

P2X PURİNOSEPTÖRLER: MOLEKÜLER BİYOLOJİK, FARMAKOLOJİK VE ELEKTROFİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Mehmet Uğur*

ÖZET

P2X sınıfı purinerjik reseptörler bir hormon/nörotransmitter olarak önemi yeni yeni anlaşılmaya başlanan ATP nin kalp, damar ve sinir sistemi gibi pek çok organ ve dokudaki etkilerine aracılık etmektedir. P2X reseptörleri organizmada oldukça yaygın bir şekilde bulunduğu ve çok farklı fizyolojik ve fizyopatolojik olayda rol aldığı için, bu reseptörlerin dokulardaki alt tiplerinin saptanması, fonksiyonlarının anlaşılması ve bunlara etki eden ilaçların geliştirilmesi pek çok hastalığın tedavisi için büyük bir yarar potansiyeli taşımaktadır. Bu yazıda P2X reseptörleri ile ilgili bilinenler ana hatları ile ve kısaca özetlenecektir.

Anahtar Kelimeler: P2X Reseptörleri, Ligand Bağımlı İyon Kanalları, Purinoseptörler.

Bir Nörotransmitter olarak ATP.

Adenozin trifosfat (ATP) hücre biyokimyasında bir enerji kaynağı olarak öteden beri iyi bilinen, çok önemli bir yere sahiptir. ATP nin bu klasik fonksiyonunun yanında birde, yeni yeni anlaşılmaya başlanmış olan, nörotransmitter fonksiyonu vardır. ATP nin de asetilkolin (Ach) veya noradrenalin (NA) gibi, otonom sinirlerin uyarılması sonucu oluşan yanıtlara aracılık eden bir nörot-

SUMMARY

P2X PURINOCEPTORS: MOLECULAR BIOLOGY, ELECTROPHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY

P2X receptors are responsible for mediating many effects of ATP by acting as a hormone/neurotransmitter in many organs and tissues such as the heart, blood vessels and central nervous system. It is becoming more and more apparent that P2X receptors play an important role in many physiological and pathophysiological events. As P2X receptors have a very widespread distribution, it is not surprising that understanding the exact role P2X receptors play in organ physiology and developing specific blockers for them holds significant promise for the treatment of many diseases in the future. This article provides a brief summary of the key points in P2X research.

Key Words: P2X Receptors, Ligand Gated Ionic Channels, Purinoceptors.

ransmitter olduğu fikri ilk kez Geoffrey Burnstock tarafından 1970'lerin başlarında ortaya atılmıştır. Bu iddia zamanla daha çok destek toplamış ve 1990'ların başında ATP için spesifik reseptör proteinlerinin klonlanması ile çok geniş kabul görmüştür. ATP, otonom sinir son-uçlarındaki veziküllerde Ach, NA gibi nörotransmitterler ile beraber depolanır ve uyarı sonucu bu nörotransmitterler ile beraber sinaptik aralığa salıverilir. Bu nedenle ATP bir "co-transmitter" (yardımcı-trans-

*A.Ü. Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı.

mitter) olarak da tanımlanmıştır. ATP sadece otonom sinir son-uçlarında değil aynı zamanda otonom ganglionlarda ve santral sinir sisteminde de nörotransmitter olarak rol oynamaktadır (1, 2). Bugün bir çok dokudaki düz kas (damar, mide-barsak sistemi, mesane vs.), epitel (trakea, böbrek vs.), kalp ve iskelet kası ve endokrin-ekzokrin salgı (tükrük bezleri, pankreas alfa hücreleri) hücrelerinde, bağışıklık sistemine ait hücrelerde (mast hücreleri, makrofajlar ve lenfositler), kokleadaki tüy hücrelerinde, çeşitli otonom ve santral nöronların gövdelerinde, ve birçok kültür hücresinde (cell-line) ATP reseptörlerinin varlığı gösterilmiş durumdadır (1). Sonuç olarak, bugünkü bilgilerimizin ışığında, organizmada ATP nin kardiyovasküler sistemden urogenital sisteme pek çok farklı yerde bir transmitter olarak görev yapmakta olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca ATP dışındaki, Adenozin, adenozin difosfat (ADP), uridin trifosfat (UTP) gibi, başka purin ve primidin birleşiklerinin de kendilerine özgü reseptörler aracılığı ile hücre-resel sinyal iletiminde rol oynamakta olduğu bilinmektedir (1).

Dokularda Hücre Dışı ATP nin Kaynakları ve Metabolizması.

ATP nin hücre içi derişimi milimolarlar düzeyinde iken hücre dışı sıvılardaki derişimi çok daha düşüktür. Hem ATP nin hücre zarını geçmesinin zor oluşu, hem de hücre dışına çıkan ATP nin çeşitli ekto-ATPazlar aracılığı ile hızla hidrolize edilmesi ATP derişiminin hücre dışında düşük kalmasını sağlar. Ancak bazı durumlarda hücre dışında ATP derişimi geçici bir süre bölgesel olarak yükselebilir ve bu artış kanın pıhtılaşması, düz kas hücrelerinin kasılması veya salgı bezlerinin salgı yapması gibi fizyolojik/fizyopatolojik olaylarla sonuçlanır. Hücre dışı ATP nin önemli bir kaynağı ekzositoz yolu ile sinir son-uçlarından, mast hücrelerinden yada trombositlerden olan salıverilmedir. Bu tip salıverilme sitozolde bulunan salgı veziküllerinin hücre içi Ca^{++} derişiminin artışına bağlı olarak hücre zarı ile birleşmeleri ve içlerinde depolanmış bulunan ATP nin hücre dışı ortama bırakılması ile olur ve genellikle (yukarıda belirtildiği gibi) başka transmitterlerin salıverilmesine eşlik eder. Bir diğer

ATP kaynağı, sitoliz yada hipoksi/stres sonucu oluşan ATP salıverilmesidir. Bu durumda hücre dışı ortama çıkan ATP veziküllerde depolanmış olan ATP değil, doğrudan sitozolde serbest halde bulunan ATP dir. Ağır bir stres ya da travmaya maruz kalan dokularda hücrelerin ölümü sonucu hücre zarının bütünlüğü bozulabilir ve sitozolik ATP zar engelinin ortadan kalkması ile hücre dışına çıkabilir. Ancak hücre kaybı ile sonuçlanmayan stres veya hipoksi durumlarında da, hücre zarı bütünlüğünün bozulmamasına rağmen ATP hücre içersinden dış ortama çıkabilmektedir(1). Bu tip salıverilme hipoksik koşullara maruz bırakılan kalp kası hücrelerinde gösterilmiştir (3). Ayrıca hacim artışı karşısında hepatositlerden de ATP salıverilmektedir (4). Ancak ATP nin bu şekilde salıverilmesinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hücre dışına çıkan ATP hücre zarının dış yüzeyine yerleşmiş olan ATPaz enzimleri aracılığı ile hidrolize edilir ve sırası ile ADP, AMP ve adenozine dönüştürülür. Bu enzimler çeşitli dokularda yaygın olarak bulunurlar ve dolayısı ile organizma içinde hücre dışı ortamdaki ATP derişimi sıkı bir şekilde kontrol edilmiş olur.

ATP Reseptörleri (P2X ve P2Y)

ATP de, diğer pek çok nörotransmitter ya da hormon gibi, hücre içine girmeden, hücre zarında yerleşmiş bulunan protein yapıdaki reseptörler aracılığı ile etki gösterir. Bu reseptörler, pürinerjik reseptörler (pürinoseptörler) denilen daha büyük bir reseptör ailesine dahildir. Pürinoseptörler P1 ve P2 olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Adenozin gibi nükleozitler ile aktive olan pürinoseptörler P1 tipi olarak adlandırılırken, ATP gibi nükleotidler ile aktive olan pürinoseptörlere P2 tipi denmiştir. P2 tipi reseptörler de P2X ve P2Y olmak üzere ikiye ayrılmıştır. P2Y tipi reseptörler G-proteinine kenetli reseptörler iken P2X tipi reseptörler ligand bağımlı iyon kanallarıdır.

Metabotropik ve iyonotropik reseptörler:

Bu noktada metabotropik (G-proteinine kenetli) ve iyonotropik (Ligand bağımlı iyon kanalı) tip reseptörlerin genel özelliklerinden kısaca bahsetmek yararlı olabilir. G-proteinine kenetli reseptör

törler tek alt ünitelerden oluşan, trans-membran proteinlerdir. Hetero-trimerik (birbirinden yapıca farklı üç alt ünite içeren) ve hücre-içi bir protein olan G-proteini aracılığı ile ikinci habercilerin (second messenger) sentezinden sorumlu enzimleri aktive ederek etki gösterirler. Bu reseptörlere, yapılarında yedi adet trans membran α -heliks motifi içerdikleri için kısaca 7TM (Trans Membran) reseptörler de denmektedir. 7TM reseptörlerin, farklı tipleri bulunmaktadır. Her farklı tip 7TM reseptör özgül olduğu hormona yüksek afinite ile bağlanır. Bu bağlanmadan sonra reseptör kenetli olduğu G-proteinini uyarma yeteneği kazanır. Uyarılan G-proteininin tipine bağlı olarak, hücre içinde, belirli bir cins ikinci haberci molekülün sentezi değişir. Sentezlenen bu ikinci haberci moleküller reseptörün hücrede oluşturduğu etkiye aracılık ederler. Ayrıca uyarılmış durumdaki bazı G-proteinlerinin doğrudan iyon kanallarının aktivitesini düzenledikleri de düşünülmektedir. Asetilkolin, noradrenalin, histamin ve serotonin (5HT) gibi pek çok nörotransmitter yada hormon etkilerini 7TM reseptörler aracılığı ile göstermektedir (5).

Ligand bağımlı iyon kanalı yapısındaki reseptörlerde ise hormon ile reseptörün bağlanması sonucunda aynı reseptör proteininin yapısında yer alan bir iyon kanalı açılır, böylece hormon etkisi ile hücre zarının iyonlara geçirgenliği doğrudan değiştirilmiş olur. Ligand bağımlı iyon kanalı olan reseptörler; 7TM reseptörlerden farklı olarak, hetero- veya homo-polimerik, trans membran proteinlerdir (yani yapıca birbirinden farklı veya birbirinin aynı birden fazla alt-ünite içerirler). Bu tip reseptörler içinde en iyi bilineni nikotinik asetilkolin reseptörüdür, ayrıca γ -aminobutirik asit (GABA), glutamat-aspartat, glisin ve bazı serotonin (5-HT₃) reseptörleri de bu tip reseptörlerdir (6). Çizgili kasta bulunan nikotinik asetilkolin reseptörü (Ni-Ach) $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ olarak adlandırılan dört değişik alt-ünitenin 2:1:1:1 stokiyometrisi ile birleşmesinden oluşur, dolayısı ile bir hetero-pentamerdir. Hidropatisite analizi her bir alt-ünitede dört hidrofobik bölge olduğunu göstermiştir, bu bölgeler M1, M2, M3, M4 olarak adlandırılır ve bunların proteinin trans membran bölgelerine karşılık geldiği düşünülmektedir.

lyonotropik reseptörlerde alt-ünite çeşitliliği ve reseptör alt-tipi sayısı:

Bu tip polimerik yapıdaki reseptörler için belirtilmesi gerekli önemli bir nokta da her alt-ünitenin amino asit dizilimleri birbirinden farklı alt-tiplerinin aynı organizmada var olabilmesidir (Örneğin nöronal Ni-Ach reseptörü α alt ünitesinin sekiz, β ünitesinin üç değişik alt-tipi vardır ve α_{2-9} , β_{2-4} olarak adlandırılırlar). Bu birbirlerinden farklı alt-ünite alt-tiplerinin çeşitli kombinasyonları sonucu, aynı reseptörün, özellikleri birbirinden farklı çok fazla sayıda alt-tipinin ortaya çıkması olasılığı vardır (Örneğin: $\alpha_1 - \beta_1$, $\alpha_2 - \beta_1$, $\alpha_3 - \beta_2$ kombinasyonlarından her birinin oluşturacağı protein bir "nöronal Ni-Ach reseptörü" olmakla birlikte her birisi farklı farmakolojik ve elektro-fizyolojik özelliklere sahip olabilecektir).

Hem P2X hem de P2Y reseptörlerinin çeşitli alt-tipleri olduğu bilinmektedir, moleküler klonlama yolu ile amino asit dizilerinin belirlenmesi sonucu bulunan bu alt tiplerden bu güne kadar varlıkları kesinleşmiş olanları ve varsa, etkilerine aracılık eden ikinci haberci molekülleri TABLO 1 da topluca gösterilmiştir (7).

P2X Tipi reseptörlerin alt-tipleri ve özellikleri

P2X reseptörlerinin iki farklı alt ünitesi ilk olarak 1994 yılında iki bağımsız grup tarafından klonlanmıştır (8, 9). Daha sonra klonlanan P2X reseptörü sayısı toplam olarak yedi tipe yükselmiştir. Bu yeni P2X alt-tipleri P2X₁₋₇ olarak adlandırılmaktadır. Bu proteinlerin xenopus oositlerinde, S49 veya HEK hücrelerinde heterolog ifadesi (heterolog expression) sonucu farmakolojik (agonist, antagonist duyarlılığı) ve elektrofizyolojik olarak (aktivasyon/inaktivasyon kinetiği) farklılıklar gösteren iyonik akımlar elde edilmiştir (10,11,12). Heterolog olarak ifade ettirilen bu kanallar genelde katyonlara seçicilik gösterir ancak katyonlar arasında fazla ayırım yapmazlar. CHO hücrelerinde tek başlarına ifade ettirilen P2X alt-ünitelerinden yapılan tek kanal kayıtlarında, -100 mV da tutulan patchlerde, P2X1, P2X2 ve P2X4 reseptörlerinin aktivasyonu sonucu sırası ile -1.8, -2.2 ve -0.9 pA lik tek kanal akımları kaydedilmiştir. P2X3 reseptörünün aktivasyonu ile oluşan

Tablo 1: P2 purinerjik reseptörlerin sınıflaması

P2Y Reseptörleri		P2X Reseptörleri	
Reseptör	İkinci Haberci	Reseptör	İkinci Haberci
P2Y1	IP3	P2X1	Katyon Kanalı
P2Y2	IP3	P2X2	Katyon Kanalı
P2Y4	IP3	P2X3	Katyon Kanalı
P2Y6	IP3	P2X4	Katyon Kanalı
		P2X5	Katyon Kanalı
		P2X6	Katyon Kanalı
		P2X7	Katyon Kanalı / hücre zarı permeabilizasyonu

akımlar da ise, kinetiğin çok hızlı olması nedeni ile, tek kanal akımları ayırt edilememiştir (13). Bu yedi ana alt-tipin yanısıra bu tiplerin "splice-variant"ı olarak tanımlanan ve aynı gen tarafından kodlanmasına rağmen m-RNA kurgulanması (editing) değişikliği gösteren, pek çok protein daha klonlanmıştır (örneğin 14). Klonlanan alt-ünite proteinlerinin amino asit dizilerinin incelenmesi sonucu, transmembran segmenti olduğu düşünülün, dört değil sadece iki adet hidrofobik bölgeye sahip oldukları görülmüştür. Bu özellikleri ile P2X reseptörleri diğer ligand bağımlı iyon kanallarına benzememektedir. Yapılan mutasyon çalışmalarından anlaşıldığı kadarıyla genel olarak P2X alt ünitelerinin C ve N uçları hücre içinde bulunurken iki hidrofobik bölgenin arasında yer alan aminoasitler hücre dışında yer almaktadır (15).

P2X reseptörünün bir polimer olduğu bilinmektedir. Yapılan cross-linking çalışmaları, bir araya gelerek fonksiyonel bir kanal oluşturan alt-ünite sayısının üç olduğunu düşündürmektedir (16). Aynı ya da farklı tipteki alt-ünitelerin bir araya gelerek fonksiyonel P2X kanalları oluşturabildiği gösterilmiştir (17), yani kanal hem homohem de hetero-polimer olarak kurulabilmektedir. Birlikte-immünopresipitasyon (co-immunoprecipitation) çalışmalarından anlaşıldığı kadarıyla her alt-ünite tipi herhangi bir başka tip alt-ünite ile birleşmemekte, farklı alt ünitelerin biraraya gelmesinde belirli bir seçicilik görülmektedir. Örne-

ğin P2X4 sadece P2X5, P2X6 ve kendisi ile birleşip fonksiyonel bir iyon-kanalı oluşturabilmektedir diğer alt-tiplerle ise birleşmemektedir. Buna karşın P2X7 alt-tipi sadece kendisi ile bir araya gelebilmektedir (18). Bu hetero-polimerik yapıya sahip proteinlerdeki alt-ünite stokiyometrisi ise henüz bilinmemektedir. Deneysel olarak sadece P2X1 veya sadece P2X3 alt-ünitesinin oositlerde ifadesi (expression), iki alt ünitenin birlikte ifade edilmesinden farklı farmakolojik ve kinetik özellikler gösteren bir iyonik akım oluşmasına yol açmıştır. Bu melez kanalın özellikleri merkezi sinir sisteminde yer alan ve P2X₁ ve P2X₃ alt-tiplerinin her ikisini birden içerdiği bilinen bir tip nöronda bulunan P2X reseptörlerinin özellikleri ile büyük yakınlık göstermektedir (17). Aynı şekilde P2X1 ve P2X5 alt tiplerinin birlikte ifade ettirilmesi de her iki alt tipden farklı özelliklere sahip bir iyon kanalı oluşturmuştur (19). Birbirinden farklı alt-ünitelerin bir araya gelerek tamamen farklı özellikte bir kanal oluşturabilmeleri nedeni ile hücre üzerinde bulunabilecek P2X reseptörlerinin fenotip çeşitliliği, farklı tip alt-ünite sayısı olan 7 den, teorik olarak, çok daha fazla olabilir (bakınız bir önceki bölüm). "Splice variant" ların da hesaba katılması ile bu sayı daha da büyümektedir. Dokularda yada hücrelerde bulunan P2X reseptörlerinin hangi alt-tiplerin bir araya gelmesi ile oluştuğu araştırılmayı bekleyen bir konudur.

P2X tipi reseptörler ATP nin yanısıra çeşitli ya-

pay ATP analogları ile de aktive olabilmektedir. Ancak alt-tipler arasında bu analoglara duyarlılık açısından önemli farklar vardır. Bu analoglar arasında önemli olanlar benzoil-benzoil ATP (BzATP, P2X₇ alt-tipi için spesifik bir agonist kabul edilmektedir), 2 metil-tiyo ATP (2 Me-S-ATP), alfa, beta metilen ATP (α,β Me-ATP) olarak sayılabilir. PPADS ve Suramin ise seçici olmayan P2X reseptör antagonistleri olarak tanımlanmıştır. (7) Yakın zamanda Brilliant Blue G nin P2X₇ reseptörleri için seçici bir antagonist olduğu ileri sürülmüştür.

Klonlanmış ve Dokularda bulunan P2X reseptörlerinin özellikleri

Bu bölümde sıçan C-DNA larından klonlanmış P2X reseptörlerinin ve bazı belli başlı organ ve dokularda bulunan P2X reseptörlerinin elektrofizyolojik ve farmakolojik özelliklerinden kısaca bahsedilecektir.

Klonlanmış P2X reseptörleri

İlk klonlanan P2X reseptörü olan P2X₁ heterolog olarak ifade ettirildiğinde ATP ye karşı hızlı duyarsızlaşma gösteren, α,β Me ATP ile uyarılabilen, ATP için EC₅₀ si 1 μ M olan bir fenotip gözlenmektedir. Buna karşın P2X₂ reseptörü α,β Me ATP ye duyarsız, ATP ye karşı hızlı duyarsızlaşma göstermeyen, ATP için EC₅₀ si yaklaşık 60 μ M olan bir fenotip vermektedir (8, 9). P2X₃ reseptörünün fenotipi P2X₁e, P2X₄ ünki ise P2X₂ ye benzerlik gösterir (20, 10,12).

P2X₇ ise tüm diğer alt tiplerden belirgin olarak daha uzun bir COOH terminali içerir. Bunun yanı sıra ATP için daha yüksek bir EC₅₀ ye sahiptir ve BzATP ye karşı çok duyarlıdır. P2X₇ reseptörlerinin en ilginç özellikleri ise belirli bir süre ATP ile uyarıldıklarında (özellikle hücre dışı divalen katyonların derişiminin düşük olduğu halde) hücre zarını yüksek molekül ağırlıklı maddelere karşı geçirgen hale getirmeleridir (permeabilizasyon) (21). ATP ile ilk uyarıldıklarında bir katyon kanalı gibi davranan reseptör bir süre sonra hem büyük molekül ağırlıklı, hücre zarını normal koşullarda geçemeyen, bazı floresan boyaların (YO-PRO, ethidium bromide) hücre içine girmesi ile, hem de büyük organik katyonlarla taşı-

nan iyonik akımların zıtlanma potansiyellerindeki değişimlerle gözlemlenebilen bir hücre zarı permeabilizasyonuna neden olmaktadır. Bu ilginç yanıtın mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, fakat diğer P2X reseptörlerinde bulunmayan uzun COOH terminalinin varlığı bu yanıtın ortaya çıkması için önemli gibi görünmektedir(21). Yeni çalışmalar P2X₇ dışındaki diğer bazı P2X reseptörlerinde (P2X₄) bu permeabilizasyon özelliğine bir miktar sahip olduğunu göstermiştir. Bu özelliğin reseptörlerin ikinci trans membran bölgesi ile ilişkili olabileceği yapılan mutasyon çalışmaları ile gösterilmiştir. (22). Ancak P2X₇ reseptörleri her ifade ettirildikleri hücrede bu permeabilizasyon yanıtını göstermemektedirler, bu da permeabilizasyon oluşmasında reseptörün kendisinin yanı sıra başka faktörlerin varlığını da düşündürmektedir (23).

Düz kaslardaki P2X reseptörleri

P2X reseptörlerinin düz kas hücrelerinde varlığı ilk olarak arterlerde gösterilmiştir (24). Daha sonra vas deferens, mesane, uterus (25) ve mide düz kaslarında da (26) bu reseptörlerin varlığı bildirilmiştir. Arter, vas deferens ve mesane düz kaslarındaki reseptörler ATP ye karşı hızlı bir duyarsızlaşma gösterirler ve düşük EC₅₀ ye sahip reseptörlerdir. Bu reseptörlerde α,β Me ATP iyi bir agonisttir. Bu reseptörlerin bu sayılan farmakolojik ve elektrofizyolojik özellikleri nedeni ile bunların P2X₁ tipi reseptörler olduğu düşünülmüştür, ancak insitu hibridizasyon yöntemi ile sıçan damar düz kaslarında P2X₁, P2X₂, P2X₄ m-RNA larının üçününde birlikte bulunduğu bildirilmiştir (27, 20). Buna karşın uterus ve gastrik düz kas hücrelerindeki reseptörler yüksek EC₅₀ ye sahip duyarsızlaşma göstermeyen ve α,β Me ATP ile uyarılamayan reseptörlerdir(25, 26). Ayrıca gastrik hücrelerde tanımlanan P2X reseptörleri BzATP ye büyük duyarlılık göstermektedirler (26). Yakın zamanda insan safen veni düz kas hücrelerinde benzer özellikte bir P2X reseptörü gösterilmiştir, bu reseptörün aynı zamanda uzun süreli ATP uygulaması sonucu hücre zarı permeabilizasyonuna da neden olduğu öne sürülmüştür (28). Bu en son belirtilen üç dokudaki P2X reseptörlerinin, gösterdikleri özellikler nedeni ile P2X₇

alt tipi olabilecekleri öne sürülmüştür. Bu düşüncüyü destekleyen bir bulguda sıçan uterus düz kasında P2X7 RNA sının saptanmasıdır (M. Uğur, J. V. Walsh, J. J. Singer, yayınlanmamış gözlem).

Kalpdeki P2 reseptörleri

Sıçan kalbinde, RT-PCR kullanılarak, çeşitli P2X reseptörü alt-tiplerine ait mRNA larının da (P2X1,2,4,5) varlığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmalarda problem, varlığı saptanan RNA nın kalp dokusunda bulunan kardiyomiyositlerde mi yoksa damar düz kası veya otonom sinir liflerinde mi olduğunun anlaşılmasındaki güçlülüdür. Örneğin sıçan kalbinde, mikro diseksiyon ile ayrılmış ventriküler segmentlerden ve ayrıca kalp dokusundan hazırlanan homojenatlarda P2X mRNA larının varlığı RT-PCR ile açıkça görülmekte iken, in situ-hibridizasyon metodu ile kardiyomiyositlerde herhangi bir P2X reseptör mRNA sının varlığı gösterilememiştir. Ancak kalp dokusundaki damar düz kaslarında P2X mRNA larının varlığı, in situ hibridizasyon ile kolayca gösterilebilmektedir. Bu çelişkili gibi görünen sonuçların nedeninin mRNA kopya sayısının farklı hücrelerde farklılık göstermesi ve/veya farklı teknikler arasında duyarlılık açısından var olan büyük farklar olması mümkündür. (27, 20). Dolayısı ile kardiyomiyositlerdeki P2X alt tiplerinin neler olduğu konusu henüz daha netleşmemiştir. Ayrıca insan kalbinde de çeşitli P2X reseptör m-RNA larının bulunduğu bildirilmiştir (29).

İzole sıçan kalp hücrelerinde ise, hücre dışından uygulanan ATP nin voltaj bağımlı Ca^{++} -akımlarını arttırmasının yanı sıra hızla duyarsızlaşma özelliği gösteren bir iyonik akımı da aktive ettiği bildirilmiştir. Bu akım katyonlar arasında belirgin bir seçicilik göstermemektedir. Ancak anyon geçirgenliği konusu net olarak aydınlatılmamıştır. Bu akımın ilginç bir özelliği ise aktive olabilmek için dış ortamda Mg^{++} 'un varlığına mutlaka ihtiyaç göstermesidir. Bu akım hücre içi pH değişikliği sonucu oluşan $[Ca^{+2}]_i$ artışı ile aktive olan bir Ca^{+2} -bağımlı katyon-kanalı olarak yorumlanmıştır. Ancak belirtilen bu iyonik akımın bir P2X reseptörüne bağlı olması ihtimali tam olarak red edilememektedir (30). Bu bilgilerden

de anlaşılacağı üzere kalp hücrelerinde bulunan P2X tipi purinoseptörlere dair bazı hala aydınlanmamış noktalar vardır. Bu reseptörlerin kalpteki dağılımı ve fonksiyonel özellikleri kesinlik kazanmamıştır.

Nöronlardaki P2X reseptörleri

ATP nin P2X tipi reseptörler aracılığı ile hem beyinde hem de sempatik gangliyonlarda sinaptik iletimde rol aldığı bilinmektedir (31, 32). P2X2 ve P2X3 reseptörlerinin bir dikkate değer özelliği her ikisinin de birlikte (büyük bir olasılıkla hetero-polimerik bir iyon kanalı oluşturarak) hemen hemen sadece C-tipi sinir hücrelerinde bulunmalarıdır. Bu hücrelerin ağrı duyusunun iletimindeki rolü iyi bilinmektedir. Bu bulgular ışığında hücre hasarı sonucu hücre dışına çıkan ATP nin ağrı duyusunu başlatan mediyatör olabileceği ve aynı zamanda spinal kord arka kök de bu hücrelerin yaptığı sinapslarda nörotransmitter olarak rol alabileceği (P2X1 ve P2X2 aracılığı ile), dolayısı ile ağrı duyusunun iletiminde önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür (12, 33).

İmmün sistem hücrelerindeki P2X reseptörleri

İnsan da dahil olmak üzere çeşitli memeli mast hücreleri, lenfositleri ve makrofajları, ATP ile uyarıldıkları zaman hücre zarları büyük molekül ağırlıklı maddelere geçirgen hale gelmektedir (permeabilizasyon). Daha önce de belirtildiği gibi bu yanıt klonlanmış P2X7 reseptörlerinin bir özelliğidir. Ayrıca P2X7 tipi reseptörlerin varlığı, bağışıklık sistemi ile ilgili çeşitli hücrelerde gösterilmiştir. Bu nedenle mast hücrelerinde, lenfositlerde ve makrofajlarda ATP ye karşı görülen bu yanıtın P2X7 aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir. Membran permeabilizasyonunun fizyolojik önemi açık olmamakla birlikte belirli bir süre devam etmesinin hücre ölümü ile sonuçlandığı bilinmektedir. P2X7 reseptörlerinin bağışıklık hücrelerinde görülen apoptotik ve nekrotik değişimlerin oluşumunda önemli rolü olduğu bilinmekle birlikte hücre zarı permeabilizasyonunun sorumlu tek mekanizma olmadığı düşünülmektedir (34).

P2X tipi reseptörlerin olası fizyopatolojik rolleri ve P2X reseptörlerinin tedavideki geleceği

Yukarıda da bahsedildiği gibi anoksi ve stres gibi bazı fizyopatolojik olaylarda hücre içi ATP nin, çok iyi bilinmeyen bazı mekanizmalar ile hücre dışına çıktığı bilinmektedir. Böyle durumlarda P2X reseptörlerinin aktivasyonunun ilk sonucu, bu kanalların seçici olmayan katyon kanalları olmaları nedeni ile, hücre zarında depolarizasyon olacaktır. Depolarizasyon sonucu kalp miyositlerinin uyarılabilirliği artar ve ventriküllerde spontan ritmik aktivite ortaya çıkabilir. Bu yolla miyokard enfarktı gibi patolojik olaylarda hasarlanan dokusudan hücre dışı ortama çıkan ATP kalp hücrelerinin üzerinde bulunan P2X reseptörlerini uyararak enfarkt çevresindeki dokuda aşırı duyarlı bir bölge yaratabilir ve enfart sonrası görülen aritmilerin ortaya çıkmasından sorumlu olabilir. Ayrıca gene enfarkt çevresindeki dokuda membran depolarizasyonu sonucu voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının aktive olması ve P2X kanallarından geçen kalsiyum hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun aşırı artmasına neden olarak kardiyomiyositlerin ölümüne neden olabilir.

KAYNAKLAR

- 1- DUBYAK G, EL-MOATASSIM C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265 (cell Physiol. 34): C577-C606.
- 2- WINDCHEIF U. Purinoceptors: From History to recent progress. A review. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48: 993-1011.
- 3- FORRESTER T, WILLIAMS C A. Release of ATP from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J Physiol. Lond* 1977; 268: 371-390.
- 4- ROMAN R M, FERANCHAK A P, DAVISON A K, ve ark. Evidence for Gd³⁺ inhibition of membrane ATP permeability and purinergic signaling. *American Journal of Physiology* 1999; 277: G1222-G1230.
- 5- GILMAN A G. G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 615-649.
- 6- WESTBROOK G L. Ligand-gated ion channels. In: Sperlakakis N ed. *Cell Physiology Source Book* (second edition): Academic Press, 1998: 597-609.
- 7- TI PS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement 1999.
- 8- SOLEDAD V, HUSSY N, EVANS R J, ve ark. A new class of ligand gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994; 371: 516-519.
- 9- BRAKE A J, WAGENBACH M J, JULIUS D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994; 371: 519-523,.
- 10- BUELL G, LEWIS C, COLLO G, ve ark. An antagonist insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO Journal* 1996; 15: 55-62.
- 11- COLLO G, NORTH R A, KAWASHIMA E ve ark. Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *Journal of Neuroscience* 1996; 16: 2495-2507.
- 12- CHEN C C, AKOPIAN A N, SIVILOTTI L. ve ark. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995; 377: 428-431.
- 13- EVANS R J. Single channel properties of ATP-gated

Aynı şekilde, sinir hücrelerinde de hücre dışı ortama salınan aşırı miktarlarda ATP P2X tipi reseptörler aracılığı ile nöronlarda depolarizasyona neden olabilir ve P2X reseptörlerinin Ca⁺⁺ geçirgenliğinin de işe karışması sonucu nöronlarda hasarlanma veya hücre ölümü oluşabilir.

P2X reseptörlerine seçici antagonistlerin geliştirilmesi iskemik kalp ve merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde, infarkt alanının sınırlanması, nörolojik sekellerin azaltılması gibi bugün üzerinde önemle durulan klinik problemlere yeni çözümler sunabilir. Ayrıca P2X reseptör agonist veya antagonistleri ağrı tedavisi programlanmış hücre ölümü (programmed cell death) gibi konularda da yeni gelişmelere neden olabilir. Dolayısıyla ile kalp, damar, sinir sistemi gibi çeşitli organlarda P2X reseptörlerinin hangi alt tiplerinin var olduğunun anlaşılması, bu reseptörlerin bulunduğu dokulardaki işlevlerinin tanımlanması ve bu reseptörlere karşı seçici antagonist ve agonistlerin geliştirilmesi biyomedikal araştırmaların öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır.

- cation channels (P2X receptors) heterologously expressed in chinese hamster ovary cells. *Neuroscience letters* 1996; 212: 212-214.
- 14- Simon J, Kidd E J, Smith F M, ve ark. *Molecular Pharmacology* 1997; 52: 237-248.
- 15- Newbolt A, Stoop R, Virginio C, ve ark. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 15177-15182.
- 16- Nicke A, Baumert H G, Rettinger J. ve ark. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand gated ion-channels. *EMBO Journal* 1998; 17: 3016-3028.
- 17- Lewis C, Neidhart S, Holy C. ve ark. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995, 377: 432-435.
- 18- Torres G, Egan T M, Voigt M M. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 6653-6659.
- 19- Torres G, Haines W R, Egan T M ve ark. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-Gated ion channel. *Molecular Pharmacology* 1998; 54: 989-993.
- 20- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez Hernandez J M. ve ark. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; USA. 93: 3684-3688.
- 21- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E. ve ark. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996; 272: 735-738.
- 22- Khakh B S, Bao X R, Labarca C. ve ark. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature Neuroscience* 1999; 2: 322-330.
- 23- Petrou S, Ugur M, Drummond R M. ve ark. P2x7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Letters* 1997; 411: 339-345.
- 24- Benham C D, Tsien R W. A novel receptor-operated Ca²⁺ permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; 328: 275-278.
- 25- Honore E, Martin C, Mironneau C, ve ark. An ATP-sensitive conductance in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *American Journal of Physiology* 1989; 257: C297-305.
- 26- Ugur M., Drummond R M, Zou H. ve ark. An ATP-gated cation channel with some P2Z-like characteristics in gastric smooth muscle cells of toad. *Journal of Physiology* 1997; 498: 427-442.
- 27- Nori S, Fumagalli L, Bo X. ve ark. Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridisation and RT-PCR study. *J. Vasc. Research.* 1998; 35: 179-185.
- 28- Cario-Toumaniantz C, Loirand G, Ladoux A ve ark. P2X7 Receptor Activation-induced contraction and lysis in human saphenous vein smooth muscle. *Circulation research.* 1998; 83: 196-203.
- 29- Bogdanov Y, Rubino A, Burnstock G. Characterisation of subtypes of the P2X and P2Y families of ATP receptors in the foetal human heart. *Life Sciences* 1998; 62: 697-703.
- 30- Scamps F, Vassort G. Mechanism of extracellular ATP-induced depolarization in rat isolated ventricular cardiomyocytes. *Pflügers Archive* 1990; 417: 309-316.
- 31- Burnstock G. Purinergic Mechanisms. *Annals of N.Y. Academy of Sciences* 1990; 603: 1-7.
- 32- Evans R J, Derkach V, Surprenant A. *Nature* 1992; 357: 503-505.
- 33- Kennedy C, Leff P. Painful connection for ATP. *Nature* 1995; 337: 385.
- 34- Ferrari D, Los M, Bauer M K A. ve ark. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Letters* 1999; 447: 71-75.