

1. Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von komplexen Nukleotidpolyphosphaten auf das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen.

Warum ist das purinerge System, d.h. die Purinrezeptoren und die purinergen Agonisten, im Zusammenhang mit der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen von Interesse?

Ein wesentlicher Grund ist, dass unser Kenntnisstand der Physiologie, vor allem aber der Pathophysiologie der Gefäßregulation und der Hypertonie, trotz großer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten noch wesentliche Lücken aufweist.

Auf der einen Seite sind eine ganze Reihe von Regulationssystemen bekannt und gut untersucht. Beispiel hierfür ist unter anderem das sympathoadrenerge System mit den gut untersuchten alpha- und beta-Rezeptoren, die seit langem als therapeutische Angriffspunkte antihypertensiver Therapie genutzt werden, ferner das Renin-Angiotensin-System. Auch dieses System ist eingehend untersucht: Mittlerweile sind weitere Agonisten neben dem Angiotensin II bekannt, wie zum Beispiel das Angiotensin(1-7). Ebenso hat sich das Wissen über die Rezeptoren im Renin-Angiotensin-System in den letzten Jahren erheblich erweitert. Die grundlegende Differenzierung in AT1- und AT2-Rezeptoren hat mittlerweile durch die entsprechenden Agonisten große klinische und pharmakologische Bedeutung erlangt.

In Bezug auf die Rolle des purinergeren Systems in der Kreislaufregulation stehen wir am Anfang einer ähnlichen Entwicklung, wie sie oben für die lange bekannten Systeme skizziert wurde: In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Purinrezeptoren [1,2,3] identifiziert worden.

Weiterhin wurden eine Reihe neuer Agonisten identifiziert [4,5,6,7], deren vaskuläre Wirkungen unser Wissen über die Gefäßregulation wesentlich erweitern.

So konnte gezeigt werden, dass die vasoaktiven Eigenschaften vor allem durch P2-Rezeptoren vermittelt sind. Der Schritt zur Entwicklung therapeutischer Angriffspunkte ist jedoch noch nicht vollzogen.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Projekt hat das Ziel, die neu entdeckten komplexen Purinnukleotide bezüglich der wachstumssteigernden Eigenschaften an glatten Gefäßmuskelzellen zu charakterisieren.

1.2 Das purinerge System

Über die Rolle des purinergeren Systems sind in den letzten Jahren unter anderem durch die Klonierung einer großen Zahl von Purinrezeptorsubtypen wesentliche neue Erkenntnisse gewonnen worden.

Zu dem purinergeren System gehört die sehr differenzierte Gruppe von Rezeptoren, die auf den unterschiedlichsten Zellen im Säugetierorganismus exprimiert sind, und auf der anderen Seite gehören zu diesem System diejenigen Substanzen, die die purinergeren Rezeptoren aktivieren [1].

Es gibt zwei große Familien von Purinrezeptoren: Diejenigen, die durch Adenosin aktiviert werden, zählen zu den P1-Rezeptoren und diejenigen, die durch ATP, ADP, UTP oder auch UDP aktiviert werden, zählen zu den P2-Rezeptoren.

Die P1 Rezeptoren wurden aufgrund molekularer, biochemischer und pharmakologischer Bedeutung noch in weitere vier Subklassen unterteilt: A1, A2A, A2B und A3. Diese Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Die P2 Rezeptoren werden aufgrund ihrer molekularen Struktur und des Signaltransduktionsweges nochmals in P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt. Die P2X-Rezeptoren, von denen bisher acht Subtypen und zahlreiche weitere Varianten kloniert wurden, sind Ionenkanäle, die durch bestimmte purinerge Botenstoffe geöffnet werden [2,8]. Die P2Y-Rezeptoren, von denen bisher sechs Rezeptor-Subtypen (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 und P2Y12) in Säugetierzellen kloniert wurden, wirken hingegen nicht direkt über einen Einstrom von Ionen, sondern über eine nachgeschaltete Signalkaskade, die unter anderem die G-Proteine und das Inositoltrisphosphat beinhaltet [9,10].

Die grundsätzlich verschiedenen Mechanismen haben dazu geführt, dass die P2Y-Rezeptoren auch als „metabotrope“, die P2X-Rezeptoren hingegen als „ionotrope“ Rezeptoren bezeichnet werden. Die Purinrezeptorsubtypen sind aufgrund der zum Teil sehr unterschiedlichen Molekülstruktur, abermals vor allem aufgrund der sehr unterschiedlichen Pharmakologie charakterisiert.

Ein besonderer Aspekt bei der Betrachtung der Purinrezeptoren besteht in der Tatsache, dass unterschiedliche Purinrezeptorsubtypen gleichzeitig in ein und derselben Zelle exprimiert werden können. Gleichzeitig exprimierte Purinrezeptoren können die Eigenschaft zur Bildung von Rezeptorheteromeren haben [2,10,11,12]. Diese Purinrezeptorheteromere haben unter Umständen pharmakologische Eigenschaften, die die Purinrezeptorhomomere allein nicht haben. So zeigt zum Beispiel eine Kombination aus dem P2X1-

und P2X5-Rezeptor eine ganz langsame Desensitisation bei starker Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch ATP, wohingegen der P2X1-Rezeptor allein durch ATP aktiviert, schnell und vollständig desensitisiert, und der P2X5-Rezeptor durch ATP kaum aktivierbar ist [11]. Diese Möglichkeit zur Heteromerenbildung von Purinrezeptorsubtypen ist sowohl für die P2X-Rezeptoren [12], wie auch kürzlich für P2Y-Rezeptoren [10] beschrieben worden. Die Eigenschaft zur Rezeptorheteromerisierung erweitert das pharmakologische Spektrum der Purinrezeptorfamilie um ein Vielfaches.

Zu dem purinergen System gehören neben der sehr differenzierten Gruppe von Rezeptoren auch diejenigen Substanzen, die die purinergen Rezeptoren aktivieren [1]. Es handelt sich unter anderem um die Vertreter der endogenen Nukleotide wie z.B. ATP als bekanntestem Vertreter [13] und auch um die Gruppe der komplexeren Nukleotide wie die Dinukleosidpolyphosphate [5,7,14], die in den letzten Jahren in zahlreichen Säugetiergeweben nachgewiesen werden konnten.

1.3 Identifizierung von neuen Purinnukleotiden beim Menschen

In den letzten Jahren ist es gelungen, im menschlichen Organismus eine Anzahl neuer Purinrezeptoragonisten zu identifizieren. Diese Nukleotide gehören alle zu der Gruppe der so genannten Dinukleosidpolyphosphate.

Bei den Dinukleosidpolyphosphaten (Xp_nX , $X = \text{Adenosin oder Guanosin}$, $n = \text{Anzahl der Phosphatgruppen (P)}$) handelt es sich um Nukleotide wie das Adenosin und/oder Guanosin, die durch eine Kette von zwei bis sieben Phosphaten verbunden sind. (Abbildung 1, Beispiel für Ap_5A).

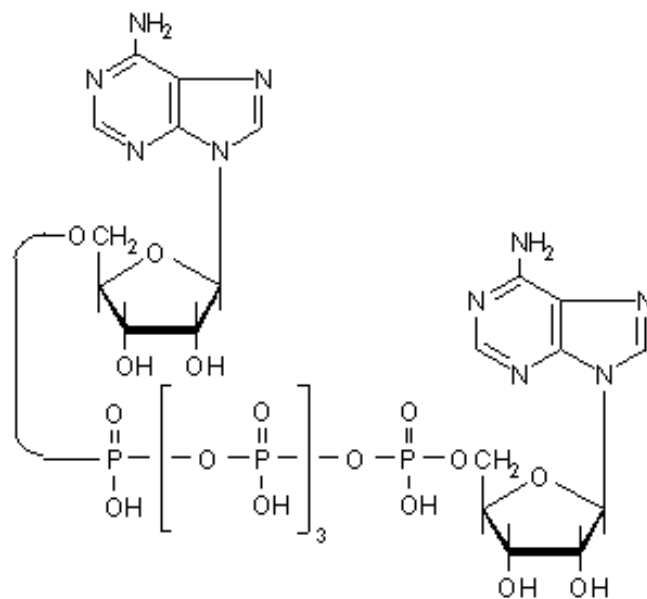


Abbildung 1: Diadenosinpentaphosphat (Ap5A)

Diese Substanzen wurden in menschlichen Geweben, wie dem Herzmuskel (Ap2A & Ap3A) [15,16], Thrombozyten (Xp2-6X [X=Adenosin (A) oder Guanosin (G)] & Ap7A) [4,17,18,19], Erythrozyten (Ap6A) [20] und in der Plazenta (Ap3-6A) [21] nachgewiesen. Es zeigte sich, dass diese Substanzen in unterschiedlichen Gefäßbetten zum Teil vasoaktive und proliferationsinduzierende Wirkung haben. Die Wirkung der Dinukleosidpolyphosphate wird im wesentlichen über P1- und P2-Rezeptoren vermittelt [6]. Vor allem bei den Dinukleosidpolyphosphaten mit 5 und 6 Phosphatgruppen zeigte sich, dass diese im wesentlichen über die Aktivierung von P2-Rezeptoren vermittelt sind.

In dieser Arbeit werden nur Dinukleosidpolyphosphate mit 5 bzw. 6 Phosphatgruppen untersucht, sodass im folgenden vor

allen die Bedeutung der P2-Rezeptoren in der Kreislaufregulation beschrieben werden.

1.4 Die Rolle des purinergen Systems in der Kreislaufregulation

Die purinerge Transmission ist unter anderem bedeutsam für die Nozizeption [22,23], die Immunantwort [24,25,26] und die Plättchenaggregation [27,28,29,30]. Es mehren sich nunmehr auch Hinweise, dass das purinerge System auch in der Kreislaufregulation [3,6,31,32,33] eine wichtige Rolle spielt.

1.5 P2-Rezeptoren

Extrazellulär vorkommende Nukleotide, wie unter anderem ATP, regulieren bekanntlich den Gefäßtonus und die kardiale Funktion [34]. Die beobachteten Effekte werden im wesentlichen über P2-Rezeptoren vermittelt [1]. Dinukleosidpolyphosphate regulieren ebenfalls den Gefäßtonus über die Aktivierung von P2-Rezeptoren [4,18,19,20,35,36,37,38,39,40].

Lokal ausgeschüttete Nukleotide wirken auf das Endothel, indem sie unter anderem eine NO- und Prostaglandinfreisetzung stimulieren. Ein Teil der vaskulären Wirkungen von Nukleotiden ist also auch indirekt vermittelt [41,42,43,44,45,46].

1.6 P2-Rezeptoren im Gefäßendothel

Das pharmakologische Profil der Aktivierung der Endothelzellen durch verschiedene Purinnukleotide, wie UTP und ATP, ließ zunächst auf die Existenz von zwei unterschiedlichen endothelialen Purinrezeptoren schließen.

Ein Purinrezeptorsubtyp wurde durch Adenin-haltige Nukleotide und der andere durch Uridin-haltige Nukleotide aktiviert.

Pirroton und Mitarbeiter [47] zeigten, dass sowohl P2Y1- wie auch P2Y2-Rezeptoren in den Endothelzellen der Rinderaorta koexprimiert sind. Dies wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [48,49]. In den Endothelzellen der Hirngefäße [50,51,52] und in Mesenterialarterien [53,54] der Ratte sind ebenfalls P2Y-Rezeptoren identifiziert worden, wie auch in den Glomeruli der Rattenniere [55]. Bisher ist jedoch nicht vollständig klar, ob noch andere Purinrezeptorsubtypen in den Endothelzellsystemen exprimiert werden.

Zweifellos vermittelt der endotheliale P2Y1-Rezeptorsubtyp eine Vasodilatation [48,50,54,56,57], jedoch wird auch dem P2Y2- und P2Y4-Rezeptorsubtyp eine Rolle bei der Vasodilatation zugeschrieben [54]. ATP aktiviert vor allem den P2Y1/P2Y2-Rezeptor und mit geringer Affinität den P2Y4-Rezeptor, während UTP sowohl den P2Y2- wie auch den P2Y4-Rezeptor aktivieren kann. ADP stimuliert vor allem den P2Y1- und P2Y6-Rezeptor, während UDP im wesentlichen den P2Y6-Rezeptor stimuliert [9]. Über die Verteilung von P2X-Rezeptoren im Endothel sind kaum Untersuchungen angestellt worden. Bisher konnte man in Endothelzellen von arteriellen Rattenhirngefäßen nur den P2X2-Rezeptor nachweisen [58].

1.7 P2-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen

a) Niere

ATP verursacht an glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion. In der Niere konnten sowohl P2X wie auch P2Y-Rezeptoren identifiziert werden, die an einer Vasokonstriktion beteiligt sind [59,60]. Der P2X1 und der P2X4-Rezeptorsubtyp wurden in den afferenten Arteriolen

nachgewiesen [61,62,63,64]. Eine Expression des P2X3- und P2X4-Rezeptorsubtyps ist fraglich [64].

Es gibt Hinweise, dass auch der P2Y2-Rezeptor in der glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Gefäße vorkommt [65]. Weitere Purinrezeptoren wurden in den glatten Gefäßmuskelzellen der arteriellen Gefäße der Niere bisher nicht nachgewiesen.

b) Sonstige Gewebe

In glatten Gefäßmuskelzellen anderer Gefäße, wie der thorakalen Aorta und den Mesenterialgefäßen, zeigt sich eine ganz andere Purinrezeptorverteilung.

In den Mesenterialarterien der Ratte sind sowohl der P2X1-Rezeptorsubtyp wie auch der P2Y2-Rezeptor an der Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt [66,67,68]. Es findet sich eine Expression des P2X4- und P2X5-Rezeptorsubtyps in Mesenterialarterien [68], jedoch ist eine Aktivierung und konsekutive Vasokonstriktion bisher nicht beschrieben worden. In den glatten Gefäßmuskelzellen der thorakalen Aorta werden neben dem P2X1-, P2X2, und P2X4-Rezeptorsubtyp auch der P2Y1-, P2Y2-, P2Y4- und P2Y6-Rezeptorsubtyp exprimiert [69,70,71,72,73]. Diese Rezeptoren sollen alle an einer möglichen Vasokonstriktion beteiligt sein. In glatten Gefäßmuskelzellen der Koronargefäße zeigt sich die Expression des P2X1- und P2Y2-Rezeptorsubtyps [74]. In zerebralen Gefäßen sind dieselben Rezeptorsubtypen exprimiert wie in der thorakalen Aorta (P1X1, P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6) [54,75]. Es zeigt sich, dass der P2X1-Rezeptor in den glatten Gefäßmuskelzellen aller Gefäße zu finden ist, wohingegen die P2Y-Rezeptorsubtypexpression doch ein sehr heterogenes Muster aufzeigt.

Speziell P2Y-Rezeptoren vermitteln ferner auch eine Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen und mesangialen Zellen [44,45,46]. P2Y1, P2Y2-, P2Y4- und P2Y6-Rezeptorsubtypen sind insbesondere an einer Proliferation beteiligt [70,76,77,78].

Bei der Signaltransduktion der P2Y-vermittelten Zellproliferation spielt die Aktivierung der Rho-Kinase eine zentrale Rolle [69].

1.8 Bedeutung von Purinrezeptoren auf die Gefäßhypertrophie und damit beim Bluthochdruck

Trotz großer Fortschritte in der Klärung der Ursachen für die essentielle Hypertonie sind nicht alle Aspekte der Ätiopathogenese der essentiellen Hypertonie durch bekannte Botenstoffe (Transmitter / Hormone) zu erklären. Bei der essentiellen Hypertonie treten zwei prinzipielle Veränderungen am Gefäßsystem auf: eine vermehrte Wandspannung und eine Gefäßhypertrophie.

Beide Vorgänge können durch purinerge Mechanismen verursacht werden. Die Vasokonstriktion kann, wie oben ausführlich gezeigt, vor allem über P2X1,P2X2,P2X4,P2Y2,P2Y4- und P2Y6-Rezeptorsubtypen und eine Vasodilatation über den P2Y1-Rezeptor vermittelt werden.

Eine Proliferation wird durch P2Y1-,P2Y2-,P2Y4- und P2Y6-Rezeptoren vermittelt. Obwohl zahlreiche Informationen über die Auswirkung der Aktivierung der unterschiedlichen Purinrezeptoren am Gefäß durch die entsprechenden Agonisten vorliegen, gibt es nur wenige Informationen darüber, welche konkrete Bedeutung die Existenz von Purinrezeptoren und den entsprechenden aktivierenden Nukleotiden in den Gefäßen in Bezug auf die Gefäßhypertrophie haben.

1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren konnten zahlreiche neue, bisher nicht bekannte vasoaktive Nukleotide aus menschlichen Geweben und Zellen gewonnen werden. Es gibt Hinweise, dass die Dinukleosidpolyphosphate mit 5 und 6 Phosphatgruppen Wachstumsfaktoren darstellen.

Bisher ist jedoch nicht bekannt, welcher Purinrezeptor die Proliferation induziert und wie die dazugehörige Signaltransduktion funktioniert. In der vorliegenden Arbeit soll auf folgende Fragen eine Antwort gegeben werden:

- Wie stark proliferativ wirken die Dinukleosidpolyphosphate mit 5 und 6 Phosphaten?
- Welcher P2Y-Rezeptor ist für die Proliferation verantwortlich?
- Wie funktioniert die Signaltransduktion der dinukleotid-induzierten Zellproliferation?