

4. Diskussion

Diadenosinpolyphosphate induzieren abhängig von der Länge ihrer Phosphatbrücke unterschiedliche Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Diadenosinpolyphosphate Ap3A und Ap4A im Gegensatz zu Ap5A und Ap6A auf glatte Gefäßmuskelzellen mitogene Eigenschaften aufweisen, wohingegen Hinweise auf eine Differenzierung durch diese Diadenosinpolyphosphate nicht gefunden werden konnten. Die Vermittlung des mitogenen Signals erfolgt über einen Signalweg, der mit der Aktivierung purinerger P2Y-Rezeptoren beginnt und mit der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 endet, die über eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern nukleäre Transkriptionsfaktoren regulieren und proliferative Signale übermitteln. Heidenreich und Mitarbeiter beschrieben 1995 proliferative Effekte von Diadenosinpolyphosphaten auf renale Mesangiumzellen der Ratte. In der hier vorgestellten Arbeit wird gezeigt, dass Ap3A und Ap4A in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte eine Steigerung der DNA-Synthese und eine Proliferation induzieren. Dies schließt sich der Beobachtung an, dass das in der Wirkung der Diadenosinpolyphosphate sehr ähnliche Nukleotid ATP ebenso proliferativ auf glatte Gefäßmuskelzellen wirkt (Burnstock und Mitarbeiter, 2002). Für die Diadenosinpolyphosphate Ap5A und Ap6A konnten keine proliferativen Effekte gezeigt werden.

4.1 Diadenosinpolyphosphate aktivieren die MAP-Kinasen ERK1/2

Die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 sind Teile von kaskadenartig ablaufenden Signaltransduktionswegen, die Signale wie die der Proliferation in den Zellkern von glatten Gefäßmuskelzellen transportieren. Für die Diadenosinpolyphosphate Ap3A und Ap4A, die proliferativ auf glatte Gefäßmuskelzellen wirken, konnte gezeigt werden, dass sie eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 induzieren, wohingegen eine Aktivierung von JNK und p38 durch diese Substanzgruppe nicht nachgewiesen werden konnte. Es galt nun, essentielle Elemente eines Weges zu suchen, der durch die Diadenosinpolyphosphate stimuliert wird und zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 führt, um beschreiben zu können, wie Diadenosinpolyphosphate proliferativ auf glatte Gefäßmuskelzellen wirken

(Abbildung 16). Dabei wurde das Diadenosinpolyphosphat Ap₄A als repräsentative stimulierende Substanz herangezogen.

Diadenosinpolyphosphate können nur auf Zellen Einfluss nehmen, die entsprechende Rezeptoren exprimieren. Die Diadenosinpolyphosphate besitzen eine hohe Affinität zu den purinergen P₂-Rezeptoren, die in die zwei Klassen der P₂X- und P₂Y-Rezeptoren unterteilt werden. Glatte Gefäßmuskelzellen können beide Klassen zum gleichen Zeitpunkt exprimieren, wobei in diesem Zusammenhang der Art des Phänotyps der glatten Gefäßmuskelzellen eine große Bedeutung zukommt. Campbell und Mitarbeiter (1985) zeigten, dass es einerseits den kontraktilen, andererseits den proliferativen Phänotyp gibt, für die jeweils ein unterschiedliches Muster der Expression von Rezeptoren nachgewiesen wurde. So gibt es eine erhöhte Synthese und Expression von ionotropen P₂X-Rezeptoren in kontraktilen bzw. differenzierten glatten Gefäßmuskelzellen, wobei der proliferative Phänotyp einen signifikant erhöhten Expressionsgrad von P₂Y-Rezeptoren zeigt (Erlinge und Mitarbeiter, 1998). Für die in dieser Arbeit untersuchten glatten Gefäßmuskelzellen konnte von der Arbeitsgruppe Reusch und Mitarbeiter mittels PCR die Existenz der Rezeptoren P₂Y₁, P₂Y₂, P₂Y₄ und P₂Y₆ nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde mit dem spezifischen P₂Y₁-Agonisten 2met-thio-ADP eine Aktivierung des P₂Y₁-Rezeptors durch Ap₄A gezeigt, die eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung zur Folge hatte. Durch die Untersuchung des in diesen Zellen durch Diadenosinpolyphosphate induzierten intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstieges konnte kein Hinweis für die Expression von P₂X-Rezeptoren gefunden werden, was zu den von der Arbeitsgruppe Erlinge formulierten Aussagen über den proliferativen Phänotyp von glatten Gefäßmuskelzellen passt. Eine genauere Abklärung der Frage, welche Subtypen der P₂Y-Rezeptoren bei der Wirkungsentfaltung der Diadenosinpolyphosphate in glatten Gefäßmuskelzellen eine Bedeutung besitzen, wurde durch die Tatsache erschwert, dass es bis heute noch keine zuverlässigen spezifische Antagonisten für die einzelnen Rezeptorsubtypen gibt.

Da die P₂Y-Rezeptoren zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, sollte geklärt werden, welche G-Proteine bei dem untersuchten Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass die durch Ap₄A induzierte intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung durch Inhibition mit Pertussistoxin etwa um 50% reduziert wurde und dass durch direkte Inhibition der PLC β sowohl die durch Ap₄A

induzierte gesteigerte DNA-Synthese als auch die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 gehemmt wurde. Dies verdeutlichte eine Beteiligung der G-Proteine $G_{i,0}$ und $G_{q,11}$ bei der Vermittlung mitogener Signale, da zwei Wege zu einer Aktivierung der PLC β führen können: Einerseits können die α -Untereinheiten der Pertussistoxin-insensitiven G_q -Familie, andererseits der $\beta\gamma$ -Komplex der durch Pertussistoxin inhibierbaren G_i -Familie eine Stimulation der PLC β induzieren (Taylor und Mitarbeiter, 1991; Lee und Mitarbeiter, 1992; Camps und Mitarbeiter, 1992; Katz und Mitarbeiter, 1992).

Über die Aktivierung der PLC β werden über die Hydrolyse des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die „second messenger“ Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol generiert. Das Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C. Als Proteinkinasen C (PKC) bezeichnet man eine Gruppe Kalzium- und Phospholipid-abhängiger Proteinkinasen-Isoformen, die an multiplen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Die PKC führt unter anderem zu einer Stimulation der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade. Über die Inhibition der PKC mittels Bisindolylmaleimid (BIM) konnte eine Reduktion der durch Ap4A induzierten Aktivierung von ERK1/2 erreicht werden. Das Inositol-1,4,5-trisphosphat bindet an spezifische Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums der glatten Gefäßmuskelzellen, die als Liganden-aktivierbare Kalziumkanäle über eine Erhöhung ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit eine Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken. Eine in dieser Arbeit nicht gezeigte Untersuchung demonstrierte, dass auch über die Inhibition des intrazellulären Kalziums durch Einsatz des Kalziumchelators TMB8 die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade verringert werden konnte.

Zur Verdeutlichung, dass die durch Ap4A induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 tatsächlich durch die Aktivierung der Ras-Raf-MEK-Kaskade bewirkt wird, wurde die für die MAP-Kinase-Kinase MEK inhibitorisch wirkende Substanz PD98059 eingesetzt, um darüber eine Reduktion der Ap4A induzierten DNA-Synthese-Steigerung und der Phosphorylierung von ERK1/2 zu zeigen.

4.2 Die Kinase- Aktivität des EGF-Rezeptors ist an der durch Ap4A induzierten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 beteiligt

Untersuchungen von Signaltransduktionswegen, die mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren beginnen und zu einer Stimulation der Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade führen, konnten eine noch nicht vollständig geklärte Beteiligung des EGF-Rezeptors beschreiben (Moghal und Mitarbeiter, 1999). Der EGF-Rezeptor gehört zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren, die über eine Tyrosinkinaseaktivität in ihrem zytosolischen Anteil verfügen, die durch Bindung eines Liganden aktiviert wird und zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt. An diese Phosphotyrosinreste des Rezeptors können wiederum Proteine mit SH₂-Domänen andocken und auf diese Weise aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des EGF-Rezeptor-Kinase-Inhibitors AG1478 eine Beteiligung dieses Rezeptors an dem durch Ap4A aktivierten und zur Phosphorylierung von ERK1/2 führenden Signaltransduktionsweges nachgewiesen. Des Weiteren konnte durch Inhibition dieses Rezeptors die durch Ap4A induzierte Steigerung der DNA-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen verringert werden. Es bleibt die Frage, wie der EGF-Rezeptor an dem das mitogene Signal weiterleitenden Weg beteiligt ist. Dieser Frage nachgehend konnten Daub und Mitarbeiter (1997) in COS7-Zellen eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors nach Stimulation von G_{q,11}- und G_{i,0}-gekoppelten Rezeptoren darstellen. Im gleichen Zellsystem wurde außerdem gezeigt, dass der βγ-Komplex von G_i-Proteinen, die an adrenerge α₂-Rezeptoren binden, über eine Stimulation der Src-Kinase eine Aktivierung der Tyrosinkinase des EGF-Rezeptors induziert (Luttrell und Mitarbeiter, 1997). Dies ist wiederum eine Voraussetzung für die Bindung eines Adapterproteins Grb2, das über die dafür nötige SH₂-Domäne verfügt und über die Aktivierung des „Guaninnukleotid-releasing“ Proteins SOS das kleine G-Protein Ras stimuliert, womit die dann folgende Kaskade Raf-MEK-ERK1/2 ablaufen kann. Es kann vermutet werden, dass diese Prozesse auch bei der Stimulation der P2Y-Rezeptoren durch Ap4A zu beobachten sind.

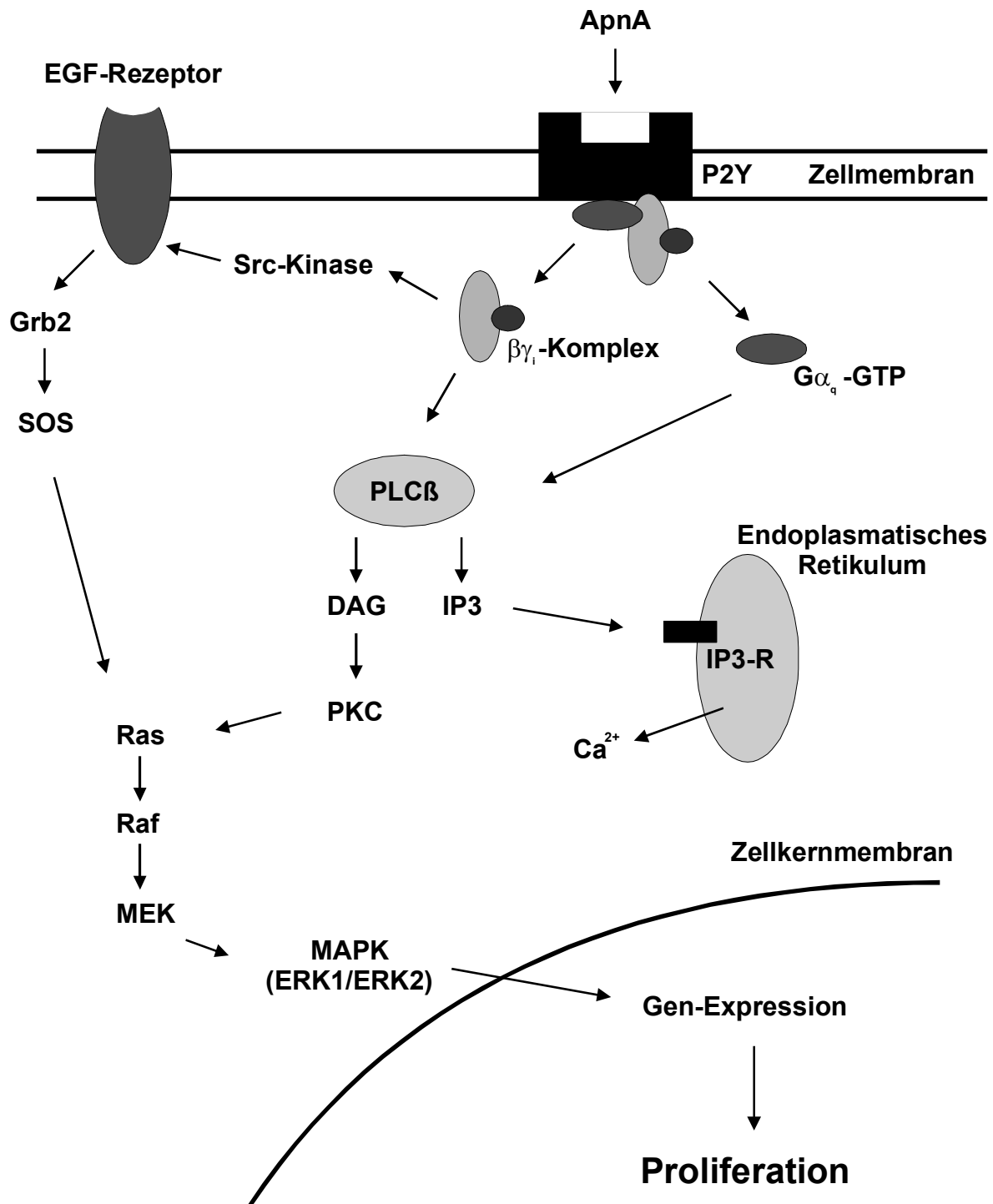


Abbildung 16: Schematische Darstellung von Signaltransduktionswegen, die über die Bindung von Ap4A an purinerge P2Y-Rezeptoren aktiviert werden und zu eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen führen könnten.

4.3 Diadenosinpolyphosphate induzieren keine Stressfasern in Swiss 3T3-Fibroblasten

Es ist ungeklärt, ob die durch Diadenosinpolyphosphate stimulierten P2Y-Rezeptoren mit G-Proteinen der G_{12} -Familie koppeln. Um diese Frage zu beantworten, wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie eine Induktion von Stressfaserbildung in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Es ergab sich das Problem, dass schon in unstimulierten glatten Gefäßmuskelzellen Stressfasern dargestellt werden konnten, so dass eine Stimulierung durch entsprechende Agonisten mit Hilfe dieser Methode nicht mehr gezeigt werden konnte. Swiss 3T3-Fibroblasten zeigten hingegen unstimuliert diese Problematik nicht und wurden aus diesem Grunde verwendet, um die oben genannte Fragestellung zu bearbeiten.

Erstmals konnten Buhl und Mitarbeiter (1995) zeigen, dass die Expression daueraktiver Mutanten sowohl von $G_{\alpha_{12}}$ als auch von $G_{\alpha_{13}}$ eine Rho-vermittelte Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen in Swiss-3T3-Fibroblasten induziert. Dazu konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren unabhängig von G_{q^-} , G_{11^-} und $G_{i,0^-}$ -Proteinen unter differentieller Involvierung von $G_{\alpha_{12}}$ und $G_{\alpha_{13}}$ eine Rho-abhängige Stressfaserbildung bewirkt (Gohla und Mitarbeiter, 1998), wobei bei der Signaltransduktion, die über das $G_{\alpha_{13}}$ -Protein verläuft, der EGF-Rezeptor eine essentielle Rolle einnimmt. Rezeptoren, denen eine Kopplung an G-Proteinen der $G_{\alpha_{12}}$ -Familie schon nachgewiesen worden ist, sind zum Beispiel Tromboxan- und Thrombin-Rezeptoren in Thrombozyten und Rezeptoren für das thyreotrope Hormon (TSH) in Schilddrüsenzellen.

Weder Diadenosinpolyphosphate noch das Nukleotid ATP konnten in Swiss-3T3-Zellen eine Induktion von Stressfasern bewirken, obwohl über die Messung des intrazellulären Kalziumspiegels der Fibroblasten die Existenz von purinergen P2Y-Rezeptoren nachgewiesen werden konnte. Somit gelang auch in diesen Zellen kein Nachweis für P2Y-Rezeptoren, die mit G-Proteinen der $G_{\alpha_{12,13}}$ -Familie funktionell verbunden sind.

4.4 Ap4A induziert in glatten Gefäßmuskelzellen keine Differenzierung

Glatte Gefäßmuskelzellen können sich in zwei Phänotypen, den proliferativen und den differenzierten, präsentieren. Der differenzierte Typ zeigt im Unterschied zu den mitogenen Gefäßmuskelzellen eine erhöhte Synthese von kontraktilen Proteinen wie dem α -Aktin und dem Myosin und bietet somit die Voraussetzung für die Ausführung von Kontraktionen in glatten Gefäßmuskelzellen. Diese differenzierten Zellen sind unter anderem charakterisiert durch die Synthese spezifischer schwerer Ketten des Myosins (smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC), die in zwei Isoformen exprimiert und im proliferativen Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen reduziert synthetisiert werden. Im Rahmen der Pathogenese von Gefäßerkrankungen wie der Arteriosklerose ist die Umwandlung des Phänotyps von der differenzierten hin zur proliferativen Form (phänotypische Modulation) von Bedeutung. Dabei stellt sich die Frage, ob Substanzen existieren, die eine solche Modulation induzieren. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren wie das PDGF, EGF und IGF eine Steigerung der Proliferationsrate von glatten Gefäßmuskelzellen induzieren, die sich über eine erniedrigte Expression von kontraktilen Proteinen in diesen Zellen charakterisieren (Jawien und Mitarbeiter, 1992; Jackson und Mitarbeiter, 1993; Arnquist und Mitarbeiter, 1995). Dem gegenüber stand die Beobachtung, dass Thrombin eine solche Wirkung an glatten Gefäßmuskelzellen nicht entfaltet, sondern vielmehr eine Umwandlung des dedifferenzierten in einen differenzierten Phänotyp fördert. Reusch und Mitarbeiter (2001) demonstrierten, dass Thrombin zwei Phasen der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 induziert, wobei beide für die Vermittlung differenzierender Signale von Bedeutung sind. Der Wachstumsfaktor PDGF induziert eine solche von der Zeit abhängige Phosphorylierung von ERK1/2 nicht. In dieser Arbeit wurde für Ap4A gezeigt, dass es ähnlich wie das PDGF zeitabhängig eine monophasische Phosphorylierung von ERK1/2 induziert, wohingegen eine zweite Phase dieser Phosphorylierung, wie sie zum Beispiel Thrombin zeigt, durch Ap4A ausgeschlossen werden konnte. Dies führte zu der These, dass Ap4A keine differenzierenden Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen besitzt. Dies wird durch die von der Arbeitsgruppe Reusch noch nicht veröffentlichte Beobachtung erhärtet, dass Ap4A neben den weiteren Diadenosinpolyphosphaten Ap3A, Ap5A und Ap6A keine Steigerung der Aktivität des SM-MHC-Promotors (smooth muscle-myosin heavy chain) induziert. Der Grad der Aktivierung des SM-

MHC-Promotors wird dabei als ein Maß der Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen angesehen, da sie indirekt Hinweise darauf bietet, wie stark Proteine, die charakteristisch für den differenzierten Phänotyp dieser Zellen sind, synthetisiert werden. Eine Aktivitätssteigerung dieses Promoters ist typischerweise bei Substanzen wie Thrombin zu finden, die *in vitro* zu einer Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen führen.

4.5 Bedeutung der intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung

In glatten Muskelzellen ist eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung essentielle Voraussetzung für eine Kontraktion. Für die in dieser Arbeit untersuchten Diadenosinpolyphosphate Ap₃A und Ap₄A wurde eine solche Erhöhung nach Stimulation festgestellt, die über die Aktivierung von P₂Y-Rezeptoren erklärt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass dies Teil eines durch diese Diadenosinpolyphosphate aktivierten Signaltransduktionsweges ist, der ein mitogenes Signal in den Zellkern transportiert. Doch bleibt die Frage offen, ob nicht auch das aus den intrazellulären Speichern freigesetzte Kalzium zu einer Kontraktion der Zelle, wie es auch schon von der Arbeitsgruppe Erlinge (1998) für ATP postuliert wurde, führen könnte. Bisher sind kontraktile Effekte der Diadenosinpolyphosphate in glatten Muskelzellen hauptsächlich durch die Aktivierung von P₂X-Rezeptoren beschrieben worden (Van der Giet und Mitarbeiter, 1998). Diese P₂X-Rezeptoren vermitteln dabei als Ionenkanäle eine Diffusion extrazellulären Kalziums in den intrazellulären Raum und damit eine intrazelluläre Kalziumkonzentrationserhöhung. Ein sich dadurch bildender Calmodulin-Kalzium-Komplex induziert daraufhin die Aktivierung der Myosinkinase, die unter ATP-Verbrauch Teile der Myosinfilamente der glatten Muskelzellen phosphoryliert, was die Voraussetzung zur so genannten Querbrückenbildung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten und zur sich daraus ergebenden Kontraktion darstellt.

Die Bedeutung von P₂Y-Rezeptoren im Rahmen einer Kontraktion glatter Muskelzellen ist bis heute weitgehend ungeklärt, und man nimmt an, dass diese Rezeptorenklasse eher bei der gegenteiligen Reaktion, der Dilatation, ihre Bedeutung findet. Van der Giet und Mitarbeiter (1998) beschrieben dilatatorische Effekte von Diadenosinpolyphosphaten in renalen Widerstandsgefäßen, die über

eine P2Y-vermittelte Synthese von Stickstoffmonoxyd (NO) in Endothelzellen erklärt wurden. Dabei führt das durch die NO-Synthase aus Arginin gebildete NO in den glatten Muskelzellen zu einer Konzentrationserhöhung des „second messengers“ cGMP, das die Relaxion von glatten Gefäßmuskelzellen letztendlich vermittelt.

4.6 Unterschiedliche Wirkungen der einzelnen Diadenosinpolyphosphate

Die einzelnen über die Länge der Phosphatbrücke definierten Diadenosinpolyphosphate können zum Teil entgegengesetzte Wirkungen induzieren. In glatten Gefäßmuskelzellen wurden Kontraktions- und Dilatationsvorgänge, induziert durch die einzelnen Diadenosinpolyphosphate, spezifisch untersucht. Dabei spielt die Expression der Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen und den Endothelzellen der Gefäße eine essentielle Rolle bei der Entscheidung, ob die Diadenosinpolyphosphate dilatativ oder kontrahierend wirken. So wird die Dilatation über P2Y-Rezeptoren der Endothelzellen durch die Synthese von NO und die Kontraktion durch direkte Aktivierung der ionotropen P2X-Rezeptoren der glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt. Steinmetz und Mitarbeiter (2000) demonstrierten für die einzelnen Diadenosinpolyphosphate einen kontrahierenden Effekt auf renale Widerstandsgefäße der Ratte bei gleichzeitiger dilatativer Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen der mesenterialen Gefäße der Ratte, was mittels unterschiedlicher Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoren erklärt wurde. Weitergehende Untersuchungen an mesenterialen Gefäßen der Ratte zeigten, dass allein Ap4A, Ap5A und Ap6A kontrahierende Eigenschaften an diesem Gefäßsystem aufweisen, wohingegen Ap2A und Ap3A Gefäß erweiternd wirken (Ralevic und Mitarbeiter, 1995). Dies entspricht auch den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen, die unterschiedliche Effekte wie die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder die Steigerung der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte durch Ap3A, Ap4A, Ap5A und Ap6A zeigen. Konnten einerseits Ap3A und Ap4A Wirkungen dieser Art induzieren, waren andererseits Ap5A und Ap6A in dieser Hinsicht wirkungslos. Genaue Erklärungsmuster konnten bis heute für dieses Phänomen nicht gegeben werden. Doch sind drei wesentliche Aspekte bei diesem Thema zu beachten:

- 1) Diadenosinpolyphosphate aktivieren eine bislang noch nicht vollständig beschriebene Gruppe von purinergen Rezeptoren, die, in einzelne Subtypen klassifiziert, unterschiedliche Signaltransduktionswege in glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren können. So bestimmt wesentlich der Expressionsgrad der einzelnen Rezeptoren die Wirkung der Diadenosinpolyphosphate auf dieses Zellsystem.
- 2) Diadenosinpolyphosphate besitzen differenzierte Affinitäten zu den einzelnen von den Zellen exprimierten Rezeptorsubtypen. Dabei spielt sicherlich die Länge der Phosphatbrücke, die die beiden Adenosinanteile zusammenhält, eine wichtige Rolle.
- 3) Neben den wasserlöslichen Nukleotidasen gibt es auch noch die auf der Außenseite der Zellmembran verankerten Ectohydrolasen, die schnell Diadenosinpolyphosphate in andere aktive Metabolite abbauen können. Auch diese Metabolite müssen berücksichtigt werden, wenn man die Effekte der ursprünglichen Substanzen untersucht, da es durchaus möglich ist, dass diese Wirkungen entfalten, die denen des eigentlich untersuchten Diadenosinpolyphosphates vollkommen unterschiedlich sind.

4.7 Diadenosinpolyphosphate und ihr Einfluss auf Gefäßerkrankungen

Gefäßverletzungen stellen einen kritischen Beginn unterschiedlicher pathologischer Prozesse wie zum Beispiel der Arteriosklerose dar, die das Wachstum, die Proliferation, die Wanderung und die Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen beinhalten (Thomas und Mitarbeiter, 1976; Ip und Mitarbeiter, 1990). Jankowski und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass Dialysepatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erhöhte Konzentrationen von gespeicherten Diadenosinpolyphosphaten in Thrombozyten aufweisen, was als ein möglicher Erklärungsversuch für die erhöhte Inzidenz der Arteriosklerose und anderer Herz- Kreislauferkrankungen bei Dialysepatienten angebracht wurde. Andere Studien belegen die Beobachtungen, dass Patientengruppen mit erhöhten Risikofaktoren für Herz- Kreislauferkrankungen abnorme Konzentrationen von Diadenosinpolyphosphaten oder anderen Nukleotiden wie ATP und dessen Abbauprodukt Adenosin in Thrombozyten aufweisen. Doch gibt es nur eine limitierte Anzahl von Studien, die sich direkt mit der Frage

auseinandersetzen, welchen Einfluss diese Substanzen tatsächlich auf pathologische Entwicklungen in glatten Gefäßmuskelzellen besitzen.

Das Wachstum von Blutgefäßen ist ein essentieller Teil bei pathologischen Prozessen wie dem Wachstum eines Tumors, der Wundheilung, der Psoriasis und der diabetischen Retinopathie. Purinerge Einflüsse sind in diesen Bereichen schon beschrieben worden, und man nimmt an, dass diese einen nicht zu unterschätzenden Anteil an der dort pathologischen Angiogenese einnehmen (Satterwhite und Mitarbeiter, 1999).

Die Apoptose spielt wie die Proliferation bei der Arteriosklerose eine wichtige Rolle. Endothelzellen der Gefäße könnten dort eine modulierende Rolle spielen, indem die Freisetzung der in diesen Zellen gespeicherten Nukleotiden und Diadenosinpolyphosphaten einerseits die Proliferation andererseits die Apoptose von Gefäßmuskelzellen steuert. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung von P2X7-Rezeptoren eine Synthese von Cytokinen zur Folge hat, die sowohl proliferative als auch apoptotische Wirkungen erzielen (Di Virgilio und Mitarbeiter, 2000), die zum Teil durch den Tumornekrosefaktor $TNF\alpha$ vermittelt sind (Mallat und Mitarbeiter, 2000). Dies schließt sich der Beobachtung an, dass Diadenosinpolyphosphate proliferativ auf Mesangiumzellen der Ratte über P2Y2- und P2Y4-Rezeptoren wirken und gleichzeitig eine Apoptose dieser Zellen durch Aktivierung von P2X7-Rezeptoren induzieren können (Harada und Mitarbeiter, 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Diadenosinpolyphosphate Ap3A und Ap4A mitogene Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte besitzen, was Hinweise darauf bietet, dass diese Substanzklasse eine Rolle bei der Entwicklung von Gefäßerkrankungen spielen könnte. Dies wird durch die Beobachtungen erhärtet, dass Patientengruppen mit erhöhten Risikofaktoren für Gefäßerkrankungen erhöhte Konzentrationen von Diadenosinpolyphosphaten in Thrombozyten aufweisen.

4.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse beschreiben einen möglichen Signaltransduktionsweg, über den das Diadenosinpolyphosphat Ap₄A in glatten Gefäßmuskelzellen proliferative Signale vermittelt. Ziel weiterer Untersuchungen wird es sein, genauere Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Subtypen der purinergen P₂Y-Rezeptoren spezifisch durch die einzelnen Diadenosinpolyphosphate aktiviert werden und welchen Einfluss diese auf die Vermittlung von mitogenen Signalen nehmen. Dazu werden intensivere Untersuchungen kommen, ob es P₂Y-Rezeptoren gibt, die mit G-Proteinen der G_{12,13}-Familie koppeln. Darauf aufbauend wird es möglich sein, die vielfältigen unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen Diadenosinpolyphosphate auf glatte Gefäßmuskelzellen zu erklären.