

Aus dem
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Abteilung: Medizinischen Klinik IV / Nephrologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Zidek

***Pharmakologische und molekularbiologische
Charakterisierung eines neuen blutdruckregulierenden
Gruppe I P2X-Rezeptors in der Rattenniere***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Giebing
aus Köln

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Zidek
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. G. Schultz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17.5.2002

Meinen Eltern, Michael,
meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition, Ursachen und Risiken der Hypertonie	1
1.2 Purinrezeptoren	5
1.3 Bedeutung, Lokalisation und Funktion von P2X-Rezeptoren	8
1.4 Fragestellung	10
2. Methodik	11
2.1 <i>Expressionsuntersuchungen</i>	
2.1.1 Gewebegewinnung und RNA-Extraktion	11
2.1.2 Gelelektrophorese	13
2.1.3 DNA-Herstellung durch reverse Transkription	14
2.1.4 DNA-Vervielfältigung durch PCR und PCR-Optimierung	15
2.1.5 DNA-Isolation	19
2.1.6 Klonierung	20
2.1.7 Sequenzierung	23
2.2 <i>Untersuchungen an der isolierten perfundierten Rattenniere</i>	
2.2.1 Präparation zur Isolierung der Rattenniere	24
2.2.2 Aufbau und Testung der Funktion des Perfusionssystems	25
2.2.3 Durchführung der Nierenversuche	27
2.3 Materialien	29
2.4 Statistik	30
3. Ergebnisse	31
3.1 <i>Expressionsuntersuchungen</i>	
3.1.1 Ergebnis der RNA-Extraktion	31
3.1.2 Ergebnis der PCR-Optimierung	32
3.1.3 P2X-Expressionsprofil in dem Nierenmark	36
3.1.4 P2X-Expressionsprofil in der Nierenrinde	37
3.1.5 P2X-Expressionsprofil in der Arteria renalis	38

3.2	<i>Untersuchungen an der isolierten perfundierten Rattenniere</i>	
3.2.1	Schild-Plot für Suramin	39
3.2.2	Schild-Plot für PPADS	41
3.2.3	Schild-Plot für NF023	43
4.	Diskussion	45
5.	Literaturverzeichnis	50

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
Ap ₅ A	P ¹ ,P ⁵ -Diadenosinpentaphosphat
Ap ₆ A	P ¹ ,P ⁶ -Diadenosinhexaphosphat
bp	Basenpaare
EKG	Elektrokardiographie
i.E.	internationale Einheit
KG	Körpergewicht
α,β-meATP	α,β-Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat
β,γ-meATP	β,γ-Methylen-Adenosin-5'-Triphosphat
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
RAS	Renin-Angiotensin-System
NFO23	1,3,5 Naphtalen-trisulfonsäure
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren gibt es zahlreiche Hinweise, daß Purinrezeptoren eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation spielen. In der Literatur gibt es Hinweise, daß mindestens zwei P2X-Rezeptorsubtypen an einer Blutdruckregulation beteiligt sind.

Zunächst wurde mit Hilfe der RT-PCR die Expression aller bekannten P2X-Rezeptorsubtypen in der Niere überprüft. In einem zweiten Schritt wurde dann an der isolierten perfundierten Rattenniere mit Hilfe von spezifischen P2X-Rezeptorantagonisten überprüft, welche P2X-Rezeptorsubtypen an einer Vasokonstriktion beteiligt sind.

Mittels molekularbiologischer Methoden konnten in der Rattenniere die Purinrezeptoren P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄ und P2X₇ nachgewiesen werden. Mit spezifischen P2X-Rezeptoragonisten wie α,β -methyl-Adenosin-5'-Triphosphat (α,β -meATP), Diadenosinhexaphosphat (Ap₆A) und Adenosin-Guanosinhexaphosphat (Ap₆G) und unter Verwendung von P2X-Rezeptorantagonisten wie Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS), Suramin und 1,3,5-naphtalene-trisulfonsäure (NF023) konnte gezeigt werden, daß die Vasokonstriktionen induziert durch den P2X₁-Rezeptor und besonders durch den P2X₃-Rezeptor vermittelt werden.

Es konnte zum ersten Mal die Existenz des P2X₃-Rezeptors in der Rattenniere nachgewiesen werden. Unter Verwendung von P2X-Rezeptorantagonisten konnte gezeigt werden, daß der P2X₃-Rezeptor an der Blutdruckregulation entscheidend beteiligt ist und damit eine wichtige Rolle in der glomerulären Perfusion, Blutdruckregulation und damit bei der Entstehung der Hypertonie spielen kann.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Walter Zidek für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Möglichkeit zur Promotion danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn PD Dr. med. Martin Tepel für die thematische Findung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit danken.

Besonders erwähnen möchte ich Herrn Dr. med. Markus van der Giet, dem ich neben seiner effizienten Unterstützung im praktischen und schriftlichen Teil auch für seine Förderung danken möchte.

Für die Bereitstellung und Aufreinigung der Substanzen möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Joachim Jankowski danken.

Herrn Dr. med. Okan Cinkilic danke ich herzlich für die freundschaftliche Unterstützung bezüglich dieser Arbeit.

Besonders möchte ich meiner lieben Simone Schaub danken, die mich jederzeit während der Fertigstellung der Arbeit in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.