung 3 zeigt die Gelelektrophorese der extrahierten RNA aus dem Nierenmark, der Nierenrinde und der Nierenarterie. Man erkennt zwei RNA-Banden, eine obere bei ca. 1400 bp und eine untere bei ca. 800 bp. Die obere Bande entspricht 28 Svedberg-Einheiten und die untere Bande 18 Svedberg-Einheiten.

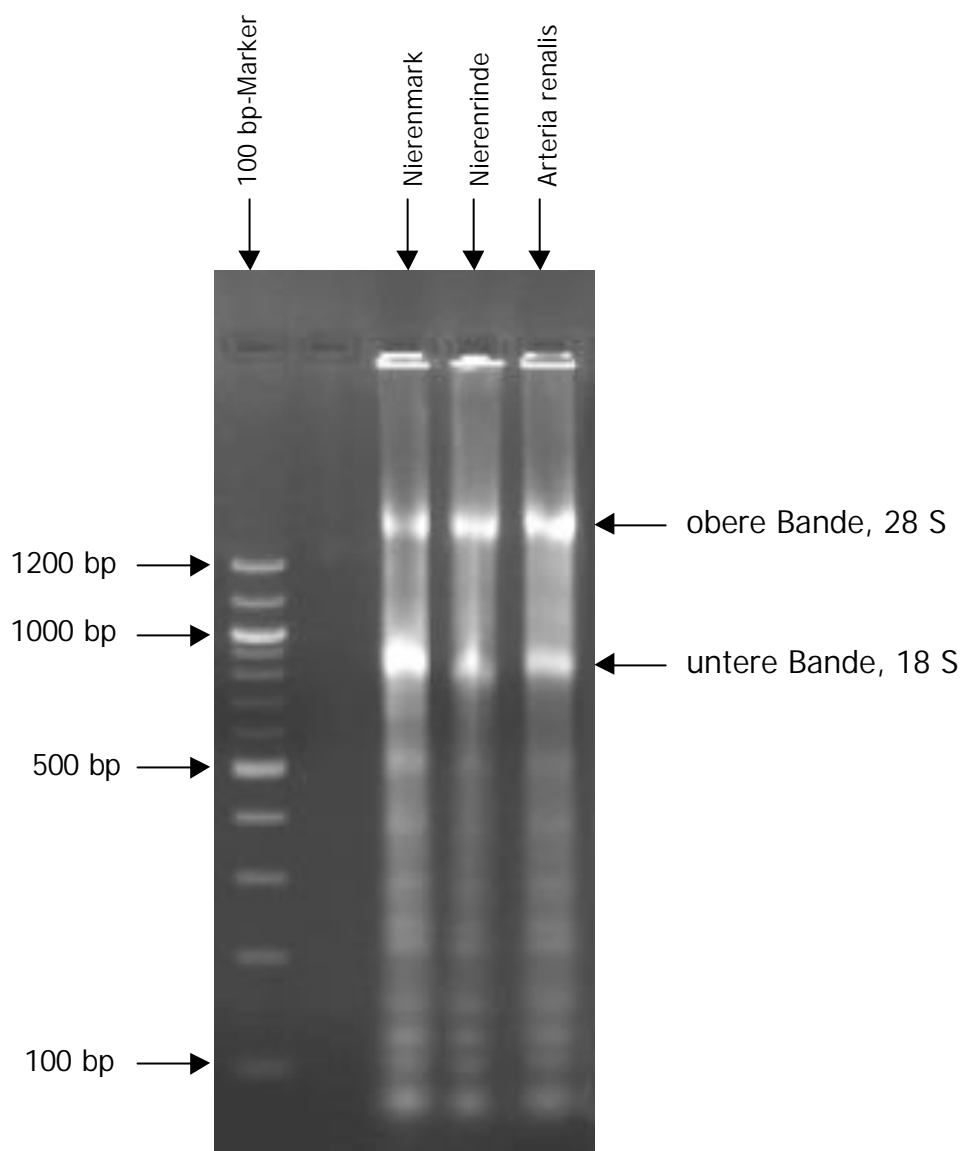


Abbildung 3: Gelelektrophorese zur RNA-Extraktion. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 μ l.

3.1.2 Ergebnis der PCR-Optimierungen

Abbildung 4a und 4b zeigen beispielhaft eine PCR-Optimierung, dem Schema entsprechend wie zuvor in Tabelle 4 beschrieben, wie sie für jeden P2X-Rezeptor durchgeführt wurde.

Bei der hier gezeigten PCR-Optimierung wurde DNA verwandt, die aus einer vorausgegangenen reversen Transkription der Nierenmark-RNA resultierte. Es wurde ein spezifischer Primer für den P2X₃-Rezeptor mit einer Basenpaarlänge von 634 bp gewählt. Mittels dieser PCR-Optimierung konnte die optimale Konzentration, die in der Gelelektrophorese anhand einer singulären und expressionsstarken Bande zu erkennen war, herausgefunden werden. Für den P2X₃-Rezeptor lag diese bei Probennummer 36. In den Tabellen 6a und 6b sind die Bedingungen aller verwandten Primer, P2X₁-P2X₇ und β -Aktin, nach erfolgter Optimierung zusammengefaßt.

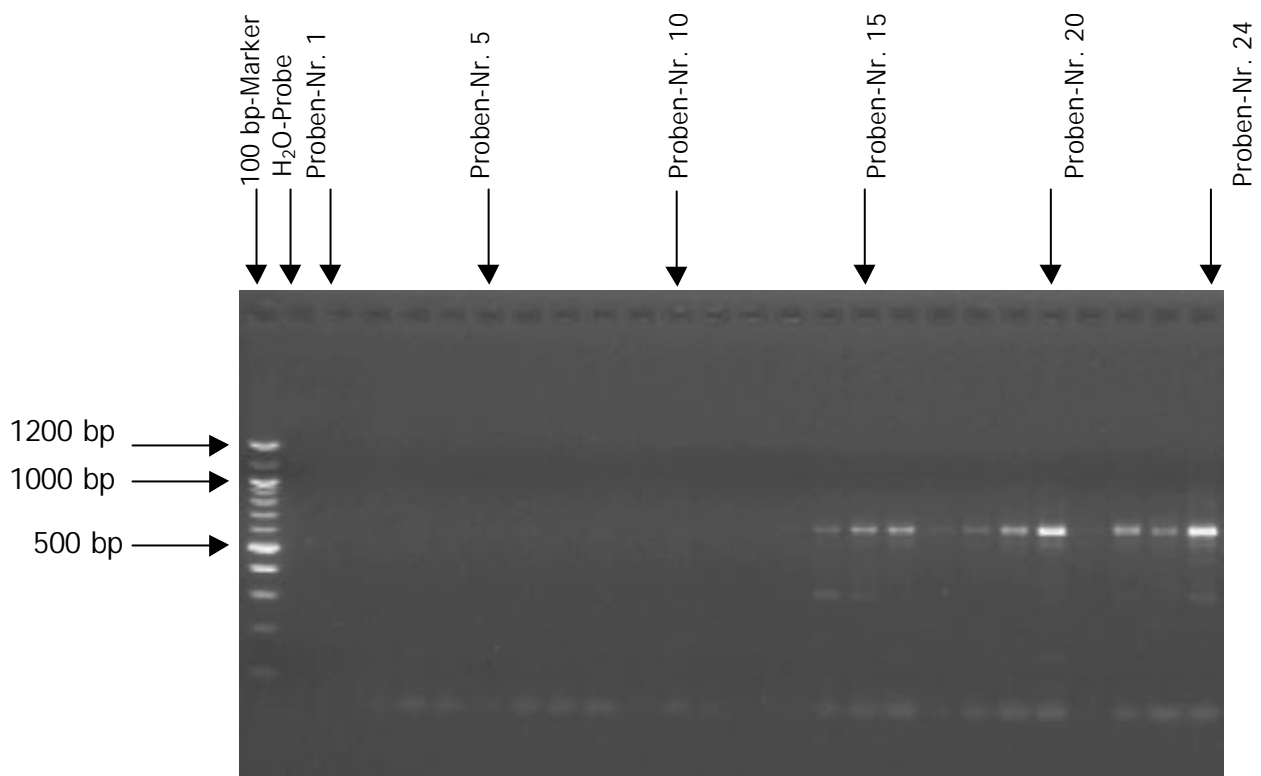


Abbildung 4 a: Gelelektrophorese zur PCR-Optimierung von P2X₃ im Nierenmark. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 μ l.

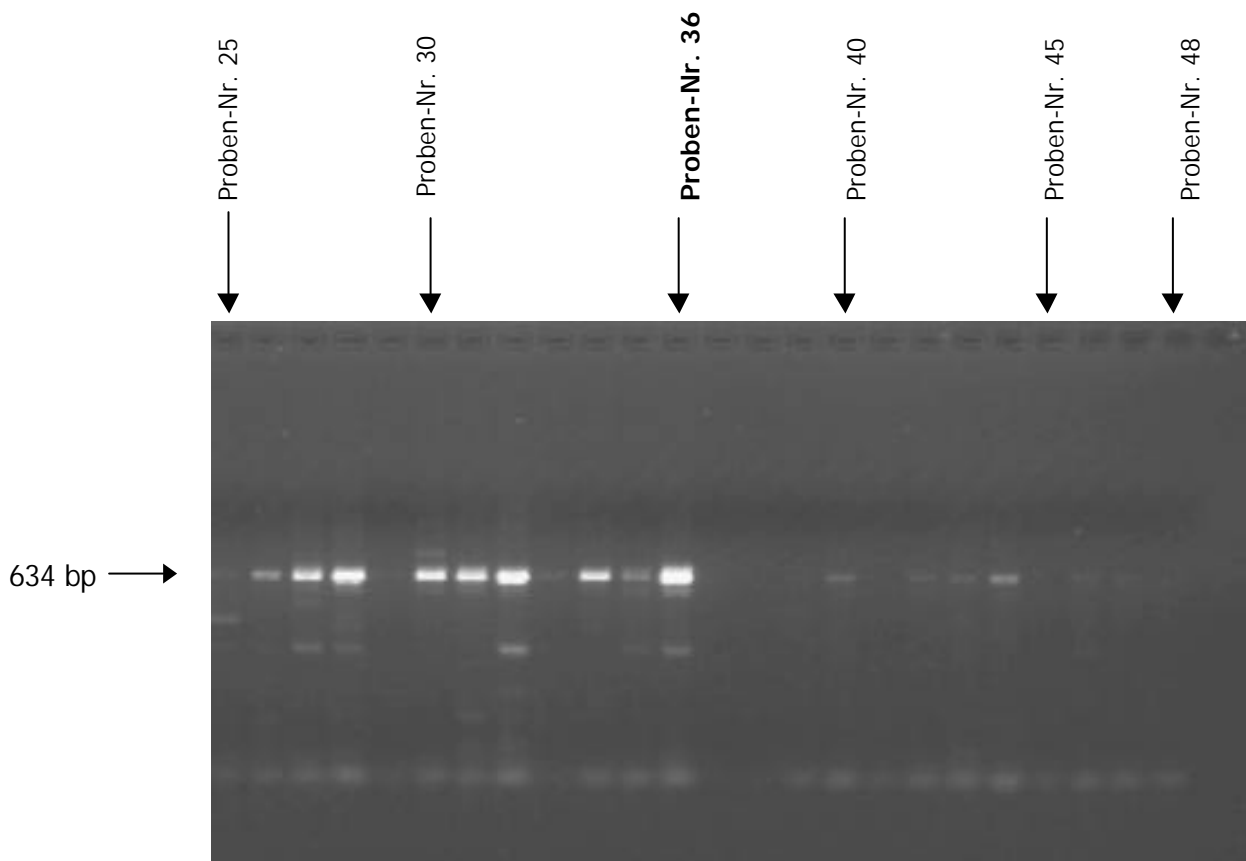


Abbildung 4 b: Gelelektrophorese zur PCR-Optimierung von P2X₃ im Nierenmark. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 µl; Probe 36 zeigt die optimale Zusammensetzung.

Tabelle 6 a: optimale PCR-Bedingungen für die P2X₁-P2X₄-Rezeptoren der Ratte bzgl. Temperaturprofil und Zusammensetzung der PCR-Proben

	<u>P2X₁</u>		P2X ₂		P2X ₃		P2X ₄	
10xPuffer	5 µl		5 µl		5 µl		5 µl	
MgCl ₂ 50 mM	3 µl		2 µl		3 µl		3 µl	
dNTP 2,5 mM	3 µl		3 µl		3 µl		3 µl	
Primer S + As 10 µM	2 µl		2 µl		1 µl		1 µl	
Taq 0,5 u/µl	1,5 µl		1,5 µl		1,5 µl		1,5 µl	
H ₂ O	31,5 µl		33,5 µl		34,5 µl		34,5 µl	
RT-Probe	2 µl		1 µl		1 µl		1 µl	
Inkubationszeit								
Pre	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min
Anneal	55°C	60 sec	55°C	60 sec	57°C	60 sec	57°C	60 sec
extend 40 Zyklen	72°C	60 sec	72°C	20 sec	72°C	60 sec	72°C	60 sec
Denature	95°C	30 sec	95°C	30 sec	95°C	30 sec	95°C	30 sec
Post	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min
End	4°C	20 min	4°C	20 min	4°C	20 min	4°C	20 min

Tabelle 6 b: optimale PCR-Bedingungen für die P2X₅-P2X₇ -Rezeptoren der Ratte bzw. β -Actin bzgl. Temperaturprofil und Zusammensetzung der PCR-Proben

	P2X ₅		P2X ₆		P2X ₇		β -Actin	
10xPuffer	5 μ l		5 μ l		5 μ l		5 μ l	
MgCl ₂ 50 mM	4 μ l		4 μ l		4 μ l		4 μ l	
dNTP 2,5 mM	3 μ l		1 μ l		3 μ l		2 μ l	
Primer S + As 10 μ M	0,5 μ l		0,5 μ l		2 μ l		1,5 μ l	
Taq 0,5 u/ μ l	1,5 μ l		1,5 μ l		1,5 μ l		1, μ l	
H ₂ O	34,5 μ l		35,5 μ l		27,5 μ l		34 μ l	
RT-Probe	1 μ l		2 μ l		5 μ l		1 μ l	
Inkubationszeit								
Pre	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min	94°C	3 min
Anneal	58°C	60 sec	60°C	60 sec	55°C	60 sec	55°C	60 sec
extend 40 Zyklen	72°C	60 sec	72°C	60 sec	72°C	20 sec	72°C	60 sec
Denature	95°C	30 sec	95°C	30 sec	95°C	30 sec	95°C	30 sec
Post	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	10 min
End	4°C	30 min	4°C	30 min	4°C	30 min	4°C	30 min

3.1.3 P2X-Expressionsprofil im Nierenmark

Abbildung 5 zeigt das P2X-Expressionsprofil, P2X₁₋₇, im Nierenmark. Der P2X₁, P2X₃, P2X₄ und der P2X₇ zeigen die stärkste Expression bei den entsprechenden Basenpaarlängen (P2X₁ bei 488 bp, P2X₃ bei 634 bp, P2X₄ bei 571 bp, P2X₇ bei 549 bp). Der P2X₂-Rezeptor ist relativ schwach bei einer Basenpaarlänge von 273 exprimiert. Eine Präsenz von P2X₅ und P2X₆ kann im Nierenmark nicht nachgewiesen werden.

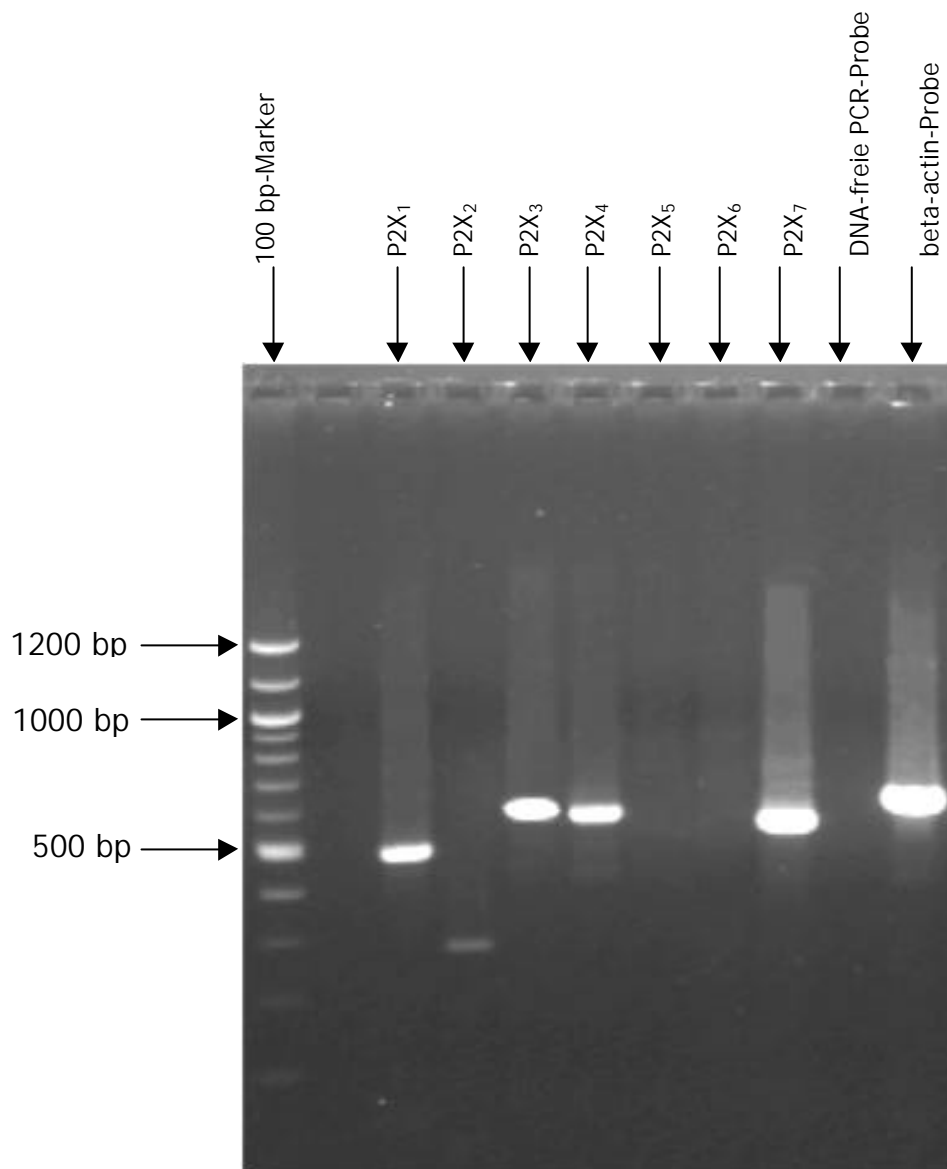


Abbildung 5: Gelelektrophorese von P2X₁₋₇ im Nierenmark. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 µl

3.1.4 P2X-Expressionsprofil in der Nierenrinde

Abbildung 6 zeigt das P2X-Expressionsprofil in der Nierenrinde. Hier sind P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄ und P2X₇ exprimiert, wobei P2X₂ die schwächste Expression aufweist und die anderen ein mittelstarkes Signal zeigen. P2X₅ und P2X₆ können, wie auch schon im Nierenmark, nicht nachgewiesen werden.

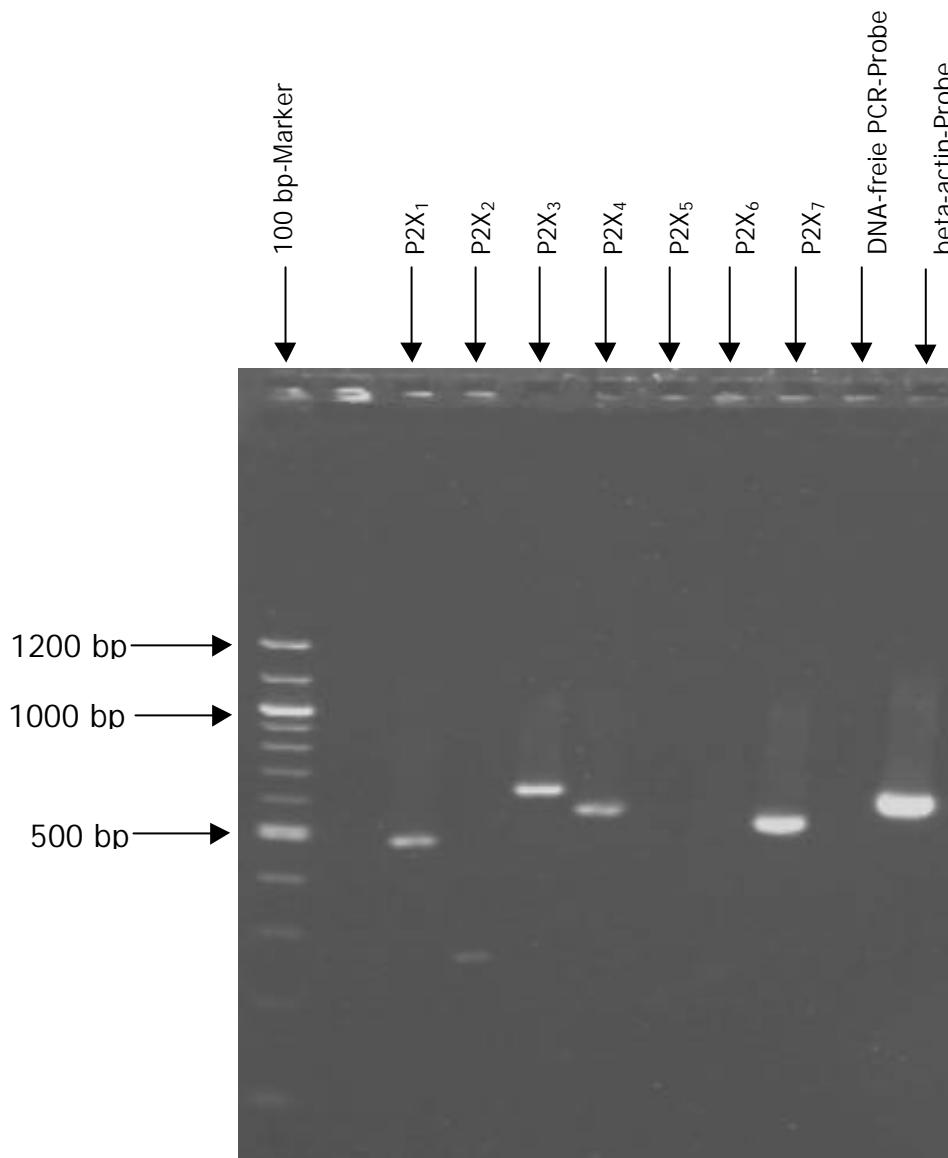


Abbildung 6: Gelelektrophorese von P2X₁₋₇ in der Nierenrinde. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 µl

3.1.5 P2X-Expressionsprofil in der Arteria renalis

In der Arteria renalis sind, wie in Abbildung 7 dargestellt, der P2X₁, P2X₂ und der P2X₇ mittelstark präsent. Die anderen P2X-Rezeptoren können in der Nierenarterie nicht nachgewiesen werden.

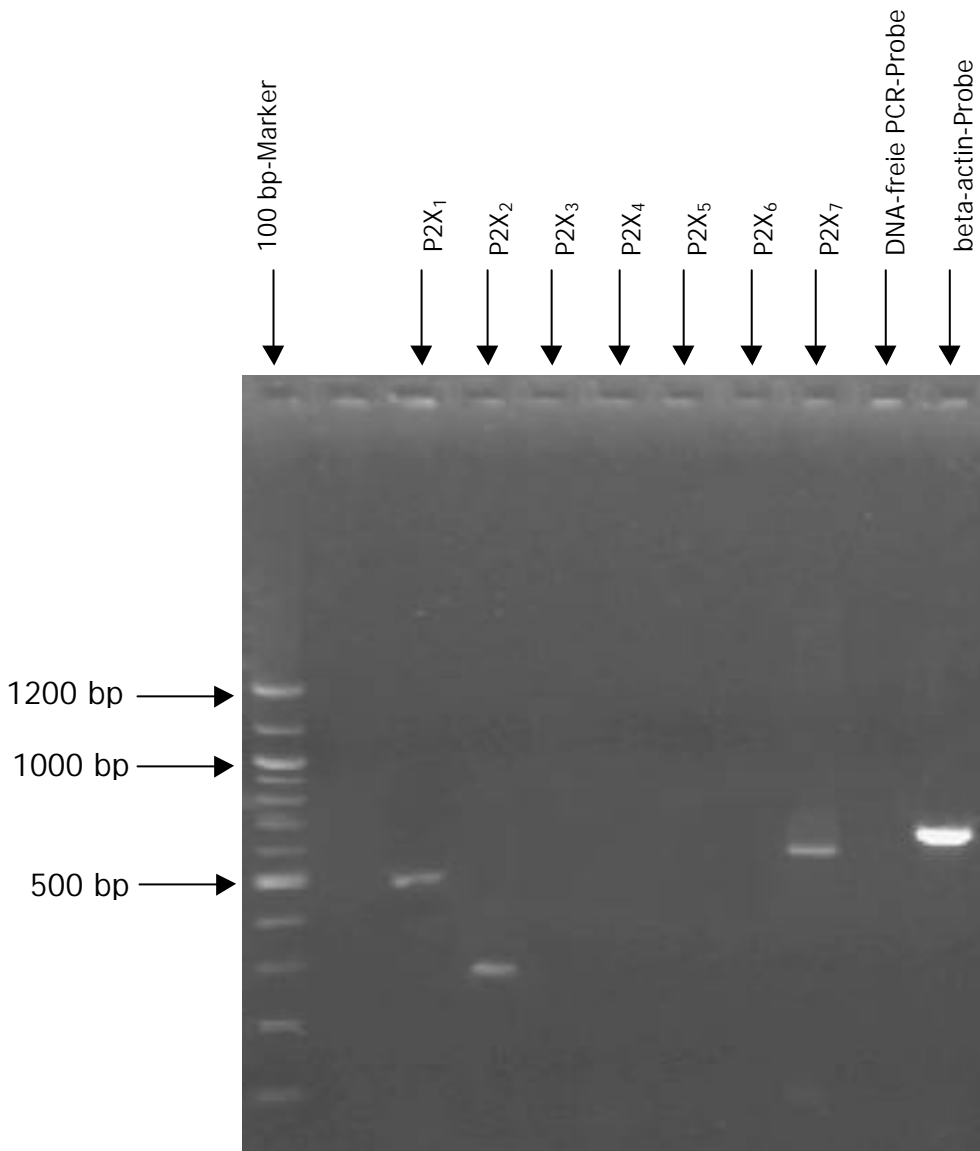


Abbildung 7: Gelelektrophorese von P2X₁₋₇ in der Arteria renalis. 2%-iges Agarosegel, Spannung 100 Volt, Dauer der angelegten Spannung 60 Minuten, Auftragsvolumen 10 µl

3.2 Untersuchungen an der isolierten perfundierten Niere

3.2.1 Schild-Plot für Suramin

In Abbildung 8 ist dargestellt, wie die Agonisten Ap_6A , Ap_6G , α,β -meATP durch aufsteigende Konzentrationen von Suramin gehemmt werden (Schild-Plot).

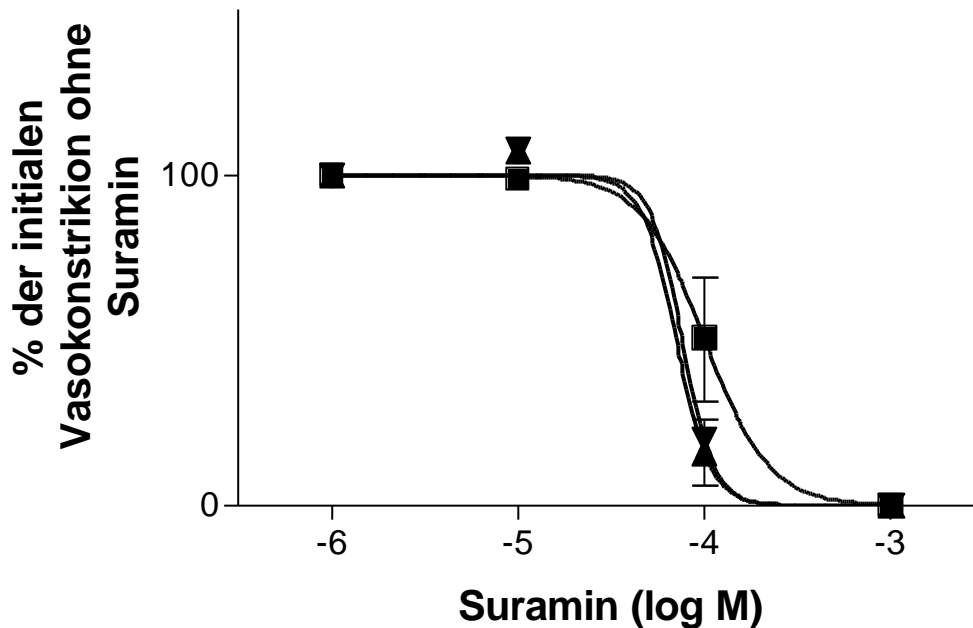


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige Blockade von Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A , ■), Adenosin-Guanosin-hexaphosphat (Ap_6G , π), α,β -Methylen-Adenosintriphosphat (α,β -meATP, θ) (jeweils 10^{-7} mol) durch Suramin. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von mindestens 5 separaten Experimenten, und die vertikale Linie zeigt die Standardabweichung.

Die IC_{50} -Werte mit den Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten sind in Tabelle 7a dargestellt. Die Rangfolge der Inhibition durch verschiedene Suraminkonzentrationen ist α,β -meATP = Ap_6A = Ap_6G (Tabelle 7 b).

Tabelle 7 a: IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP bezüglich Suramin (n=6)

Agonisten	IC₅₀ [log M]	SD IC₅₀
Ap ₆ A	-3,997	± 0,076
Ap ₆ G	-4,15	± 0,12
α,β-meATP	-4,118	± 0,09

Tabelle 7 b: Inhibitionspotenzvergleich von PPADS auf die Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests

verglichene Agonisten	<i>Signifikanter Unterschied</i>
Ap ₆ A vs Ap ₆ G	P > 0,05
Ap ₆ A vs α,β-meATP	P > 0,05
Ap ₆ G vs α,β-meATP	P > 0,05

3.2.2 Schild-Plot für PPADS

In Abbildung 9 ist dargestellt, wie die Agonisten Ap_6A , Ap_6G , α,β -meATP durch aufsteigende Konzentrationen von PPADS gehemmt werden (Schild-Plot).

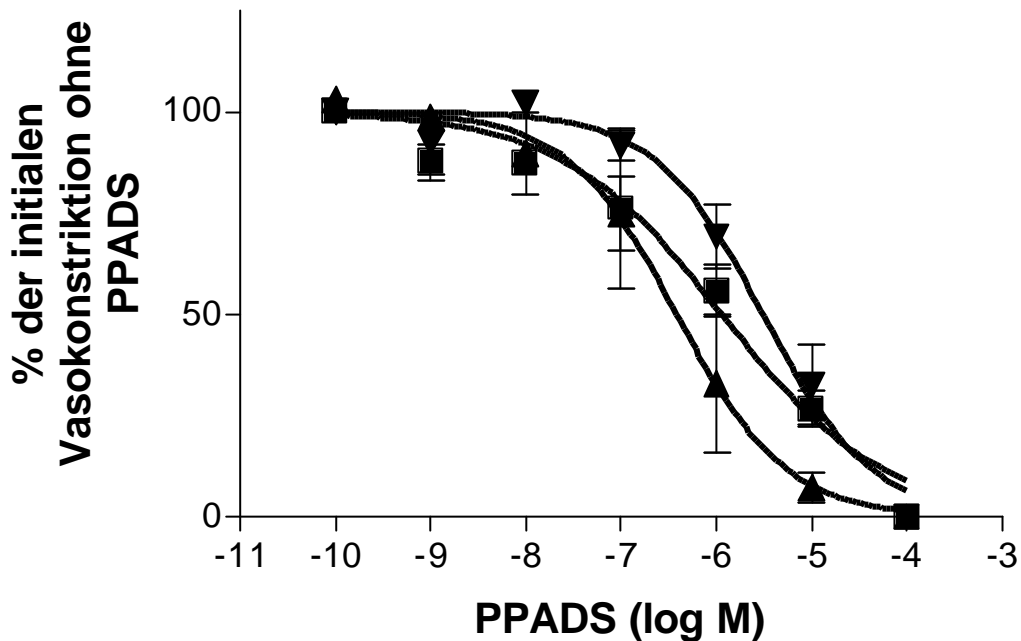


Abbildung 9: Konzentrationsabhängige Blockade von Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A , ■), Adenosin-Guanosin-hexaphosphat (Ap_6G , ▽), α,β -Methylen-Adenosintriphosphat (α,β -meATP, ●) (jeweils 10^{-7} mol) durch Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von mindestens 5 separaten Experimenten, und die vertikale Linie zeigt die Standardabweichung.

Die IC_{50} -Werte mit den Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten sind in Tabelle 8a dargestellt. Die Rangfolge der Inhibition durch verschiedene PPADS-Konzentration ist α,β -meATP > Ap_6A = Ap_6G , d.h. α,β -meATP wird durch PPADS signifikant ($p < 0,05$) potenter blockiert als Ap_6A oder Ap_6G (Tabelle 8 b).

Tabelle 8 a: IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP bezüglich PPADS (n=6)

Agonisten	IC₅₀ [log M]	SD IC₅₀
Ap ₆ A	-5,94	± 0,14
Ap ₆ G	-6,413	± 0,13
α,β-meATP	-5,506	± 0,1

Tabelle 8 b: Inhibitionspotenzvergleich von PPADS auf die Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests

verglichene Agonisten	<i>Signifikanter Unterschied</i>
Ap ₆ A vs Ap ₆ G	P > 0,05
Ap ₆ A vs α,β-meATP	P < 0,05
Ap ₆ G vs α,β-meATP	P < 0,05

3.2.3 Schild-Plot für NF023

In Abbildung 10 ist dargestellt, wie die Agonisten Ap_6A , Ap_6G , $\alpha,\beta\text{-meATP}$ durch aufsteigende Konzentrationen von NF023 gehemmt werden (Schild-Plot).

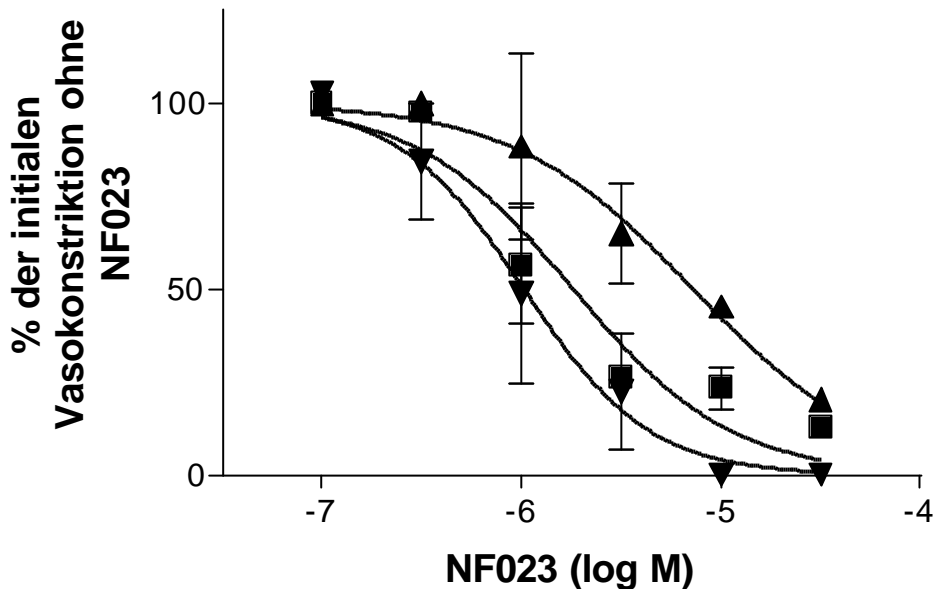


Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Blockade von Diadenosinhexaphosphat (Ap_6A , ■), Adenosin-Guanosin-hexaphosphat (Ap_6G , π), α,β -Methylen-Adenosintriphosphat ($\alpha,\beta\text{-meATP}$, θ) (jeweils 10^{-7} mol) durch den P2X_1 -spezifischen-Blocker 1,3,5-Naphtalen-trisulfonsäure (NF023). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von mindestens 5 separaten Experimenten, und die vertikale Linie zeigt die Standardabweichung.

Die IC_{50} -Werte mit den Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten sind in Tabelle 9a dargestellt.

$\alpha,\beta\text{-meATP} > \text{Ap}_6\text{A} > \text{Ap}_6\text{G}$, d.h. $\alpha,\beta\text{-meATP}$ wird durch NF023 signifikant ($p < 0.05$) potenter blockiert als Ap_6A oder Ap_6G , und auch Ap_6A wird signifikant potenter blockiert durch NF023 als Ap_6G (Tabelle 9 b).

Tabelle 9 a: IC₅₀-Werte mit Standardabweichungen für die einzelnen Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP bezüglich NF023 (n=6)

Agonisten	IC₅₀ [log M]	SD IC₅₀
Ap ₆ A	-5,741	± 0,11
Ap ₆ G	-5,139	± 0,18
α,β-meATP	-5,988	± 0,13

Tabelle 9 b: Inhibitionspotenzvergleich von NF023 auf die Agonisten Ap₆A, Ap₆G, α,β-meATP mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests

verglichene Agonisten	Signifikanter Unterschied
Ap ₆ A vs Ap ₆ G	P < 0,001
Ap ₆ A vs α,β-meATP	P < 0,01
Ap ₆ G vs α,β-meATP	P < 0,001