

Aus der Klinik für Nephrologie – Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung des Wirkungsmechanismus des neu  
identifizierten gemischten Dinukleosidpolyphosphats Uridin-  
Adenosin-Tetraphosphat (UP<sub>4</sub>A) auf das renale Gefäßsystem**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Hannemann

aus Berlin

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
                          2. Prof. Dr. med. K. Kisters  
                          3. Prof. Dr. med. B. Sanner

Datum der Promotion: 18.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Hypertonie .....	1
1.1.1. Essentielle Hypertonie .....	1
1.1.2. Die Rolle des Endothels bei der Hypertonieentstehung .....	1
1.2. Elemente des purinergen Systems .....	8
1.2.1. P <sub>2X</sub> -Rezeptoren .....	10
1.2.2. P <sub>2Y</sub> -Rezeptoren .....	12
1.3. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP <sub>4</sub> A) - ein neuartig entdeckter, endothelialer Vasokonstriktor .....	14
<b>2. Material und Methode</b> .....	17
2.1. Material .....	17
2.1.1. Chemische Substanzen .....	17
2.1.2. Geräte .....	17
2.1.3. Versuchstiere .....	18
2.2. Methode .....	19
2.2.1. Präparation .....	19
2.2.2. Perfusionssystem .....	19
2.2.3. Funktionsprüfung der NierengefäÙe .....	20
2.2.4. Erstellung nicht kumulativer Dosiswirkungskurven .....	21
2.2.5. Nicht kumulative Dosiswirkungskurven unter Dauerperfusion mit dem P <sub>2X</sub> -Agonist $\alpha,\beta$ -meATP .....	21
2.2.6. Nicht kumulative Dosiswirkungskurven unter Dauerperfusion mit Purinrezeptoranta- gonisten .....	21
2.2.7. Statistische Analyse .....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	24
3.1. Veränderung des MPD durch endotheliale Faktoren .....	24
3.2. Untersuchung des konzentrationsabhängigen Effektes von UP <sub>4</sub> A auf den MPD .....	25
3.3. Identifizierung der purinergen Rezeptorsubtypen, über die UP <sub>4</sub> A seine vasokonstriktive Wirkung vermittelt .....	26

3.3.1. Untersuchung der Wirkung von $\alpha$ , $\beta$ -meATP auf den vasokonstriktiven Effekt von als Bolus appliziertem UP <sub>4</sub> A sowie der entsprechenden DWK .....	26
3.3.2. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von UP <sub>4</sub> A in Gegenwart der P <sub>2X1</sub> /P <sub>2X3</sub> -Rezeptorantagonisten TNP-ATP und NFO23 .....	28
3.3.3. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von UP <sub>4</sub> A unter Dauerperfusion mit UP <sub>4</sub> A .	29
3.3.4. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von UP <sub>4</sub> A in Gegenwart verschiedener P <sub>2</sub> - bzw. P <sub>2Y</sub> -Rezeptorantagonisten (MRS 2179, RB2, PPADS und Suramin).....	30
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>32</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>37</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>43</b>
<b>8. Curriculum vitae</b> .....	<b>44</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Perfusionssystem der isoliert perfundierten Rattenniere.....	20
Abbildung 2: Originalaufzeichnungen des aus Bolusgaben von endothelialelem Überstand resultierenden Effekts auf den MPD.....	24
Abbildung 3: Originalabbildung eines Versuches an der isoliert perfundierten Rattenniere mit einer dosisabhängigen Applikation von UP <sub>4</sub> A.....	25
Abbildung 4: DWK des durch UP <sub>4</sub> A induzierten Perfusionsdruckanstiegs .....	26
Abbildung 5: Originalaufzeichnungen des aus Bolusgaben von UP <sub>4</sub> A resultierenden Anstiegs des MPD ohne und mit $\alpha$ , $\beta$ -meATP als Perfusionszusatz.....	27
Abbildung 6: DWK von UP <sub>4</sub> A ohne Perfusionszusatz und in Gegenwart von $\alpha$ , $\beta$ -meATP .....	28
Abbildung 7: Originalaufzeichnungen des aus der Dauerperfusion mit UP <sub>4</sub> A resultierenden Anstiegs des MPD.....	29
Abbildung 8: Einfluss von $\alpha$ , $\beta$ -meATP, TNP-ATP, NF023, MRS2179, RB2, PPADS und Suramin auf die UP <sub>4</sub> A-induzierte Vasokonstriktion .....	31

## Tabellensverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika bekannter Dinukleosidpolyphosphate .....	6
Tabelle 2: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen $A_1$ und $A_{2A}$ .....	9
Tabelle 3: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen $P_{2X1}$ , $P_{2X2}$ , $P_{2X3}$ und $P_{2X4}$ .....	11
Tabelle 4: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen $P_{2Y1}$ , $P_{2Y2}$ , $P_{2Y4}$ und $P_{2Y6}$ .....	14

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
$\alpha, \beta$ -meATP	$\alpha, \beta$ -Methylen-Adenosin-5'-triphosphat
Ach	Acetylcholin
ACE	Angiotensin-converting-Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalischer Phosphatase
AP <sub>2</sub> A	Diadenosindiphosphat
AP <sub>3</sub> A	Diadenosintriphosphat
AP <sub>4</sub> A	Diadenosintetraphosphat
AP <sub>5</sub> A	Diadenosinpentaphosphat
AP <sub>6</sub> A	Diadenosinhexaphosphat
AP <sub>7</sub> A	Diadenosinheptaphosphat
AP <sub>3</sub> G	Adenosintriphosphoguanosin
AP <sub>4</sub> G	Adenosintetraphosphoguanosin
AP <sub>5</sub> G	Adenosinpentaphosphoguanosin
AP <sub>6</sub> G	Adenosinhexaphosphoguanosin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATP <sub><math>\gamma</math>S</sub>	Adenosin-5'-0-3'-Thiotriphosphat
BBG	Brilliant Blue G
$\beta, \gamma$ -meATP	$\beta, \gamma$ -Methylen-Adenosin-5'-triphosphat
bzw.	Beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CPI 17	C-Kinase-aktivierender Phosphataseinhibitor 17

ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ED <sub>50</sub>	effektive Dosis, bei der 50% des max. erreichbaren Effekts vorliegen
EDCF	Endothelium-derived contracting factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor (NO)
eNOS	endotheliale NOS
ET	Endothelin
GMP	Guanosinmonophosphat
GP <sub>4</sub> G	Diguanosintetraphosphat
GP <sub>5</sub> G	Diguanosinpentaphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase Rho	Guanosin-5'-triphosphatase Rho
His	Histamin
H <sub>2</sub> O	Wasser
I.E.	Internationale Einheiten
iNOS	induzierbare NOS
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> I	Diinosinpentaphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphatdihydrat
L-NAME	L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin
L-NMMA	L-NG-Monomethyl Arginin
M	mol pro Liter
2-meSATP	2-Methylen-Thioadenosin-5'-triphosphat
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MPD	Mittlerer Perfusionsdruck
MRS2179	2'-Desoxy-N <sup>6</sup> -methyladenosin-3',5'-bisphosphat
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphatdihydrat
NFO23	1,3,5-Naphtalentrifosfonsäure
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat



nNOS	neuronal NOS
NO	englisch: Nitric oxide, deutsch: Stickstoffmonoxid (=EDRF)
NOS	englisch: Nitric oxide synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PE	Phenylephrin
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostacyclin
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLC <sub>β2</sub>	Phospholipase C <sub>β2</sub>
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2,4-disulfonsäure
RB2	Reactive Blue 2
RK	Rho-Kinase
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes
Ser	Serotonin
TNP-ATP	2'3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)-Adenosintri-phosphat
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
u.	und
UDP	Uridindiphosphat
UP <sub>2</sub> A	Uridin-Adenosin-Diphosphat
UP <sub>4</sub> A	Uridin-Adenosin-Tetraphosphat
UP <sub>6</sub> A	Uridin-Adenosin-hexaphosphat
UP <sub>4</sub> U	Diuridintetraphosphat
UP <sub>5</sub> U	Diuridinpentaphosphat
UTP	Uridintriphosphat
WKY-Ratten	Wistar-Kyoto-Ratten

# **1. Einleitung**

## **1.1. Hypertonie**

### **1.1.1. Essentielle Hypertonie**

Die primäre (essentielle) Hypertonie, welche etwa 90% aller Bluthochdruckerkrankungen ausmacht, ist ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsbild. Bestimmt wird es sowohl von Umweltfaktoren (Ernährung, Alkoholkonsum, Nikotingenuss, Bewegungsmangel, Adipositas, psychischer und mentaler Stress) als auch von genetischen Faktoren (Noel 1994), die bisher jedoch noch nicht ausreichend definiert werden konnten.

Bislang gelang lediglich die Entdeckung seltener monogenetischer Formen, wie etwa der autosomal-dominant vererbaren glucocorticoidempfindlichen Hypertonie, sowie die Identifizierung einiger Kandidatengene, die wahrscheinlich eine Rolle innerhalb der Pathogenese der essentiellen Hypertonie spielen. Infrage kommen beispielsweise Gene, die die Aktivität des Angiotensin-converting-Enzyms (ACE) oder des Atrialen natriuretischen Peptids (ANP) beeinflussen.

Auch das Endothel und das purinerge System (Siehe 1.1.2. und 1.1.3) (Ralevic and Burnstock 1998) spielen eine wichtige, noch nicht vollständig verstandene Rolle in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie.

Es ist unabdingbar die molekulare Basis der wahrscheinlich polygen bedingten essentiellen Hypertonie weiter zu erforschen. Eine exaktere Aufklärung ist für die Abschätzung des individuellen kardiovaskulären Risikos, eine präzisere Diagnostik, die Entwicklung besserer Prophylaxe- und eventuell auch effizienterer -da differenziertere- Therpiemöglichkeiten notwendig.

### **1.1.2. Die Rolle des Endothels bei der Hypertonieentstehung**

Das Endothel stellt ein auto-, para- und endokrines Organ dar, das an der Regulation von Gerinnung, vaskulärem Remodelling und lokalen Entzündungsprozessen beteiligt ist. Ferner spielt es eine entscheidende Rolle für den Gefäßtonus, da es sowohl Mediatoren sezerniert, die Vasodilatation als auch solche, die Vasokontraktion vermitteln (Vanhoutte 1996):

#### 1. Stickstoffmonoxid

Der endothelialen Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), dem sogenannten "endothelium-derived relaxing factor", kommt hierbei eine Schlüsselposition zu (Furchgott and Zawadzki 1980). Es bewirkt eine Vasodilatation mit konsekutiver Reduktion des peripheren Gefäßwiderstands und ist zusammen mit Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) Gegenspieler zahlreicher

vasokonstriktiv wirkender Substanzen, wie etwa Endothelin, Angiotensin II (Ang II) und Noradrenalin. Katalysator der NO-Produktion ist die NO-Synthase, wobei drei Isoformen dieses Enzyms identifiziert worden sind: Die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Nathan and Xie 1994). Letztere wird bei Infektionen oder Entzündungsreaktionen induziert (Kanno, Hirata et al. 1994), während es sich bei der eNOS um ein konstitutiv exprimiertes Enzym handelt (Nathan and Xie 1994). Die nNOS findet sich im enterischen Nervensystem, wo NO eine wichtige Rolle bei der non-adrenergen non-cholinergen Neurotransmission spielt.

Unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und reduzierender Äquivalente in Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP/NADPH) als Kosubstrate katalysiert die eNOS die Reduktion der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Aktiviert wird sie durch einen Anstieg der intrazellulären Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration, der durch Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-Komplexes an die eNOS zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Aktivierung des Enzyms führt (Marletta 1994).

NO wirkt direkt vasodilatativ über Aktivierung des Enzyms Guanylatzyklase, das einen Anstieg der intrazellulären Konzentration des second messengers cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) bewirkt, sowie indirekt über Hemmung der Produktion vasokonstriktorischer Peptide (z.B. Endothelin) (Vanhoutte 2000). Ebenfalls cGMP-vermittelt hemmt NO die Thrombozytenaggregation. Durch kovalente Modifizierung von Thiolgruppen der verantwortlichen Proteine und durch Redoxreaktionen mit Radikalen unterbindet NO die Proliferation, bzw. Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die Expression von Adhäsionsmolekülen für neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten auf durch Entzündung aktivierten Endothelzellen. So schützt NO die Gefäßwand vor Thrombose und arteriosklerotischen Umbauprozessen (Palmer, Ferrige et al. 1987).

In Abhängigkeit von seiner Konzentration und dem Redoxstatus der Zellen kann NO im Rahmen der Immunantwort auch zytotoxisch wirken (Karupiah, Xie et al. 1993).

## 2. Prostaglandine

Auch die Prostaglandine (PG) stellen einen wichtigen Faktor der endothelialen Vasoregulation dar. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Gewebshormonen, die durch Cyclooxygenase, Peroxidase und verschiedene Synthasen aus Arachidonsäure gebildet werden. Man unterscheidet mehrere Gruppen von Prostaglandinen, die unterschiedliche Effekte im Organismus auslösen. Eine Vasodilatation wird durch die Prostaglandine  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_2$  vermittelt.

PGI<sub>2</sub> wirkt über G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren, die sogenannten IP-Rezeptoren. Über diese bewirkt es in den glatten Gefäßmuskelzellen eine Erhöhung des intrazellulären cAMPs (zyklisches Adenosinmonophosphat) mit konsekutiver Hemmung der Gefäßkontraktion. Ferner fungiert es als Antagonist des in den Thrombozyten gebildeten Thromboxans, da es die Plättchenaggregation hemmt. Es ist außerdem ein schwacher Bronchodilatator, wirkt im Magen schleimhautprotektiv, steigert die Aktivität der Phospholipase A und der Adenylatzyklase in sensiblen Neuronen und moduliert so die Aktivität der Ionenkanäle und die Neurotransmitterfreisetzung. Im Rahmen von Entzündungsprozessen erhöht PGI<sub>2</sub> die Gefäßpermeabilität, steigert die Durchblutung und verstärkt die Schmerzsensibilität nozizeptiver Nervenendigungen.

PGE<sub>2</sub> wirkt über die G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren EP1 bis EP4 und kann sowohl vasodilatativ (z.B. an den Nierengefäßen) als auch -konstriktiv wirken, wobei die Wirkung von der Art des Gefäßes, bzw. der Art der in den Myozyten exprimierten Prostaglandin-E-Rezeptoren abhängt. Ferner induziert es einen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, hält den Ductus arteriosus (über EP4-Rezeptoren) offen, ist ein schwacher Bronchodilatator, verursacht Fieber (über EP3-Rezeptoren im Hypothalamus), wirkt (über EP3-Rezeptoren) im Magen schleimhautprotektiv, hemmt die Lipolyse, steigert die Knochenresorption, sowie das Schmerzempfinden im Rückenmark und an nozizeptiven Nervenendigungen und ist in Entzündungsprozesse involviert (es erhöht die Gefäßpermeabilität und hemmt die Interleukin-, Interferon- und Tumor-Nekrose-Faktor alpha-Freisetzung aus Entzündungszellen).

Neben PGE<sub>2</sub> wirkt auch das durch die Thromboxan-Synthase aus Prostaglandin H<sub>2</sub> gebildete Thromboxan (genauer: Thromboxan A<sub>2</sub> = TXA<sub>2</sub>) über den membranständigen, G-Protein-gekoppelten Thromboxanrezeptor TP vasokonstriktorisch. Seine Halbwertszeit beträgt 30 Sekunden, abgebaut wird es zum inaktiven Thromboxan B<sub>2</sub>. Darüber hinaus wirkt es als Bronchiokonstriktor und aktiviert die Aggregation von Thrombozyten, welche TXA<sub>2</sub> bilden können (Bergstrom and Samuelsson 1962; Simmons, Botting et al. 2004).

### 3. Endothelin

Das Peptid Endothelin ist ein hochwirksamer Vasokonstriktor, welcher über einen G-Protein-gekoppelten Endothelinrezeptor wirkt, von dem derzeit die zwei Rezeptorsubtypen ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> (nochmals untergliedert in ET<sub>B1</sub>- und ET<sub>B2</sub>-Rezeptoren) bekannt sind. Neben Endothelin 1 (ET1), welches die höchste vasokonstriktive Potenz aufweist und quantitativ bei weitem überwiegt, werden die drei Isoformen Endothelin 2, 3 und 4 (ET2, ET3, ET4) im

menschlichen Organismus gebildet (Agapitov and Haynes 2002). ET1 wirkt über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren in den glatten Gefäßmuskelzellen vasokonstriktorisch. ET<sub>B</sub>-Rezeptoren werden in Endothel- (ET<sub>B1</sub> und ET<sub>B2</sub>), Epithel- (ET<sub>B1</sub>) und glatten Muskelzellen (ET<sub>B2</sub>) exprimiert; ET1 und ET3 können am Endothel sowohl eine Vasodilatation (über ET<sub>B1</sub>-Rezeptoren, die eine Freisetzung von NO vermitteln) als auch eine Vasokonstriktion (über ET<sub>B2</sub>-Rezeptoren) auslösen (Davenport 2002; Hynynen and Khalil 2006).

Ferner wirkt Endothelin an den Gefäßen des Gastrointestinaltrakts, vermittelt die Neubildung von Bindegewebszellen und Kollagen und beeinflusst Rhythmus sowie Kontraktilität des Herzens. Bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Arteriosklerose findet sich häufig ein erhöhter Endothelinspiegel (Davenport 2002; Hynynen and Khalil 2006).

#### 4. Mono- und Dinukleotide

Ein weiteres wichtiges Element der endothelialen Vasoregulation stellen endogene Mono- und Dinukleotide dar. Sie bilden zusammen mit der differenzierten Gruppe der Purinrezeptoren das sogenannte purinerge System (Ralevic and Burnstock 1998) und können je nach Rezeptorverteilung unterschiedlichste biologische Effekte vermitteln.

Zu den bedeutendsten Mononukleotiden im menschlichen Organismus zählen die Pyrimidinderivate Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP) sowie die Purinderivate Adenosin, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) (North and Barnard 1997). Sie vermitteln als purinerge Agonisten Kontraktion und Dilatation glatter Gefäßmuskelzellen, exokrine und endokrine Sekretion, Thrombozytenaggregation und wirken bei inflammatorischen Prozessen, der Neurotransmission und der Modulation der kardialen Funktion mit.

In den letzten Jahren wurde nun auch nach und nach die große Bedeutung der ebenfalls als purinerge Agonisten fungierenden Dinukleosidpolyphosphate (XP<sub>n</sub>X; X=Adenosin oder Guanosin; n =2-8) für die Vasoregulation erkannt (Schluter, Offers et al. 1994) (Schluter, Tepel et al. 1996) (Miras-Portugal, Gualix et al. 1998).

Für folgende Dinukleosidpolyphosphate ist ein über Purinrezeptoren vermittelter vaskulärer Effekt gesichert: Diguanosintetraphosphat (GP<sub>4</sub>G), Diguanosinpentaphosphat (GP<sub>5</sub>G), Adenosintriphosphoguanosin (AP<sub>3</sub>G), Adenosintetraphosphoguanosin (AP<sub>4</sub>G), Adenosinpentaphosphoguanosin (AP<sub>5</sub>G), Adenosinhexaphosphoguanosin (AP<sub>6</sub>G), Diadenosindiphosphat (AP<sub>2</sub>A), Diadenosintriphosphat (AP<sub>3</sub>A), Diadenosintetraphosphat

(AP<sub>4</sub>A), Diadenosinpentaphosphat (AP<sub>5</sub>A), Diadenosinhexaphosphat (AP<sub>6</sub>A) und Diadenosinheptaphosphat (AP<sub>7</sub>A).

Eine Übersicht über Lokalisation und Wirkung dieser bekannten vasoaktiven Dinukleotide zeigt Tabelle 1 auf Seite 6.

Bekannt ist inzwischen vor allem die Funktion der Diadenosinpolyphosphate (AP<sub>n</sub>A; n=2-8) (Kisselev, Justesen et al. 1998). Diadenosinpolyphosphate wurden in Erythrozyten (AP<sub>6</sub>A), Thrombozyten, Herzmuskelzellen (AP<sub>2</sub>A und AP<sub>3</sub>A), Plazentagewebe (AP<sub>2</sub>A und AP<sub>3</sub>A) und Blutplasma (AP<sub>3</sub>A, AP<sub>4</sub>A, AP<sub>5</sub>A und AP<sub>6</sub>A) nachgewiesen, ohne dass bis jetzt Erkenntnisse über ihre in-vivo Biosynthese gewonnen werden konnte. Sie können über unterschiedliche purinerge Rezeptoren an Mesenterial-, Nieren- und Koronararterien vasodilatierend (v.a. AP<sub>3</sub>A und AP<sub>4</sub>A) (van der Giet, Schmidt et al. 2002) oder vasokonstriktorisches (AP<sub>2</sub>A bis AP<sub>7</sub>A) (van der Giet, Jankowski et al. 1998) sowie proliferationsinduzierend (AP<sub>2</sub>A, AP<sub>3</sub>A, AP<sub>5</sub>A und AP<sub>6</sub>A) (Jankowski, Hagemann et al. 2001) wirken und die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation hemmen (AP<sub>4</sub>A, AP<sub>5</sub>A, AP<sub>7</sub>A und AP<sub>8</sub>A) (Jankowski, Tepel et al. 1999).

Für das erstmals von Flodgaard und Klenow (Flodgaard and Klenow 1982) in menschlichen Thrombozyten nachgewiesene AP<sub>4</sub>A gelang es der Arbeitsgruppe um M. van der Giet 1997 (van der Giet, Khattab et al. 1997) in Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere die Purinrezeptoren zu identifizieren, über die AP<sub>4</sub>A seine vasoaktiven Effekte vermittelt. Es handelt sich um die Subtypen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und P<sub>2X</sub>. Da keine Affinität zu P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren besteht, eignet sich AP<sub>4</sub>A wiederum zur pharmakologischen Identifizierung von P<sub>2</sub>-Rezeptoren-Subtypen als Vermittler der Wirkung anderer purinerger Substanzen.

Dinukleotide wirken aber nicht nur auf direktem Wege vasoregulatorisch: GP<sub>5</sub>G beispielsweise zeigt zwar selbst keine Vasoaktivität, führt aber in Anwesenheit des Vasokonstriktors Angiotensin II (AngII) zu einer signifikanten Senkung von dessen ED<sub>50</sub>, also der Dosis, bei der 50% des maximal erreichbaren Effekts von AngII vorliegen (bei unveränderter maximaler Wirkung).

Dinukleotide wirken also in komplexer Weise auf die Blutdruckregulation im menschlichen Organismus und sind wahrscheinlich maßgeblich an der Entstehung der essentiellen Hypertonie beteiligt (Schluter, Tepel et al. 1996).

## **Tabelle 1: Charakteristika bekannter Dinukleosidpolyphosphate**

(Ralevic, Hoyle et al. 1995; van der Giet, Khattab et al. 1997; Gabriels, Rahn et al. 2002)

<b>Substanz</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Wirkung/ Purinrezeptoren</b>
AP <sub>2</sub> A	Thrombozyten, Plazentagewebe, Nebenniere, Herzmuskelzellen	A <sub>1</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Koronararterien und Nierengefäßen
		A <sub>2</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronararterien und Nierengefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
AP <sub>3</sub> A	Thrombozyten, Plazentagewebe, Nebenniere, Plasma, Herzmuskelzellen	A <sub>1</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Koronararterien, Nieren- und mesenterialen Gefäßen
		A <sub>2</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronararterien, Nieren- und mesenterialen Gefäßen
		P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Koronararterien, Nieren- und mesenterialen Gefäßen
		P <sub>2Y</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronararterien, Nieren- und mesenterialen Gefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
AP <sub>4</sub> A	Thrombozyten, Nebenniere, Plasma	A <sub>1</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nierengefäßen
		A <sub>2</sub> -Rezeptor: Vasodilatation an Mesenterial- und Koronararterien
		P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nieren- und mesenterialen Gefäßen
AP <sub>5</sub> A	Thrombozyten, Nebenniere, Plasma	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nieren-, Mesenterial- und Koronargefäßen
		P <sub>2Y</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronargefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskel- und mesangialer Zellen
AP <sub>6</sub> A	Thrombozyten, Nebenniere, Plasma, Erythrozyten	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nieren- und Mesenterial- und Koronargefäßen
		P <sub>2Y</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronargefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskel und mesangialer Zellen
AP <sub>7</sub> A	Thrombozyten	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nierengefäßen
AP <sub>3</sub> G, AP <sub>4</sub> G	Thrombozyten	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nierengefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
AP <sub>5</sub> G, AP <sub>6</sub> G	Thrombozyten	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nieren- und Koronargefäßen
		P <sub>2Y</sub> -Rezeptor: Vasodilatation in Koronargefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
GP <sub>4</sub> G	Thrombozyten	P <sub>2X</sub> -Rezeptor: Vasokonstriktion in Nierengefäßen
		Unbekannter Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
GP <sub>5</sub> G	Thrombozyten	P <sub>2Y</sub> -Rezeptor: Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

### 5. Endothelium-derived contracting factor (EDCF)

Das Endothel produziert neben den bereits erwähnten Mediatoren der endothelvermittelten Vasokonstriktion einen weiteren Faktor, den sogenannten "endothelium-derived contracting factor" (EDCF) (De Mey and Vanhoutte 1982). Dieser konnte zwar bis heute noch nicht

eindeutig identifiziert werden, es ist aber zumindest gelungen, einige Erkenntnisse über seinen Wirkungsmechanismus zu gewinnen: Anzunehmen ist, dass das Enzym Cyclooxygenase (und zwar v.a. die Isoform COX1) (Miller and Vanhoutte 1985; Luscher and Vanhoutte 1986) sowie die Thromboxan A<sub>2</sub>- (TP-) Rezeptoren (Katusic, Shepherd et al. 1988; Yang, Feletou et al. 2002), auf den glatten Gefäßmuskelzellen Schlüsselpositionen in den EDCF-vermittelten Reaktionen einnehmen. In Tierversuchen an spontan hypertensiven Ratten fand sich einerseits eine signifikant erhöhte COX1-Expression (Ge, Hughes et al. 1995), andererseits führte die Gabe des COX-Inhibitors Indomethazin zu einer Verringerung der Katecholamin-vermittelten Vasokonstriktion (Miller and Vanhoutte 1985) und zu einer Normalisierung der endothelvermittelten Vasorelaxation (Ito, Kato et al. 1991). Auch die Gabe von selektiven TP-Rezeptorantagonisten konnten die endothelabhängigen Vasokonstriktionen vermindern (Auch-Schwelk, Katusic et al. 1990). Allerdings führte die Anwesenheit des Thromboxan-Synthasehemmers Dazoxiben nicht zu einer Reduktion der Kontraktion (Katusic, Shepherd et al. 1988); diese muss also von einem TP-Rezeptoragonisten hervorgerufen werden, bei dem es sich nicht um TXA<sub>2</sub> handelt. Hierfür kämen z.B. TXA<sub>2</sub>-Precursoren (Endoperoxide) in Frage (Taddei and Vanhoutte 1993).

Die Arbeitsgruppe um Vanhoutte stellte 1996 die auf diese Erkenntnisse begründete Theorie auf, dass der EDCF die übermäßig exprimierte COX1 in glatten Gefäßmuskeln aktiviert und deren Produkt -wahrscheinlich ein Endoperoxid (Ge, Hughes et al. 1995)- über die TP-Rezeptoren Vasokonstriktion vermittelt (Vanhoutte 1996).

Weitere Experimente an spontan hypertensiven Ratten zeigten, dass aus molekularem Sauerstoff gebildete Radikale bei diesen Tieren stärkere Kontraktionen hervorrufen als bei normotensiven Vergleichstieren, sowie dass dieser vasokonstriktorische Effekt ebenfalls durch COX-Inhibitoren und TP-Rezeptorantagonisten gehemmt wird (Auch-Schwelk, Katusic et al. 1989; Rodriguez-Martinez, Garcia-Cohen et al. 1998). Ihre extrem kurze Halbwertszeit stellt sie zwar als potentielle EDCFs in Frage, sie könnten dessen Wirkung jedoch fördern.

Normalerweise kommt es beim Menschen mit fortschreitendem Alter zu einer progredienten Beeinträchtigung der endothelialen Funktion mit Abnahme der gefäßdilatierenden Reaktion auf endothelabhängige Vasodilatoren wie z.B. Acetylcholin (Ach) (Zeiber, Drexler et al. 1993; Taddei, Viridis et al. 1995). In Studien am Menschen zeigte sich, dass bei normotensiven Individuen unter 60 Jahren die Hauptsache dafür in einem Defekt des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges liegt, ohne dass es Anzeichen für die Mitwirkung eines EDCF gibt, während bei älteren Versuchspersonen Indomethazin eine Zunahme der Dilatationsfähigkeit bewirkte (Taddei, Viridis et al. 1997). Bei einigen essentiellen



Hypertonikern ließ sich dieser Effekt schon ab 31 Jahren nachweisen und stieg mit zunehmendem Alter noch stärker an, was mit einer vorzeitigen Alterung der Blutgefäßwand zusammenhängen könnte (Taddei, Virdis et al. 1997). Zusätzlich bewirkte die Anwesenheit von Indomethazin auch einen Anstieg der Gefäßreaktion auf NO-Synthasehemmer (z. B. L-NMMA), was nahelegt, dass die erhöhte Aktivität der COX mit einer reduzierten Verfügbarkeit von NO einhergeht (Taddei, Virdis et al. 2001).

Auch die Gabe von Vitamin C, welches Radikale abbaut, verbesserte die endothelabhängige Vasodilatation bei über 60-Jährigen normotensiven und Versuchsteilnehmern mit essentieller Hypertonie (Taddei, Virdis et al. 2001).

Eine Schädigung des Endothels führt auf mehreren Wegen zu einem Übergewicht dessen vasokonstriktorischer gegenüber dessen vasodilatativer Potenz und so zu einer endothelialen Dysfunktion:

Einerseits geht die Barrierefunktion des Endothels verloren, so dass Adenosintriphosphat (ATP) vermehrt die in subendothelial gelegenen vaskulären Myozyten lokalisierten Adenosinrezeptoren erreichen und diese aktivieren kann, was zu einer Vasokonstriktion führt. Andererseits erfolgt nur noch in insuffizientem Maße -eventuell im Zusammenhang mit dem EDCF- die Synthese von PGI<sub>2</sub> und NO, den Mediatoren der Vasodilatation.

Hinzu kommt, dass das Endothel unter mechanischem oder hypoxischem Stress selbst vermehrt vasokonstriktorisch wirkende Stoffe (z. B. EDCF, Endothelin und ATP) (Sedaa, Bjur et al. 1990) freisetzt, was die Entstehung von Hypertonie und Atherosklerose weiter fördert.

Endotheliale Dysfunktion stellt also einen entscheidenden Faktor innerhalb der Pathophysiologie der Hypertonie und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

## **1.2. Elemente des purinergen Systems**

Nach jahrelanger Kontroverse konnte das Konzept eines selektiven extrazellulären Signalsystems, in dem Nukleotide und Nukleoside, wie beispielsweise ATP, Adenosin (Drury and Szent-Gyorgyi 1929) und Dinukleosidpolyphosphate, über spezifische Rezeptoren Effekte vermitteln (Burnstock 1976), etabliert werden (Burnstock 1972). Burnstock führte hierfür den Begriff des „Purinergen Systems“ ein (Ralevic and Burnstock 1998). Das purinerge Signalsystem ist in eine Vielzahl von Mechanismen im menschlichen Organismus involviert, wie etwa im Bereich der Vasoregulation, Neurotransmission, neuromuskulären Transmission, exo- und endokrinen Sekretion sowie der mechanosensorischen Transduktion (Burnstock and Knight 2004; Burnstock 2006). Langfristige Wirkungen werden im Bereich

der Zellproliferation, -differenzierung, -migration, und -regeneration sowie in der embryonalen Entwicklung vermittelt (Abbraccio and Burnstock 1998; Burnstock 2002).

Nach pharmakologischen, molekularen und biochemischen Aspekten ist eine Einteilung der diese Wirkungen vermittelnden purinergen Rezeptoren, welche auf verschiedensten Zellen im Säugetierorganismus exprimiert werden, möglich:

Man unterscheidet P<sub>1</sub>-Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind, durch Adenosin aktiviert und durch Methylxanthine gehemmt werden von P<sub>2</sub>-Rezeptoren, welche durch ATP und dessen Metabolite aktiviert und nicht durch Methylxanthine gehemmt werden (Dalziel and Westfall 1994). Die P<sub>2</sub>-Rezeptoren werden weiter in die als ligandengesteuerte Ionenkanäle fungierenden (ionotropen) P<sub>2X</sub>- und die an G-Proteine gekoppelten (metabotropen) P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren unterteilt (Burnstock and Kennedy 1985; Abbraccio and Burnstock 1994).

Bis jetzt ist es gelungen vier P<sub>1</sub>-Rezeptorsubtypen (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub>) (van Calker, Muller et al. 1979; Londos, Cooper et al. 1980) sowie sieben P<sub>2X</sub>- (P<sub>2X1</sub>, P<sub>2X2</sub>, P<sub>2X3</sub>, P<sub>2X4</sub>, P<sub>2X5</sub>, P<sub>2X6</sub> und P<sub>2X7</sub> [zuvor als P<sub>2Z</sub> bezeichnet]) (North 2002) und acht P<sub>2Y</sub>-Subtypen (P<sub>2Y1</sub>, P<sub>2Y2</sub> [zuvor als P<sub>2U</sub> bezeichnet], P<sub>2Y4</sub>, P<sub>2Y6</sub>, P<sub>2Y11</sub>, P<sub>2Y12</sub>, P<sub>2Y13</sub> und P<sub>2Y14</sub>) (Abbraccio, Burnstock et al. 2006) zu klassifizieren. Ferner ist die Bildung von Heteromeren aus verschiedenen P<sub>2X</sub>- (Le, Boue-Grabot et al. 1999) und P<sub>2Y</sub>-Rezeptorsubtypen (Barnard and Simon 2001) beobachtet worden, was zusätzlich zu einer erheblichen Steigerung der pharmakologischen Rezeptoreigenschaften führt. Die bedeutendsten Charakteristika der vasoaktiven Purinrezeptoren sind zusammenfassend in den Tabellen 2, 3 und 4 aufgelistet.

**Tabelle 2: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen A<sub>1</sub> und A<sub>2A</sub>**

(van Calker, Muller et al. 1979; Londos, Cooper et al. 1980)

Rezeptor-Subtyp	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>
Wirkung	Vasokonstriktion, negativ ino-, chrono- und dromotrop	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation
Gewebeexpression	v.a. Endothel	v.a. Endothel
Transduktionsmechanismus	G <sub>I/O</sub> -Protein → cAMP↓	G <sub>S</sub> -Protein → cAMP↑
Agonisten	Adenosin>AMP>ADP>ATP	Adenosin>AMP>ADP>ATP
Antagonisten	MRS1754, CPX, CPT, N-0840	KW6002, Alloxazine

Für die vorliegende Arbeit ist vor allem die Rolle des purinergen Systems im Bereich der Kreislaufregulation, dabei insbesondere bei der Regulation des Gefäßtonus, relevant, über die in den vergangenen Jahren kontinuierlich neue Erkenntnisse gesammelt werden konnten. So wurde beispielsweise entdeckt, dass ATP und Adenosin eine wichtige Funktion innerhalb der

vaskulären Regulation (vornehmlich vermittelt über P<sub>2</sub>-Rezeptoren), zukommt sowie dass einige pathologische Zustände des Herzkreislaufsystems mit einer Erhöhung purinerges Ko-Transmitter einhergehen.

Im Folgenden soll daher vor allem auf diejenigen Purinorezeptoren eingegangen werden, welche für die Kreislaufregulation und auch für die Pathogenese der Hypertonie von Bedeutung sind.

### 1.2.1. P<sub>2X</sub>-Rezeptoren

Bei den P<sub>2X</sub>-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Kationenkanäle, welche zwei transmembranäre Untereinheiten sowie einen cysteinreichen extrazellulären Anteil aufweisen und deren C- und N-terminales Ende jeweils intrazellulär lokalisiert ist.

Die P<sub>2X</sub>-Rezeptoren sind als unselektive Kationenkanäle durchlässig für Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Bean 1992; Dubyak and el-Moatassim 1993). Auf glatten Gefäßmuskelzellen werden die P<sub>2X</sub>-Rezeptorsubtypen P<sub>2X1</sub>, P<sub>2X2</sub>, P<sub>2X3</sub> und P<sub>2X4</sub> exprimiert (Chan, Unwin et al. 1998; Nori, Fumagalli et al. 1998). Diese vermitteln dort eine schnelle Depolarisation über spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Bean and Friel 1990; Dubyak and el-Moatassim 1993), so dass die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Zytoplasma ansteigt und es zur Vasokonstriktion kommt (Harden, Boyer et al. 1995). Der blutdrucksteigernde Effekt, den perivaskuläre sympathische Nerven durch Freisetzung von Noradrenalin über α<sub>1</sub>-Rezeptoren vermitteln, wird häufig durch das oftmals gleichzeitig als Ko-Transmitter sezernierte ATP, welches an den P<sub>2X</sub>-Rezeptor (vor allem am P<sub>2X1</sub>-, in manchen Gefäßen aber auch am P<sub>2X2</sub>- oder P<sub>2X4</sub>-Rezeptorsubtyp) bindet, verstärkt. Bei kontinuierlicher Präsenz von ATP an den P<sub>2X</sub>-Rezeptoren kommt es bei einigen Subtypen innerhalb von Millisekunden zu einer Desensibilisierung für ATP (P<sub>2X1</sub>- und P<sub>2X3</sub>-Rezeptorsubtyp), während andere Subtypen (P<sub>2X2</sub>- oder P<sub>2X4</sub>-Rezeptorsubtyp) 100-1000mal langsamer desensibilisieren (North 2002; Egan, Samways et al. 2006).

Agonisten an P<sub>2X1</sub>-Rezeptorsubtypen, welche vollständig desensibilisierbar sind (Ralevic and Burnstock 1998), sind in abnehmender Stärke α, β-Methylen-Adenosin-5'-triphosphat (α, β-meATP), β, γ-Methylen-Adenosin-5'-triphosphat (β, γ-meATP), ATP und 2-Methylen-Thioadenosin-5'-triphosphat (2-meSATP) (Dalziel and Westfall 1994). Als Antagonisten sind Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2,4-disulfonsäure (PPADS) Suramin und (selektiver) TNP-ATP wirksam (Valera, Hussy et al. 1994).

Die P<sub>2X2</sub>-Rezeptorsubtypen sprechen jeweils etwa gleichstark auf ATP, Adenosin-5'-0-3'-Thiotriphosphat (ATP<sub>γ</sub>S) und 2meSATP an, während α, β-meATP und β, γ-meATP inaktiv

sind (Evans, Lewis et al. 1995). Ferner sind sie sensitiv für Protonen, Kupfer und Zink. Sie sind geringfügig desensibilisierbar und durch PPADS und Suramin hemmbar (Evans, Lewis et al. 1995).

Die P<sub>2X3</sub>-Rezeptorsubtypen sprechen in etwa gleichem Maße auf ATP und  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP an, während 2-meSATP stärker und AP<sub>4</sub>A schwächer agonistisch wirkt. Antagonisten sind TNP-ATP, Suramin und PPADS.

Die P<sub>2X4</sub>-Rezeptorsubtypen wiederum sprechen auf 2meSATP an, während  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP schwach oder gar nicht wirksam ist (Bo, Zhang et al. 1995; Seguela, Haghghi et al. 1996). Schwache Antagonisten sind Brilliant Blue G (BBG) und TNP-ATP, Desensibilisierung erfolgt kaum.

Darüber hinaus kommen P<sub>2X</sub>-Rezeptoren auf endothelialen Zellen vor und sind mit deren Permeabilität und der Zelladhäsion assoziiert. Höchstwahrscheinlich sind sie in die Entwicklung diverser kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. So findet sich beispielsweise bei der dilatativen Kardiomyopathie eine erhöhte P<sub>2X1</sub>-Rezeptorexpression im Atrium. Auch bei der Entstehung von Arteriosklerose und Restenosen nach Ballondilatationen ist eine Beteiligung des purinergen Systems wahrscheinlich, denn es kommt zu einer verstärkten Freisetzung von ATP aus geschädigten Endothelzellen, welches wiederum vor allem über P<sub>2X4</sub>-Rezeptoren Effekte wie Endothelwachstum, Wachstum der glatten Muskelzellen, Zellmigration, -proliferation und -tod vermittelt.

**Tabelle 3: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen P<sub>2X1</sub>, P<sub>2X2</sub>, P<sub>2X3</sub> und P<sub>2X4</sub>**

(Bo, Zhang et al. 1995; Evans, Lewis et al. 1995; Egan, Samways et al. 2006)

Rezeptor-Subtyp	P <sub>2X1</sub>	P <sub>2X2</sub>	P <sub>2X3</sub>	P <sub>2X4</sub>
<b>Wirkung</b>	Vasokonstriktion	Vasokonstriktion	Vasokonstriktion	Vasokonstriktion
<b>Gewebe-expression</b>	v.a.glatte Gefäßmuskulatur	v.a.glatte Gefäßmuskulatur	v.a.glatte Gefäßmuskulatur	v.a.glatte Gefäßmuskulatur
<b>Transduktions-mechanismus</b>	ligandengesteuerter Kationenkanal → Ca <sup>2+</sup> ↑	ligandengesteuerter Kationenkanal → Ca <sup>2+</sup> ↑	ligandengesteuerter Kationenkanal → Ca <sup>2+</sup> ↑	ligandengesteuerter Kationenkanal → Ca <sup>2+</sup> ↑
<b>Agonisten</b>	$\alpha$ , $\beta$ -meATP = $\beta$ , $\gamma$ -meATP = ATP = 2-meSATP	ATP ≥ ATP <sub>γS</sub> ≥ 2-meSATP > $\alpha$ , $\beta$ -meATP	2-meSATP > ATP ≥ $\alpha$ , $\beta$ -meATP ≥ AP <sub>4</sub> A	2meATP >> $\alpha$ , $\beta$ -meATP, CTP
<b>Antagonisten</b>	Suramin, PPADS, TNP-ATP, NF023, NF449, IP <sub>5</sub> I	Suramin, PPADS, NF770, NF279, RB2	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, IP <sub>5</sub> I	TNP-ATP, BBG (jeweils schwach)

### 1.2.2. P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren

Die P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, d.h. sie sind an verschiedene G-Proteine

gebunden und vermitteln ihre Wirkung über second messenger. Sie weisen die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren charakteristischen sieben transmembranären hydrophoben Domänen mit jeweils kurzem extrazellulären N- und intrazellulären C-terminalen Ende auf.

Auf glatten Gefäßmuskelzellen werden die Rezeptorsubtypen  $P_{2Y1}$ ,  $P_{2Y2}$ ,  $P_{2Y4}$  und  $P_{2Y6}$  exprimiert, wobei der  $P_{2Y2}$ - und der  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtyp am häufigsten zu finden sind.

Der  $P_{2Y1}$ -Rezeptorsubtyp kommt auf vaskulären Myozyten, Thrombozyten und Endothelzellen vor, ist an ein G-Protein ( $G_q$ ) gekoppelt und vermittelt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) (Dubyak 1991) eine Erhöhung von Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dadurch wird die Phospholipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) aktiviert und es kommt zur vermehrten Bildung von  $PGI_2$  und Endothelium derived relaxing factor (EDRF = NO) (Powell, Milligan et al. 1980), welche vasodilatierend und durch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation antithrombotisch wirken (Kennedy and Burnstock 1985; Mathieson and Burnstock 1985; Liu, McCormack et al. 1989). Die  $P_{2Y1}$ -Rezeptorsubtypen sind schwer desensibilisierbar und werden in abnehmender Stärke durch 2-meSATP, Adenosin-5'-diphosphat (ADP), MRS2365 und ATP aktiviert (Chhatriwala, Ravi et al. 2004; Waldo and Harden 2004). Antagonisten sind MRS2279, MRS2500 und MRS2179.

Der  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp wird auf glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen exprimiert (Godecke, Decking et al. 1996). Er ist an ein  $G_i$ -Protein gekoppelt. In Endothelzellen vermittelt er über die Aktivierung der Phospholipase  $C_{\beta 2}$  ( $PLC_{\beta 2}$ ) (Dubyak and el-Moatassim 1993) und den resultierenden Anstieg von  $IP_3$  und  $Ca^{2+}$ -Ionen ebenfalls die Freisetzung von  $PGI_2$  und NO (Weick, Cherkas et al. 2003; Xu, Chalimoniuk et al. 2003). Er wirkt jedoch nicht nur vasodilatierend und antithrombotisch, sondern in glatten Gefäßmuskelzellen durch einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration auch vasokonstriktorisch.

Der  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp ist ebenfalls schwer desensibilisierbar, etwa gleichstarke Agonisten sind ATP, Uracil-5'-triphosphat (UTP),  $UTP_{\gamma S}$  und INS37217 (Abbraccio, Burnstock et al. 2006). Antagonist ist Suramin.

Bei dem  $P_{2Y4}$ -Rezeptorsubtyp handelt es sich vermutlich um einen an zwei verschiedene G-Proteine ( $G_i$  und  $G_{q/11}$ ) gekoppelten Rezeptor, welcher lediglich auf glatter Gefäßmuskulatur vorkommt. Vasokonstriktion wird im frühen Stadium der Signalkaskade über  $G_i$  im späteren Stadium über  $G_{q/11}$  durch Aktivierung der PLC und daraus resultierend die Bildung von  $IP_3$  und die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration vermittelt (Communi, Motte et al. 1996).

Stärkster Agonist ist UTP. Weitere, etwa gleichstarke Agonisten sind ATP,  $UTP_{\gamma S}$  und INS37217. ADP,  $ATP_{\gamma S}$ , 2-meSATP und  $AP_4A$  stellen partielle Agonisten dar (Bogdanov,

Wildman et al. 1998). Antagonisten sind Suramin und Reactive Blue 2 (RB2).

Der P<sub>2Y6</sub>-Rezeptorsubtyp findet sich auf glatten Gefäßmuskelzellen (Chang, Hanaoka et al. 1995) und bewirkt wie der P<sub>2Y4</sub>-Rezeptorsubtyp über ein G<sub>q/11</sub>-Protein eine Vasokonstriktion. Als Agonist fungiert vor allem UDP (Lazarowski, Rochelle et al. 2001); schwach oder gar nicht wird er durch UTP, UTP<sub>β</sub>S, ATP, ADP und 2-meSATP aktiviert. Antagonisten ist MRS2578 (Communi, Parmentier et al. 1996; Nicholas, Watt et al. 1996; Pendergast, Yerxa et al. 2001).

Neben der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Vasokonstriktion und der Freisetzung von PGI<sub>2</sub> und NO mit resultierender Vasodilatation und Thrombozytenaggregationshemmung (letzteres zum Beispiel vermittelt über ATP, welches aus Thrombozyten und bei Hypoxie oder mechanischem Stress auch aus dem Endothel, freigesetzt wird), vermitteln die oben genannten P<sub>2Y</sub>-Rezeptorsubtypen in vaskulären Myozyten Effekte über die Rho-Kinase (Sauzeau, Le Jeune et al. 2000) und deren Aktivierung durch die GTPase Rho (Hirata, Kikuchi et al. 1992; Gong, Iizuka et al. 1996; Kimura, Ito et al. 1996; Matsui, Amano et al. 1996): Über die aktivierte Rho-Kinase wird die Myosinleichtkettenphosphatase (Kitazawa, Masuo et al. 1991; Somlyo and Somlyo 1994) gehemmt, damit kommt es sekundär zu einer Erhöhung des phosphorylierten Anteils der Myosinleichtketten, was wiederum zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Sensibilität der Myofilamente führt. Dies spielt eine wichtige Rolle innerhalb der Blutdruckregulation und der Arterioskleroseentstehung (Satoh, Kreutz et al. 1994; Kandabashi, Shimokawa et al. 2002), in die das purinerge System also involviert ist. Ferner wird GTPase Rho/Rho-Kinase vermittelt eine Organisation des Aktinzytoskeletts und die Proliferation glatter Muskelzellen sowie mesangialer Zellen ausgelöst.

#### **Tabelle 4: Charakteristika der Purinrezeptor-Subtypen P<sub>2Y1</sub>, P<sub>2Y2</sub>, P<sub>2Y4</sub> und P<sub>2Y6</sub>**

(Abbraccio, Burnstock et al. 2006) ( Bogdanov, Wildman et al. 1998) (Chhatriwala, Ravi et al. 2004; Waldo and Harden 2004) (Lazarowski, Rochelle et al. 2001)

Rezeptor-Subtyp	P <sub>2Y1</sub>	P <sub>2Y2</sub>	P <sub>2Y4</sub>	P <sub>2Y6</sub>
Wirkung	Vasodilatation, Proliferation glatter Gefäßmuskel- und mesangialer Zellen, Hemmung der Thrombozytenaggregation	Vasodilatation (Endothel), Vasokonstriktion (glatte Gefäßmuskulatur), Hemmung der Thrombozytenaggregation, Proliferation glatter Gefäßmuskel- und mesangialer Zellen	Vasokonstriktion, Proliferation glatter Gefäßmuskel- und mesangialer Zellen	Vasokonstriktion, Proliferation glatter Gefäßmuskel- und mesangialer Zellen
Gewebe-expression	Endothel, glatte Gefäßmuskulatur, Thrombozyten	Endothel, glatte Gefäßmuskulatur	glatte Gefäßmuskulatur	glatte Gefäßmuskulatur
Transduktionsmechanismus	G <sub>q</sub> -Protein →*PLC →IP <sub>3</sub> u. [Ca <sup>2+</sup> ] <sup>↑</sup> →PGI <sub>2</sub> u. EDRF <sup>↑</sup>	G <sub>i</sub> -Protein →*PLC <sub>β2</sub> →IP <sub>3</sub> u. [Ca <sup>2+</sup> ] <sup>↑</sup> → <sup>↑</sup> PGI <sub>2</sub> u. EDRF <sup>↑</sup>	G <sub>i</sub> /G <sub>q/11</sub> -Protein →*PLC →IP <sub>3</sub> u. [Ca <sup>2+</sup> ] <sup>↑</sup>	G <sub>q/11</sub> Protein →*PLC → IP <sub>3</sub> u. [Ca <sup>2+</sup> ] <sup>↑</sup>
Agonisten	2-meSADP> 2-meSATP=ADP> ATP, MRS2365	UTP=UTP <sub>γ</sub> S= ATP=INS37217	UTP≥ UTP <sub>γ</sub> S= ATP=INS37217	UDP> UTP> ATP, UTP <sub>β</sub> S
Antagonisten	MRS2179, MRS2279, MRS2500	Suramin> RB2	RB2 > Suramin	MRS2578

\*=Aktivierung

### 1.3. Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP<sub>4</sub>A)- ein neuartig entdeckter endothelialer Vasokonstriktor

Wie bereits dargelegt, konnten im Laufe der letzten Jahrzehnte immer weitreichendere Erkenntnisse über die Funktion des Endothels als auto-, para- und endokrines Organ, sowie als hauptsächlich lokales System zur Blutdruckregulation gewonnen werden.

Während es gelang, die endotheliale Produktion von NO in seiner Schlüsselposition für Gefäßtonus und Gefäßintegrität zu erkennen, sowie entscheidende Mechanismen der NO-Bildung und –Wirkung zu verstehen (Palmer, Ferrige et al. 1987), sind dessen physiologischen Gegenspieler noch nicht vollständig identifiziert worden.

Im Jahre 2005 gelang es der Arbeitsgruppe um V. und J. Jankowski aufzuzeigen, dass nach mechanischer Stimulation Endothelzellen menschlicher Hautgefäße neben den bekannten vasokonstriktiv wirkenden Faktoren Endothelin und den Mononukleotiden ATP und UTP noch weitere, bisher unbekannte Faktoren freigesetzt werden, die auch nach Applikation des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BQ123 (dieser verringerte den Effekt um 9,3 +/- 9,1 %)

und Alkalischer Phosphatase (diese führte über Denaturierung von UTP und ATP zu einer Verringerung des Effektes um 42,5 +/- 8,6 %) noch eine signifikante Vasokonstriktion in Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere hervorrufen.

Anschließend war es dieser Arbeitsgruppe möglich in mehreren Schritten mittels Chromatographie und Spektralanalyse das bis dato noch unbekanntes Dinukleotid Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP<sub>4</sub>A) zu isolieren (Jankowski, Tolle et al. 2005).

In weiteren Versuchen ließ sich zum einen unter Verwendung der Spektrophotometrie ausschließen, dass sich UP<sub>4</sub>A erst während der Aufreinigung und den dabei entstandenen, unphysiologischen pH-Werten spontan gebildet hatte. Darüber hinaus konnte chromatographisch nachgewiesen werden, dass UP<sub>4</sub>A in humanem Plasma gesunder Individuen in Konzentrationen enthalten ist, welche ausreichen um in Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere vasokonstriktive Effekte auszulösen und dass die Freisetzung von UP<sub>4</sub>A aus dem Endothel durch Ach, Endothelin, A23187, ATP, UTP und mechanischen Stress stimuliert wird.

Es scheint sich bei UP<sub>4</sub>A um einen sehr potenten Vasokonstriktor zu handeln, denn im Vergleich mit Konzentrationen, die der von UTP und ATP im Plasma entsprechen, wirkt UP<sub>4</sub>A stärker vasokonstriktorisch als die Mononukleotide. Auch im Vergleich mit ET1 zeigt UP<sub>4</sub>A eine stärkere Wirkung. Die pharmakologische Inhibition von UP<sub>4</sub>A hat zwar keine Auswirkungen auf den Endothelineffekt, aber da ET1 die Freisetzung von UP<sub>4</sub>A aus dem Endothel stimuliert, könnte ein Teil des dem ET1 zugeschriebenen Effekts in Wirklichkeit durch UP<sub>4</sub>A vermittelt werden.

Es steht nun noch aus, die Rolle von UP<sub>4</sub>A in dem komplexen Zusammenspiel vasoaktiver Faktoren genauer zu definieren und die Wirkmechanismen, über welche seine Effekte vermittelt werden, zu entschlüsseln.

### **Fragestellung**

UP<sub>4</sub>A beinhaltet als erstes im lebenden Organismus entdecktes Dinukleosidpolyphosphat sowohl Purin- als auch Pyrimidinanteile. Es ist erwiesen, dass pyrimidinhaltige Nukleotide wie UTP als P<sub>2Y</sub>-Agonisten (Abbraccio, Burnstock et al. 2006) und reine Purin-Dinukleotide wie z.B. AP<sub>4</sub>A als P<sub>2X</sub>-Agonisten (van der Giet, Khattab et al. 1997) Vasokonstriktion vermitteln, daher liegt die Vermutung nahe, dass UP<sub>4</sub>A sowohl über P<sub>2X</sub>- als auch über P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren wirkt.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll geklärt werden, über welches Zusammenspiel der



purinergen Rezeptoren  $UP_4A$  die Vasomotorik am Beispiel der isoliert perfundierten Rattenniere reguliert.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemische Substanzen

Alle verwendeten chemischen Substanzen wurden über *Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, U.S.A.)* bezogen.

Bei der Präparation des Versuchstieres wurden 1,4g pro Kilogramm Körpergewicht Urethan als Anästhetikum und 500 Internationale Einheiten (I.E.) Heparin verwendet, wobei das Heparin verhinderte, dass die Perfusion der Nierengefäße durch Thrombenbildung beeinflusst wurde.

Während des eigentlichen Versuchs wurde die Rattenniere an ein Perfusionssystem angeschlossen und mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Diese wurde für jeden Versuch nach folgendem Schema in einem Liter zweifach destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) neu angesetzt:

Natriumchlorid (NaCl)	:	112,0 mM
Kaliumchlorid (KCl)	:	5,0 mM
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	:	1,2 mM
Glukose	:	11,0 mM
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	:	1,2 mM
Natriumhydrogenphosphatdihydrat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	:	1,0 mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	:	25,0 mM

Zusätzlich wurde das Perfusat kontinuierlich in dem Maße mit Carbogen (Zusammensetzung: 95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast, dass der pH-Wert, welcher während des Versuchs mehrfach bestimmt wurde, stets bei 7,4 lag.

Die im jeweiligen Versuch verwendeten Substanzen wurden stets vor Versuchsbeginn aus einer tiefgefrorenen Stammlösung (Konzentration: 10<sup>-2</sup> M) in frischer Krebs-Henseleit-Lösung neu angesetzt.

Folgende Substanzen wurden in den durchgeführten Versuchen verwendet:

α, β-meATP, Alkalische Phosphatase, Ang II, BQ123, MRS2179, PPADS, RB2, Suramin, TNP-ATP, NFO23, UP<sub>4</sub>A.

#### 2.1.2. Geräte

Präparation: - Polyethylen-Kathteter (*Firma Baxter, Unterschleißheim, Deutschland*)

- Präparationsbesteck: Mikroklemme, Mikroschere, scharfe Pinzette, stumpfe Pinzette, Schere

Perfusionssystem: - Heizanlage (*Firma Kottermann, Uetze-Hanigsen, Deutschland*)  
 - Peristaltische Pumpe (*Firma Ismatec, Glattbrugg, Schweiz*)

Versuchsdokumentation und

Auswertung : - Brückenverstärker (*Firma Hugo Sachs, Freiburg, Deutschland*)  
 - Gould-Transducer: Statham Transducer P23Gb  
 (*Firma Hugo Sachs, Freiburg, Deutschland*)  
 - Polygraph (*Firma Rikadenki, Freiburg, Deutschland*)  
 - Computerprogramme:  
     Microsoft Windows XP (*Unterschleißheim, Deutschland*)  
     Microsoft Office: MS Word, Excel, Powerpoint  
     (*Unterschleißheim, Deutschland*)  
     GraphPadPrism 4.0 (*SanDiego, U.S.A.*)

### 2.1.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY-Ratten) im Alter von vier bis sechs Monaten und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 243 Gramm (232-265 Gramm) verwendet, welche von der Firma *Charles River, Sulzfeld, Deutschland* bezogen wurden. Die Tiere wurden in einem begehbaren, fensterlosen Tierstall mit Zeitschaltprogramm gehalten, so dass sie einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden mit einer Dauerbeleuchtung von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr ausgesetzt waren.

Die Raumtemperatur lag zwischen 18°C und 22°C, die relative Luftfeuchte zwischen 50% und 70% .

Ernährt wurden die Tiere mit Trinkwasser, Trockenfutter der Firma *Altromin, Soest, Deutschland* und zusätzlich dreimal pro Woche mit Körnern und Obst.

Als Einstreu diente entkeimte und entstaubte Weichholzfaser der Firma *Altromin, Soest, Deutschland*.

Zwischen der Anlieferung der Versuchstiere und dem Versuchstag vergingen mindestens fünf Tage um die Akklimation der Tiere zu gewährleisten.

## **2.2. Methode**

### **2.2.1. Präparation**

Erlaubnis zur Durchführung von Tierexperimenten:

Aktenzeichen: O 0086/01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

Die im Folgenden beschriebene Präparation von Rattennieren entspricht den von der Deutschen Physiologischen Gesellschaft formulierten „Richtlinien bezüglich des Umgangs mit Versuchstieren im Rahmen physiologischer Forschung“.

Nachdem das Versuchstier durch intraperitoneale Injektion von Urethan (Dosis: 1,4 Gramm pro Kilogramm Körpergewicht) narkotisiert worden war, wurde die Bauchhöhle durch ventrale, mediale Inzision vom Unterbauch bis zum Zwerchfellansatz eröffnet und die Aorta abdominalis sowie die linke Niere mit zugehöriger Arteria und Vena renalis sinistra wurden durch stumpfe Dissektion vorsichtig freipräpariert.

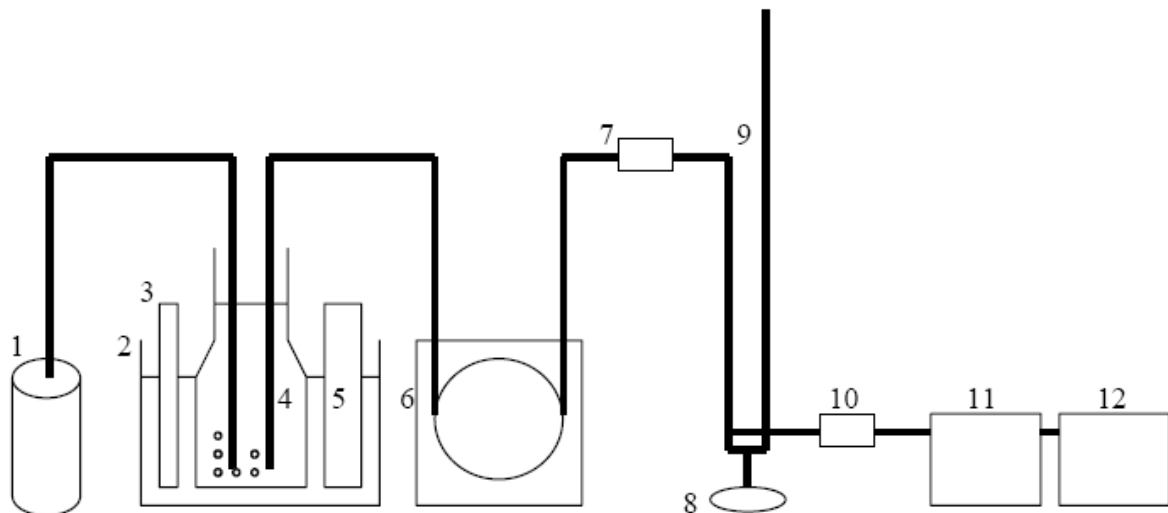
Als nächster Schritt wurden Ligaturen locker um die freipräparierte, infrarenal gelegene Aorta abdominalis und die Arteria renalis sinistra positioniert.

Nach Abklemmen der Aorta abdominalis distal des Abgangs der Arteria renalis sinistra (so dass die Perfusion der Nierengefäße unbeeinträchtigt blieb) wurde die Aorta distal der Ligatur eröffnet und ein Polyethylen-Katheter (Durchmesser 20 gauge) wurde sanft in die Aorta eingeführt.

Nach Lösen der Klemme wurde der Polyethylen-Katheter bis in die Arteria renalis sinistra vorgeschoben und 500 I.E. Heparin wurden injiziert. Die beiden Ligaturen wurden festgezogen, ohne jedoch dass Katheterlumen einzuengen, und die Niere wurde mitsamt Arteria renalis sinistra, Aorta abdominalis und Polyethylen-Katheter aus dem Retroperitonealraum der Ratte entfernt und unverzüglich an das Perfusionssystem angeschlossen.

### **2.2.2. Perfusionssystem**

Das Perfusionssystem, welches für die hier beschriebenen Versuche verwendet wurde, folgt im Aufbau der Beschreibung von Hofbauer et al. von 1973 (Hofbauer, Zschiedrich et al. 1973).



**Abbildung 1: Perfusionssystem der isoliert perfundierten Rattenniere**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Perfusionssystems:

- |                |                           |                     |                       |
|----------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|
| 1. Carbogen    | 4. Krebs-Henseleit-Lösung | 7. Injektionsventil | 10. Transducer        |
| 2. Wasserbad   | 5. Heizanlage             | 8. Rattenniere      | 11. Brückenverstärker |
| 3. Thermometer | 6. Peristaltikpumpe       | 9. Windkessel       | 12. Polygraph         |

Die in einem Wärmebad (2.) kontinuierlich auf 37°C erwärmte und mit Carbogen (1.) begaste Krebs-Henseleit-Lösung wurde über eine Peristaltikpumpe mit einem konstanten Perfusionsfluss von acht bis zwölf Milliliter pro Minute in die angeschlossene Rattenniere geleitet. Dabei ermöglichte ein parallel geschalteter Windkessel eine konstante Perfusion der Niere, so dass der mittlere Perfusionsfluss (MPD) beständig zwischen 60mmHg und 80 mmHg (=Baseline) lag. Ein ebenfalls angeschlossener Gould-Transducer wandelte den in den Nierengefäßen gemessenen MPD in elektrische Signale um, die durch einen Brückenverstärker verstärkt und von einem Polygraphen aufgezeichnet wurden. Über ein Injektionsventil konnten Substanzen in Bolusform (100µl) ins Perfusat appliziert werden und somit die Nierengefäße erreichen. Verursachten diese Substanzen eine Druckänderung innerhalb der Nierengefäße, wurde diese Veränderung in Form eines von der Baseline abweichenden Ausschlags vom Polygraphen registriert.

### 2.2.3. Funktionsprüfung der Nierengefäße

Nach Anschluss der Rattenniere an das Perfusionssystem wurde zunächst mindestens 30 Minuten lang die Äquilibration des MPD abgewartet. Hatte sich eine stabile Baseline eingestellt, wurde vor dem eigentlichen Versuchsbeginn, sowie nach Versuchsende und nach Beginn einer Dauerperfusion mit purinergen Agonisten, Antagonisten oder Rho-Kinase-Inhibitoren die Sensitivität der Nierengefäße auf Ang II und  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP getestet.

Lösten diese jeweils als Bolus verabreichten Substanzen keine adäquate Änderung des Perfusionsdrucks als Ausdruck der Kontraktionsfähigkeit der Nierengefäße aus, wurde der Versuch verworfen.

#### **2.2.4. Erstellung nicht kumulativer Dosiswirkungskurven**

Unter kontinuierlicher Perfusion der Niere mit Krebs-Henseleit-Lösung wurden über das Injektionsventil steigende Dosen von Ang II (als Kontrollsubstanz) und im Anschluss von UP<sub>4</sub>A als Bolus injiziert (n=6), wobei keine Desensibilisierung der Rezeptoren stattfand. Es wurden Konzentrationen von 10<sup>-9</sup> M bis 10<sup>-4</sup> M in dekadischlogarithmischen 5er-Schritten appliziert. Der zeitliche Abstand zwischen den Injektionen betrug im Konzentrationsbereich von 10<sup>-9</sup> M bis 10<sup>-7</sup> M fünf Minuten, im Konzentrationsbereich von 10<sup>-7</sup> M bis 10<sup>-4</sup> M zwanzig Minuten, so dass vor jeder Bolusgabe die Äquilibration des MPD auf Baseline-Niveau erfolgte. Die durch die Bolusgabe resultierenden Änderungen des MPD wurden durch den angeschlossenen Polygraphen in Form von von der Baseline abweichenden Ausschlägen aufgezeichnet und nach dem Versuch mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism 4.0 als Dosiswirkungskurve graphisch dargestellt.

#### **2.2.5. Nicht kumulative Dosiswirkungskurven unter Dauerperfusion mit dem P<sub>2X</sub>-Agonist $\alpha,\beta$ -meATP**

Nach Erstellung je einer nicht-kumulativen Dosiswirkungskurve von Ang II und UP<sub>4</sub>A ohne Perfusionszusatz wurde der P<sub>2X</sub>-Agonist  $\alpha,\beta$ -meATP im Perfusat gelöst (10 $\mu$ M). Es wurden mindestens 30 Minuten abgewartet um sicherzustellen, dass sämtliche Nierengefäße mit dem Perfusionszusatz durchspült wurden.

Nach initialem Anstieg und anschließender Äquilibration des MPD mit erneutem Erreichen der Baseline wurde durch Bolusgabe von  $\alpha,\beta$ -meATP die vollständige Desensibilisierung der P<sub>2X</sub>-Rezeptoren nachgewiesen. Anschließend wurde eine weitere nicht-kumulative Dosiswirkungskurve von UP<sub>4</sub>A erstellt.

#### **2.2.6. Nicht kumulative Dosiswirkungskurven unter Dauerperfusion mit Purinrezeptorantagonisten**

Nach Erstellung je einer nicht-kumulativen Dosiswirkungskurve von Ang II und UP<sub>4</sub>A ohne Perfusionszusatz wurden verschiedene Purinrezeptorantagonisten ins Perfusat gegeben, um die für die durch UP<sub>4</sub>A hervorgerufene Vasokonstriktion verantwortlichen Purinrezeptoren zu identifizieren. In verschiedenen Versuchen wurden die spezifischen P<sub>2X</sub>-Rezeptorantagonisten TNP-ATP (10  $\mu$ mol/l), NFO23 (10  $\mu$ mol/l), die spezifischen P<sub>2Y</sub>-Rezeptorantagonisten MRS2179 (in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l P<sub>2Y1</sub>-Inhibitor), RB2 (10  $\mu$ mol/l) und PPADS (Antagonist der P<sub>2X1</sub>-, P<sub>2Y1</sub>-, P<sub>2Y4</sub>- und P<sub>2Y6</sub>- Rezeptorsubtypen in einer Konzentration von 50  $\mu$ mol/l) sowie Suramin (Antagonist der P<sub>2X1</sub>-, P<sub>2Y1</sub>-, P<sub>2Y2</sub>- und P<sub>2Y6</sub>- Rezeptorsubtypen in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l) im Perfusat gelöst (n jeweils =6). Es wurden mindestens 30 Minuten abgewartet um sicherzustellen, dass sämtliche Nierengefäße

mit dem Perfusionszusatz durchspült wurden.

Die Kontraktionsfähigkeit der Nierengefäße wurde durch Bolusgabe von  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP als stärkstem bekannten  $P_{2X}$ -Rezeptoragonisten, das nach Dauerperfusion mit PPADS, TNP-ATP und Suramin keinen oder nur noch einen minimaler Anstieg des MPD auslösen durfte und Ang II als purinrezeptorunabhängigem Vasokonstriktor nachgewiesen. Anschließend wurde nach Äquilibration des MPD und Erreichen der Baseline erneut eine nicht-kumulative Dosiswirkungskurve von  $UP_4A$  erstellt.

### 2.2.7. Statistische Analyse

Die unter Dauerperfusion mit oder ohne Perfusionszusatz erzielten Effekte von  $UP_4A$  wurden -wie bereits beschrieben- als Änderung des MPD in mmHg aufgezeichnet und als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error mean) dargestellt.

Bei diesen Ergebnissen handelt es sich aus statistischer Sicht um unverbundene Stichproben mit eventuell unterschiedlicher Standardabweichung und unsymmetrischer Verteilung.

Zur statistischen Beurteilung wurde daher der verteilungsunabhängige U-Test von Mann-Whitney herangezogen:

Die Nullhypothese, die es zu widerlegen galt, lautete:

Die Änderung des MPD, verursacht durch  $UP_4A$  unter Dauerperfusion mit Agonisten oder Antagonisten, ist gleich der Druckänderung unter Dauerperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung ohne Perfusionszusatz.

Nullhypothese:  $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Die Alternative hingegen besagte, dass der Effekt von  $UP_4A$  unter Dauerperfusion mit den oben genannten Substanzen ungleich der Wirkung von  $UP_4A$  unter Dauerperfusion ohne Perfusionszusatz sei.

Alternative:  $H_1: \mu_1 > \mu_2$  oder  $\mu_1 < \mu_2$

Der U-Test arbeitet nicht mit Originaldaten sondern mit zugeordneten Rangwerten; jeder Änderung des MPD wurde also eine Rangzahl zugeordnet, danach wurde eine Rangordnung erstellt.

Der Stichprobenumfang unter Dauerperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung betrug ohne Perfusionszusatz  $n_1$ , mit Perfusionszusatz  $n_2$ .

Als nächstes wurden die Rangsummen  $R_A$  und  $R_B$  in beiden Stichproben berechnet, dann erfolgte die Berechnung der sogenannten Prüfgröße  $U$  als Minimum beider Werte:

$$U_A = n_1 * n_2 + n_1 * (n_1 + 1) / 2 - R_A$$

$$U_B = n_1 * n_2 + n_2 * (n_2 + 1) / 2 - R_B$$

Die Nullhypothese  $H_0$  galt als widerlegt, wenn der kleinere Wert von  $U_A$  und  $U_B$  unter dem tabellarisch aufgeführten kritischen Wert  $U$  für das Signifikanzniveau von 5% (da eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  als signifikant vorausgesetzt wurde) lag.

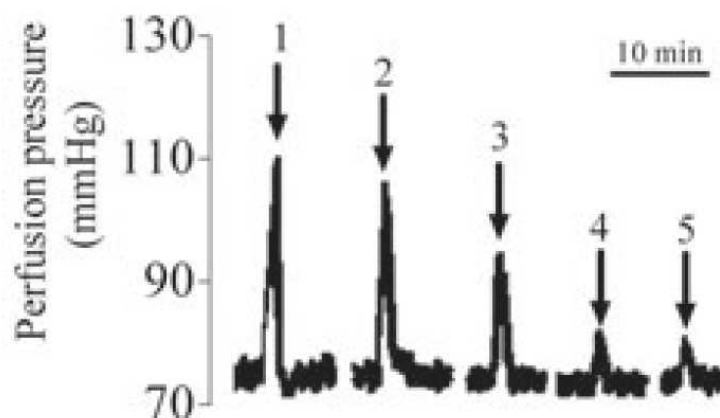


### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Veränderung des MPD durch endotheliale Faktoren

An der isoliert perfundierten Rattenniere bewirkte die Applikation des Überstands aus durch mechanischen Stress stimulierten Endothelzellen menschlicher Hautgefäße einen deutlich signifikanten Anstieg des MPD.

Nach gleichzeitiger Gabe des Endothelin-1-Rezeptor-Antagonisten BQ123 verringerte sich der beobachtete Effekt um  $9,3 \pm 9,1 \%$  ( $n=12$ ). Die zusätzliche Inkubation von Alkalischer Phosphatase (AP) bewirkte über Denaturierung von UTP und ATP eine weitere Verringerung des vasokonstriktiven Effekts um  $42,5 \pm 8,6\%$  ( $n=12$ ). Der verbleibende Anstieg des MPD konnte durch die Gabe der unselektiven purinergen Antagonisten PPADS ( $n=7$ ) bzw. Suramin ( $n=5$ ) um weitere  $28,8 \pm 6,5 \%$  bzw.  $32,4 \pm 8,6 \%$  gesenkt werden.



**Abbildung 2: Originalaufzeichnungen des aus Bolusgaben von endotheliale Überstand resultierenden Effekts auf den MPD**

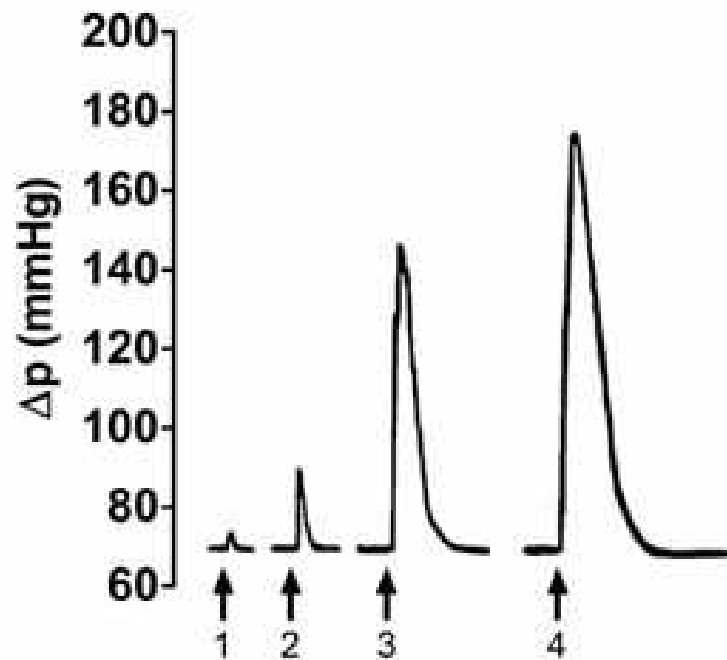
Auf der Ordinate ist der MPD in mmHg gegen die Zeit (in Minuten) auf der Abszisse aufgetragen. Die Kurven sind jeweils repräsentative Darstellungen aus mindestens 5 verschiedenen Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere ( $n>5$ ). Die Pfeile und Ziffern entsprechen den jeweils applizierten Substanzen:

- 1 = Endothelialer Überstand als Bolus injiziert, ohne Perfusionszusatz;
- 2 = Endothelialer Überstand als Bolus injiziert, unter Dauerperfusion mit BQ123;
- 3 = Endothelialer Überstand als Bolus injiziert, unter Dauerperfusion mit BQ123 und AP;
- 4 = Endothelialer Überstand als Bolus injiziert, unter Dauerperfusion mit BQ123, AP und PPADS;
- 5 = Endothelialer Überstand als Bolus injiziert, unter Dauerperfusion mit BQ123, AP und Suramin.

Es ist zu erkennen, dass der endotheliale Überstand eine deutliche Erhöhung des MPD hervorruft und die der Perfusionslösung zugesetzten Substanzen diesen Effekt verringern.

### 3.2. Untersuchung des konzentrationsabhängigen Effekts von UP<sub>4</sub>A auf den MPD

Um nachzuweisen, dass es sich bei UP<sub>4</sub>A um einen potenten Vasokonstriktor handelt, wurde eine nicht kumulative Dosiswirkungskurve (DWK) von UP<sub>4</sub>A erstellt. Ab einer Dosis von 500 pmol bewirkte die Substanz einen signifikanten Anstieg des MPD; ein maximaler Anstieg wurde bei einer Dosis von (100 nmol) erreicht. Um die Kontraktionsfähigkeit der Nierengefäße nachzuweisen wurden zuvor zwei DWK von Ang II angefertigt.

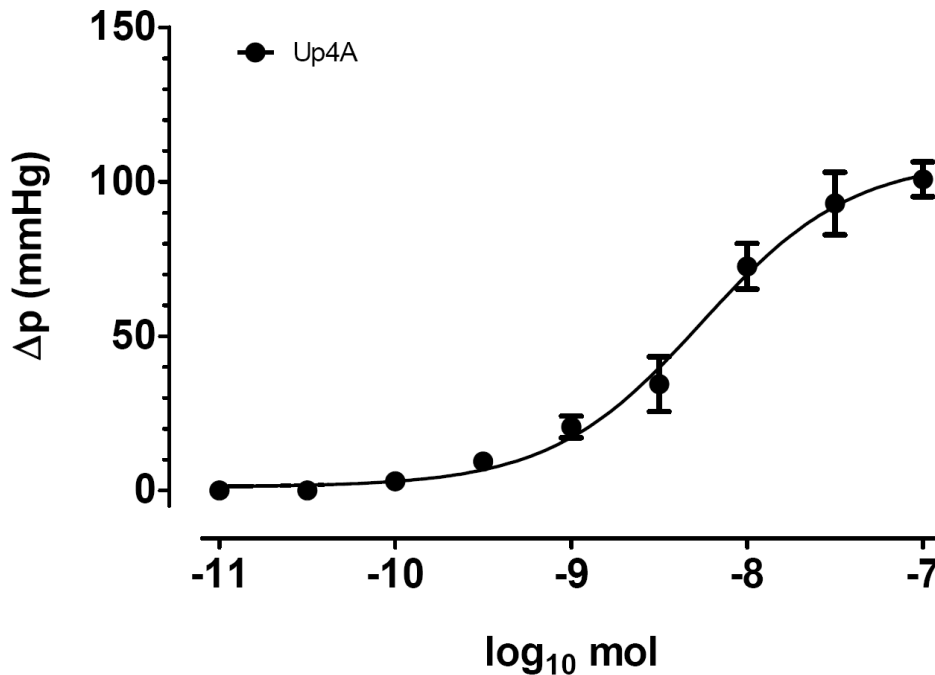


**Abbildung 3: Originalabbildung eines Versuches an der isoliert perfundierten Rattenniere mit einer dosisabhängigen Applikation von Up4A**

Die Abbildung zeigt Kurven, die die aus sechs unabhängigen Versuchen (n=6) an der isoliert perfundierten Rattenniere gewonnenen Daten repräsentieren. Auf der Ordinate ist die Änderung des MPD (in mmHg) gegen die Zeit (in Minuten) auf der Abszisse aufgezeichnet. Die Pfeile und Ziffern markieren jeweils die Bolusapplikation von UP<sub>4</sub>A in steigender Dosis:

1 = 500pmol; 2 = 1nmol; 3 = 10nmol; 4 = 100nmol.

Es zeigt sich ein dosisabhängiger UP<sub>4</sub>A-induzierter Perfusionsdruckanstieg, der bei einer Dosis von 100 nmol sein Maximum erreicht.



**Abbildung 4: DWK des durch UP<sub>4</sub>A induzierten Perfusionsdruckanstiegs**

Dargestellt ist das Ausmaß des UP<sub>4</sub>A-vermittelten Anstiegs des MPD in mmHg gegen die injizierte Dosis von UP<sub>4</sub>A. Die Messpunkte entsprechen jeweils dem Mittelwert der aus sechs unabhängigen Versuchen gewonnenen Daten (n=6), wobei die vertikalen Linien dem Standardfehler p<0,05 entsprechen.

Es zeigte sich erneut ein konzentrationsabhängiger Anstieg des MPD, der bei einer Konzentration von (100 nmol) sein Wirkungsmaximum erreichte.

### **3.3. Identifizierung der purinergen Rezeptorsubtypen, über die UP<sub>4</sub>A seine vasokonstriktive Wirkung vermittelt**

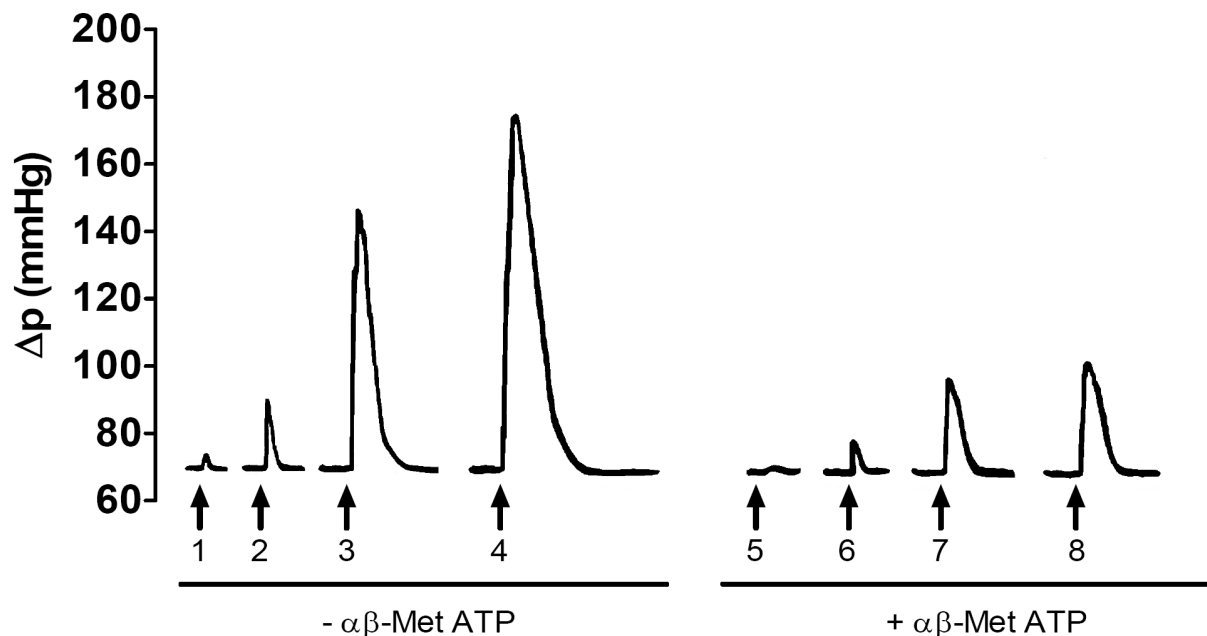
#### **3.3.1. Untersuchung der Wirkung von α, β-meATP auf den vasokonstriktiven Effekt von als Bolus appliziertem UP<sub>4</sub>A, sowie der entsprechenden DWK**

Um zu klären, über welche purinergen Rezeptorsubtypen UP<sub>4</sub>A wirkt, wurde zunächst α, β-meATP verwendet. Bei α, β-meATP handelt es sich um den stärksten bekannten P<sub>2X</sub>-Rezeptoragonisten. Eine Dauerperfusion der isoliert perfundierten Rattenniere mit dieser Substanz (10 μmol/l) bewirkt eine vollständige Desensibilisierung der P<sub>2X1</sub>- und P<sub>2X3</sub>-Rezeptorsubtypen.

In sechs unabhängigen Versuchen (n=6) erfolgte nach Äquilibration des MPD an den Gefäßen der isoliert perfundierten Rattenniere auf 60 +/- 5 mmHg eine Bolusgabe von UP<sub>4</sub>A in steigender Dosis, die zu einer zunehmenden Erhöhung des MPD führte. Nach Abfall des MPD auf das Ausgangsniveau wurde nun α, β-meATP in die Perfusionslösung (10 μmol/l)

gegeben. Nach einem initialen Anstieg des MPD wurde nach etwa 30 Minuten erneut das Baseliniveau erreicht. Die Bolusgabe von  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt mehr auf den MPD, was eine vollständige Desensitisierung der  $P_{2X}$ -Rezeptoren nachwies. Die folgende Bolusgaben von  $UP_4A$  bewirkte nun nur noch einen viel geringeren dosisabhängigen Anstieg des MPD im Vergleich zu den zuvor gemessenen  $UP_4A$ -induzierten Perfusionsdruckanstieg.

Anschließend wurde eine DWK von  $UP_4A$  ohne und mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP als Perfusionszusatz angefertigt, die den repräsentativen Mittelwert aus sechs Versuchen bildete ( $n=6$ ) und eine signifikante ( $p<0,05$ ) Verringerung des Wirkungsmaximums von  $UP_4A$  um  $74,6 \pm 4,5$  % bei Anwesenheit des  $P_{2X}$ -Rezeptoragonisten zeigte.



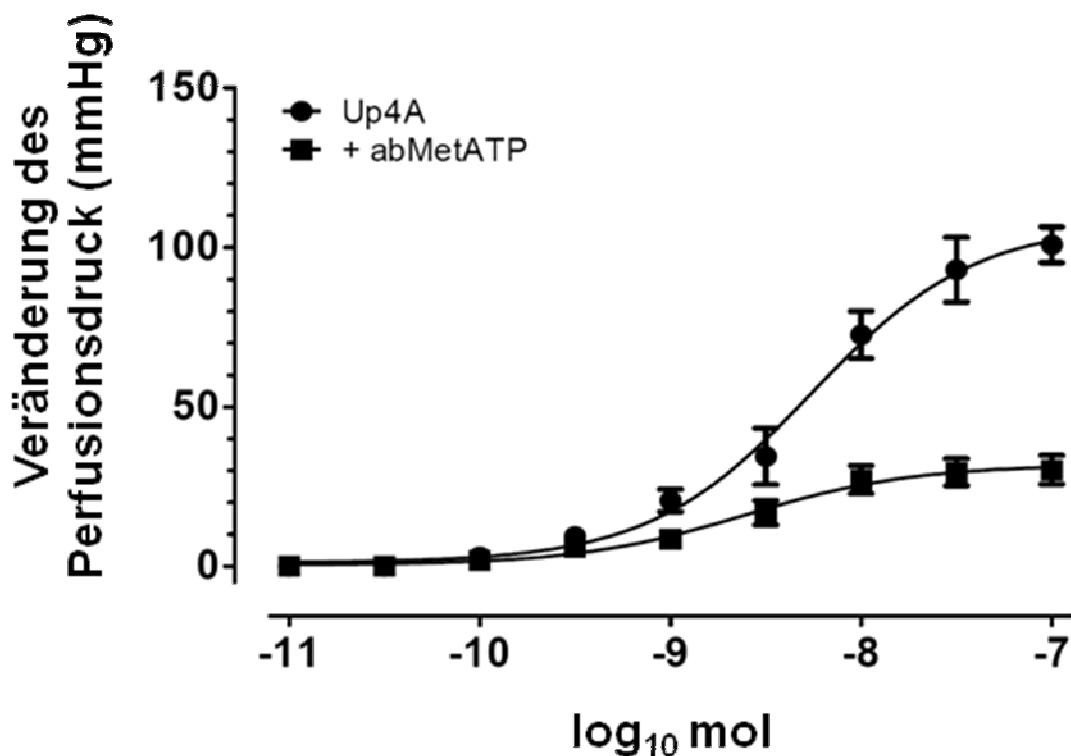
**Abbildung 5: Originalaufzeichnungen des aus Bolusgaben von  $UP_4A$  resultierenden Anstiegs des MPD ohne und mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP als Perfusionszusatz**

Aufgetragen ist die Änderung des MPD in mmHg gegen die Zeit. Es handelt sich um eine repräsentative Abbildung aus sechs unabhängigen Versuchen an der isoliert perfundierten Niere von WKY-Ratten ( $n=6$ ).

1 = 500 pmol; 2 = 1 nmol; 3 = 10 nmol; 4 = 100 nmol; jeweils ohne Perfusionszusatz.

5 = 500 pmol; 6 = 1 nmol; 7 = 10 nmol; 8 = 100 nmol; jeweils unter Dauerperfusion mit  $\alpha, \beta$ -meATP (10  $\mu$ mol/l).

Nicht dargestellt ist der resultierende initiale Anstieg des MPD bei der Gabe von  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP zur Perfusionslösung und der folgende erneute Abfall auf das Ausgangsniveau sowie die Injektion von  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP als Bolus zu diesem Zeitpunkt, welche ohne Effekt auf den MPD blieb und somit die vollständige Desensitisierung der  $P_{2X1}$ - und  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtypen nachwies.



**Abbildung 6: DWK von UP<sub>4</sub>A ohne Perfusionszusatz und in Gegenwart von  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP**

Die Abbildung zeigt auf der Ordinate die Veränderung des MPD (in mmHg), aufgetragen gegen die applizierte Dosis von UP<sub>4</sub>A in log<sub>10</sub> mol auf der Abszisse. Die Messpunkte entsprechen jeweils dem Mittelwert der aus sechs unabhängigen Versuchen gewonnenen Daten (n=6), wobei die vertikalen Linien dem Standardfehler  $p < 0,05$  entsprechen.

Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger UP<sub>4</sub>A-induzierter Anstieg des MPD, welcher bei Dauerperfusion der Niere mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP signifikant ( $p < 0,05$ ) verringert wird.

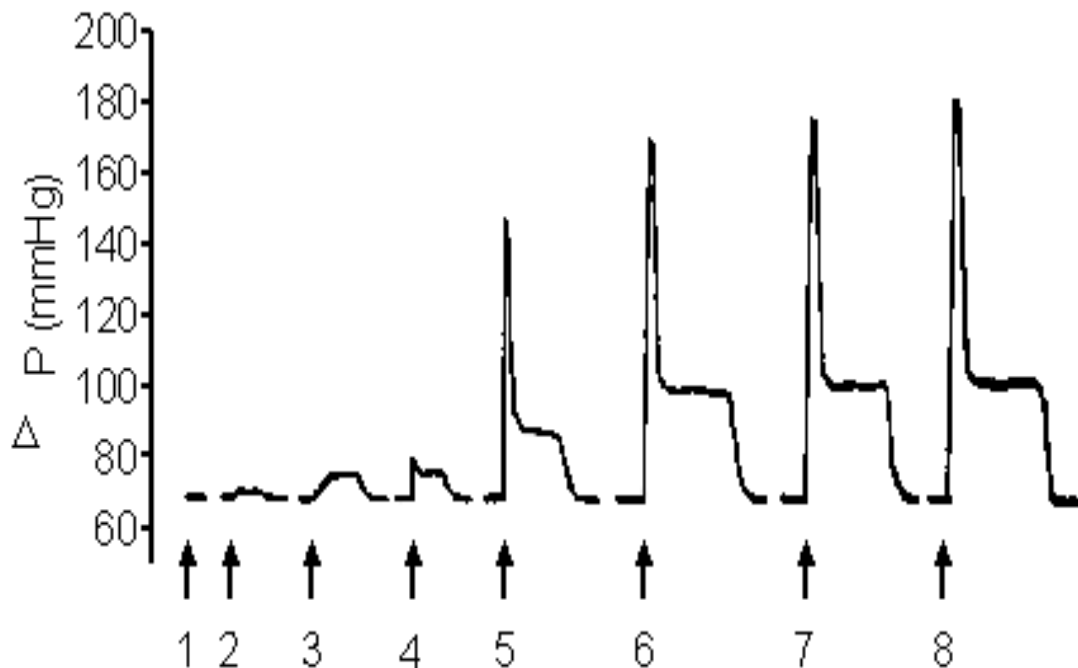
### 3.3.2. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von UP<sub>4</sub>A in Gegenwart der P<sub>2X1</sub>/P<sub>2X3</sub>-Rezeptorantagonisten TNP-ATP und NF023

Mit dem Ziel, die an der Vermittlung des vasokonstriktiven Effekts von UP<sub>4</sub>A beteiligten P<sub>2X</sub>-Rezeptorsubtypen zu identifizieren, wurde nach Äquilibrierung des MPD auf 60 +/- 5 mmHg erst eine DWK von UP<sub>4</sub>A ohne Perfusionszusatz und anschließend in Anwesenheit des P<sub>2X1</sub>/P<sub>2X3</sub>-Rezeptorantagonisten TNP-ATP bzw. NF023 in der Perfusionslösung (jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l) erstellt. In dieser Konzentration inhibiert TNP-ATP vor allem den P<sub>2X1</sub>-Rezeptorsubtypen, während für eine signifikante Hemmung des P<sub>2X3</sub>-Rezeptorsubtyps weitaus höhere Konzentrationen notwendig sind. Ähnlich verhält es sich mit NF023. Dieser P<sub>2X1</sub>/P<sub>2X3</sub>-Rezeptorantagonist weist in der verwendeten Konzentration eine Affinität zum P<sub>2X1</sub>- und P<sub>2X3</sub>-Rezeptorsubtypen im Verhältnis von 20 zu 1 auf. Es zeigte sich

eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verringerung des Wirkungsmaximums von  $UP_4A$  sowohl unter Dauerperfusion mit TNP-ATP als auch mit NF023 (siehe Abb. 8).

### 3.3.3. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von $UP_4A$ unter Dauerperfusion mit $UP_4A$

Wie unter 3.3.1. beschrieben, riefen nach vollständiger Desensibilisierung der  $P_{2X}$ -Rezeptoren durch Dauerperfusion mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP Bolusgaben von  $UP_4A$  einen zwar viel geringeren jedoch weiterhin signifikanten dosisabhängigen Anstieg des MPD hervor. Um zu überprüfen, ob  $UP_4A$  auch über nicht-desensibilisierbare Rezeptoren wirkt, erfolgte in sechs unabhängigen Versuchen ( $n=6$ ) nach Äquilibration des MPD an den Gefäßen der isoliert perfundierten Rattenniere eine Dauerperfusion mit  $UP_4A$  in steigender Dosis.



**Abbildung 7: Originalaufzeichnungen des aus der Dauerperfusion mit  $UP_4A$  resultierenden Anstiegs des MPD:**

Aufgetragen ist die Änderung des MPD in mmHg gegen die Zeit. Es handelt sich um eine repräsentative Abbildung aus sechs unabhängigen Versuchen an der isoliert perfundierten Niere von WKY-Ratten ( $n=6$ ). 1-8: 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 nmol/L.

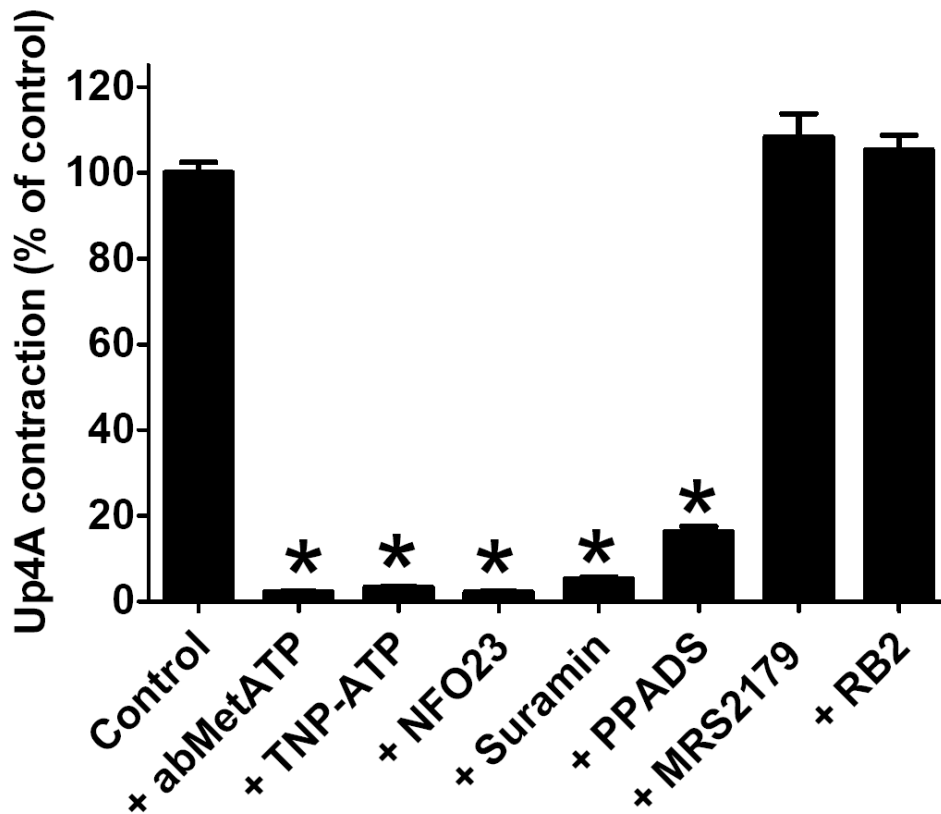
Es konnte gezeigt werden, dass nach Desensibilisierung des  $P_{2X1/3}$ -Rezeptors unter Dauerperfusion mit  $UP_4A$  eine Dauerkontraktion durch  $UP_4A$  induziert wurde. Dieser Effekt wurde bei Bolusgaben von  $UP_4A$  durch die stärker ausgeprägte Wirkung des  $P_{2X1/3}$ -Rezeptors

maskiert. Es muss also ein weiterer, nicht-desensibilisierbarer Rezeptor an der Vermittlung des vasokonstriktiven Effekts von  $UP_4A$  beteiligt sein. Da der  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp keine Desensibilisierungsphänomene aufweist, könnte die zweite Wirkkomponente von  $UP_4A$  über diesen Rezeptorsubtyp vermittelt werden.

### **3.3.4. Untersuchung des vasokonstriktiven Effekts von $UP_4A$ in Gegenwart verschiedener $P_2$ - bzw. $P_{2Y}$ -Rezeptorantagonisten (MRS2179, RB2, PPADS und Suramin)**

Untersucht wurde nun, ob auch  $P_{2Y}$ -Rezeptorsubtypen an der Vermittlung der vasokonstriktorischen Wirkung von  $UP_4A$  beteiligt sind:

Es wurden in jeweils sechs unabhängigen Versuchen Dosiswirkungskurven von  $UP_4A$  ohne und mit dem Zusatz verschiedener  $P_{2Y}$ -Rezeptorantagonisten erstellt (siehe Abb. 8). In Gegenwart von MRS2179 (in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  nahezu spezifischer Antagonist des  $P_{2Y1}$ -Rezeptorsubtyps) und RB2 (in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  Antagonist des  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtyps) kam es zu keiner signifikanten Abnahme des Wirkungsmaximums des  $UP_4A$ -induzierten Anstiegs des MPD. Bei Dauerperfusion mit PPADS (Antagonist der  $P_{2X1}$ -,  $P_{2Y1}$ -,  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtypen in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$ ) und Suramin (Antagonist der  $P_{2X1}$ -,  $P_{2Y1}$ -,  $P_{2Y2}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtypen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ ) kam es jedoch zu einer signifikanten Abnahme des maximal erreichten Anstiegs des MPD.



**Abbildung 8: Einfluss von  $\alpha,\beta$ -meATP, TNP-ATP, NFO23, MRS2179, RB2, PPADS und Suramin auf die UP<sub>4</sub>A-induzierte Vasokonstriktion**

Die Vasokonstriktion in Prozent des maximalen UP<sub>4</sub>A-induzierten Anstieges des MPD (durch die erste Säule dargestellt) ist für  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP, sowie jeden P<sub>2X1</sub>/P<sub>2X3</sub>- und P<sub>2Y</sub>-Rezeptorantagonisten gesondert aufgetragen. Jede Säule repräsentiert das arithmetische Mittel aus sechs unabhängigen Versuchen (n=6). Die senkrechten Linien entsprechen dem Standardfehler p<0,05.

Wie bereits unter 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, zeigt sich unter Dauerperfusion mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP, TNP-ATP und NFO23 (jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l) eine hochsignifikante Abnahme des UP<sub>4</sub>A-induzierten Effekts auf den MPD.

Es zeigt sich außerdem, dass MRS2179 (1 $\mu$ mol) als selektiver Inhibitor des P<sub>2Y1</sub>-Rezeptorsubtyps keine Wirkung auf den Effekt von UP<sub>4</sub>A hat. RB2, in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l Antagonist am P<sub>2Y4</sub>- und P<sub>2Y6</sub>-Rezeptorsubtyp zeigt ebenfalls keinen signifikanten Effekt. PPADS, in einer Konzentration von 50  $\mu$ mol/l Antagonist des P<sub>2X1</sub>-, P<sub>2Y1</sub>-, P<sub>2Y4</sub>- und P<sub>2Y6</sub>-Rezeptorsubtyps, führt zu einer signifikanten Verringerung des vasokonstriktorischen Effekts von UP<sub>4</sub>A. Noch deutlicher ist die Wirkung von Suramin, das neben dem P<sub>2X1</sub>-, P<sub>2Y1</sub>- und P<sub>2Y6</sub>-Rezeptorsubtypen in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l als einziger der verwendeten Inhibitoren ebenfalls den P<sub>2Y2</sub>-Rezeptorsubtypen hemmt.



## 4.Diskussion

Nach Applikation des neuartig in menschlichen Endothelzellen entdeckten UP<sub>4</sub>A zeigte sich ein ausgeprägter Anstieg des MPD in Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere. Der Arbeitsgruppe um J. und V. Jankowski war es gelungen, UP<sub>4</sub>A als erstes gemischtes Dinukleotid mit purin- und pyrimidinhaltigen Anteilen aus dem Zellüberstand mechanisch stimulierter Endothelzellen menschlicher Hautgefäße zu isolieren (Jankowski, Tolle et al. 2005) sowie mittels Spektrophotometrie auszuschließen, dass sich UP<sub>4</sub>A erst während der Aufreinigung und den dabei entstandenen, unphysiologischen pH-Werten spontan gebildet hatte. In Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere löste die Bolusgabe des Endothelzellüberstands zum einen eine Erhöhung des MPD im Sinne einer Vasokonstriktion aus. Zum anderen konnte ausgeschlossen werden, dass der beobachtete vasokonstriktive Effekt lediglich von bereits bekannten, vom Endothel produzierten Vasokonstriktoren wie Endothelin oder den Mononukleotiden ATP und UTP ausgelöst worden war, indem der Endothelin-1-Rezeptor-Antagonist BQ123 und Alkalische Phosphatase, die Mononukleotide denaturiert, appliziert wurden. Beide Substanzen konnten den durch Bolusgabe des Endothelzellüberstands ausgelösten Anstieg des MPD lediglich geringgradig hemmen.

Es musste also ein weiterer, potenter vasoaktiver Faktor von den stimulierten Endothelzellen produziert worden sein. In weiteren Versuchen bewirkten die nichtselektiven, aber spezifischen P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten PPADS und Suramin eine weitere signifikante Abnahme des beschriebenen vasokonstriktiven Effekts, woraus zu schließen war, dass der bis dato unbekannte endotheliale Faktor seine Wirkung über das purinerge System vermittelte. Bei diesem Faktor handelt es sich um UP<sub>4</sub>A, welches im menschlichen Plasma in einer Konzentration von 55 nmol/l nachgewiesen werden konnte (Jankowski, Tolle et al. 2005). Diese Konzentration reichte aus um experimentell eine Erhöhung des MPD hervorzurufen. Die in-vitro Versuche berücksichtigten natürlich nicht alle Faktoren, die in vivo wirksam werden; so könnten beispielsweise durch Stimulierung des Endothels zeitweise durchaus viel höhere lokale Konzentrationen von UP<sub>4</sub>A auftreten.

Da UP<sub>4</sub>A sowohl purin- als auch pyrimidinhaltige Anteile aufweist und pyrimidinhaltige Nukleotide wie UTP als P<sub>2Y</sub>-Agonisten (Abbraccio, Burnstock et al. 2006) und reine Purin-Dinukleotide wie z.B. AP<sub>4</sub>A als P<sub>2X</sub>-Agonisten wirken (van der Giet, Khattab et al. 1997), wurde die Hypothese aufgestellt, dass UP<sub>4</sub>A sowohl über P<sub>2X</sub>- als auch über P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren Vasokonstriktion vermittelt.

Als nächster Schritt wurde daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht, durch welchen auf der glatten Gefäßmuskulatur exprimierten  $P_{2X}$ -Rezeptorsubtyp die Wirkung von  $UP_4A$  vermittelt wird. Eine Dauerperfusion mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP, einer Substanz, welche die auf glatten Muskelzellen dominierenden  $P_{2X1}$ - und  $P_{2X3}$ -Rezeptoren desensibilisiert, verringerte die Wirkung von  $UP_4A$  um ca. 75%. Durch die gleichzeitige Blockade dieses Anteils der  $UP_4A$  induzierten Vasokonstriktion durch die nichtselektiven  $P_{2X}$ -Rezeptorblocker Suramin und PPADS sowie durch NFO23 und den selektiven  $P_{2X1}$ -/ $P_{2X3}$ -Rezeptorblocker TNP-ATP auf vergleichbare Werte, ist anzunehmen, dass die Aktivierung von  $P_{2X}$ -Rezeptoren diesen Anteil der  $UP_4A$  induzierten Vasoaktivität vermittelt.

Auf glatten Gefäßmuskelzellen werden die  $P_{2X}$ -Rezeptorsubtypen  $P_{2X1}$ ,  $P_{2X2}$ ,  $P_{2X3}$  und  $P_{2X4}$  exprimiert. Es ist bekannt, dass der  $P_{2X2}$ - und  $P_{2X4}$ -Rezeptor auf der glatten Gefäßmuskelzelle keinen signifikanten Einfluss auf deren Kontraktilität haben (Chan, Unwin et al. 1998; Nori, Fumagalli et al. 1998).

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Promotionsarbeit stehen keine selektiven Antagonisten oder Agonisten zur Verfügung um zwischen dem  $P_{2X1}$ - und  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtypen weiter zu differenzieren. Um dennoch zu ermitteln, ob es sich bei dem gesuchten Rezeptorsubtyp um den  $P_{2X1}$ - oder den  $P_{2X3}$ -Rezeptor handelt, wurden die  $P_{2X1}$ / $P_{2X3}$ -Rezeptorantagonisten TNP-ATP und NF023 in einer Konzentration eingesetzt, in welcher vor allem der  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtyp inhibiert wird. Für eine signifikante Hemmung des  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtyps sind dagegen weitaus höhere Konzentrationen notwendig. Die in sechs unabhängigen Versuchen ermittelte repräsentative DWK von  $UP_4A$  unter Dauerperfusion mit TNP-ATP bzw. NF023 zeigt im Vergleich zu einer zuvor erstellten repräsentativen DWK ohne Perfusionszusatz eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verringerung des Wirkungsmaximums von  $UP_4A$ . Dieser Effekt entsprach dem unter  $\alpha$ , $\beta$ -meATP gesehenen Wirkungsabfall, so dass davon auszugehen ist, dass der  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtyp keine wesentliche Rolle im Wirkmechanismus von  $UP_4A$  spielt. Es wurde also gezeigt, dass  $UP_4A$  (vermutlich über den adenosinhaltigen Anteil) einen großen Anteil seiner vasokonstriktiven Wirkung über den  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtypen vermittelt.

Als Nächstes wurde untersucht, ob einer der den Gefäßtonus beeinflussenden  $P_{2Y}$ -Rezeptorsubtypen  $P_{2Y1}$ ,  $P_{2Y2}$ ,  $P_{2Y4}$  oder  $P_{2Y6}$  (Godecke, Decking et al. 1996) die nach vollständiger Desensibilisierung der  $P_{2X1}$ - und  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtypen durch den stärksten bekannten  $P_{2X}$ -Rezeptoragonisten  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP verbleibenden, nicht  $P_{2X}$ -vermittelten 25% des  $UP_4A$ -Effekts vermittelt.

Während für den  $P_{2Y2}$ -,  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtypen zum Zeitpunkt der Erstellung dieser

Promotionsarbeit keine spezifischen Antagonisten oder Agonisten bekannt sind, steht für den  $P_{2Y1}$ -Rezeptorsubtyp MRS2179 in einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  als spezifischer Antagonist zur Verfügung. In Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere bewirkte die Dauerperfusion mit MRS2179 keine signifikante Veränderung des Wirkungsmaximums der DWK von  $\text{UP}_4\text{A}$  im Vergleich zur DWK ohne Perfusionszusatz. Es konnte folglich ausgeschlossen werden, dass  $\text{UP}_4\text{A}$  über diesen Rezeptorsubtyp wirkt.

In weiteren Versuchen wurden DWK von  $\text{UP}_4\text{A}$  in Gegenwart von RB2, in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  Antagonist am  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtypen, erstellt, die ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf das Wirkungsmaximum von  $\text{UP}_4\text{A}$  hatten. Somit schieden auch diese beiden Rezeptorsubtyp als möglicher Wirkort von  $\text{UP}_4\text{A}$  aus.

PPADS, in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  Antagonist des  $P_{2X1}$ -,  $P_{2Y1}$ -,  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtyps, führte zu einer signifikanten Verringerung des  $\text{UP}_4\text{A}$ -induzierten Anstiegs des MPD ( $p < 0,05$ ); dieser Effekt wird demnach über den  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtyp vermittelt.

Eine fast vollständige Aufhebung des Effekts von  $\text{UP}_4\text{A}$  auf den MPD bewirkte der unselektive  $P_{2X1}$ -,  $P_{2Y1}$ -,  $P_{2Y2}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorantagonist Suramin.

Es lässt sich schlussfolgern, dass der stärkere Effekt im Vergleich zu PPADS über die Hemmung des  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtypen erfolgte. Der geringe in Gegenwart von Suramin verbleibende Effekt von  $\text{UP}_4\text{A}$  auf den MPD könnte durch einen Abbau des Dinukleosidtetraphosphats zu ATP und UTP verursacht oder dadurch erklärt werden, dass zur vollständigen Antagonisierung der oben genannten purinergen Rezeptoren höhere Konzentrationen notwendig sind, welche jedoch in den Experimenten an der isoliert perfundierten Rattenniere nicht erreicht werden konnten, da sie unspezifische, am ehesten toxische Reaktion auslösten.

Für eine Beteiligung des  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtypen spricht außerdem, dass nach Desensibilisierung des  $P_{2X1/3}$ -Rezeptorsubtypen in Dauerperfusionsexperimenten eine Dauerkontraktion durch  $\text{UP}_4\text{A}$  induziert wurde und der  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp keine Desensibilisierungsphänomene aufweist.

Es wurde also gezeigt, dass  $\text{UP}_4\text{A}$  seine vasokonstriktive Wirkung nicht nur über den  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtypen, sondern (vermutlich über den uridinhaltigen Anteil) auch über den  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtypen vermittelt. Über den  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp könnte  $\text{UP}_4\text{A}$  eventuell auch Langzeiteffekte an den Gefäßen vermitteln, da dieser Rezeptor an Proliferation und Differenzierung von Gefäßzellen mitwirkt (Satoh, Kreutz et al. 1994; Kandabashi, Shimokawa et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $UP_4A$  als EDCF eine entscheidende Rolle in der vaskulären Tonusregulation spielt und über die Rezeptorsubtypen  $P_{2X1}$  und  $P_{2Y2}$  wirkt. Eventuell vermittelt  $UP_4A$  darüber hinaus über den  $P_{2Y2}$ -Rezeptor auch vaskuläre Langzeiteffekte, so dass dieses Dinukleotid für die Pathogenese der Hypertonie von großer Bedeutung sein könnte. In diesem Falle würde die medikamentöse Beeinflussung dieses neuartig entdeckten Dinukleosidpolyphosphats einen bedeutenden neuen Therapieansatz für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenniere die Wirkung des neuartig entdeckten, im Endothel gebildeten purin- und pyrimidinhaltigen Dinukleotids  $UP_4A$  auf das Gefäßsystem untersucht und die Rezeptoren, welche diese Effekte vermitteln, identifiziert werden. In den durchgeführten Versuchen löste  $UP_4A$  als potenter Vasokonstriktor einen signifikanten Anstieg des MPD aus und zwar bereits in der in vivo nachweisbaren Konzentration von etwa 55 nmol/l. Daraufhin wurde untersucht, durch welchen auf der glatten Gefäßmuskulatur exprimierten  $P_{2X}$ -Rezeptorsubtypen die Wirkung von  $UP_4A$  vermittelt wird. Eine Dauerperfusion mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -meATP, dem stärksten bekannten  $P_{2X}$ -Rezeptoragonisten, führte zu einer kompletten Desensibilisierung der auf glatten Muskelzellen dominierenden  $P_{2X1}$ - und  $P_{2X3}$ -Rezeptoren und verringerte die Wirkung von  $UP_4A$  um 75%. Die übrigen auf der glatten Gefäßmuskulatur exprimierten  $P_{2X}$ -Rezeptorsubtypen ( $P_{2X2}$  und  $P_{2X4}$ ) haben bekanntermaßen keinen signifikanten Einfluss auf deren Kontraktilität. Um nun zwischen dem  $P_{2X1}$ - und dem  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtypen zu differenzieren, wurden in Ermangelung selektiver Antagonisten oder Agonisten die  $P_{2X1}/P_{2X3}$ -Rezeptorantagonisten TNP-ATP und NFO23 in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l eingesetzt. In dieser Konzentration wird vor allem der  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtyp inhibiert, während für eine signifikante Hemmung des  $P_{2X3}$ -Rezeptorsubtypen weitaus höhere Konzentrationen notwendig sind. Der resultierende starke Abfall des MPD, spricht dafür, dass  $UP_4A$  über den  $P_{2X1}$ -Rezeptorsubtyp wirkt. Da alle bekannten uridinhaltigen Nukleotide eine Affinität zu  $P_{2Y}$ -Rezeptorsubtypen aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass ein Großteil der verbleibenden 25% des  $UP_4A$ -Effekts, der nicht über  $P_{2X}$ -Rezeptoren vermittelt wird, über einen der den Gefäßtonus beeinflussenden  $P_{2Y}$ -Rezeptorsubtypen ( $P_{2Y1}$ ,  $P_{2Y2}$ ,  $P_{2Y4}$  oder  $P_{2Y6}$ ) erzielt wird. Mit Hilfe des spezifischen  $P_{2Y1}$ -Rezeptorantagonisten MRS2179 in einer Konzentration von 1  $\mu$ mol/l und RB2, in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l Antagonist am  $P_{2Y4}$ - und  $P_{2Y6}$ -Rezeptorsubtypen, konnte die Wirkung von  $UP_4A$  über eine dieser drei  $P_{2Y}$ -Rezeptorsubtypen ausgeschlossen werden, da beide Antagonisten die Wirkung von  $UP_4A$  nicht beeinflussen. Der  $P_{2X1}$ -,  $P_{2Y1}$ -,  $P_{2Y2}$ - und  $P_{2Y6}$ - Rezeptorantagonist Suramin inhibierte die Wirkung von  $UP_4A$  dagegen fast vollständig. Es ist folglich davon auszugehen, dass  $UP_4A$  einen Teil seiner Wirkung über den  $P_{2Y2}$ -Rezeptorsubtyp vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte also gezeigt werden, dass  $UP_4A$  als EDCF eine entscheidende Rolle in der vaskulären Tonusregulation spielt und über die purinergen Rezeptorsubtypen  $P_{2X1}$  und  $P_{2Y2}$  wirkt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1994). "Purinceptors: are there families of P2X and P2Y purinceptors?" Pharmacol Ther **64**(3): 445-75.
- Abbracchio, M. P. and G. Burnstock (1998). "Purinergic signalling: pathophysiological roles." Jpn J Pharmacol **78**(2): 113-45.
- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, et al. (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy." Pharmacol Rev **58**(3): 281-341.
- Agapitov, A. V. and W. G. Haynes (2002). "Role of endothelin in cardiovascular disease." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **3**(1): 1-15.
- Auch-Schwelk, W., Z. S. Katusic, et al. (1989). "Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat." Hypertension **13**(6 Pt 2): 859-64.
- Auch-Schwelk, W., Z. S. Katusic, et al. (1990). "Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions." Hypertension **15**(6 Pt 2): 699-703.
- Barnard, E. A. and J. Simon (2001). "An elusive receptor is finally caught: P2Y(12), an important drug target in platelets." Trends Pharmacol Sci **22**(8): 388-91.
- Bean, B. P. (1992). "Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels." Trends Pharmacol Sci **13**(3): 87-90.
- Bean, B. P. and D. D. Friel (1990). "ATP-activated channels in excitable cells." Ion Channels **2**: 169-203.
- Bergstrom, S. and B. Samuelsson (1962). "Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. 11." J Biol Chem **237**: 3005-6.
- Bo, X., Y. Zhang, et al. (1995). "A P2X purinceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile." FEBS Lett **375**(1-2): 129-33.
- Bogdanov, Y. D., S. S. Wildman, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor." Br J Pharmacol **124**(3): 428-30.
- Burnstock, G. (1976). "Purinergic receptors." J Theor Biol **62**(2): 491-503.
- Burnstock, G. (2002). "Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 364-73.
- Burnstock, G. (2006). "Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling." Pharmacol Rev **58**(1): 58-86.
- Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinceptor?" Gen Pharmacol **16**(5): 433-40.
- Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." Int Rev Cytol **240**: 31-304.
- Chan, C. M., R. J. Unwin, et al. (1998). "Localization of P2X1 purinceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys." Am J Physiol **274**(4 Pt 2): F799-804.

- 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.
- Chhatriwala, M., R. G. Ravi, et al. (2004). "Induction of novel agonist selectivity for the ADP-activated P2Y1 receptor versus the ADP-activated P2Y12 and P2Y13 receptors by conformational constraint of an ADP analog." J Pharmacol Exp Ther **311**(3): 1038-43.
- Communi, D., S. Motte, et al. (1996). "Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor." Eur J Pharmacol **317**(2-3): 383-9.
- Communi, D., M. Parmentier, et al. (1996). "Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **222**(2): 303-8.
- Dalziel, H. H. and D. P. Westfall (1994). "Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization." Pharmacol Rev **46**(4): 449-66.
- Davenport, A. P. (2002). "International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature." Pharmacol Rev **54**(2): 219-26.
- De Mey, J. G. and P. M. Vanhoutte (1982). "Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium." Circ Res **51**(4): 439-47.
- 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): 213-37.
- Dubyak, G. R. (1991). "Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP." Am J Respir Cell Mol Biol **4**(4): 295-300.
- Dubyak, G. R. and C. el-Moatassim (1993). "Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides." Am J Physiol **265**(3 Pt 1): C577-606.
- Egan, T. M., D. S. Samways, et al. (2006). "Biophysics of P2X receptors." Pflugers Arch **452**(5): 501-12.
- Evans, R. J., C. Lewis, et al. (1995). "Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors)." Mol Pharmacol **48**(2): 178-83.
- Flodgaard, H. and H. Klenow (1982). "Abundant amounts of diadenosine 5',5''-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets." Biochem J **208**(3): 737-42.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Gabriels, G., K. H. Rahn, et al. (2002). "Mesenteric and renal vascular effects of diadenosine polyphosphates (APnA)." Cardiovasc Res **56**(1): 22-32.
- Ge, T., H. Hughes, et al. (1995). "Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta." Circ Res **76**(6): 1003-10.

- Godecke, S., U. K. Decking, et al. (1996). "Cloning of the rat P2u receptor and its potential role in coronary vasodilation." Am J Physiol **270**(2 Pt 1): C570-7.
- Gong, M. C., K. Iizuka, et al. (1996). "Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1340-5.
- Harden, T. K., J. L. Boyer, et al. (1995). "P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 541-79.
- Hirata, K., A. Kikuchi, et al. (1992). "Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction." J Biol Chem **267**(13): 8719-22.
- Hofbauer, K. G., H. Zschiedrich, et al. (1973). "Conversion of angiotensin I into angiotensin II in the isolated perfused rat kidney." Clin Sci **44**(5): 447-56.
- Hynynen, M. M. and R. A. Khalil (2006). "The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries." Recent Pat Cardiovasc Drug Discov **1**(1): 95-108.
- Ito, T., T. Kato, et al. (1991). "Prostaglandin H<sub>2</sub> as an endothelium-derived contracting factor and its interaction with endothelium-derived nitric oxide." J Hypertens **9**(8): 729-36.
- Jankowski, J., J. Hagemann, et al. (2001). "Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates." Kidney Int **59**(3): 1134-41.
- Jankowski, J., M. Tepel, et al. (1999). "Identification and characterization of P(1), P(7)-Di(adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets." J Biol Chem **274**(34): 23926-31.
- Jankowski, V., M. Tolle, et al. (2005). "Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor." Nat Med **11**(2): 223-7.
- Kandabashi, T., H. Shimokawa, et al. (2002). "Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(2): 243-8.
- Kanno, K., Y. Hirata, et al. (1994). "Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2318-24.
- Karupiah, G., Q. W. Xie, et al. (1993). "Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase." Science **261**(5127): 1445-8.
- Katusic, Z. S., J. T. Shepherd, et al. (1988). "Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries." Stroke **19**(4): 476-9.
- Kennedy, C. and G. Burnstock (1985). "Evidence for two types of P2-purinoreceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein." Eur J Pharmacol **111**(1): 49-56.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Kisselev, L. L., J. Justesen, et al. (1998). "Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules?" FEBS Lett **427**(2): 157-63.



- Kitazawa, T., M. Masuo, et al. (1991). "G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9307-10.
- Lazarowski, E. R., L. G. Rochelle, et al. (2001). "Cloning and functional characterization of two murine uridine nucleotide receptors reveal a potential target for correcting ion transport deficiency in cystic fibrosis gallbladder." J Pharmacol Exp Ther **297**(1): 43-9.
- Le, K. T., E. Boue-Grabot, et al. (1999). "Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X1 and P2X5 subunits." J Biol Chem **274**(22): 15415-9.
- Liu, S. F., D. G. McCormack, et al. (1989). "Evidence for two P2-purinoceptor subtypes in human small pulmonary arteries." Br J Pharmacol **98**(3): 1014-20.
- Londos, C., D. M. Cooper, et al. (1980). "Subclasses of external adenosine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2551-4.
- Luscher, T. F. and P. M. Vanhoutte (1986). "Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat." Hypertension **8**(4): 344-8.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." Cell **78**(6): 927-30.
- Mathieson, J. J. and G. Burnstock (1985). "Purine-mediated relaxation and constriction of isolated rabbit mesenteric artery are not endothelium-dependent." Eur J Pharmacol **118**(3): 221-9.
- Matsui, T., M. Amano, et al. (1996). "Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho." Embo J **15**(9): 2208-16.
- Miller, V. M. and P. M. Vanhoutte (1985). "Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase." Am J Physiol **248**(4 Pt 2): H432-7.
- Miras-Portugal, M. T., J. Gualix, et al. (1998). "The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates." FEBS Lett **430**(1-2): 78-82.
- Nathan, C. and Q. W. Xie (1994). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell **78**(6): 915-8.
- Nicholas, R. A., W. C. Watt, et al. (1996). "Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor." Mol Pharmacol **50**(2): 224-9.
- Noel, H. (1994). "Essential hypertension: pathophysiology." J Am Acad Nurse Pract **6**(7): 322-33; quiz 334-6.
- Nori, S., L. Fumagalli, et al. (1998). "Coexpression of mRNAs for P2X1, P2X2 and P2X4 receptors in rat vascular smooth muscle: an in situ hybridization and RT-PCR study." J Vasc Res **35**(3): 179-85.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev **82**(4): 1013-67.
- North, R. A. and E. A. Barnard (1997). "Nucleotide receptors." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 346-57.

- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
- Pendergast, W., B. R. Yerxa, et al. (2001). "Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates." Bioorg Med Chem Lett **11**(2): 157-60.
- Powell, D. A., W. L. Milligan, et al. (1980). "Peripheral autonomic changes accompanying learning and reaction time performance in older people." J Gerontol **35**(1): 57-65.
- Ralevic, V. and G. Burnstock (1998). "Receptors for purines and pyrimidines." Pharmacol Rev **50**(3): 413-92.
- Ralevic, V., C. H. Hoyle, et al. (1995). "Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries." J Physiol **483** ( Pt 3): 703-13.
- Rodriguez-Martinez, M. A., E. C. Garcia-Cohen, et al. (1998). "Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved." Br J Pharmacol **125**(6): 1329-35.
- Satoh, S., R. Kreutz, et al. (1994). "Augmented agonist-induced Ca(2+)-sensitization of coronary artery contraction in genetically hypertensive rats. Evidence for altered signal transduction in the coronary smooth muscle cells." J Clin Invest **94**(4): 1397-403.
- Sauzeau, V., H. Le Jeune, et al. (2000). "P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(6): H1751-61.
- Schluter, H., E. Offers, et al. (1994). "Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure." Nature **367**(6459): 186-8.
- Schluter, H., M. Tepel, et al. (1996). "Vascular actions of diadenosine phosphates." J Auton Pharmacol **16**(6): 357-62.
- Sedaa, K. O., R. A. Bjur, et al. (1990). "Nerve and drug-induced release of adenine nucleosides and nucleotides from rabbit aorta." J Pharmacol Exp Ther **252**(3): 1060-7.
- Seguela, P., A. Haghghi, et al. (1996). "A novel neuronal P2x ATP receptor ion channel with widespread distribution in the brain." J Neurosci **16**(2): 448-55.
- Simmons, D. L., R. M. Botting, et al. (2004). "Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition." Pharmacol Rev **56**(3): 387-437.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1994). "Signal transduction and regulation in smooth muscle." Nature **372**(6503): 231-6.
- Taddei, S. and P. M. Vanhoutte (1993). "Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta." Hypertension **21**(1): 9-15.
- Taddei, S., A. Viridis, et al. (2001). "Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans." Hypertension **38**(2): 274-9.
- Taddei, S., A. Viridis, et al. (1997). "Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans." Hypertension **29**(3): 736-43.

- Taddei, S., A. Viridis, et al. (1995). "Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension." Circulation **91**(7): 1981-7.
- Valera, S., N. Hussy, et al. (1994). "A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP." Nature **371**(6497): 516-9.
- van Calker, D., M. Muller, et al. (1979). "Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells." J Neurochem **33**(5): 999-1005.
- van der Giet, M., J. Jankowski, et al. (1998). "Mediation of the vasoactive properties of diadenosine tetraphosphate via various purinoceptors." J Hypertens **16**(12 Pt 2): 1939-43.
- van der Giet, M., M. Khattab, et al. (1997). "Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney." Br J Pharmacol **120**(8): 1453-60.
- van der Giet, M., S. Schmidt, et al. (2002). "Effects of dinucleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone." Eur J Pharmacol **448**(2-3): 207-13.
- Vanhoutte, P. M. (1996). "Endothelial dysfunction in hypertension." J Hypertens Suppl **14**(5): S83-93.
- Vanhoutte, P. M. (2000). "Say NO to ET." J Auton Nerv Syst **81**(1-3): 271-7.
- Waldo, G. L. and T. K. Harden (2004). "Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor." Mol Pharmacol **65**(2): 426-36.
- Weick, M., P. S. Cherkas, et al. (2003). "P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice." Neuroscience **120**(4): 969-77.
- Xu, J., M. Chalimoniuk, et al. (2003). "Prostaglandin E2 production in astrocytes: regulation by cytokines, extracellular ATP, and oxidative agents." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **69**(6): 437-48.
- Yang, D., M. Feletou, et al. (2002). "Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats." Br J Pharmacol **136**(1): 104-10.
- Zeiger, A. M., H. Drexler, et al. (1993). "Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension." J Clin Invest **92**(2): 652-62.

## **7. Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. Walter Zidek möchte ich für die Schaffung der Rahmenbedingungen danken, die diese Dissertation möglich gemacht haben.

Herrn Professor Dr. med. Markus van der Giet danke ich für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche und kompetente Betreuung.

Auch Herrn Dr. rer. nat. Joachim Jankowski sei an dieser Stelle Dank für die Bereitstellung der aufgereinigten Substanzen und die gute Zusammenarbeit ausgesprochen.

Ferner danke ich Frau Anissa Habib, Herrn Konrad Henze, Frau Myriam Lallinger, Frau Mi-Hyo Lee, Frau Susanne Schwarz und Herrn Kurban Tanis für die freundschaftliche Unterstützung während der Erarbeitung des experimentellen Teils dieser Arbeit und die stets angenehme Atmosphäre im Labor.

Vor allem danke ich meiner Familie, die mir während der Erstellung dieser Promotionsarbeit eine große Unterstützung war.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dr. med. Markus Tölle für die kompetente Unterstützung während des experimentellen Teils dieser Arbeit und die ständige Ansprechbarkeit bei fachlichen Fragen.

## **8. Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Erklärung**

„Ich, Laura Hannemann, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Untersuchung des Wirkungsmechanismus des neu identifizierten gemischten Dinukleosidpolyphosphats Uridin-Adenosin-Tetraphosphat (UP<sub>4</sub>A) auf das renale Gefäßsystem“ 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.“

Berlin, den 2.1.2011

Laura Hannemann