

3. Ergebnisse

3.1 Die proliferationsinduzierende Wirkung von Xp5X und Xp6X an glatten Gefäßmuskelzellen

Eine Applikation von XpnX (X=A/G, n=5/6) auf glatte Gefäßmuskelzellen induzierte eine dosiswirkungsabhängige Steigerung des Einbau von [³H]-Thymidin in die DNA als Ausdruck der Gefäßmuskelzellproliferation (Abbildung 3).

Gp5G induziert signifikantes Wachstum ($p < 0.05$) in glatten Gefäßmuskelzellen ab einer Konzentration von 10^{-8} M, Ap5G, Ap5A und Xp6X (X=A/G) ab 10^{-6} M und ATP oder GTP ab Konzentrationen von 10^{-5} M.

Gp5G ist mit Abstand die stärkste wachstumsstimulierende Substanz im Vergleich zu den anderen getesteten Dinukleosidpolyphosphaten. Die Reihenfolge der Wachstumpotenzierung ist:

Gp5G > Ap5G ≥ Gp6G » Ap6A » Ap5A » GTP > AP6G » ATP.

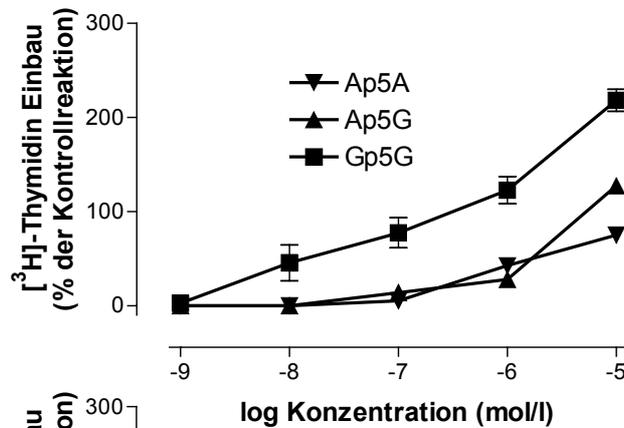
In Tabelle 2 wird dargestellt, wie stark die proliferationssteigernde Wirkung der Dinukleosidpolyphosphate bei einer Gabe von 10^{-5} M der jeweiligen Substanz ist.

Substanz	Wachstum in % der Kontrolle
Ap5A	75.0±7.0
Ap5G	127.3±12.5
Gp5G	218±20.0
Ap6A	84.6±8.9
Ap6G	63.4±8.5
Gp6G	109.1±36.4
ATP	40.1±6.5
GTP	63.6±5.6
PDGF-BB ¹ (50 ng/ml)	98.5±8.4

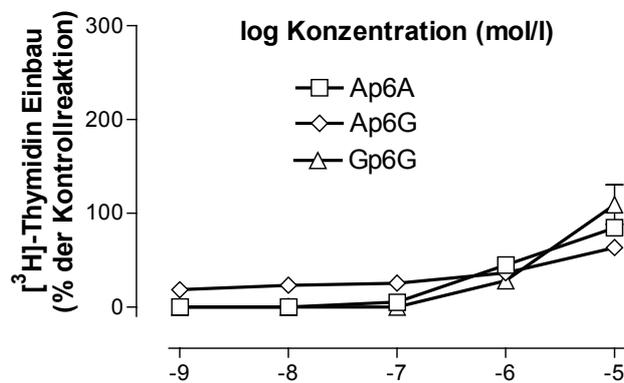
¹Platelet-derived growth factor-BB (Fa. Sigma, Geisenhofen, Deutschland)

Tabelle 2: Maximales Wachstum induziert bei Applikation von Dinukleosidpolyphosphaten (10^{-5} M) auf glatte Gefäßmuskelzellen (n=10)

(A)



(B)



(C)

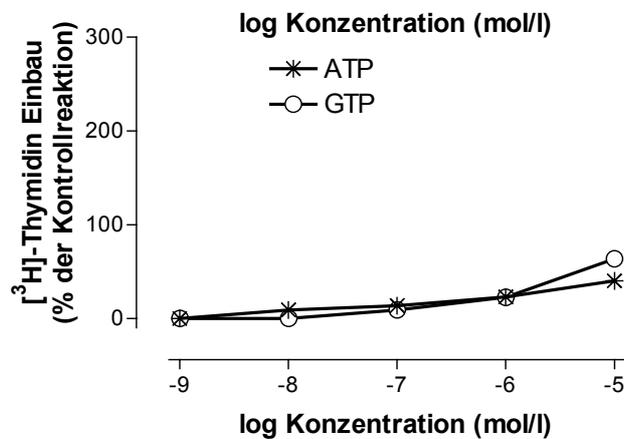


Abbildung 3: [^3H]-Thymidineinbau (in % der Kontrollreaktion, d.h. ohne Stimulation) in glatte Gefäßmuskelzellen induziert durch (A) Ap5A, Ap5G, Gp5G, (B) Ap6A, Ap6G, Gp6G, (C) GTP und ATP. Jeder Punkt gibt den Mittelwert aus mindestens zehn Messungen wieder und die vertikalen Linien geben die Standardabweichung wieder. Gp5G induziert signifikantes Wachstum ($p < 0.05$) in glatten Gefäßmuskelzellen ab einer

Konzentration von 10^{-8} M, Ap5G, Ap5A und Xp6X (X=A/G) ab 10^{-6} M und ATP oder GTP ab Konzentrationen von 10^{-5} M.

3.2 Proliferationssteigerung der Wachstumsantwort von PDGF

In diesem Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob die bekannte wachstumsstimulierende Wirkung von PDGF durch Gp5G und Gp6G gesteigert werden kann.

Es ist lange bekannt, dass Nukleotide eine Steigerung der Wirkung anderer Wachstumsfaktoren deutlich induzieren [81]. Eine Stimulation des Wachstums mit PDGF führt bei gleichzeitiger Applikation von Gp5G und Gp6G in geringen Konzentrationen bereits zu einer signifikanten stärkeren Proliferation (Abbildung 4)

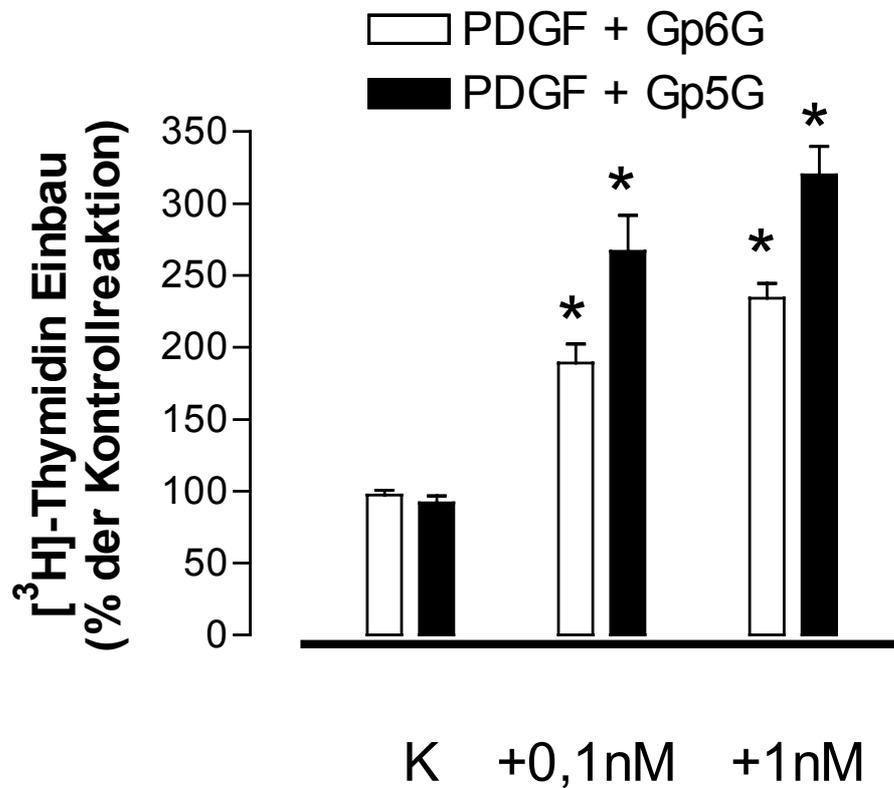


Abbildung 4

[³H]-Thymidineinbau (in % der Kontrollreaktion, d.h. nur Stimulation mit PDGF 50 ng/ml (K)) in glatte Gefäßmuskelzellen induziert bei Zusatzgabe von Gp₅G (0,1 und 1nM) oder Gp₆G (0,1 und 1nM) Jeder Balken gibt den Mittelwert aus mindestens acht Messungen wieder und die vertikalen Linien geben die Standardabweichung wieder.*P<0.05 vs. Kontrolle.

3.3 Einfluss von PPADS, MRS2179- und Y-27632 auf die Gp5G und Gp6G induzierte Proliferation

Es ist wichtig zu wissen, durch welchen Purinrezeptor die Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen induziert wird.

In diesem Versuchsansatz wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit maximal wachstumsinduzierenden Mengen von Gp5G und Gp6G stimuliert.

Als Kontrolle wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit PDGF stimuliert. Einige Versuche wurden in Anwesenheit des P2Y1-Rezeptorantagonisten MRS2179 und des P2Y-1/2/6-Rezeptorantagonisten PPADS durchgeführt. Ein Teil der Versuche wurde in Anwesenheit des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die proliferationsfördernde Wirkung von Gp5G und Gp6G durch PPADS und Y-27632 vollständig gehemmt werden kann (Abbildung 5).

MRS2179 ist nicht in der Lage, die proliferationssteigernde Wirkung von Gp5G und Gp6G zu beeinflussen. Die Rho-Kinase-Inhibition durch Y-27632 führt ebenfalls zu einer vollständigen Hemmung der proliferationssteigernden Wirkung von Gp5G und Gp6G. PDGF lässt sich nicht in seiner Wachstumsaktivierung beeinflussen.

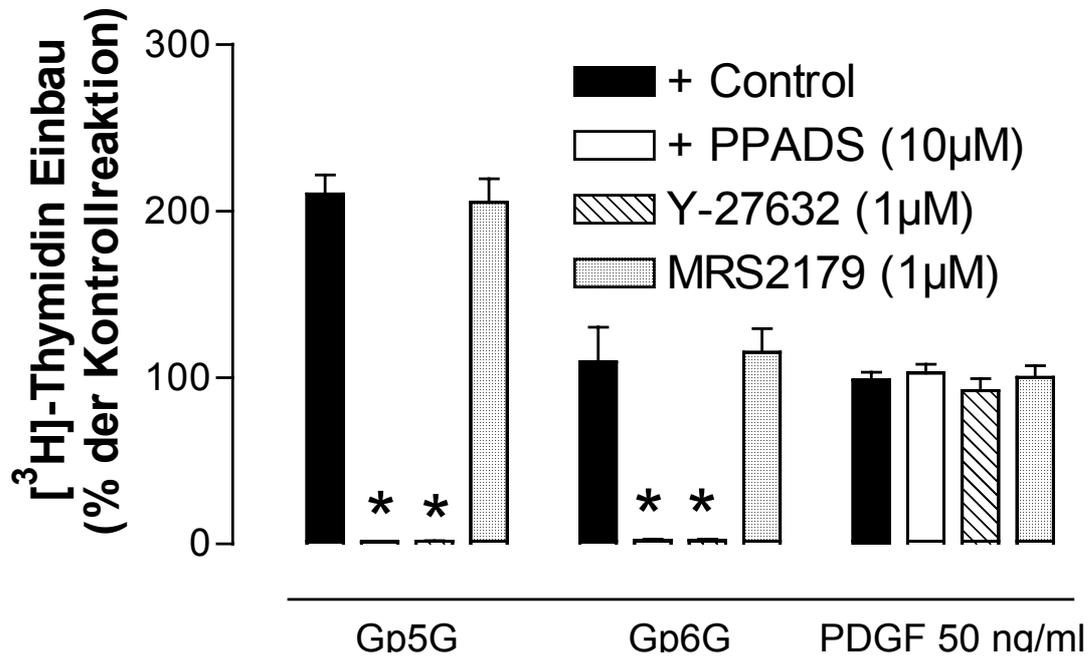


Abbildung 5: [³H]-Thymidineinbau (in % der Kontrollreaktion, d.h. ohne Stimulation) in glatte Gefäßmuskelzellen induziert durch Gp5G (10^{-5} M), Gp6G (10^{-5} M) und PDGF 50 ng/ml in Anwesenheit oder Abwesenheit (Kontrolle) von PPADS (10µM), MRS2179 (1µM) und Y-27632 (1µM). Jeder Balken gibt den Mittelwert aus mindestens acht Messungen wieder und die vertikalen Linien geben die Standardabweichung wieder.

*P<0.05 vs. Kontrolle.

3.4 Expression von P2Y-Rezeptoren in der glatten Gefäßmuskelzelle

Es wurde die Expression des P2Y1, P2Y2, P2Y4 und P2Y6-Rezeptors in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte überprüft. Hier zeigte sich, dass alle vier P2Y-Rezeptorsubtypen gleichmäßig exprimiert sind. Da in den Proliferationsexperimenten in der Regel glatte Gefäßmuskelzellen aus den Passagen 3 bis 9 verwandt wurden,

wurde in allen verwandten Passagen die Expression der P2Y-Rezeptorsubtypen durchgeführt. Hier zeigte sich in allen Expressionsexperimenten das gleiche Muster der P2Y-Rezeptorexpression, d.h. während aller Passagen waren alle P2Y-Rezeptoren gleichzeitig exprimiert.

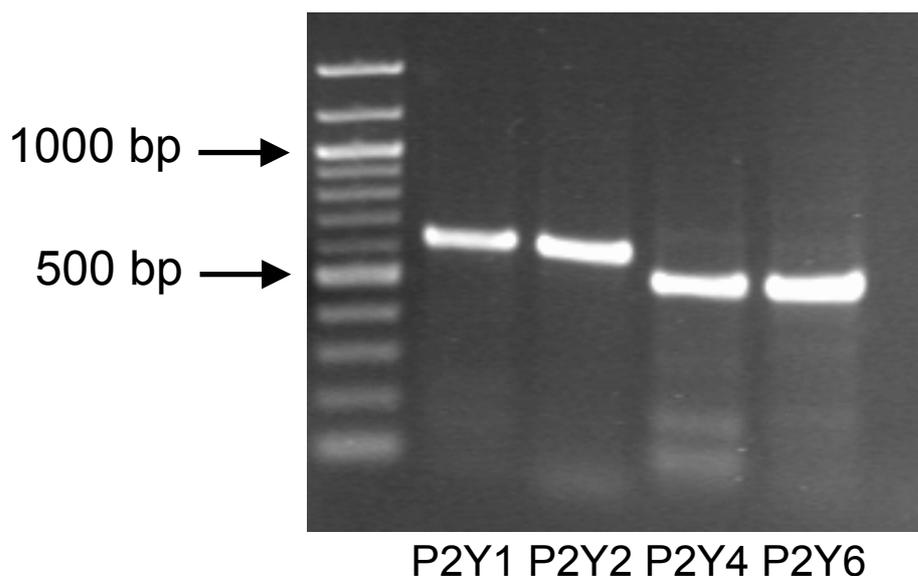


Abbildung 6: In dieser Abbildung wird das Expressionsmuster der P2Y-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen dargestellt. Zellen der Passage 9 als Beispiel.

Darstellung von PCR-Fragmenten mit Hilfe eines 2%-TAE Agarose Gels (Laufzeit 45 min. bei 100 V). Die Fragmente wurden mit Ethidiumbromid komplexiert und mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Anschließend wurde das entstandene Bild mit Hilfe einer Videokamera gefilmt und durch einen Computer digitalisiert. Als Basenpaarmarker wurde ein 100 bp-Marker verwandt (NeoEngland Biolabs, Beverly, MA, USA), jeweils links und rechts aufgetragen.