

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Das endothelial sezernierte Dinukleosidpolyphosphat
Uridin-Adenosin- Tetrphosphat ist ein potenter
Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskelzellen
über Aktivierung von P2Y-Rezeptoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Funda Taner

aus Karlsruhe

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet
2. Prof. Dr. med. H. Peters
3. Prof. Dr. med. K. Kisters

Datum der Promotion: 19.09.2008

Meinem

Vater ...

Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Atherosklerose	1
1.2. Dinukleosid-Polyphosphate.....	4
1.3. Das purinerge System.....	5
1.4. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP ₄ A)	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	11
2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien.....	11
2.1.3. Gerätschaften	12
2.1.4. Reaktionssets (Kits).....	13
2.1.5. Verbrauchsmaterial	13
2.1.6. Software	14
2.2. Methoden	14
2.2.1. Isolation von VSMCs aus thorakalen Aorten von WKY- Ratten.....	14
2.2.2. Zellkultur	14
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl	15
2.2.4. Versuchsvorbereitung.....	16
2.2.5. BrdU-Assay	16
2.2.5.1. Funktionsprinzip des Produktes	17
2.2.5.2. Testprinzipien.....	18
2.2.5.3. Assay-Zeit.....	18
2.2.6. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von alpha-Aktin	20
2.2.7. Auswertung mit Prism 4.0.....	21
2.2.8. Statistik.....	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Proliferation von VSMCs durch Uridin-Adenosin-Tetraphosphat	22
3.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Proliferation der VSMCs	23
3.3. Einfluss der Up ₄ A-Konzentration auf die Up ₄ A-induzierte Zellproliferation.....	24
3.4. Purinrezeptorantagonisten und Up ₄ A-induzierte Zellproliferation.....	25
3.5. PDGF potenziert Up ₄ A-Effekt.....	26
4. Diskussion	28
4.1. Die Bedeutung von Dinukleosiden in der Proliferation von VSMCs	28

4.2. Rezeptorvermittelte Wirkung von Dinukleosidpolyphosphaten	29
5. Zusammenfassung	31
6. Literaturverzeichnis	33
7. Danksagung	38
8. Lebenslauf.....	39
9. Erklärung.....	42

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopischer Nachweis von VSMCs.....	22
Abbildung 2: Einfluss von Up ₄ A und anderen bekannten Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen aus der Aorta thoracica von WKY-Ratten.	23
Abbildung 3: Zeitabhängige Wachstumsstimulation mit Up ₄ A	24
Abbildung 4: Dosisabhängige Up ₄ A- Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen.....	25
Abbildung 5: Einfluss von P ₂ Y- Rezeptorantagonisten auf die Up ₄ A- induzierte Proliferation.....	26
Abbildung 6: Potenzierende Wirkung von Up ₄ A auf das PDGF- induzierte Wachstum .	27

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen BrdU-Lösungen 19

IV. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANAPP 3	Arylazido aminopropionyl adenosine triphosphate
ATP	Adenosintriphosphat
BRDU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
DNA	Desoxyribonucleid Acid
EDRF	Endothelin derived relaxing factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G- Protein	Guaninnucleotide-bindendes Protein
HDL	High density lipoprotein
ICAM	Intercellular adhesion molecul
IUPHAR	International union of pharmacology
LDL	Low density lipoprotein
oxLDL	Oxidierte Form des LDL
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
NO	Nitric oxide
PDGF	Plateled derivated growth factor
PEAF	Plateled derivated growth factor
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEF	Platelet-endothelial factor
POD	Peroxidase
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PGI2	Prostacyclin
PPADS	Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate
RB 2	Reactiv blue
SD	Standard deviation
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
WKY	Wistar-Kyoto-Ratte
vWF	Von Willebrand-Faktor

1. Einleitung**1.1. Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist eine sich über Jahre erstreckende chronische Erkrankung arterieller Gefäße, die neben der essentiellen Hypertonie in der Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen einen hohen Stellenwert einnimmt (Ross 1999). Nach heutigem Verständnis ist sie an der Entstehung zahlreicher weiterer Krankheitsbilder beteiligt, von denen die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK), der zerebrale Insult und die Niereninsuffizienz hervorzuheben sind. Kardiovaskuläre Erkrankungen, die im Zuge einer Atherosklerose auftreten, stellen heute die häufigste natürliche Todesursache dar (Braunwald 1997; Breslow 1997). In die Ätiologie der Atherosklerose ist eine Vielzahl endo- und exogener Faktoren eingebunden, so dass sich von einem multifaktoriell bedingten Geschehen sprechen lässt.

Nach heutiger Auffassung kommt der arteriellen Hypertonie (Gress, Nieto et al. 2000; Danese, Vestri et al. 2006) eine außerordentliche Bedeutung zu; so liegt derzeit die Atherosklerosewahrscheinlichkeit für Hypertonie-Patienten deutlich höher als bei Menschen mit normalen Druckwerten (Su, Chien et al. 2006).

Neben der Hypertonie sind andere sogenannte Wohlstandsleiden wie Hyperlipidämien (Jaillard 1983), Diabetes mellitus (Kunjathoor, Wilson et al. 1996), Hyperhomozysteinämie (Selhub, Jacques et al. 1995), Nikotinabusus (Oliver 1989) und Adipositas (Stamatelopoulos, Lekakis et al. 2006) in die Entstehung, Förderung und Unterhaltung der Atherosklerose involviert. Ferner wird eine Vielzahl weiterer Faktoren als Ursachen diskutiert, darunter genetische Faktoren und infektiöse Agentien wie Chylamidia pneumoniae (Blanchard, Bailey et al. 1993) und Herpesviren (Adam, Melnick et al. 1987).

Zur Pathogenese der Atherosklerose wurden bereits Mitte des 19. Jahrhunderts Hypothesen entwickelt (Marson, Zanchin et al. 2004). In der *Response-to-injury*-Hypothese behaupteten Ross und Glomset 1976, Risikofaktoren wie Hypertonus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus verursachten chronische Endothelschäden, die ihrerseits zur Thrombozytenaggregation und zur Sekretion von Wachstumsfaktoren führten (Ross and Glomset 1976). Die Annahme, Endothelläsionen würden der Intimaverdickung und Lipidaufnahme zwingend vorausgehen, konnte morphologisch jedoch nicht bestätigt werden, so dass diese Auffassung in den

folgenden Jahren modifiziert wurde. In der Weiterentwicklung wurden auch Virchows *Lipidhypothese* und die *Inkrustationstheorie* von Rokitansky (1852) berücksichtigt (Capron 1989). Man kam zu dem Schluss, neben der morphologischen Komponente müsse die Funktionsstörung des Endothels ein wesentlicher Faktor in der Genese der Atherosklerose sein. Diese Funktionsstörung wird als *endotheliale Dysfunktion* bezeichnet (Schachinger and Zeiher 2000; Jarvisalo, Juonala et al. 2006; Rundek, Hundle et al. 2006).

Nach Ross ist die Atherosklerose eine Entzündung, die verschiedene Stadien durchläuft, die durch bestimmte zelluläre und nichtzelluläre Prozesse unterhalten werden (Ross 1999). Danach gibt es im arteriellen Gefäßschenkel Prädilektionsstellen, etwa Gefäßverzweigungen und Kurven, die die Entstehung atherosklerotischer Plaques begünstigen, da es besonders hier zu Strömungsänderungen kommt. Besonders die Zunahme von Scherkräften mit verstärkter Ausbildung von Turbulenzen ist hierbei zu beachten. Diese Änderungen bewirken in den betroffenen Gefäßabschnitten Veränderungen im Expressionsmuster der Zellproteine.

Zu erwähnen sind hier spezifische Adhäsionsmoleküle, darunter PEAf (platelet endothelial adhesion factor), ICAM (intercellular adhesion molecule) und verschiedene Selektine, die als Rezeptoren für Glykokonjugate und Integrine dienen und vermehrt an der Oberfläche der Endothelzellen erscheinen. Mit ihrer Hilfe können Entzündungszellen, v.a. Monozyten und T-Lymphozyten (T-Zellen), an diese Endothelzellen binden und sich dauerhaft anheften. Ein weiterer Bestandteil des Entzündungsprozesses ist die Migration von Leukozyten durch das Endothel hindurch, wobei wiederum bestimmte Moleküle, darunter PEF (platelet endothelial factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), Osteopontin und oxidativ-modifiziertes LDL (Holvoet, Jenny et al. 2006), notwendige Vermittler der Chemotaxis sind.

Eine erhöhte Cholesterinkonzentration im Blutplasma, insbesondere des LDL (low density lipoprotein), und die Akkumulation von Cholesterol in der Gefäßwand stellen ebenfalls Risikofaktoren für die Atherosklerosegenese dar. Als fatty streaks werden heute die frühesten, schon im Kindes- und Jugendalter feststellbaren Gefäßwandläsionen bezeichnet (Napoli, D'Armiento et al. 1997). Sie sind Ausdruck einer rein entzündlichen Gefäßwandreaktion, die mikroskopisch aus monozytenständigen Makrophagen und T-Zellen besteht (Stary, Chandler et al. 1994). Einer pharmakologischen Senkung der Plasmalipide kommt daher eine wichtige präventive Bedeutung zu (Grodos and Tonglet 1994; McMurray and Slattery 1994).

Auch die endotheliale Dysfunktion wird durch verschiedene Risikofaktoren ausgelöst; hierzu zählen die Erhöhung der LDL-Plasmakonzentrationen, reaktive Sauerstoffradikale (Barry-Lane, Patterson et al. 2001) und zahlreiche genetische Faktoren.

Ein weiterer Ausdruck der endothelialen Dysfunktion ist die Adhäsion mononukleärer Leukozyten (Monozyten, T-Zellen) und Thrombozyten an gestörte Endothelzellen. Diese Adhäsion ist zum einen die Folge aktivierter Zellen im Blutplasma, zum anderen illustriert sie, dass ein wichtiger antithrombotischer und antiadhäsiver Prozeß gestört ist: die Stickstoffmonoxid-Sekretion (NO) aus den Endothelzellen selbst (Sachais 2001). Hinzu kommt eine Vermehrung von Zytokinen, vasoaktiven Molekülen und Wachstumsfaktoren.

Besteht der Entzündungsprozess längerfristig, so werden Gefäßmuskelzellen durch Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Diese Phase wird als Intermediärläsion bezeichnet. Sie kann im weiteren Verlauf zu einer derart starken Gefäßwandverdickung führen, dass eine deutliche Einengung des Lumens resultiert. Nur zu Beginn dieses Geschehens reicht die Vasodilatation aus, die Lumenverengung zu kompensieren (Glagov, Weisenberg et al. 1987), was dann als Umbauphase bezeichnet wird. Die Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen führt ferner zur Synthese und Sekretion von Wachstumsfaktoren, Mediatoren, Zyto- und Chemokinen (Libby 1996; Libby, Geng et al. 1996; Raines and Ross 1996), die die fortgesetzte Schädigung der Gefäßwand unterhalten und letztlich zur Ausbildung fokaler Nekrosen führen (Falk 2006). Granulozyten kommen hingegen nur vereinzelt vor (Jonasson, Holm et al. 1986).

Das Zusammenwirken der oben erwähnten Einzelprozesse mündet in einer Entstehung und permanente Vergrößerung der fibrotischen Kappe, die dem eigentlichen Entzündungsherd, der aus Fetteinlagerung und Nekrose besteht, aufliegt. In diesem Stadium spricht man von einer fortgeschrittenen oder komplizierten Läsion. Freigesetzte Metalloproteinasen und viele weitere hydrolytische Enzyme verdünnen die fibrotische Kappe durch fortgesetzten Matrixabbau. Die Ruptur der ausgedünnten fibrotischen Kappe kann zu Spontanblutungen mit erneuter Thrombenbildung und letztlich zum Verschluss des Gefäßes führen.

1.2. Dinukleosid-Polyphosphate

Drury und Gyrögyi haben 1929 zum erstenmal die vasoaktive Wirkung von Adenin-Nukleotiden beobachtet (Drury and Szent-Gyorgyi 1929). Nachdem die Forscher Meerschweinchen ATP (Adenosintriphosphat) intravenös injiziert hatten, haben sie Hypotonie, Arteridilatation und einen Abfall der Herzfrequenz registriert. Holton vermutete 1959, ATP spiele eine Rolle als Neurotransmitter (Holton 1959). Seither sind diverse weitere Mediatoren identifiziert worden, darunter Angiotensin II, der Thrombozytenwachstumsfaktor (Platelet derived growth factor, PDGF) und zahlreiche Nukleotide.

Zu letzteren gehört eine neuartige Gruppe von Signalmolekülen: die Dinukleosidpolyphosphate (Hoyle 1990; Ogilvie, Blasius et al. 1996). Diesen Substanzen kommt eine besondere Rolle in der Kreislauf- und Gefäßphysiologie zu, v.a. wegen ihrer zweifachen Gefäßwirkung als Vasokonstriktoren *und* als Wachstumsfaktoren. Es handelt sich um Moleküle mit unterschiedlich langen Ketten aneinanderhängender Phosphatgruppen, die – wie bei Nukleotiden üblich – über Esterbindungen mit den Hydroxylgruppen an den 5'-C-Atomen beider Riboseeinheiten verbunden sind. Die international übliche Kurzschreibweise für solche Verbindungen lautet neutral N_pN' , wobei für N und N' die Buchstaben der beteiligten Nukleoside gesetzt werden, während n für die Anzahl der Phosphatgruppen steht.

Wie andere Mediatoren auch, werden Dinukleosidpolyphosphate vom Golgi-Apparat in intrazelluläre Vesikel verpackt, aus denen sie infolge bislang unbekannter Regulationsmechanismen parakrin freigesetzt werden. Zu den Zellen, die Dinukleosidpolyphosphate synthetisieren, gehören nach heutigem Wissen Erythrozyten (Forrester 1990; Ellsworth, Forrester et al. 1995), Thrombozyten (Born and Kratzer 1984; Gordon 1986), verschiedene Neuronen, sowie Zellen in Herz (Forrester 1990) und Nebennierenmark (Cena and Rojas 1990).

Als vielfältige Gruppe von extra- und intrazellulären Mediatoren greifen Dinukleosidpolyphosphate offenbar in unzählige Funktionen des Organismus ein, darunter

- Herz-Kreislauf-System,
- Thrombozytenaggregation,
- Nierenfunktion,
- Nervensystem,

- Immunsystem,
- Nozizeption,
- Kontraktion glatter Muskelzellen,
- Stoffwechselfunktionen und
- Zellwachstum.

1.3. Das purinerge System

Aus pharmakologischer Sicht sind die Dinukleosidpolyphosphate zu den Purinrezeptoragonisten zu rechnen, womit sie in einer Reihe mit jenen Nukleotiden stehen, die die Purinbasen Adenin und Guanin enthalten.

Der Begriff *purinerges System* geht auf Burnstock zurück und bezeichnet Rezeptoren, an die adeninhaltige Nukleoside oder Nukleotide binden (Burnstock 1972; Burnstock, Cocks et al. 1978). Inzwischen ist eine Vielzahl derartiger Rezeptoren im Organismus des Menschen identifiziert worden.

Burnstock unterschied zunächst nur P1- und P2-Rezeptoren. Die weitere Gliederung der P1-Rezeptoren orientiert sich an biochemischen, pharmakologischen und molekulargenetischen Faktoren und führt zu den vier Subtypen A1, A2A, A2B und A3, die alle in den Plasmamembranen o.g. Zellen lokalisiert sind und deren Signaltransduktion über die Aktivierung verschiedener G-Proteine (Guaninnucleotide-bindendes Protein) erfolgt. Ihre größte Häufigkeit findet sich bei Endothelzellen, wo sie über die oben erwähnten Signaltransduktionsmechanismen eine Vasokonstriktion (Subtyp A1) oder eine Vasodilatation (Subtyp A2) bewirken. Die P1- Rezeptoren werden mit Adenosin aktiviert und durch Methylxanthine gehemmt. P2-Rezeptoren lassen aufgrund von Molekularstruktur und Signaltransduktion zwei Untergruppenerkennen: ligandenabhängige Ionenkanäle (Benham and Tsien 1987) und G-Protein-assoziierte Rezeptoren (Dubyak 1991), die mit P2Y und P2X bezeichnet werden (Abbraccio and Burnstock 1994; Fredholm, Abbraccio et al. 1994). Sie lassen sich mit ATP und seinen Metaboliten aktivieren; Methyloxanthin beeinflusst sie nicht. Im folgenden gehe ich näher auf die zuletzt genannte Rezeptorenklasse ein, da besonders diese für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Die P2-Nomenklatur geht auf jene von Burnstock und Kennedy (1985) zurück (International Union of Pharmacology, IUPHAR). Beide hatten P2X- und P2Y-

Purinrezeptoren mit verschiedenartiger Gewebsverteilung und abweichenden pharmakologischen Profilen beschrieben. Sie hatten für P_{2X} -Rezeptoren zeigen können, daß die stabilen ATP-Analoga α,β - und β,γ -Methylen-ATP die stärksten Agonisten mit höchster Affinität darstellten. Für die P_{2Y} -Rezeptoren hatte sich 2-Methylthio-ATP als stärkster Agonist erwiesen, während α,β - und β,γ -Methyl-ATP lediglich eine schwache oder keine Wirkung erbrachten. Ferner hatte sich der P_{2X} -Rezeptor sowohl mit α,β -Methyl-ATP selektiv desensibilisieren als auch mit Arylazido-Aminopropionyl-ATP (ANAPP3) antagonisieren lassen (Kennedy and Burnstock 1985). Auch die Verteilung der Rezeptoren in den verschiedensten Geweben und die jeweiligen Funktionen haben Eingang in die Gliederung gefunden. So wurden P_{2X} -Rezeptoren v.a. im Vas deferens, in der Harnblase und in Gefäßmuskelzellen nachgewiesen, wo sie als Kontraktionsvermittler auftreten.

Gefäßmuskelzellen exprimieren die Subtypen P_{2X1} , P_{2X2} und P_{2X4} lokalisiert, die als ligandengesteuerte Ionenkanäle für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} passieren lassen. Bei Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es zur Depolarisation und Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran. Die rasch zunehmende zyttoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration löst eine Vasokonstriktion aus und sorgt so für eine Erhöhung des Blutdrucks.

P_{2Y} -Rezeptoren wurden stattdessen in Thrombozyten, in den Taenien des Kolons (Meerschwein) und am Endothel von Blutgefäßen gefunden, wo sie offenbar der Relaxation dienen. Die Subtypen P_{2Y1} und P_{2Y2} aktivieren G-Protein-assoziiert die Phospholipase C, woraus eine gesteigerte IP_3 -Bildung und wiederum eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol resultiert. Die so über P_{2Y1} -Rezeptoren ausgelöste vermehrte Synthese von Prostacyclin (PGI_2) und EDRF (endothelin derived relaxing factor) bewirkt sowohl eine Vasodilatation als auch eine Proliferation von Gefäßmuskelzellen. Bei den P_{2Y2} -Rezeptoren kommt es durch die vermehrte Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma zur Erhöhung der Prostacyclin- und NO-Synthese, welche zur Vasodilatation führt und zur die Thrombozytenaggregation hemmt.

P_{2Y4} -Rezeptoren führen über eine Aktivierung zweier G-Proteine zu einer Signalkaskade an deren Ende eine gesteigerte Ca^{2+} -Konzentration, Vasokonstriktion und Proliferation von Gefäßmuskelzellen stehen. Eine solche Vasokonstriktion wird ebenfalls durch Stimulation von P_{2Y6} -Rezeptoren erreicht. P_2 -Rezeptoren lassen sich aus glatten Muskelzellen und Gefäßendothel klonen.

Diejenigen pharmakologischen Profile, die man ursprünglich den P_{2X}- und P_{2Y}-Rezeptoren zugeschrieben hatte, scheinen eher von der Aktivierung solcher Rezeptoren auszugehen, die den Subtypen P_{2X}₁ und P_{2Y}₁ in Aufbau und Wirkung stark ähneln. Heute gilt eine Heterogenität innerhalb der P_{2X}-Antworten in den verschiedenen Gefäßmuskelzellen, den Kolontanien und im Gefäßendothel als gesichert. Ursache hierfür könnten die zahlreichen Subtypen mit ihren feinen Struktur- und Wirkdifferenzen sein.

Weitere P₂-Rezeptoren, die hauptsächlich durch ihre abweichende Pharmakologie identifiziert worden sind, erhielten die Bezeichnungen P_{2U} (ATP- und UTP (Uridintriphosphat)-aktiviert, weit verbreitet), P_{2T} (Plättchen-ADP-Rezeptor, vermitteln Thrombozytenaggregation) und P_{2Z} (in Mastzellen und Lymphozyten, vermitteln Zytotoxizität und Degranulation) (Gordon 1986; O'Connor, Dainty et al. 1991).

In den letzten Jahrzehnten sind weitere Subtypen entdeckt worden, deren derzeitige Bezeichnungen jedoch nicht als endgültig anzusehen sind: P_{2D} (Pintor, Diaz-Rey et al. 1993), P_{2S} (Wiklund and Gustafsson 1988), P_{2R} (von Kugelgen and Starke 1990), P₃ (Shinozuka, Bjur et al. 1988; Forsyth, Bjur et al. 1991), P₄ (Pintor and Miras-Portugal 1995) und Uridin- Nukleotid- spezifische Rezeptoren, sog. Pyrimidinrezeptoren (Seifert and Schultz 1989; von Kugelgen and Starke 1990).

Die Prüfung der P₂-Nomenklatur erfolgte aufgrund von Hinweisen, extrazelluläres ATP wirke über zwei Transduktionsmechanismen: Ionenkanäle und G-Proteine. Es zeigte sich zunehmend eine signifikante Heterogenität unter den nativen P₂-Rezeptoren, die sich in einer beachtlichen Vielfalt pharmakologischer Antwortprofile widerspiegelt, die sich offensichtlich nicht allein mit der Vielfalt der bekannter Subtypen erklären läßt.

1994 wurde offiziell vorgeschlagen, P₂-Rezeptoren in die Hauptgruppen P_{2X} und P_{2Y} zu gliedern, je nachdem, ob es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle (P_{2X}) oder G-Protein-assoziierte Strukturen (P_{2Y}) handelt. Hierbei sind auch Strukturunterschiede der P₂-Rezeptoren bei Säugern berücksichtigt. Inzwischen sind sieben P_{2X}- (P_{2X}₁₋₇) und fünf P_{2Y}-Subtypen (P_{2Y}₁, P_{2Y}₂, P_{2Y}₄, P_{2Y}₆, P_{2Y}₁₁) geklont, pharmakologisch charakterisiert und als valide Mitglieder der P₂-Familie bestätigt.

Der Sprung in der Zahlen-Abfolge der P_{2Y}-Rezeptorfamilie wird durch die späte Einsicht verursacht, daß manche Rezeptoren fälschlicherweise in diese Familie aufgenommen wurden. So eliminierte man nachträglich die Bezeichnungen P_{2Y}₅ (Webb, Feolde et al. 1996) und P_{2Y}₇ (Akbar, Dasari et al. 1996). Auch die bereits

geklonten Rezeptoren P2Y9 und P2Y10 erwiesen sich schließlich ebenso wenig als Nukleotidrezeptoren.

Die Subtypen P2Y4 und P2Y6 sind Uridin-Nukleotid-spezifische Rezeptoren, die geklont wurden und sensitiv auf UTP und UDP (Uridindiphosphat) reagieren. Deren Identifikation komplementiert frühere Vermutungen, basierend auf verschiedener Pharmakologie mancher biologischer Gewebe, dass endogene Uridin-Nukleotid-spezifische Rezeptoren existieren. Bevor diese geklont vorlagen, hatte man die Existenz solcher Subtypen nicht in Erwägung gezogen, und als Folge daraus wurde die Möglichkeit verschiedener UTP- und UDP-Selektivitäten für Mitglieder dieser Familie kaum beachtet. Bis heute ist daher die Literatur zu Agonistenprofilen unvollständig. Die Frage, ob P2Y4 und P2Y6 tatsächlich P2-Rezeptoren oder doch eher Subtypen anderer – bislang nicht geklonter – Moleküle sind, bleibt offen.

Das Fehlen selektiver Agonisten und Antagonisten, aber auch das Auftreten von Komplikationen, die durch Rezeptor-Koexpression und Agonisten-Interconversion entstehen, führen dazu, dass die Subtypenidentität der meisten endogenen Uridin-Nukleotid-spezifischen Rezeptoren derzeit unklar bleiben muss. Interessant ist, daß der Subtyp P2Y11 derzeit der einzige P2Y-Rezeptor mit deutlicher Selektivität für ATP ist – verglichen mit anderen Purin- und Pyrimidinnukleotiden.

Für die Wissenschaft boten die Entdeckungen des vergangenen Jahrzehnts nicht nur eine beachtliche Fülle bislang unbekannter Details, sondern im Gegenzug eine unübersehbare Frustration, da zahlreiche Neubewertungen den Abschied von früheren, als sicher angenommenen Auffassungen notwendig machten. Aufgrund o.g. Gründe ist es derzeit eine große Herausforderung, die endogenen Purin- und Pyrimidinrezeptoren in den verschiedensten biologischen Systemen zu charakterisieren. Weit schwieriger wird es sein, für all jene Rezeptoren herauszufinden, in welche physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen sie eingebunden sind. Gelingen kann eine solche grundlegende Charakterisierung erst unter Entwicklung und Verwendung Subtypen-selektiver Testpharmaka.

1.4. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP₄A)

Aufgrund der vasoaktiven und wachstumsstimulierenden Eigenschaft der Dinukleosidpolyphosphate hat das Interesse an diesen Substanzen in letzter Zeit stark zugenommen. Vor kurzem haben Jankowski et al mit einem aus stimuliertem menschlichen Gefäßendothel gewonnenen Überstand, den sie in isolierte perfundierte Rattennieren injiziert hatten, Vasokonstriktionen ausgelöst (Jankowski, Tolle et al. 2005). Nach Einsatz eines Purinrezeptorblockers war es zu einer stärkeren Hemmung dieser Vasokonstriktion gekommen als mit Endothelin-Rezeptor-Blockern. Anschließend war es den Forschern gelungen, einen neuartigen, offenbar proatherogenen Faktor zu isolieren und massenspektrometrisch zu identifizieren.

Dabei handelt es sich um das Dinukleosidpolyphosphat Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up₄A). Um zu prüfen, ob die oben beschriebene Vasokonstriktion tatsächlich als Up₄A-Antwort zu verstehen ist, wurden die nicht-selektiven P2X- und P2Y-Antagonisten PPADS (Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate) und Suramin eingesetzt, durch die eine signifikante Hemmung der Vasokonstriktion ausgelöst werden konnte. Dabei scheint Up₄A einen neuartigen, sehr potenten endothelabhängigen Vasokonstriktor darzustellen, der unter physiologischen Bedingungen in einer im Vergleich zum Endothelin weit höheren Konzentration vorkommt.

Diese Up₄A induzierte Vasokonstriktion konnte zum großen Teil der Aktivierung des P2X₁-Rezeptors zugeordnet werden. Darüber hinaus konnte nach Desensibilisierung des P2X₁-Rezeptores durch die kontinuierliche Perfusion mit α,β -Methylen-ATP eine weitere P2X₁-Rezeptor unabhängige vasokonstriktorische Komponente identifiziert werden, die auf eine Aktivierung des P2Y₂- oder P2Y₄-Rezeptor beruht. Somit konnte zum ersten Mal ein gemischtes Dinukleosidpolyphosphat identifiziert werden, das eine Affinität zu P2X und P2Y Rezeptoren besitzt, eine Eigenschaft, welche von vielen Uracil-haltigen Nukleosiden bekannt ist.

Die vasoaktive Potenz des Up₄A liegt offenbar nahe der von Noradrenalin: Beide hatten im Test den arteriellen Blutdruck erhöht, wobei Noradrenalin jedoch zu einem steilen, kurzzeitigen Anstieg führte, während der Up₄A-Effekt eher als prolongiert zu bezeichnen ist. Da sich auch andere purinhaltige Agonisten, wie ATP und UTP, im menschlichen Plasma befinden, wurde ihr Anteil an der Vasokonstriktion untersucht. Es stellte sich heraus, daß diese in erheblichem Maße an der endothelabhängigen Vasokonstriktion beteiligt sind, wobei die Effekte des Plasma-Up₄A wahrscheinlich deutlich überwiegen. Da Endothelzellen für die Freisetzung von ATP bekannt sind, könnte Up₄A auch als

Stimulans einer endothelialen ATP-Sekretion und damit als indirekter Gefäßregulator anzusehen sein. Die Tatsache, daß Up_4A einerseits nach Vasokonstriktion im Plasma gefunden wird, andererseits durch Stimulation mit ATP, UTP, Acetylcholin und Endothelin freigesetzt wird, lässt vermuten, die Substanz könne eine bedeutende Rolle in der Blutdruckregulation spielen. Die Besonderheit des Up_4A liegt zum einen in seinem endogenen Vorkommen, zum anderen in seinem Aufbau, denn es handelt sich um das erste isolierte Dinukleosid, das sowohl eine Pyrimidin- (Uracil) als auch eine Purinbase (Adenin) enthält. Vasokonstriktiv wirkt Up_4A wahrscheinlich hauptsächlich über den Purinrezeptorsubtyp P2X1, doch kommen hierfür auch die Subtypen P2Y2 und P2Y4 in Frage. Da über die letztgenannten Rezeptoren zahlreiche weitere Effekte wie Zellproliferation und -differenzierung vermittelt werden, ergeben sich Fragen zum Up_4A nicht allein zu seiner Wirkung als Vasoaktivator, sondern auch zu Langzeiteffekten im Innern der Gefäßwand.

Fragestellung

In den letzten Jahren ist die Bedeutung der Dinukleosidpolyphosphate stark gestiegen, besonders ihre Doppelwirkung aus Vasokonstriktion und Wachstumstimulation ist dafür wesentlich verantwortlich. Mit der Entdeckung des neuartigen endothelabhängigen Mediators Up_4A stellen sich die folgenden Fragen, auf die in der vorliegenden Arbeit eingegangen wird.

- Induziert das Dinukleosidpolyphosphat Up_4A als endothelial sezernierter Mediator eine sichtbare Proliferation von Gefäßmuskelzellen?
- Über welche Rezeptoren wird eine solche durch Up_4A induzierte Proliferation von Gefäßmuskelzellen vermittelt?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei den eingesetzten Versuchstieren handelt es sich um männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere haben ein Durchschnittsalter von 62 Tagen (56–74 Tage) und ein mittleres Körpergewicht von 123 g (98–147 g). Sie werden in Kolonie bei einer Raumtemperatur zwischen 19 und 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 70% in einem begehbaren Tierstall ohne Fenster gehalten. Ein Zeitschaltprogramm gibt einen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden vor (Tag = Dauerbeleuchtung von 6 bis 18 Uhr). Als Einstreu dient entstaubte keimfreie Weichholzfaser (Fa. Altromin, Soest, Deutschland), die zweimal in der Woche gewechselt wird. Trinkwasser und Trockenfutter (Fa. Altromin, Soest) werden ad libitum angeboten, zusätzlich dreimal je Woche Körner und Obst. Zwischen Anlieferung und dem ersten Tierversuch liegen mindestens 5 Tage zur Akklimation. Die Artenexplantation für die In-vitro-Versuche wird zwischen 6 und 12 Uhr durchgeführt.

2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe/D
Albumin	Roth, Karlsruhe/D
Antikörper: monoclonal anti- Actin	
α- smooth muscle- FITC	Sigma, St. Louis/USA
Bidestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Fluka, Buchs/CH
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
BSA-Standard	Pierce, Rochford/USA
Dinatriumphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Life Technology, Paisley/USA
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin/D
Glukose	Merck, Darmstadt/D
L-Glutamin	Sigma, St. Louis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D

Kaliumazetat	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, St. Louis/USA
Ketamin	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumsulfat (Mg ₂ SO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt/D
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt/D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Penicillin-Streptomycin (100×)	Biochrom, Berlin/D
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin/D
Polyvinyl alcohol mounting medium	Fluka, St. Louis/USA
Salzsäure (HCl), rauchend	Merck, Darmstadt/D
Tris-buffered saline (TBS)	Roth, Karlsruhe/D
Xylazin	Sigma, St. Louis/USA
Von Willebrand- Faktor (vWF)	Roche Bioscience, Mannheim/D

2.1.3. Gerätschaften

Analysewaage	Sartorius, Göttingen/D
Computer	Fujitsu Siemens, Sunnyvale/USA Compaq/HP, Berlin/D
Gefrierschränke	- 80°C Heraeus, Osterode/D Forma Scientific, Marietta/USA
	- 20°C Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)	Brand, Wertheim/D
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß/D
Magnetrührer	IKA-Werk, Staufen in Breisgau/D
Mehrkanalpipette	Biohit, Helsinki/SN
Mikroskope	Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/D
Monitor	LG, Seoul/Ko

pH-Messgeräte	Beckman, Palo Alto/USA
pH-Messgerät PHM210	Radiometer, Copenhagen/DK
pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes, Bedford/USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/D
Schüttler	New Brunswick Scientific New Jersey/USA
Sterilarbeitsbank Herasafe (Klasse II)	Heraeus, Osterode/D
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wärmeschrank	Heraeus, Osterode/D
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe/D Julabo, Seelbach/D
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg/D
Cell counter + Analyser System Casy 1 TTC	Schärfe System, Reutlingen/D
Zentrifugen	Heraeus, Osterode/D Sorvall, Newtown/USA

2.1.4. Reaktionssets (Kits)

BRDU Assay Kit	Merck, Darmstadt/D
----------------	--------------------

2.1.5. Verbrauchsmaterial

Cover Slides BD Falcon CultureSlides	BD Bioscience, Bedford/USA
Deckgläser	Roth, Karlsruhe/D
Einwegskalpelle	Rüttgers, Solingen/D
Kulturflaschen	Nunc, Roskilde/DK
Objektträger	Roth, Karlsruhe/D
Pipettenspitzen	Süd Laborbedarf, Gauting/D
Präparationsbesteck	FST, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg/D
0,5 ml	Eppendorf, Hamburg/D
1,5 und 2,0 ml	Falcon, Oxnard/USA
15 und 20 ml	Greiner, Nürtingen/D
Schläuche	VWR, Darmstadt/D
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun Melsungen, Melsungen/D

2.1.6. Software

Adobe Acrobat 6.0 Professional	Adope Systems Inc., San Jose/USA
Adobe Photoshop 7.0	Adope Systems Inc., San José/USA
Endnote 6.0	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
MS Office 2003 Professional	Microsoft Corp., Redmond/USA
MS Explorer 6.0	Microsoft Corp., Redmond/USA
Prism 4.0	GraphPad Software, San Diego/USA

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von VSMCs aus thorakalen Aorten von WKY- Ratten

Die Isolierung von Gefäßmuskelzellen (engl. vascular smooth muscle cells, VSMC) erfolgt nach der langjährig etablierten Explant-Methode nach Russel Ross (Ross and Glomset 1974). WKY-Ratten im Alter von durchschnittlich 62 Tagen (56–74 Tage) werden per intramuskuläre Injektion mit Xylazin und Ketamin betäubt. Nach Thorakotomie wird die thorakale Aorta vorsichtig präpariert, nach Injektion heparinisierte PBS-Lösung (200 µl) intrakardial explantiert und direkt in warmes DMEM-Medium überführt. Letzteres enthält 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die weitere Präparation erfolgt erst unter einer Zellkulturbank.

Nachdem die Adventitia vollständig entfernt und die Aorta längs aufgeschnitten ist, wird das Endothel entfernt. Anschließend wird die Aorta zerkleinert, die Stücke in sterile Zellkulturflaschen überführt und mit Nährmedium bedeckt. Nach durchschnittlich sechs bis acht Tagen wachsen die ersten Gefäßmuskelzellen aus den Gewebestücken.

Zur Differenzierung des jeweiligen Zelltyps wurden fluoreszenzmikroskopische Färbungen des alpha-Aktin Gehaltes durchgeführt. Zusätzlich werden die Zellen auf Endothelmarker hin untersucht (Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM). Nur solche Primärkulturen, die ausreichend viele α -Aktin-positive Zellen enthalten und PECAM-negativ reagieren, werden in die weitere Passagierung eingeschlossen.

2.2.2. Zellkultur

Die aus thorakalen Aortensegmenten von WKY-Ratten gewonnenen Gefäßmuskelzellen (VSMCs) werden in der Zellkultur angelegt und kultiviert. Zum Erhalt der Zellen wird in Abständen von zwei bis drei Tagen das Medium erneuert. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um DMEM (1,0 g/l D-Glucose), versetzt mit

fetalem Kälberserum (FCS, 10%) und 1% Penicillin/Streptomycin. Es enthält die für das Wachstum der Zellen notwendigen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren und sorgt für konstante Osmolarität und pH-Wert. Die zusätzliche Supplementierung des Mediums mit Antibiotika dient der Verhinderung von Kontaminationen. Für den Mediumwechsel wird das alte Medium abgesaugt und frisches in derselben Menge, zuvor im Wasserbad bei 37°C erwärmt, zugegeben.

Neben dem Mediumwechsel erfolgte in regelmäßigen Abständen die Splittung der konfluenten Zellkultur, um das Überleben der Zellen zu sichern. Hierzu werden die Zellen nach Absaugen des alten Mediums trypsiniert, um sich vom Boden abzulösen. Nach einer Minute wird das Trypsin abgesaugt, weitere fünf Minuten im Inkubator (37°C) folgen. Um die Trypsinaktivität zu stoppen, wird Medium mit FCS (10%) zugegeben, und die Zellsuspension bei 2200 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Nach diesem Schritt wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut mit FCS (10%) resuspendiert. Die so erhaltene Suspension wird dann auf die entsprechende Anzahl neuer Flaschen aufgeteilt, sodass die Verteilung der Suspension auf zwei neue Flaschen ein Splittverhältnis von 1:2 ergibt, bei drei Flaschen ein Verhältnis von 1:3.

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach der Neubauer-Zählkammer-Methode und wird folgendermaßen durchgeführt:

Die zu bestimmenden Zellen werden zentrifugiert (2200 rpm, 5 min). Danach wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Medium mit FCS (10%) resuspendiert. Es werden in einem sog. Eppendorf-Röhrchen 10 µl Trypanblau vorgelegt. Die Zählkammer wird mit Wasser und Ethanol (70%) gereinigt, angehaucht und das Deckgläschen aufgeschoben. Es wird ein Aliquot der Zellsuspension (10 µl) mit dem Trypanblau gemischt und direkt auf die Zählkammer gegeben. Jetzt werden jeweils die vier Felder mit Quadranten (s. Abbildung) ausgezählt und die Zellzahl nach der unten stehenden Formel bestimmt.

*Zellzahl = gezählte Zellen / Anzahl gezählter Felder × Verdünnungsfaktor (hier 2)
× Kammerfaktor (10 000)*

2.2.4. Versuchsvorbereitung

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden unterschiedliche Zellzahlen, Mangelmedien und Ruhebedingungen verwendet. Die Zellzahlen erstreckten sich dabei von 2.000 bis 10.000 Zellen pro Well. Nach mehreren Ansätzen wurde als bestmögliche Voraussetzung zur Versuchsdurchführung folgende gewählt:

Es wurde nach der Neubauer-Zählkammer-Methode die Zellzahl bestimmt, eine definitive Anzahl von Zellen auf Mikroplatten (96-Well-Platten) ausgesät und für 12 Stunden mit FCS (10%) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium (0%) für 24 Stunden ruhiggestellt. Erst danach wurden sie für sechs bis 48 Stunden mit U_p4A und anderen Testsubstanzen stimuliert. Vier Stunden vor Ende der Stimulation erfolgte die Markierung mit dem BrdU-Reagenz und nach Stimulationsende die im Abschnitt 2.2.6 erläuterte Assay-Prozedur.

2.2.5. BrdU-Assay

Markierung mit 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU):

Eine wichtige Entwicklung war der Ersatz von [3H]-Thymidin durch 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU). Diese Technik basiert auf der Inkorporierung des Pyrimidin-Analogons BrdU anstelle des Thymidins in die DNA (Desoxyribonucleid Acid) proliferierender Zellen. Nach seinem Einbau in die DNA wird BrdU mittels Immunassay nachgewiesen.

Mehrere monoklonale Antikörper mit hochgradiger Spezifität für BrdU sind beschrieben. Ursprünglich wurde die immunhistochemische Detektierung von S-Phase-Zellen sowie die Quantifizierung der Zellproliferation mit Hilfe von Mikroskopie und Durchflusszytometrie realisiert. Auch wenn diese Methoden sehr informativ waren, so zeigten sie sich zunehmend ungeeignet für die routinemäßige Proliferationsanalyse, da nur wenige Proben in kurzer Zeit analysiert werden konnten.

Porstmann et al. beschrieben 1985 erstmals einen Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Zellproliferation durch BrdU-Quantifizierung (Porstmann, Ternynck et al. 1985). Dieser BrdU-Assay wurde zum Gebrauch in der Wissenschaft konzipiert: präzise, schnell, einfach und frei von Radioaktivität. Basis ist die Chemilumineszenzmessung nach BrdU-Einbau in die DNA während deren Neusynthese in proliferierenden Zellen. Der Zellproliferations-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) kann also für verschiedenste In-vitro-Zellsysteme genutzt werden.

Produkt-Charakteristik:

- Spezifität: Das Antikörperkonjugat reagiert mit dem Thymidinanalogon BrdU und mit BrdU, das in DNA inkorporiert ist. Um an BrdU in der DNA binden zu können, muss BrdU-markierte DNA denaturiert werden. Die Antikörper zeigen keinerlei Kreuzreaktivität mit endogenen Substanzen wie Thymidin, Uridin und DNA.
- Sensitivität: In Abhängigkeit von verwendetem Zelltyp und Inkubationszeit haben sich $0,05 - 1,0 \times 10^4$ Zellen/Well als ausreichend für die meisten Versuchskonzepte herausgestellt. Die ELISA-Ergebnisse korrelierten sehr stark mit Daten des [³H]-Thymidin-Assays, einem lange etablierten Proliferationsassay.
- Messbereich: Die Quantifizierung der Chemilumineszenz wird von der Auflösung des Hauptgerätes (Photomultiplier) eingeschränkt. Kommerziell verfügbare Luminometer (Lichtmesser) haben einen dynamischen Bereich zwischen 10 und 2×10^6 relativen Lichteinheiten/Sekunde (rlu/s). Daher deckt der lineare Bereich mehr als vier Zehnerpotenzen ab, abhängig von der Hintergrundaktivität des gegebenen Immunoassays.

2.2.5.1. Funktionsprinzip des Produktes

Es konnte gezeigt werden, dass eine Bewertung der Zellproliferation durch Messung der BrdU-Inkorporierung in neu synthetisierte zelluläre DNA möglich ist. Außerdem wurde durch etliche Maus- und Humanzellsysteme (inklusive Mitogen- und Antigen-stimulierte Lymphozyten und Zytokin-induzierte Proliferation verschiedener Zelllinien) bewiesen, dass eine gute Korrelation zwischen BrdU-Zellproliferations-ELISA und [³H]-Thymidin-Assay besteht. Die Peroxidase (POD) katalysiert – bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) – die Oxidation von Diazylhydraziden wie Luminol. Ein Reaktionsprodukt im angeregten Zustand wird gebildet, das auf sein energetisches Ausgangsniveau zurückfällt und dabei Licht erzeugt. Das Signal (Photonen), das in Enzym-katalysierten, Licht-abgebenden Reaktionen erzeugt wird, ist identisch mit jenem Signal, das beim radioaktiven Zerfall in Scintillationsmessern detektiert wird. Die Chemilumineszenzmessung hat Charakteristika und Vorteile, die vergleichbar sind mit denen radioaktiver Methoden. Beide Methoden liefern also ein schnelles, über einen großen logarithmischen Messbereich konstantes Signal, das durch Photonendichtemessung mit Hilfe eines Mikrotiter-Platten-Luminometers und der Photomultiplier-Technology quantifiziert wird (Evaluation des Zellproliferations-ELISA

mittels LB 96 P-reader, EG & G Berthold). Dabei korrelieren die relativen Lichteinheiten je Sekunde (rlu/s) direkt mit der DNA-Synthese-Leistung und so mit der Zellproliferation in der jeweiligen Mikrokultur.

2.2.5.2. Testprinzipien

1. Die Zellen werden in Anwesenheit der jeweiligen Testsubstanz und über eine bestimmte Zeitspanne (1–5 Tage, abhängig vom jeweiligen Assay) in geeigneten 96-Well-MP bei 37°C kultiviert.
2. Anschließend wird BrdU hinzugefügt und die Zellen erneut inkubiert (über 4 Stunden). Während dieser „Markierungszeit“ wird das Pyrimidinanalogon BrdU anstelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut.
3. Nach Entnahme des Kulturmediums werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Die Denaturierung der DNA ist notwendig, um den Zugang der Antikörper zum achsennah liegenden BrdU zu verbessern.
4. Der anti-BrdU-POD-Antikörper (POD-markiert) wird hinzugefügt. Er bindet an BrdU, das Teil der neu synthetisierten DNA ist.
5. Die Immunkomplexe werden durch die folgende Substratreaktion detektiert.
6. Chemilumineszenz entsteht und wird gemessen.

2.2.5.3. Assay-Zeit

Die Assay-Zeit beträgt zwischen 1,5 und 3 Stunden, abhängig von der anti-BrdU-POD-Inkubationszeit (exklusive der Zeiten für Zellkultur und Antikörpermarkierung). Nach einer längeren Etablierungszeit wurde die Methode bezüglich der Inkubationszeiten variiert und verbessert, sodass im weiteren Verlauf folgende Schritte durchgeführt wurden:

1. 10 ul/Well BrdU-Labeling-Lösung hinzufügen (wenn Zellen in 100 ul/Well kultiviert sind) und bei 37°C für 4 Stunden inkubieren.
2. Entfernen des Labeling-Mediums durch Ausschütten und Abklopfen. Der Assay kann nach diesem Prozess unterbrochen und die Zellen nach dem Trocknen für eine Woche bei 2 bis 8°C gelagert werden.
3. 200 ul/Well Fix Denat hinzugeben und bei 15 bis 25°C für 30 Minuten inkubieren.
4. Fix Denat entfernen durch Ausschütten und Abklopfen.

5. 100 ul/Well Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung und bei 15 bis 25°C für ca. 60 Minuten inkubieren.
6. Entfernen der Arbeitslösung durch Ausschütten, Abklopfen und Spülen der Wells mit 200 ul/Well Waschlösung. Diese während des Spülvorganges ca. 2 Minuten in den Wells belassen.
7. Entfernen der Waschlösung durch Ausschütten und Abklopfen.
8. 100 ul/Well Substratlösung mit einer Multi-Channel-Pipette hinzufügen. Die Messung sollte 10 Minuten nach Zugabe der Substratlösung erfolgen.

Neben den schon fertigen Lösungen werden noch folgende Arbeitslösungen zubereitet:

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen BrdU-Lösungen

Inhalt	Zubereitung	Funktion
BrdU Labeling Lösung	BrdU-Labeling-Reagens verdünnen (Flasche 1) 1:100 in sterilem Kulturmedium (erhaltene Konzentration: 100 uM BrdU)	Markieren der Zellen 4 h vor Stimulationsende
Anti-BrdU-POD stock solution (Stammlösung)	Auflösen von Anti-BrdU-POD (Flasche 3) für 10 Minuten in 1,1 ml ddH ₂ O, mischen	Für die Aufbereitung der Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung
Anti-BrdU-POD-Arbeitslösung	Verdünnen (1:100) der Anti-BrdU-POD stock solution mit der Antibody dilution solution (Flasche 4).	Bindet an das in die neu synthetisierte DNA inkorporierte BrdU
Waschlösung	Verdünnen des Waschpufferkonzentrats (Flasche 5) 1:10 mit ddH ₂ O	Anwendung im Protokollschritt 6
Substratlösung	Mischen der Substratkomponente B (Flasche 7) 1: 100 mit der Komponente A (Flasche 6).	Bindet an Immunkomplexe und weist sie so nach

2.2.6. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von alpha-Aktin

Die Zellen der Primärkultur wurden morphologisch im Lichtmikroskop identifiziert. Zur eigentlichen Immunphänotypisierung dienten aus der Maus stammende monoklonale Antikörper gegen α -Aktin glatter Muskelzellen. Die indirekte Immunfluoreszenz erlaubt es, α -Aktin-positive und -negative Zellen zu unterscheiden und die jeweiligen Anteile auszuzählen, denn nur α -Aktin-positive Zellen fluoreszieren. Nur solche Primärkulturen wurden subkultiviert, deren α -Aktin-positiver Zellanteil bereits nach der ersten Passage über 95% lag.

Dass die experimentell verwendeten Kulturen frei von Endothelzellen waren, bestätigte der negativ ausgefallene Immunfluoreszenztest mit Antikörpern gegen den Von-Willebrand-Faktor (vWF).

Für die Immunfärbung wurden die Zellen auf sterile Objektträger gegeben und in vier separaten Kammern inkubiert. Zellen in Kammer 1 wurden mit Antikörpern gegen α -Aktin angefärbt, jene in Kammer 2 mit Antikörpern gegen den humanen vWF. Der Prüfung etwaiger Autofluoreszenz dienten die Zellen in Kammer 3, während jene in Kammer 4 eine Testung auf unspezifische Reaktionen des Fluoreszin-konjugierten Anti-Maus-Antikörpers mit Zellstrukturen ermöglichten.

Hatten die Zellen einen geschlossenen, einlagigen Verband gebildet (Monolayer), wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Dem schloss sich die Fixation mit Methanol (10 min, -20°C) an. Das Methanol wurde im Anschluss entfernt, und die Zellen wurden erneut mit PBS versetzt. Eine Überschichtung der Zellen mit fetalem Kälberserum (20 μl) und die Inkubation in der feuchten Kammer (30 min, 37°C) dienten dem Zweck, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

In der Folge wurde auch diese Flüssigkeit entfernt, der Primärantikörper (20 μl) hinzugegeben und erneut feucht inkubiert (60 min, Raumtemperatur). Nach zwei PBS-Waschungen wiederholte sich die letztgenannte Feuchtinkubation, diesmal jedoch mit Anti-Maus-IG-FITC-Lösung. Erst nach Abfolge dieser Schritte war das Zellpräparat zur Einbettung in das Eindeckmedium und zur anschließenden Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop bereit.

2.2.7. Auswertung mit Prism 4.0

Die Messwerte, die wir mit dem Mikrotiter-Platten-Luminometer und der Photomultiplier-Technology erhielten, wurden mit dem Graph Pad Prism ausgewertet. Der Prism kombiniert Biostatistics, wissenschaftliche Graphik und Kurvenanpassung in einem Programm und wurde entwickelt, um wissenschaftlichen Daten effektiv auszuwerten und zu präsentieren. Er bietet eine umfangreiche Auswahl an Darstellungen der Messwerte und berechnet zudem automatisch die Fehlerbalken für diese. Bei Fehlereingabe reicht es diesen zu korrigieren, so dass Prism wieder automatisch alle bereits erstellten Graphiken und Analysen neu berechnet.

2.2.8. Statistik

Zum Vergleich der Ergebnisse der Gruppen wurde der U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney benutzt. Dieser Test für unverbundene Stichproben ist verteilungsabhängig. Man bringt die $(m + n)$ Stichprobenwerte in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge. Die Summe der Rangzahlen von Stichprobe 1 sei R_1 , die von Stichprobe 2 sei R_2 .

$$U_1 = m * n + 0,5 * m * (m + 1) - R_1$$

$$U_2 = m * n + 0,5 * n * (n + 1) - R_2$$

$$U_1 + U_2 = m * n$$

Die Nullhypothese wird verworfen, wenn U als der kleinere Wert von U_1 und U_2 kleiner oder gleich dem tabellierten Wert $U(m, n; \alpha)$ ist.

Die Berechnung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism 4.0 (La Jolla, USA).

3. Ergebnisse

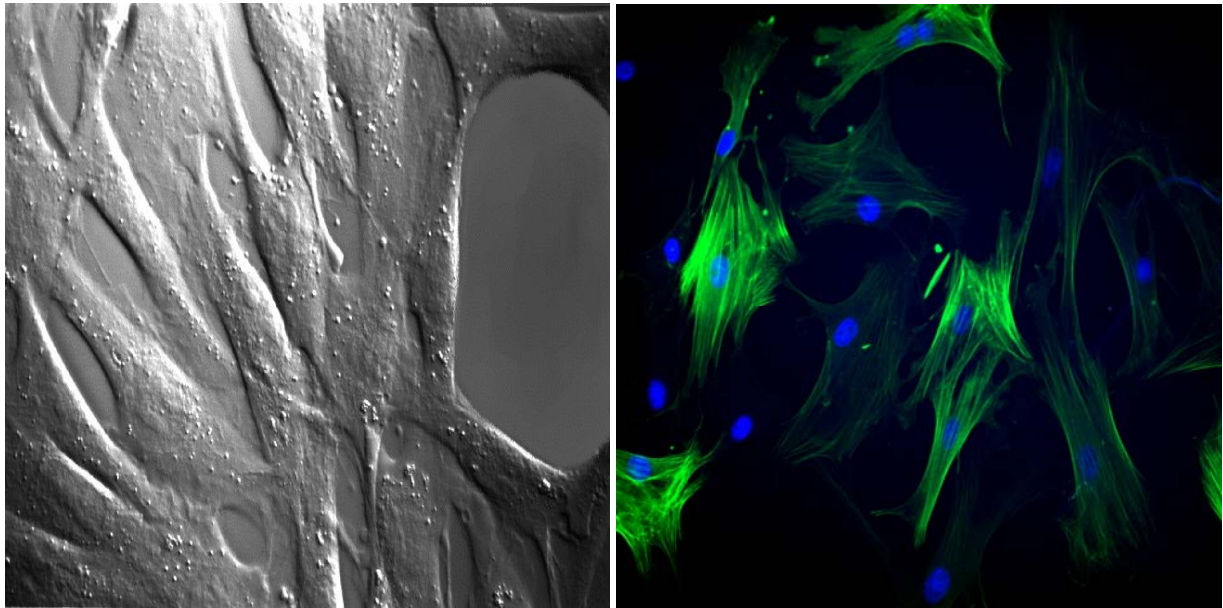


Abbildung 1: Mikroskopischer Nachweis von VSMCs

Mikroskopische Darstellung von VSMCs im DIC-Kontrast (linke Abbildung) und fluoreszenzmikroskopische Darstellung von alpha-Aktin in den VSMCs (rechte Abbildung)

3.1. Proliferation von VSMCs durch Uridin-Adenosin-Tetraphosphat

Um den Up_4A -Einfluss auf das Zellwachstum zu prüfen, wurden Gefäßmuskelzellen aus der Aorta thoracica von WKY-Ratten mit Up_4A und drei weiteren Wachstumsfaktoren (UDP, UTP, PDGF) stimuliert. Abbildung 2 zeigt den signifikanten Anstieg der Zellzahl (280%, SD 10,27) nach Up_4A -Zugabe (100 nmol/l) im Vergleich zum Basalwert, der als 100% festgelegt ist. Auch UDP (1 μ mol/l) und UTP (1 μ mol/l) bewirken eine deutliche Proliferation (297,8%, SD 8,0 bzw. 287%, SD 21,2) der Gefäßmuskelzellen, ebenso der zum Vergleich und als Kontrolle dienende der PDGF (50 ng/ml), dessen Wachstumssteigerung (314%, SD 15,1) ebenfalls dargestellt ist.

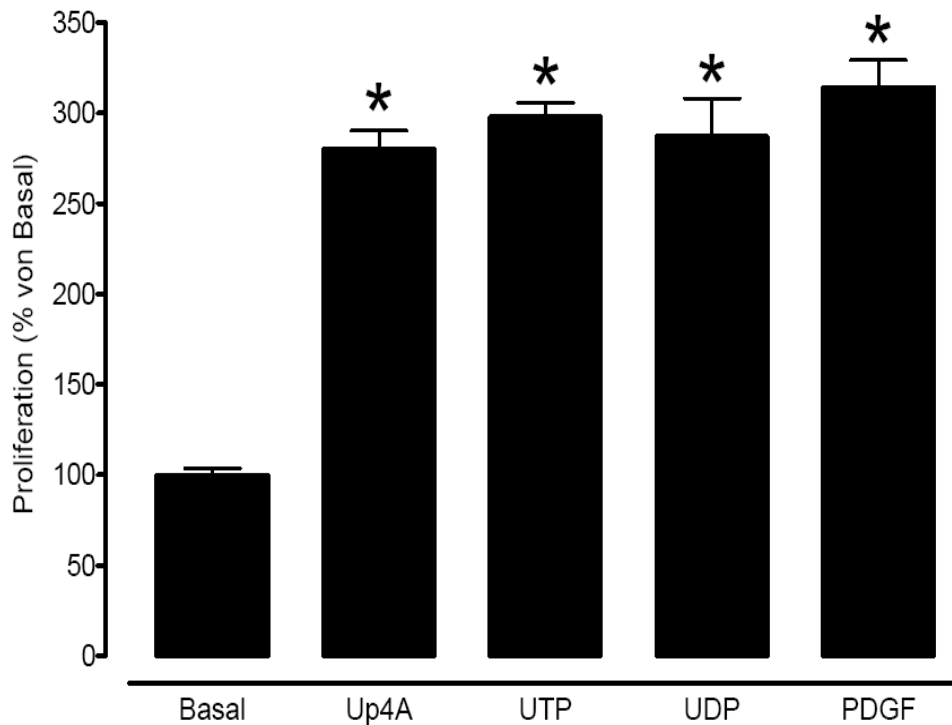


Abbildung 2: Einfluss von Up_4A und anderen bekannten Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen aus der Aorta thoracica von WKY-Ratten.

Die Zellen (5000/Well) wurden auf Mikroplatten ausgesät und für 12 Stunden mit FCS (10%) inkubiert. Nach Ruhigstellung (Medium, 0%) kamen Up_4A bzw. weitere Mediatoren hinzu. 24 Stunden später erfolgte die Messung der Proliferation (Assay-Prozedur), die in Prozent des Basalwertes (Zellen ohne Stimulation) dargestellt ist. Man erkennt deutlich den signifikanten Anstieg des Zellwachstums, bewirkt durch die jeweiligen Testsubstanzen. Aufgetragen ist die Proliferation von Basal in Prozent gegen die eingesetzten Testsubstanzen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus den durchgeführten Experimenten ($n=6$). Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichungen dar.

3.2. Einfluss der Inkubationszeit auf die Proliferation der VSMCs

Um die Bedeutung der Inkubationszeit mit Up_4A auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen zu bestimmen, werden erneut Gewebestücke aus der Aorta thoracica von WKY-Ratten verwendet. Die Zellen werden zwischen 12 und 48 Stunden mit Up_4A inkubiert, dann ihre Proliferation mit der Assay-Methode analysiert. Abbildung 3 zeigt ein nicht signifikantes Zellwachstum nach 12 Stunden (113,7% SD 11,5) im Vergleich zum Basalwert. Nach 24 Stunden ist ein deutliches Wachstum zu erkennen (263,3%, SD 11,6), das sein Maximum nach 36 Stunden erreicht, um langsam zurückzugehen, wobei es noch nach 48 Stunden sichtbar war (209,5 %, SD 15,2).

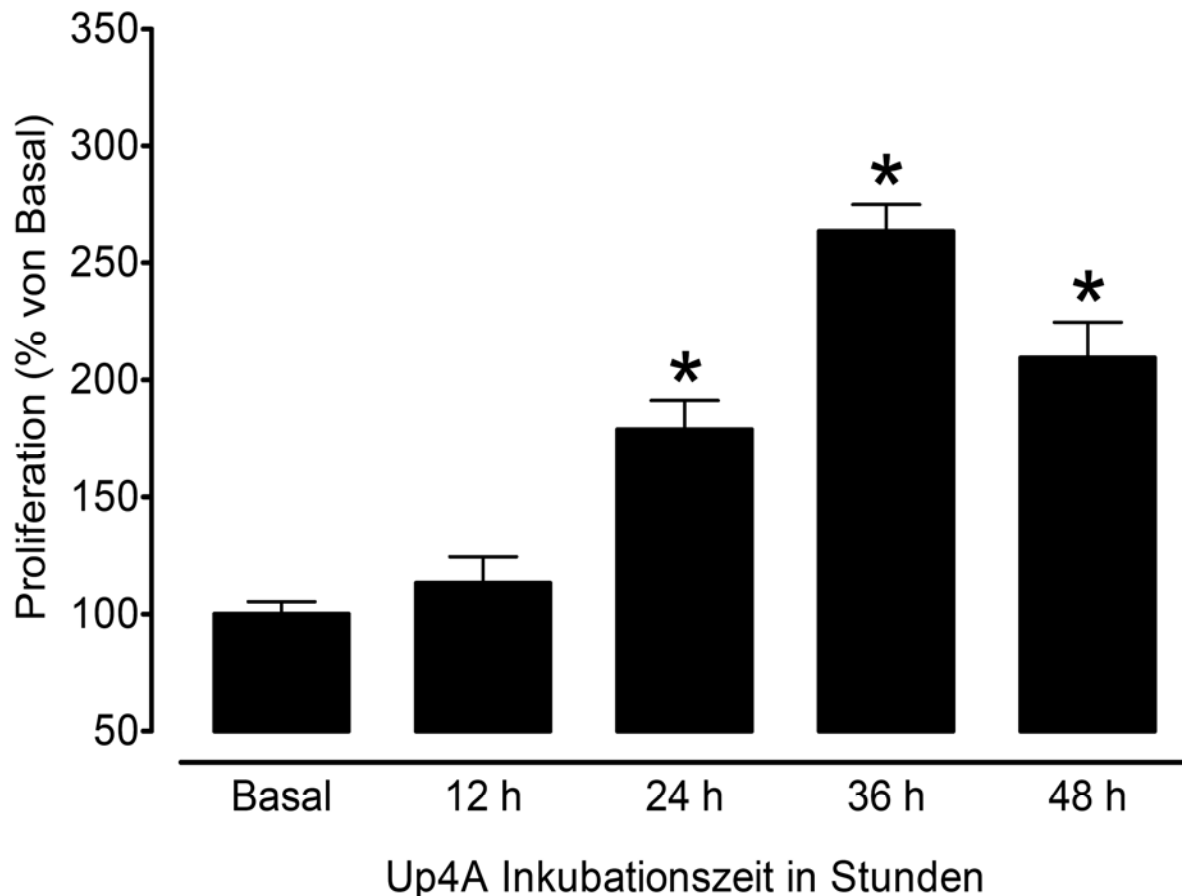


Abbildung 3: Zeitabhängige Wachstumsstimulation mit Up4A

Einfluss der Up₄A-Inkubationszeit auf die Proliferation der Gefäßmuskelzellen aus thorakalen Aortensegmenten von WKY-Ratten (Bedingungen wie in Abb. 1). 36 Stunden nach Up₄A-Gabe erreicht der signifikante Anstieg der Zellzahl seinen Maximalwert. Aufgetragen ist die Proliferation in Prozent von Basal gegen die Inkubationszeiten von 12 bis 48 Stunden in Abständen von 12 Stunden. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus den durchgeführten Experimenten (n=6). Die vertikalen Linien= SD

3.3. Einfluss der Up₄A-Konzentration auf die Up₄A-induzierte Zellproliferation

Nachdem die Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Up₄A auf das Zellwachstum untersucht wurde, wurden die Zellen (5000/Well) erneut ausgesät und wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurde Up₄A in steigenden Konzentrationen zwischen 100 pmol/l und 1 µmol/l zu den Zellen gegeben und diese wiederum für 24 Stunden inkubiert. Abbildung 4 zeigt, dass bei einer Up₄A-Konzentration von 100 pmol/l noch kein signifikantes Wachstum (8,28%, 111,83 SD) der Gefäßmuskelzellen, verglichen mit dem jeweiligen Basalwert, gemessen wurde. Erst ab einer Konzentration von 1 nmol/l war dies der Fall (154,3%, SD 7,8): Das Wachstum nahm mit steigender Up₄A-Konzentration zu und erreichte bei 1 µmol/l sein Maximum (281,2%, SD 9,0). Um

das Ausmaß der Zellproliferation zu beurteilen, wurden gleichzeitig Zellen mit dem bekannten Wachstumsmediator PDGF (50 ng/ml) inkubiert, dessen Wirkung (295%, SD 9,8) ebenfalls dargestellt ist.

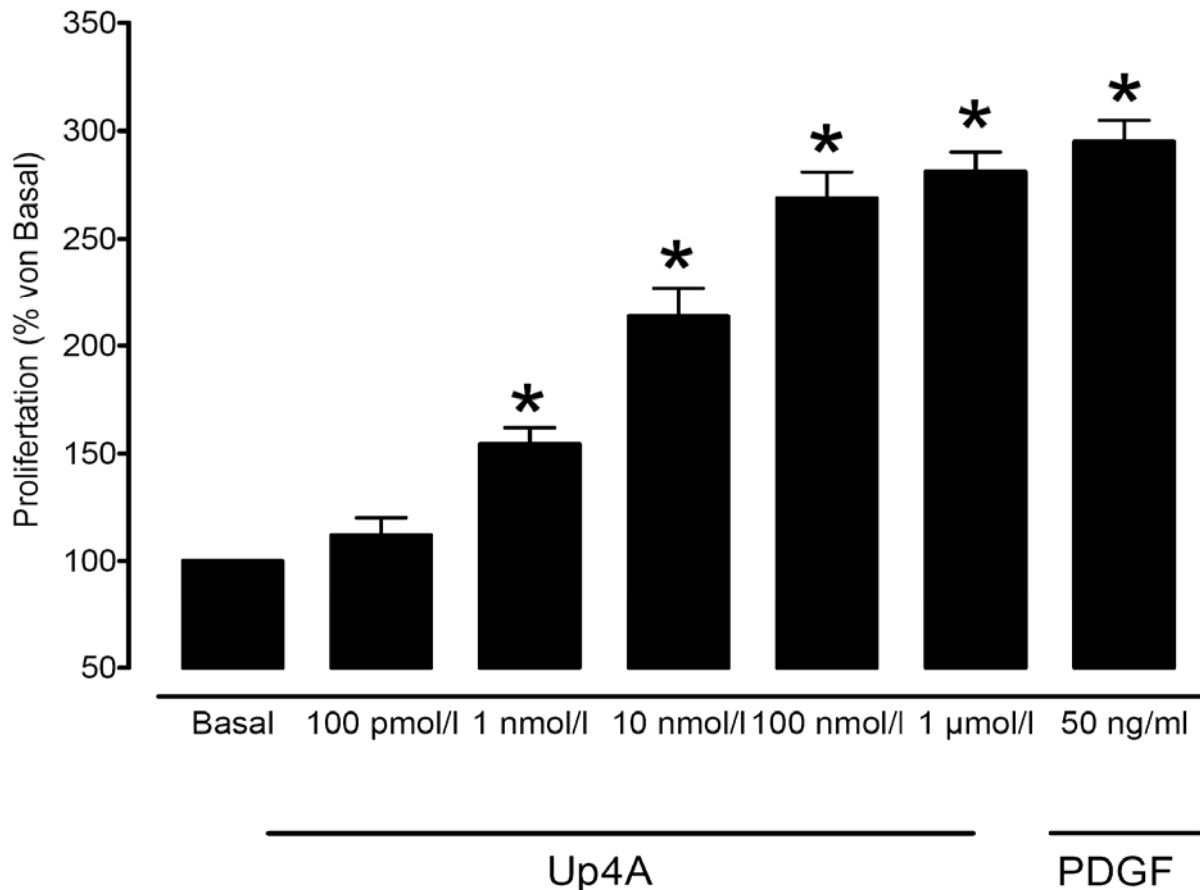


Abbildung 4: Dosisabhängige Up₄A- Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen

Dargestellt ist die Dosis- Wirkungskurve von UP₄A auf die Proliferation von Gefäßmuskelzellen aus thorakalen Aortenstücken von WKY- Ratten. UP₄A induziert nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden einen dosisabhängigen signifikanten Anstieg des Zellwachstums. Aufgetragen ist die Proliferation in Prozent von Basal gegen die jeweiligen Konzentrationen von UP₄A. Die Absolutwerte sind in der obigen Abbildung als Balkendiagramm dargestellt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert aus den durchgeführten Experimenten (n=6). Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichung dar.

3.4. Purinrezeptorantagonisten und Up₄A-induzierte Zellproliferation

Um zu prüfen, ob das Up₄A-induzierte Zellwachstum über P₂X- und P₂Y- Rezeptoren vermittelt wird, wurden die Zellen 24 Stunden zum einen mit Up₄A, zum anderen mit den nicht-selektiven und selektiven P₂X- und P₂Y-Antagonisten Suramin, PPADS, NFO-23 und RB2 inkubiert. Die allein von Up₄A induzierte signifikante Zellproliferation (281,2%, SD 17,9), ging nach Zugabe der Antagonisten deutlich zurück, wie die in

Abbildung 5 ersichtlichen Werte zwischen 150,8 und 128,2% (SD 7,9 bzw. - 9,3) zeigen. Ferner kam MRS 2176 zum Einsatz, der bislang einzige bekannte selektive P2Y1-Antagonist, der den Up₄A-Effekt jedoch nicht signifikant reduzierte (279,6%, SD 10,4).

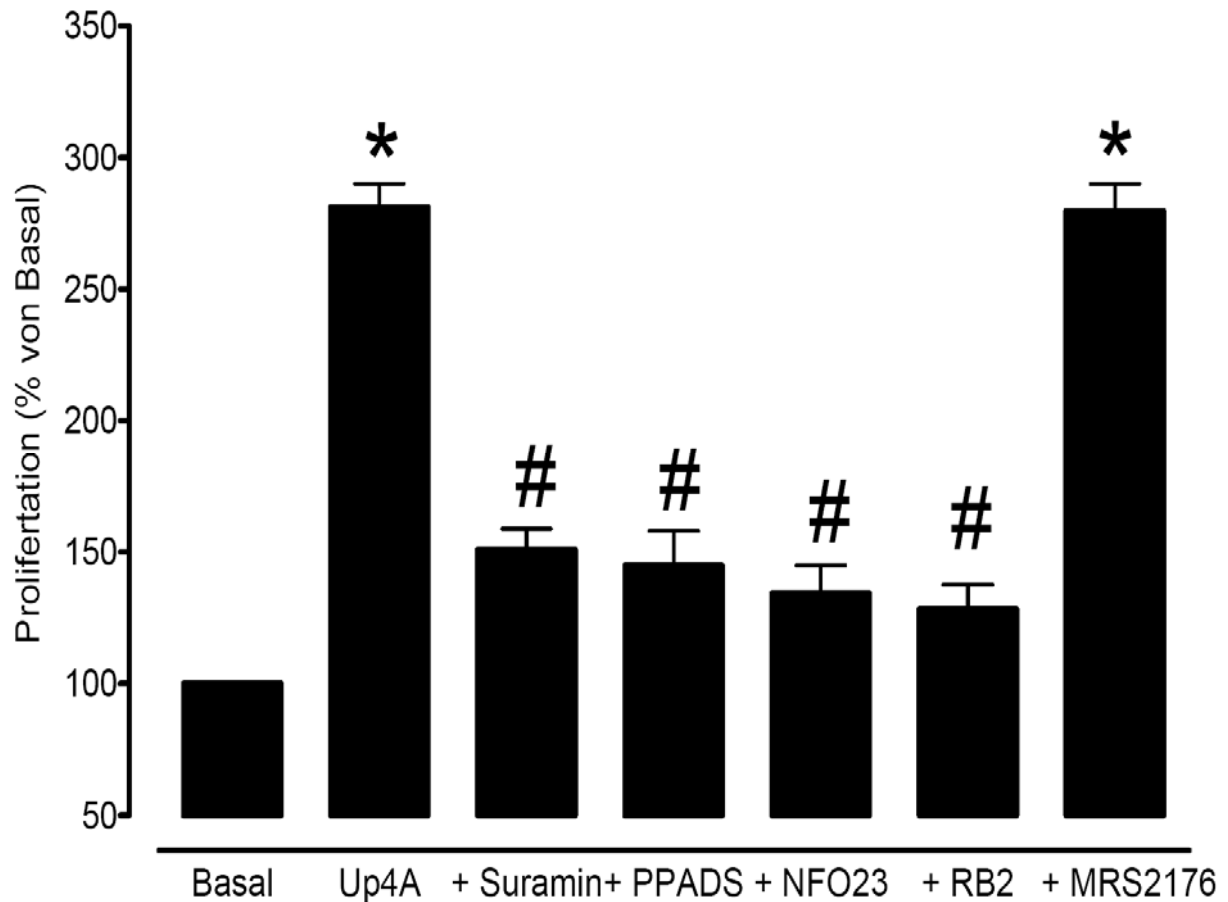


Abbildung 5: Einfluss von P2Y- Rezeptorantagonisten auf die Up₄A- induzierte Proliferation

Effekte der Purinozeptorantagonisten auf die durch UP₄A bewirkte Proliferation von Gefäßmuskelzellen. Die Zellen werden nach Ruhigstellung 24 Stunden jeweils mit UP₄A (100 nmol/l) sowie mit nicht-selektiven und selektiven Purinrezeptorantagonisten (10 µmol/l) inkubiert. UP₄A induziert an Gefäßmuskelzellen der thorakalen Aortenstücke eine signifikante Proliferation. Beide Antagonistenarten mindern bis auf Ausnahme von MRS 2176 signifikant das Up₄A-induzierte Zellwachstum. Aufgetragen ist die Proliferation in Prozent von Basal gegen UP₄A und die Antagonisten. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert der durchgeführten Experimente (n=6). Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichung dar.

3.5. PDGF potenziert Up₄A-Effekt

Abbildung 6 illustriert den Zusammenhang zwischen Up₄A und PDGF. Sowohl das Dinukleosidpolyphosphat als auch PDGF steigerten das Zellwachstum signifikant (133,7% SD 7,6 bzw. 295%, SD 10,0). Die Kombination beider Mediatoren führte

ebenfalls zu einer Zunahme, die noch deutlicher ausfällt (447,3%, SD 13,2) und weit über dem Additivwert liegt. Auf Zugabe von Suramin und PPADS folgte eine signifikante Hemmung (281,7%, SD 7,8 bzw. 297,7%, SD 18,3) des durch Up₄A und PDGF ausgelösten Effektes, der jedoch etwa in Höhe der durch PDGF allein induzierten Proliferation lag.

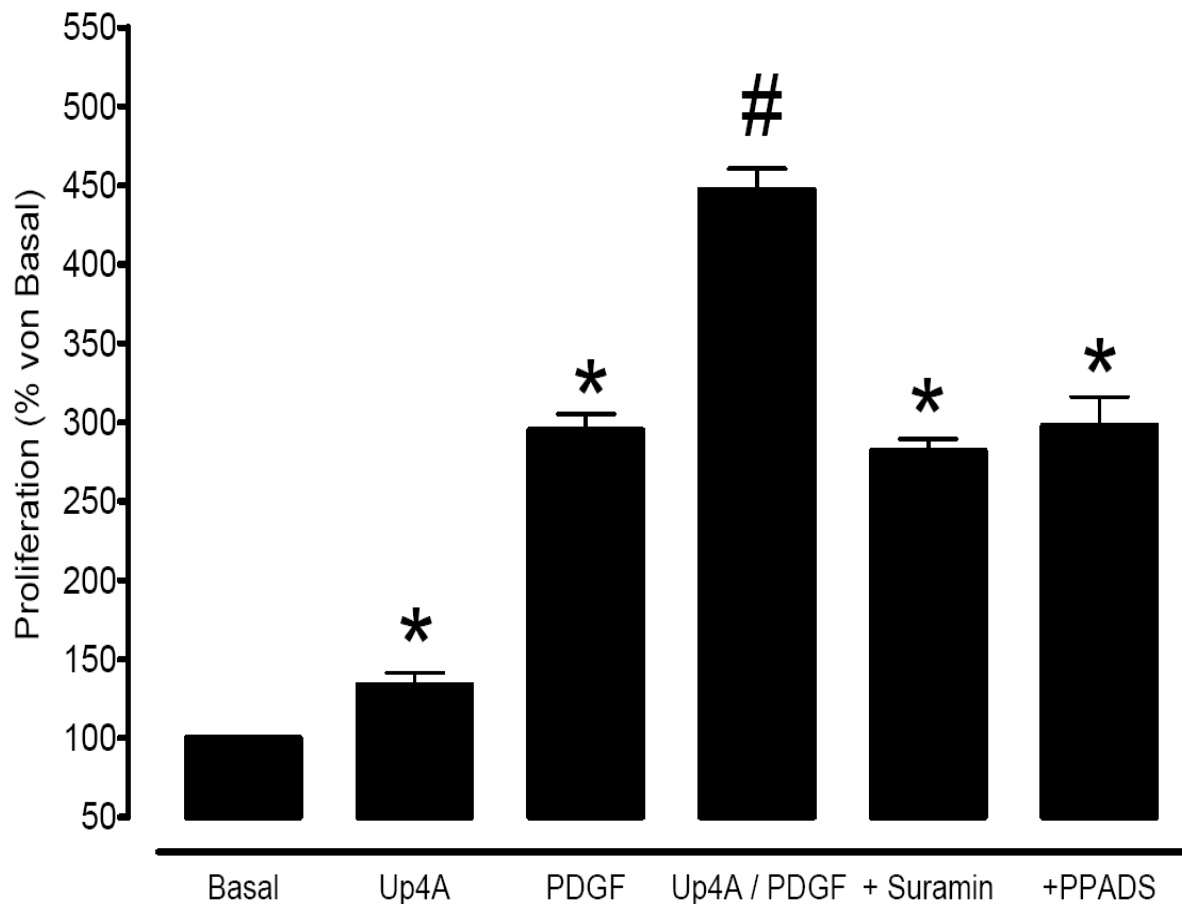


Abbildung 6: Potenzierende Wirkung von Up₄A auf das PDGF- induzierte Wachstum

Potenzierung der wachstumsstimulierenden Wirkung des PDGFs durch Up₄A. Die Inkubation der Zellen erfolgte hier nach der Ruhigstellung jeweils allein mit Up₄A (100 nmol/l), PDGF (50 ng/ml), Suramin (10 µmol/l) und PPADS (10 µmol/l) sowie mit Up₄A (100 nmol/l) und PDGF (50 ng/ml) über 24 Stunden. Die Zellstimulation mit Up₄A und PDGF erbrachte eine signifikante Proliferationssteigerung. Aufgetragen ist die Proliferation in Prozent von Basal gegen UP₄A, PDGF und die Antagonisten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der durchgeführten Experimente (n=6). Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichung dar.

4. Diskussion

4.1. Die Bedeutung von Dinukleosiden in der Proliferation von VSMCs

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass das neuartig identifizierte gemischte Dinukleosidpolyphosphat, Uridin-Adenosin-Tetraphosphat, nicht nur ein starker endothelialer Vasokonstriktor ist, der über die Aktivierung des P2X1- und P2X3-Rezeptors im renalen Perfusionsgebiet zu einer starken Erhöhung des Perfusionsdrucks führt, sondern an glatten Gefäßmuskelzellen ebenfalls starke proliferationssteigernde Effekte bewirkt.

Der proliferationsfördernde Effekt der Dinukleosidpolyphosphate war bereits Thema einer inzwischen abgeschlossenen Promotionsarbeit aus derselben Arbeitsgruppe. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwei andere Dinukleosidpolyphosphate, nämlich Diadenosin- und Diguanosinpolyphosphat, starke Proliferationssteigerungen auslösen. Dieser Effekt war bei dem guaninhaltigen Dinukleosidpolyphosphat deutlich stärker ausgeprägt als bei der adeninhaltigen Variante.

Die Proliferation von Gefäßmuskelzellen stellt für zahlreiche Prozesse einen beachtlichen Einflussfaktor dar, u.a. bei der Pathogenese von Hypertonus und Atherosklerose. Viele bekannte Vasokonstriktoren, darunter Angiotensin II und Endothelin, beeinflussen nicht nur die Vasoaktivität, sondern greifen auch in die Zellproliferation ein. In diese Mechanismen sind auch Dinukleosidpolyphosphate involviert, insbesondere Up₄A.

Zwischen den einzelnen Dinukleosidpolyphosphaten bestehen jedoch deutliche Unterschiede in der Gewichtung zwischen Vasoaktivität und Proliferationsstimulation. So zeigen adeninhaltige Dinukleotide eine starke P2X1- und P2X3-Rezeptor- vermittelte Vasoaktivität. Dahingegen weisen guanosinhaltige Dinukleotide eine sehr schwache P2X1- und P2X3-Rezeptor- vermittelte Vasoaktivität durch eine schwächere Aktivierung dieser Rezeptoren auf. Die Unterschiede liegen in der Aktivierung einzelner P2-Rezeptor- Subtypen durch diese Dinukleotide. Die guanosinhaltigen Dinukleotide aktivieren wie z.B. uridinhaltige Nukleotide (UTP oder UDP) sehr potent die P2Y Rezeptoren, während die Aktivierung der P2X- Rezeptoren erst bei 100- bis 1000-fach höherer Konzentration erfolgt. Bei den Dinukleotiden ist darüber hinaus auch noch die Anzahl der Phosphatketten von entscheidender Bedeutung. So zeigen Dinukleotide mit vier oder fünf Phosphatgruppen die stärksten Effekte auf Vasoaktivität *und* Proliferation.

4.2. Rezeptorvermittelte Wirkung von Dinukleosidpolyphosphaten

Heute ist erwiesen, dass in Gefäßmuskelzellen nach Kultivierung nur noch P2Y-Rezeptoren exprimiert sind; die Expression von P2X-Rezeptoren ist vollständig unterdrückt. Im Gegensatz zum P2Y-Subtyp spielt P2X in der Regulation nukleosidvermittelter Zellproliferation auch keine wesentliche Rolle.

In kultivierten Gefäßmuskelzellen werden offenbar vier Subtypen des P2Y-Rezeptors exprimiert: P2Y1, P2Y2, P2Y4 und P2Y6. Bei der Vielzahl an unterschiedlichen P2Y-Rezeptoren und deren engen phylogenetischen Verwandtschaft ist derzeit lediglich ein selektiver Antagonist bekannt. Daneben gibt es eine Reihe unspezifischer P2Y-Rezeptor-Blocker.

Aufgrund dessen gelingt eine Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren lediglich durch den Einsatz mehrerer unselektiver Antagonisten, wobei erst die Summationseffekte auf die Beteiligung einzelner Rezeptoren schließen lassen.

Es konnte in dieser Promotionsarbeit gezeigt werden, dass das gemischte Dinukleosidpolyphosphat Up4A einen dosisabhängigen wachstumssteigernden Effekt auf kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen ausübt. Ebenfalls konnte eine zeitliche Abhängigkeit nachgewiesen werden. Diese proliferationssteigernden Effekte waren mit denen der bekannten P2Y-Rezeptor-Agonisten UTP und UDP vergleichbar.

MRS2176, der einzige in dieser Studie eingesetzte selektive Antagonist des P2Y1-Rezeptores, hatte keinen Einfluss auf die Up4A-, UTP- und UDP- induzierte Proliferationssteigerung, so dass die Beteiligung des P2Y1-Rezeptors ausgeschlossen werden kann.

Weitere, jedoch unselektive P2Y-Rezeptor-Antagonisten sind PPADS und Suramin (Dunn and Blakeley 1988). Beide hemmen den Subtyp P2Y6 (Chang, Hanaoka et al. 1995; Robaye, Boeynaems et al. 1997), PPADS zusätzlich P2Y4 (Communi, Motte et al. 1996), Suramin auch P2Y2 (Hoiting, Molleman et al. 1990; Henning, Nelemans et al. 1992; Henning, Duin et al. 1993). Sowohl PPADS, als auch Suramin hemmen die UTP-, UDP- und Up4A- induzierte Proliferation signifikant. Reactive Blue 2 hemmt den P2Y1-, P2Y6- und P2Y11-Rezeptor (Burnstock and Warland 1987; Hopwood and Burnstock 1987; Houston, Burnstock et al. 1987; Chang, Hanaoka et al. 1995). Ebenfalls durch Reactive blue 2 konnten die Effekte von UTP, UDP und Up4A signifikant gehemmt werden.

Aus der Gesamtsicht der Ergebnisse lässt sich mit gewissen Einschränkungen der P2Y6- Rezeptor als der proliferationsvermittelnde Rezeptor klassifizieren. Weitere

Untersuchungen mit molekularen Eingriffsmöglichkeiten sind jedoch von Notwendigkeit, um diese These vollständig zu erhärten.

Ein weiteres wichtiges und interessantes Ergebnis ist der Nachweis, dass Up₄A nicht nur ein eigenständiger Wachstumsfaktor ist, sondern zusätzlich die Wirkung anderer potenter Wachstumsfaktoren verstärken kann.

So konnte die ohnehin starke PDGF-induzierte Proliferationssteigerung durch Zugabe einer geringen Konzentration von Up₄A signifikant erhöht werden – einer Up₄A-Menge, die allein lediglich zu einer geringen Wachstumssteigerung führte. Dieser potenzierende Effekt von Up₄A wiederum ließ sich durch die unspezifischen P₂Y-Rezeptor Antagonisten Suramin und PPADS signifikant hemmen.

Durch die in dieser Arbeit geleisteten Untersuchungen konnte ein weiterer Beweis dafür erbracht werden, dass das purinerge System nicht nur an der Blutdruckregulation beteiligt ist, sondern zentral auch in die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen eingreifen kann. Das neuartige gemischte Dinukleosidpolyphosphat Up₄A stellt nicht nur einen sehr starken Vasokonstriktor dar, sondern ist ferner als potenter Wachstumsfaktor anzusehen, der selbst in physiologischen Konzentrationen fähig ist, die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren zu potenzieren. Ein vergleichbarer Befund konnte bereits mit einem anderen Dinukleosidpolyphosphat erhoben werden. Diguanosinpentaphosphat kann die vasoaktive Eigenschaft von Angiotensin über die Aktivierung der Rho-Kinase potenzieren. Möglicherweise ist ein solcher Mechanismus ebenfalls für die potenzierende Wirkung von Up₄A auf andere Wachstumsfaktoren verantwortlich.

Damit konnte mit Up₄A ein wichtiger gefäßmodulierender Faktor identifiziert werden. Die pharmakologische Intervention des purinergen Systems könnte sich als ein wichtiger Ansatzpunkt für die Behandlung des Hypertonus und der Atherosklerose herausstellen, sobald spezifische Agonisten und Antagonisten entwickelt worden sind.

5. Zusammenfassung

Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Dinukleosidpolyphosphate eine wichtige Bedeutung im kardiovaskulären System haben. Dabei zeigen Dinukleosidpolyphosphate zum einen starke vasokonstriktorische Wirkungen im renalen Gefäßsystem aber stellen auch potente Wachstumsfaktoren dar. Dinukleosidpolyphosphate wirken über eine Vielzahl an Rezeptoren, wobei P2X- und P2Y-Rezeptoren von größter Bedeutung sind. 2005 konnte erstmalig ein neuartiges gemischtes Dinukleosidpolyphosphat identifiziert werden, das sich sowohl aus einem Purin (Adenosin) als auch aus einem Pyrimidin (Uridin) zusammensetzt. Bei diesem Dinukleosidpolyphosphat handelt es sich um Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (Up4A). Es konnte gezeigt werden, dass Up4A im renalen Gefäßsystem sowohl P2X- als auch P2Y-Rezeptoren aktivieren kann.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eingehend die wachstumsinduzierende Wirkung des endothelial sezernierten Up4A an glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Dabei wurde eine pharmakologische Charakterisierung der beteiligten P2X- und P2Y-Rezeptoren durchgeführt.

UP4A ist ein potenter Wachstumsfaktor, der an glatten Gefäßmuskelzellen eine dosis- und zeitabhängige Proliferation bewirkt, wobei bei einer Inkubationszeit von 36 Stunden und einer UP4A Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ der maximale wachstumsinduzierende Effekt beobachtet wird.

Die wachstumsinduzierende Wirkung von Up4A wird nach Inkubation der glatten Gefäßmukelzellen mit Suramin (unselektiver P2X- und P2Y-Antagonist), PPADS (unselektiver P2X- und P2Y-Antagonist), NFO23 (unselektiver P2X- und P2Y-Antagonist) und RB2 (unselektiver P2Y-Antagonist) signifikant gehemmt. Jedoch wird die Wirkung mit eben genannten Purinrezeptorantagonisten nicht vollständig aufgehoben, was eine Vermittlung der proliferierenden Wirkung auch über andere Rezeptoren/Wege vermuten lässt. Die Zugabe des bekannten selektiven P2Y1-Antagonisten hebt nicht die durch UP4A ausgelöste wachstumsinduzierende Wirkung auf. Aus den unterschiedlichen Wirkungen der jeweiligen Antagonisten auf P2Y-Rezeptoren kann man mit schließen, dass der P2Y6-Rezeptor zentral in den proliferationssteigernden Prozess eingebunden ist. Zusammenfassend kann man sagen, dass UP4A das erste gemischte Dinukleosidpolyphosphat ist, das einen potenten Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskelzellen darstellt. Ihre proliferierende

Wirkung vermittelt UP4A wahrscheinlich hauptsächlich über Aktivierung von P2Y-Rezeptoren.

6. Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?" Pharmacol Ther **64**(3): 445-75.
- Akbar, G. K., V. R. Dasari, et al. (1996). "Molecular cloning of a novel P2 purinoceptor from human erythroleukemia cells." J Biol Chem **271**(31): 18363-7.
- Barry-Lane, P. A., C. Patterson, et al. (2001). "p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice." J Clin Invest **108**(10): 1513-22.
- Benham, C. D. and R. W. Tsien (1987). "A novel receptor-operated Ca²⁺-permeable channel activated by ATP in smooth muscle." Nature **328**(6127): 275-8.
- Born, G. V. and M. A. Kratzer (1984). "Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man." J Physiol **354**: 419-29.
- Braunwald, E. (1997). "Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities." N Engl J Med **337**(19): 1360-9.
- Breslow, J. L. (1997). "Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases." Nat Med **3**(6): 600-1.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacol Rev **24**(3): 509-81.
- Burnstock, G., T. Cocks, et al. (1978). "Purinergetic innervation of the guinea-pig urinary bladder." Br J Pharmacol **63**(1): 125-38.
- Burnstock, G. and J. J. Warland (1987). "P2-purinoceptors of two subtypes in the rabbit mesenteric artery: reactive blue 2 selectively inhibits responses mediated via the P2y-but not the P2x-purinoceptor." Br J Pharmacol **90**(2): 383-91.
- Capron, L. (1989). "[Pathogenesis of atherosclerosis: an update on the three main theories]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **38**(10): 631-4.
- Cena, V. and E. Rojas (1990). "Kinetic characteristics of calcium-dependent, cholinergic receptor controlled ATP secretion from adrenal medullary chromaffin cells." Biochim Biophys Acta **1023**(2): 213-22.
- Chang, K., K. Hanaoka, et al. (1995). "Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor." J Biol Chem **270**(44): 26152-8.
- Communi, D., S. Motte, et al. (1996). "Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor." Eur J Pharmacol **317**(2-3): 383-9.

- Danese, C., A. R. Vestri, et al. (2006). "Do hypertension and diabetes mellitus influence the site of atherosclerotic plaques?" Clin Ter **157**(1): 9-13.
- Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." J Physiol **68**(3): 213-237.
- Dubyak, G. R. (1991). "Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP." Am J Respir Cell Mol Biol **4**(4): 295-300.
- Dunn, P. M. and A. G. Blakeley (1988). "Suramin: a reversible P2-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens." Br J Pharmacol **93**(2): 243-5.
- Ellsworth, M. L., T. Forrester, et al. (1995). "The erythrocyte as a regulator of vascular tone." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H2155-61.
- Falk, E. (2006). "Pathogenesis of atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **47**(8 Suppl): C7-12.
- Forrester, T. (1990). "Release of ATP from heart. Presentation of a release model using human erythrocyte." Ann N Y Acad Sci **603**: 335-51; discussion 351-2.
- Forsyth, K. M., R. A. Bjur, et al. (1991). "Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens." J Pharmacol Exp Ther **256**(3): 821-6.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, et al. (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev **46**(2): 143-56.
- Glagov, S., E. Weisenberg, et al. (1987). "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." N Engl J Med **316**(22): 1371-5.
- Gordon, J. L. (1986). "Extracellular ATP: effects, sources and fate." Biochem J **233**(2): 309-19.
- Gress, T. W., F. J. Nieto, et al. (2000). "Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study." N Engl J Med **342**(13): 905-12.
- Grodos, D. and R. Tonglet (1994). "Scandinavian simvastatin study (4S)." Lancet **344**(8939-8940): 1768.
- Henning, R. H., M. Duin, et al. (1993). "Activation of the phospholipase C pathway by ATP is mediated exclusively through nucleotide type P2-purinoceptors in C2C12 myotubes." Br J Pharmacol **110**(2): 747-52.
- Henning, R. H., A. Nelemans, et al. (1992). "The nucleotide receptors on mouse C2C12 myotubes." Br J Pharmacol **106**(4): 853-8.

- Hoiting, B., A. Molleman, et al. (1990). "P2-purinoceptor-activated membrane currents and inositol tetrakisphosphate formation are blocked by suramin." Eur J Pharmacol **181**(1-2): 127-31.
- Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." J Physiol **145**(3): 494-504.
- Holvoet, P., N. S. Jenny, et al. (2006). "The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." Atherosclerosis.
- Hopwood, A. M. and G. Burnstock (1987). "ATP mediates coronary vasoconstriction via P2x-purinoceptors and coronary vasodilatation via P2y-purinoceptors in the isolated perfused rat heart." Eur J Pharmacol **136**(1): 49-54.
- Houston, D. A., G. Burnstock, et al. (1987). "Different P2-purinergic receptor subtypes of endothelium and smooth muscle in canine blood vessels." J Pharmacol Exp Ther **241**(2): 501-6.
- Hoyle, C. H. (1990). "Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function." Gen Pharmacol **21**(6): 827-31.
- Jaillard, J. (1983). "[Circulating lipids and arterial risk. Retrospective and prospective studies]." LARC Med **3**(1): 36-8.
- Jankowski, V., M. Tolle, et al. (2005). "Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor." Nat Med **11**(2): 223-7.
- Jarvisalo, M. J., M. Juonala, et al. (2006). "Assessment of inflammatory markers and endothelial function." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **9**(5): 547-52.
- Jonasson, L., J. Holm, et al. (1986). "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." Arteriosclerosis **6**(2): 131-8.
- Kennedy, C. and G. Burnstock (1985). "Evidence for two types of P2-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein." Eur J Pharmacol **111**(1): 49-56.
- Kunjathoor, V. V., D. L. Wilson, et al. (1996). "Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice." J Clin Invest **97**(7): 1767-73.
- Libby, P. (1996). "Atheroma: more than mush." Lancet **348** **Suppl 1**: s4-7.
- Libby, P., Y. J. Geng, et al. (1996). "Macrophages and atherosclerotic plaque stability." Curr Opin Lipidol **7**(5): 330-5.

- Marson, P., G. Zanchin, et al. (2004). "[Some historical considerations on the inflammatory theory of atherosclerosis]." Reumatismo **56**(3): 215-9.
- McMurray, J. and J. Slattery (1994). "Scandinavian simvastatin study (4S)." Lancet **344**(8939-8940): 1765-6; author reply 1767-8.
- Napoli, C., F. P. D'Armiento, et al. (1997). "Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions." J Clin Invest **100**(11): 2680-90.
- O'Connor, S. E., I. A. Dainty, et al. (1991). "Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies." Trends Pharmacol Sci **12**(4): 137-41.
- Ogilvie, A., R. Blasius, et al. (1996). "Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules." J Auton Pharmacol **16**(6): 325-8.
- Oliver, M. F. (1989). "Cigarette smoking, polyunsaturated fats, linoleic acid, and coronary heart disease." Lancet **1**(8649): 1241-3.
- Pintor, J., M. A. Diaz-Rey, et al. (1993). "Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals." Br J Pharmacol **108**(4): 1094-9.
- Pintor, J. and M. T. Miras-Portugal (1995). "A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes." Br J Pharmacol **115**(6): 895-902.
- Porstmann, T., T. Ternynck, et al. (1985). "Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response." J Immunol Methods **82**(1): 169-79.
- Raines, E. W. and R. Ross (1996). "Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy?" Bioessays **18**(4): 271-82.
- Robaye, B., J. M. Boeynaems, et al. (1997). "Slow desensitization of the human P2Y6 receptor." Eur J Pharmacol **329**(2-3): 231-6.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S419-20.
- Ross, R. and J. Glomset (1974). "Studies of primate arterial smooth muscle cells in relation to atherosclerosis." Adv Exp Med Biol **43**(0): 265-79.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." N Engl J Med **295**(7): 369-77.

- Rundek, T., R. Hundle, et al. (2006). "Endothelial dysfunction is associated with carotid plaque: a cross-sectional study from the population based Northern Manhattan Study." BMC Cardiovasc Disord **6**: 35.
- Sachais, B. S. (2001). "Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **3**(5): 412-6.
- Schachinger, V. and A. M. Zeiher (2000). "Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction." Z Kardiol **89 Suppl 9**: IX/70-4.
- Seifert, R. and G. Schultz (1989). "Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides." Trends Pharmacol Sci **10**(9): 365-9.
- Selhub, J., P. F. Jacques, et al. (1995). "Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis." N Engl J Med **332**(5): 286-91.
- Shinozuka, K., R. A. Bjur, et al. (1988). "Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **338**(3): 221-7.
- Stamatelopoulos, K. S., J. P. Lekakis, et al. (2006). "The relative impact of different measures of adiposity on markers of early atherosclerosis." Int J Cardiol.
- Strydom, H. C., A. B. Chandler, et al. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **89**(5): 2462-78.
- Su, T. C., K. L. Chien, et al. (2006). "Pulse pressure, aortic regurgitation and carotid atherosclerosis: a comparison between hypertensives and normotensives." Int J Clin Pract **60**(2): 134-40.
- von Kugelgen, I. and K. Starke (1990). "Evidence for two separate vasoconstriction-mediating nucleotide receptors, both distinct from the P2x-receptor, in rabbit basilar artery: a receptor for pyrimidine nucleotides and a receptor for purine nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **341**(6): 538-46.
- Webb, T. E., E. Feolde, et al. (1996). "The P2Y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase." Br J Pharmacol **119**(7): 1385-92.
- Wiklund, N. P. and L. E. Gustafsson (1988). "Indications for P2-purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle." Eur J Pharmacol **148**(3): 361-70.

7. Danksagung

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Für die Bereitstellung der aufbereiteten Substanzen danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. Joachim Jankowski.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Markus Tölle für die hervorragende Betreuung und die zahlreichen wertvollen Empfehlungen, auf die ich stets zurückgreifen konnte.

Meiner Familie danke ich ganz besonders für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

9. Erklärung

„Ich, Funda Taner, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Das endothelial sezernierte Dinukleosidpolyphosphat Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ist ein potenter Wachstumsfaktor für glatte Gefäßmuskelzellen über Aktivierung von P2Y- Rezeptoren

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

August 2007