

## 1. Einleitung

### 1.1 Definition, Ursachen und Risiken der Hypertonie

Die Hypertonie ist definiert als eine chronische Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Die Weltgesundheits-Organisation (WHO = World Health Organization) teilt ihn folgendermaßen ein:

**Tabelle 1:** Definition und Klassifizierung der Blutdruckveränderungen nach der WHO, 1999

<b>Blutdruck (mmHg)</b>	<b>Systolisch</b>	<b>Diastolisch</b>
Optimal	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Hochnormal	130-139	85-89
<u>Bluthochdruck:</u>		
Stadium 1*	140-159	90-99
Stadium 2	160-179	100-109
Stadium 3**	= 180	= 110

\*Stadium 1 entspricht teilweise der Grenzwerthypertonie: Blutdruckwerte 140-159 systolisch zu 90-94 diastolisch (mmHg)

\*\*zu differenzieren ist die maligne Hypertonie, die über den diastolischen Druck (>120-130 mmHg) und über schwere Organschäden an den Nieren und am Augenhintergrund definiert ist

Ätiologisch wird die Hypertonie in eine primäre (essentielle) und sekundäre Form eingeteilt. Die Ursache der primären Hypertonien ist unbekannt. Nach Rudnick et al. (1977), Danielson et al. (1981) und Sinclair et al. (1987) sind ungefähr 95% aller Hypertonien primärer Art. Die Ursache der sekundären Hypertonien ist bekannt. Am häufigsten sind hierbei die renale und die endokrine Hypertonie. Bei der renalen Hypertonie liegt entweder eine renovaskuläre Stenose und/oder eine renoparenchymatöse Erkrankung vor. Die Ursachen der endokrinen Hypertonie sind Phäochromozytome, ein Cushing- oder Conn-Syndrom oder ein adrenogenitales Syndrom. Des weiteren

gibt es induzierte Formen der Hypertonie, die durch Schwangerschaft, Streß, Alkohol oder Medikamente hervorgerufen werden.

Es werden vier verschiedene Erscheinungsformen der Hypertonie unterschieden. Die labile Hypertonie ist eine belastungsabhängige Hypertonie, wobei der Bluthochdruck nur zeitweise bei körperlicher oder seelischer Belastung auftritt. Die stabile Hypertonie ist eine dauerhafte Blutdruckerhöhung, also die Hypertonie im engeren Sinne. Eine hypertensive Krise ist definiert als eine kritische Blutdrucksteigerung mit Werten über 230/130 mmHg ohne Organschäden im Gegensatz zum hypertensiven Notfall, bei dem bei gleichen Blutdruckwerten eine vitale Gefährdung besteht.

Nach Magrini et al. (1992) haben in den westlichen Industrieländern ca. 20% der Bevölkerung Blutdruckwerte im hypertonen Bereich. Die Prävalenz ist altersabhängig und nimmt mit steigendem Alter zu. In der Gruppe der 25- bis 44-jährigen kommt sie bei 8-10% und bei den 45-75 jährigen bei 15-20% vor. Vor der Menopause sind Frauen seltener betroffen, während nach der Menopause beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind (Stieber et al., 1982).

Eine Hypertonie muß nicht zu Folgeerscheinungen führen; so kann es sein, daß eine jahrelange milde Hypertonie sich bei jungen Menschen zurückbildet (Liebermann, 1990). Folgen der Hypertonie können Atherosklerose und daraus folgend eine koronare Herzkrankheit (KHK) bzw. ein Herzinfarkt ein Hirninfarkt, eine Retinopathia atherosclerotica und Aneurysmata mit eventuell folgender Ruptur sein. An der Niere kann es des weiteren zur Nephrosklerose und zur Niereninsuffizienz kommen, und an den Extremitäten kann eine periphere arterielle Verschlußkrankheit (Claudicatio intermittens) entstehen (Riede, Schäfer, 1995). Die wichtigsten Veränderungen treten jedoch im Herz-Kreislauf-System auf. Durch die Framingham-Studie (Kannel et al., 1975) konnte festgestellt werden, daß im Gegensatz zu normotensiven

Männern hypertensive Männer ein 8-fach höheres Risiko eines Schlaganfalls haben, ein 6,6-fach höheres Risiko einer Herzinsuffizienz, ein 2,4-fach höheres Risiko einer KHK und ein 2-fach erhöhtes Risiko einer Claudicatio intermittens. Für hypertensive Frauen beträgt das relative Risiko für einen Schlaganfall 7,7, für eine Herzinsuffizienz 4,6 und für eine KHK 3,4.

Mehrere Studien in der Vergangenheit haben gezeigt, daß man davon ausgehen kann, daß die Entstehung der primären Hypertonie ein multifaktorielles Geschehen ist. Es sind vor allem umwelt- und verhaltensbedingte Faktoren beteiligt (Manger et al., 1986). Da diese Erkrankung familiär gehäuft vorkommt, ist auch eine genetische Komponente zu beachten. An genetischen Faktoren zur Entstehung der essentiellen Hypertonie werden unter anderem Angiotensin-converting-enzyme (ACE)- und Angiotensinogenpolymorphismen diskutiert. Das ACE-Gen umspannt 21 Kilobasen und besteht aus 26 Exons, wobei verschiedene Genotypen, nämlich II, ID und DD (I=insertion, D=deletion) existieren (Nakai et al., 1995). Einige Autoren beschreiben eine Korrelation des D-Allels mit einem erhöhten Risiko von KHK (Mattu et al., 1995) und Herzinfarkt (Ludwig et al., 1995). Andere Autoren fanden keine signifikante Korrelation zwischen dem D-Allel und KHK, stattdessen aber einen Zusammenhang von Angina pectoris oder Herzinfarkt mit einem Angiotensinogenpolymorphismus (Katsuya et al., 1995). Für die Heterogenität dieser Ergebnisse kommen mehrere Ursachen in Frage. Unterschiede in der Sensitivität der Methoden (z.B. EKG und Koronarangiographie), die nicht einheitliche Selektion der untersuchten Gruppen und Fehler in der Bestimmung des ID-Genotyps als DD-Genotyp (Fehlerquote bei ca. 5%) könnten zu einer solchen Heterogenität führen (Singer et al., 1996). Derzeit werden weitere Studien durchgeführt, um eine mögliche positive Assoziation zwischen Polymorphismen und

der Hypertonie, bzw. den Folgeerkrankungen der Hypertonie zu klären (Singer et al., 1996).

Wichtiger zur Ausprägung der Hypertonie scheinen jedoch andere Faktoren zu sein. Adipositas (Landsberg, 1992), zu hoher Salzkonsum (Aldermann, 1994), überhöhter Alkoholkonsum (Beilin et al., 1992), orale Kontrazeption oder chronische Lärmbelästigung bzw. Streß (Falkner, 1991) führen häufig zu einer dauerhaften Erhöhung des Blutdrucks. Nach Herrmann et al. (1986) scheinen Umwelteinflüsse die Hypertonie mehr zu beeinflussen als genetische Faktoren.

Man kann nicht ausschließen, daß das Renin-Angiotensin-System (RAS) an der Aufrechterhaltung einer primären Hypertonie beteiligt ist, weil durch Eingriff in dieses System mit ACE-Hemmern gezeigt wurde, daß bei einigen Patienten eine Blutdrucksenkung stattfindet. Die Effekte des atrialen natriuretischen Peptids weisen auf eine antagonistische Wirkung gegenüber dem RAS hin (Clinkigbeard et al., 1990). Bisher ist deren Funktion bei der Hypertonie noch unklar, wobei jedoch feststeht, daß die Peptide an der verstärkten Natriuresis bei primärer Hypertonie beteiligt sind (Sorensen et al., 1989).

Nicht identifizierte humorale Faktoren könnten ebenfalls an der Entstehung der primären Hypertonie eine Rolle spielen. Kreuzzirkulationsversuche zwischen normotonen und hypertonen Ratten von Zidek und Mitarbeitern zeigten, daß bei einer konstanten Blutaustauschrate eine Volumenverschiebung stattfindet. Der Bluthochdruck konnte dabei auf die normotonen Ratten übertragen werden (Zidek et al., 1985). Dies gelang auch, wenn man den normotensiven Ratten in den Kreuzzirkulationsversuchen die Nieren und Nebennieren entfernte (Zidek et al., 1986). Die umgekehrte Transplantation normalisierte den Hochdruck der Ratte (Bianchi et al., 1974). In anderen Versuchen konnte bestätigt werden, daß der Blutdruck der Niere folgt (Dahl et al., 1975; Kawabe et al., 1979). Ein möglicher Syntheseort humoraler Faktoren könnte die

Niere sein, denn nach Nierentransplantation bei Patienten mit essentieller Hypertonie trat eine Remission des erhöhten Blutdruckwertes ein (Curtis et al., 1983).

Auf der Suche nach Hormonen, die den Blutdruck regulieren, entdeckten Schlüter und Mitarbeiter kürzlich in Thrombozyten eine Substanzgruppe, die Diadenosinpolyphosphate. Die verschiedenen Diadenosinpolyphosphate, die in Nebennieren, Hepatozyten, im ZNS, in Placentae, Herzen und in Plasma nachgewiesen wurden, unterscheiden sich lediglich in der Anzahl der Phosphatgruppen ( $Ap_nA$ , mit  $n=2-8$ ). Diadenosinpolyphosphate sind in der Lage, den Blutdruck bei normotonen Ratten dauerhaft zu erhöhen (Schlüter et al., 1994;). Bei Dauerperfusionsversuchen an der isolierten perfundierten Rattenniere gelang es, durch Diadenosinpolyphosphate, die ihre Wirkung über Purinrezeptoren vermitteln, den Perfusionsdruck permanent zu erhöhen (van der Giet et al., 1999).

## 1.2 Purinrezeptoren

Purinrezeptoren sind eine heterogene Gruppe von Rezeptoren, deren gemeinsames Merkmal die Aktivierung durch Purinverbindungen, wie z.B. ATP oder Adenosin ist. Man unterteilt die Purinrezeptoren in P1- und P2-Rezeptoren. P1-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren, die ihrerseits in  $A_{1-4}$ -Rezeptoren eingeteilt sind. Agonist ist Adenosin, Antagonisten sind Methylxanthine. P2-Rezeptoren werden in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt (Abbraccio & Burnstock, 1994). P2X-Rezeptoren sind Nukleotid-gesteuerte unselektive Ionenkanäle. P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt.

Bisher konnte man 8 Subtypen des P2X-Rezeptors klonieren ( $P2X_{1-8}$ ), die ihrer pharmakologischen Charakteristik entsprechend in 4 Gruppen eingeteilt werden (Humphrey et al., 1998). Die Einteilungskriterien für die P2X-Rezeptoren sind die  $\alpha, \beta$ -meATP-

Sensitivität, ein typischer P2X-Rezeptoragonist, das Desensitisierungsverhalten und die Antagonisierung durch Suramin und PPADS (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der pharmakologischen Charakteristika von P2X-Rezeptoren

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
$\alpha,\beta$ -meATP-sensitiv schnell desensitisierend Suramin-sensitiv	$\alpha,\beta$ -meATP-insensitiv nicht desensitisierend Suramin-sensitiv	$\alpha,\beta$ -meATP-insensitiv nicht desensitisierend Suramin-insensitiv	$\alpha,\beta$ -meATP-insensitiv nicht desensitisierend schwach Suramin-sensitiv
P2X <sub>1</sub> P2X <sub>3</sub> P2X <sub>8</sub>	P2X <sub>2</sub> P2X <sub>5</sub>	P2X <sub>4</sub> P2X <sub>6</sub>	P2X <sub>7</sub>

Trotz der Unterschiede in der pharmakologischen Charakteristik der einzelnen P2X-Rezeptoren besitzen sie erhebliche genetische Verwandtschaft. So ist beispielsweise die Basensequenz des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors zu 50% identisch mit der des P2X<sub>4</sub>-Rezeptors. Der P2X<sub>5</sub>-Rezeptor hat mit dem P2X<sub>4</sub>-Rezeptor sogar 52% seiner Basensequenz gemeinsam (Humphrey et al., 1998).

Neben der homooligomeren Wirkungsweise, die alle Subtypen außer P2X<sub>6</sub> zeigen, sind P2X-Rezeptoren in der Lage, ihre Wirkung sowohl in vitro als auch in vivo durch Heterooligomerbildung zu entfalten. Dies bedeutet, daß unterschiedliche Subtypen, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, miteinander Ionenkanäle bilden können. So koexistieren zum Beispiel P2X<sub>2</sub>- und P2X<sub>3</sub>-Rezeptoren in Form von Heterooligomeren in Neuronen der Spinalganglien der Ratte (Vulchanova et al., 1997). Diese Heteromere zeigen dann ganz neue pharmakologische Eigenschaften, die die Homomerrezeptoren nicht besitzen. In vitro Experimente zeigten, daß, bis auf den

P2X<sub>7</sub>, der keine Heterooligomerbildung mit anderen Rezeptoren eingeht, jeder P2X-Rezeptorsubtyp in der Lage ist, mit anderen P2X-Rezeptoren heterooligomere Strukturen zu bilden (Torres et al., 1999). P2X<sub>6</sub> scheint sogar ausschließlich als Teil eines heterooligomeren Komplexes zu arbeiten (Le et al., 1998). Die Aktivierung der P2X-Rezeptoren erfolgt klassisch durch ATP, ADP, 2-meSATP,  $\alpha,\beta$ -meATP und ATP $\gamma$ S (Khakh et al., 1995). Diadenosinpolyphosphate, vor allem das Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A, sind in der Lage, sowohl rekombinante (Wildmann et al., 1999) als auch native P2X-Rezeptoren (van der Giet et al., 1999; Lewis et al., 2000) zu aktivieren. Spezifischer Antagonist an P2X-Rezeptoren ist Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure (PPADS). Trinitrophenyl-substituiertes ATP ist in der Lage, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub> und das Heteromer P2X<sub>2/3</sub> spezifisch zu antagonisieren (Virginio et al., 1998). Das Suraminanalogon 8,8-Carbonylbis(imino-3,1-phenylencarbonylimino)bis(1,3,5-naphtalen-trisulfonsäure) (NF023) antagonisiert die Wirkung von ATP am P2X<sub>1</sub>-Rezeptor in einer 10-fach niedrigeren Konzentration als den P2X<sub>3</sub>-Rezeptor (Soto et al., 1999). Suramin ist ein unspezifischer P2-Antagonist.

Von den funktionell identifizierten P2Y-Rezeptoren, P2Y<sub>1-11</sub>, konnten bis heute 5 kloniert werden. Diese sind P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> und P2Y<sub>11</sub> (Harden et al., 1998). Agonisten an P2Y-Rezeptoren sind ATP, ADP, 2-meSATP,  $\alpha,\beta$ -meATP, ATP $\gamma$ S, andere Adenosinderivate, UTP und UDP. Auch an diesen Rezeptoren sind Diadenosinpolyphosphate in der Lage, eine Wirkung zu vermitteln (Ralevic et al., 1996). Antagonisten an P2Y-Rezeptoren sind der unspezifische P2-Antagonist Suramin und Reactive Blue 2.

### **1.3 Bedeutung, Lokalisation und Funktion von P2X-Rezeptoren**

P2X-Rezeptoren spielen in verschiedenen Organsystemen eine Rolle, wobei ATP den entscheidenden Transmitter darstellt (Burnstock, 1989). Obwohl pharmakologische Effekte von Adeninverbindungen bereits 1929 beschrieben wurden (Drury et

al., 1929), gelangte erst 1972 Geoffrey Burnstock zu der Erkenntnis, daß ATP und dessen Metabolite von mutmaßlichen purinergen Neuronen als Kotransmitter oder Neurotransmitter ausgeschüttet werden (Burnstock, 1972). Purinrezeptoren als verantwortliche Empfänger-moleküle wurden erstmals 1978 beschrieben (Burnstock, 1978).

P2X-Rezeptoren vermitteln eine Reihe physiologischer Effekte. Im zentralen Nervensystem sind sie an der Nozizeption beteiligt, wobei dem P2X<sub>3</sub> hier wahrscheinlich eine entscheidende Rolle zukommt (Tsuda et al., 1999). Im kardiovasulären System üben P2X-Rezeptoren ihre Wirkungen an Thrombozyten (vor allem P2X<sub>1</sub>, Vial et al., 1997), an Mastzellen (P2X<sub>7</sub>, Cockcroft et al., 1979), an Endothelzellen (P2X<sub>4</sub>, Yamamoto et al., 2000), an Myokardzellen (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, Bogdanov et al., 1998) und an glatten Gefäßmuskelzellen (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, Nori et al., 1998) aus.

Im kardiovaskulären System sind Purinrezeptoren vor allem an der Blutdruckregulation beteiligt (van der Giet et al., 1997; 1999). Aufgrund des Vorkommens von ATP-abbauenden Phosphatasen in den verschiedenen Geweben scheint ATP in vivo in bezug auf die Aktivierung von Gruppe 1 P2X-Rezeptoren eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Sneddon et al., 2000) verglichen mit der Aktivierung durch Dinukleotide (van der Giet et al., 1997).

Dinukleotide sind Verbindungen, die sich in der Anzahl ihrer Phosphatgruppen unterscheiden (Np<sub>n</sub>N, n=2-8). Sie wurden in menschlichen Thrombozyten, Nebennieren, Hepatozyten, im ZNS, in Placentae, Herzen und in Plasma nachgewiesen. Sie zeigten eine Fülle physiologischer und pathophysiologischer Effekte. Vor allem im kardiovaskulären Bereich sind die Diadenosinpolyphosphate Ap<sub>5</sub>A und Ap<sub>6</sub>A und die Adenosinepolyphosphoguanosine Ap<sub>5</sub>G und Ap<sub>6</sub>G vasoaktiv im Sinne einer arteriellen Drucksteigerung wirksam. Nach intraaortaler Applikation am Ganztiermodell der Ratte (Schlüter et al., 1994), an der isolierten perfundierten Rattenniere (van der

Giet et al., 1999), an isolierten perfundierten humanen Nabelschnurvenen (Davies et al., 1995) und an Mesenterialarterien der Ratte (Ralevic et al., 1995; Lewis et al., 2000) induzieren  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  eine Kontraktion der Gefäße.  $Ap_5G$  und  $Ap_6G$  bewirken an der isolierten perfundierten Rattenniere eine Drucksteigerung (Schlüter et al. 1998; van der Giet et al., 2001). An Mesenterialarterien der Ratte führen  $Ap_5G$  und  $Ap_6G$  zu einer Kontraktion (Lewis et al., 2000). Wie Antagonisierungsversuche bewiesen, werden diese Effekte über Gruppe 1 P2X-Rezeptoren vermittelt (van der Giet et al., 1999; 2001; Lewis et al., 2000). Versuche an rekombinanten Gruppe 1 P2X-Rezeptoren zeigten eine deutliche Aktivierung durch Diadenosinpolyphosphate (Wildman et al., 1999) und Adenosinpolyphosphoguanosine (noch nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Die Tatsache, daß die Effekte von  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  in der isolierten perfundierten Rattenniere durch zwei unterschiedliche P2X-Rezeptoren vermittelt werden (van der Giet et al., 1999), stellt die physiologische Grundlage der vorliegenden Arbeit dar.

#### 1.4 Fragestellung

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß  $Ap_5A$  und  $Ap_6A$  in den Rattennieren durch zwei unterschiedliche P2X-Rezeptoren den Blutdruck regulieren. Der eine Rezeptor ist ein P2X1-Rezeptorsubtyp. Der zweite P2X-Rezeptorsubtyp entspricht vom Profil her einem Typ I Rezeptor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den zweiten bisher nicht identifizierten Purinrezeptor mit Hilfe von molekularbiologischen und pharmakologischen Untersuchungen weiter zu charakterisieren.

Es soll folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Welche Purinrezeptorsubtypen sind in der Rattenniere exprimiert, insbesondere in Nierenmark und Nierenrinde?
2. Inwiefern beeinflussen Antagonisten von P2X-Rezeptoren mit unterschiedlicher Blockade der einzelnen Subtypen, wie NF023, Suramin, oder auch PPADS, die Vasoaktivität von  $Ap_6A$  in der Niere?