

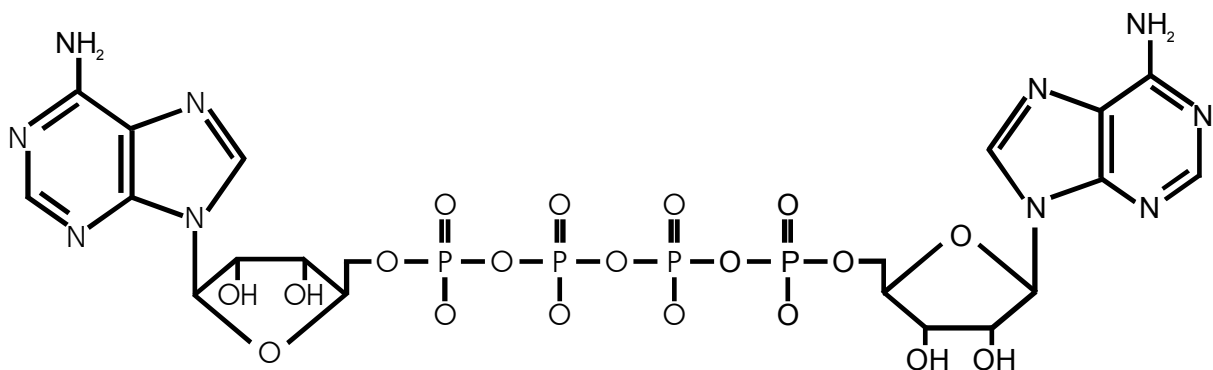
## 1. Einleitung

### 1.1 Diadenosinpolyphosphate

Diadenosinpolyphosphate wurden als Teil der großen Gruppe der Dinukleosidpolyphosphate im Laufe der letzten 25 Jahre als eine Gruppe extrazellulär wirkender Hormone im humanen Organismus entdeckt. Sie vermitteln einer Zelle ihr hormonelles Signal über Purinorezeptoren. Über das Zusammenspiel der Sekretion der Diadenosinpolyphosphate, der unterschiedlichen Expression der beteiligten Rezeptoren und der Synthese von abbauenden Enzymen wie Ectohydrolasen und Nukleotidasen bilden sie ein komplexes Hormonsystem, dessen Bedeutung und dessen Funktionsweise bis heute nicht vollständig geklärt ist.

#### 1.1.1 Struktur der Diadenosinpolyphosphate

Diadenosinpolyphosphate setzen sich aus zwei Adenosinanteilen zusammen, die über eine Phosphatbrücke miteinander verbunden sind. Das Purinnukleosid Adenosin besteht aus der Purinbase Adenin, die mittels einer N-glycosidischen Bindung mit der Pentose Ribose verbunden ist. Der Ribose ist eine Phosphatgruppe über eine Phosphoester-Bindung angehängt. Die einzelnen Phosphatgruppen der die zwei Adenosine verbindenden Phosphatbrücke hängen untereinander mit der energiereichen Phosphorsäureanhydrid-Bindung zusammen. Mindestens zwei Phosphatanteile müssen an dieser Brücke beteiligt sein. Je nach der Anzahl dieser Gruppen teilt man die Diadenosinpolyphosphate in Ap2A bis Ap7A ein.



Strukturformel des Diadenosintetraphosphates Ap4A

### **1.1.2 Vorkommen der Diadenosinpolyphosphate im humanen Organismus**

Im humanen Organismus kommen Diadenosinpolyphosphate in verschiedenen Geweben vor. So wurde zum Beispiel das Diadenosinpolyphosphat Ap<sub>4</sub>A in humanen Thrombozyten entdeckt (Flodgaard und Mitarbeiter, 1982). Auch Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>5</sub>A, Ap<sub>6</sub>A und Ap<sub>7</sub>A konnten im Laufe der Zeit in Thrombozyten isoliert und nachgewiesen werden (Lüthje und Mitarbeiter, 1983; Schlüter und Mitarbeiter, 1994). Daneben spielt aber auch die Speicherung dieser Substanzen in Granula von Herzgewebe, Nebennieren und Nervenzellen eine wichtige Rolle.

### **1.1.3 Physiologische Bedeutung der Diadenosinpolyphosphate**

Bis heute ist eine Vielzahl physiologischer Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate in unterschiedlichen Zellarten beschrieben worden:

In glatten Muskelzellen aus renalen Widerstandsgefäßen der Ratte führt zum Beispiel die Einwirkung von Diadenosinpolyphosphaten zu Kontraktionen, die über die Aktivierung von ionotropen P<sub>2</sub>X-Rezeptoren erklärt werden (Tepel und Mitarbeiter, 1997). Darüber hinaus werden am gleichen Zellsystem dilatierende Effekte von Diadenosinpolyphosphaten beschrieben (van der Giet und Mitarbeiter, 1998), die durch die P<sub>2</sub>Y-Rezeptor vermittelte Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen induziert werden. Die auf der einen Seite Gefäß verengende und auf der anderen Seite Gefäß erweiternde Wirkung der Diadenosinpolyphosphate unterliegt dabei einem äußerst komplexen Mechanismus, der von der Länge der oben beschriebenen Phosphatbrücke (van der Giet und Mitarbeiter, 1997), der Quelle der Diadenosinpolyphosphate (Plasma, Thrombozyten, Nervenzellen), der jeweiligen Expression der verschiedenen purinergen Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen, dem Expressionsgrad der Ectohydrolasen und der Präsenz der die Diadenosinpolyphosphate abbauenden Nukleotidasen im extrazellulären Raum abhängig zu sein scheint. Des weiteren wird die Komplexität der Wirkungsweise dadurch erhöht, dass die entsprechenden glatten Gefäßmuskelzellen durchaus mehrere Subtypen purinergere Rezeptoren exprimieren können und dass die durch die abbauenden Enzyme entstehenden Metabolite wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) eigenständige

---

Wirkungen entfalten, die denen des ursprünglichen Diadenosinpolyphosphates durchaus entgegengesetzt sein können.

Weitere physiologische Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate zeigen sich an  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas. Martin und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass die Diadenosinpolyphosphate in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas zum Teil die ATP-sensitiven Kaliumkanäle blockieren, was das Membranpotential dieser Zellen herabsetzt und die Öffnungswahrscheinlichkeit von in der Zellmembran verankerten, spannungsabhängigen Kalziumkanälen erhöht, womit die untersuchten Diadenosinpolyphosphate Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen.

Auch intrazelluläre Stoffwechselprozesse können durch Diadenosinpolyphosphate moduliert werden. Edgecombe und Mitarbeiter (1997) bewiesen, dass Diadenosinpolyphosphate eine Stimulation der Gluconeogenese in renalen Tubulusepithelzellen der Ratte induzieren können.

In humanen neuronalen Zellen wird dieser Stoffklasse eine Bedeutung bei der Informationsübertragung beigemessen (Pintor und Mitarbeiter, 1999), genauso wie in der Steuerung der Tränensekretion, da Diadenosinpolyphosphate vom Kornealepithel synthetisiert werden und darüber modulierend in die Sekretion der Tränenflüssigkeit eingreifen (Pintor und Mitarbeiter, 2002).

Eine ebenfalls komplexe Wirkungsweise der Diadenosinpolyphosphate zeigt sich bei der Mitogenese. Konnten auf der einen Seite Heidenreich und Mitarbeiter (1995) mitogene Eigenschaften dieser Stoffklasse auf renale Mesangiumzellen der Ratte demonstrieren, so scheinen auf der anderen Seite die Diadenosinpolyphosphate auch Funktionen im Bereich der Apoptose einzunehmen. Gröschel-Stewart und Mitarbeiter (1999) beschrieben den Weg dermalen Epithelzellen beginnend vom Stratum spinosum bis hin zum Stratum corneum, während dem über P2Y1-Rezeptoren proliferative und über P2X5-Rezeptoren differenzierende Effekte vermittelt werden, bis im Stratum corneum die Apoptose der Keratinozyten durch P2X7-Rezeptoren eingeleitet wird.

---

#### **1.1.4 Diadenosinpolyphosphate und ihre mögliche Rolle bei vaskulären Erkrankungen**

Den Diadenosinpolyphosphaten wird bei der Entwicklung von vaskulären Erkrankungen eine noch nicht vollständig geklärte Rolle zugeteilt. Jankowski und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass Hämodialysepatienten eine gesteigerte Konzentration von Diadenosinpolyphosphaten in Thrombozyten aufweisen, woraus die Annahme resultierte, dass Diadenosinpolyphosphate einen Beitrag zur Entwicklung der Arteriosklerose leisten. Die Pathogenese der Arteriosklerose ist u.a. gekennzeichnet durch die Veränderung glatter Gefäßmuskelzellen, die ihren Differenzierungsgrad und ihre Wachstumsraten wechseln und aus der Media des Gefäßes in die Intima wandern, wo sie durch eine gesteigerte Proliferation zu einer Einengung des Gefäßlumens beitragen (Ross und Mitarbeiter, 1976; Schwartz und Mitarbeiter, 1984). Gefördert wird dieser Prozess durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, welche aus durch Endothelläsionen aktivierten Thrombozyten stammen. Aus diesem Grund besteht die Vermutung, dass Diadenosinpolyphosphate, deren Konzentration in Thrombozyten von Patienten mit erhöhten Arterioskleroserisiko gesteigert ist und die proliferative Effekte ausüben können (Heidenreich und Mitarbeiter, 1995), einen Beitrag zur Pathogenese von vaskulären Erkrankungen leisten. Gestärkt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass Substanzen wie das Nukleotid ATP, welches über die gleichen Rezeptoren wie die Diadenosinpolyphosphate seine Effekte vermittelt, auf glatte Gefäßmuskelzellen mitogene Signale induzieren.

#### **1.1.5 Metabolisierung der Diadenosinpolyphosphate**

Diadenosinpolyphosphate werden durch eine Vielzahl von extrazellulären Nukleotidasen und von auf der Zelloberfläche exprimierten Ectohydrolasen metabolisiert. Eine Ecto-Ap4A-Hydrolase konnte auf bovinen aortalen Endothelzellen (Mateo und Mitarbeiter, 1997) und auf Mesangiumzellen der Ratte (von Drygalski und Mitarbeiter, 2000) nachgewiesen werden. Auch wurde die humane zweifach phosphorylierte Inositol-Phosphat-Phosphohydrolase beschrieben, die besondere Affinität zu Ap5A und Ap6A zeigt (Safrany und Mitarbeiter, 1999).

Bei dem Abbau der Diadenosinpolyphosphate entstehen zum Teil sehr reaktive Metabolite, die wiederum eigene Wirkungen entfalten können. Zu diesen zählen Mononukleotide wie ATP und ADP und Nukleoside wie das Adenosin.

Untersuchungen der Halbwertszeiten der einzelnen Substanzen zeigten, dass die der Diadenosinpolyphosphate im menschlichen Blut bei ungefähr 17 Minuten liegt, wobei die von ATP nicht länger als eine Minute beträgt (Iwata und Mitarbeiter, 1995). Dieses Erkenntnis ist für die Bewertung experimenteller Ergebnisse entscheidend, da nicht nur die untersuchte Substanz, sondern auch ihr Abbauprodukt eigenständige Wirkungen entfalten können.

### **1.2.1 Purinorezeptoren**

Die Purinorezeptoren werden in die zwei großen Gruppen der P1- und P2-Rezeptoren eingeteilt. Diadenosinpolyphosphate aktivieren P2-Rezeptoren, die wiederum in die ionotropen P2X- und metabotropen P2Y-Rezeptoren unterteilt werden.

### **1.2.2 Ionotrope P2X-Rezeptoren**

Zu der Familie der ionotropen P2X-Rezeptoren, die von humanen Zellen synthetisiert werden können, gehören derzeit fünf aktivierbare Ionenkanäle, wobei angenommen wird, dass weitere noch nicht klassifizierte Subtypen existieren. Als gemeinsames Merkmal zeichnen sie sich durch zwei hydrophobe transmembranäre Domänen aus, die mit einer großen extrazellulären Schleife verbunden sind. Nukleotide wie ATP, UTP und CTP aktivieren diese genauso wie die Dinukleosidpolyphosphate. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die einzelnen P2X-Subtypen und deren dazu gehörenden Agonisten.

Rezeptor-Subtyp	Potenz der Agonisten	Literaturquelle
P2X1	ATP 7,25 > Ap4A 6,74 > Ap5A 6,65 > Ap6A 5,95	Bianchi und Mitarbeiter 1999
P2X2	ATP 5,99	Lynch und Mitarbeiter 1999
P2X3	ATP 6,47 > Ap4A 6,30 > Ap5A 6,21 > Ap6A 6,20	Bianchi und Mitarbeiter 1999
P2X4	ATP 6,32 > Ap4A 6,20 > Ap5A 5,91 > Ap6A 4,20	Bianchi und Mitarbeiter 1999
P2X7	ATP 4,02     ApnA ohne Aktivität	Bianchi und Mitarbeiter 1999

**Tabelle 1: Agonisten von im humanen Organismus exprimierten P2X-Rezeptoren in der Reihenfolge ihrer Potenz. Die Ziffern geben die  $pEC_{50}$ -Werte (negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung zu beobachten ist) wieder.**

### 1.2.3 Metabotrope P2Y-Rezeptoren

Die metabotropen P2Y-Rezeptoren haben als charakterisierendes Zeichen sieben in der Plasmamembran verankerte Transmembrandomänen und sind immer mit heterotrimeren G-Proteinen verbunden (G-Protein gekoppelte Rezeptoren, GPCR). Bis heute sind sechs Subtypen der P2Y-Rezeptoren beschrieben worden, die genau wie die P2X-Rezeptoren eine große Vielfalt von Agonisten aufweisen, was in Tabelle 2 dargestellt ist.

Rezeptor-Subtyp	Potenz der Agonisten	Literaturquelle
P2Y1	ADP 6,59 > Ap4A 6,20 > Ap2A 4,00 > Ap5A 3,00	Schachter und Mitarbeiter 1996
P2Y2	UTP 7,69 > ATP 7,09 > Ap4A 6,58 > Ap3A 5,00	Janssens und Mitarbeiter 1999
P2Y4	UTP 6,26 ApnA ohne Aktivität	Kennedy und Mitarbeiter 2000
P2Y6	UDP 8,23 > ATP 6,33 ApnA ohne Aktivität	Filippov und Mitarbeiter 1999
P2Y11	ATP 4,19	Communi und Mitarbeiter 1999
P2Y12	ADP	Nicholas und Mitarbeiter 2001

**Tabelle 2: Agonisten von im humanen Organismus exprimierten P2Y-Rezeptoren in der Reihenfolge ihrer Potenz. Die Ziffern geben die  $pEC_{50}$ -Werte (negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung zu beobachten ist) wieder.**

An P2Y-Rezeptoren bindende G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, sowie je einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten werden als funktionelle Einheit angesehen, da sie immer einen undissoziierbaren Komplex bilden. Kommt es zu einer Aktivierung des P2Y-Rezeptors, dann durchläuft das heterotrimere G-Protein einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Zyklus, durch den nachfolgende Signaltransduktionswege moduliert werden: Im inaktiven Zustand ist der  $\beta\gamma$ -Komplex mit der  $\alpha$ -Untereinheit, an die GDP gebunden ist, assoziiert. Kommt es zu einer Aktivierung des Rezeptors, dann dissoziiert das GDP von der  $\alpha$ -Untereinheit und wird durch GTP ersetzt. Dies induziert eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheit, die dazu führt, dass sie einerseits vom Rezeptor, andererseits vom  $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert, wobei sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex in diesem Moment in der Lage sind, intrazelluläre Effektorproteine zu aktivieren. Eine GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit terminiert die Stimulation des G-Proteins, indem durch eine Hydrolyse aus GTP wieder GDP entsteht, das an der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden bleibt und die Voraussetzung dazu bildet, dass der  $\beta\gamma$ -Komplex mit der  $\alpha$ -Untereinheit

---

reassoziieren kann. Diese durch die GTP-Hydrolyse induzierte Reassoziation stellt den entscheidenden Inaktivierungsmechanismus dar. Dabei kann die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit durch unterschiedliche Effektorproteine beeinflusst werden. Dazu zählen auch die RGS-Proteine, die in der Lage sind, die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit zu beschleunigen (Dohlman und Mitarbeiter, 1997; Berman und Mitarbeiter, 1998).

G-Proteine werden in vier große Gruppen eingeteilt, wobei für deren Klassifizierung die  $\alpha$ -Untereinheit die entscheidende Komponente darstellt:  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_{12/13}$ . Diese  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei Domänen, wobei die eine ihre Bedeutung durch Bindungsstellen für den  $\beta\gamma$ -Komplex, den Rezeptoren, den Guaninnukleotiden und den Effektoren gewinnt. Die Funktion der zweiten, helikal aufgebauten Domäne ist bis heute unbekannt.

Die Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine entscheidet, welche intrazellulären Effektorproteine eines Signaltransduktionsweges nach Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren induziert werden. So aktiviert die  $G\alpha_s$ -Familie alle Typen der Adenylatzyklase, wohingegen die  $G\alpha_i$ -Familie diese zum größten Teil inhibiert. Die  $G\alpha_q$ -Familie stimuliert im Gegensatz dazu die Phospholipase C $\beta$ .

Von der  $G\alpha_{12}$ -Familie ist weitaus weniger bekannt, doch konnte bereits gezeigt werden, dass über diese Gruppe der  $\alpha$ -Untereinheiten die kleine GTPase Rho aktiviert werden kann, durch die wiederum eine intrazelluläre Akkumulation von Aktinfasern, so genannten Stressfasern, induziert wird.

Welche Subtypen der G-Proteine genau mit den speziellen purinergen P2Y-Rezeptoren koppeln, ist bislang nur unvollständig beantwortet, da wegen der Flexibilität eines solchen Rezeptorsystems es durchaus möglich ist, dass ein Subtyp der P2Y-Klasse mit unterschiedlichen Familien der G-Proteine bindet und interagiert. Die Tabelle 3 gibt Aufschluss über die bisherigen Erkenntnisse.



Rezeptorsubtyp	G-Protein	Effektorprotein
P2Y1	$G\alpha_q$	PLC $\beta$ $\uparrow$
P2Y2	$G\alpha_q + G\alpha_i$	PLC $\beta$ $\uparrow$ + AC $\downarrow$
P2Y4	$G\alpha_q + G\alpha_i$	PLC $\beta$ $\uparrow$ + AC $\downarrow$
P2Y6	$G\alpha_q$	PLC $\beta$ $\uparrow$
P2Y11	$G\alpha_q + G\alpha_s$	PLC $\beta$ $\uparrow$ + AC $\uparrow$
P2Y12	$G\alpha_i$	AC $\downarrow$

**Tabelle 3: Zusammenfassung der bisher beschriebenen P2Y-Subtypen, der mit diesen Subtypen gekoppelten G-Proteine und deren Effektorproteinen.**

Der  $\beta\gamma$ -Komplex erlangt seine Bedeutung in der Regulation verschiedener Effektoren wie einzelner Adenylatzyklasen und der Phospholipase C $\beta$ . In glatten Gefäßmuskelzellen ist er an der Vermittlung differenzierender und mitogener Signale beteiligt. Burnstock und Mitarbeiter (2002) beschreiben hierzu einen Signaltransduktionsweg, durch den proliferative Signale über den  $\beta\gamma$ -Komplex weitergeleitet werden, der einerseits die Phospholipase C $\beta$  und andererseits nicht näher beschriebene Tyrosinkinasen aktiviert.

#### 1.2.4 G-Protein regulierte Effektoren

Durch Klonierung einer Vielzahl von G-Protein regulierter Effektoren konnte demonstriert werden, dass Isoformen von Effektoren existieren, die sowohl eine spezifische Gewebeexpression aufweisen, als auch differentiell durch die  $\alpha$ -Untereinheiten bzw. dem  $\beta\gamma$ -Komplex der G-Proteine reguliert werden können (Gohla und Mitarbeiter, 1998).

Ein wichtiger Effektor ist die Phospholipase C, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) katalysiert und die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) generiert. Das durch die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> entstandene IP<sub>3</sub> verlässt die Plasmamembran und diffundiert ins Zytosol der Zelle. Dort bindet es an IP<sub>3</sub>-abhängige Kalziumkanäle der Membran des

endoplasmatischen Retikulums und löst darüber die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Kalziumspeichern ins Zytosol aus.

Es gibt mindestens drei Familien von Enzymen ( $PLC\beta$ ,  $PLC\gamma$  und  $PLC\delta$ ), die eine Phospholipase C-Aktivität besitzen, wobei die  $PLC\beta$  die Familie von Enzymen darstellt, deren vier Isoformen alle durch G-Proteine reguliert werden (Sternweis und Smrcka, 1992; Exton, 1996). Dabei werden alle bekannten Isoformen der  $PLC\beta$  durch Mitglieder der Pertussistoxin-insensitiven  $G\alpha_q$ -Familie stimuliert (Taylor und Mitarbeiter, 1991; Lee und Mitarbeiter, 1992; Jiang und Mitarbeiter, 1994). Dem gegenüber steht die Pertussistoxin-sensitive Aktivierung der  $PLC\beta$  durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aus den Mitgliedern der  $G\alpha_{i/o}$ -Familie (Camps und Mitarbeiter, 1992; Katz und Mitarbeiter, 1992).

Gebildetes Diacylglycerol kann zwei Funktionen übernehmen: Einerseits kann es weiter in Arachidonsäure metabolisiert werden, die sowohl als Botenstoff fungieren als auch als Ausgangssubstanz für die Eicosanoidsynthese dienen kann. Andererseits aktiviert DAG die Proteinkinase C, die wiederum weitere Effektorproteine innerhalb der Zelle durch Phosphorylierung aktivieren kann.

Die durch  $IP_3$  induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann zu einer Verlagerung der PKC vom Zytosol an die Innenseite der Zellmembran führen, wo sie durch den gemeinsamen Einfluss von Kalzium, Diacylglycerol und Phosphatidylserin aktiviert wird.

### **1.2.5 Induktion von Stressfasern über Aktivierung der $G\alpha_{12}$ -Familie**

Humane Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen können auf extrazelluläre Stimuli mit einer schnellen Reorganisation ihres Aktin-Zytoskeletts reagieren, wobei eine solche Umstrukturierung von Aktinfasern besonders gut in Fibroblasten zu beobachten ist (Ridley und Mitarbeiter, 1992). Sowohl in Fibroblasten als auch in allen anderen eukaryoten Zellen kontrollieren kleine GTPasen der Rho-Familie, die eine Untergruppe der Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine bilden, ein solches Bündeln von Aktinfasern, die als Stressfasern bezeichnet werden. Darüber hinaus führt eine Aktivierung von Rho zu einer Akkumulation von Integrinen und assoziierten Proteinen in fokalen Adhäsionskomplexen, die über Integrine einen

---

Kontakt zwischen Stressfasern und der extrazellulären Matrix aufbauen. Gohla und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass die G-Proteine der  $G\alpha_{12}$ -Familie, zu der sowohl  $G\alpha_{12}$  als auch  $G\alpha_{13}$  gehören, einen wesentlichen Anteil an einer möglichen Aktivierung von Rho tragen. Dabei zeigte sich, dass die beiden Subtypen der Familie einen unterschiedlichen Signaltransduktionsweg zur Induktion von Stressfasern aktivieren. Führt einerseits die Aktivierung von  $G\alpha_{12}$  zu einer annähernd direkten Stimulation von Rho, zeigt andererseits der Weg über  $G\alpha_{13}$  eine Beteiligung des EGF-Rezeptors und eine mögliche inhibierende Beeinflussung durch aktiviertes  $G\alpha_{12}$ .

Die G-Proteine  $G_{12}$  und  $G_{13}$  werden im humanen Organismus ubiquitär exprimiert, und für eine Reihe von Rezeptoren konnte in den letzten Jahren eine Kopplung an diese Familie der G-Proteine nachgewiesen werden. So wurde für Thromboxan- $A_2$ - und Thrombin-Rezeptoren in Thrombozyten und in der Schilddrüse für TSH-Rezeptoren eine direkte Verbindung zur  $G\alpha_{12}$ -Familie bewiesen (Offermanns und Mitarbeiter, 1994; Laugwitz und Mitarbeiter, 1996). Eine Kopplung dieser G-Proteine mit purinergen Rezeptoren konnte bislang nicht gezeigt werden.

### 1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Die Familie der mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) beinhaltet derzeit mindestens drei Mitglieder: Die extrazellulären-signalregulierten Kinasen (ERK1/2), deren zwei Isoformen hinsichtlich ihrer Größe auch als p42/p44-MAP-Kinasen bezeichnet werden, die c-jun-Amino-Terminus Kinase (JNK) und die p38 Kinase. Bei kaskadenartig ablaufenden Signaltransduktionswegen, die Signale wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose von der Zelloberfläche in den Zellkern transportieren, können diese MAPK involviert sein.

Über eine Aktivierung sowohl von G-Protein gekoppelten Rezeptoren als auch von Tyrosinkinaserzeptoren kann es zu einer Stimulation der MAP-Kinasen ERK1/2 kommen: Die kleine GTPase Ras aktiviert durch direkte Interaktion die Serin/Threonin-Kinase Raf. Aktiviertes Raf phosphoryliert die multifunktionale Threonin/Tyrosin MAP-Kinase-Kinase MEK, die im nächsten Schritt durch Phosphorylierung die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert (van Corven und Mitarbeiter, 1993; Vouret-Craviari, 1993). Durch Translokation der aktivierten MAP-Kinasen

---

ERK1/2 vom Zytoplasma in den Zellkern können diese nukleäre Transkriptionsfaktoren regulieren, um proliferative oder differenzierende Signale zu übermitteln.

#### 1.4 Zielsetzung

Glatte Gefäßmuskelzellen spielen im Rahmen der Entwicklung der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle, da sie ihren Differenzierungsgrad und ihre Proliferationsrate verändern können, aus der Media in die Intima des Gefäßes wandern und somit zu Gefäßveränderungen beitragen. Der Substanzklasse der Diadenosinpolyphosphate wird bei der Entwicklung der Arteriosklerose eine Bedeutung beigemessen, da gezeigt werden konnte, dass Patienten mit einem erhöhten Arterioskleroserisiko eine gesteigerte Konzentration von Diadenosinpolyphosphaten in Thrombozyten aufweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise der Diadenosinpolyphosphate auf aortale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte zu beschreiben. Insbesondere sollte geklärt werden, ob und wie diese Substanzen die Entwicklung pathologischer Gefäßveränderungen beeinflussen können. Dazu wurden die Diadenosinpolyphosphate Ap3A – Ap6A an zwei Zellsystemen, den aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte und den Swiss 3T3-Fibroblasten, untersucht.

Im Einzelnen hatte die Arbeit folgende Ziele:

- 1) Untersuchung des Einflusses von Diadenosinpolyphosphaten auf die Proliferation und Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen
- 2) Identifizierung eines Signaltransduktionsweges, über den Diadenosinpolyphosphate mitogene Signale in den Kern von glatten Gefäßmuskelzellen leiten.
- 3) Untersuchung purinergere P2Y-Rezeptoren auf ihre Kopplung mit G-Proteinen der Subtypen  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$ .
- 4) Beschreibung möglicher Gründe für die unterschiedlichen Wirkungen von den Diadenosinpolyphosphaten Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A auf glatte Gefäßmuskelzellen.