

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

Die Bedeutung von Sphingolipid- und Purinrezeptoren  
in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Annette Wiedon  
aus Dresden

Datum der Promotion: 25.06.2017

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
Abstract - Englisch	1
Abstrakt - Deutsch	2
Einführung	3
Methodik	5
Ergebnisse	8
Untersuchungen der Sphingolipidrezeptoren	8
Untersuchungen der Purinrezeptoren	10
Diskussion	14
Die Bedeutung der Sphingolipidrezeptoren in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose	14
Die Bedeutung der Purinrezeptoren in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose	16
Literaturverzeichnis	19
2. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	21
3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	23
4. Lebenslauf	66
5. Publikationsliste	67
6. Danksagung	69

## 1. Zusammenfassung

### Abstract - Englisch

Atherosclerosis represents a subset of multiple inflammatory events. A crucial part is assumed by the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) which enter into mitosis in a pathological condition and migrate from the media into the intima. This change of behavior is not only triggered by growth factors like PDGF or VEGF but can also be provoked by sphingolipids as well as nucleotides. Therefore this doctoral research study aimed to investigate the role of sphingolipid and nucleotide receptors in atherosclerosis with special regard to their impact on proliferation and migration of VSMC.

By using the sphingolipid receptor agonists S1P, FTY720-P and AUY954 as well as selective antagonists a S1P<sub>1</sub> mediated proliferation and migration of VSMC could be shown. In contrast, S1P<sub>2</sub> revealed an inhibitory effect on cell migration. The activation of the endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells was mediated by S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub> and associated with Akt protein kinase. Thus, sphingolipid receptors display also protective functions in the vascular system.

The investigation of the purinoreceptors focused on the dinucleotide Up<sub>4</sub>A which is only little characterized so far. A stimulation of VSMC with this dinucleotide resulted in an increased proliferation and migration response of these cells. The migration of VSMC revealed a direct connection to the matrix protein osteopontin whose expression and secretion is elevated after Up<sub>4</sub>A stimulation. By using several receptor antagonists a dominant role of the P2Y<sub>2</sub> receptor could be shown for VSMC migration as well as osteopontin expression. The MEK1/ERK1/2 cascade and the transcription factor CREB are activated in the intracellular signal transmission. Furthermore, this research study provides evidence for a potential cross-communication of the P2Y<sub>2</sub> receptor and the PDGF receptor by demonstrating a direct phosphorylation of the PDGF receptor after Up<sub>4</sub>A stimulation by western blot and the use of siRNA technique.

The investigated sphingolipid and nucleotide receptors display pathologic as well as protective functions in atherosclerosis. Which of these functions appear to have a more prominent effect depends on the particular receptor patterns as well as the amount and type of agonists.

## Abstrakt - Deutsch

Die Atherosklerose ist eine Abfolge verschiedener inflammatorischer Ereignisse. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC), die im pathologischen Zustand in die Mitose eintreten und aus der Media in die Intima wandern. Als Auslöser für die Veränderung des Verhaltens der VSMC kommen neben Wachstumsfaktoren wie PDGF oder VEGF auch Sphingolipide und Nukleotide in Frage. Die Promotionsarbeit hatte daher das Ziel, die Rolle der Sphingolipid- und Purinrezeptoren im Rahmen der Atherosklerose, und dabei insbesondere deren Auswirkungen auf die Proliferation und Migration der VSMC, zu untersuchen.

Unter Einsatz der Sphingolipid-Rezeptoragonisten S1P, FTY720-P und AUY954 sowie selektiver Antagonisten, konnte eine S1P<sub>1</sub> vermittelte Stimulation der Proliferation und Migration von VSMC nachgewiesen werden. S1P<sub>2</sub> zeigte dagegen eine inhibierende Wirkung auf die Zellmigration. Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase in Endothelzellen erfolgt über S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> sowie unter Beteiligung der Proteinkinase Akt. Somit kommt den Sphingolipidrezeptoren gleichfalls eine protektive Funktion im Gefäß zu.

Der Einfluss der Purinrezeptoren wurde speziell anhand des bislang noch wenig charakterisierten Dinukleotids Up<sub>4</sub>A untersucht. Eine Stimulation der VSMC mit dem Dinukleotid resultierte ebenfalls in einer gesteigerten Proliferations- und Migrationsantwort der Zellen. Die Migration der VSMC zeigte eine direkte Abhängigkeit von dem Matrixprotein Osteopontin, welches im Zuge der Up<sub>4</sub>A-Stimulation vermehrt exprimiert und sekretiert wird. Sowohl für die VSMC-Migration als auch für die Osteopontin-Expression konnte mit Hilfe verschiedener Rezeptorantagonisten eine dominante Rolle des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden. An der intrazellulären Signalweiterleitung sind die MEK1/ERK1/2-Kaskade sowie der Transkriptionsfaktor CREB beteiligt. Durch den Nachweis einer direkten Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors nach Up<sub>4</sub>A-Stimulation im Western Blot sowie unter Einsatz der siRNA-Technik, präsentiert die Arbeit zudem Hinweise auf eine mögliche Cross-Kommunikationen zwischen dem P2Y<sub>2</sub>-Purinorezeptor und der PDGF-Rezeptortyrosinkinase.

Den untersuchten Sphingolipid- und Purinrezeptoren kommen somit im Rahmen der Atherosklerose sowohl pathologische als auch protektive Funktionen zu. Welche Eigenschaft letztlich zum Tragen kommt ist u.a. abhängig vom Expressionsmuster der jeweiligen Rezeptoren sowie von der Menge und Art des Agonisten.

## **Einführung**

Die Pathogenese der Atherosklerose wurde 1999 von R. ROSS in einem wegweisenden Artikel als Abfolge komplexer Entzündungsreaktionen beschrieben [1]. Dieses neue Verständnis geht weit über eine bloße Ansammlung von Fetten in der arteriellen Gefäßwand hinaus und umfasst hoch spezifische zelluläre und molekulare Reaktionen.

Als initialer Schritt der atherosklerotischen Entzündungskaskade gilt eine endotheliale Dysfunktion, ausgelöst durch beispielsweise freie Radikale, Bluthochdruck oder erhöhte LDL-Gehalte [1]. Die Verletzung des Endothels führt zu einer erhöhten Permeabilität gegenüber Lipoproteinen und anderen Plasmartikeln. Eine zunehmende Präsentation von Adhäsionsmolekülen sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie etwa dem Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) resultieren in der verstärkten Anheftung und Einwanderung von Monozyten und Thrombozyten in die Gefäßwand [1-3]. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus diesen Zellen stimuliert glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zur Proliferation und Migration in die Intima [1,4]. Sie bilden dort eine fibröse Kappe über die fortschreitende Läsion aus eingewanderten lipid-beladenen Makrophagen und nekrotischem Gewebe. Zunehmende Instabilität der Kappe durch den Einfluss matrix-degradierender Enzyme kann schließlich zum Aufbrechen der Plaques und damit zur Freisetzung pro-koagulierender Faktoren in das Gefäßlumen führen [1].

Sphingolipide sind in die Gruppe der Lysophospholipide einzuordnen und repräsentieren somit wichtige Bausteine in der de novo-Synthese von Phospholipiden. Von ISHII et al. wurden sie darüber hinaus als bioaktive Lipid-Mediatoren beschrieben, die eine Reihe fundamentaler zellulärer Funktionen beeinflussen [5]. Sphingolipide vermitteln ihre zellulären Effekte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, benannt nach dem prominentesten Vertreter Sphingolipid-1-Phosphat (S1P) in S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> Rezeptor [5]. Die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> werden in zahlreichen Zellsystemen exprimiert, darunter auch in kardiovaskulären Systemen, wohingegen die Rezeptoren S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> lokal begrenzt in lymphoidem Gewebe bzw. im Gehirn auftreten [5,6]. Aufgrund der durch diese Rezeptoren vermittelten Zellantworten wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Migration oder Adhäsion ist anzunehmen, dass Sphingolipidrezeptoren nicht nur bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen, sondern auch bei pathogenetischen Prozessen wie etwa der Atherosklerose [7-9]. Neben den potentiell pro-atherosklerotischen Vorgängen ist jedoch auch eine S1P vermittelte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) beschrieben worden [10,11]. Die Freisetzung von NO im

vaskulären Raum beeinflusst einerseits die Regulation des Gefäßtonus und inhibiert andererseits die Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten [10,11]. In diesem Zusammenhang vermitteln Sphingolipidrezeptoren eine erhöhte Integrität und verringerte Permeabilität der Gefäße.

In den letzten Jahren haben zahlreiche Veröffentlichungen auf die zentrale Rolle des purinergeren Systems an der Regulation kardiovaskulärer Prozesse hingewiesen [12-14]. Purinrezeptoren werden in nahezu allen Zellsystemen exprimiert [14]. Aufgrund ihrer pharmakologischen und molekularen Unterschiede werden Purinrezeptoren in Adenosinrezeptoren, P1, und Nukleotidrezeptoren, P2, unterschieden [14,15]. Letztere werden wiederum in die Ionenkanal-gesteuerten P2X Rezeptoren und die G-Protein gekoppelten P2Y Rezeptoren unterteilt. Derzeit sind mit A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> vier verschiedene P1 Subtypen bekannt [16]. Für P2X wurden sieben Subtypen (P2X<sub>1-7</sub>) beschrieben, weitere acht unterschiedliche P2Y Rezeptoren wurden identifiziert (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>) [17,18].

Den Nukleotid-Agonisten der P2 Rezeptoren wurde insbesondere eine prominente Rolle als Vasokonstriktoren zugewiesen, die über Aktivierung des P2X<sub>1</sub> auf VSMC erfolgt [13]. Daneben gibt es jedoch auch zahlreiche Berichte, die einen Zusammenhang der P2 Rezeptoren mit inflammatorischen Prozessen wie etwa der Atherosklerose beschreiben [15,12,19,20]. So konnte für mehrere Nukleotid-Agonisten ein stimulierender Einfluss auf die Migration und Proliferation von VSMC festgestellt werden [12,20]. Für ATP wurde gezeigt, dass es die Freisetzung von Interleukinen (IL-6, IL-8) stimuliert und die Anheftung von Neutrophilen an Endothelzellen verstärkt [12,19]. Das Vorhandensein zahlreicher Purinrezeptoren auf inflammatorischen Zelltypen unterstreicht ihre Bedeutung in zahlreichen Entzündungsreaktionen [15].

Als Agonisten der P2 Rezeptoren gewinnen zunehmend Dinukleosidpolyphosphate an Bedeutung [21]. So konnten beispielsweise für Ap<sub>4</sub>A und Ap<sub>5</sub>A dilatorische und proliferierende Effekte auf VSMC nachgewiesen werden [21]. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Untersuchung des Dinukleotids Up<sub>4</sub>A, dem erst 2005 eine physiologische Relevanz zugewiesen wurde [22] und das es seither zu charakterisieren gilt. MATSUMOTO et al. haben die bisherigen Erkenntnisse zusammengefasst, die überwiegend unterschiedliche Einflüsse von Up<sub>4</sub>A auf die Regulation des Gefäßtonus umfassen [23]. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden darüber hinaus speziell längerfristige, atherosklerotische Prozesse wie etwa die durch Up<sub>4</sub>A induzierte Proliferation und Migration sowie deren Signalwege untersucht. Insbesondere wurde dabei der Frage nach möglichen Rezeptorinteraktionen zwischen Purinrezeptoren und anderen Rezeptortypen nachgegangen.

## Methodik

**Zellkultur** – Die Isolation der arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) erfolgte gemäß der Explant-Methode aus thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto-Ratten. Die humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) wurden kommerziell bezogen und im Rhythmus von 3-4 Tagen ebenfalls durch Trypsinierung passagiert.

**Proliferationsassay** – Potentiell mitogene Stimuli wurden mit dem Proliferationsassay der Firma Roche, dem sog. Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit, getestet. Dazu wird die DNA-Synthese einer Zelle innerhalb eines definierten Zeitraums zur Quantifizierung der Proliferation herangezogen. Das Kit verwendet das Basen-Analoga Brom-2'-deoxyuridin (BrdU), das während der Replikation anstelle von Thymidin in den DNA-Strang eingebaut wird. Die Inkorporation von BrdU ist direkt proportional zur neu synthetisierten DNA-Menge. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird ein BrdU-spezifischer Antikörper an die DNA gebunden, der wiederum an eine Peroxidase gekoppelt ist. Durch Zugabe des Peroxidase-Substrats kann der Einbau von BrdU mittels Detektion der frei werdenden Lumineszenz quantifiziert werden.

**Migrationsassay** – Das migratorische Potential der Substanzen wurde mit Hilfe der ChemoTX-Platten der Firma Neuroprobe ermittelt. Das System basiert auf einem Konzentrationsgradienten, der sich zwischen zwei Kammern aufbaut. Die untere Kammer enthält die potentiell migrationsstimulierende Substanz, die obere Kammer enthält eine Zellsuspension mit demselben Medienhintergrund, jedoch ohne Stimulus. Zwischen beiden Kammern befindet sich eine Membran definierter Porengröße (8 µm), die so gewählt ist, dass sie von den Zellen nicht frei passiert werden kann sondern sich diese aktiv in die Poren hinein bewegen müssen. Mittels Fluoreszenzmarkierung durch Calcein-AM kann die Anzahl der in der Membran befindlichen Zellen nach Ablauf einer definierten Inkubationszeit von 5 h in einem Fluoreszenzlesegerät bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen werden.

**Western Blot** – Die Western Blots dieser Arbeit wurden mit Hilfe des iBlot Dry Blotting Systems der Firma Invitrogen durchgeführt. Dabei wurden die zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembranen übertragen. Der Transfer erfolgte je nach Größe des Zielproteins über 5-7 min bei einer konstanten Spannung

von 20 V. Die Gele wurden nach dem Proteintransfer in Bio-Safe Coomassie angefärbt und dokumentiert, so dass eine einheitliche Proteinbeladung nachweisbar ist. Die Trägermembran wurde zur Antikörperinkubation weiterverwendet. Über den Peroxidase-markierten Sekundärantikörper wurde die spezifische Proteinbindung visualisiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol, wodurch Chemolumineszenz entsteht, die von einer Kamera detektiert und dokumentiert wurde.

**Nachweis von NO** – Der Nachweis von intrazellulär gebildetem Stickstoffmonoxid (NO) erfolgte über Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Diaminofluorescein-2 Diacetat (DAF2-DA). HUVEC wurden in den speziell für Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Ibidi- $\mu$ -Dishes anwachsen gelassen und vor Versuchsbeginn in Mangelmedium synchronisiert. Unmittelbar nach Beladung der Zellen mit 5  $\mu$ M DAF2-DA folgte die Stimulation der einzelnen Ansätze für 40 min, die durch Fixierung mit 2% eiskaltem Glutardialdehyd gestoppt wurde. Die so präparierten  $\mu$ -Dishes wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 485 nm analysiert. Die einzelnen Fluoreszenzintensitäten von mind. drei Aufnahmen wurden summiert und in Relation zur entsprechenden Zellfläche gesetzt.

**Osteopontin-ELISA** – Die Sekretion des Matrixproteins Osteopontin (OPN) wurde mittels eines kommerziellen ELISA-Kits der Firma IBL nachgewiesen. Zur Gewinnung des Überstandes wurden VSMC in 6well-Platten kultiviert und mit den zu testenden Substanzen stimuliert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Überstand zentrifugiert, im Verhältnis 1:10 mit EIA-Puffer des Rat Osteopontin Assay Kits verdünnt und entsprechend der Kitanleitung in dem 96well-basierten Assay eingesetzt. Der Reaktionsansatz wird bei 450 nm photometrisch gemessen.

**Signaltransduktion** – Die Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle wurde mit der sog. xMAP-Technologie anhand von Assays und Geräten der Firma BioRad untersucht. Das System basiert auf der Verwendung von farbkodierten Beads, die an targetspezifische Antikörper gebunden sind. Ebenfalls an das Zielmolekül wird ein biotinylierter Detektions-Antikörper gebunden, an den wiederum über Streptavidin ein Phycoerythrin-Reportermolekül gebunden wird. Der Komplex aus Zielmolekül, Bead und Detektionsantikörper mit Reporter wird in die Detektionskammer des Luminex-Gerätes aufgezogen und von einem grünen Reporter-Laser und einem roten Klassifizierungs-Laser analysiert.

Für die Analyse der Signalmoleküle wurden die Beads des Bio-Plex Total 5-plex Panels sowie des Bio-Plex Phospho 5-plex Panels verwendet. Die Panel beinhalten jeweils Bead-gekoppelte Antikörper spezifisch für die Kinasen MEK1, ERK1/2, Akt, p38 und JNK bzw. deren phosphorylierte Formen sowie die entsprechenden Detektionsantikörper. Die Untersuchung der CREB-Aktivierung wurde ebenfalls mit Bio-Plex Beads durchgeführt (Bio-Plex Total und Phospho-CREB Assays). Die gemessenen Phosphorylierungszustände der Signalmoleküle wurden auf den Totalgehalt des jeweiligen Moleküls bezogen und zusätzlich auf den Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

**Real-Time Polymerasekettenreaktion** – Die Taqman-Ansätze der Real-Time PCR wurden mit dem iQ Supermix der Firma BioRad pipettiert. Jedem Ansatz wurden 1000 ng cDNA sowie Primer und Sonde in der Konzentration 10  $\mu\text{mol/L}$  beigelegt. Im 96well-basierten Thermal Cycler wurden folgende Konditionen eingestellt: 95°C – 10 min, 95°C – 15 sek, 60°C – 1 min. Die letzten beiden Programmschritte wurden in insgesamt 42 Zyklen wiederholt. Der Ct-Wert jedes Well wurde automatisch von der Software des Cyclers ermittelt und zur Auswertung in eine Excel-Datei transferiert. Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte als relative Quantifizierung bezogen auf  $\beta$ -Aktin. Die Kontrolle selbst wurde auf den Wert 1 normiert, alle weiteren Ansätze als n-fache Expression der Kontrolle ausgedrückt.

**siRNA Transfektion** – Die gezielte Unterdrückung des PDGFR- $\beta$  in VSMC wurde über die Transfektion von siRNA mittels Elektroporation erreicht. Die Elektroporation wurde mit einem Nukleofektor der Firma Amaxa durchgeführt, die gegen den PDGFR- $\beta$  gerichtete siRNA-Sequenz wurde in Anlehnung an CHEN et al. kommerziell erworben [24].

Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen in Transfektionsmedium des Amaxa Nukleofektor Kits for Primary Smooth Muscle Cells überführt, wobei eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt wurde. Die Zellsuspension wurde daraufhin entweder mit der siRNA gegen PDGFR- $\beta$ , mit Silencer Negative Control #4 oder mit Wasser (Pulskontrolle) vermischt und in Amaxa Reaktionsküvetten der Elektroporation ausgesetzt. Eine Transfektionskontrolle auf mRNA-Ebene wurde 24 h, 48 h und 72 h nach Ablauf der Transfektion durchgeführt. Die Translation wurde 48 h nach Transfektion mittels Western Blot überprüft.

## Ergebnisse

### Untersuchungen der Sphingolipidrezeptoren

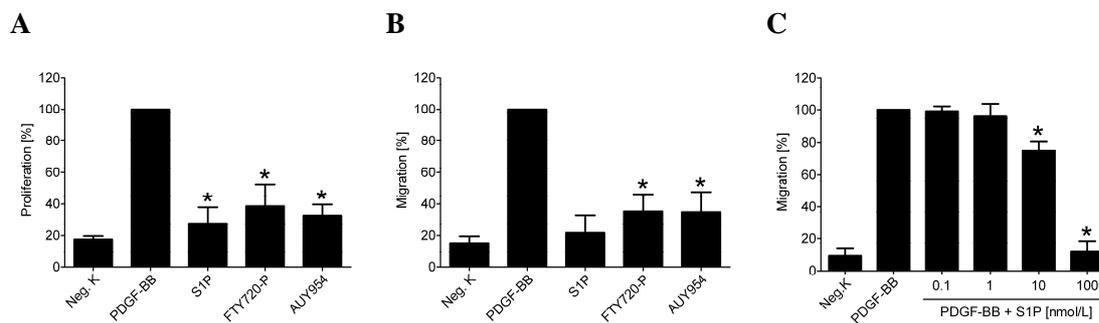
Die verwendeten Zellkulturen wurden zunächst mittels Polymerasekettenreaktion auf ihren Besatz an Sphingolipidrezeptoren untersucht. In VSMC sind der S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> Rezeptor am stärksten exprimiert; der S1P<sub>1</sub> Rezeptor weist die schwächste Bande im Agarosegel auf. In HUVEC ist die höchste Expression für den S1P<sub>1</sub> Rezeptor zu verzeichnen, gefolgt von dem annähernd gleich stark exprimierten S1P<sub>3</sub> Rezeptor und dem nicht signifikant nachweisbaren S1P<sub>2</sub> Rezeptor.

Der Einfluss verschiedener Sphingolipidrezeptor-Agonisten auf die Proliferation von VSMC wurde mithilfe des Cell Proliferation ELISAs untersucht (Abb. 1A). Als interne Positivkontrolle wurde bei jedem Versuch eine PDGF-BB Stimulation mitgemessen. Der Wachstumsfaktor wurde als Referenz für das Proliferationspotenzial der jeweiligen VSMC-Charge herangezogen und die Werte der einzelnen Messungen auf den Wert der PDGF-BB Stimulation normiert. Im Vergleich zu PDGF-BB zeigen die Sphingolipide eine nur schwache Stimulation der VSMC Proliferation. Nach 24-stündiger Inkubation der VSMC mit S1P in den Konzentrationen von 0,1 bis 1000 nmol/L ist nur eine geringe dosisabhängige Steigerung der Proliferation zu verzeichnen, die ab 100 nmol/L erstmals signifikant über dem Kontrollniveau liegt. Die Stimulation der VSMC mit dem S1P<sub>1/3</sub>-Agonisten FTY720-P erreichte ebenfalls ab 100 nmol/L eine signifikante Proliferationssteigerung. Eine Inkubation der VSMC mit dem selektiven S1P<sub>1</sub>-Agonisten AUY954 führte bereits ab einer Konzentration von 1 nmol/L zu einer signifikant erhöhten BrdU-Inkorporation.

Die potentiell stimulierende Wirkung verschiedener Sphingolipidrezeptor-Agonisten auf die Migration von VSMC wurde mithilfe des ChemoTX-Systems der Firma NeuroProbe untersucht (Abb. 1B). Als interne Positivkontrolle wurde auch bei den Migrationsversuchen eine PDGF-BB Stimulation mitgemessen. Der Wachstumsfaktor ist als migratorischer Stimulus gut charakterisiert und wurde als Referenz für das Migrationspotenzial der jeweiligen VSMC-Charge herangezogen. Für S1P konnte in keiner der getesteten Konzentrationen von 0,1 bis 1000 nmol/L die signifikante Aktivierung einer Migrationsantwort der VSMC festgestellt werden. Dagegen zeigten VSMC stimuliert mit FTY720-P signifikant höhere Migrationsraten als die unstimulierten Kontrollzellen. Das Maximum wurde mit einer Stimulation von 100 nmol/L

FTY720-P erreicht. AUY954 war bereits ab einer Konzentration von 1 nmol/L in der Lage, eine signifikante Migrationssteigerung der VSMC gegenüber der Negativkontrolle zu induzieren.

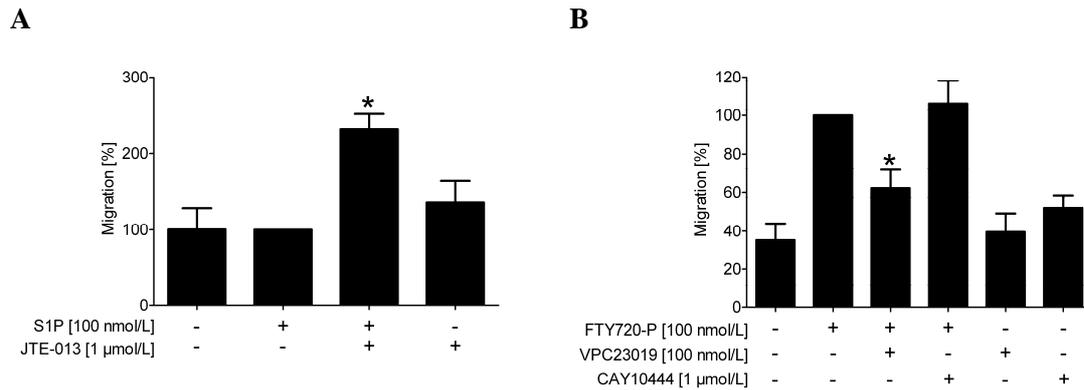
Das Sphingolipid S1P wurde zusätzlich in einer Ko-Stimulation mit PDGF-BB in seiner Wirkung auf die VSMC-Migration getestet (Abb. 1C). Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche S1P Konzentrationen von 0,1 bis 100 nmol/L unter gleichzeitiger Anwesenheit von PDGF-BB im Migrationsassay eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass S1P ab einer Konzentration von 10 nmol/l einen signifikant inhibierenden Einfluss auf die PDGF-BB induzierte Migrationsantwort der VSMC hat.



**Abb. 1: VSMC Proliferation und Migration nach Stimulation mit Sphingolipiden**

(A) Proliferation von VSMC nach Stimulation mit PDGF-BB [10 ng/ml], S1P [1  $\mu$ mol/L], FTY720-P [1  $\mu$ mol/L] und AUY954 [10 nmol/L]. (B) Migration von VSMC nach Stimulation mit PDGF-BB [1 ng/ml], S1P [100 nmol/L], FTY720-P [100 nmol/L] und AUY954 [100 nmol/L]. (C) Migration von S1P in Ko-Stimulation mit PDGF-BB [1 ng/ml]. Die Daten wurden auf den Wert der PDGF-BB Stimulation normiert und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  STABW aus mind. drei unabhängigen Versuchen. \* $P < 0,05$  vs. Neg. K (A, B) bzw. PDGF-BB (C).

Zur genaueren Charakterisierung der Rolle der einzelnen Rezeptoren an der Migrationsantwort wurden verschiedene Rezeptorantagonisten verwendet. Der selektive S1P<sub>2</sub>-Antagonist JTE-013 wurde zusammen mit S1P im ChemoTX-Migrationsassay inkubiert (Abb. 2A). Während S1P allein keinen messbaren Einfluss auf die VSMC Migration zu haben scheint, führt der Stimulationsansatz aus S1P inklusive JTE-013 zu einer signifikanten Aktivierung der Migration in diesen Zellen. Die alleinige Inkubation von JTE-013 ergab bezogen auf die Kontrolle keine signifikante Änderung der VSMC Migration. Eine Stimulation von FTY720-P mit den Sphingolipidrezeptor-Antagonisten VPC23019 und CAY10444 ergab die in Abbildung 2B dargestellten Ergebnisse. Die gleichzeitige Inkubation von FTY720-P mit dem S1P<sub>1/3</sub>-Antagonisten VPC23019 resultierte in einer signifikanten Reduktion der Migration. Der Stimulationsansatz aus FTY720-P zusammen mit dem selektiven S1P<sub>3</sub>-Antagonisten CAY10444 ergab keine signifikante Verringerung des migratorischen Verhaltens der VSMC im Vergleich zur singulären FTY720-P Stimulation.



### Abb. 2: VSMC Migration nach Stimulation mit Sphingolipid-Rezeptorantagonisten

Migration von VSMC nach Stimulation mit S1P und dem S1P<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten JTE-013 (A) sowie nach Stimulation mit FTY720-P und dem S1P<sub>1/3</sub>-Antagonisten VPC23019 bzw. dem S1P<sub>3</sub>-Antagonisten CAY10444 (B). Die Daten wurden auf den Wert der S1P- bzw. der FTY720-P Stimulation normiert und repräsentieren Mittelwerte ± STABW aus jeweils drei unabhängigen Versuchen. \* $P < 0,05$  vs. S1P (A) bzw. FTY720-P (B).

Anhand des Fluoreszenzfarbstoffes DAF2-DA wurde untersucht, inwieweit eine Aktivierung der Sphingolipidrezeptoren zur Bildung intrazellulären Stickstoffmonoxids (NO) führt. Eine Stimulation von HUVEC mit AUY954 und FTY720-P führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Fluoreszenzintensität (Publikation 2, Abb. 1C,D). Um die Beteiligung der aktivierten Rezeptoren im Einzelnen zu überprüfen, wurden die Ansätze mit verschiedenen S1P-Rezeptorantagonisten inkubiert. Dabei zeigte die gleichzeitige Stimulation von HUVEC mit AUY954/FTY720-P und VPC23019 eine signifikante Reduktion der DAF2-Fluoreszenz, wohingegen die Inkubation von AUY954/FTY720-P mit CAY10444 zu keiner Veränderung der Fluoreszenzintensität führte. Die Inkubation mit CAY10444 und zusätzlich dem S1P<sub>1</sub>-Antagonisten W146 konnte die Fluoreszenzintensität in beiden Stimulationsansätzen signifikant hemmen (Publikation 2, Abb. 2A,B).

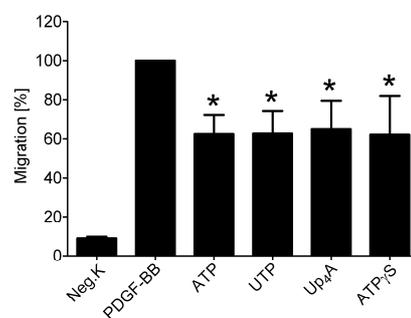
Die mit der Rezeptoraktivierung in Verbindung stehende Signaltransduktion wurde mittels der Luminex-Technologie untersucht. Im Vergleich zu unstimulierten HUVEC konnte sowohl für AUY954 als auch FTY720-P eine signifikante Aktivierung von Akt festgestellt werden (Publikation 2, Abb. 3A).

### Untersuchungen der Purinrezeptoren

Die in dieser Arbeit untersuchten Purinrezeptoren wurden ebenfalls mittels PCR in VSMC nachgewiesen. Der P2Y<sub>2</sub> Rezeptor wird am stärksten exprimiert, gefolgt vom P2Y<sub>6</sub> Rezeptor. Eine schwache Expression ist für den P2Y<sub>4</sub> Rezeptor zu verzeichnen. Der P2Y<sub>1</sub> Rezeptor ist nicht signifikant nachweisbar (Publikation 3, Abb. 2a).

Der Einfluss verschiedener Purinrezeptor-Agonisten auf die Proliferation von VSMC wurde mithilfe des Cell Proliferation ELISAs untersucht. Als interne Positivkontrolle wurde bei jedem Versuch eine PDGF-BB Stimulation mitgemessen. Die getesteten Nukleotide zeigen eine sehr unterschiedliche Wirkung auf die Proliferation der VSMC. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit ATP und UTP in den Konzentrationen von 1 nmol/L bis 10  $\mu$ mol/L lässt sich keine signifikante Steigerung der Proliferation verzeichnen. Die Inkubation der VSMC mit Up<sub>4</sub>A erreichte dagegen ab einer Konzentration von 100 nmol/L eine signifikante Stimulation der Zellproliferation (Publikation 3, Suppl. Abb. IIA). Einen aktivierenden Einfluss auf die VSMC-Proliferation zeigte auch ATP $\gamma$ S. Ebenfalls ab einer Konzentration von 100 nmol/L lag der Wert der gemessenen BrdU-Inkorporation in den VSMC signifikant über den unstimulierten Ansätzen. In Abhängigkeit von der Erhöhung der ATP $\gamma$ S-Konzentration nahm auch die Stimulation der VSMC-Proliferation zu (Publikation 3, Suppl. Abb. IIC).

Die potentiell stimulierende Wirkung verschiedener Purinrezeptor-Agonisten (ATP, UTP, Up<sub>4</sub>A, ATP $\gamma$ S) auf die Migration von VSMC wurde ebenfalls mit PDGF-BB als interne Positivkontrolle untersucht. Alle getesteten Nukleotide zeigen eine signifikante, dosisabhängige Aktivierung der VSMC-Migration. Abbildung 3 zeigt exemplarisch die an VSMC gemessenen Migrationswerte bei Stimulation mit einer Nukleotidkonzentration von je 10  $\mu$ mol/L.



**Abb. 3: VSMC Migration nach Stimulation mit Purinorezeptor-Agonisten**

Migration von VSMC nach Stimulation mit PDGF-BB [1 ng/ml] sowie den Nukleotiden ATP, UTP, Up<sub>4</sub>A und ATP $\gamma$ S in je 10  $\mu$ mol/L. Die Daten wurden auf den Wert der PDGF-BB Stimulation normiert und repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  STABW aus mind. sieben unabhängigen Versuchen. \* $P < 0,005$  vs. Neg. K.

Das Enzym Apyrase ist eine Nukleotid-Phosphohydrolase und hydrolysiert Nukleotide unter Freisetzung anorganischer Phosphate. Die Ko-Stimulation von ATP und UTP mit Apyrase führte zu einem drastischen Einbruch der Migrationsantwort. Auf die VSMC-Stimulationen durch Up<sub>4</sub>A und ATP $\gamma$ S im ChemoTX-Assay hatte die Anwesenheit von Apyrase keinen signifikanten Einfluss (Publikation 1, Abb. 1B).

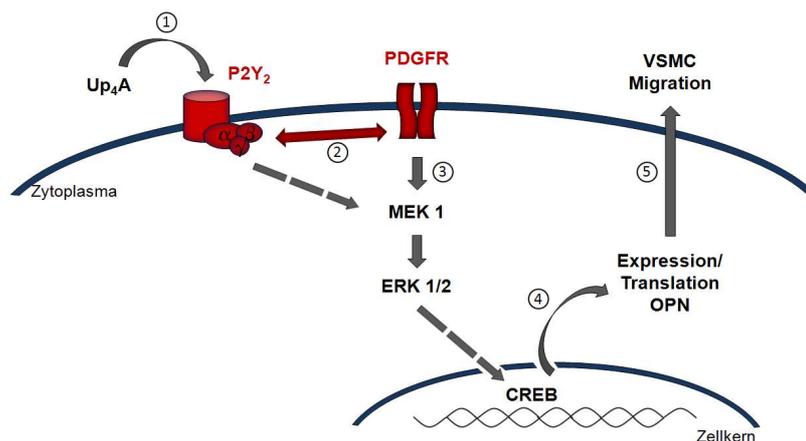
Die Untersuchung der Bedeutung von Purinrezeptoren an atherosklerotischen Prozessen fokussiert sich im Folgenden auf die Rezeptoraktivierung mit dem noch wenig charakterisierten Dinukleotid  $Up_4A$ . Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Rezeptorantagonisten auf die Stimulation der VSMC-Migration durch  $Up_4A$  analysiert. Zum Einsatz kamen MRS2179 als selektiver  $P2Y_1$ -Antagonist, Suramin, PPADS und RB-2 als unspezifische  $P2Y$ -Antagonisten sowie MRS2578 als selektiver  $P2Y_6$ -Antagonist. Die Antagonisten wurden zusammen mit  $Up_4A$  im ChemoTX-Migrationsassay inkubiert. Unter den getesteten Purinrezeptor-Antagonisten waren Suramin, PPADS und RB-2 in der Lage, die Nukleotid-induzierte Migration der VSMC zu hemmen. MRS2179 und MRS2578 zeigten keinen Einfluss auf die  $Up_4A$ -induzierte Migration der VSMC (Publikation 1, Abb. 1C).

Aufgrund zahlreicher Hinweise in der Literatur wurde die durch  $Up_4A$ -induzierte VSMC-Migration auf eine Beteiligung des Matrixproteins Osteopontin (OPN) untersucht. Ein spezifisch gegen OPN gerichteter Antikörper wurde zusammen mit  $Up_4A$  im ChemoTX-Assay inkubiert. Die Migrationsantwort der VSMC auf  $Up_4A$  geht bei gleichzeitiger Inkubation mit dem OPN-Antikörper signifikant zurück (Publikation 1, Abb. 2E). Eine vergleichende Inkubation der VSMC mit  $Up_4A$  und einem unspezifischen, IgG1-Kontrollantikörper zeigte keine signifikante Wirkung auf die Migration der Zellen. In Real-time PCR-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass  $Up_4A$  einen positiven, konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Expression des Matrixproteins hat. Diese durch  $Up_4A$  induzierte OPN-Expression in VSMC konnte bei gleichzeitiger Inkubation mit den  $P2Y$ -Inhibitoren MRS2179, Suramin, RB2 und MRS2578 nur durch Suramin gehemmt werden (Publikation 1, Abb. 2B). Der OPN-Expression folgte eine durch  $Up_4A$  induzierte Sekretion des Matrixproteins. Der positive Zusammenhang zwischen einer  $Up_4A$ -Stimulation und der Sekretion von OPN konnte dosisabhängig und zeitabhängig, in einem Intervall von 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden beobachtet werden (Publikation 1, Abb. 2C,D).

Die hinter der  $Up_4A$ -induzierten Rezeptoraktivierung stehende Signaltransduktion wurde ebenfalls analysiert. Mittels der xMAP-Technologie ließ sich nach Inkubation mit dem Dinukleotid eine zeitabhängige Aktivierung von MEK1, ERK1/2 und p38 in VSMC messen (Publikation 3, Abb. 7a). Die Aktivierung der intrazellulären Kinasen erreichte jeweils nach zehn Minuten ein Maximum und war nach Ablauf von 30 Minuten etwa auf Kontrollniveau zurückgefallen. Zusätzlich zu den beschriebenen Kinasen konnte auch eine zeitabhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB gemessen werden (Publikation 1, Abb. 3C). Mit dem Einsatz des MEK1-Inhibitors PD98059 sowie des ERK1/2-Inhibitors U0126 wurde eine

Beteiligung der MEK1/ERK1/2-Kaskade sowohl an der Up<sub>4</sub>A-induzierten OPN-Expression als auch Migration gezeigt (Publikation 1, Abb. 3E,F).

Eine mögliche Cross-Kommunikation der Purinrezeptoren mit anderen Rezeptortypen wurde am Beispiel des PDGF-Rezeptors (PDGFR) untersucht. Der Wachstumsfaktor PDGF-BB induziert eine dosisabhängige Migration der VSMC; diese Eigenschaft wurde bereits vielfach beschrieben und charakterisiert. Die Analyse der hinter dieser Reaktion stehenden Signaltransduktion ergab auch für PDGF-BB eine zeitabhängige Aktivierung von MEK1, ERK1/2 und CREB in VSMC sowie eine Beteiligung der MEK1/ERK1/2-Kaskade an der PDGF-BB-induzierten Migration (Publikation 1, Abb. 3A-C,F). Eine gleichzeitige Stimulation von VSMC mit Up<sub>4</sub>A und AG1296, ein Inhibitor der PDGF- $\beta$  Rezeptor-Tyrosinkinase, resultierte sowohl in einer Hemmung der Zellmigration als auch in einem Rückgang der durch Up<sub>4</sub>A-induzierten OPN-Sekretion (Publikation 1, Abb. 4A,B). Mittels Western Blot konnte eine Phosphorylierung des PDGFR- $\beta$  durch Up<sub>4</sub>A gezeigt werden. Die zeitabhängige Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase durch Up<sub>4</sub>A ließ nach einer Stimulationszeit von 1 bis 2,5 Minuten eine maximale Phosphorylierung des PDGFR- $\beta$  erkennen (Publikation 1, Abb. 4C). Durch transiente Unterdrückung der PDGF- $\beta$ -Expression mittels siRNA in VSMC konnte eine unmittelbare Beteiligung des Rezeptors an der Up<sub>4</sub>A-induzierten Migration nachgewiesen werden. Die Migrationsantwort dieser Zellen lag nach Stimulation mit Up<sub>4</sub>A signifikant unter dem Wert der Migration von VSMC, die nicht mit siRNA gegen PDGFR- $\beta$  transfiziert wurden (Publikation 1, Abb. 4D). Abbildung 4 bietet einen Überblick über die beobachteten Zusammenhänge.



**Abb. 4: Up<sub>4</sub>A-induzierte VSMC Migration über Aktivierung von P2Y<sub>2</sub> und PDGFR**

Up<sub>4</sub>A aktiviert den Purinorezeptor P2Y<sub>2</sub> (1) und über eine Transaktivierung die PDGFR Rezeptor-Tyrosinkinase (2). Auf die Rezeptoraktivierung folgt die Aktivierung der MEK1/ERK1/2-Kaskade (3) sowie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB. CREB transloziert in den Zellkern und könnte dort an der Hochregulation der OPN mRNA-Expression beteiligt sein (4). Die Translation und Sekretion des OPN-Proteins beeinflussen schließlich die VSMC Migration (5).

## Diskussion

### Die Bedeutung der Sphingolipidrezeptoren in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose

Sphingolipide sind essentieller Bestandteil zahlreicher Membransysteme und agieren darüber hinaus als wichtige intrazelluläre und extrazelluläre Signalmoleküle [5,25]. Als solche sind sie an physiologischen Prozessen wie etwa der Angiogenese oder der Regulation des Gefäßtonus beteiligt [9,10,26], spielen andererseits jedoch auch in pathologischen Zusammenhängen eine entscheidende Rolle [27,28]. Ihr prominentester Vertreter Sphingosine-1-Phosphat (S1P) stand in den letzten Jahren im Fokus zahlreicher Forschungen [29]. S1P vermittelt seine vielfältigen Effekte über die spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub>, die in den verschiedensten Zellsystemen, darunter auch vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, exprimiert werden [5]. In den in dieser Arbeit verwendeten VSMC konnte in Übereinstimmung mit der Literatur eine ausgeprägte Expression von S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>, sowie eine schwächere Bande für S1P<sub>1</sub> nachgewiesen werden [30]. Die verwendeten HUVEC hingegen zeigten die für Endothelzellen typische starke Expression des S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> [26]. Über die genannten Rezeptoren kann das im Gefäßsystem zirkulierende S1P zum einen pro-atherosklerotische Wirkungen auslösen, zum anderen jedoch auch anti-atherosklerotische Schutzfunktionen vermitteln. Als pathologische Eigenschaften wurden beispielsweise die Aktivierung von NF-κB sowie die Expression des vaskulären Adhäsionsfaktors VCAM-1 in Endothelzellen beschrieben [27,31,32]. Der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch S1P kommt dagegen eine protektive Funktion zu [27].

Da die Proliferation von VSMC im Rahmen der Atherosklerose eine wesentliche Rolle spielt, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Sphingolipidrezeptor-Agonisten auf ihre mitogene Wirkung getestet. Zum Einsatz kamen S1P als Agonist der Rezeptoren S1P<sub>1-5</sub>, FTY720-P als Agonist von S1P<sub>1,3-5</sub> sowie AUY954 als selektiver S1P<sub>1</sub>-Agonist (in VSMC vorhandene Rezeptoren S1P<sub>1,3</sub>). Alle drei Agonisten zeigten einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die Proliferation der VSMC. Da die selektive Stimulation mit AUY954 ausreichte um einen positiven Effekt in den VSMC hervorzurufen, ist eine Beteiligung des S1P<sub>1</sub> an der Proliferationsreaktion anzunehmen. Die Ergebnisse von KLUK & HLA bestätigen diesen Befund, indem sie durch stabile Transfektion von S1P<sub>1</sub> in VSMC die Proliferationsantwort dieser Zellen signifikant steigern konnten [30].

Neben der Proliferation von VSMC ist im Verlauf der Atherosklerose vor allem die Migration dieser Zellen in die Intima ein wichtiges Charakteristikum für den Verlauf der Krankheit [1]. Die Inkubation der VSMC mit den oben genannten Agonisten im Migrationsassay ergab unterschiedliche Ergebnisse. Während FTY720-P und AUY954 einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die Migration der VSMC zeigten, inhibierte S1P die durch PDGF-BB induzierte Migrationsantwort. Eine gleichzeitige Stimulation mit S1P und dem selektiven S1P<sub>2</sub>-Antagonisten JTE-013 führte dagegen zu einer signifikant gesteigerten Migration der VSMC. Der Frage, ob die resultierende Migrationsantwort S1P<sub>1</sub> oder S1P<sub>3</sub> vermittelt ist, wurde durch Ko-Inkubation von FTY720-P mit dem S1P<sub>1/3</sub>-Antagonisten VPC23019 sowie dem selektiven S1P<sub>3</sub>-Antagonisten CAY10444 nachgegangen. VPC23019 konnte die Migration der VSMC signifikant verringern, CAY10444 zeigte jedoch keinen Einfluss. Gemäß den Ergebnissen ist die Stimulation der Migration in diesem Versuchsaufbau S1P<sub>1</sub> vermittelt, wohingegen der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor eine inhibierende Wirkung entfaltet. Die Aktivierung der VSMC-Migration durch S1P<sub>1</sub> sowie deren Inhibierung über S1P<sub>2</sub> konnte auch von anderen Gruppen gezeigt werden und wird auf eine unterschiedliche Regulation der kleinen GTPasen Rho und Rac zurückgeführt [5,33]. Während Rac durch S1P<sub>1</sub> aktiviert wird, vermittelt S1P<sub>2</sub> die Inhibierung von Rac und die Aktivierung von Rho [34-36]. Ähnliche Ergebnisse beschrieben INOKI et al. auch für Endothelzellen, wobei in diesen Zellen die Aktivierung der Migration S1P<sub>3</sub> vermittelt wird [35]. Eine Beteiligung des S1P<sub>3</sub> lässt sich auch bei der VSMC-Migration nicht ausschließen [5].

Über die eingangs beschriebene Aktivierung der eNOS kommt den Sphingolipidrezeptoren auch eine anti-atherosklerotische Bedeutung zu. Die Inkubation von HUVEC mit AUY954 und FTY720-P führt zu einer signifikanten Zunahme der DAF2-DA Fluoreszenz und somit zu einer zunehmenden NO-Freisetzung. Das Fluoreszenzsignal beider Agonisten konnte durch die zusätzliche Inkubation mit dem S1P<sub>1/3</sub>-Antagonisten VPC23019 signifikant inhibiert werden. Das selektive Inhibieren einzelner Rezeptoren genügte jedoch nicht, um die NO-Bildung nach FTY720-P Stimulation signifikant zu hemmen: die Antagonisten W146 (S1P<sub>1</sub>) und CAY10444 (S1P<sub>3</sub>) allein zeigten keine Wirkung auf das Fluoreszenzsignal. Erst die parallele Antagonisierung mit W146 und CAY10444 konnte das FTY720-P bedingte Signal reduzieren. Es ist somit anzunehmen, dass beide Rezeptoren, S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub>, in der Lage sind, die NO-Freisetzung zu induzieren. Biochemisch konnte nach Stimulation mit AUY954 und FTY720-P eine Phosphorylierung der eNOS im Western Blot nachgewiesen werden, wie sie vergleichbar von IGARASHI et al. auch nach S1P-Stimulation an bovinen arteriellen Endothelzellen gefunden wurde [37]. Die hinter der Rezeptoraktivierung stehende Signaltransduktion wurde ebenfalls

untersucht. Eine unmittelbare Phosphorylierung von Akt nach Stimulation mit AUY954 bzw. FTY720-P konnte über die sensitive xMAP Technologie in HUVEC-Lysaten gemessen werden. Diese Phosphorylierung war unter Einsatz des Akt Inhibitors signifikant hemmbar. Die hier präsentierten Ergebnisse bekräftigen frühere Hinweise auf eine Akt-vermittelte Aktivierung der eNOS [11,37]. Sphingolipidrezeptoren tragen damit auch wesentlich zu protektiven NO-vermittelten Funktionen bei, wie etwa der Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen sowie dem Erhalt der endothelialen Integrität über eine herabgesetzte Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten bzw. Leukozyten [10].

### **Die Bedeutung der Purinrezeptoren in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose**

Purinrezeptoren sind entscheidend an der Physiologie und Pathophysiologie des kardiovaskulären Systems beteiligt. Sie regulieren die Gefäßkonstriktion und -dilatation, beeinflussen das Wachstum von VSMC und Endothelzellen, stimulieren die Thrombozytenaggregation und induzieren inflammatorische Vorgänge [12]. Welcher Effekt letztlich durch die Purinrezeptoren vermittelt wird, ist abhängig von der Art des Nukleotid-Agonisten, seiner Degradation durch Nukleotidasen sowie vom jeweiligen Zelltyp [12]. So werden beispielsweise durch Aktivierung des P2Y<sub>2</sub> Rezeptors zahlreiche pro-atherosklerotische Prozesse ausgelöst, wie etwa die vermehrte Expression des pro-inflammatorischen vaskulären Adhäsionsfaktors VCAM-1 [38]. Ebenfalls P2Y<sub>2</sub> vermittelt erfolgt die Freisetzung von MCP-1 durch VSMC [Publikation 3], was ebenso wie VCAM-1 zur vermehrten Anheftung von Monocyten an das Endothel führt. Protektive Einflüsse von Purinrezeptoren auf die Pathogenese der Atherosklerose konnten für P1-Rezeptoren beobachtet werden. Durch den inhibierenden Einfluss des A<sub>2A</sub>-Rezeptors auf die Transformation von Makrophagen in Schaumzellen [39] sowie auf die Proliferation von VSMC [13] kommt den Purinrezeptoren auch eine anti-atherosklerotische Funktion zu.

Die hier vorgestellten Versuche wurden an VSMC von Wistar-Ratten durchgeführt, für die die Expression der Purinrezeptoren P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> sowie etwas schwächer auch P2Y<sub>4</sub> nachgewiesen wurde. P2Y<sub>1</sub> war nicht signifikant nachweisbar. Der gefundene Rezeptorbesatz ist analog in der Literatur beschrieben [12].

Während für Up<sub>4</sub>A und das nicht-hydrolyisierbare ATP-Analog ATPγS eine proliferationssteigernde Wirkung auf VSMC gezeigt werden konnte, war dies für ATP und UTP nicht möglich. Trotz der vielfach beschriebenen mitogenen Wirkung beider Nukleotide ist anzunehmen, dass im eigenen Versuchsaufbau die Degradation durch Nukleotidasen und die

resultierende Inhibierung der Proliferation über P1-Rezeptoren überwog [13,40]. Für die  $Up_4A$ -induzierte Proliferation der VSMC konnte über den Antagonisten Suramin eine Beteiligung der P2Y-Rezeptoren nachgewiesen werden [41,42]. Die Proliferation der VSMC während der Pathogenese der Atherosklerose kommt u.a. in einer zunehmenden Intima-Media-Dicke zum Ausdruck. JANKOWSKI et al. fanden in jugendlichen Bluthochdruckpatienten einen erhöhten  $Up_4A$ -Plasmaspiegel, der mit einer Zunahme der Intima-Media-Dicke korrelierte, und führten dies auf eine P2Y-vermittelte VSMC-Proliferation zurück [41]. Insofern lässt sich für  $Up_4A$  bereits eine atherosklerotische Relevanz vermuten.

Neben der Zellproliferation sind migratorische Prozesse entscheidend an der Progression der Atherosklerose beteiligt [1]. Für  $Up_4A$  konnte eine mit ATP, UTP und  $ATP\gamma S$  vergleichbare, migrationsstimulierende Wirkung nachgewiesen werden. Aus der parallelen Inkubation von  $Up_4A$  mit Apyrase kann gefolgert werden, dass diese Wirkung nicht auf Degradationsprodukten beruht. Zur Evaluation der beteiligten Purinrezeptoren kamen verschiedene Antagonisten zum Einsatz; Suramin, PPADS und RB-2 hemmten die VSMC-Migration signifikant. Über Suramin werden P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> gehemmt [18]. Eine Beteiligung von P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>6</sub> konnte durch die selektiven Antagonisten MRS2179 und MRS2578 ausgeschlossen werden. PPADS hemmt unselektiv P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>4</sub>, hat jedoch in den verwendeten VSMC aus Ratte keine Wirkung auf P2Y<sub>4</sub> [18]. RB-2 inhibiert neben P2Y<sub>2</sub> und P2Y<sub>6</sub> vor allem P2Y<sub>4</sub> [18] und zeigte einen geringen aber signifikanten Einfluss auf die VSMC-Migration. Das vorliegende Muster der Rezeptor-antagonisierung weist somit auf eine überwiegend P2Y<sub>2</sub>-vermittelte Migrationsreaktion hin.

Die Reorganisation der extrazellulären Matrix spielt bei migratorischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Für die Nukleotid-induzierte VSMC-Migration wird insbesondere eine Beteiligung von Osteopontin (OPN) vermutet [43,44]. Tatsächlich konnte auch durch Stimulation mit  $Up_4A$  eine gesteigerte OPN-Expression und Sekretion in VSMC hervorgerufen werden. Die Induktion der OPN-Expression erfolgt P2Y<sub>2</sub>-vermittelt, da sie lediglich durch Suramin, nicht jedoch durch RB-2 hemmbar war. Über den Einsatz eines gegen OPN gerichteten Antikörpers im Migrationsassay wurde die Beteiligung von OPN in der  $Up_4A$ -induzierten VSMC-Migration unmittelbar nachgewiesen.

Die beobachtete Expression von OPN ist abhängig von einer Aktivierung der intrazellulären MAP Kinasen MEK1 und ERK1/2. Über den Einsatz der MAPK Antagonisten PD98059 sowie U0126 konnte ein signifikanter Rückgang der OPN-Expression nach Stimulation der Zellen mit  $Up_4A$  gemessen werden. Die MEK1/ERK1/2-Kaskade ist auch an der Signalvermittlung der  $Up_4A$ -induzierten Migrationsantwort der VSMC beteiligt. Durch Einsatz derselben MAPK

Antagonisten im Migrationsassay konnte eine signifikante Hemmung der Zellmigration erreicht werden. Eine Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation von P2Y<sub>2</sub> wurde auch von anderen Autoren in verschiedenen Zellsystemen beobachtet [45]. Die anhaltende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB nach Stimulation der VSMC mit Up<sub>4</sub>A konnte aufgrund fehlender Inhibitoren leider nicht in einen unmittelbaren Zusammenhang mit der Zellmigration gesetzt werden. JALVY et al. haben jedoch für die UTP-induzierte VSMC-Migration mittels CREB siRNA einen signifikanten Rückgang der Migrationsantwort nachgewiesen [46].

Zahlreiche Studien haben im Hinblick auf die Signaltransduktion mögliche Rezeptor-Cross-Kommunikationen beschrieben, darunter auch für Purinrezeptoren. Neben der Interaktion von P2X und P2Y-Rezeptoren werden auch Cross-Kommunikationen zwischen den G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen beobachtet [45]. So konnte beispielsweise für die eingangs beschriebene VCAM-1-Expression eine P2Y<sub>2</sub>-induzierte Transaktivierung des VEGF-Rezeptors festgestellt werden [47]. Die vorliegende Arbeit postulierte eine vergleichbare Transaktivierung des PDGF-Rezeptors durch Up<sub>4</sub>A-induzierte P2Y<sub>2</sub>-Aktivierung. Unter Verwendung des PDGF-Rezeptor-Inhibitors AG1296 wurde sowohl ein Rückgang der durch Up<sub>4</sub>A stimulierten OPN-Sekretion beobachtet, als auch eine signifikante Hemmung der Up<sub>4</sub>A-Migration. Up<sub>4</sub>A war zudem in der Lage, eine direkte, zeitabhängige Phosphorylierung des PDGFβ-Rezeptors auszulösen. Die Phosphorylierung wurde über einen monoklonalen Antikörper an Tyr716 im Western Blot gezeigt. VSMC, die mit siRNA gegen den PDGFβ-Rezeptor tranfiziert wurden, zeigten im Migrationsassay eine signifikant geringe Migrationsantwort auf Up<sub>4</sub>A als Zellen, die mit einem unveränderten PDGFβ-Rezeptorbesatz ausgestattet waren. Eine Interaktion beider Rezeptortypen in der Up<sub>4</sub>A-induzierten Migration von VSMC ist daher anzunehmen. Als möglichen Mechanismus der Cross-Kommunikation beider Rezeptortypen schlagen LIU et al. eine Signalübertragung über die Tyrosinkinase Src vor; die für die Bindung von Src am P2Y<sub>2</sub> notwendige SH3-Domäne wurde bereits nachgewiesen [48].

Die hier diskutierten Ergebnisse zeigen, dass eine Up<sub>4</sub>A-induzierte P2Y<sub>2</sub>-Rezeptoraktivierung neben den bereits bekannten vasoaktiven Eigenschaften [22,49] auch einen Einfluss auf inflammatorische Gefäßveränderungen hat. Die im Rahmen einer Inflammation lokal erhöhten Up<sub>4</sub>A-Konzentrationen können über die Freisetzung von MCP-1 sowie über die Aktivierung proliferatorischer und migratorischer Prozesse, die Pathologie der Atherosklerose beeinflussen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Ross R (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
- [2] Boisvert WA (2004) Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med* 14:161-165
- [3] Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621
- [4] Newby AC, Zaltsman AB (1999) Fibrous cap formation or destruction – the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41:345-360
- [5] Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J (2004) Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 73:321-354
- [6] Hla T, Brinkmann V (2011) Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology* 76:S3
- [7] Osborne N, Stainier DYR (2003) Lipid receptors in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 65:23-43
- [8] Ninio E (2005) Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:123-131
- [9] Schuchardt M, Tölle M, Prüfer J, van der Giet M (2011) Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *BJ Pharmacol* 163:1140-1162
- [10] Igarashi J, Michel T (2009) Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. *Cardiovasc Res* 82:212-220
- [11] Igarashi J, Michel T (2008) S1P and eNOS regulation. *Biochim Biophys Acta* 1781(9):489-495
- [12] Erlinge D, Burnstock G (2008) P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 4(1):1-20
- [13] Burnstock G (2009) Purinergic regulation of vascular tone and remodeling. *Auton Autacoid Pharmacol* 29(3):63-72
- [14] Burnstock G, Verkhratsky A (2010) Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1:e9
- [15] Ferrero ME (2011) Purinoreceptors in inflammation: potential as anti-inflammatory therapeutic targets. *Front Biosci* 17:2172-2186
- [16] Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64:1471-1483
- [17] Burnstock G, Kennedy C (2011) P2X receptors in health and disease. *Adv Pharmacol* 61:333-72
- [18] von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415-432
- [19] Seye CI, Kong Q, Yu N, González FA, Erb L, Weisman GA (2006) P2 receptors in atherosclerosis and postangioplasty restenosis. *Purinergic Signal* 2(3):471-480
- [20] Di Virgilio F & Solini A (2002) P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 135:831-842
- [21] Jankowski V, van der Giet M, Mischak H, Morgan M, Zidek W, Jankowski J (2009) Dinucleosid polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol* 157:1142-1153
- [22] Jankowski V, Tölle M, Vanholder R, Schönfelder G, van der Giet M, Henning L, Schluter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J (2005) Uridine adenosine tetraphosphate: A novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med* 11:223-227
- [23] Matsumoto T, Tostes RC, Webb RC (2011) The role of uridine adenosine tetraphosphate in the vascular system. *Adv Pharmacol Sci*, Epub 2011 Nov 1
- [24] Chen SW, Chen YX, Zhang XR, Quian H, Chen WZ, Xie WF (2008) Targeted inhibition of platelet-derived growth factor receptor-beta subunit in hepatic stellate cells ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Gen Ther* 15:1424-1435
- [25] Hannich JT, Umebayashi K, Riezman H (2011) Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(5):1-14
- [26] Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N (2008) Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* 1781(9):483-8
- [27] Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S (2012) Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22(1):50-60
- [28] Kolter T (2011) A view on sphingolipids and disease. *Chem Phys Lipids* 164(6):590-606
- [29] Fyrst H, Saba JD (2010) An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol* 6(7):489-497

- [30] Kluk MJ, Hla T (2001) Role of the sphingosine 1-phosphate receptor edg-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 89:496-502
- [31] Daum G, Grabski A, Reidy MA (2009) Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1439-1443
- [32] Xu C, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L (2004) Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 25(7):849-854
- [33] Osada M, Yatomi Y, Ohmori T, Ikeda H, Ozaki Y (2002) Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 299(3):483-487
- [34] Ruy Y, Takuwa N, Sugimoto N, Sakurada S, Usui S, Okamoto H, Matsui O, Takuwa Y (2002) Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 90(3):325-332
- [35] Inoki I, Takuwa N, Sugimoto N, Yoshioka K, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y (2006) Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 346(1):293-300
- [36] Takashima S, Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takamura M, Takata S, Kaneko S, Takuwa Y (2008) G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase. *Cardiovasc Res* 79(4): 689-697
- [37] Igarashi J, Bernier SG, Michel T (2001) 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* 276(15):12420-12426
- [38] Seye CI, Yu N, Jain R, Kong Q, Minor T, Newton J, Erb L, González FA, Weisman GA (2003) The P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 278(27):24960-24965
- [39] Reiss AB, Cronstein BN (2012) Regulation of foam cells by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(4):879-86
- [40] Dubey RK, Gillespie DG, Shue H, Jackson EK (2000) A(2B) receptors mediate antimitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35:267-72
- [41] Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran TN, van der Giet M, Tölle M, Zidek W, Jankowski J (2007) Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1776-1781
- [42] Gui Y, He G, Walsh MP, Zheng XL (2011) Signaling mechanisms mediating uridine adenosine tetraphosphate-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 58(6):654-62
- [43] Renault MA, Jalvy S, Potier M, Belloc I, Genot E, Dekker LV, Desgranges C, Gadeau AP (2005) UTP induces osteopontin expression through a coordinate action of NFκB, activator protein-1, and upstream stimulatory factor in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280:2708-2713
- [44] Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, Dupuch F, Ezan G, Peiretti F, Loirand G, Pacaud P, Gadeau AP (2001) Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin. *Circ Res* 89(9):772-778
- [45] Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 452(5):552-562
- [46] Jalvy S, Renault MA, Lam Shang Leen L, Belloc I, Reynaud A, Gadeau AP, Desgranges C (2007) CREB Mediates UTP-Directed Arterial Smooth Muscle Cell Migration and Expression of the Chemotactic Protein Osteopontin via Its Interaction with Activator Protein-1 Sites. *Circ Res* 100(9):1292-1299
- [47] Seye CI, Yu N, González FA, Erb L, Weisman GA (2004) The P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem* 279:35679-35686
- [48] Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Perez LI, Gonzalez FA, Seye CI, Weisman GA, Erb L (2004) Src homology 3 binding sites in the P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor interact with src and regulate activities of src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J Biol Chem* 279:8212-8218
- [49] Tölle M, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Klockel L, Jankowski J, Jankowski V, Zidek W, van der Giet M (2010) Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 161:530-540

## 2. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Annette Wiedon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: `Die Bedeutung von Sphingolipid- und Purinrezeptoren in der Pathologie und Protektion der Atherosklerose` selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

**Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen**

Annette Wiedon hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Wiedon A, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M, Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inductor of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 417(3):1035-1040

Impact Factor: 2,371

Beitrag im Einzelnen: Design und Durchführung des überwiegenden Anteils der Versuche. Etablierung der Migrationsexperimente. Selbständiges Verfassen des Manuskripts.

**Publikation 2:** Tölle M, Klöckl L, Wiedon A, Zidek W, van der Giet M, Schuchardt M, Regulation of endothelial nitric oxide synthase activation in endothelial cells by S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub>, *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 476(4):627-634

Impact Factor: 2,371

Beitrag im Einzelnen: Transfektion von HUVEC mit siRNA gegen S1P<sub>1</sub>-Rezeptor. Durchführung mehrerer Western Blot-Experimente zum Nachweis der eNOS-Aktivierung. Durchführung einzelner Zellexperimente zum Nachweis von NO mittels DAF2-DA-Fluoreszenz.

**Publikation 3:** 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, Tölle M, The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y2-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation, *J Mol Med*, 2011, 89(8):799-810

Impact Factor: 5,107

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Migrations- und Proliferationsversuche mit Up<sub>4</sub>A und ATP<sub>γ</sub>S. Detektion des Phosphorylierungszustands der MAP Kinasen.

Datum

---

Unterschrift

### **3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

**Publikation 1:** Wiedon A, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M, Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inductor of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 417(3):1035-1040

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.088> – Supplement]

**Publikation 2:** Tölle M, Klöckl L, Wiedon A, Zidek W, van der Giet M, Schuchardt M, Regulation of endothelial nitric oxide synthase activation in endothelial cells by S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub>, Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(4):627-634

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

[<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.009>]

**Publikation 3:** 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, Tölle M, The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y2-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation, *J Mol Med*, 2011, 89(8):799-810

<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0750-6>

[<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0750-6>]

[<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0750-6> – Supplement]

## **4. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 5. Publikationsliste

Ziemssen F, Hufenbach U, **Wiedon A**, Scheffler M, Bertelmann T (2016) Regional differences in the care of patients with neovascular age-related macular degeneration, based on the non-interventional OCEAN study. *Klin Monbl Augenheilkd* [Epub ahead of print]

Tölle M, Klöckl L, **Wiedon A**, Zidek W, van der Giet M, Schuchardt M (2016) Regulation of endothelial nitric oxide synthase activation in endothelial cells by S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 476(4):627-634

Heimes B, Schick T, Brinkmann CK, **Wiedon A**, Haegele B, Kirchhof B, Holz FG, Pauleikhoff D, Ziemssen F, Liakopoulos S, Spital G, Schmitz-Valckenberg S (2016) Design of the ORCA module in the OCEAN study: Evaluation of SD-OCT results in daily routine practice. *Ophthalmologie* 113(7):570-580

Wachtlin J, Ringwald A, Maulhardt T, Pohl K, **Wiedon A**, BRIDGE investigators (2015) Cooperation of German ophthalmologists in routine care of patients with neovascular age-related macular degeneration: results of the non-interventional BRIDGE study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 254(8):1529-1536

**Wiedon A**, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M (2011) Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y<sub>2</sub> receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 417(3):1035-1040

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, Tölle M (2011) The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y<sub>2</sub>-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. *J Mol Med* 89(8):799-810

Tölle M, Schuchardt M, **Wiedon A**, Huang T, Klöckl L, Jankowski J, Jankowski V, Zidek W, van der Giet M (2010) Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoreceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* 161(3):530-540

Tölle 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 (2008) Adenosine 5-Tetraphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. *Circ Res* 103(10):1100-1108

Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tölle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schlüter H, **Wiedon A**, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J (2007) Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(2):297-302

## 6. Danksagung

„Wo viele Hände sind, ist die Last nicht schwer.“

*[Sprichwort, Haiti]*

In diesem Sinne möchte ich all den Menschen danken, die mir im Laufe der Promotionszeit geholfen haben, dass die Last nicht zu schwer wurde. Allen voran danke ich meinem Doktorvater Professor Markus van der Giet, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Forschungsarbeit durchführen zu können. Neben der Bereitstellung der Labore, Geräte und zahlreichen Materialien hat er vor allem durch wertvolle fachliche Ideen und Denkanstöße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, allen voran PD Dr. Markus Tölle und Dr. Mirjam Tölle-Schuchardt für ihre wertvolle fachliche und organisatorische Unterstützung. Ein besonderes Dankeschön möchte ich an Dr. Tao Huang richten, die mir als Zimmerkollegin oft motivierend zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Weiterhin danke ich meinen ehemaligen KollegInnen Dr. Lars Klöckl, Dr. Jasmin Prüfer, Dr. Nicole Prüfer und Patricia Wolter für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und das freundschaftliche Miteinander, das sich bis heute erhalten hat. Zudem danke ich Frau Joschika Bastine, die mich während ihrer Diplomarbeitszeit ebenfalls hilfreich unterstützt hat. Meiner Familie danke ich sehr sehr herzlich für all die mentale Unterstützung und Motivation, mit der sie mich immer wieder aufgebaut haben, um mir die Last nicht zu schwer werden zu lassen – DANKE!