

Medizinische Fakultät der Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Martin Paul
Abteilung: Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. H. Peter Reusch

**Diadenosinpolyphosphate induzieren über die Aktivierung von MAP-Kinasen
Proliferation von neonatalen glatten Gefäßmuskelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Peter Bobbert
aus Barcelona

Referent: Prof. Dr. med. H. Peter Reusch

Korreferent: PD Dr. med. U. Kintscher

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 17. März 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Diadenosinpolyphosphate	1
1.1.1	Struktur der Diadenosinpolyphosphate	1
1.1.2	Vorkommen der Diadenosinpolyphosphate im humanen Organismus	2
1.1.3	Physiologische Bedeutung der Diadenosinpolyphosphate	2
1.1.4	Diadenosinpolyphosphate und ihre mögliche Rolle bei vaskulären Erkrankungen	4
1.1.5	Metabolisierung der Diadenosinpolyphosphate	4
1.2	1.2.1 Purinorezeptoren	5
	1.2.2 Ionotrope P2X-Rezeptoren	5
	1.2.3 Metabotrope P2Y-Rezeptoren	6
	1.2.4 G-Protein regulierte Effektoren	9
	1.2.5 Induktion von Stressfasern über Aktivierung der $G\alpha_{12}$ -Familie	10
1.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	11
1.4	Zielsetzung	12

2. Material und Methoden

2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien	13
2.1.2	Puffer	15
2.1.3	Seren, Medien	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Protein-Gel-Elektrophorese und Westernblot	17
2.2.2	Zellkultur	18
2.2.3	Intrazelluläre Kalziummessung	19
2.2.4	Fluoreszenz-Mikroskopie	19

2.2.5	³ H-Thymidin-Einbau	20
2.2.6	Zellzählung	20

3. Ergebnisse

3.1	3.1.1	Einfluss der Diadenosinpolyphosphate auf die DNA-Synthese glatter Gefäßmuskelzellen	22
	3.1.2	Ap4A induziert eine Proliferation von GMZ	23
	3.1.3	Ap3A und Ap4A aktivieren die MAP-Kinasen ERK1/2	24
3.2		Beschreibung eines möglichen Signaltransduktionsweges, der zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt	26
	3.2.1	Die MAP-Kinase Kinase (MEK) ist essentieller Bestandteil des zur Aktivierung der Proteine ERK1/2 führenden Weges	26
	3.2.2	Phospholipase C β und Proteinkinase C sind an der durch Ap4A induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen beteiligt	27
	3.2.3	Die durch Ap4A induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 ist abhängig von der Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors	29
3.3	3.3.1	Ap3A und Ap4A induzieren intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhungen in GMZ	31
	3.3.2	P2Y-Rezeptoren vermitteln die teilweise Pertussistoxin sensitive intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung durch Ap4A in GMZ	33
	3.3.3	Die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher führt zu der von Ap4A induzierten Kalziumkonzentrationserhöhung	34
	3.3.4	P2Y1 vermittelt mit weiteren P2Y-Rezeptoren den durch Ap4A induzierten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration	36

3.4	Ap4A induziert in glatten Gefäßmuskelzellen keine Differenzierung	38
3.5	Induktion von Stressfasern in Swiss 3T3-Fibroblasten	39
4. Diskussion		
4.1	Diadenosinpolyphosphate aktivieren die MAP-Kinasen ERK1/2	43
4.2	Die Kinase- Aktivität des EGF-Rezeptors ist an der durch Ap4A induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 beteiligt	46
4.3	Diadenosinpolyphosphate induzieren keine Stressfasern in Swiss 3T3- Fibroblasten	48
4.4	A4pA induziert in glatten Gefäßmuskelzellen keine Differenzierung	49
4.5	Bedeutung der intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung	50
4.6	Unterschiedliche Wirkungen der einzelnen Diadenosinpolyphosphate	51
4.7	Diadenosinpolyphosphate und ihr Einfluss auf Gefäßerkrankungen	52
4.8	Ausblick	54
5. Zusammenfassung		
6. Abkürzungsverzeichnis		
7. Literaturverzeichnis		
8. Danksagung		
9. Lebenslauf		