

Aus dem

CharitéCentrum13 – Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie

Klinik für Nephrologie, Endokrinologie, Hypertensiologie und Intensivmedizin

Direktor: Professor Dr. med. Walter Zidek

## **Habilitationsschrift**

### **„Identifizierung und Charakterisierung neuer vasoaktiver Substanzen und endogener atheroprotektiver Faktoren in der vaskulären Regulation“**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

**Dr. med. Markus Tölle**

Geboren 04. September 1975 in Herne

Eingereicht: Dezember 2011

Dekanin: Frau Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Professor Dr. U. Wenzel (Hamburg)

2. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Mischak (Glasgow)

Scio me nihil scire

(Ich weiß, dass ich Nichts weiß)

(Sokrates 469-399 v.Chr.)

Cuiusvis hominis est errare,  
nullius nisi insipientis in errore perseverare.

(Irren ist menschlich,

doch im Irrtum zu verharren ist ein Zeichen von Dummheit)

(Cicero 106-43 v.Chr.)

**Meinen Eltern**

## **Inhaltsverzeichnis:**

Prolog .....	1
Einleitung.....	1
Themengebiet I .....	3
1. Einleitung in das Themengebiet .....	3
2. Zielstellung .....	10
3. Fragestellungen .....	11
4. Zusammenfassung des Themengebietes .....	11
Originalarbeiten Themengebiet I .....	14
Themengebiet II .....	57
1. Einleitung in das Themengebiet .....	57
2. Zielstellung .....	57
3. Fragestellungen .....	58
4. Zusammenfassung des Themengebietes .....	58
Originalarbeiten Themengebiet II .....	60
Diskussion .....	80
Regulation des Gefäßtonus durch neue endogene Faktoren .....	80
Bedeutung neuer endogener Faktoren auf die Atherogenese .....	85
Zusammenfassung.....	90
Literaturverzeichnis .....	92
Danksagung .....	101

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Klassifizierung der purinergen Rezeptoren in verschiedene Subtypen. ....	4
---	---

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2X Rezeptoren. ....	5
Tabelle 2 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2Y1-ähnlichen Rezeptoren. ....	6
Tabelle 3 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2Y12-ähnlichen Rezeptoren. ....	6
Tabelle 4: Vorkommen und Wirkung von Dinukleosidpolyphosphaten in humanen Geweben.....	7
Tabelle 5: Expression von P2 Rezeptoren in arteriellen Gefäßen .....	8

## Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACE	„Angiotensin Converting Enzyme“
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AngII	Angiotensin II
Ap <sub>2</sub> A	Diadenosindiphosphat
Ap <sub>2</sub> G	Adenosin-Guanosindiphosphat
Ap <sub>3</sub> A	Diadenosintriphosphat
Ap <sub>3</sub> G	Adenosin-Guanosintriphosphat
Ap <sub>4</sub>	Adenosintetraphosphat
Ap <sub>4</sub> A	Diadenosintetraphosphat
Ap <sub>4</sub> G	Adenosin-Guanosintetraphosphat
Ap <sub>5</sub> A	Diadenosinpentaphosphat
Ap <sub>5</sub> G	Adenosin-Guanosinpentaphosphat
Ap <sub>6</sub> A	Diadenosinhexaphosphat
Ap <sub>6</sub> G	Adenosin-Guanosinhexaphosphat
Apo	Apolipoprotein
AT1	Angiotensin Rezeptor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BFGF	„Basic fibroblast growth factor“
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
COX <sub>2</sub>	Cyclooxygenase 2
CSE	Cholesterinsyntheseenzym
EDCR	„Endothelial derived contracting factor“
EDHF	„Endothelial derived hyperpolarization factor“
EDRF	„Endothelial derived relaxing factor“
EGF	„Endothelial Growth Factor“
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	„extracellular signal-related kinases“
ESRD	„End stage renal disease“
ET1	Endothelin-1
Gp <sub>2</sub> G	Diguanosindiphosphat
Gp <sub>3</sub> G	Diguanosintriphosphat
Gp <sub>4</sub> G	Diguanosintetraphosphat
Gp <sub>5</sub> G	Diguanosinpentaphosphat
Gp <sub>6</sub> G	Diguanosinhexaphosphat
GPR4	G-Protein-Rezeptor 4
GTP	Gunanosintriphosphat
HDL	„High Density Lipoprotein“
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
ICAM	„intercellular vascular adhesion molecule 1“
IF	„Impact factor“
IGF1	„Insulin like growth factor 1“
IL	Interleukin

IMT	„Intima media thickness“
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
Ip <sub>5</sub> l	Diinosinpentaphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	„Low Density Lipoprotein“
LSF	Lysosulfatid
MAPK	„Mitogen activated protein kinase“
MCP1	„Monocyte chemoattractant protein 1“
MLC	„Myosin light chain“
MLCK	„Myosin light chain kinase“
MMP	Metallo-Matrix-Proteinase
NCZ	„natural killer“ Zellen
NAP(P)H	Nicotinamiddinukleosidphosphat
NO	„Nitric Oxide“
oxLDL	oxidiertes „low density lipoprotein“
P2X <sub>x</sub>	P2X Rezeptor X
P2Y <sub>x</sub>	P2Y Rezeptor X
PC-PLD	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase D
PDGF	„Platelet Derived Growth Factor“
PEAF	„Platelet endothelial adhesion factor“
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostaglandin I2, Prostazyklin
PI3-K	Phosphoinositol-3 Kinase
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKB	Phosphokinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
RB2	„reactive blue 2“
RhoK	Rho Kinase
ROS	„reactive oxygene species“
S1P	Sphingosin-1-Phospholipid
S1P <sub>x</sub>	Sphingosin-1-Phospholipid Rezeptor X
SHR	„Spontaneous hypertensive rat“
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
sPLA <sub>2</sub>	Sekretorische Phospholipase A2
SRBI	„Scavenger Rezeptor class B, member I“
TGFβ	„Transforming Growth Factor β“
TNF	„Tumor necrosis factor“
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
Up <sub>4</sub> A	Uridin-Adenosintetraphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VCAM	„Vascular adhesion molecule 1“
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“
VSCM	„vascular smooth muscle cell“
αβ-Met-ATP	αβ-Methylene-Adenosin-Triphosphat

## In der Habilitationsschrift aufgeführte Publikationen

### 1. Originalarbeiten als Erst- bzw. Letztautor:

Zahl	Publikation
1	<b>Tölle M*</b> , Giebing G*, Tietge UJ, Jankowski J, Jankowski V, Henning L, Hörl MP, Weiss W, Zidek W, van der Giet M. Diguanosinepentaphosphate: an endogenous activator of Rho-kinase possibly involved in blood pressure regulation. Journal of Hypertension, 24(10), 2006 Oct, 1991-2000. <i>*geteilte Erstautorenschaft</i>
2	<b>Tölle M</b> , Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 28(8), 2008, 1542-8.
3	<b>Tölle M</b> , Jankowski V, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Hub F, Kowalska J, Jemielity J, Guranowski A, Loddenkemper C, Zidek W, Jankowski J, van der Giet M. Adenosine 5'-tetrphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. Circulation Research, 103(10), 2008, 1100-8.
4	<b>Tölle M</b> , Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Klöckel L, Jankowski J, Jankowski V, Zidek W, van der Giet M. Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. British Journal of Pharmacology, 161(3), 2010 Oct, 530-40.
5	Schuchardt M, Prüfer J, Prüfer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schäfer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, <b>Tölle M</b> . The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. Journal of Molecular Medicine, 89(8), 2011, 799-810.

### 2. Koautorenschaften

Zahl	Publikation
1	Keul P, <b>Tölle M</b> , Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 27(3), 2007, 607-13.
2	Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran TN, van der Giet M, <b>Tölle M</b> , Zidek W, Jankowski J. Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 27(8), 2007, 1776-81.
3	Schuchardt M, <b>Tölle M</b> , Prüfer J, Prüfer N, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. Kidney International, 2011 Sep 28. [Epub ahead of print]

### 3. Fallbeschreibungen

Keine

### 4. Übersichtsarbeiten als Erst- und Letztautor

Zahl	Publikation
1	<b>Tölle M</b> , Schuchardt M, van der Giet M. Relevance of sphingolipids in the pleiotropic protective effects of high-density lipoproteins. Current Pharmaceutical Design, 16(13), 2010, 1468-79.

### 5-7. Editorial, Buchkapitel und Proceedings

Keine

## Prolog

Die in dieser Habilitationsschrift aufgeführten Originalarbeiten und Übersichtsarbeiten beschäftigen sich mit der „Identifizierung und Charakterisierung von neuen vasoaktiven Substanzen und endogenen atheroprotektiven Faktoren in der vaskulären Regulation“. Diese Habilitationsschrift fasst wesentliche Elemente der wissenschaftlichen Arbeiten zusammen, die in 2 Themengebiete eingeteilt werden.

**Themengebiet I** – Die Bedeutung des purinergen Systems auf die vaskuläre Regulation

**Themengebiet II** – HDL und Sphingolipide in der vaskulären Regulation

Ein vollständiger Überblick über die wissenschaftlichen Leistungen gibt das Publikationsverzeichnis wieder. In den jeweiligen Themengebieten sind die relevanten Originalarbeiten aufgeführt. Die Beteiligung des Verfassers dieser Habilitationsschrift an den jeweiligen Arbeiten als Erstautor bzw. Koautor sind dargelegt. Die jeweiligen Themengebiete werden mittels einer kurzen Übersicht eingeleitet. In den Themengebieten, in denen der Verfasser eine Übersichtsarbeit in einem „peer-reviewed“ Journal verfasst hat, ist diese als Einleitung angefügt.

## Einleitung

### Kardiovaskuläre Mortalität

In den westlichen Industrieländern zählen die Folgen vaskulärer Veränderungen zu den häufigsten Todesursachen. Bei jedem zweiten Verstorbenen ist der Tod durch eine Herz-Kreislauf-Erkrankung ausgelöst<sup>1</sup> und sind ein großes klinisches Problem, insbesondere bei Patienten mit chronischem (CNI) und terminalem Nierenversagen (ESRD).<sup>2</sup> Dabei zeigt sich eine stadienabhängige Zunahme der kardiovaskulären Sterblichkeit.<sup>3</sup> Etwa 40% der Dialysepatienten weisen eine koronare, ca. 20% eine zerebrovaskuläre und mehr als 20% eine periphere arterielle Gefäßerkrankung auf.<sup>4</sup>

### Atherosklerose

Die frühesten atherosklerotischen Läsionen können bereits bei Kindern beobachtet werden.<sup>5</sup> Atherosklerose ist eine inflammatorische Gefäßerkrankung, die in verschiedenen Stadien abläuft<sup>6</sup> und durch spezifische zelluläre und azelluläre Prozesse unterhalten wird.<sup>7</sup> Die endotheliale Dysfunktion ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus, durch die die intimale Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten und zusätzlich die Gefäßwandpermeabilität durch reduzierte Bildung von protektiven Mediatoren verstärkt wird.<sup>8</sup> Daneben sind erhöhte Plasmakonzentrationen von „Low Density Lipoprotein“ (LDL) und oxidiertem LDL (oxLDL), rheologische Störungen, reaktive Sauerstoffradikale (ROS)<sup>9</sup> ausgelöst durch Zigarettenrauchen,<sup>10</sup> Diabetes mellitus<sup>11</sup> oder Hypertonie,<sup>12</sup>



erhöhte Homozysteinplasmakonzentration,<sup>13</sup> sowie genetische und infektiöse Faktoren<sup>14</sup> von Bedeutung. Spezielle Bereiche innerhalb des arteriellen Gefäßsystems, wie beispielsweise Gefäßabzweigungen, verursachen rheologische Veränderungen mit Zunahme der Scherkräfte durch turbulente Strömungen, die mit Änderungen des Expressionsmuster der Gefäßzellen in diesem Bereich einhergehen. Eine große Anzahl von verschiedenen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. „platelet endothelial adhesion factor“ (PEAF), „intercellular adhesion molecule“ (ICAM) oder Selektine werden vermehrt exprimiert. Die Liganden dieser Rezeptoren befinden sich auf der Oberfläche von Monozyten und T-Lymphozyten, über die die Anhaftung an das Endothel gesteuert wird. Zusammen mit chemotaktisch wirkenden Molekülen, wie u.a. „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP1) oder oxLDL, werden Entzündungszellen in die Gefäßwand geleitet. Die Akkumulation von Plasmalipiden in der Gefäßwand stellt neben der zellulären Komponente einen weiteren pathophysiologischen Faktor dar.<sup>15, 16</sup> Es bildet sich eine Endothelläsion mit Ausbildung einer prokoagulatorischen Umgebung. Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) werden zur Proliferation angeregt und wachsen in das inflammatorische Gebiet hinein. Es bildet sich eine intermediäre Läsion, durch die sich eine Lumeneinengung bilden kann. Diese wird anfänglich durch eine Vasodilatation kompensiert.<sup>17</sup> Diese Phase wird als Umbauphase bezeichnet. Die hauptsächlichen Entzündungszellen in dieser Phase sind Makrophagen und spezifische Subtypen von T-Lymphozyten mit einer verstärkten Freisetzung von Entzündungsmediatoren.<sup>18, 19</sup> Granulozyten kommen vereinzelt vor.<sup>20</sup> Die Folge sind weitere Schädigungen der Gefäßwand mit Ausbildung fokaler Nekrosen<sup>21</sup> und Formierung einer fibrotischen Kappe im Sinne einer fortgeschrittenen Läsion. Aktivierte Makrophagen sezernieren hydrolytische Enzyme, die die fibrotische Kappe verdünnen. Eine Ruptur kann zu der spontanen Thrombusbildung und zu einem Gefäßverschluss bis hin zum Organinfarkt führen.

## **Hypertonie**

Ein wichtiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die arterielle Hypertonie,<sup>1</sup> für die bei >80% der Fälle keine ätiologischen Gründe gefunden werden. Systolischer und diastolischer Blutdruck und insbesondere der Pulsdruck sind von großer Bedeutung. Im Alter nimmt die Gefäßsteifigkeit zu, der diastolische Blutdruck sinkt und damit steigen der Pulsdruck und das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen. Viele wichtige Mediatorsysteme, wie beispielsweise das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), konnten identifiziert werden. Durch spezifische Antagonisierung dieser Systeme ist es möglich geworden, den Bluthochdruck therapeutisch zu beeinflussen. Trotz vielfacher Möglichkeiten ist es allerdings in ca. 10% der Fälle nicht möglich, den Blutdruck in den therapeutisch angestrebten Bereich zu senken.<sup>22</sup> Scheinbar sind weitere, aktuell nicht oder nur unzureichend bekannte Mediatorsysteme für die Blutdruckregulation von großer Bedeutung. Daher stellt die Erforschung weiterer blutdruckregulierender Systeme auch heute noch einen wichtigen Zweig der hypertensiologisch orientierten Forschung dar.

# Themengebiet I

## Der Einfluss des purinergen Systems auf die vaskuläre Regulation

### 1. Einleitung in das Themengebiet

Das purinerge System besteht aus einer differenzierten Gruppe von Rezeptoren, die ubiquitär exprimiert und von unterschiedlichen Agonisten aktiviert werden.<sup>23</sup> Durch die Klonierung einer großen Zahl von Purinrezeptorsubtypen konnten in den letzten Jahren bedeutende neue Erkenntnisse über die Rolle des purinergen Systems in Bezug auf das kardiovaskuläre System gewonnen werden. Im Folgenden werden sowohl die Rezeptoren als auch die Agonisten, die diesem System angehören, in einem kurzen Überblick dargestellt.

Nach der Entdeckung der Zelloberflächenrezeptoren, die durch Nukleotide aktiviert werden können, konnte zunehmend gezeigt werden, dass Purine und Pyrimidine, wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Uridintriphosphat (UTP) und Uridindiphosphat (UDP), neben ihrer Rolle als intrazelluläre Energiequellen oder Kofaktoren wichtige extrazelluläre Signalmoleküle darstellen.<sup>24</sup> Verschiedene Befunde deuten dabei auf eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Regulation hin. Nukleotide können sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation in verschiedenen Gefäßsystemen stimulieren, das Wachstum von VSMC und Endothelzellen (EC) beeinflussen, Angiogeneseprozesse und vaskuläres „remodelling“ steuern, Thrombozytenaggregation, Koagulation und vaskuläre Inflammation stimulieren und sind in verschiedenen anderen Mechanismen innerhalb der kardiorenovaskulären Regulation involviert.<sup>24-28</sup>

### Purinrezeptoren

Es gibt zwei große Familien von Purinrezeptoren.<sup>23, 29</sup> Die P1 Rezeptoren, die im Wesentlichen durch Adenosin aktiviert werden, und die P2 Rezeptoren, die durch ATP, ADP, UTP oder auch UDP aktiviert werden. Die P1 Rezeptoren wurden aufgrund molekularer, biochemischer und pharmakologischer Bedeutung noch in weitere vier Subklassen unterteilt: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub>. Die P2 Rezeptoren werden aufgrund ihrer molekularen Struktur und des gekoppelten Signaltransduktionsweges in P2X und P2Y Rezeptoren unterteilt, die in weitere sieben P2X (P2X<sub>1,2,3,4,5,6,7</sub>) und acht P2Y (P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>) Subtypen unterteilt werden können (Abbildung 1).<sup>30-32</sup> Die Subtypen der Purinrezeptoren sind sowohl durch eine unterschiedliche Molekülstruktur, aber vor allem aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Wirkungen charakterisiert. Zellen exprimieren ein inhomogenes und variables Rezeptormuster. Purinrezeptoren können sowohl Hetero- als auch Homodimere mit anderen Purinrezeptoren bilden.<sup>33</sup> Beispielsweise konnte ein Dimer aus dem P2Y<sub>1</sub> und dem A<sub>1</sub> nachgewiesen werden, deren pharmakologischen Eigenschaften nicht mit denen der einzelnen Rezeptoren

verglichen werden kann.<sup>34</sup> Für die Ausbildung eines funktionellen P2X Rezeptors ist eine Trimerbildung notwendig, die sich bei allen P2X Rezeptoren, mit Ausnahme von P2X<sub>6</sub>, aus Homomeren zusammensetzen kann.<sup>35, 36</sup> Diese können veränderte pharmakologische Eigenschaften im Vergleich zu den korrespondierenden Purinrezeptorhomomeren aufzeigen.<sup>37</sup> Diese Eigenschaft zur Rezeptorheteromerisierung erweitert das funktionelle Spektrum der Purinrezeptorfamilie erheblich. Im Weiteren wird nur auf die P2X und P2Y Rezeptoren eingegangen.

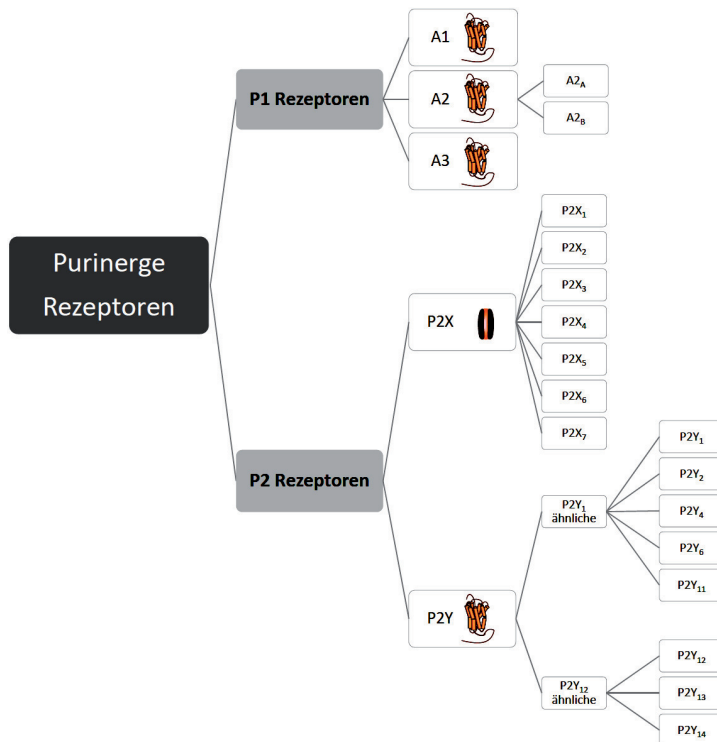


Abbildung 1: Klassifizierung der purinergen Rezeptoren in verschiedene Subtypen (nach <sup>38, 39</sup>).

### P2 Rezeptoren: P2X und P2Y Rezeptorsubtypen

Die P2 Rezeptoren werden durch ATP oder ADP aktiviert und nicht durch Methylxanthine antagonisiert. Die Klasse der P2 Rezeptoren ist heterogen in P2X und P2Y Rezeptoren unterteilt,<sup>40</sup> die sich in ihren Bindungs- und Desensitisierungseigenschaften von ATP und dessen Analoga (z.B.  $\alpha$ , $\beta$ -Methylene-ATP ( $\alpha\beta$ -Met-ATP)) unterscheiden. Des Weiteren unterscheiden sich die P2 Subtypen in ihren Rezeptoreigenschaften. So sind die P2X ionotrope Rezeptoren, die für Natriumionen, Kaliumionen und Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) durchlässig sind.<sup>41</sup> Ihre Aktivierung führt u.a. zu einer Depolarisation und Öffnung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen im Plasmalemma mit konsekutivem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und was eine Muskelkontraktion mit anschließender Vasokonstriktion bewirkt.<sup>42</sup> Der größte Teil der Rezeptoren liegt als Loop extrazellulär vor, wobei in diesem Bereich mehrere konservierte Regionen liegen, so dass sich die unterschiedlichen P2X Rezeptoren zu einem unterschiedlichen Teil strukturell ähneln.<sup>42</sup> Die

wichtigsten Eigenschaften von P2X Rezeptoren sind in Tabelle 1 zusammengefasst, wobei diese in vier weitere Subgruppen eingeteilt werden können.<sup>43</sup>

**Tabelle 1 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2X Rezeptoren.**<sup>38</sup>

	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3		Gruppe 4
	P2X <sub>1</sub>	P2X <sub>3</sub>	P2X <sub>2</sub>	P2X <sub>5</sub>	P2X <sub>4</sub>	P2X <sub>6</sub>	P2X <sub>7</sub>
<i>Rezeptortyp</i>	ionotrop		ionotrop		ionotrop		ionotrop
<i>Signalkaskade</i>	Liganden gesteuerte Kationenkanäle → zytosolisches Ca <sup>2+</sup> ↑						Kationenkanal, Porenbildung
<i>Wirkung</i>	Vasokonstriktion		Vasokonstriktion		Vasokonstriktion		Vasokonstriktion, Apoptose
<i>Desensit.</i>	schnell		sehr langsam		Langsam	sehr langsam	keine
<i>Agonisten</i>	α,β-Met-ATP>β,γ-Met-ATP> ATP, 2-Met-ATP	ATP, 2-ATPγS, 2-Met-ATP, UTP	2-Met-SATP, ATPγS	2-Met-ATP, α,β-Met-ATP, GTP, BzATP	2-Met-SATP, ATPγS	α,β-Met-ATP	2-Met-SATP, BzATP
<i>Antagonisten</i>	Suramin		Suramin, PPADS		TNP-ATP		oxATP, KN-62

Die P2Y sind metabotrope, G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die unterschiedliche G-Proteine aktivieren.<sup>44</sup> P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> aktivieren das G<sub>q</sub>-Protein und damit den Inositol Signaltransduktionsweg, wohingegen P2Y<sub>12,13,14</sub> das G<sub>i</sub>-Protein aktiviert und damit die AC inhibiert und eine G<sub>βγ</sub>-medierte Aktivierung einer großen Reihe von Effektorproteinen bewirkt.<sup>45, 46</sup> Deshalb können die P2Y Rezeptoren in die P2Y<sub>1</sub> ähnlichen Subtypen (P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub>) und die P2Y<sub>12</sub> ähnlichen Subtypen (P2Y<sub>12,13,14</sub>) eingeteilt werden, deren wichtige Eigenschaften in Tabelle 2 (P2Y<sub>1</sub> ähnliche) und Tabelle 3 (P2Y<sub>12</sub> ähnliche) zusammengefasst sind. Die einzelnen P2Y Rezeptoren haben eine unterschiedliche Affinität zu Adenosin- und Uridinhaltigen Mononukleotiden. Der P2Y<sub>1,12,13</sub><sup>47, 48</sup> hat eine hohe Affinität zu ADP, der P2Y<sub>2,11</sub><sup>48-50</sup> zu ATP, der P2Y<sub>2,4</sub><sup>51</sup> zu UTP sowie der P2Y<sub>6,14</sub><sup>51, 52</sup> zu UDP. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl neuer selektiver Agonisten identifiziert und charakterisiert werden, die eine Zuordnung biologischer Effekte zu speziellen P2 Subtypen ermöglicht. Leider existieren immer noch nicht für alle Subtypen diese selektiven Agonisten/Antagonisten.<sup>53, 54</sup>

### Dinukleosidpolyphosphate als purinerge Agonisten

Zu den purinergen Agonisten gehören neben ATP und UTP als die bekanntesten Vertreter,<sup>55</sup> auch komplexere Nukleotide wie die Dinukleosidpolyphosphate, die in den letzten Jahren in zahlreichen Säugetiergeweben nachgewiesen wurden und auch aus menschlichen Geweben isoliert werden konnten.<sup>56-58</sup> Es zeigte sich, dass diese in unterschiedlichen Gefäßregionen starke vasoaktive und proliferationssteigernde Wirkungen haben. Die Wirkung der Dinukleosidpolyphosphate wird im Wesentlichen über P1 und P2 Rezeptoren vermittelt.<sup>59</sup>

**Tabelle 2 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2Y<sub>1</sub>-ähnlichen Rezeptoren.<sup>60</sup>**

	P2Y <sub>1</sub>	P2Y <sub>2</sub>	P2Y <sub>4</sub>	P2Y <sub>6</sub>	P2Y <sub>11</sub>
<i>Rezeptortyp</i>	metabotrop	metabotrop	metabotrop	metabotrop	metabotrop
<i>Signalkaskade</i>	G <sub>q/11</sub> →PLC → Ca <sup>2+</sup> ↑ →PGI <sub>2</sub> / EDRF↑	Aktiv.→IP <sub>3</sub> /DAG↑ P <sub>3</sub> ↑ → Ca <sup>2+</sup> ↑ →PGI <sub>2</sub> / NO↑	G <sub>q/11/i</sub> →PLCβ <sub>2</sub> →I G <sub>i/q/11</sub> →PLC Aktiv.→IP <sub>3</sub> ↑ →Ca <sup>2+</sup> ↑	G <sub>q/11</sub> →PLC Aktiv.→IP <sub>3</sub> /DAG↑	G <sub>s</sub> →cAMP↑ VSMC: Proliferation
<i>Wirkung</i>	Vasodilatation, Proliferation von VSMC, Thrombozyten- aggregation	Endothel: Vasodilatation, VSMC: Vasokonstriktion, Proliferation	Vasokonstriktion, Proliferation von VSMC	Vasokonstriktion	VSMC: Proliferation
<i>Agonisten</i>	2-Met-ATP >  ATP > ADP	ATP, UTP, ATPγS	UTP, UDP, ATP	UDP, UTP, ATP	ATP, ATPγS
<i>Antagonisten</i>	Suramin, MRS2179	PPADS, Suramin	PPADS, RB-2	Suramin, PPADS, RB-2	Suramin, RB-2

**Tabelle 3 Zusammenfassung wichtiger Eigenschaften von P2Y<sub>12</sub>-ähnlichen Rezeptoren.<sup>60</sup>**

	P2Y <sub>12</sub>	P2Y <sub>13</sub>	P2Y <sub>14</sub>
<i>Rezeptortyp</i>	metabotrop	metabotrop	metabotrop
<i>Signalkaskade</i>	G <sub>i</sub> →AC↓→cAMP↓	G <sub>i</sub> →AC↓→cAMP↓	G <sub>i</sub> →AC↓→cAMP↓
<i>Wirkung</i>	Ca <sup>2+</sup> Thrombozytenaggregation	Kanalinhibition, Immunantwort	Chemotaktische Wirkung, Immunantwort
<i>Agonisten</i>	2-Met-SADP, ADP	2-Met-SADP, ADP	UDP-Glucose, Galaktose
<i>Antagonisten</i>	Suramin, RB-2	Suramin, PPADS, RB-2	UDP-

1994 wurde mit Diadenosintetraphosphat (Ap<sub>4</sub>A) erstmalig ein Vertreter dieser neuen Gruppe von purinergen Substanzen identifiziert.<sup>61</sup> In den folgenden Jahren wurden dann weitere Dinukleosidpolyphosphate identifiziert und charakterisiert, die Purinbasen enthalten (2 Adenosine, ein Adenosin und ein Guanosin oder 2 Guanosine), die mit einer variablen Kettenlänge von 2-7 Phosphaten verbunden sind. Die Adenosin enthaltene Dinukleosidpolyphosphate zeigen vasoaktive Eigenschaften, wohingegen Guanosin enthaltende Dinukleosidpolyphosphate die Proliferation von verschiedenen Zellen, u.a. VSMC, stimulieren.<sup>62</sup> Im Gegensatz zu Mononukleotiden haben Dinukleosidpolyphosphate eine deutlich längere Halbwertszeit, womit eine Wirkung nicht nur auto- oder parakrin, sondern auch endokrin anzunehmen ist. Lokale Konzentrationen der einzelnen Nukleotide können um mehrere Zehnerpotenzen höher liegen als im Plasma.<sup>44, 63</sup> In Tabelle 4 sind in einer Übersicht vaskuläre Wirkungen bedeutender Dinukleosidpolyphosphate aufgeführt.

**Tabelle 4: Vorkommen und Wirkung von Dinukleosidpolyphosphaten in humanen Geweben**

Substanz	Vorkommen	Bekannte vaskuläre Wirkungen	Literatur
<i>Ap<sub>2</sub>A</i>	Herzmuskel	Vasodilatation (A2) u. Vasokonstriktion (A1) in Koronararterien und Nierengefäßen,	64-68
	Thrombozyten	Proliferation VSMC (U)	
	Plazenta		
	Nebenniere		
<i>Ap<sub>2</sub>G</i>	Thrombozyten	Proliferation VSMC	64
<i>Gp<sub>2</sub>G</i>	Thrombozyten	Proliferation VSMC	64
<i>Ap<sub>3</sub>A</i>	Herzmuskel	Vasodilatation (P2Y und A2) u. Vasokonstriktion (A1 und P2X) in Koronararterien,	65-70
	Thrombozyten	Nierengefäßen und mesenterialen Gefäßen	
	Plazenta		
	Nebenniere	Proliferation VSMC (U)	
<i>Ap<sub>3</sub>G</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X), Proliferation VSMC (U)	62
<i>Gp<sub>3</sub>G</i>	Thrombozyten	Proliferation VSMC (U)	62
<i>Ap<sub>4</sub>A</i>	Nebenniere	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X, A1) und Mesenterialgefäßen (P2X)	66-72
	Plasma		
	Thrombozyten		
<i>Ap<sub>4</sub>G</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X), Proliferation VSMC (U)	62
<i>Gp<sub>4</sub>G</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X), Proliferation VSMC (U)	62
<i>Ap<sub>5</sub>A</i>	Nebenniere	Proliferation in Mesangialzellen (U) und VSMC (U), Vasokonstriktion in Nierengefäßen	67-70, 72-77
	Plasma	(P2X), Mesenterialgefäßen (P2X) und Koronargefäßen (P2X), Vasodilatation in	
	Thrombozyten	Koronargefäßen (P2Y)	
<i>Ap<sub>5</sub>G</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X), Proliferation VSMC (U), Vasokonstriktion in	62, 76, 77
		Nierengefäßen (P2X) und Koronargefäßen (P2X), Vasodilatation in Koronargefäßen (P2Y)	
<i>Gp<sub>5</sub>G</i>	Thrombozyten	Proliferation VSMC (P2Y)	62, 76, 77
<i>Ap<sub>6</sub>A</i>	Nebenniere	Proliferation in Mesangialzellen (U) und VSMC (U), Vasokonstriktion in Nierengefäßen	67-70, 72-77
	Plasma	(P2X), Mesenterialgefäßen (P <sub>2x</sub> ) und Koronargefäßen (P2X), Vasodilatation in	
	Thrombozyten	Koronargefäßen (P2Y)	
	Erythrozyten		
<i>Ap<sub>6</sub>G</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X) und Koronargefäßen (P2X), Vasodilatation in	62, 76, 77
		Koronargefäßen (P2Y), Proliferation VSMC (U)	
<i>Gp<sub>6</sub>G</i>	Thrombozyten	Proliferation VSMC (U)	62, 76, 77
<i>Ap<sub>7</sub>A</i>	Thrombozyten	Vasokonstriktion in Nierengefäßen (P2X)	78

(U) = unbekannter Rezeptor, *Ap<sub>2</sub>A*: Diadenosindiphosphat; *Ap<sub>3</sub>A*: Diadenosintriphosphat; *Ap<sub>4</sub>A*: Diadenosintetraphosphat; *Ap<sub>5</sub>A*: Diadenosinpentaphosphat; *Ap<sub>6</sub>A*: Diadenosinhexaphosphat; *Ap<sub>7</sub>A*: Diadenosinheptaphosphat; *Ap<sub>2</sub>G*: Adenosin-Guanosindiphosphat; *Ap<sub>3</sub>G*: Adenosin-Guanosintriphosphat; *Ap<sub>4</sub>G*: Adenosin-Guanosintetraphosphat; *Ap<sub>5</sub>G*: Adenosin-Guanosinpentaphosphat; *Ap<sub>6</sub>G*: Adenosin-Guanosinhexaphosphat; *Gp<sub>2</sub>G*: Diguanosindiphosphat; *Gp<sub>3</sub>G*: Diguanosintriphosphat; *Gp<sub>4</sub>G*: Diguanosintetraphosphat; *Gp<sub>5</sub>G*: Diguanosinpentaphosphat; *Gp<sub>6</sub>G*: Diguanosinhexaphosphat.

## Die Bedeutung von Purinrezeptoren und deren Regulation im vaskulären System

### Expression von P2 Rezeptoren im vaskulären System

Die P2 Rezeptoren werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wobei im Folgenden nur auf deren Expressionsmuster im Gefäßendothel sowie in VSMC eingegangen werden soll.

#### Gefäßendothel

P2Y Rezeptoren sind reproduzierbar in EC nachgewiesen worden, unter anderem in Hirngefäßen,<sup>79-81</sup> in Mesenterialarterien<sup>82, 83</sup> und in den Glomeruli der Rattenniere.<sup>84</sup> Insbesondere P2Y<sub>1,2,4</sub> werden in EC der Rinderaorta koexprimiert,<sup>85, 86</sup> über die eine Vasodilatation ausgelöst wird.<sup>79, 83</sup> Über die Verteilung von P2X Rezeptoren im Endothel ist wenig bekannt. Auf EC arterieller Rattenhirngefäße konnte hauptsächlich P2X<sub>2</sub> nachweisen werden.<sup>87</sup> Daneben werden noch P2X<sub>1,2,3,4</sub> auf unterschiedlichen EC exprimiert.<sup>83, 88-103</sup>

#### Glatte Gefäßmuskelzellen

In verschiedenen arteriellen Gefäßregionen der Niere, des Herzens und des Hirns ließen sich sowohl P2X wie auch P2Y Rezeptoren nachweisen. Beide Rezeptorsubtypen lösen hier eine Vasokonstriktion aus. Insbesondere P2Y<sub>1,2,4,6</sub> vermitteln eine Proliferation von VSMC und renaler mesangialer Zellen.<sup>88, 98, 103-106</sup> Es zeigt sich, dass der P2X<sub>1</sub> in den VSMC aller arteriellen Gefäße zu finden ist, wohingegen die P2Y Expression ein heterogenes Muster aufweist. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Expressionsmuster von P2 Rezeptoren in unterschiedlichen arteriellen Gefäßen.

**Tabelle 5: Expression von P2 Rezeptoren in arteriellen Gefäßen**

Gewebe/Gefäß	Rezeptoren	Literatur
Niere - afferente Arteriolen	P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>3</sub> , P2X <sub>4</sub> , P2Y <sub>2</sub>	89-92, 107
Mesenterialgefäße	P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>4</sub> , P2X <sub>5</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>6</sub>	66,67, 93-96
Thorakale Aorta	P2X <sub>1</sub> , P2X <sub>2</sub> , P2X <sub>4</sub> , P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	88, 97-101
Koronargefäße	P2X <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub>	108
Zerebrale arterielle Gefäße	P2X <sub>1</sub> , P2Y <sub>1</sub> , P2Y <sub>2</sub> , P2Y <sub>4</sub> , P2Y <sub>6</sub>	83, 102

#### Die Rolle des purinergen Systems auf den Gefäßtonus sowie in der Atherosklerose

Das purinerge System spielt im kardiovaskulären System eine bedeutende Rolle.<sup>59, 109, 110</sup> Dabei werden gefäßspezifische Wirkungen überwiegend durch die Aktivierung von P2 Rezeptoren induziert. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren wird sowohl die Regulation des Gefäßtonus, das Wachstum von VSMC und EC, die Angiogenese, das vaskuläre „Remodelling“, die Plättchenaggregation, die Koagulation, die vaskuläre Inflammation und viele weitere Aspekte des kardiovaskulären Systems reguliert.

## Regulation des Gefäßtonus

Die Blutdruckregulation ist eine Nettobilanz aus Vasodilatation und Vasokonstriktion. Die P2 Rezeptoren mit der größten Bedeutung für die Vasodilatation sind P2Y<sub>1,2,6</sub>.<sup>24</sup> Die wichtigsten kontraktilen Rezeptoren auf der Oberfläche von VSMC sind P2X<sub>1,2,4</sub> und P2Y<sub>2,4,6,12</sub>.<sup>83, 111</sup> ATP und UTP, die von der luminalen Seite durch EC und Erythrozyten sezerniert werden, induzieren eine Vasodilatation, wohingegen eine Vasokonstriktion induziert wird, wenn diese Mediatoren von der adventitiellen Seite aus Nervenzellen freigesetzt werden. Darüber hinaus wird der Blutdruck durch ATP über direkte renale Mechanismen oder Hirnstammmechanismen gesteuert.<sup>89, 112</sup> ATP spielt eine wichtige Rolle als Kotremitter des sympathischen Nervensystems in „spontaneous hypertensive rats“ (SHR),<sup>113, 114</sup> in denen die vaskuläre Reaktion auf  $\alpha\beta$ -Met-ATP und ATP erhöht ist.<sup>115, 116</sup> Ebenso stellt sich Reaktivität der *Aorta thoracalis* hier erhöht dar. Neben den Mononukleotiden spielen vor allem Dinukleosidpolyphosphate eine wichtige Rolle als starke vasoaktive Mediatoren, die über P2X<sub>1</sub> und P2Y<sub>2</sub> vasokonstringierend wirken.<sup>117</sup> „Shear Stress“ und Hypoxie sind wichtige Stimuli für die ATP und UTP Freisetzung aus EC.<sup>118</sup> Dadurch werden vasodilatierende Mediatoren, wie Prostazyklin, NO oder der „endothelial derived hyperpolarisation factor“ (EDHF) über P2Y<sub>1,2,6</sub> Aktivierung freigesetzt.<sup>23, 119-121</sup> Von den P2X Rezeptoren wird neben dem P2X<sub>2</sub> hauptsächlich P2X<sub>4</sub> in hoher Dichte auf EC exprimiert,<sup>119, 122</sup> der nach Aktivierung durch ATP einen Kalziuminflux induziert.<sup>123</sup> Extrazelluläres ATP und UTP werden in der Zirkulation schnell durch Nukleasen abgebaut,<sup>124, 125</sup> wodurch Adenosin und AMP<sup>126, 127</sup> über die Aktivierung des A<sub>2A</sub> in der Spätphase, ADP durch P2Y<sub>1</sub> Aktivierung in der Mittelphase und ATP<sup>128, 129</sup> durch P2Y<sub>2</sub> und P2X<sub>4</sub> Aktivierung in der Frühphase nach Ischämieinduktion eine Hyperämie induzieren können.

## Atherosklerose

Die Atherogenese wird durch das purinerge System stark beeinflusst. Inflammatorische Zellen exprimieren eine große Anzahl an P2 Rezeptoren, insbesondere P2X<sub>7</sub> und P2Y<sub>2,11</sub>, über die eine Vielzahl an inflammatorischen Reaktionen gesteuert werden.<sup>27, 130</sup> Durch die Aktivierung des P2X<sub>7</sub> wird beispielsweise eine mitogene und antiapoptotische Wirkung auf T-Lymphozyten<sup>131, 132</sup> und eine Freisetzung von „Interleukin-1“ (IL-1)<sup>133</sup> und „Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ “ (TNF- $\alpha$ )<sup>134</sup> induziert. Über die Aktivierung des P2Y<sub>2</sub> wird eine chemotaktische Wirkung auf dendritische Zellen<sup>135</sup> ausgelöst und die oxidative Abwehr in humanen Makrophagen verstärkt.<sup>136</sup> Die Ausschaltung von P2Y<sub>1</sub> in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen reduziert das Plaquareal, das durch Makrophagen eingenommen wurde.<sup>137</sup> Durch die Aktivierung des P2Y<sub>11</sub> wird die Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen inhibiert<sup>138, 139</sup> und die Reifung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten reguliert.<sup>140, 141</sup> Über P2Y<sub>1,2</sub> wird die Freisetzung von NO induziert und außerdem proinflammatorische Signalwege stimuliert, wie beispielsweise eine Produktion von IL-6, IL-8, MCP1, „growth regulated oncogene  $\alpha$ “ und ICAM1 in mikrovaskulären



EC.<sup>142</sup> Dabei spielt das dysfunktionale Endothel eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Monozyten und deren Differenzierung in Makrophagen. ATP stimuliert die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel.<sup>139</sup> UTP und ATP stimulieren die Expression des proinflammatorischen Moleküls „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM1) in humanen koronaren EC über die Aktivierung des P2Y<sub>2</sub>, über den eine Transaktivierung der VCAM1 Rezeptoren erfolgt.<sup>143,</sup>  
<sup>144</sup> Diese Effekte konnten *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden.<sup>145</sup> Extrazelluläres ATP ist ein potenter Wachstumsfaktor für VSMC über die Aktivierung von P2Y Rezeptoren<sup>25, 88, 146, 147</sup> und wirkt synergistisch mit vielen bekannten Wachstumsfaktoren („platelet derived growth faktor“ (PDGF), „basic fibroblast growth factor“ (BFGF), Insulin).<sup>146, 147</sup> UTP ist ein potenter migrationsstimulierender Faktor über die Aktivierung des P2Y<sub>2</sub><sup>146</sup> und UDP über die Aktivierung des P2Y<sub>6</sub>.<sup>147-149</sup> P2 Rezeptoren regulieren weiterhin den Phänotyp der VSMC und die Expression dieser Rezeptoren ist nach der Veränderung des kontraktile in den proliferierenden Phänotyps der Zellen deutlich verändert.<sup>26</sup> Aufgrund dieser Wirkungen scheinen extrazelluläre Nukleotide einen wichtigen Beitrag in der Atherogenese zu leisten.

## 2. Zielstellung

### **Bedeutung von Purinrezeptoren in der Blutdruckregulation und der Atherosklerose**

Bei der essenziellen Hypertonie treten zwei prinzipielle Veränderungen am Gefäßsystem auf, ein vermehrter Gefäßwiderstand und Gefäßhypertrophie. Beide Vorgänge können durch purinerge Mechanismen verursacht werden. Bisher sind die Ursachen für den gesteigerten systemischen Gefäßtonus beim Patienten mit essenzieller Hypertonie nur unzureichend bekannt. Es sind weitere purinergen Mediatoren denkbar, die die Eigenschaften unterschiedlicher purinerner Mediatoren vereinen können. Daher ist eine Zielstellung dieser Habilitationsschrift die Identifizierung und Charakterisierung von neuartigen purinergen Mediatoren. Da insbesondere das Endothel als ein potentes Sekretom für die Freisetzung von unterschiedlichen vasoaktiven Mediatoren verantwortlich ist, ist der Schwerpunkt auf dieses Kompartiment gelegt worden. Daneben sollte die Charakterisierung der Wirkung dieser purinergen Mediatoren auf den Gefäßtonus und deren klinische Relevanz untersucht werden. Es ist bekannt, dass ein gesteigerter Tonus der Gefäßmuskulatur grundsätzlich durch zwei Prozesse hervorgerufen wird: eine Zunahme des freien zytosolischen Kalziums oder eine Kalziumsensibilisierung, bei der der kontraktile Apparat der Gefäßmuskulatur durch reduzierte Dephosphorylierung der Myosinleichtketten (MLC) für Kalzium sensibilisiert wird, ohne dass sich die freie zytosolische Kalziumkonzentration ändert. Der erste Mechanismus ist gut untersucht,<sup>150, 151</sup> dennoch ließ sich bislang eine erhöhte zytosolische freie Kalziumkonzentration in der menschlichen Gefäßmuskulatur beim Hypertoniker nicht überzeugend nachweisen. Es ist denkbar, dass auch eine gesteigerte Kalziumsensibilisierung des kontraktile

Apparats grundlegend zur Hypertonieentstehung beiträgt und neben einer Kalziumerhöhung den Gefäßtonus steigert. Die vorliegenden tierexperimentellen Befunde lassen bereits eine wichtige Rolle der Kalziumsensibilisierung für den Gefäßtonus vermuten, was bei hypertensiven Ratten und dessen Rolle in der Hypertonieentstehung unterstreichen würde.<sup>152-154</sup> Eine Rho Kinase (RhoK) induzierte Kalziumsensibilisierung ist bekannt.<sup>155</sup> P2Y<sub>1,2,4,6</sub> können wiederum die RhoK aktivieren.<sup>97</sup> Neben der Kalziumsensibilisierung modifiziert die RhoK viele weitere Prozesse, wie beispielsweise die Proliferation und die Migration unterschiedlicher Zellen.<sup>156-158</sup> Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Erforschung des Einflusses des purinergen Systems auf zentrale proatherogene Mechanismen, die insbesondere in der frühen Atherogenese eine Bedeutung haben. Am Beispiel MCP1 sollte der Einfluss von Up<sub>4</sub>A untersucht werden.

### 3. Fragestellungen

Die Fragestellungen innerhalb dieses Teilgebietes sind:

- neue purinerge Mediatoren zu identifizieren, die potente vasoaktive Eigenschaften besitzen, deren pharmakologische Charakterisierung und deren Bedeutung bei Patienten mit arterieller Hypertonie.
- neue indirekte purinerge Mechanismen zu identifizieren, über die Nukleotide die Vasoaktivität und damit den Blutdruck verändern können.
- die Bedeutung der neuartigen Mediatoren auf die Atherogenese zu untersuchen.

### 4. Zusammenfassung des Themengebietes

**Fragestellung 1: Identifizierung neuartiger vasoaktiver Nukleotide und deren physiologische Charakterisierung**

Im Rahmen der ersten Fragestellung konnte durch systematische Analyse aus dem Überstand von aktivierten humanen mikrovaskulären EC („human microvascular endothelial cells“, HMEC) zwei bislang nicht bekannte Nukleotide, Up<sub>4</sub>A und Ap<sub>4</sub>, identifiziert werden. Die Daten konnten in den folgenden Artikeln veröffentlicht werden:

1. Im Rahmen der ersten Publikation auf diesem Gebiet konnte Up<sub>4</sub>A identifiziert werden.

*Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Nature Medicine“ (IF: 28,878) 2005 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist 1. Autor, wobei eine geteilte Erstautorenschaft vorliegt. **Diese Arbeit ist Bestandteil der kumulativen Promotionsschrift des Verfassers und damit KEIN Bestandteil dieser Habilitationsschrift.** Sie dient der vollständigen Beschreibung der wissenschaftlichen Tätigkeit des Verfassers auf dem Gebiet des purinergen Systems. Das Manuskript ist **im Anhang hinterlegt.***

2. Des Weiteren konnte ein neuartiges Mononukleotid identifiziert werden, das Adenosintetraphosphat ( $Ap_4$ ), das am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere dasjenige Nukleotid mit der höchsten vasoaktiven Potenz darstellt. Die Wirkung von  $Ap_4$  konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bestätigt werden.  $Ap_4$  zeichnet sich darüber hinaus durch eine höhere Resistenz gegenüber Phosphatasen aus, so dass die Halbwertszeit im Vergleich zu ATP verlängert ist.

*Das Originalmanuskript ist **der Habilitationsschrift beigelegt**. Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Circulation Research“ (IF: 9,989) 2008 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist 1. Autor. Es besteht ein 50% Anteil bei der Erstellung der Arbeit.*

3. Die Bedeutung von  $Up_4A$  wurde im klinischen Bereich an juvenilen Hypertonikern untersucht, bei denen die  $Up_4A$  Plasmakonzentration mit der Höhe des arteriellen Blutdrucks, dem Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie und der IMT korreliert. Ein möglicher Mechanismus liegt in einer proliferationssteigernden Wirkung von  $Up_4A$  auf VSMCs.

*Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology“ (IF: 7,221) 2007 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist Ko-Autor. Es besteht ein 20% Anteil bei der Erstellung der Arbeit. Das Manuskript ist **im Anhang hinterlegt**.*

4. Zuletzt wurde die physiologische Charakterisierung von  $Up_4A$  am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere detailliert untersucht, an dem neben  $P2X_{1,3}$  auch  $P2Y_2$  aktiviert werden. Über die Aktivierung des  $P2X_{1,3}$  wird eine potente, aber durch schnelle Desensibilisierung kurze Vasokonstriktion induziert. Über die Aktivierung des  $P2Y_2$  wird eine im Vergleich zum  $P2X$  Rezeptoreffekt geringere Vasokonstriktion induziert, die aber aufgrund der fehlenden Desensibilisierung von  $P2Y$  Rezeptoren kontinuierlich anhält. Somit konnte gezeigt werden, dass  $Up_4A$  sowohl in der kurzfristigen Vasoregulation als auch in der langfristigen Vasoregulation eine wichtige Rolle spielt.

*Das Originalmanuskript ist **der Habilitationsschrift beigelegt**. Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „British Journal of Pharmacology“ (IF: 5,204) 2010 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist 1. Autor. Es besteht ein 50% Anteil bei der Erstellung der Arbeit.*

## **Fragestellung 2: Erforschung neuer Mechanismen über die purinerge Mediatoren den Vasotonus verändern können**

Neben der direkten vasoaktiven Wirkung von Nukleotiden durch die Aktivierung des  $P2X_{1,3}$  spielen weitere potente Mechanismen in der vaskuläre Physiologie eine entscheidende Rolle. Daten über die Bedeutung des purinergen Systems auf die Kalziumsensibilisierung konnten im folgenden Artikel veröffentlicht werden:

1. Am Beispiel von Diguanosinpentaphosphat ( $Gp_5G$ ) konnte ein für purinerge Mediatoren erstmalig gezeigte blutdrucksteigernder Effekt über die Aktivierung der MLCK-II gezeigt

werden. Gp<sub>5</sub>G besitzt eine hohe Affinität zu P2Y Rezeptoren und keine Affinität zu P2X Rezeptoren. Am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere konnte gezeigt werden, dass Gp<sub>5</sub>G keine direkte Veränderung des Perfusionsdrucks induzierte. Durch die Dauerperfusion mit Gp<sub>5</sub>G konnte die vasoaktive Potenz von AngII dosisabhängig erhöht werden. Die Aktivierung des P2Y<sub>4,6</sub> durch Gp<sub>5</sub>G aktiviert die MLCK-II-Kinase. Über diese Aktivierung werden VSMC für Kalzium sensibilisiert, so dass damit die Linksverschiebung der DWK von AngII erklärt werden kann. Damit stellt dieser Mechanismus einen pathophysiologisch wichtigen Mechanismus zur Hypertoniegenese durch das purinerge System dar.

*Das Originalmanuskript ist **der Habilitationsschrift beigelegt**. Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Cardiovascular Research“ (IF: 5,218) 2006 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist 1. Autor, wobei eine geteilte Erstautorenschaft mit Herrn Dr. med. Günter Giebing vorliegt, die beide 35% Anteil bei der Erstellung der Arbeit haben.*

### **Fragestellung 3:           Untersuchung des Einflusses von Up<sub>4</sub>A auf die Atherogenese**

Die Atherosklerose stellt eine vaskuläre Systemerkrankung mit immenser Bedeutung dar. Es ist bekannt, dass purinerge Mediatoren wichtige Prozesse innerhalb der Atherogenese beeinflussen können. Da das neuartig identifizierte Dinukleosidpolyphosphat Up<sub>4</sub>A eine hohe Affinität zu P2Y Rezeptoren aufweist, wurde in diesem Abschnitt dessen Bedeutung auf die Initiation der Atherogenese untersucht. Die Ergebnisse konnte in folgendem Artikel veröffentlicht werden:

1. Es wurde die Bedeutung von Up<sub>4</sub>A auf die Induktion von proinflammatorischen Prozessen untersucht. Ein bedeutendes Zytokin, das in der frühen Phase der Atherogenese eine wichtige Rolle zukommt, ist MCP1, das über einen sauerstoffradikalabhängigen Mechanismus gebildet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Up<sub>4</sub>A auf die MCP1 Expression und Sekretion und die damit verbundenen Signaltransduktionsmechanismen in VSMC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass über die Stimulation mit Up<sub>4</sub>A die MCP1 Produktion konzentrationsabhängig über die Aktivierung von P2Y<sub>2</sub> induziert werden kann. Dabei wird die vaskuläre NADPH Oxidase zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen stimuliert. Der intrazelluläre Signaltransduktionsweg ist von der Aktivierung von MAPK abhängig.

*Das Originalmanuskript ist **der Habilitationsschrift beigelegt**. Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Journal of Molecular Medicine“ (IF: 5,192) 2011 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist Letztautor. Es besteht ein Anteil von 50% bei der Erstellung der Arbeit.*

## Themengebiet II

### HDL und Lysophospholipide in der vaskulären Regulation

#### 1. Einleitung in das Themengebiet

Als Einleitung in das Themengebiet ist dieser Habilitationsschrift eine vom Verfasser geschriebene und publizierte Übersichtsarbeit beigelegt.

#### 2. Zielstellung

Vielen bekannten proinflammatorischen und proatherogenen Faktoren stehen wenige bekannte endogene vaskuloprotektive Faktoren gegenüber. Einer der wichtigsten dieser endogenen Faktoren ist das „High Density Lipoprotein“ (HDL). Seit vielen Jahrzehnten ist nicht nur durch die Framingham Studie bekannt, dass HDL eine wichtige Rolle bei der Reduktion kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität spielt. HDL konnte als ein wichtiger Faktor zur Reduktion der inflammatorischen Reaktion in den Gefäßen identifiziert werden. Bereits in tierexperimentellen Studien und in Observationsstudien konnte gezeigt werden, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Bildung und Progression einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung und einer niedrigen HDL Plasmakonzentration gibt. Bis vor wenigen Jahren hat man angenommen, dass HDL über den Abtransport von Cholesterin, den sogenannten reversen Cholesterintransfer, aus den arteriellen Gefäßen gefäßprotektiv wirkt. Jedoch mehren sich in den letzten Jahren die Daten, dass HDL mehr als nur ein Transportmolekül für Cholesterin ist. HDL wirkt im Bereich arterieller Gefäße antiinflammatorisch und damit der Progression einer bestehenden inflammatorischen Atherosklerose entgegen. 2001 konnte gezeigt werden, dass einer der wichtigsten molekularen vaskuloprotektiven Mechanismen, die Aktivierung der eNOS, zellvermittelt durch HDL aktiviert werden kann. HDL ist ein komplex aufgebautes Molekül, das sich sowohl aus Proteinen als auch aus Lipidbestandteilen zusammensetzt. Dabei setzt sich die Proteinfraktion aus den sogenannten Apolipoproteinen (Apo), insbesondere dem ApoAI und dem ApoAII, zusammen. Die Lipidfraktion besteht aus Cholesterin, Triglyzeriden und Phospholipiden. Innerhalb der Gruppe der Phospholipide nehmen die Lysophospholipide eine besondere Rolle ein, hierzu zählen sowohl Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und Lysophosphatid (LSF). Diese Lysophospholipide wirken über spezifische Rezeptoren, insbesondere die S1P Rezeptoren, direkt zellvermittelt auf die vaskuläre Physiologie. Das Lysophospholipid basierte Immunsuppressivum FTY720, ein strukturelles Analogon von S1P, stellt eine neuartige Medikamentenklasse dar.

### 3. Fragestellungen

Die Fragestellungen innerhalb dieses Teilgebietes sind:

- die antiinflammatorischen Eigenschaften von HDL und dessen Komponenten detailliert zu untersuchen. Dabei wurde die Wirkung auf die Aktivierung der eNOS und die Expression von frühen Markern der Atherogenese untersucht.
- die mögliche therapeutische Bedeutung von S1P und FTY720, als ein strukturelles Analogon des S1P, auf die vaskuläre Regulation zu untersuchen. Dabei wurde die Wirkung u.a. auf die Atherogenese und die Aktivierung der eNOS untersucht.

### 4. Zusammenfassung des Themengebietes

#### Fragestellung 1: Identifizierung und Charakterisierung vasoprotektiver Eigenschaften von HDL

1. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass die eNOS durch HDL und dessen assoziierte Lysophospholipide S1P, SPC und LSF über Bindung an den „scavenger receptor class B, member I“ (SRBI) und S1P<sub>3</sub> Stimulation aktiviert werden kann. Damit konnten erstmalig die HDL Komponenten isoliert und charakterisiert werden, die für eine potente vaskuloprotektive Wirkung von HDL verantwortlich sind.

*Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Journal of Clinical Investigation“ (IF: 14,204) 2004 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist Koautor. **Diese Arbeit ist Bestandteil der kumulativen Promotionsschrift des Verfassers und damit KEIN Bestandteil dieser Habilitationsschrift.** Sie dient nur der vollständigen Beschreibung der wissenschaftlichen Tätigkeit des Verfassers auf dem Gebiet des HDL. Das Manuskript ist **im Anhang hinterlegt.***

2. An Ratten VSMC konnte gezeigt werden, dass die Expression und Sekretion des für die Initiation der Atherogenese bedeutenden MCP1 durch HDL und assoziierte Lysophospholipide potent inhibiert werden konnte. Der Signaltransduktionsweg verläuft über die Aktivierung des S1P<sub>3</sub> und über die Verminderung der Superoxidradikalproduktion durch die Inhibition der vaskulären NADPH Oxidase.

*Das Originalmanuskript ist **der Habilitationsschrift beigelegt.** Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology“(IF: 6,858) 2008 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist 1. Autor. Es besteht ein 50% Anteil bei der Erstellung der Arbeit.*

#### Fragestellung 2: Identifizierung und Charakterisierung vasoprotektiver Eigenschaften des Lysophospholipids S1P und des Lysophospholipid basierten Immunsuppressivums FTY720

1. Der Immunmodulator FTY720, ein strukturelles Analog des S1P, zeigte mit S1P vergleichbare vaskuläre Eigenschaften. Ebenfalls über Aktivierung des S1P<sub>3</sub> wird die eNOS aktiviert. Damit

konnte erfolgreich gezeigt werden, dass neben der immunmodulatorischen Wirkung von FTY720 auch vasoprotektive Eigenschaften bestehen.

*Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Circulation Research“ (IF: 9,408) 2005 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist Erstautor, wobei eine geteilte Erstautorenschaft mit Herrn Prof. Dr. Bodo Levkau vorliegt. **Diese Arbeit ist Bestandteil der kumulativen Promotionsschrift des Verfassers und damit KEIN Bestandteil dieser Habilitationsschrift.** Sie dient nur der vollständigen Beschreibung der wissenschaftlichen Tätigkeit des Verfassers auf dem Gebiet der Lysophospholipide. Das Manuskript ist **im Anhang hinterlegt.***

2. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die unter Punkt 1 erhobenen Ergebnisse der Lysophospholipid induzierten Vaskuloprotektion auch *in vivo* zu erkennen sind. Dazu wurden ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse auf eine normale oder eine hochkalorische Diät gesetzt. Die Tiere unter hochkalorischer Diät entwickelten eine Atherosklerose. Diese Tiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Eine wurde mit FTY720 behandelt, unter dessen Behandlung sich eine signifikant verminderte atherosklerotische Gefäßwandveränderung ausbildete im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Expression und Sekretion von MCP1 aus VSMC durch die Aktivierung des S1P<sub>3</sub> durch FTY720 inhibiert werden kann.

*Das Manuskript wurde im peer-reviewed Journal „Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology“ (IF: 7,221) 2007 veröffentlicht. Der Verfasser dieser Habilitationsschrift ist Koautor. Es besteht ein 20% Anteil bei der Erstellung der Arbeit. Das Manuskript ist **im Anhang hinterlegt.***

In diesem Themengebiet wurden weitere funktionelle und strukturelle Aspekte von HDL und Lysophospholipiden untersucht. Die Arbeiten konnten als Koautor publiziert werden und sind dem Publikationsverzeichnis zu entnehmen.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Habilitationsschrift werden in zwei unabhängigen Aspekten diskutiert: zum einen die Bedeutung der erhobenen Daten in Bezug auf die Regulation des Gefäßtonus und zum anderen in Bezug auf die Atherogenese. Im Rahmen der Diskussion wird auf die für das jeweilige Themengebiet relevanten Arbeiten unabhängig von Erst- oder Koautorenschaften eingegangen.

### Regulation des Gefäßtonus durch neue endogene Faktoren

Die vaskuläre Regulation spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose<sup>7</sup> und der arteriellen Hypertonie.<sup>159</sup> Dabei nehmen vor allem die Regulation des Gefäßtonus und Veränderungen in der Gefäßarchitektur eine bedeutende Rolle ein. Zahlreiche Mediatoren sind heutzutage bekannt, die einen wesentlichen Einfluss auf diese vaskulären Regulationsprozesse haben. Dabei stellen neben wichtigen blut- und gewebeständigen sekretorisch aktiven Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Thrombozyten oder natürliche Killerzellen (NKZ),<sup>160</sup> ebenfalls gefäßständige Zellen, wie EC, ein Sekretom mit erstaunlicher Leistungsfähigkeit dar. So wird eine große Bandbreite an vasoaktiven Mediatoren von EC unter „Shear Stress“ Bedingungen synthetisiert, gespeichert und sezerniert. Es werden sowohl vasorelaxierende Faktoren (EDRF), als auch vasokonstriktorisch wirkende Mediatoren freigesetzt (EDCF).<sup>161</sup> Die Entdeckung des endothelial sezernierten NO durch Furchgott und Zawadzki zu Beginn der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts veränderte die Sichtweise der vaskulären Regulation bis heute.<sup>162, 163</sup> Mit ET1 konnte ein endothelial sezerniertes Peptid mit potenter vasokonstriktorischer und eNOS aktivierender Eigenschaft identifiziert werden.<sup>164, 165</sup> In den letzten Jahrzehnten hat das RAAS eine zentrale Position des wissenschaftlichen Interesses der vaskulären Regulation eingenommen, was zur Entwicklung von hochselektiven und potenten Medikamenten, wie Aldosteroninhibitoren, „Angiotensin converting enzyme“ (ACE) Inhibitoren, Angiotensin Rezeptor 1 (AT1) Blockern oder Reninantagonisten führte.<sup>166</sup> Durch die pharmakologische Beeinflussung des RAAS konnte beeindruckend gezeigt werden, dass vaskuläre Veränderungen und deren Wirkung auf das kardiovaskuläre System aufgehoben und teilweise wieder aufgehoben werden können.<sup>167</sup> So zählen diese Medikamente heute zu wichtigen therapeutischen Ansätzen in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie,<sup>168</sup> chronischer Herzinsuffizienz,<sup>169</sup> nach Myokardinfarkt<sup>169</sup> oder chronischer Niereninsuffizienz.<sup>170</sup> Weitere wichtige und potente endogene Regulatorsysteme, wie beispielsweise das Endothelinsystem<sup>171</sup> oder das sympathische Katecholaminsystem,<sup>172</sup> erlauben zusätzliche therapeutische Ansätze. Aufgrund der dargestellten klinischen Erfolge ist es von großer Bedeutung, weitere bedeutende Mediatorsysteme zu identifizieren und zu charakterisieren, was eines der eigenen Arbeiten darstellte, um die Grundlage für eine mögliche pharmakologische Intervention zu schaffen. Hierfür wurde das Sekretom Endothel am Beispiel von HMEC, die unter definierten



Bedingungen zur Sekretion von vasoaktiven Mediatoren stimuliert wurden, als Modellsystem verwendet.<sup>173</sup> Durch systematische Analyse des nach Stimulation erhaltenen Überstandes konnten im biologischen "Read-Out" der isoliert perfundierten Rattenniere zwei bis dato *in vivo* human unbekannte endothelial sezernierte vasoaktive Nucleotide identifiziert werden: das Mononucleotid Ap<sub>4</sub> und das Dinucleosidpolyphosphat Up<sub>4</sub>A (siehe Anhang).

Das Konzept der extrazellulären Signaltransduktion durch Nucleotide wurde Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts von Burnstock aufgestellt, insbesondere die Bedeutung von ATP als Kofaktor in sympathischen Nervenfasern.<sup>174, 175</sup> Trotz anfänglicher Blockade gegen das Konzept der extrazellulären purinergen Signaltransduktion ist diese bis heute fundiert belegt.<sup>176, 177</sup> Das Endothel stellt ein bedeutendes Sekretom für adenosinhaltigen und uridinhaltige Nucleotide dar, die dort lokal in hoher Konzentration vorkommen.<sup>26, 178-180</sup> ATP wird schnell aus kultivierten EC unterschiedlicher Gefäßbette als Antwort auf einen durch eine erhöhte Perfusionsrate entstehenden „Shear Stress“ freigesetzt.<sup>181-184</sup> Die durch die jeweiligen Nucleotide ausgelöste physiologische Reaktion ist vom jeweiligen Nucleotidtyp und dem Muster der purinergen Rezeptoren auf den Zielzellen abhängig,<sup>118, 185</sup> die innerhalb verschiedener Gefäßbetten variabel exprimiert werden. So werden auf VSMC vornehmlich P2X<sub>1</sub> und in einigen Gefäßen auch P2X<sub>2,3,4</sub> und P2Y<sub>1,2,4,6</sub> exprimiert, auf EC P2X<sub>1,2,3,4</sub> sowie P2Y<sub>1,2,4,12</sub>.<sup>83, 88-103</sup> Des Weiteren haben die Anwesenheit einer Adenosinuntereinheit und die Anzahl der mit dieser Untereinheit verbundenen Phosphate einen wesentlichen Anteil an der Affinität zu P2 Rezeptoren.<sup>186, 187</sup> Insbesondere das Vorhandensein einer Kette von 3 Phosphaten am Adenin erhöht die Affinität zu P2X Rezeptoren.<sup>188</sup> Mehrere Jahrzehnte vor dieser Entdeckung konnte mit Ap<sub>4</sub> ein Nucleotid aus dem Überstand von VSMC identifiziert werden, dass im Vergleich zu ATP eine Phosphatgruppe zusätzlich beinhaltet.<sup>189, 190</sup> Ap<sub>4</sub> ist mit anderen Nucleotiden innerhalb der Granula von Thrombozyten kolokalisiert und kann durch die Einwirkung von Thrombin freigesetzt werden. Ap<sub>4</sub> zeigt eine höhere Resistenz gegen die Degradation durch Nucleotidasen<sup>191</sup> und eine höhere vasokonstriktorische Potenz als ATP. In einer Studie von Lee *et al.* wurde die Wirkung von Ap<sub>4</sub> auf die vasculäre Regulation in thorakalen Aortenringen von Sprague Dawley Ratten untersucht.<sup>191</sup> In diesem Modell löst Ap<sub>4</sub> im nicht vorkontrahierten Zustand mit intaktem Endothel eine potente Vasokonstriktion aus, wohingegen ATP zur Vasodilatation führt. Nach mechanischer Entfernung des Endothels zeigt sowohl Ap<sub>4</sub> als auch ATP eine dosisabhängige Kontraktion, wobei Ap<sub>4</sub> eine höhere Potenz besitzt. Unter Vorkontraktionsbedingung mit intaktem Endothel zeigte sich sowohl bei ATP als auch bei Ap<sub>4</sub> eine dosisabhängige Vasodilatation, wobei in diesem Fall ATP eine höhere Potenz besitzt. Eine nähere physiologische Charakterisierung der vermittelnden Rezeptorsubtypen oder der assoziierten Signaltransduktion hinter diesen Prozessen wurde nicht untersucht.

In einer eigenen Arbeit<sup>192</sup> konnte dann erstmals gezeigt werden, dass das humane Endothel ein potentes Sekretom für  $Ap_4$  darstellt. Des Weiteren wurde  $Ap_4$  in zwei unterschiedlichen physiologischen Modellen, dem Kleingefäßmyographen an der *A. renalis* und der isoliert perfundierten Rattenniere einer Wistar Ratte, charakterisiert. Dabei zeigte  $Ap_4$  eine höhere vasoaktive Potenz als  $\alpha,\beta$ -Met-ATP, eine durch chemische Modifikationen gegen Degradation durch Nukleotidasen geschützten Variante des ATP, die nicht *in vivo* vorkommt und bislang als stärkster purinerg Vasokonstriktor im renalen Perfusionsgebiet galt.<sup>192</sup> Interessanterweise ist die vasoaktive Potenz von Norepinephrin ebenfalls schwächer als die von  $Ap_4$ . Dieser vasokonstriktive Effekt wird durch die Aktivierung des  $P2X_1$  vermittelt, ein mit der Literatur konformer Befund.<sup>68, 71</sup> Die in der Arbeit von Lee gezeigte dilatative Wirkung von  $Ap_4$  konnte in dieser Arbeit sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* belegt werden.  $Ap_4$  induziert unter vollständiger Blockade des  $P2X_1$  und unter Vorkontraktionsbedingungen am *ex vivo* Modell der isoliert perfundierten Rattenniere eine geringe dosisabhängige vasodilatatorische Wirkung, die im Rahmen der geringen Degradation zu AMP und Adenosin erklärt werden kann.<sup>193-195</sup> Die Applikation von ATP unter den gleichen Bedingungen bewirkt eine stärkere Vasodilatation, vereinbar mit der größeren Abbaurate von ATP im Vergleich zu  $Ap_4$ . Ein übereinstimmender Effekt konnte auch nach intraarterieller Applikation von  $Ap_4$  und ATP auf den systemischen Blutdruck beobachtet werden, wobei ATP eine dosisabhängige Abnahme des arteriell gemessenen Blutdrucks und durch  $Ap_4$  eine biphasische Blutdruckveränderung mit einer schnell einsetzenden Blutdruckerhöhung und einer anschließenden Blutdrucksenkung induziert wurde. Die intraarterielle Applikation von chemisch stabilisierten und damit gegen Degradation geschützten Derivaten von ATP und  $Ap_4$ , induzierte jeweils einen starken und lang anhaltenden Blutdruckanstieg ohne anschließende Blutdruckabnahme, was die Beteiligung der Abbauprodukte an diesem blutdrucksenkenden Effekt wahrscheinlich macht. Mit  $Ap_4$  konnte somit das endothelial sezernierte Mononukleosidpolyphosphat mit der höchsten vasoaktiven Potenz und im Vergleich zu ATP längerer Halbwertszeit identifiziert werden. Somit scheint ATP ein parakrin sezerniertes Nukleotid mit Bedeutung für die Regulation des lokalen Blutflusses und  $Ap_4$  ein zusätzlich endokrin wirksames Nukleotid mit systemischer Wirkung zu sein.

Als zweiter neuer vasoaktiver Mediator konnte  $Up_4A$  aus dem stimulierten Endothelzellüberstand isoliert (siehe Anhang)<sup>196</sup> und im Modell der isoliert perfundierten Rattenniere charakterisiert werden.<sup>197</sup>  $Up_4A$  stellt das erste identifizierte gemischte Dinukleosidpolyphosphat bestehend aus einer Purin- und einer Pyrimidinuntereinheit dar.  $Up_4A$  hat potente vasoaktive Wirkungen, was sowohl im *ex vivo* Versuch an der isolierten perfundierten Rattenniere zu einer mit Katecholaminen vergleichbaren Vasokonstriktion führte, als auch *in vivo* nach intraarterieller Applikation einen systemischen Blutdruckanstieg in einer Wistar Ratte induzierte. Die pharmakologische Charakterisierung zeigte zunächst eine Aktivierung des  $P2X_{1,3}$  sowie  $P2Y_2$ , für die eine potente

vasokonstriktorische Wirkung bekannt sind.<sup>196</sup> Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass adenosinhaltige Dinukleosidpolyphosphate, wie beispielsweise  $Ap_4A$ ,  $Ap_5A$  oder  $Ap_6A$  über eine Aktivierung des  $P2X_{1,3}$  eine starke Vasokonstriktion hervorrufen.<sup>68, 71</sup>  $Up_4A$  induziert eine für die Aktivierung des  $P2X_1$  typische schnelle und potente Vasokonstriktion, die aufgrund einer vollständigen Desensibilisierung des  $P2X_1$  lediglich kurzdauernd ist. Zu  $P2Y$  Rezeptoren weisen adenosinhaltige Dinukleosidpolyphosphate eine schlechtere Affinität auf.  $Up_4A$  hingegen aktiviert neben  $P2X$  auch  $P2Y$  Rezeptoren. Eine  $Up_4A$  Dauerperfusion am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere zeigte einen initial kurzen starken Perfusionsdruckanstieg über die Aktivierung von  $P2X_{1,3}$ , gefolgt von einem geringeren aber kontinuierlichen Perfusionsdruckanstieg über die Aktivierung des  $P2Y_2$ , der keine Desensibilisierung zeigt. Somit ist  $Up_4A$  zum einen ein potenter Regulator innerhalb der kurzfristigen Regulation des Vasotonus, beispielsweise im Rahmen einer parakrinen Sekretion, und zum anderen ein möglicher Regulator des systemischen Blutdrucks durch die Fähigkeit der Daueraktivierung des  $P2Y_2$ . Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass über die Aktivierung von  $P2Y_{1,2}$  eine Stimulation der eNOS erfolgt, was an Pulmonalarterien von Sprague Dawley Ratten bestätigt werden konnte.<sup>198</sup>  $Up_4A$  induziert in diesen Gefäßen eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion, wobei  $Up_4A$  eine äquipotente Wirkung verglichen mit UTP und UDP in mechanisch deendothelialisierten Arterien zeigte und eine deutlich stärkere Potenz in Arterien mit intaktem Endothel. Wie ATP und UTP induziert  $Up_4A$  eine Vasodilatation in diesem Gefäßbett, was dessen Bedeutung als potenter  $P2Y$  Agonist unterstreicht.<sup>198</sup> In thorakalen Aorten von männlichen Sprague Dawley Ratten konnten übereinstimmende Ergebnisse gezeigt werden, wo eine Applikation von  $Up_4A$  zu einer konzentrationsabhängigen Vasokonstriktion in intakten Aorten führte, die durch die Endothelentfernung potenziert werden konnte.<sup>199</sup> Die geringe  $Up_4A$  induzierte Vasodilatation konnte durch Blockade der eNOS inhibiert werden.<sup>199</sup> Des Weiteren zeigte die kontraktile Wirkung von  $Up_4A$  keine Tachyphylaxie und konnte durch die Inhibition von  $P1$  und  $P2X$  Rezeptoren, des L-Type Kalziumkanals und der RhoK unterdrückt werden. Außerdem konnte ein Teil der Vasokonstriktion durch Hemmung der NADPH-Oxidase und Applikation eines „reactive oxygen species“ (ROS) Scavengers inhibiert werden, was auf eine  $Up_4A$  induzierte Sauerstoffradikalproduktion hindeutet.<sup>199</sup> Auch in dieser Arbeit konnte die duale Bedeutung von  $Up_4A$  für die Regulation des Vasotonus durch Vasorelaxation und Vasokonstriktion nachgewiesen werden.<sup>199</sup>  $Up_4A$  wird von renalen Tubulusepithelzellen sezerniert und bewirkt in intrarenalen Arterien eine Kontraktion des Vas efferens der Glomeruli. Somit scheinen der renale Plasmafluss, der glomeruläre Perfusionsdruck und damit die glomeruläre Filtrationsrate durch  $Up_4A$  reguliert zu werden.<sup>200</sup> In einem humanen hypertensiven Kollektiv konnte gezeigt werden, dass die  $Up_4A$  Plasmakonzentration mit wichtigen kardiovaskulären physiologischen Parametern, wie dem Ausmaß des arteriellen Hypertonus, der linksventrikulären kardialen Masse und der IMT, korreliert und

möglicherweise eine Stimulation der Proliferation von VSMC hervorgerufen wird (siehe Anhang).<sup>201</sup> Am Beispiel  $Up_4A$  zeigt sich, in welcher komplexer Art und Weise purinerge Mediatoren in der Lage sind, die vaskuläre Regulation potent zu beeinflussen. Die pharmakologische Intervention des purinergen Systems bietet damit eine mögliche therapeutische Option zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen. Somit konnte letztendlich von der Isolation, der Aufreinigung und physiologischen Charakterisierung von  $Up_4A$  bis hin zur Assoziation der  $Up_4A$  Plasmakonzentration mit bedeutenden kardiovaskulären Parametern in einem humanen hypertensiven Kollektiv die (patho)physiologische Bedeutung dieses Nukleotids gezeigt werden.

Die Regulation des vaskulären Tonus unterliegt neben der direkten Beeinflussung durch Rezeptor gesteuerte Vasokonstriktion und Vasodilatation auch indirekten Einflüssen. Einer dieser indirekten Mechanismen ist die Sensibilisierung der VSMC für Kalzium durch die Aktivierung der RhoK. Die Phosphorylierung der MLC in VSMC ist ein bedeutender Parameter für den vaskulären Gefäßtonus. Das Ausmaß der MLC Phosphorylierung ist stark abhängig von der Aktivität der Kalzium/Calmodulin abhängigen MLC Kinase und der Aktivität der MLC Phosphorylase. Die Aktivität der MLC Kinase ist somit abhängig von der intrazellulären zytosolischen Kalziumkonzentration,<sup>202</sup> wohingegen die Aktivität der MLC Phosphatase dagegen kalziumunabhängig ist. Durch eine kalziumunabhängige Verminderung der Aktivität der MLC Phosphatase kann bei unveränderter intrazellulärer Kalziumkonzentration der Vasotonus steigen. Die Aktivität der MLC Phosphatase wird durch Aktivierung des GTPase abhängigen RhoA Signaltransduktionsweges verändert.<sup>203, 204</sup> RhoA stimuliert die RhoK, die die regulatorische Myosin bindende Untereinheit der Myosinphosphatase phosphoryliert, was zur Inhibition der MLC Phosphatase führt.<sup>205, 206</sup> Dadurch wird eine „Sensibilisierung“ der Effektorzelle gegenüber der vorliegenden Kalziumkonzentration bewirkt und die Eigenschaften von bekannten Vasokonstriktoren, beispielsweise von AngII, verstärkt.<sup>155</sup> *In vivo* konnte gezeigt werden, dass durch die pharmakologische Inhibition der RhoK entweder durch Y27632 oder Fasudil der Blutfluss im Unterarm bei Patienten mit essentieller Hypertonie deutlich stärker erhöht werden konnte als bei gesunden Kontrollen,<sup>207</sup> was auf einen erhöhten RhoK assoziierten Gefäßtonus bei diesen hypertensiven Probanden hindeutet. Auch im Tiermodell wurde bei hypertensiven Ratten eine erhöhte Expression der RhoK nachgewiesen.<sup>153</sup> In diesen Tieren konnte die RhoK induzierte Kalziumsensibilisierung durch Fasudil inhibiert werden.<sup>208</sup> Es stellte sich die Frage, ob das purinerge System zu einer Potenzierung von vasokonstriktiven Wirkungen durch Beeinflussung der MLC beitragen kann.<sup>209</sup> In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass  $Gp_5G$  keinen direkten Einfluss auf die Regulation des Vasotonus zeigt, aber die Proliferation von VSMC über eine potente Aktivierung von P2Y Rezeptoren induziert wird.<sup>62</sup> Da ein Teil der AngII induzierten Vasokonstriktion abhängig von der Aktivität des RhoK Signaltransduktionsweges ist, wurde dieser Vasokonstriktor exemplarisch untersucht.<sup>210</sup> Es gibt Hinweise, dass die chronische Aktivierung der

RhoK in die durch AngII induzierte kardiovaskuläre Hypertrophie eingebunden ist.<sup>211</sup> Die Potenz der AngII induzierten Vasoaktivität wird durch Gp<sub>5</sub>G dosisabhängig verstärkt, wobei das Ausmaß der maximalen AngII induzierten Vasokonstriktion unverändert bleibt, ein Effekt der durch die Aktivierung des P2Y<sub>4,6</sub> über Aktivierung der RhoK und Aktivierung von RhoA induziert wird.<sup>196</sup> Die im humanen Plasma nachgewiesene Gp<sub>5</sub>G Konzentration ist suffizient, um diesen indirekten Einfluss auf den Vasotonus durch Sensibilisierung von VSMC auszuüben. *In vivo* konnte mittels invasiver Blutdruckmessung gezeigt werden, dass nach intraarterieller Injektion von Gp<sub>5</sub>G ein zeitlich verzögert auftretender, aber langanhaltender Blutdruckanstieg über die Aktivierung von P2Y Rezeptoren gemessen werden konnte. Diese Reaktion steht im Gegensatz zum direkten, schnellen und kurzzeitigen Anstieg des arteriellen Blutdrucks nach intraarterieller Injektion anderer Nukleotide, beispielsweise Ap<sub>5</sub>A, der über die direkte Aktivierung von P2X<sub>1,3</sub> ausgelöst wird.<sup>61</sup> Dieser zusätzliche Wirkmechanismus erweitert das Spektrum der purinergen Einflüsse auf das kardiovaskuläre System erheblich.

### **Bedeutung neuer endogener Faktoren auf die Atherogenese**

Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass die Atherosklerose kein passives Einlagern von Lipidbestandteilen in die Gefäßwand darstellt, sondern eine inflammatorische Gefäßerkrankung ist. Einer großen Anzahl proinflammatorischer Mediatoren stehen wenige bekannte endogene Mediatoren mit antiinflammatorischer Wirkung gegenüber.<sup>7</sup> Einer der wichtigsten ist HDL. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass es einen inversen Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration von HDL und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen gibt.<sup>212</sup> Eine niedrige HDL Konzentration ist ein eigenständiger und von der LDL Plasmakonzentration unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von vaskulären Erkrankungen. Eine niedrige HDL Plasmakonzentration ist ein führender Befund bei Männern mit früh einsetzender Atherosklerose.<sup>213</sup> Auf der anderen Seite konnte durch eine leichtgradige Erhöhung der HDL Plasmakonzentration durch die Behandlung mit Niacin und Fibraten eine Verminderung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen erzielt werden.<sup>214, 215</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden mit Cholesterin-Synthase Enzym (CSE) Hemmer<sup>216</sup> oder Ezetimib<sup>217</sup> beobachtet. In einer Hochrisikopopulation konnte der Erfolg einer Primärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen durch die Einnahme von Rosuvastatin nachgewiesen werden.<sup>207</sup> Lange Zeit wurde diese schützende Wirkung von HDL auf dessen Einfluss auf den RCT gedeutet.<sup>218</sup> Diese erstmals 1968 erhobene These ist heute nicht mehr alleinstehend gültig.<sup>219</sup> Beispielsweise schwächt HDL die bei vorliegender endothelialer Dysfunktion zu erkennende abnormale Acetylcholin induzierte Vasokonstriktion in atherosklerotischen Koronararterien ab.<sup>220</sup> Die Verabreichung von HDL bei Männern mit Hypercholesterinämie führt zu einer Verbesserung der Unterarmdurchblutung durch Verbesserung der endothelialen Funktion *in vivo*, die durch L-NMMA,

einen Inhibitor der eNOS, aufgehoben werden konnte.<sup>221</sup> Der Mechanismus, der diesem HDL induzierten antiatherogenen Effekt zugrunde liegt, konnte lange Zeit nicht näher charakterisiert werden. Heute sind pleiotrope Effekte von HDL bekannt. HDL induziert eine Synthesesteigerung von vasodilatativ wirkenden Prostaglandinen (Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)) aus vermehrt zur Verfügung stehender Arachidonsäure.<sup>222, 223</sup> Eine bahnbrechende Erkenntnis war, dass die eNOS durch HDL über einen SRBI assoziierten Signaltransduktionsweg stimuliert werden konnte.<sup>224</sup> Eine Erklärung für diesen Effekt konnte in dieser ersten wichtigen Publikation nicht gegeben werden, da durch den SRBI Bindungspartner, das ApoAI, keine Aktivierung der eNOS gesehen werden konnte. In Folgestudien wurden unterschiedliche Theorien für die HDL induzierte eNOS Stimulation postuliert, wie z.B. eine eNOS Aktivierung über eine HDL induzierte intrazelluläre Ceramidbildung<sup>225, 226</sup> oder HDL assoziierte Östrogene.<sup>226</sup> In einer initialen eigenen Arbeit<sup>227</sup> (siehe Anhang) konnte gezeigt werden, dass HDL eine eNOS Aktivierung über die Aktivierung von Akt/PKB induziert.<sup>227</sup> HDL ist ein komplex aufgebautes Lipidpartikel, das sich aus unterschiedlichen Proteinen und Lipiden zusammensetzt. Durch systematische Analyse konnten die HDL assoziierten Lysophospholipide S1P, SPC und LSF als Mediatoren der eNOS Aktivierung identifiziert werden. Lysophospholipide aktivieren eine Reihe von G-Protein gekoppelten Lysophospholipidrezeptoren, insbesondere S1P Rezeptoren. S1P, SPC und LSF aktivieren endothelial exprimierte S1P<sub>1,3,5</sub>.<sup>228-230</sup> Durch Experimente an S1P<sub>3</sub><sup>-/-</sup> Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass HDL und die assoziierten Lysophospholipide die eNOS über einen S1P<sub>3</sub> abhängigen Mechanismus stimulieren. Dabei liegen die Konzentrationen, in denen diese Lysophospholipide eine eNOS Aktivierung bewirken, im Bereich der physiologisch im HDL Molekül vorliegenden Konzentration. 1 mg des HDL Moleküls beinhaltet ungefähr 300 pmol S1P und 300 pmol SPC.<sup>227</sup> 50% der maximalen Vasorelaxation durch die jeweiligen Lysophospholipide wird bei Konzentrationen erreicht, die zwischen 100 nmol/l und 1000 nmol/l liegen. Die in dieser Arbeit verwendete HDL Konzentration von 1 mg/ml beinhaltet eine Konzentration an bioaktiven Lysophospholipiden (S1P und SPC zusammen) von ca. 550-600 nmol/l. Der Schlüssel für die Aktivierung der eNOS liegt in der Bindung des HDL assoziierten ApoAI an den SRBI, wodurch ein Cholesterinefflux über die Zellmembran der EC induziert wird. Dadurch bilden sich lipidreiche Domänen,<sup>231</sup> in denen der S1P<sub>3</sub> in die Nähe des SRBI und damit in die Nähe der HDL assoziierten Lysophospholipide kommt, die diesen aktivieren können. Die eNOS assoziiert mit den lipidreichen Domänen, so dass durch die Aktivierung des S1P<sub>3</sub> eine Stimulation der eNOS stattfinden kann. Die Bindung von HDL über das ApoAI an den SRBI scheint die lokale Konzentration der im HDL Molekül enthaltenden Lysophospholipide in der Umgebung des S1P<sub>3</sub> deutlich zu erhöhen. Somit ist es nicht möglich, die Wirkung auf die eNOS durch die im HDL enthaltenden Konzentrationen der Lysophospholipide mit der jeweiligen isoliert untersuchten äquimolaren Konzentration im *in vitro* Modell zu vergleichen, da durch diese Assoziationen höhere Konzentrationen der im HDL

vorliegenden Lysophospholipide lokal in die Nähe des S1P<sub>3</sub> kommen können. Das Lysophospholipide mögliche protektive kardiovaskuläre Eigenschaften aufweisen, konnte an einem murinen Herzinfarktmodell gezeigt werden, in dem die Applikation von S1P zu einer Verminderung der Herzinfarktgröße führte. Dieser Effekt war durch die pharmakologische Blockade der eNOS inhibierbar.<sup>232</sup> Zusammenfassend konnten somit Lysophospholipide als HDL Komponenten mit vaskuloprotektiven Eigenschaften identifiziert und der S1P<sub>3</sub> als erster funktioneller HDL assoziierter Rezeptor charakterisiert werden. Lysophospholipide stellen somit eine klinisch interessante therapeutische Substanzklasse dar. Im Rahmen von Organtransplantationen wurde das Lysophospholipid basiertes Immunsuppressivum FTY720 entwickelt, das agonistische Wirkungen am S1P<sub>1,3,4,5</sub> ausübt.<sup>233</sup> Aufgrund dieser Rezeptorassoziation und der möglichen klinischen Implikation wurde in einer Folgestudie untersucht, ob das oral verfügbare FTY720 eine dem S1P vergleichbare Aktivierung der eNOS induzieren kann (siehe Anhang).<sup>234</sup> FTY720 führt, vergleichbar mit S1P, über die Aktivierung von S1P<sub>3</sub> zur einer eNOS Aktivierung und Stimulation von Akt. Da in der Literatur auch eine Aktivierung der eNOS durch die Stimulation des S1P<sub>1</sub> nachgewiesen wurde,<sup>235, 236</sup> muss in diesem Zusammenhang eine Interaktion der Signaltransduktionswege des S1P<sub>1,3</sub> oder eine Heterodimerisierung dieser Rezeptoren diskutiert werden. Des Weiteren ist eine starke Interaktion zwischen den S1P Rezeptoren und anderer Signaltransduktionswege bekannt, wie u.a. dem VEGF<sup>237</sup> und dem TGFβ System.<sup>238</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden,<sup>239</sup> dass die orale Applikation von FTY720 zu einer Reduktion der atherosklerotischen Plaquelast in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen führt (siehe Anhang). Begleitend wurden in diesen Plaques weniger Makrophagen und Kollagenfasern nachgewiesen, die durch eine vermehrte HDL induzierte NO Produktion zu erklären ist. Die Infiltration von monozytären Zellen in die Gefäßwand stellt einen entscheidenden Schritt innerhalb der Atherogenese dar.<sup>240, 241</sup> MCP1 ist ein Schlüsselregulator für die Monozytenrekutierung hin zum Ort der Entzündung.<sup>241-243</sup> Darüber hinaus werden durch den Einfluss von MCP1 proatherogene und proinflammatorische Effekte induziert, wie u.a. die Sekretion von Zytokinen oder die Expression von Adhäsionsmolekülen.<sup>241-243</sup> MCP1 wurde in atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen nachgewiesen und bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom konnten erhöhte Plasmakonzentrationen gemessen werden. In MCP1<sup>-/-</sup> Mäusen und CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen, die den korrespondierenden MCP1 Rezeptor nicht exprimieren, ist eine verminderte Atherogenese nachgewiesen worden, wohingegen die Überexpression von MCP1 in Makrophagen zu einer vermehrten Atherogenese führt.<sup>241-243</sup> Durch die Beeinflussung dieser frühen Signale ist eine Verminderung der Plaquelast zu erwarten, ein durch multiple epidemiologische Studien bereits gezeigtes Phänomen.<sup>243</sup> Die Expression von MCP1 in VSMC wird durch den Einfluss von FTY720 vermindert.<sup>239</sup> Die molekularen Mechanismen hinter diesem Lysophospholipid basierten Effekt in VSMC wurden im Anschluss<sup>244</sup> weiter untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HDL und das



assoziierte Lysophospholipid S1P direkt die Thrombin induzierte MCP1 Expression und Sekretion vermindern kann. Die MCP1 Expression in VSMC wird über die NADPH Oxidase abhängige Bildung von ROS geregelt.<sup>245</sup> Die NAD(P)H Oxidase ist zentral in die Vermittlung von proinflammatorischen Prozessen in der Zelle eingebunden. Sie wird durch unterschiedliche proinflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise AngII, oxLDL, Homozystein oder Thrombin stimuliert.<sup>246</sup> Der Aktivierung der NAD(P)H Oxidase geht eine Stimulation der kleinen GTPase Rac1 voraus. Erst durch deren Aktivierung werden die einzelnen Komponenten der NADPH Oxidase, bestehend aus NOX1/4, gp67phox, gp47phox, gp40phox und gp22phox und an der Plasmamembran koordiniert zusammengesetzt.<sup>247</sup> Die Aktivität dieser Oxidase wird durch den Einfluss von HDL und S1P vermindert, was durch eine Inhibition der Aktivität der kleinen GTPase Rac1 bedingt ist. Insgesamt stellen Lysophospholipide für die vaskuläre Regulation wichtige Mediatoren dar. Trotz der in der letzten Zeit zunehmenden Erkenntnisse auf diesem Gebiet ist die Bedeutung der einzelnen S1P Rezeptoren und insbesondere die scheinbar bestehende ausgeprägte Interaktion mit anderen Rezeptorsystemen erst anfänglich aufgeklärt. Durch die Etablierung von spezifischen S1P Rezeptorantagonisten und –agonisten ist eine Beeinflussung der vaskulären Regulation denkbar.

Purinerge Mediatoren haben neben ihrer wichtigen Rolle innerhalb der kurzfristigen und langfristigen Regulation des Vasotonus auch Einflüsse auf die Atherogenese und Reparaturmechanismen nach Gefäßverletzung. Die Liberation von ATP aus verletztem Endothel hat eine autokrine Stimulation der EC und eine parakrine Stimulation der VSMC zur Folge, die zu einer Proliferation und Migration von VSMC in den Verletzungsbereich führen. Es scheint sich dabei um einen rezeptorvermittelten Effekt hauptsächlich über die Aktivierung des P2Y<sub>2,4</sub> zu handeln.<sup>88, 148, 248</sup> ADP wirkt mit PDGF, „endothelial growth factor“ (EGF) und TGFβ synergistisch auf die Thrombozyten induzierte Proliferation von VSMC.<sup>249</sup> VSMC kommen in zwei Phänotypen vor, in einem kontraktilem oder in einem synthetischen Phänotyp.<sup>250</sup> Der purinerge Rezeptorbesatz ist in diesen beiden Phänotypen unterschiedlich. Während VSMC im kontraktilem Phänotyp vermehrt den P2X<sub>1</sub> auf der Membran exprimieren, ändert sich das Expressionsmuster im synthetischen Phänotyp hin zum einem P2Y<sub>1,2</sub> Rezeptorbesatz, wobei keine Expression von P2X<sub>1</sub> zu beobachten ist.<sup>251</sup> Somit erlangt der synthetische Phänotyp mehr mitogene und proliferative Eigenschaften. Dies konnte in einer Studie mit Up<sub>4</sub>A belegt werden, in der gezeigt werden konnte, dass Up<sub>4</sub>A als proatherogener Mediator über einen P2Y<sub>2</sub> vermittelnden Signalweg die Expression und Sekretion von MCP1 erhöht.<sup>252</sup> Die Stimulation von P2Y<sub>2</sub> durch Up<sub>4</sub>A induziert die Aktivierung der NOX1 assoziierten NAD(P)H Oxidase, was in einer höheren ROS Produktion und anschließender Stimulation der „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) resultiert. Dieser Up<sub>4</sub>A induzierte einen Einfluss auf den oxidativen „burst“ konnte ebenfalls in Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden.<sup>253</sup> Die chronische Inflammation bei Niereninsuffizienz und Atherosklerose ist ebenfalls stark sauerstoffradialabhängig.<sup>7, 254, 255</sup> Aufgrund



der fehlenden selektiven Agonisten und Antagonisten und aufgrund der Problematik, dass P2X Rezeptoren in kultivierten VSMC bereits in frühen Passagen nicht mehr nachgewiesen werden können, ist die Rezeptoridentifizierung nur indirekt über spezifische, aber teilweise unselektive Antagonisten möglich. In den untersuchten VSMC konnten literaturkonform P2Y<sub>2,4,6</sub>, aber nicht P2Y<sub>1</sub> nachgewiesen werden.<sup>24</sup> Die MCP1 Bildung konnte durch Suramin inhibiert werden, einem spezifischen, aber unselektiven Inhibitor für P2Y<sub>1,2</sub> mit gering inhibitorischer Wirkung auf den P2Y<sub>6</sub>.<sup>31</sup> Andere Antagonisten für P2Y<sub>1,4,6</sub> zeigten keinen Einfluss. Es gibt Hinweise, dass P2Y<sub>2</sub> zentral in inflammatorische Reaktionen eingebunden ist, was dessen Bedeutung für die Bildung von MCP1 aus Alveolar- und Peritonealmakrophagen,<sup>256</sup> die Chemotaxis von Neutrophilen,<sup>257</sup> die Expression des „cell adhesion molecule 1“<sup>144</sup> und Regulation der transendothelialen Migration von VSMC beweist.<sup>258</sup> Für ATP und UDP konnte eine Sauerstoffradikal induzierende Wirkung nachgewiesen werden.<sup>259</sup> Die NOX1 Expression und dessen Aktivierung über Stimulation von Rac1 werden durch Up<sub>4</sub>A induziert, gefolgt von der Aktivierung von MEK1, „extracellular signal-related kinase 1/2“ (ERK1/2) und p38, die alle durch P2Y<sub>2</sub> aktiviert werden können.<sup>44, 256</sup> Die Antagonisierung dieser Kinasen inhibiert die Up<sub>4</sub>A induzierte MCP1 Produktion. Für p38 und ERK1/2 konnte eine Aktivierung durch NOX1 mehrfach gezeigt werden,<sup>44, 260, 261</sup> durch die die Expression von MCP1 gesteigert wird.<sup>244</sup> Unter pathologischen Bedingungen ist die Plasmakonzentration von Up<sub>4</sub>A erhöht, was auf eine gesteigerte lokale Konzentration schließen lässt.<sup>201</sup> Somit nimmt das purinerge System auf vielen Ebenen Einfluss auf die Regulation der Gefäßphysiologie. Up<sub>4</sub>A könnte einen Einfluss auf die Initiation und Progression der vaskulären inflammatorischen Reaktion haben und somit eine Verbindung zwischen arterieller Hypertonie und Atherosklerose darstellen. Eine pharmakologische Beeinflussung des P2Y<sub>2</sub> vermag eine antiatherogene Wirkung haben.

## Zusammenfassung

### Themengebiet 1: Bedeutung neuartiger endothelial sezernierter vasoaktiver Mediatoren auf den Gefäßtonus

Eine Fragestellung war es, neue vasoaktive Mediatoren aus dem Überstand von stimulierten HMEC zu isolieren. Durch eine Kombination aus chromatographischen, massenspektrometrischen und physiologischen Versuchen konnten zwei purinerge Mediatoren,  $Up_4A$  und  $Ap_4$ , isoliert werden, die eine potente vasoaktive Wirkung auf das renale Perfusionssystem ausüben.  $Up_4A$  ist das erste gemischte Dinukleosidpolyphosphat, das sowohl  $P2X$  als auch  $P2Y$  Rezeptoren aktiviert. Am Modell der isoliert perfundierten Rattenniere zeigt  $Up_4A$  eine Katecholaminen vergleichbare vasoaktive Wirkung. Durch die Aktivierung des  $P2X_{1,3}$  induziert  $Up_4A$  einen potenten, aber selbstlimitierenden Anstieg des Perfusionsdrucks, der über die Desensibilisierung des  $P2X_1$  zu erklären ist. Durch die Aktivierung des  $P2Y_2$  induziert  $Up_4A$  einen geringeren, aber kontinuierlichen Perfusionsdruckanstieg. Durch den Einfluss von  $Up_4A$  sind damit sowohl kurzfristige potente Änderungen der lokalen Flussverhältnisse als auch langanhaltende systemische Blutdruckmodifikation möglich. Die erhöhte  $Up_4A$  Plasmakonzentration bei juvenilen Hypertonikern ist mit wichtigen klinischen Parametern, wie linksventrikuläre Wanddicke und IMT, assoziiert.  $Ap_4$  konnte zum ersten Mal aus humanen Zellen isoliert werden. Unter den purinergen Mediatoren ist  $Ap_4$  dasjenige mit der größten vasoaktiven Potenz im renalen Gefäßsystem, wobei eine hohe Affinität zum  $P2X_1$  besteht. Im Gegensatz zu ATP, das schnell durch endogene Endonukleasen abgebaut wird, zeigt  $Ap_4$  eine deutlich geringere Abbaurate. Damit scheint es sich um ein Mononukleotid zu handeln, das aufgrund seiner hohen vasoaktiven Potenz neben der parakrinen Sekretion auch im Rahmen einer endokrinen Sekretion eine Wirkung auf den systemischen Blutdruck ausübt. Neben der direkten vasoaktiven Wirkung über die Aktivierung von  $P2$  Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass purinerge Mediatoren die Vasoaktivität anderer bekannter Mediatoren, wie beispielsweise AngII, durch Aktivierung der RhoK potenzieren kann. Die Phosphorylierung der MLC in VSMC ist ein bedeutender Parameter für den vaskulären Gefäßtonus. Das Ausmaß dieser MLC Phosphorylierung ist stark abhängig von der Aktivität der Kalzium/Calmodulin abhängigen MLC Kinase und der Aktivität der MLC Phosphatase. Durch eine kalziumunabhängige Verminderung der Aktivität der MLC Phosphatase kann somit bei unveränderter intrazellulärer Kalziumkonzentration der Vasotonus steigen. Diese Verminderung wird durch RhoA induziert, das die RhoK stimuliert, die die MLC Phosphatase phosphoryliert und damit inhibiert. Dadurch wird eine gesteigerte Sensibilisierung der Zellen gegenüber der intrazellulären zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkt.  $Gp_5G$  aktiviert über die Stimulation des  $P2Y_4$  und/oder  $P2Y_6$  RhoA, so dass eine Sensibilisierung des renalen Perfusionssystems beispielsweise für die AngII induzierte Vasokonstriktion induziert wird. Nukleotide können somit zu einer Erniedrigung der  $EC_{50}$  von bekannten Vasokonstriktoren bei unveränderter  $V_{max}$  über die Kalziumsensibilisierung beitragen.

## **Themengebiet 2: Bedeutung von neuen endogenen Faktoren auf die Atherogenese**

In einer initialen Arbeit konnten erstmalig die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF als die HDL assoziierten Moleküle identifiziert werden, die für direkte zellvermittelte Effekte von HDL verantwortlich sind, wie beispielsweise die S1P<sub>3</sub> vermittelte eNOS Aktivierung über Stimulierung der PI3-K und Akt. In einer Folgearbeit zeigte der oral verfügbare Lysophospholipid basierten Immunmodulator FTY720 die gleichen Eigenschaften wie HDL und S1P. FTY720 aktiviert S1P<sub>1,3,4,5</sub> Rezeptoren. Nach Aktivierung des S1P<sub>3</sub> werden PI3-K und Akt stimuliert, was in einer eNOS Aktivierung resultiert. Somit stellt eine Lysophospholipid basierte Therapie einen interessanten neuen Ansatz auch außerhalb der Immunsuppression dar. Die ermittelten *in vitro* Erkenntnisse der möglichen antiatherosklerotischen Wirkung von FTY720 durch eNOS Stimulation konnten anschließend in einem Tiermodell der induzierbaren Atherosklerose, einer ApoE<sup>-/-</sup> Maus, *in vivo* reproduziert werden. Nach Fütterung der Tiere mit FTY720 konnte eine reduzierte Atherosklerosebildung beobachtet werden. In einer weiteren Arbeit konnte der Effekt auf die MCP1 Expression und Sekretion ebenfalls für HDL, S1P und SPC nachgewiesen werden. Die Thrombin induzierte MCP1 Expression und Sekretion aus VSMC wird durch HDL, S1P und SPC über die Stimulation des S1P<sub>3</sub> inhibiert. In der Signaltransduktion wird die NADPH Oxidase und damit die ROS abhängige Stimulation der MCP1 Expression inhibiert. Erstmals konnten somit die HDL assoziierten Lysophospholipide als funktionelle antiatherosklerotisch wirksame HDL Komponenten und der S1P<sub>3</sub> als funktioneller HDL Rezeptor identifiziert werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Up<sub>4</sub>A über die Aktivierung purinerner Rezeptoren, wie die des P2Y<sub>2</sub>, ein potenter Induktor des proatherogen wirkenden Zytokins MCP1 über die Aktivierung der NADPH Oxidase und Produktion von Sauerstoffradikalen ist. Somit beeinflusst Up<sub>4</sub>A über purinerge Rezeptoren neben dem Gefäßtonus auch über strukturelle Gefäßwandveränderungen die vaskuläre Regulation, was die Bedeutung des purinergen Systems unterstreicht.

## Literaturverzeichnis

1. Statistisches-Bundesamt. 2007;385
2. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular calcification: The killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2009
3. Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlichs C, Achenbach S, Nonnast-Daniel B, Amann K. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. *Kidney Blood Press Res*. 2005;28:280-289
4. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2000;58:353-362
5. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100:2680-2690
6. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association. *Circulation*. 1994;89:2462-2478
7. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126
8. Sachais BS. Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3:412-416
9. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. P47phox is required for atherosclerotic lesion progression in apoe(-/-) mice. *J Clin Invest*. 2001;108:1513-1522
10. Oliver MF. Cigarette smoking, polyunsaturated fats, linoleic acid, and coronary heart disease. *Lancet*. 1989;1:1241-1243
11. Kunjathoor VV, Wilson DL, LeBoeuf RC. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest*. 1996;97:1767-1773
12. Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, Wofford MR, Brancati FL. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis risk in communities study. *N Engl J Med*. 2000;342:905-912
13. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ, Rosenberg IH. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 1995;332:286-291
14. Blanchard T, Bailey R, Holland M, Mabey D. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. *Lancet*. 1993;341:825
15. Grodos D, Tonglet R. Scandinavian simvastatin study (4s). *Lancet*. 1994;344:1768
16. McMurray J, Slattery J. Scandinavian simvastatin study (4s). *Lancet*. 1994;344:1765-1766; author reply 1767-1768
17. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375
18. Raines EW, Ross R. Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: Specificity or redundancy? *Bioessays*. 1996;18:271-282
19. Libby P. Atheroma: More than mush. *Lancet*. 1996;348 Suppl 1:s4-7
20. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of t cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-138
21. Falk E. [plaque vulnerability and disruption]. *Rev Clin Esp*. 1996;196:6-12
22. Kotchen TA. Historical trends and milestones in hypertension research: A model of the process of translational research. *Hypertension*. 2011;58:522-538
23. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50:413-492
24. Erlinge D, Burnstock G. P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal*. 2008;4:1-20
25. Erlinge D. Extracellular atp: A growth factor for vascular smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*. 1998;31:1-8
26. Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:364-373
27. Di Virgilio F, Solini A. P2 receptors: New potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2002;135:831-842
28. Gachet C. Regulation of platelet functions by p2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:277-300
29. Dalziel HH, Westfall DP. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: Subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev*. 1994;46:449-466
30. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. Xxiv. Current status of the nomenclature and properties of p2x receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*. 2001;53:107-118
31. von Kugelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of p2y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362:310-323.
32. Barnard EA, Simon J. An elusive receptor is finally caught: P2y(12), an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:388-391
33. Albizu L, Cottet M, Kralikova M, Stoev S, Seyer R, Brabet I, Roux T, Bazin H, Bourrier E, Lamarque L, Breton C, Rives ML, Newman A, Javitch J, Trinquet E, Manning M, Pin JP, Mouillac B, Durrroux T. Time-resolved fret between gpcr ligands reveals oligomers in native tissues. *Nat Chem Biol*. 2010;6:587-594
34. Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H. Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine a(1) and p2y(1) receptors in living cells. *FEBS Lett*. 2002;523:147-151

35. Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G. Trimeric architecture of homomeric p2x2 and heteromeric p2x1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol.* 2004;342:333-343
36. Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM. Atomic force microscopy imaging demonstrates that p2x2 receptors are trimers but that p2x6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem.* 2005;280:10759-10765
37. Barnard EA, Simon J. An elusive receptor is finally caught: P2y(12'), an important drug target in platelets. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:388-391
38. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994;46:143-156
39. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International union of pharmacology. Xxv. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53:527-552
40. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of p2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 1985;16:433-440
41. Egan TM, Khakh BS. Contribution of calcium ions to p2x channel responses. *J Neurosci.* 2004;24:3413-3420
42. North RA. Molecular physiology of p2x receptors. *Physiol Rev.* 2002;82:1013-1067
43. Abbracchio M, Williams M. *Purinergic and pyrimidergic signalling i.* Springer Verlag Berlin Heidelberg; 2001.
44. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International union of pharmacology lviii: Update on the p2y g protein-coupled nucleotide receptors: From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58:281-341
45. Smrcka AV. G protein betagamma subunits: Central mediators of g protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:2191-2214
46. Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci.* 1992;17:383-387
47. Palmer RK, Boyer JL, Schachter JB, Nicholas RA, Harden TK. Agonist action of adenosine triphosphates at the human p2y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 1998;54:1118-1123
48. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human p2y11 receptor. *Br J Pharmacol.* 1999;128:1199-1206
49. Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK. Pharmacological selectivity of the cloned human p2u-purinoceptor: Potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol.* 1995;116:1619-1627
50. Qi AD, Kennedy C, Harden TK, Nicholas RA. Differential coupling of the human p2y(11) receptor to phospholipase c and adenylyl cyclase. *Br J Pharmacol.* 2001;132:318-326
51. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase c-activating p2 receptors: Identification of a udp-selective, a utp-selective, and an atp- and utp-specific receptor. *Mol Pharmacol.* 1996;50:224-229
52. Fricks IP, Maddileti S, Carter RL, Lazarowski ER, Nicholas RA, Jacobson KA, Harden TK. Udp is a competitive antagonist at the human p2y14 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:588-594
53. von Kugelgen I, Harden TK. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the p2y receptors. *Adv Pharmacol.* 2011;61:373-415
54. Guay D, Beaulieu C, Belley M, Crane SN, DeLuca J, Gareau Y, Hamel M, Henault M, Hyjazie H, Kargman S, Chan CC, Xu L, Gordon R, Li L, Mamane Y, Morin N, Mancini J, Thérien M, Tranmer G, Truong VL, Wang Z, Black WC. Synthesis and sar of pyrimidine-based, non-nucleotide p2y14 receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2011;21:2832-2835
55. North RA, Barnard EA. Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7:346-357
56. Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD, Frolova LY. Diadenosine oligophosphates (ap(n)a), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.* 1998;427:157-163
57. Schluter H, Tepel M, Zidek W. Vascular actions of diadenosine phosphates. *J Auton Pharmacol.* 1996;16:357-362
58. Miras-Portugal MT, Gualix J, Pintor J. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett.* 1998;430:78-82
59. Flores NA, Stavrou BM, Sheridan DJ. The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 1999;42:15-26
60. von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian p2y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 2006;110:415-432
61. Schluter H, Offers E, Bruggemann G, van der Giet M, Tepel M, Nordhoff E, Karas M, Spieker C, Witzel H, Zidek W. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature.* 1994;367:186-188
62. Schluter H, Grobeta I, Bachmann J, Kaufmann R, van der Giet M, Tepel M, Nofer JR, Assmann G, Karas M, Jankowski J, Zidek W. Adenosine(5') oligophospho-(5') guanosines and guanosine(5') oligophospho-(5') guanosines in human platelets. *J Clin Invest.* 1998;101:682-688
63. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:1471-1483
64. Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, van Der Giet M, Stephan N, Henning L, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Zidek W, Schluter H. Dinucleotides as growth-promoting extracellular mediators. Presence of dinucleoside diphosphates ap2a, ap2g, and gp2g in releasable granules of platelets. *J Biol Chem.* 2001;276:8904-8909
65. Luo J, Jankowski J, Knobloch M, Van der Giet M, Gardanis K, Russ T, Vahlensieck U, Neumann J, Schmitz W, Tepel M, Deng MC, Zidek W, Schluter H. Identification and characterization of diadenosine 5',5'''-p1,p2 -diphosphate and diadenosine 5',5'''-p1,p3-triphosphate in human myocardial tissue. *Faseb J.* 1999;13:695-705

66. Jankowski J, van der Giet M, Jankowski V, Schmidt S, Hemeier M, Mahn B, Giebing G, Tolle M, Luftmann H, Schluter H, Zidek W, Tepel M. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits inos expression. *J Clin Invest.* 2003;112:256-264
67. Jankowski J, Yoon MS, Stephan N, Zidek W, Schluter H. Vasoactive diadenosine polyphosphates in human placenta: Possible candidates in the pathophysiology of pre-eclampsia? *J Hypertens.* 2001;19:567-573
68. van der Giet M, Khattab M, Borgel J, Schluter H, Zidek W. Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol.* 1997;120:1453-1460
69. Gabriels G, Rahn KH, Schlatter E, Steinmetz M. Mesenteric and renal vascular effects of diadenosine polyphosphates (apna). *Cardiovasc Res.* 2002;56:22-32
70. Jankowski J, Hagemann J, Yoon MS, van der Giet M, Stephan N, Zidek W, Schluter H, Tepel M. Increased vascular growth in hemodialysis patients induced by platelet-derived diadenosine polyphosphates. *Kidney Int.* 2001;59:1134-1141
71. van der Giet M, Jankowski J, Schluter H, Zidek W, Tepel M. Mediation of the vasoactive properties of diadenosine tetraphosphate via various purinoceptors. *J Hypertens.* 1998;16:1939-1943
72. Ralevic V, Hoyle CH, Burnstock G. Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J Physiol.* 1995;483 ( Pt 3):703-713
73. Jankowski J, Jankowski V, Seibt B, Henning L, Zidek W, Schluter H. Identification of dinucleoside polyphosphates in adrenal glands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:365-370
74. Heidenreich S, Tepel M, Schluter H, Harrach B, Zidek W. Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates. *J Clin Invest.* 1995;95:2862-2867
75. van der Giet M, Cinkilic O, Jankowski J, Tepel M, Zidek W, Schluter H. Evidence for two different p2x-receptors mediating vasoconstriction of ap5a and ap6a in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1463-1469
76. van der Giet M, Westhoff T, Cinkilic O, Jankowski J, Schluter H, Zidek W, Tepel M. The critical role of adenosine and guanosine in the affinity of dinucleoside polyphosphates to p(2x)-receptors in the isolated perfused rat kidney. *Br J Pharmacol.* 2001;132:467-474
77. van der Giet M, Schmidt S, Tolle M, Jankowski J, Schluter H, Zidek W, Tepel M. Effects of dinucleoside polyphosphates on regulation of coronary vascular tone. *Eur J Pharmacol.* 2002;448:207-213
78. Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Tente IM, Henning L, Junker R, Zidek W, Schluter H. Identification and characterization of p(1), p(7)-di(adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets. *J Biol Chem.* 1999;274:23926-23931
79. Vigne P, Breittmayer JP, Frelin C. Diadenosine polyphosphates as antagonists of the endogenous p2y(1) receptor in rat brain capillary endothelial cells of the b7 and b10 clones. *Br J Pharmacol.* 2000;129:1506-1512
80. You J, Johnson TD, Childres WF, Bryan RM, Jr. Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by atp and adp. *Am J Physiol.* 1997;273:H1472-1477
81. Webb TE, Feolde E, Vigne P, Neary JT, Runberg A, Frelin C, Barnard EA. The p2y purinoceptor in rat brain microvascular endothelial cells couple to inhibition of adenylate cyclase. *Br J Pharmacol.* 1996;119:1385-1392
82. Malmjsjo M, Edvinsson L, Erlinge D. P2x receptors counteract the vasodilatory effects of endothelium derived hyperpolarising factor. *Eur J Pharmacol.* 2000;390:173-180
83. Malmjsjo M, Adner M, Harden TK, Pendergast W, Edvinsson L, Erlinge D. The stable pyrimidines udpbetas and utpgammas discriminate between the p2 receptors that mediate vascular contraction and relaxation of the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 2000;131:51-56
84. Jankowski M, Szczepanska-Konkel M, Kalinowski L, Angielski S. Cyclic gmp-dependent relaxation of isolated rat renal glomeruli induced by extracellular atp. *J Physiol.* 2001;530:123-130
85. Bultmann R, Hansmann G, Tuluc F, Starke K. Vasoconstrictor and vasodilator effects of guanine nucleotides in the rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;356:653-661
86. Hansmann G, Bultmann R, Tuluc F, Starke K. Characterization by antagonists of p2-receptors mediating endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;356:641-652
87. Loesch A, Burnstock G. Ultrastructural localisation of atp-gated p2x2 receptor immunoreactivity in vascular endothelial cells in rat brain. *Endothelium.* 2000;7:93-98
88. Malam-Souley R, Seye C, Gadeau AP, Loirand G, Pillois X, Campan M, Pacaud P, Desgranges C. Nucleotide receptor p2u partially mediates atp-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1996;166:57-65
89. Chan CM, Unwin RJ, Bardini M, Oglesby IB, Ford AP, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. Localization of p2x1 purinoceptors by autoradiography and immunohistochemistry in rat kidneys. *The American journal of physiology.* 1998;274:F799-804
90. White SM, Imig JD, Kim TT, Hauschild BC, Inscho EW. Calcium signaling pathways utilized by p2x receptors in freshly isolated preglomerular mvsmc. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F1054-1061
91. Lewis CJ, Evans RJ. P2x receptor immunoreactivity in different arteries from the femoral, pulmonary, cerebral, coronary and renal circulations. *J Vasc Res.* 2001;38:332-340
92. Inscho EW. P2 receptors in regulation of renal microvascular function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280:F927-944
93. Ohkubo T, Yamazaki J, Nakashima Y, Kitamura K. Presence and possible role of the spliced isoform of the p2x1 receptor in rat vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2000;441:57-64



94. Galligan JJ, Hess MC, Miller SB, Fink GD. Differential localization of p2 receptor subtypes in mesenteric arteries and veins of normotensive and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296:478-485
95. Gitterman DP, Evans RJ. Properties of p2x and p2y receptors are dependent on artery diameter in the rat mesenteric bed. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1561-1568
96. Lewis CJ, Gitterman DP, Schluter H, Evans RJ. Effects of diadenosine polyphosphates (ap(n)as) and adenosine polyphospho guanosines (ap(n)gs) on rat mesenteric artery p2x receptor ion channels. *Br J Pharmacol.* 2000;129:124-130
97. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Vaillant N, Gadeau AP, Desgranges C, Scalbert E, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. P2y(1), p2y(2), p2y(4), and p2y(6) receptors are coupled to rho and rho kinase activation in vascular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1751-1761
98. Harper S, Webb TE, Charlton SJ, Ng LL, Boarder MR. Evidence that p2y4 nucleotide receptors are involved in the regulation of rat aortic smooth muscle cells by utp and atp. *Br J Pharmacol.* 1998;124:703-710
99. Nori S, Fumagalli L, Bo X, Bogdanov Y, Burnstock G. Coexpression of mRNAs for p2x1, p2x2 and p2x4 receptors in rat vascular smooth muscle: An in situ hybridization and rt-pcr study. *J Vasc Res.* 1998;35:179-185
100. Seye CI, Gadeau AP, Daret D, Dupuch F, Alzieu P, Capron L, Desgranges C. Overexpression of p2y2 purinoceptor in intimal lesions of the rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3602-3610
101. Murthy KS, Makhlof GM. Coexpression of ligand-gated p2x and g protein-coupled p2y receptors in smooth muscle. Preferential activation of p2y receptors coupled to phospholipase c (plc)-beta1 via galphaq/11 and to plc-beta3 via gbetagamma3. *J Biol Chem.* 1998;273:4695-4704
102. Lewis CJ, Ennion SJ, Evans RJ. P2 purinoceptor-mediated control of rat cerebral (pial) microvasculature; contribution of p2x and p2y receptors. *J Physiol.* 2000;527 Pt 2:315-324
103. Harada H, Chan CM, Loesch A, Unwin R, Burnstock G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via p2y and p2x receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* 2000;57:949-958
104. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and edrf released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:236-244
105. Dominiczak AF, Quilley J, Bohr DF. Contraction and relaxation of rat aorta in response to atp. *Am J Physiol.* 1991;261:H243-251
106. Castro AF, Amorena C, Muller A, Ottaviano G, Tellez-Inon MT, Taquini AC. Extracellular atp and bradykinin increase cgmp in vascular endothelial cells via activation of pkc. *Am J Physiol.* 1998;275:C113-119
107. Inscho EW, Cook AK, Mui V, Miller J. Direct assessment of renal microvascular responses to p2-purinoceptor agonists. *The American journal of physiology.* 1998;274:F718-727
108. Malmstro M, Hou M, Harden TK, Pendergast W, Pantev E, Edvinsson L, Erlinge D. Characterization of contractile p2 receptors in human coronary arteries by use of the stable pyrimidines uridine 5'-o-thiodiphosphate and uridine 5'-o-3-thiotriphosphate. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;293:755-760
109. Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J.* 1998;336 ( Pt 3):513-523
110. Ralevic V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J Auton Nerv Syst.* 2000;81:205-211
111. von Kugelgen I, Haussinger D, Starke K. Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for utp, distinct from the p2 purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987;336:556-560
112. Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, Evans RJ. Renal autoregulation in p2x1 knockout mice. *Acta Physiol Scand.* 2004;181:445-453
113. Vidal M, Hicks PE, Langer SZ. Differential effects of alpha-beta-methylene atp on responses to nerve stimulation in shr and wky tail arteries. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1986;332:384-390
114. Brock JA, Van Helden DF. Enhanced excitatory junction potentials in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch.* 1995;430:901-908
115. Fernandez O, Wangenstein R, Osuna A, Vargas F. Renal vascular reactivity to p(2)-purinoceptor activation in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology.* 2000;60:47-50
116. Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, Feletou M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, atp and the calcium ionophore a 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18:321-326
117. Hollah P, Hausberg M, Kosch M, Barenbrock M, Letzel M, Schlatter E, Rahn KH. A novel assay for determination of diadenosine polyphosphates in human platelets: Studies in normotensive subjects and in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19:237-245
118. Burnstock G. Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat.* 1999;194 ( Pt 3):335-342
119. Wang L, Karlsson L, Moses S, Hultgardh-Nilsson A, Andersson M, Borna C, Gudbjartsson T, Jern S, Erlinge D. P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;40:841-853
120. Wihlborg AK, Malmstro M, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Jacobson K, Erlinge D. Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1451-1458
121. Malmstro M, Erlinge D, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Endothelial p2y receptors induce hyperpolarisation of vascular smooth muscle by release of endothelium-derived hyperpolarising factor. *Eur J Pharmacol.* 1999;364:169-173
122. Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Qi Z, Sokabe M, Ando J. P2x(4) receptors mediate atp-induced calcium influx in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H285-292

123. Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J. Fluid shear stress activates ca(2+) influx into human endothelial cells via p2x4 purinoceptors. *Circ Res.* 2000;87:385-391
124. Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 2006;276:113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181
125. Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of cd39/vascular atp diphosphohydrolase. *J Biol Chem.* 1996;271:33116-33122
126. Saito D, Steinhart CR, Nixon DG, Olsson RA. Intracoronary adenosine deaminase reduces canine myocardial reactive hyperemia. *Circ Res.* 1981;49:1262-1267
127. Zatta AJ, Headrick JP. Mediators of coronary reactive hyperaemia in isolated mouse heart. *Br J Pharmacol.* 2005;144:576-587
128. Gordon JL. Extracellular atp: Effects, sources and fate. *Biochem J.* 1986;233:309-319
129. Vassort G. Adenosine 5'-triphosphate: A p2-purineric agonist in the myocardium. *Physiol Rev.* 2001;81:767-806
130. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: An emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001;97:587-600
131. Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, Rubini M, Di Virgilio F. An atp-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human t lymphocytes. *Blood.* 1996;87:682-690
132. Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Malone K, Kaslow H, Koch-Nolte F, Schott WH, Leiter EH, Dennert G. P2x7 receptor-dependent and -independent t cell death is induced by nicotinamide adenine dinucleotide. *J Immunol.* 2005;174:1971-1979
133. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. Extracellular atp triggers il-1 beta release by activating the purineric p2z receptor of human macrophages. *J Immunol.* 1997;159:1451-1458
134. Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by p2x7 receptor-activated microglia. *J Neurosci.* 2004;24:1-7
135. Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di Virgilio F, la Sala A, Girolomoni G, Panther E, Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive p2y receptors. *Blood.* 2002;100:925-932
136. Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Romey G, Ventura MA, Breittmayer V, Millet MA, Husson H, Moghrabi B, Lazdunski M, Rossi B. Extracellular atp and utp control the generation of reactive oxygen intermediates in human macrophages through the opening of a charybdotoxin-sensitive ca2+-dependent k+ channel. *J Immunol.* 1997;159:6209-6215
137. Hechler B, Freund M, Ravanat C, Magnenat S, Cazenave JP, Gachet C. Reduced atherosclerotic lesions in p2y1/apolipoprotein e double-knockout mice: The contribution of non-hematopoietic-derived p2y1 receptors. *Circulation.* 2008;118:754-763
138. Duhant X, Schandene L, Bruyns C, Gonzalez NS, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Extracellular adenine nucleotides inhibit the activation of human cd4+ t lymphocytes. *J Immunol.* 2002;169:15-21
139. Dawicki DD, McGowan-Jordan J, Bullard S, Pond S, Rounds S. Extracellular nucleotides stimulate leukocyte adherence to cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995;268:L666-673
140. Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, Dalpke AH, Heeg KM, Robaye B, Hanley PJ. "Host tissue damage" signal atp promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem.* 2005;280:32459-32467
141. Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular atp in human dendritic cells. *Blood.* 2005;106:3860-3866
142. Seiffert K, Ding W, Wagner JA, Granstein RD. Atpgammas enhances the production of inflammatory mediators by a human dermal endothelial cell line via purineric receptor signaling. *The Journal of investigative dermatology.* 2006;126:1017-1027
143. Seye CI, Yu N, Jain R, Kong Q, Minor T, Newton J, Erb L, Gonzalez FA, Weisman GA. The p2y2 nucleotide receptor mediates utp-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278:24960-24965
144. Seye CI, Yu N, Gonzalez FA, Erb L, Weisman GA. The p2y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with vegf receptor-2 (kdr/flk-1). *J Biol Chem.* 2004;279:35679-35686
145. Seye CI, Kong Q, Erb L, Garrad RC, Krugh B, Wang M, Turner JT, Sturek M, Gonzalez FA, Weisman GA. Functional p2y2 nucleotide receptors mediate uridine 5'-triphosphate-induced intimal hyperplasia in collared rabbit carotid arteries. *Circulation.* 2002;106:2720-2726
146. Erlinge D, Yoo H, Edvinsson L, Reis DJ, Wahlestedt C. Mitogenic effects of atp on vascular smooth muscle cells vs. Other growth factors and sympathetic cotransmitters. *The American journal of physiology.* 1993;265:H1089-1097
147. Wang DJ, Huang NN, Heppel LA. Extracellular atp and adp stimulate proliferation of porcine aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1992;153:221-233
148. Erlinge D, You J, Wahlestedt C, Edvinsson L. Characterisation of an atp receptor mediating mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1995;289:135-149
149. Hou M, Harden TK, Kuhn CM, Baldetorp B, Lazarowski E, Pendergast W, Moller S, Edvinsson L, Erlinge D. Udp acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of p2y(6) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H784-792
150. Touyz RM, Schiffrin EL. Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin ii-mediated calcium hyper-responsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1997;15:1431-1439
151. Gonzalez JM, Suki WN. Cell calcium and arterial blood pressure. *Semin Nephrol.* 1995;15:564-568



152. Satoh S, Kreutz R, Wilm C, Ganten D, Pfitzer G. Augmented agonist-induced  $Ca^{2+}$ -sensitization of coronary artery contraction in genetically hypertensive rats. Evidence for altered signal transduction in the coronary smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1994;94:1397-1403
153. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389:990-994
154. Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, Matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of rho-kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:243-248
155. Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Gorg M, Quaschnig T, Raff U, Barth H, Seibold S, Wanner C, Pohl U. Oxidized ldl and its compound lysophosphatidylcholine potentiate angii-induced vasoconstriction by stimulation of rhoa. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1471-1479
156. Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39:319-327
157. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*. 2002;80:629-638
158. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:32-39
159. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2006;16:222-233
160. Loppnow H, Buerke M, Werdan K, Rose-John S. Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15:484-500
161. Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12:267-275
162. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376
163. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250:H1145-1149
164. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-415
165. Warner TD, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 and endothelin-3 release edrf from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S85-88; discussion S102
166. Nantel P, Rene de Cotret P. The evolution of angiotensin blockade in the management of cardiovascular disease. *Can J Cardiol*. 2010;26 Suppl E:7E-13E
167. Vijayaraghavan K, Deedwania P. Renin-angiotensin-aldosterone blockade for cardiovascular disease prevention. *Cardiology clinics*. 2011;29:137-156
168. Seely EW, Ecker J. Chronic hypertension in pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:439-446
169. Donagh C, Bruzzi J, MacNeill B, DaCosta M, Berman JS, O'Regan AW. Looking at the whole picture. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:448-453
170. Nakayama M, Nakano H, Nakayama M. Novel therapeutic option for refractory heart failure in elderly patients with chronic kidney disease by incremental peritoneal dialysis. *Journal of Cardiology*. 2010;55:49-54
171. Kohan DE, Rossi NF, Inscho EW, Pollock DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiological Reviews*. 2011;91:1-77
172. Esler M. The sympathetic nervous system through the ages: From thomas willis to resistant hypertension. *Experimental Physiology*. 2011;96:611-622
173. Burghoff S, Schrader J. Secretome of human endothelial cells under shear stress. *J Proteome Res*. 2011;10:1160-1169
174. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972;24:509-581
175. Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*. 1976;1:239-248
176. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 2007;87:659-797
177. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of p2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*. 2004;240:31-304
178. Burnstock G. Dual control of vascular tone and remodelling by atp released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2008;60:12-20
179. Ramirez AN, Kunze DL. P2x purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H2106-2116
180. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in p2x4-deficient mice. *Nat Med*. 2006;12:133-137
181. Milner P, Ralevic V, Hopwood AM, Feher E, Lincoln J, Kirkpatrick KA, Burnstock G. Ultrastructural localisation of substance p and choline acetyltransferase in endothelial cells of rat coronary artery and release of substance p and acetylcholine during hypoxia. *Experientia*. 1989;45:121-125
182. Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release atp, substance p and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci*. 1990;241:245-248

183. Bodin P, Bailey D, Burnstock G. Increased flow-induced atp release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 1991;103:1203-1205
184. Vials AJ, Burnstock G. Atp release from the isolated perfused guinea pig heart in response to increased flow. *J Vasc Res*. 1996;33:1-4
185. Bodin P, Burnstock G. Atp-stimulated release of atp by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:872-875
186. Taylor EM, Parsons ME, Wright PW, Pipkin MA, Howson W. The effects of adenosine triphosphate and related purines on arterial resistance vessels in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*. 1989;161:121-133
187. Lee JW, Filkins JP. Exogenous atp and hepatic hemodynamics in the perfused rat liver. *Circ Shock*. 1988;24:99-110
188. Bo X, Burnstock G. Triphosphate, the key structure of the atp molecule responsible for interaction with p2x-purinoceptors. *Gen Pharmacol*. 1993;24:637-640
189. Marrian DH. A new adenine nucleotide. *Biochim Biophys Acta*. 1954;13:278-281
190. Small GD, Cooper C. Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry*. 1966;5:26-33
191. Lee JW, Kong ID, Park KS, Jeong SW. Effects of adenosine tetraphosphate (atpp) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei medical journal*. 1995;36:487-496
192. Tolle M, Jankowski V, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Hub F, Kowalska J, Jemielity J, Guranowski A, Loddenkemper C, Zidek W, Jankowski J, van der Giet M. Adenosine 5'-tetraphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. *Circ Res*. 2008;103:1100-1108
193. Hansen PB, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285:F590-599
194. Grbovic L, Radenkovic M, Prostran M, Pesic S. Characterization of adenosine action in isolated rat renal artery: Possible role of adenosine a2a receptors. *General Pharmacology: The Vascular System*. 2000;35:29-36
195. Gaal K, Forgacs I. Effect of cyclic adenosine monophosphate on renal function and renin secretion. *Acta Physiol Acad Sci Hung*. 1975;46:9-18
196. Jankowski V, Tolle M, Vanholder R, Schonfelder G, van der Giet M, Henning L, Schluter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate: A novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med*. 2005;11:223-227
197. Tolle M, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Klockel L, Jankowski J, Jankowski V, Zidek W, van der Giet M. Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol*. 2010;161:530-540
198. Gui Y, Walsh MP, Jankowski V, Jankowski J, Zheng XL. Up4a stimulates endothelium-independent contraction of isolated rat pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L733-738
199. Linder AE, Tumbri M, Linder FF, Webb RC, Leite R. Uridine adenosine tetraphosphate induces contraction and relaxation in rat aorta. *Vascul Pharmacol*. 2008;48:202-207
200. Jankowski V, Patzak A, Herget-Rosenthal S, Tran TN, Lai EY, Gunthner T, Buschmann I, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate acts as an autocrine hormone affecting glomerular filtration rate. *J Mol Med*. 2008;86:333-340
201. Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Anh Tran TN, van der Giet M, Tolle M, Zidek W, Jankowski J. Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007
202. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin ii: Modulated by g proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003;83:1325-1358
203. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by g-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin ii. *J Physiol*. 2000;522 Pt 2:177-185
204. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the rho family gtpases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:459-486
205. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). *Science (New York, N.Y)*. 1996;273:245-248
206. Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272:12257-12260
207. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated c-reactive protein. *New England Journal of Medicine*. 2008;359:2195-2207
208. Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K, Takeshita A. Involvement of rho-kinase in hypertensive vascular disease: A novel therapeutic target in hypertension. *Faseb J*. 2001;15:1062-1064
209. Tolle M, Giebing G, Tietge UJ, Jankowski J, Jankowski V, Henning L, Horl MP, Weiss W, Zidek W, van der Giet M. Diguanosine pentaphosphate: An endogenous activator of rho-kinase possibly involved in blood pressure regulation. *J Hypertens*. 2006;24:1991-2000
210. Cavarape A, Bauer J, Bartoli E, Endlich K, Parekh N. Effects of angiotensin ii, arginine vasopressin and tromboxane a2 in renal vascular bed: Role of rho-kinase. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1764-1769

211. Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of rho-kinase suppresses angiotensin ii-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: Effect on endothelial nad(p)h oxidase system. *Circ Res*. 2003;93:767-775
212. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein—the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989;321:1311-1316
213. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The framingham heart study. *Arteriosclerosis*. 1988;8:737-741
214. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, Dowdy AA, Marino EK, Bolson EL, Alaupovic P, Frohlich J, Albers JJ. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med*. 2001;345:1583-1592
215. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial study group. *N Engl J Med*. 1999;341:410-418
216. Sastry P, Kaski JC. Atherosclerotic plaque regression - the role of statin therapy. *Drugs Today (Barc)*. 2010;46:601-608
217. Davis Jr HR, Lowe RS, Neff DR. Effects of ezetimibe on atherosclerosis in preclinical models. *Atherosclerosis*. 2011;215:266-278
218. Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: Cholesterol acyltransferase: Perspectives form pathology. *Adv Lipid Res*. 1973;11:1-65
219. Glomset JA. The plasma lecithins:Cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-167
220. Zeiher AM, Schachlinger V, Hohnloser SH, Saurbier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89:2525-2532
221. Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Luscher TF, Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 2002;105:1399-1402
222. Vinals M, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Regulatory effects of hdl on smooth muscle cell prostacyclin release. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2405-2411
223. Fleisher LN, Tall AR, Witte LD, Miller RW, Cannon PJ. Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1982;257:6653-6655
224. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-bi activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001;7:853-857
225. Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ. High density lipoprotein binding to scavenger receptor, class b, type i activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem*. 2002;277:11058-11063
226. Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li XA, Zhu W, Uittenbogaard A, Smart EJ. Hdl-associated estradiol stimulates endothelial no synthase and vasodilation in an sr-bi-dependent manner. *J Clin Invest*. 2003;111:1579-1587
227. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. Hdl induces no-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor s1p3. *J Clin Invest*. 2004;113:569-581
228. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*. 1999;99:301-312
229. Zhang G, Contos JJ, Weiner JA, Fukushima N, Chun J. Comparative analysis of three murine g-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene*. 1999;227:89-99
230. McGiffert C, Contos JJ, Friedman B, Chun J. Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis. *FEBS Lett*. 2002;531:103-108
231. Schroeder F, Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Huang H, Starodub O, Chao H, Yang H, Frolov A, Kier AB. Recent advances in membrane microdomains: Rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226:873-890
232. Theilmeyer G, Schmidt C, Herrmann J, Keul P, Schafers M, Herrgott I, Mersmann J, Larmann J, Hermann S, Stypmann J, Schober O, Hildebrand R, Schulz R, Heusch G, Haude M, von Wnuck Lipinski K, Herzog C, Schmitz M, Erbel R, Chun J, Levkau B. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the s1p3 lysophospholipid receptor. *Circulation*. 2006;114:1403-1409
233. Tolle M, Levkau B, Kleuser B, van der Giet M. Sphingosine-1-phosphate and fty720 as anti-atherosclerotic lipid compounds. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:171-179
234. Tolle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schonfelder G, Schafers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, Van der Giet M. Immunomodulator fty720 induces enos-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor s1p3. *Circ Res*. 2005;96:913-920
235. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2001;276:10627-10633

236. Igarashi J, Bernier SG, Michel T. Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. Differential regulation of akt and map kinase pathways by edg and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:12420-12426
237. Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T. Vegf induces s1p1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10664-10669
238. Xin C, Ren S, Kleuser B, Shabahang S, Eberhardt W, Radeke H, Schafer-Korting M, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine 1-phosphate cross-activates the smad signaling cascade and mimics transforming growth factor-beta-induced cell responses. *J Biol Chem.* 2004;279:35255-35262
239. Keul P, Tolle M, Lucke S, von Wnuck Lipinski K, Heusch G, Schuchardt M, van der Giet M, Levkau B. The sphingosine-1-phosphate analogue fty720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:607-613
240. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695
241. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-621
242. Bursill CA, Channon KM, Greaves DR. The role of chemokines in atherosclerosis: Recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:145-149
243. Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:161-165
244. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. Hdl-associated lysosphingolipids inhibit nad(p)h oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008
245. Brandes RP, Viedt C, Nguyen K, Beer S, Kreuzer J, Busse R, Gorchach A. Thrombin-induced mcp-1 expression involves activation of the p22phox-containing nadph oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 2001;85:1104-1110
246. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. Nad(p)h oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501
247. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: Nadph oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10:453-471
248. Miyagi Y, Kobayashi S, Ahmed A, Nishimura J, Fukui M, Kanaide H. P2u purinergic activation leads to the cell cycle progression from the g1 to the s and m phases but not from the g0 to g1 phase in vascular smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222:652-658
249. Crowley ST, Dempsey EC, Horwitz KB, Horwitz LD. Platelet-induced vascular smooth muscle cell proliferation is modulated by the growth amplification factors serotonin and adenosine diphosphate. *Circulation.* 1994;90:1908-1918
250. Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 1985;42:139-162
251. Erlinge D, Hou M, Webb TE, Barnard EA, Moller S. Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate p2 receptor expression as measured by quantitative rt-pcr. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248:864-870
252. Schuchardt M, Prufer J, Prufer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schafer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, Tolle M. The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces p2y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. *J Mol Med.* 2011
253. Schepers E, Glorieux G, Jankowski V, Dhondt A, Jankowski J, Vanholder R. Dinucleoside polyphosphates: Newly detected uraemic compounds with an impact on leucocyte oxidative burst. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:2636-2644
254. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (lpc) in atherosclerosis. *Curr Med Chem.* 2007;14:3209-3220
255. Zalba G, Fortuno A, Diez J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:2686-2690
256. Stokes L, Surprenant A. Purinergic p2y2 receptors induce increased mcp-1/ccl2 synthesis and release from rat alveolar and peritoneal macrophages. *J Immunol.* 2007;179:6016-6023
257. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. Atp release guides neutrophil chemotaxis via p2y2 and a3 receptors. *Science (New York, N.Y.)* 2006;314:1792-1795
258. Kukulski F, Ben Yebdri F, Bahrami F, Fausther M, Tremblay A, Sevigny J. Endothelial p2y2 receptor regulates lps-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. *Mol Immunol.* 2010;47:991-999
259. Ferrari D, Idzko M, Dichmann S, Purlis D, Virchow C, Norgauer J, Chiozzi P, Di Virgilio F, Luttmann W. P2 purinergic receptors of human eosinophils: Characterization and coupling to oxygen radical production. *FEBS Lett.* 2000;486:217-224
260. Katsuyama M, Ozgur Cevik M, Arakawa N, Kakehi T, Nishinaka T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Myocyte enhancer factor 2b is involved in the inducible expression of nox1/nadph oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme. *FEBS J.* 2007;274:5128-5136
261. Goettsch C, Goettsch W, Muller G, Seebach J, Schnittler HJ, Morawietz H. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 mapk in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380:355-360

# Danksagung

## „Faber est quisque fortunae suae“....

(Jeder ist seines Glückes Schmied)

..... man kann nicht bestreiten, dass Appius Claudius Caecus ca. 300 v. Chr. in den Grundzügen recht hätte. Aber ohne die Hilfe, Unterstützung, Aufmunterung, Motivation und den Glauben von treuen Wegbegleiter(inne)n ist auch der beste Schmied nicht in der Lage, sein Glück zu schmieden.

In den vielen Jahren, in denen ich die große Freude hatte (und hoffentlich noch haben werde) Wissenschaft machen zu dürfen, sind viele gleichartig verrückte Menschen in mein Leben getreten, die meinen Weg nachhaltig beeinflusst haben.

Dabei sind „alte“ Wegbegleiter aus Herner Tagen und „neue“ Wegbegleiter aus Berliner Tagen von gleicher Bedeutung.

Jeden dieser besonderen Menschen hier aufzuzählen ist leider ein Ding der Unmöglichkeit, aber ich möchte doch einige herausstellen und diesen einen besonderen Dank aussprechen:

### **- Herr Professor Dr. med. Walter Zidek**

Seit nun mehr als 13 Jahren begleitet mich Herr Professor Zidek auf meinem medizinisch-wissenschaftlichen Weg. Ich danke ihm besonders für seine Fähigkeiten als klinischer Lehrer und wissenschaftlicher Ideengeber. Routiniert half er mir sicherlich mehr als nur einmal aus sowohl klinischer als auch wissenschaftlicher Notlage. Für seine stetige Unterstützung sei ihm an dieser Stelle ein großer Dank ausgesprochen.

### **- Herr Professor Dr. med. Markus van der Giet**

Als einen wissenschaftlich engagierten Assistenzarzt durfte ich Herrn Prof. van der Giet kennenlernen, als ich Ostern 1998 in seiner speziellen Arbeitsgruppe als Doktorand in Herne angefangen habe. Auf einem nun mehr sehr langen gemeinsamen Wege haben wir beiden es erfolgreich geschafft, uns aus einem eher wissenschaftlich knappen Umfeld hin zu einer florierenden grundlagenwissenschaftlichen und klinischen Arbeitsgruppe entwickeln zu dürfen. Auf diesem beinahe einzigartigen Weg sind aus wissenschaftlichen Gefährten Freunde geworden. In stundenlangen Gesprächen und Diskussionen wuchsen kleine Ideen zu teilweise großen Projekten heran, aus denen sich dann Türen für weitere Tätigkeitsfelder öffneten. Gerade Dir, Markus, sei für Deine vielen teilweise verrückten Ideen, deine teils abstrusen Hirngespinnste, deine Geduld und deinen uneingeschränkten Optimismus ein ganz besonderer Dank ausgesprochen.

### **- Herr Dr. Günter Giebing**

Nicht nur beim Herrn der Ringe sind Wegbegleiter eine elementare Grundvoraussetzung für den Erfolg. Herr Dr. Giebing ist mindestens genauso ein verrückter Bursche, wie ich es war und hoffentlich noch bin. Auf einem kuriosen Weg aus der wissenschaftlichen Kleinstadt Herne hin zur wissenschaftlichen Hauptstadt Berlin hat Herr Dr. Giebing mich stets nach allen Regeln der Kunst unterstützt. Des Weiteren haben wir die ersten, teils wackligen klinischen Schritte gemeinsam unternommen. Ich danke Dir, lieber Günter, für Deine uneingeschränkte Loyalität und Deine einzigartige Art und Weise, komplexe Fragestellungen in einfache Lösungen umzusetzen. Darüber hinaus danke ich Dir für Deine langjährige Freundschaft, die mir sehr wichtig ist.

### **- Herr Professor Dr. rer. nat. Joachim Jankowski und Frau Dr. rer. nat. Vera Jankowski**

Dem „Forscherehepaar“ sei an dieser Stelle ein besonderer Dank ausgesprochen. Durch ein unerbittliches Interesse an der Suche und dem damit einhergehenden Finden von neuen Substanzen habt Ihr beide mich und die gesamte Arbeitsgruppe stets am Arbeiten gehalten. Ich danke Euch für Eure große Unterstützung und die stets produktive Zusammenarbeit.

**- Frau Dr. rer. nat. Mirjam Schuchardt**

Die Arbeitsgruppe van der Giet/Tölle erfuhr mit der Einführung grundlagen-wissenschaftlicher Doktoranden eine neue Dimension. Nachdem Frau Dr. Schuchardt in unserer Arbeitsgruppe angefangen hatte, änderte sich nicht nur unser Verständnis für grundlagenwissenschaftliches Arbeiten, sondern es begann auch ein Zeitalter der kontinuierlichen Optimierung. Frau Dr. Schuchardt hat es durch ihren extremen Arbeitseinsatz geschafft, die bestehenden Projektideen nicht nur in umzusetzen, sondern auch konstruktiv zu erweitern und die bestehenden Strukturen nicht nur zu nutzen, sondern auch weiter zu optimieren. So lernte ich Frau Dr. Schuchardt nicht nur beruflich, sondern auch privat sehr zu schätzen. Ich danke Dir, Mirjam, für Deine überwältigende Hilfe in den letzten Jahren.

**- PD Dr. med. Alexander Oksche und Frau Jenny Eichhorst**

Als kleiner Assistenzarzt mit einem fundierten physiologischen Wissen habe ich meine molekularbiologischen Hörner im Forschungsinstitut für molekulare Medizin in Berlin-Buch abstoßen können. Dabei waren insbesondere zwei (von ganz vielen) Menschen für mich von großer Bedeutung. Ich möchte Herrn PD Dr. med. Alexander Oksche danken für seine Bereitschaft uns beiden Chaoten in seiner Arbeitsgruppe einen wissenschaftlichen Hort zu geben. Von seinem Wissen über Signaltransduktion und sein methodischen Hintergrund konnte ich sehr profitieren. Ich danke Dir, Alexander, für Deine Unterstützung, die für die weitere Etablierung unserer Arbeitsgruppe großen Beitrag hat. Ein ganz besonderer Dank gilt aber auch der „guten Seele“ des FMPs, ohne die die Arbeit zum einen keinen Sinn und zum anderen keinen Spaß gemacht hat. Frau Jenny Eichhorst hat mir gezeigt, mit welcher Effizienz und Koordination man im Labor arbeiten kann. Liebe Jenny, Du warst für Günter und mich immer eine besondere „Arbeitsgefährtin“ und gerade dank Dir denken Günter und ich heute noch sehr gerne an die Zeit bei Euch zurück.

**- Herr Professor Dr. med. Gilbert Schönfelder**

Ich kenne Herrn Professor Dr. med. Gilbert Schönfelder nun seit mehr als 10 Jahren und schätze ihn als Mediziner und Wissenschaftler sehr. Dir, lieber Gilbert, sei ein großer Dank ausgesprochen für deine Loyalität und stetige unkomplizierte Hilfe über die letzten Jahre.

**- Herr Professor Dr. rer. nat. Burkhard Kleuser**

Als wir über die Erforschung des HDL auf Lysophospholipide stießen entwickelte sich eine Kooperation mit der Pharmazie in der benachbarten FU Berlin. Dort hatten wir mit Herrn Professor Dr. rer. nat. Burkhard Kleuser einen Experten in diesem Bereich glücklicherweise quasi „vor der Tür“. Herr Professor Kleuser konnte neue Impulse in unseren jungen wissenschaftlichen Untersuchungsbereich einfließen lassen. Ich danke Dir, Burkhard, für Deine Unterstützung in den letzten und in den kommenden Jahren.

**- Herr Professor Dr. med. Jerzy-Roch Nofer**

Mit Herrn Professor Dr. med. Jerzy-Roch Nofer nehme ich sehr gerne einen weiteren Wegbegleiter aus Herner Tagen mit in diese Danksagung auf. Durch die Diskussionen und Gespräche mit Herrn Professor Nofer konnte das Themengebiet der HDL induzierten eNOS Aktivierung stark bereichert werden. Dir, Roch, möchte ich für die sehr gute und stets unkomplizierte Kooperation danken.

**- Herr Professor Dr. med. Martin Tepel**

Neben Herrn Professor Zidek und Herrn Professor van der Giet stellt Herr Professor Dr. Martin Tepel ein weiteres „Urgestein“ aus Herner Tagen dar. Trotz seiner zeitweise etwas eigentümlich erscheinenden Art und der zwischenzeitlich nicht immer übereinstimmenden Ansichten bin ich ihm aber dennoch zum Dank verpflichtet da auch er sehr zu meiner wissenschaftlichen und klinischen Prägung beigetragen hat.

**- Frau Dr. rer. nat. Janin Andres**

Frau Dr. rer. nat. Janin Andres war die immer hilfsbereite „gute Seele“ des Nachbarlabors. Dir, liebe Janin, danke ich sehr für Deine prompte Hilfe und Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.



**- Herr Dr. med. Wolfgang Weiß**

Herr Dr. med. Wolfgang Weiß ist mir sowohl in der Klinik als auch in der Wissenschaft immer ein zuverlässiger und hilfsbereiter Kollege gewesen. Dir, lieber Wolfgang, danke ich für Deine große Loyalität und Deinen großen Einsatz in vielen Bereichen.

**- Herr Dr. med. Frank Spillmann**

Mediziner in der Wissenschaft sind ein besonderes Völkchen. Ein besonders Verrückter ist Herr Dr. Frank Spillmann. Dass dieser Mann sich mehrere Jahre in Italien der Wissenschaft gewidmet hat, merkt man an dem Feuer und der Energie mit der er auch heute noch neben seinem großen klinischen Einsatz sich wissenschaftlich betätigt. Herr Dr. Spillmann ist mir nicht nur aufgrund klinischer und wissenschaftlicher Zusammenarbeit ans Herz gewachsen. Dir, lieber Frank, danke ich für Deine wissenschaftliche und klinische Unterstützung und Deine Freundschaft.

**- Frau PD Dr. rer. nat. Sophie van Linthout**

Zu jedem verrückten Mediziner gehört das passende Gegenstück, das ihn in der richtigen Spur hält. Frau PD Dr. rer. nat. Sophie van Linthout ist als Ehefrau genau dieses Gegenstück für Herrn Dr. Spillmann. Aber nicht nur er hat von ihrer Leistungsfähigkeit und wissenschaftlichen Expertise profitiert. Dank unserer Kooperation konnte ich ebenso in den Genuss kommen. Ich danke Dir, liebe Sophie, für Deine große Hilfe und Unterstützung und ich freue mich auf die nächsten Jahre mit Euch.

**- Herr Professor Dr. med. Uwe Tietge**

Ein junger Assistenzarzt, eine Seleno<sup>7</sup> Maus, der Einfall eines Kollegen, viel Glück und ein Glas Hochprozentiger, so könnte man die erste Begegnung zwischen Herr Professor Dr. med. Uwe Tietge und mir beschreiben. Was sich wissenschaftlich daraus entwickelte ist in vielen gemeinsamen Publikationen nachzulesen. Dir, lieber Uwe, danke ich sehr für die freundschaftlichen Gespräche und Diskussionen und die auch auf weite Entfernung weiterbestehende Kooperation, die Markus und mir weiterhin sehr wichtig ist.

**- Frau Dr. med. Sandra Schäfer**

Langjährig hat mich Frau Dr. Sandra Schäfer in allen Bereichen meines Lebens unterstützt. Ohne Sie wäre diese Habilitationsschrift nicht entstanden. Ich danke Dir, liebe Sandra, für alles.

**- Frau Ulrike Tölle, Herr Karl-Heinz Tölle und Herr Dr. med. dent. Andreas Tölle**

Last, but not least gilt mein größter Dank meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder Andreas. Mit Worten lässt sich nicht beschreiben, welches Vertrauen sie in mich gesetzt haben, welche Hilfe sie mir zuteilwerden und welche Liebe sie mich stets spüren ließen. Dafür und noch für vieles mehr gelten Euch mein ewiger Dank und meine Liebe.

Allen hier nicht aufgeführten Menschen, die Anteil an meinem wissenschaftlichen und klinischen Werdegang hatten, möchte ich für Ihre Hilfe und Unterstützung danken.

# ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltenden Habilitationsordnung bekannt ist.

---

Datum

---

Dr. med. Markus Tölle