

Universität Erlangen-Nürnberg  
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE  
der Medizinischen Fakultät

Vorstände: PROF. DR. K. BRAND . PROF. DR. W. KERSTEN



Institut für Biochemie • Fahrstrasse 17 • 8520 Erlanger

Absender: Prof. Dr. A. Ogilvie

Tel.: 09131-854193(85)

Fax.: 09131-854605

Datum: 26. 3. 1995

---

REFERAT

zur Dissertationsarbeit von Herrn **Stefan Ullrich** aus Neustadt a.d. Waldnaab  
**"Zur Bedeutung purinerger Rezeptoren für Aktivierung und Effektorleistung  
von Leukozyten."**

---

Adenin-Nukleotide (ATP, ADP) und Adenin-Dinukleotide ( $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$ ) kommen als extrazelluläre Signalmoleküle vor. Ihre biologischen Funktionen und die molekularen Mechanismen, über die zelluläre Reaktionen ausgelöst werden, sind Schwerpunkte unserer Arbeitsgruppe.

In Thrombozyten und Zellen des Nebennierenmarks werden ATP, ADP und die ungewöhnlichen Dinukleotide ( $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$ ) gespeichert; sie können nach bestimmten Reizen ins Blutplasma sezerniert werden. Möglicherweise geben auch andere Zellen (Endothel-, Nervenzellen) Nukleotide und Dinukleotide ab.

Die frei werdenden Mengen an Dinukleotiden, falls allein eingesetzt, scheinen ausreichend, die Funktion von Thrombozyten bzw. von Gefäßwandmuskelzellen zu beeinflussen.

Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A wirken auf Blutplättchen antagonistisch. Die Versuche mit isolierten Gefäßen deuten an, daß auch auf die Vasomotorik Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A unterschiedlich wirken können.

Neuere Befunde (in Kooperation mit U. Pohl und R. Busse in Freiburg) ergaben, daß die Dinukleotide auch am schlagenden Kaninchenherzen in Konzentrationen ab 0,1  $\mu$ M den Gefäßtonus herabsetzen können.

Welche Rolle diese Dinukleotide in-vivo spielen, ist unklar. Ähnlich ungeklärt ist die In-vivo-Rolle vieler extrazellulärer Mediatoren und Signalmoleküle. Das Problem scheint schwer lösbar, wenn man bedenkt, daß die potentiellen Wirksubstanzen wahrscheinlich niemals allein agieren dürften wie in-vitro, sondern immer nur im Zusammenspiel.

An allen Stellen des Körpers, wo Plättchen aggregieren und zur Sekretion angeregt werden, d.h. unter sehr vielen pathophysiologischen Bedingungen (Endothelläsionen, Entzündungen u.a.), treten lokale Konzentrationen an Nukleotiden auf, die zu Beginn im Bereich von mM liegen und damit 100-1000fach höher sind als für die in-vitro beobachteten Effekte notwendig.

Die Lebensdauer der Adenin-Dinukleotide ist sowohl im Blut als auch auf der Endotheloberfläche länger als die der Mononukleotide (ATP, ADP); daraus folgt arbeits-hypothetisch der "Sinn" dieser ungewöhnlichen Nukleotide: sie wirken länger als die "normalen" Nukleotide und modulieren deren Funktion; die Dinukleotide können auch fernere Zielzellen erreichen (wie z.B. Knochenmarkszellen oder Mesangiumzellen in den Nierenglomeruli). Die Halbwertszeit der Purin-Dinukleotide dürfte zwischen 5 und 20 min betragen, also immer noch kurz genug für einen Signalcharakter.

Auf zahlreichen Zellen sind mit funktionellen Tests purinerge Rezeptoren gefunden worden. Adenin-Nukleotide in mikromolaren Konzentrationen lösen über diese Rezeptoren unterschiedliche zelluläre Antworten aus.

Unsere Arbeitshypothesen zur molekularen Wirkung von Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A:

- a) Die Dinukleotide binden an eigene Purin-Rezeptoren; über Second-Messenger-Kaskaden oder Öffnen von Ionenkanälen lösen sie Antworten ihrer Zielzellen aus.
- b) Die Dinukleotide binden an dieselben Purinozeptoren wie ATP (ADP) und wirken agonistisch bzw. antagonistisch.
- c) Die Dinukleotide werden von Pyrophosphohydrolasen des Blutes und von Ecto-enzymen zu Nukleotiden abgebaut; sie sind "chemisch maskierte" Nachschubquellen für ATP, ADP, AMP und Adenosin.

Die Bedeutung "Purinerge Signalsysteme" für weiße Blutzellen ist weitgehend ungeklärt.

Unter dem Purinergen Signalsystem verstehen wir das funktionelle Zusammenwirken von

1. membranständigen Rezeptoren für extrazelluläre Nukleotide (sogen. P<sub>2</sub>-Purinoceptoren),
2. biochemischen Signaltransduktionsmechanismen (wie z.B. Aktivierung membranständiger Phospholipasen, G-Proteine, u.a.),
3. Bildung intrazellulärer Second-Messenger (Inositolphosphate wie IP<sub>3</sub>, Freisetzung von Calcium aus Speichervesikeln u.a.),
4. spezifischen zellulären Antworten (wie Stoffwechsellumstellungen, Sekretion von Enzymen oder Sauerstoffradikalen ins extrazell. Außenmilieu), und
5. Degradation der extrazellulären Signalkleotide durch membranständige Ecto-Nucleotidasen, zur zeitlichen Begrenzung der Signale.

Stefan Ullrich sollte mit seiner Dissertationsarbeit folgende Fragen bearbeiten:

1. Kann über purinerge Rezeptoren die Sekretion von HGF (Hybridoma-Growth-Factor) aus Peritonealmakrophagen der Maus stimuliert werden? Eingesetzt werden sollten ADP, ATP und die Dinukleotide Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A. Als Testsystem diene die Proliferation von Hybridoma-Einzelzellen (klonales Wachstum) in Gegenwart nicht-proliferierender Makrophagen.
2. Charakterisierung der purinergen Rezeptoren auf der Makrophagenzelllinie J-774 und auf peripheren menschlichen Leukozyten.

Stefan Ullrich hat folgende Ergebnisse erzielt:

1. Peritoneale Mausmakrophagen (sogen. "residente" Zellen) lassen sich durch extrazelluläre Nukleotide zur vermehrten Sekretion von Wachstumsfaktoren anregen. Die Stimulierbarkeit ruhender, nicht-vorgeprägter Makrophagen ist jedoch träge und schwach. Für Rezeptorcharakterisierungen ist das biologische Testsystem daher nicht geeignet.

In höheren Konzentrationen als 100  $\mu$ M waren sowohl Mononukleotide als auch Dinukleotide wachstumshemmend. Der molekulare Mechanismus der cytotoxischen Effekte wurde nicht untersucht.

2. Mit Hilfe der schnell ansprechenden Meßtechnik der intrazellulären Calcium-Ausschüttung (Fura-2-Technik) konnten auf der Makrophagenzelllinie J-774 und auf menschlichen Blutleukozyten Nukleotid-Rezeptoren charakterisiert werden. Auf beiden Zellpopulationen wurden ATP-Rezeptoren von Subtyp P<sub>2z</sub> nachgewiesen. Auf peripheren Blutleukozyten fand Herr Ullrich zusätzlich einen für ADP spezifischen Rezeptor (wahrscheinlich vom Subtyp P<sub>2T</sub>). Es konnte noch nicht geklärt werden, auf welcher zellulären Subpopulation sich dieser ADP-Rezeptor befindet.

3. Es fanden sich keine Hinweise auf eigenständige Dinukleotidrezeptoren. Diese Befunde stehen in Einklang mit unseren Arbeitshypothesen, daß die Dinukleotide für weiße Blutzellen Proagonisten

darstellen, die erst durch Enzyme des Blutes oder der Endothelzelloberflächen zu den eigentlichen Agonisten ATP (ADP) gespalten werden.

Stefan Ullrich hat mit Fleiß und Geschick zahlreiche Methoden erlernt und kritisch eingesetzt. Er hat neue Verfahren in unserer Gruppe etabliert und für seine Fragestellungen zielgerichtet modifiziert. Die schriftliche Ausfertigung ist übersichtlich und klar. Auch schwierige Zusammenhänge werden sprachlich bewältigt. Die Diskussion ist auf dem neueren Stand der Literatur, ausreichend breit angelegt und auf einige Schwerpunkte erfolgreich fokussiert. Die bildhaften Darstellungen sind gelungen, und das Literaturverzeichnis ist umfassend.

Ich beurteile die Dissertationsarbeit mit der Note

Magna cum laude = sehr gut

Prof. Dr. A. Ogilvie