

3. Ergebnisse

3.1.1 Einfluss der Diadenosinpolyphosphate auf die DNA-Synthese glatter Gefäßmuskelzellen

Zur Klärung der Frage, ob die Diadenosinpolyphosphate Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A einen Einfluss auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nehmen, wurde der Einbau von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin in die DNA der Zellkerne nach Stimulation durch die oben genannten Agonisten gemessen (Abbildung 1). Die Diadenosinpolyphosphate wurden in den Konzentrationen von 10^{-6} M bis 10^{-4} M eingesetzt. Es zeigte sich dabei eine konzentrationsabhängige Steigerung des Einbaus von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin in die DNA der Zellkerne für Ap3A und Ap4A, wohingegen Ap5A und Ap6A keine Steigerung im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrollgruppe induzierten. ATP bewirkte von allen eingesetzten Agonisten die stärkste Steigerung der DNA-Synthese. Keinen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Synthese nahm Thrombin, das in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte auch keinen mitogenen Effekt ausübt (Reusch und Mitarbeiter, 2001).

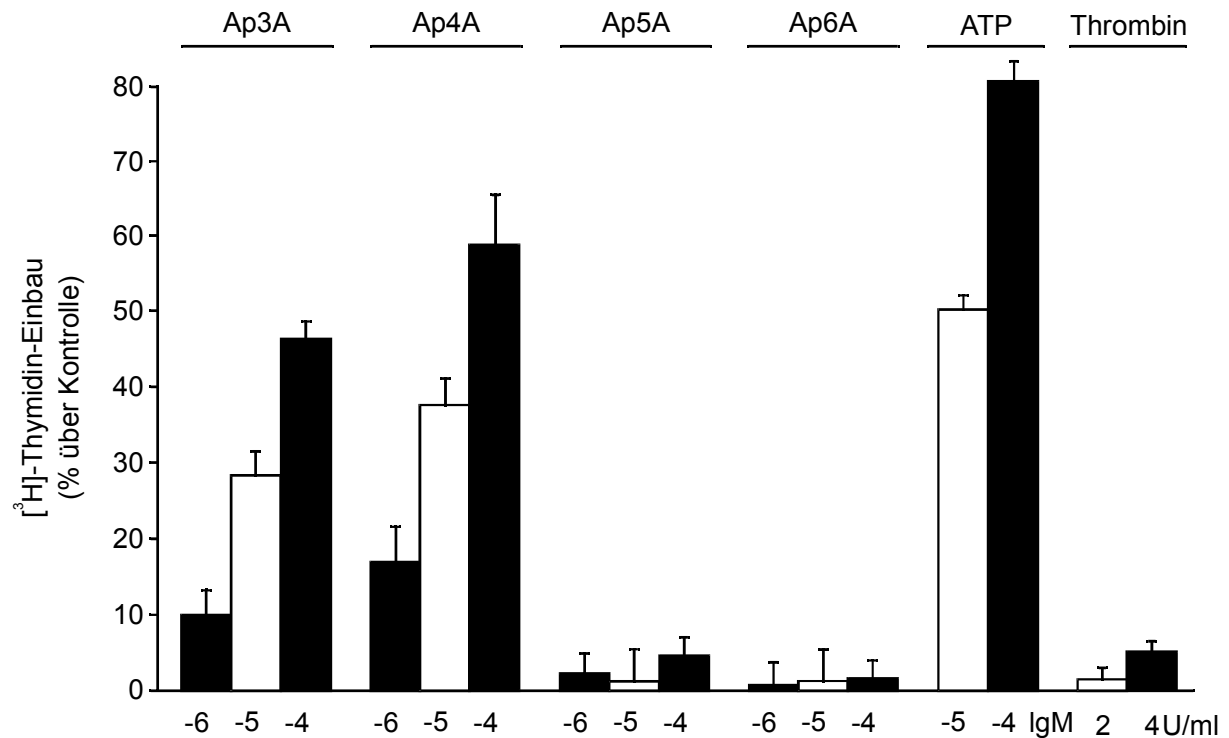


Abbildung 1: Einfluss der Diadenosinpolyphosphate (Ap3A - Ap6A) auf den Einbau von radioaktiv markierten ^3H -Thymidin in die DNA glatter Gefäßmuskelzellen. GMZ wurden, nachdem sie drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, mit den entsprechenden Agonisten 24 Stunden stimuliert. Während der letzten sechs Stunden erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten ^3H -Thymidins. Als Kontrolle dienten unstimulierte GMZ. Dargestellt sind für die jeweiligen Konzentrationen die Mittelwerte mit den dazu gehörenden Standardabweichungen von drei in gleicher Art ausgeführten Experimenten mit jeweils sechs Einzelmessungen.

3.1.2 Ap4A induziert eine Proliferation von GMZ

Der ^3H -Thymidin-Einbau gibt nur Aufschlüsse über Veränderungen der DNA-Synthese. Um den Nachweis zu erbringen, dass nicht nur die DNA-Synthese durch Stimulation mit Ap3A und Ap4A verändert wurde, sondern auch die eigentliche Zellzahl, wurde diese per Zählung in einer Neubauer Zellzählkammer gemessen (Abbildung 2). Glatte Gefäßmuskelzellen wurden über acht Tage mit serumhaltigem Medium, Thrombin, serumfreiem Medium oder Ap4A exponiert und alle zwei Tage gezählt. Unter serumfreien Bedingungen und durch die Zugabe von Thrombin kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Zellzahl. Ap4A induzierte hingegen eine Steigerung von bis zu 50%. Die Positiv- Kontrolle, die Stimulation der Zellen mit serumhaltigen Medium, induzierte eine Steigerungsrate von 800%.

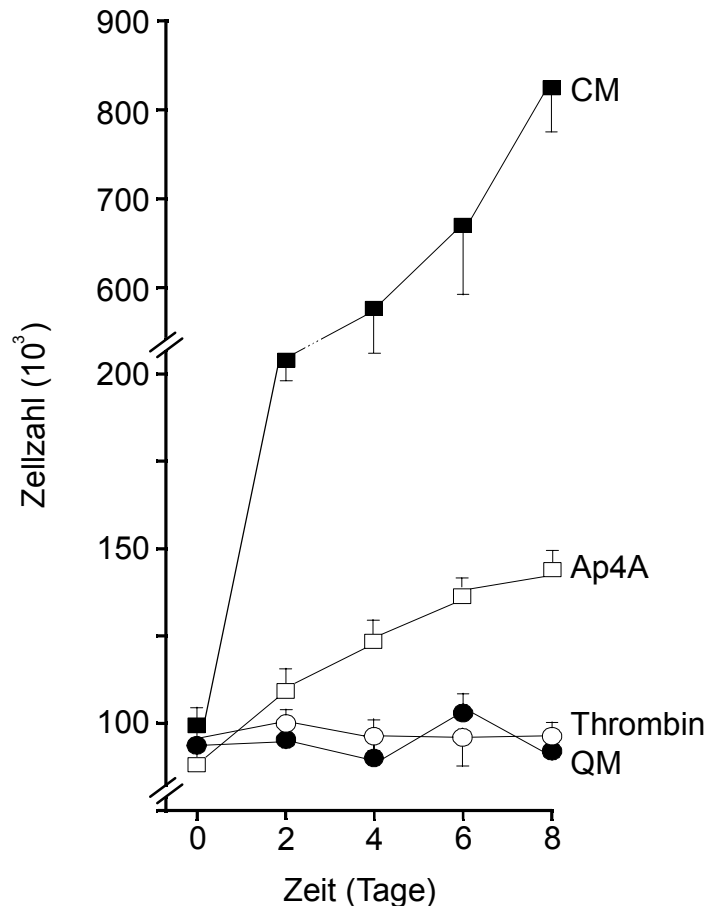


Abbildung 2: Induktion der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen durch Ap4A. Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden über drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und dann bis zu acht Tagen mit Ap4A (10^{-5} M), Thrombin (2 U/ml), serumhaltigen CM oder serumfreien QM stimuliert. Die Zellzählung erfolgte jeden zweiten Tag mit Hilfe einer Neubauer Zellzählkammer. Die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen wurden über die Auszählung von jeweils vier Quadranten der Neubauer Zellzählkammer in doppelter Ausführung berechnet.

3.1.3 Ap3A und Ap4A aktivieren die MAP-Kinasen ERK1/2

Es gibt mehrere Signaltransduktionswege in glatten Gefäßmuskelzellen, die mitogene Signale in den Zellkern weiterleiten. Eine Möglichkeit beinhaltet die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, die im aktivierten Zustand in den Zellkern translozieren und an der DNA-Synthese beteiligt sind. Um zu untersuchen, ob diese Kinasen an der durch Ap4A induzierten Zellproliferation beteiligt sind, wurde mittels Westernblot-Verfahrens der Phosphorylierungsgrad der Proteine ERK1/2 nach 5-minütiger Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen durch die Diadenosinpolyphosphate Ap3A, Ap4A, Ap5A, Ap6A und dem Nukleotid ATP

untersucht (Abbildung 3). Es zeigte sich, dass Ap3A, Ap4A und ATP eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 induzierten, während Ap5A und Ap6A auch bei hohen Konzentrationen keine Aktivierung der genannten Proteine bewirkten.

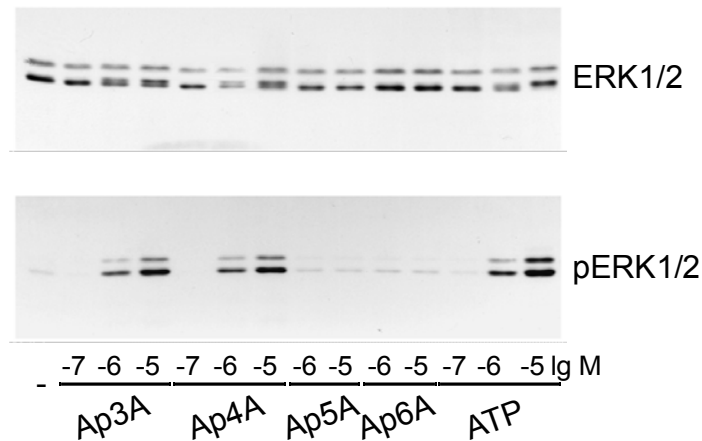


Abbildung 3: Ap3A, Ap4A und ATP induzieren im Gegensatz zu Ap5A und Ap6A eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Die für drei Tage von Serum entzogenen glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit den Diadenosinpolyphosphaten Ap3A, Ap4A, Ap5A, Ap6A und dem Nukleotid ATP für 5 Minuten stimuliert. Die Gesamtzelllysate wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und elektrogeblottet. Aktiviertes ERK1/2 wurde mit einem phosphospezifischen anti-ERK1/2 Antiserum detektiert. Zum Nachweis der gleichen Beladung wurden Aliquots der gleichen Probe mit einem anti-ERK1/2 Antiserum zusätzlich dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis, das durch mindestens zwei weitere Versuche gleicher Art bestätigt wurde.

Zusätzlich wurden weitere Mitglieder der Familie der MAP-Kinasen, die c-jun-Amino-Terminus Kinase (JNK) und die p38 Kinase auf ihren Aktivitätsgrad nach Stimulation von glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Alle untersuchten Diadenosinpolyphosphate (Ap3A – Ap6A) aktivierten dabei nicht oder nur in einem sehr geringen Maße die MAP-Kinasen JNK und p38. ATP als Positiv- Kontrolle hingegen konnte eine Phosphorylierung dieser Kinasen induzieren.

3.2 Beschreibung eines möglichen Signaltransduktionsweges, der zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt

Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 kann auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Daher wurden verschiedene Signalmoleküle hinsichtlich ihrer Beteiligung an einem solchen Signaltransduktionsweg untersucht. Das Diadenosinpolyphosphat Ap4A wurde repräsentativ eingesetzt.

3.2.1 Die MAP-Kinase Kinase (MEK) ist essentieller Bestandteil des zur Aktivierung der Proteine ERK1/2 führenden Weges

Die MAP-Kinasen ERK1/2 können über eine Aktivierung der Ras/Raf/MEK-Kaskade phosphoryliert werden. Zur Klärung der Frage nach einer möglichen Beteiligung der MAP-Kinase Kinase (MEK) an der durch Ap4A induzierten ERK1/2-Phosphorylierung wurde der für MEK spezifische Inhibitor PD98059 eingesetzt. Untersucht wurde der Einfluss dieses Inhibitors auf die von Ap4A induzierte Steigerung der DNA-Synthese und der Phosphorylierung von ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen, die mittels Westernblot-Verfahrens gemessen wurde (Abbildung 4). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme sowohl der durch Ap4A provozierten DNA-Synthese also auch der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen.

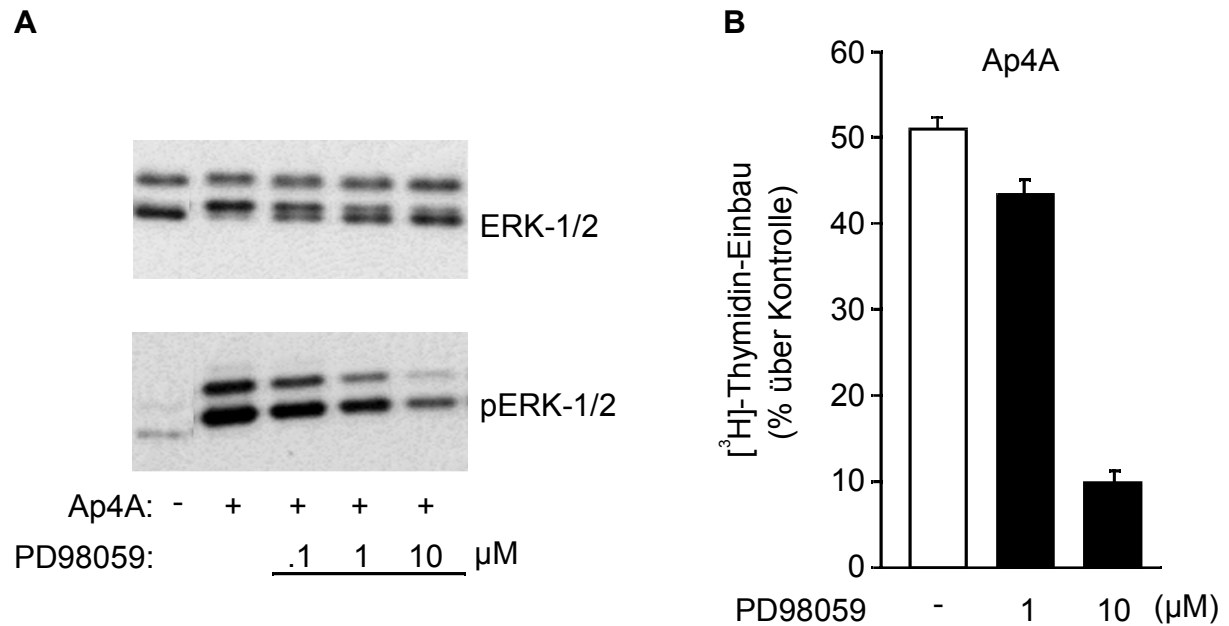


Abbildung 4: Der MEK spezifische Inhibitor PD98059 inhibiert die durch Ap4A induzierte Steigerung der DNA-Synthese und die Phosphorylierung von ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen. A) Die für drei Tage gehungerten glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 30 Minuten mit PD98059 vorbehandelt und anschließend mit Ap4A (10^{-5} M) für 5 Minuten aktiviert. Die Auftrennung und die anschließende Darstellung der Proteine des Zelllysates erfolgten nach der Beschreibung im Methodenteil. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei gleich ausgeführten Experimenten. B) Die für drei Tage mit serumfreien Medium behandelten Zellen wurden, nachdem sie 30 Minuten vorher mit PD98059 inkubiert wurden, durch Ap4A (10^{-5} M) stimuliert. Die Messung des ^3H -Thymidin-Einbaus erfolgte gemäß der Beschreibung im Methodenteil.

3.2.2 Phospholipase C β und Proteinkinase C sind an der durch Ap4A induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen beteiligt

Der Frage nachgehend, ob die Phospholipase C β und die Proteinkinase C Einfluss auf die durch Ap4A induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nehmen, wurde eine Beteiligung dieser Signalmoleküle mit Hilfe der Inhibitoren U73122 bzw. BIM untersucht (Abbildung 5). Es zeigte sich sowohl für die Phospholipase C β als auch für die Proteinkinase C, dass durch deren Inhibition mittels der obigen Antagonisten eine konzentrationsabhängige Abnahme der DNA-Synthese und der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 erfolgte.

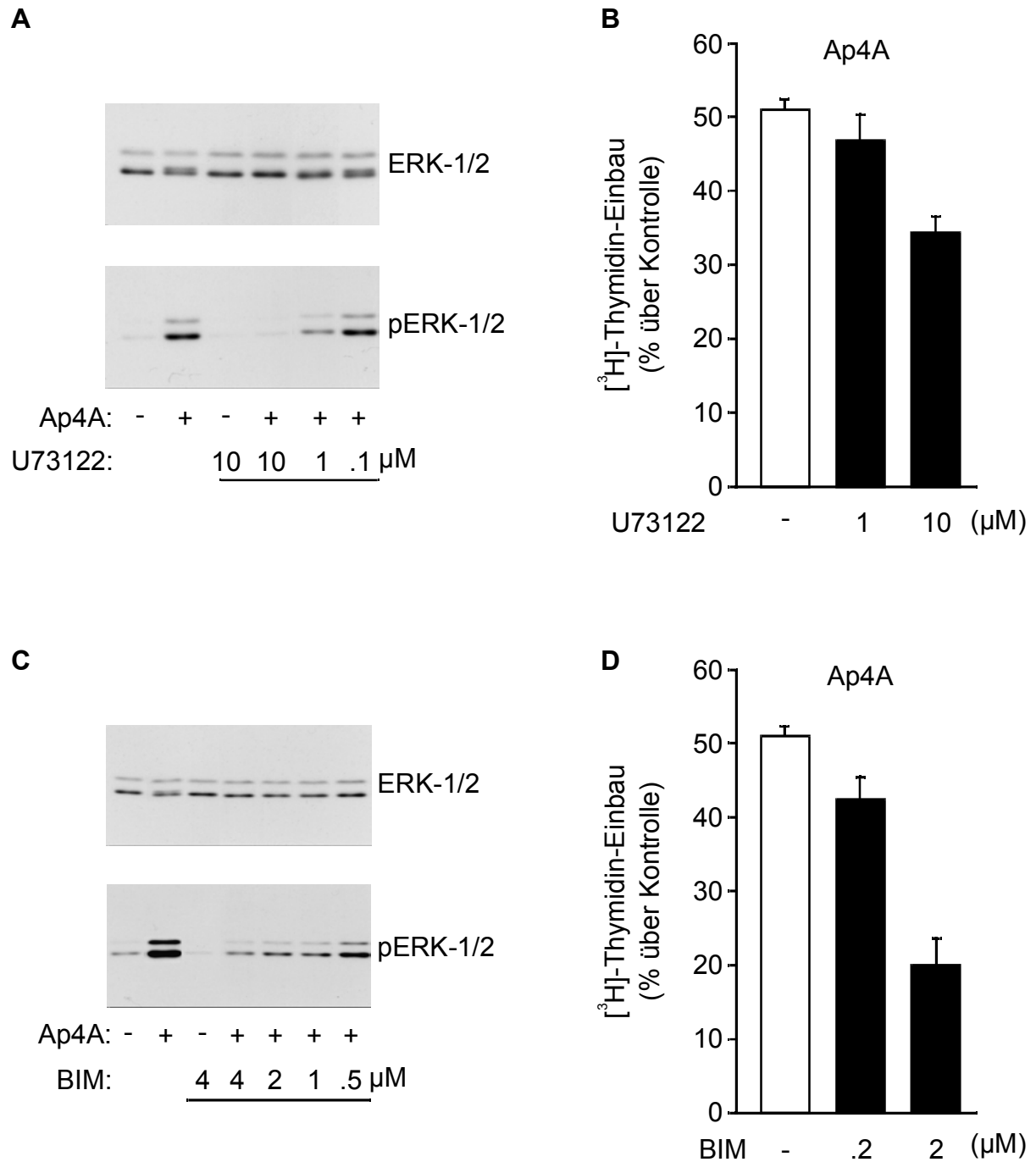


Abbildung 5: Phospholipase C β und Proteinkinase C sind an der Steigerung der DNA-Synthese und der Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt. A+C) Die für drei Tage gehungerten glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 30 Minuten mit U73122 bzw. BIM vorbehandelt und anschließend mit Ap4A (10^{-5} M) für 5 Minuten aktiviert. Die Auftrennung und die anschließende Darstellung der Proteine des Zelllysates erfolgten nach der Beschreibung im Methodenteil. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens drei gleich ausgeführten Experimenten. B+D) Die Durchführung der Bestimmung der DNA-Synthese erfolgte nach der in Kapitel 2 und in Abbildung 4 beschriebenen Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazu gehörenden Standardabweichungen von mindestens drei Experimenten mit jeweils sechs Einzelmessungen.

3.2.3 Die durch Ap4A induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 ist abhängig von der Kinase- Aktivität des EGF-Rezeptors

Es ist beschrieben, dass bei der durch das Nukleotid ATP ausgelösten intrazellulären Signaltransduktion Tyrosinkinaserzeptoren beteiligt sind (Burnstock und Mitarbeiter 2002). Diese werden über einen noch nicht komplett beschriebenen Weg aktiviert, an dem die purinergen Rezeptoren, die Phospholipase C β und unterschiedliche Wachstumsfaktoren einen essentiellen Anteil haben sollen. Daher wurde eine Beteiligung des EGF-Rezeptors an dem Signaltransduktionsweg untersucht, durch den Ap4A in glatten Gefäßmuskelzellen eine Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 und eine Steigerung der DNA-Synthese induziert. Es konnte mittels der Substanz AG1478, einem selektiven Inhibitor der EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung, eine Beteiligung des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte mittels AG1295, einem Inhibitor des PDGF-Rezeptors, eine Beteiligung dieses Tyrosinkinaserzeptors an dem untersuchten Signaltransduktionsweg weitgehend ausgeschlossen werden (Abbildung 6).

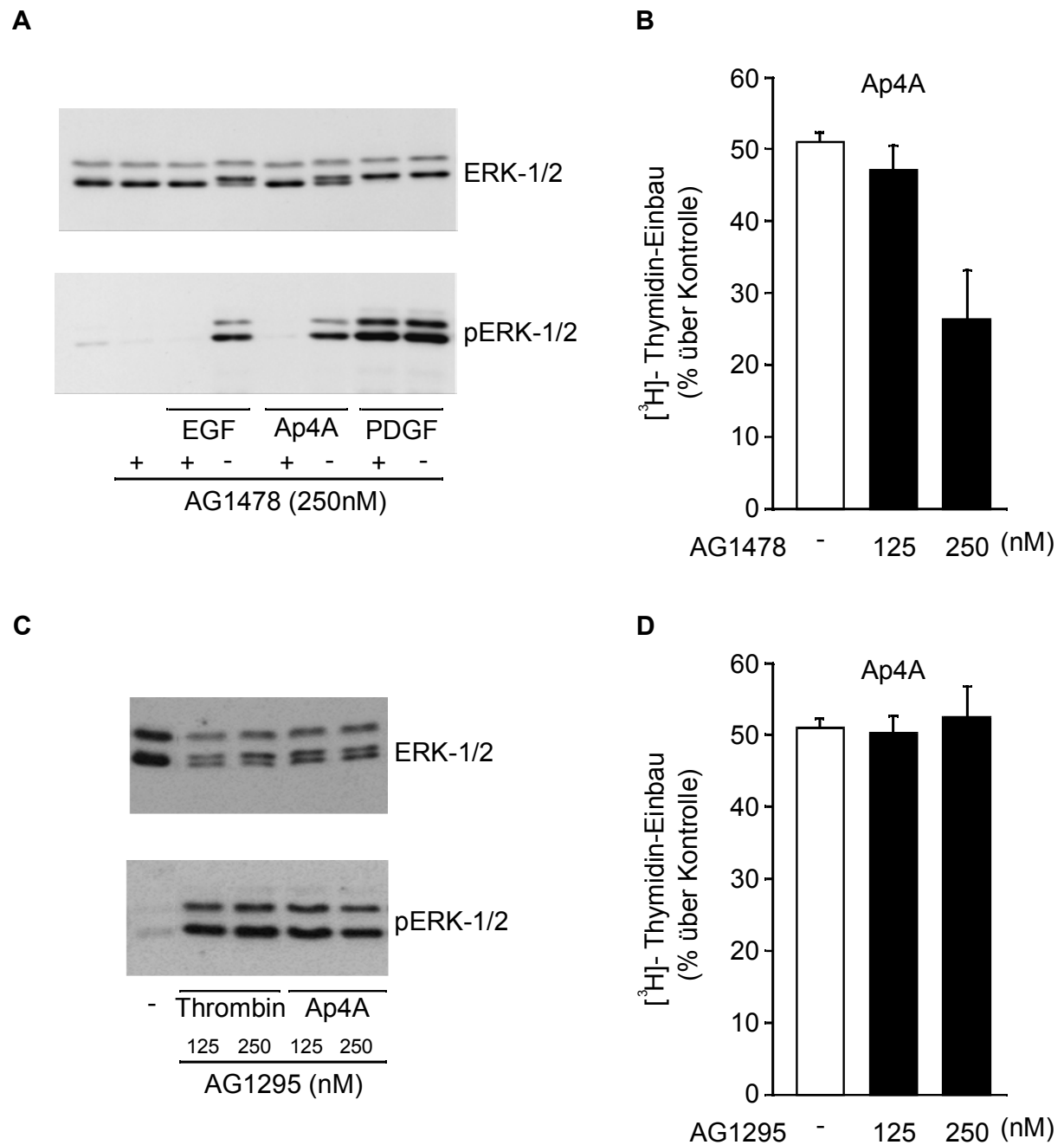


Abbildung 6: AG1478 inhibiert in glatten Gefäßmuskelzellen die durch Ap4A induzierte DNA-Synthese-Steigerung und die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2. A+C) Mittels der oben beschriebenen Westernblot- Analyse wurde die Phosphorylierung der Proteine ERK1/2 bei Inhibition der genannten zwei Rezeptoren durch Aktivierung mit Ap4A in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei Experimenten. Bei allen Experimenten wurde eine Ap4A-Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. B+D) Nach der oben beschriebenen Methode wurde die DNA-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen bei Aktivierung durch Ap4A unter Inhibition des EGF- bzw. PDGF-Rezeptors untersucht. Dargestellt sind die dabei ermittelten Mittelwerte mit den Standardabweichungen aus drei Experimenten mit mindestens sechs Einzelmessungen.

3.3.1 Ap3A und Ap4A induzieren intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhungen in GMZ

Der Nachweis, dass das Diadenosinpolyphosphat Ap4A in GMZ eine Aktivierung der PLC β induzieren kann, führte zu der Vermutung, dass auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch diese Substanz verändert werden könnte, da die PLC β über die Hydrolyse des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol generiert und Inositol-1,4,5-trisphosphat aus intrazellulären Speichern Kalzium freisetzt. Außerdem konnte zusätzlich gezeigt werden, dass in hier nicht dargestellten Versuchen durch Einsatz des intrazellulären Kalziumchelators TMB8 eine Inhibition sowohl der durch Ap4A induzierten DNA-Synthese als auch der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 induziert wurde. Aus diesem Grund wurden die Diadenosinpolyphosphate Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A auf ihren Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in mit Fura-2 beladenen GMZ untersucht. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 10^{-5} M Ap3A und Ap4A eine signifikante intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung induzierten, die annähernd so stark ausfiel wie die von ATP und Thrombin. Das Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) bewirkt typischerweise eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in GMZ über purinerge Rezeptoren (Erlinge und Mitarbeiter, 1993), wohingegen Thrombin eine solche Erhöhung über Rezeptoren bewirkt, die nicht zur Klasse der purinergen Rezeptoren gehören (Reusch und Mitarbeiter, 2001). Ap5A und Ap6A zeigten keine wesentlichen Erhöhungen der untersuchten Kalziumkonzentration im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 7).

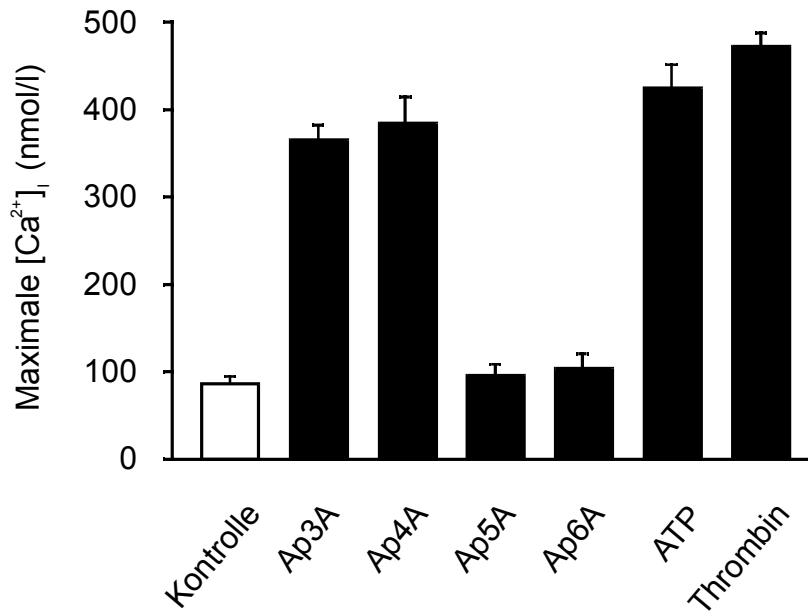


Abbildung 7: Ap3A, Ap4A, ATP und Thrombin induzieren in glatten Gefäßmuskelzellen eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Die intrazellulären Kalziumkonzentrationen wurden in mit Fura-2 (2 μ M) beladenen Zellen, die zuvor drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden, gemessen. ATP und die Diadenosinpolyphosphate wurden in einer Konzentration von 10^{-5} M, Thrombin in einer Konzentration von 2 U/ml eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Werte von Durchschnittskurven (50 Einzelmessungen) mit den dazu gehörenden Standardabweichungen.

Die Diadenosinpolyphosphate wurden in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Um zu zeigen, dass mittels dieser Konzentration eine annähernd maximale Wirkung erreicht werden kann, wurden die intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung durch ATP und Ap4A für 10^{-7} M bis hin zu 10^{-4} M gemessen. Dies ergab in einem Diagramm, bei der die intrazelluläre Kalziumkonzentration über die Konzentration des Agonisten aufgetragen wurde, eine sigmoidale Kurve, die für beide Substanzen bei der Konzentration von 10^{-5} M annähernd den maximalen Wert erreichte (Abbildung 8).

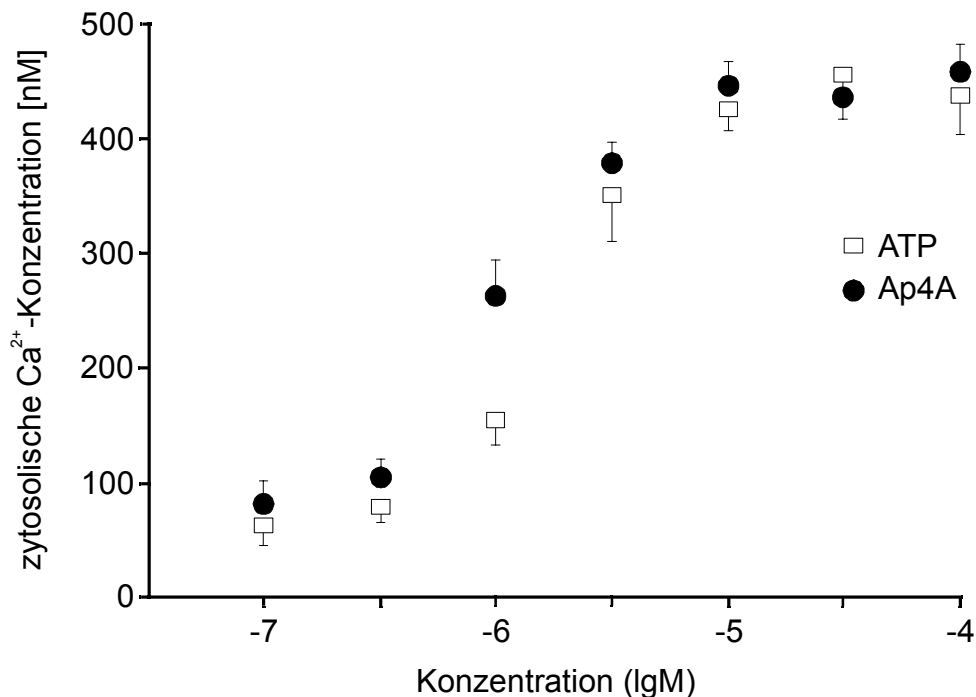


Abbildung 8: Konzentrationsabhängige, durch Ap4A und ATP induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Für die jeweiligen Konzentrationen sind die Durchschnittswerte der maximalen Konzentrationserhöhungen (n=3) von Kalzium mit den dazu gehörenden Standardabweichungen durch Ap4A und ATP dargestellt.

3.3.2 P2Y-Rezeptoren vermitteln die teilweise Pertussistoxin sensitive intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung durch Ap4A in GMZ

Um die an der von Ap4A vermittelten Kalziumkonzentrationserhöhung beteiligten Rezeptoren genauer zu klassifizieren, wurden Experimente unter kalziumfreien und unter kalziumhaltigen Bedingungen gemessen. Diese Messungen zeigten, dass Ap4A unabhängig von der Kalziumkonzentration im Extrazellularraum eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Kalzium bewirkte, womit eine Beteiligung der P2X-Rezeptoren, die Ionenkanäle darstellen, durch die im geöffneten Zustand Kalziumionen aus dem extra- in den intrazellulären Raum strömen, weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Durch eine direkt vor der Messung durchgeführte 18-stündige Inkubation der GMZ mit Pertussistoxin konnte gezeigt werden, dass die durch Ap4A induzierte intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung um die Hälfte reduziert wurde (Abbildung 9). Pertussistoxin überträgt ADP-Ribose auf heterotrimere GTP-bindende

Proteine, wobei diese ADP- Ribosylierung ausschließlich in der nukleotidbindenden alpha-Untereinheit des inhibierenden G_i -Proteins erfolgt, wodurch dieses irreversibel gehemmt wird. Durch die gezeigte Abnahme der Konzentrationserhöhung von Kalzium konnte eine eindeutige Beteiligung einer G_i -Komponente nachgewiesen werden.

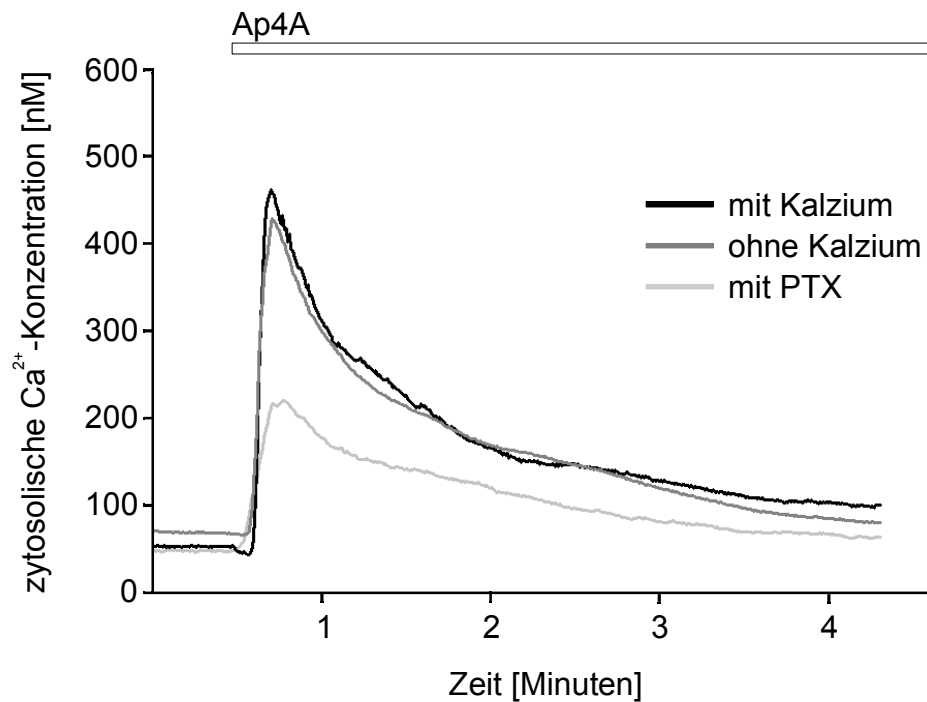


Abbildung 9: Ap4A (10^{-5} M) induziert in glatten Gefäßmuskelzellen eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung, die unabhängig von der Kalziumkonzentration im Extrazellularraum aber Pertussistoxin-sensitiv ist. Dargestellt sind die jeweiligen Durchschnittskurven ($n=4$), die in mit Fura-2 ($2 \mu\text{M}$) beladenen Zellen ermittelt wurden. Die entsprechenden Zellen wurden über 18 Stunden vor Beginn der Messungen mit Pertussistoxin (200 ng/ml) vorbehandelt. Ein nominal extrazellulär kalziumfreies Milieu wurde durch Zugabe von EDTA (1 mM) erreicht.

3.3.3 Die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher führt zu der von Ap4A induzierten Kalziumkonzentrationserhöhung

Da zuvor gezeigt werden konnte, dass die durch Ap4A induzierte intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung auch bei einem nominal kalziumfreien extrazellulären Milieu ausgelöst werden konnte, sollte darüber hinaus dargestellt

werden, dass die Kalziumkonzentrationserhöhung über die Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher erklärt werden kann. Dazu wurde die inhibitorische Substanz Thapsigargin eingesetzt. Thapsigargin ist ein aus der Wurzel der Pflanze *Thapsia garganica* gewonnener hochspezifischer Hemmstoff der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums in glatten Muskelzellen (SERCA) (Inesi und Mitarbeiter, 1992) und entleert die intrazellulären Kalziumspeicher (A. Tsukamoto und Mitarbeiter, 1993). Die Interaktion von Thapsigargin mit SERCA ist irreversibel und es wird angenommen, dass durch diese Substanz SERCA dephosphoryliert wird und die ATPase dadurch eine geringere Affinität zu Kalzium einnimmt. (Carafoli und Brini, 2000). Dieser Effekt wurde genutzt, um nachzuweisen, dass das Diadenosinpolyphosphat Ap4A nur über eine Entleerung intrazellulärer Speicher eine zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung bewirkt (Abbildung 10). Dazu wurden die GMZ zuerst mit der Substanz Thapsigargin stimuliert, was zu der erwarteten intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung durch die oben erwähnte Entleerung intrazellulärer Speicher führte. Nach dreiminütiger Wartezeit konnte nun eine Stimulation der gleichen Zellen durch Ap4A keine erneute Erhöhung der Kalziumkonzentration induzieren, was verdeutlichte, dass Ap4A seine Effekte auf den intrazellulären Kalziumspiegel dieser GMZ nur über die Beeinflussung des sarkoplasmatischen Retikulums modulieren kann.

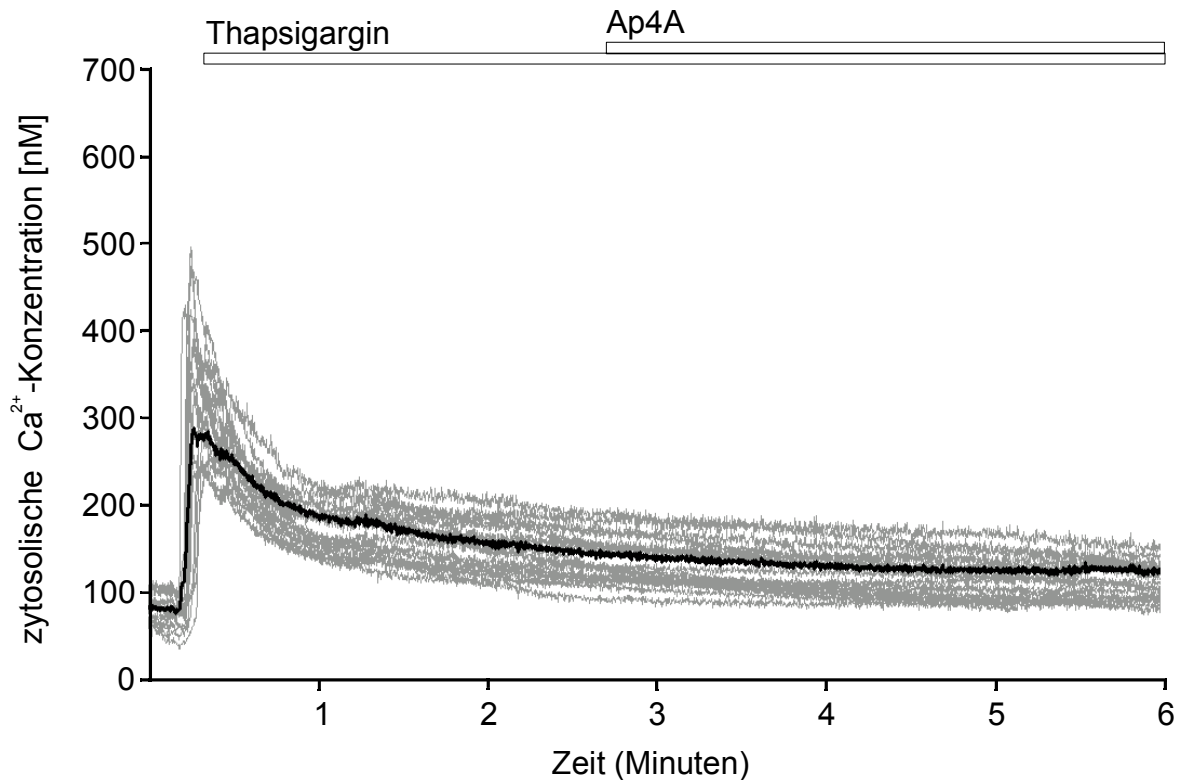


Abbildung 10: Ap4A induziert keine weitere zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung in glatten Gefäßmuskelzellen, wenn intrazelluläre Kalziumspeicher zuvor durch Thapsigargin (1 μ M) entleert wurden. Dargestellt sind die 50 Einzelmessungen und die dazu gehörende Durchschnittskurve der Konzentration des zytosolischen Kalziums in glatten Gefäßmuskelzellen, die zur Messung mit Fura-2 (2 μ M) beladen und zuvor für drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden.

3.3.4 P2Y1 vermittelt mit weiteren P2Y-Rezeptoren den durch Ap4A induzierten Anstieg der zytosolische Kalziumkonzentration

Wie im Abschnitt 3.3.2 gezeigt, sind P2X-Rezeptoren nicht an der durch Ap4A induzierten zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung beteiligt. Somit müssen P2Y-Rezeptoren diese Wirkung vermitteln. 2met-thio-ADP gilt als ein spezifischer Agonist des P2Y1-Rezeptors (Jiang und Mitarbeiter, 1997) und wurde verwendet, um eine Beteiligung dieses Rezeptors bei der Vermittlung von der Erhöhung des intrazellulären Kalziumpegels zu untersuchen. Abbildung 11 zeigt, dass Ap5A und Ap6A keinen Einfluss auf die gemessene zytosolische Kalziumkonzentration nahmen, wohingegen Ap4A die schon oben beschriebene Kalziumantwort induzierte.

2met-thio-ADP konnte daraufhin keine wesentliche Änderung des intrazellulären Kalziumspiegels bewirken, ganz im Gegensatz zu dem am Ende des Experimentes eingesetzten Thrombin. Als die Reihenfolge der Zugabe der beiden Substanzen Ap4A und 2met-thio-ADP umgekehrt wurde (Abbildung 12), konnte sowohl eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration mit Ap4A als auch mit 2met-thio-ADP erreicht werden. Aus dieser Beobachtung heraus konnte eine Beteiligung des P2Y1-Rezeptors bei der Vermittlung der intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung durch Ap4A gezeigt werden. Der spezifische P2Y1-Agonist 2met-thio-ADP konnte nur seine Wirkung erzielen, wenn nicht zuvor durch Ap4A dessen Rezeptor aktiviert und internalisiert wurde.

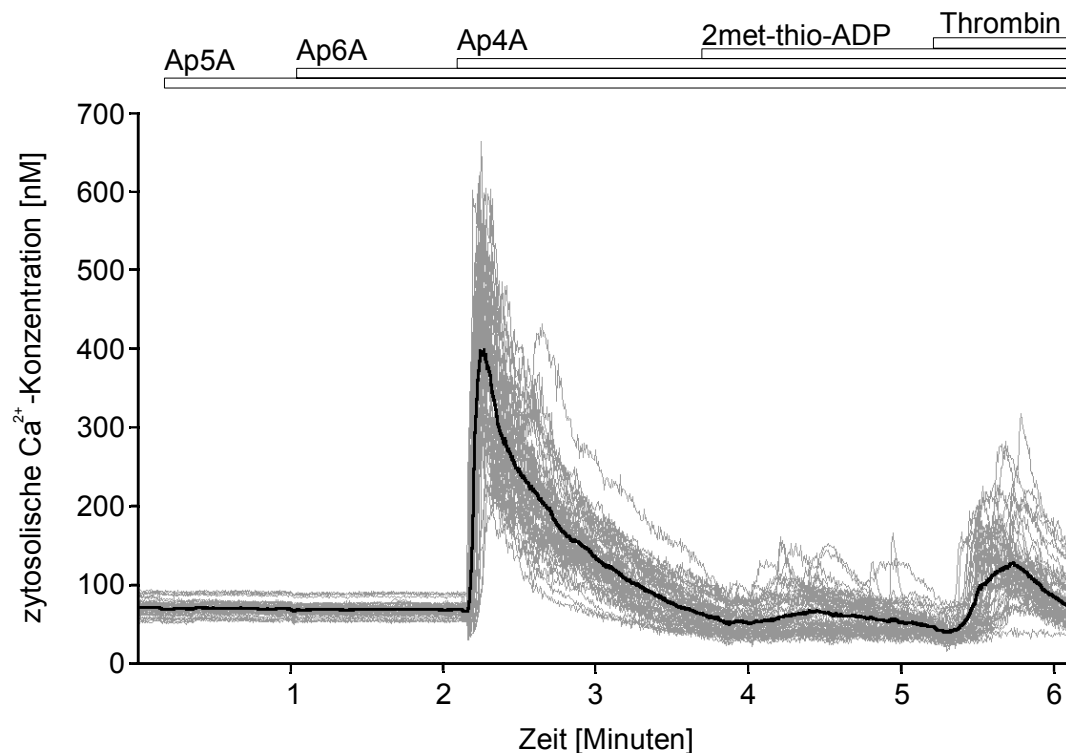


Abbildung 11: 2met-thio-ADP induziert nach vorheriger Aktivierung durch Ap4A in GMZ keine zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung. Dargestellt sind 50 Einzelmessungen mit der dazu gehörenden Durchschnittskurve von intrazellulären Kalziumkonzentrationen in mit Fura-2 (2 μ M) beladenen glatten Gefäßmuskelzellen. Die Zellen wurden vor den jeweiligen Messungen über drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und mit den entsprechenden Agonisten aktiviert. Ap5A, Ap6A, Ap4A und 2met-thio-ADP kamen in den Konzentrationen von 10^{-5} M, Thrombin in der Konzentration von 2 U/ml zum Einsatz.

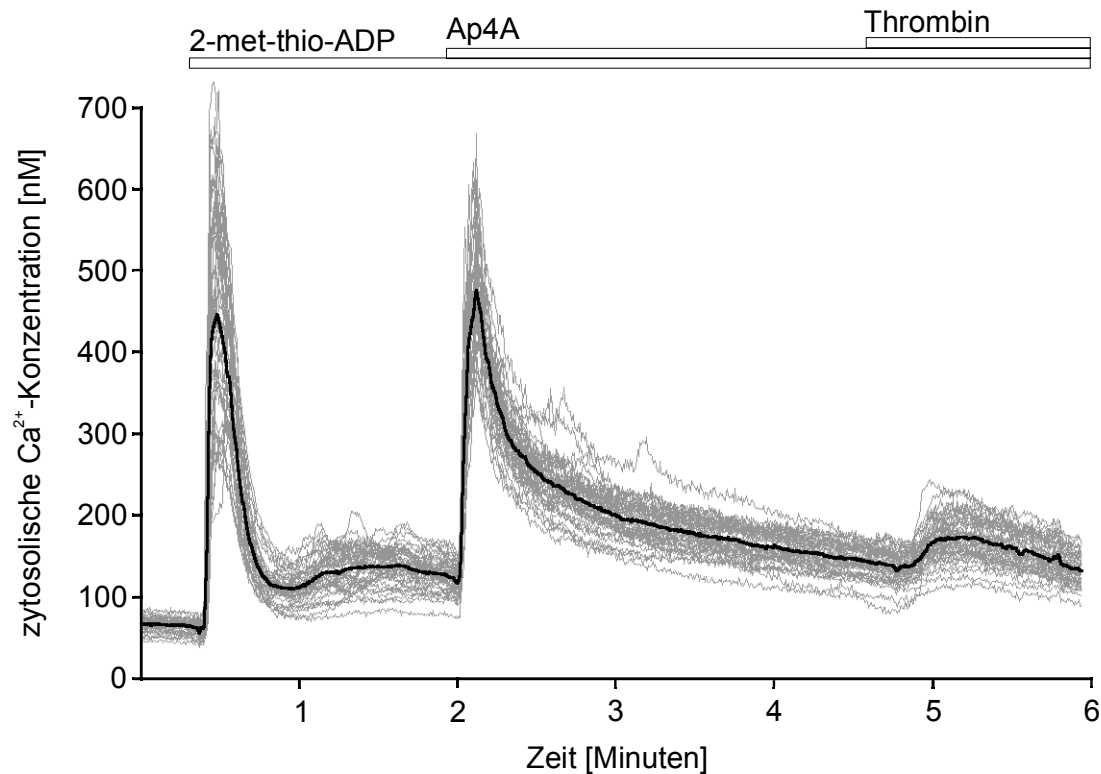


Abbildung 12: Ap4A induziert nach vorangegangener 2met-thio-ADP-Stimulation eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung in GMZ. Dargestellt sind 50 Einzelmessungen mit der dazu gehörenden Durchschnittskurve von intrazellulären Kalziumkonzentrationen in mit Fura-2 (2 μ M) beladenen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte. Die Zellen wurden vor den jeweiligen Messungen über drei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert und mit den entsprechenden Agonisten aktiviert. Ap4A und 2met-thio-ADP kamen in den Konzentrationen von 10^{-5} M, Thrombin in der Konzentration von 2 U/ml zum Einsatz.

3.4 Ap4A induziert in glatten Gefäßmuskelzellen keine Differenzierung

Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 kann in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Übermittlung von proliferativen oder differenzierenden Signalen bedeutend sein. Dabei spielt nicht nur allein die Phosphorylierung dieser Kinasen eine wichtige Rolle, sondern auch die Dauer der Stimulation der Proteine ERK1/2 (Marshall, 1995). Reusch und Mitarbeiter (2001) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Thrombin zwei Phasen der ERK-Aktivierung induziert, wobei beide Phasen für die Differenzierung von GMZ bedeutsam sind. Diesem Gedanken folgend wurde der durch Ap4A induzierte Grad der Phosphorylierung von ERK1/2 innerhalb eines Stimulationszeitraumes von 180 Minuten gemessen. Es zeigte sich für die ersten 15 Minuten eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der untersuchten MAP-

Kinasen, die den stärksten Wert bei zehn Minuten aufwies. Im Zeitfenster zwischen 30 bis 180 Minuten der Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen durch Ap4A zeigte sich keine oder nur eine unerhebliche Steigerung des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2. Eine von der Arbeitsgruppe Reusch beschriebene zweite Phase der ERK-Phosphorylierung konnte nicht erkannt werden (Abbildung 13).

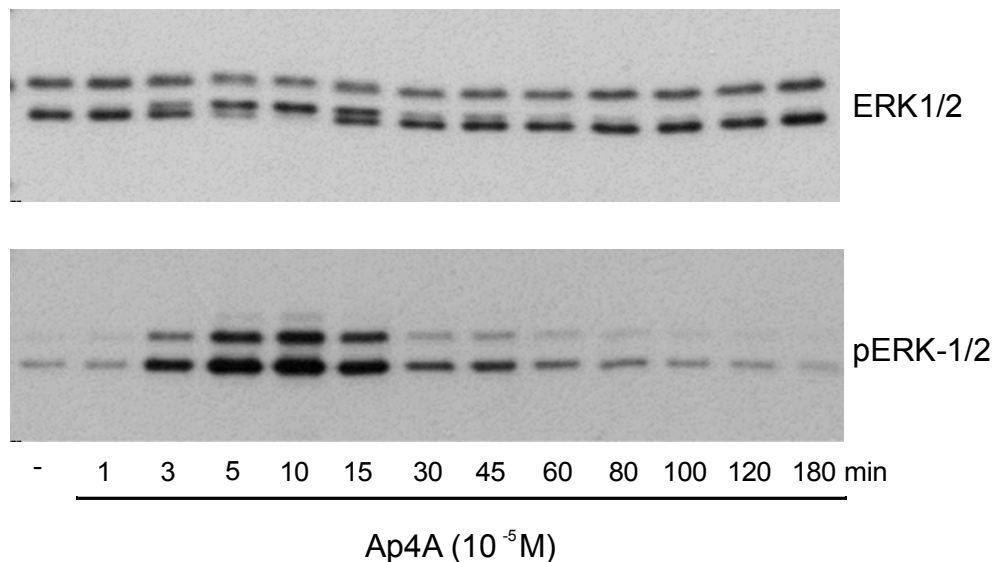


Abbildung 13: Zeitabhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch Stimulation mit Ap4A. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in 60 mm Kulturschalen subkultiviert und über drei Tage einem serumfreien Medium ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die GMZ für verschiedene Zeiträume mit Ap4A in einer Konzentration von 10^{-5} M stimuliert. Nach Ablauf der unterschiedlichen Zeiten erfolgte die Lyse der glatten Gefäßmuskelzellen und die Analyse mittels Immunoblots. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mehr als drei identisch durchgeführten Experimenten.

3.5 Induktion von Stressfasern in Swiss 3T3-Fibroblasten

In eukaryoten Zellen kann es durch unterschiedliche Reize zum intrazellulären Bündeln von Aktinfilamenten kommen, das als Induktion von Stressfasern bezeichnet wird. Diese Organisation des Aktin-Zytoskeletts wird über Rho-Proteine reguliert, wobei eine genaue Beschreibung des dazu führenden Signaltransduktionsweges fehlt. Bekannt ist aber, dass für eine Induktion von Stressfasern G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sowohl der Gruppe G_{12} als auch der Gruppe G_q angehören, essentiell sind.

Es sollte nun geklärt werden, ob die durch die untersuchten Diadenosinpolyphosphate aktivierten purinergen Rezeptoren auch mit G-Proteinen der Gruppe G_{12} koppeln können. Dafür wurden Swiss 3T3-Fibroblasten mit den Diadenosinpolyphosphaten Ap3A, Ap4A, Ap5A, Ap6A und dem Nukleotid ATP exponiert. Darüber hinaus wurde dies mit der Lysophosphatidsäure LPA und Thrombin ausgeführt, da bekannt ist, dass LPA spezifisch über Rezeptoren, die mit G_{13} gekoppelt sind, Stressfasern induziert und dass Thrombin dieses spezifisch über Rezeptoren ausübt, die ihre Wirkung über Proteine der Gruppe G_{12} vermitteln. Das in den zuvor beschriebenen Experimenten eingesetzte Zellsystem der aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte musste dabei verlassen werden, da es nicht möglich war, ein unstimuliertes Basalniveau bei der Darstellung der Stressfasern zu erreichen. Es zeigte sich, dass sowohl LPA als auch Thrombin in Swiss 3T3-Fibroblasten eine Stressfaserinduktion bewirkten, während ATP und alle eingesetzten Diadenosinpolyphosphate eine solche Reaktion nicht zeigten (Abbildung 14).

Um auszuschließen, dass dieses gezeigte Ergebnis nur durch das Fehlen von purinergen Rezeptoren auf den Swiss 3T3-Fibroblasten zurückzuführen ist, wurde darüber hinaus auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration in diesem Zellsystem bei Aktivierung durch Ap4A untersucht (Abbildung 15). Dabei konnte gezeigt werden, dass Ap4A auch in Swiss 3T3-Fibroblasten eine vom extrazellulären Kalziumpegel unabhängige Konzentrationserhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels bewirkte, womit auch die Existenz und Expression der purinergen Rezeptoren bewiesen war. Somit wurde auf diesem Weg kein Hinweis dafür gefunden, dass purinerge Rezeptoren mit G-Proteinen der Klasse G_{12} koppeln.

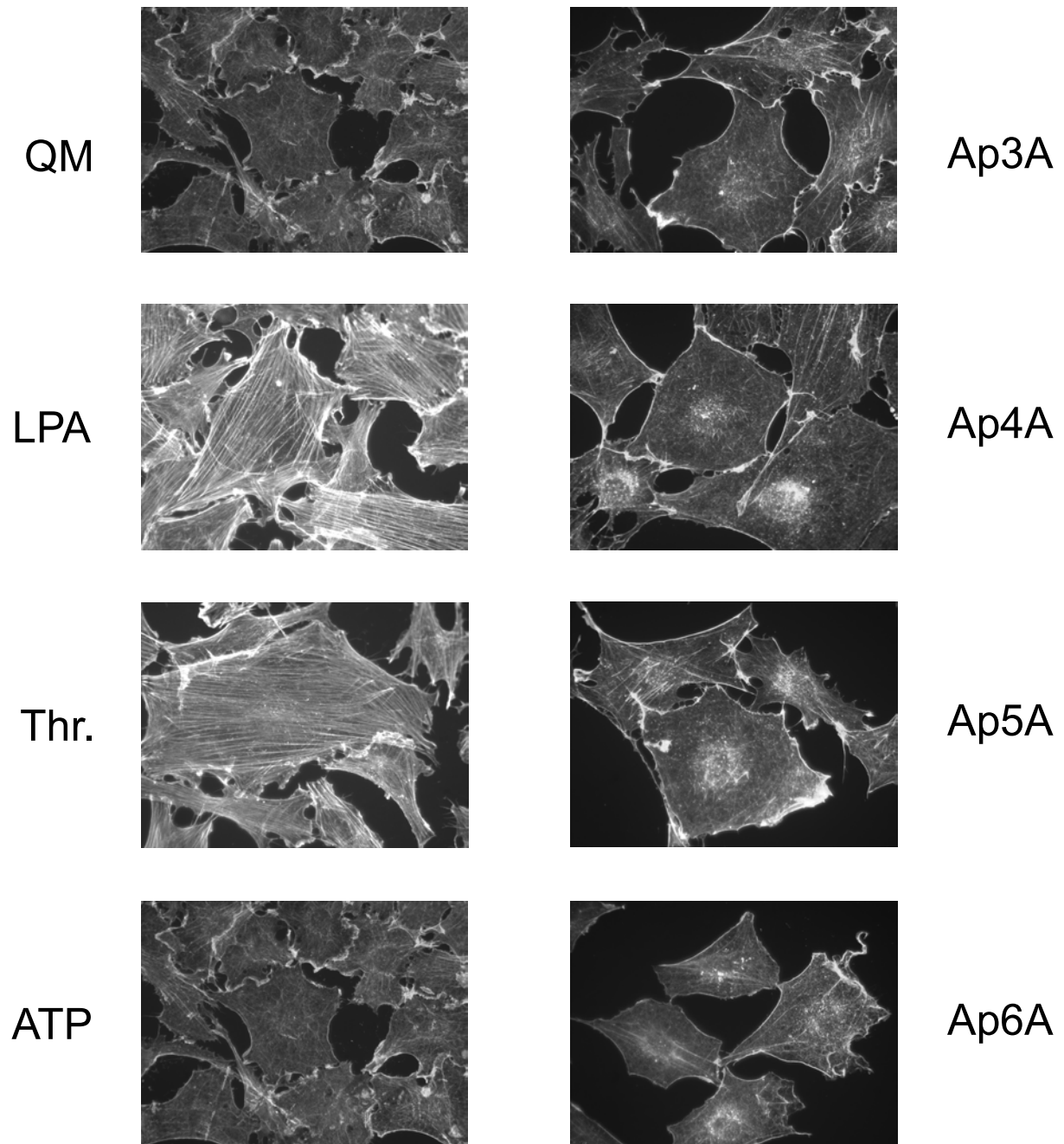


Abbildung 14: Stimulation der Aktin-Stressfaserbildung durch LPA (1 μM) und Thrombin (2 U/ml) bei fehlender Bündelung der Aktinfilamente durch Ap3A, Ap4A, Ap5A, Ap6A und ATP (10^{-5} M). Serumentzogene Swiss 3T3-Fibroblasten wurden für 30 Minuten mit den entsprechenden Agonisten ausgesetzt, mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Aktin-Stressfasern wurden dann mittels ALEXA-Phalloidin sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus mindestens drei Experimenten.

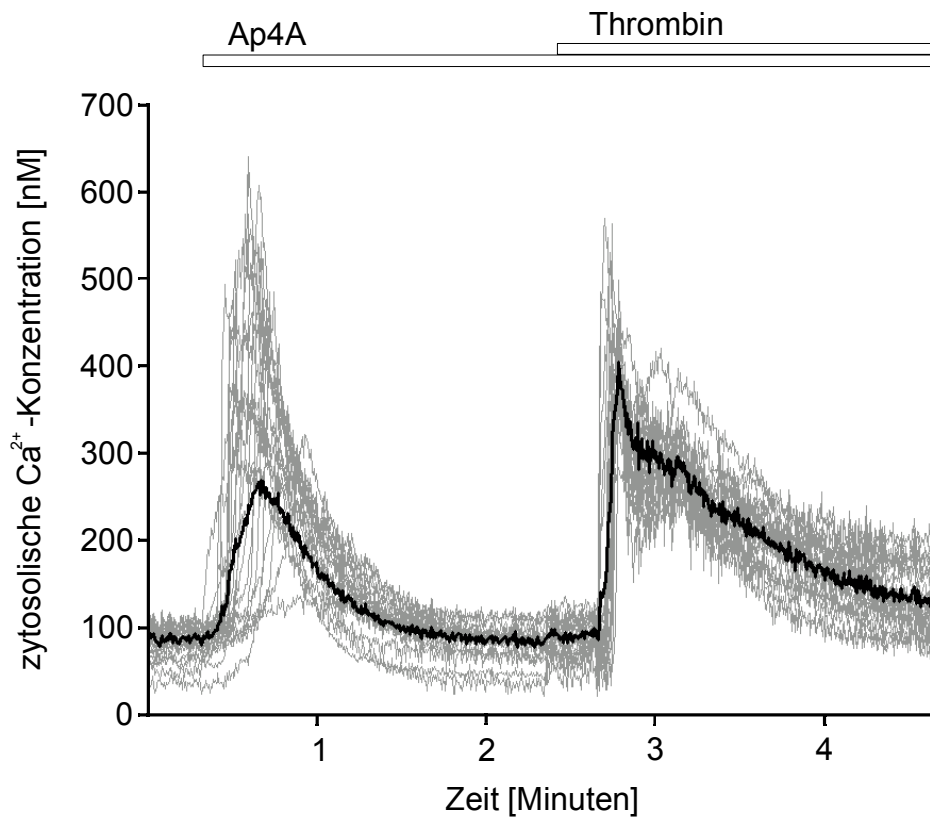


Abbildung 15: Zytosolische Kalziumkonzentrationserhöhung durch Aktivierung mit Ap4A (10^{-5} M) und Thrombin (2 U/ml) in Swiss 3T3-Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden über einen Tag unter serumfreien Bedingungen kultiviert und nach Beladung mit Fura2 (2 μ M) mit den genannten Agonisten aktiviert. Dargestellt sind 50 Einzelmessungen mit der dazu gehörenden Mittelwertkurve. Dieses Ergebnis konnte durch zwei Versuche gleicher Art bestätigt werden.