

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung stabiler Analoga von Adenosintetraphosphat als
potenteste Aktivatoren des P2X₁-Rezeptors

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Antonjas Lucas Tozman

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet
2. Prof. Dr. med. H. Peters
3. Prof. Dr. med. B. Sanner

Datum der Promotion: 3. September 2010

Referent: Prof. Dr. Markus van der Giet

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:

Aktenzeichen: O0086/01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27. April 2001

In Liebe

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Definition und Pathogenese der Hypertonie.....	1
1.2 Nukleotide und Dinukleotide.....	3
1.3 Purinerge Rezeptoren	6
1.3.1 P1-Rezeptoren.....	6
1.3.2 P2-Rezeptoren.....	6
1.3.2.1 P2X-Rezeptoren.....	7
1.3.2.2 P2Y-Rezeptoren.....	9
1.4 Fragestellung.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Verwendete Tiere	13
2.1.2 Substanzen	13
2.1.3 Lösungen	14
2.1.4 Verbrauchsmaterial	15
2.1.5 Geräte und Software	15
2.1.5.1 Geräte	15
2.1.5.2 Software.....	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Small Vessel Myograph (SVM) = Kleingefäßmyograph	17
2.2.1.1 Allgemeine Aussagen über den Kleingefäßmyographen (KGM)	17
2.2.1.2 Allgemeine physiologische Gegebenheiten.....	17
2.2.1.3 Versuchsaufbau und -ablauf	18
2.2.1.4 Die Festlegung der normalisierten Lumendurchmesser.....	21
2.2.2 Perivaskulärer Blutfluss	23
2.2.2.1 Funktionsweise der Transonic® perivascular flowprobe-Sonde.....	23
2.2.2.2 Versuchsaufbau und -ablauf	24

2.2.3 Intraarterieller Blutdruck	25
2.2.3.1 Funktionsweise des ISOTEC™ Pressure Transducers	25
2.2.3.2 Versuchsaufbau und -ablauf	26
2.3 Reproduzierbarkeit und Statistik	27
3 ERGEBNISSE	28
3.1 In vitro-Messung am Kleingefäßmyographen	28
3.1.1 Dosisabhängige Vasokonstriktion an Gefäßringen aus der A. renalis durch Ap ₄ , α,β-metAp ₄ , α,β-metATP und ATP	28
3.1.2 Dosisabhängige Vasokonstriktion an Gefäßringen aus der A. renalis von WKY- Ratten durch Ap ₄ sowie die stabilen Analoga α,β-metAp ₄ , β,γ-metAp ₄ und γ,δ-metAp ₄	29
3.1.3 Inhibition der Vasokonstriktion von Ap ₄ und ATP sowie den stabilen Analoga durch Suramin und α,β-metATP	30
3.2 In vivo-Messungen mittels perivaskulärem Blutfluss	32
3.2.1 Dosisabhängige Reduktion des Blutflusses durch α,β-metATP und α,β-metAp ₄	32
3.3.1 Dosisabhängige Senkung des MADs durch Applikation von ATP	33
3.3.2 Dosisabhängiger Anstieg des MAD durch Gabe von α,β-metATP	34
3.3.3 Dosisabhängiger Anstieg des MADs durch Gabe von α,β-metAp ₄	35
3.3.4 Dosisabhängiger Anstieg des MADs durch Gabe von Ap ₄	36
3.3.5 Dosisabhängige Wirkung von α,β-metATP und ATP im Vergleich	37
3.3.6 Dosisabhängiger Effekt von PE und α,β-metATP im Vergleich	38
3.3.8 Dosisabhängige Wirkung von α,β-metAp ₄ sowie Ap ₄ im Vergleich	40
3.3.9 Dosisabhängiger Effekt von α,β-metAp ₄ , PE sowie α,β-metATP im Vergleich	41
4 DISKUSSION	42
5 ZUSAMMENFASSUNG	45
6 LITERATURVERZEICHNIS	46
7 DANKSAGUNG	55
8 CURRICULUM VITAE	56
9 ERKLÄRUNG	57

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Struktur des Ap_4	3
Abbildung 2 Struktur des α,β -met Ap_4	3
Abbildung 3 Struktur des β,γ -met Ap_4	3
Abbildung 4 Struktur des γ,δ -met Ap_4	3
Abbildung 5 Struktur der Dinukleosidpolyphosphate	5
Abbildung 6 Struktur des P2X-Rezeptors	7
Abbildung 7 Struktur des P2Y-Rezeptors	9
Abbildung 8 Versuchsanordnung des Multi Myograph Systems	19
Abbildung 9 Darstellung eines Normalisierungsvorganges	22
Abbildung 10 Seiten- und Frontansicht der Transonic [®] perivascular flowprobe-Sonde 1PR	24
Abbildung 11 ISOTECH [™] Pressure Transducer	26
Abbildung 12 Wirkung von Ap_4 , α,β -met Ap_4 , α,β -metATP und ATP auf die Wandspannung von Gefäßringen der A. renalis	28
Abbildung 13 Wirkung von Ap_4 , α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 und γ,δ -met Ap_4 auf die Wandspannung von Gefäßringen der A. renalis	29
Abbildung 14 Wirkung von Suramin und α,β -metATP auf die Vasokonstriktion von Ap_4 und ATP sowie den stabilen Analoga	30
Abbildung 15 Wirkung von α,β -metATP und α,β -met Ap_4 auf den Blutfluss der A. renalis	32
Abbildung 16 Wirkung von ATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	33
Abbildung 17 Wirkung von α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	34
Abbildung 18 Wirkung von α,β -met Ap_4 auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	35
Abbildung 19 Wirkung von Ap_4 auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	36
Abbildung 20 Effekt von α,β -metATP und ATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck ...	37
Abbildung 21 Wirkung von PE und α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck ..	38
Abbildung 22 Effekt von ATP und Ap_4 auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	39
Abbildung 23 Effekt von α,β -met Ap_4 sowie Ap_4 auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck...	40
Abbildung 24 Effekt von α,β -met Ap_4 , PE sowie α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck	41

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Klassifikation der Hypertonie	1
Tabelle 2 Charakteristika der P2X-Rezeptoren.....	9
Tabelle 3 Charakteristika der P2Y-Rezeptoren.....	11
Tabelle 4 Tyrode-Lösung	14
Tabelle 5 Depolarisierende KCl-Lösung.....	15

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erklärung
2-MeSATP	2-Methylthio-ATP
α,β -metAp ₄	α,β -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat
α,β -metATP	α,β -Methylene-ATP
β,γ -metAp ₄	β,γ -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat
β,γ -metATP	β,γ -Methylene-ATP
γ,δ -metAp ₄	γ,δ -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat
μ	Mikro
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ap ₄	Adenosin 5'-tetrphosphat
AR-C66096	2-propylthio-D- β,γ -difluoromethyleneATP
AR-C69931MX	N6-[2-methylthioethyl]-2-[3,3,3-trifluoropropylthio]-5'-Laktazidogen
ATP	Adenosintriphosphat
ATP- γ -S	Adenosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-3'5'-monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
dBz-ATP	2',3'-O-Di(benzoyl)-ATP
D _{max}	maximale Vasodilatation
DWK	Dosis-Wirkungskurve
EC ₅₀	halbmaximal stimulatorische Konzentration
EDCF	englisch: endothelium-derived contracting factor, deutsch: Endothel-abgeleiteter gefäßkontahierender Faktor
EDRF	englisch: endothelium-derived relaxing factor, deutsch: Endothel-abgeleiteter gefäßverengender Faktor
G _{i/s} -Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein; i - inhibierend, s - stimulierend
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H ₀	Nullhypothese

H ₁	Alternativhypothese
IABP	englisch: intraarterial blood pressure, deutsch: intraarterieller Blutdruck
IC ₅₀	halbmaximal inhibitorische Konzentration
isoPPADS	Stereoisomer des Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonat
KGM	Kleingefäßmyograph
L-NAME	L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin
m	Milli
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
MRS2179	2'-Deoxy-N6-methyladenosine-3',5'-bisphosphate
MRS2279	(N)-Methanocarpa-N6-methyl-2-chloro-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat
n	Nano
n	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NO	englisch: Nitric oxide, deutsch: Stickstoffmonoxid
p	Pico
P-5-P	Pyridoxal-5'-phosphat
PLC	Phospholipase C
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonat
PVBF	Perivaskulärer Blutfluss
IL	Interleukin
R	Rangzahlen
SD	englisch: standard deviation, deutsch: Standardabweichung
SEM	englisch: Standard error of mean, deutsch: Standardabweichung der Mittelwerte
SVM	englisch: small vessel myograph, deutsch: Kleingefäßmyograph
U	Prüfungsgrößen
UDP	Uridin 5'-diphosphat
UTP	Uridin 5'-triphosphat
V _{max}	maximale Vasokonstriktion

1 EINLEITUNG

1.1 Definition und Pathogenese der Hypertonie

Die Hypertonie ist definiert als eine pathologische Erhöhung des arteriellen Blutdruckes mit einem konsekutiv erhöhten kardiovaskulären Risiko. Dieses steigt dabei mit Höhe des systolischen und diastolischen Druckes sowie mit der Blutdruckamplitude.

Die Hypertonie wird nach den Hypertonie-Leitlinien 2007 der Deutschen Hochdruckliga, wie in Tabelle 1 dargestellt, eingeteilt. Die Zuordnung erfolgt durch wiederholte Messungen an verschiedenen Tageszeiten.

Tabelle 1 Klassifikation der Hypertonie

Klassifikation	Blutdruck (mmHg)	
	systolisch	diastolisch
Optimal	< 120	< 80
Normal	120 - 129	80 - 84
Hochnormal	130 - 139	85 - 89
Hypertonie Stufe 1 Leicht	140 - 159	90 - 99
Hypertonie Stufe 2 Mittelschwer	160 - 179	100 - 109
Hypertonie Stufe 3 Schwer	≥ 180	≥ 110
isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	< 90

Ätiologisch lässt sich die Hypertonie in eine primäre und eine sekundäre Hypertonie unterteilen. Die Ursache der primären Hypertonie ist bisher nicht bekannt, es wird jedoch eine polygene und multifaktorielle Genese vermutet. Zu den Risikofaktoren zählen unter anderem die Adipositas [1], übermäßiger Kochsalz- [2], Alkohol- [3] und / oder Kaffeekonsum. Chronischer Stress bzw. Lärmbelästigung [4] sowie die Einnahme von oralen Kontrazeptiva können die Entstehung einer primären Hypertonie begünstigen. Die primäre Hypertonie ist mit ca. 95% die häufigste Form der Hypertonie [5], [6], [7].

Zu den häufigsten Ursachen der sekundären Hypertonie zählen die renale und die endokrine Hypertonie. Renoparenchymatöse Erkrankungen wie zum Beispiel die Glomerulonephritis, eine chronische Pyelonephritis, Zystennieren und / oder Nierenarterienstenosen können eine renale Hypertonie verursachen. Bei der endokrinen Art liegt meist ein primärer Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) vor; das Cushing-Syndrom, das androgenitale Syndrom oder die Akromegalie können ebenso ursächlich sein. Darüber hinaus kann eine sekundäre Hypertonie auch kardiovaskulär, beispielsweise bei einer Aortenisthmusstenose, oder aber auch temporär, zum Beispiel durch Schwangerschaft, Pharmaka, Erkrankungen des ZNS oder Alkohol, erfolgen.

Das Endothel spielt, neben seiner mechanischen Barrierefunktion, ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Vasoregulation und beeinflusst damit den Blutdruck. Mit der Entdeckung des Prostacyclin [8] und des Stickstoffmonoxid (englisch nitric oxide, NO), wurden zwei vasodilatatorisch wirksame Substanzen gefunden, die von Endothelzellen produziert werden. Letzterer ist auch bekannt als Endothel-abgeleiteter gefäßentspannender Faktor (EDRF = endothelium-derived relaxing factor) [9]. Bereits einige Jahre später wurde bei der Untersuchung des EDRF die Existenz eines Gegenspielers, des Endothel-abgeleiteten gefäßkontrahierenden Faktors (EDCF = endothelium-derived contracting factor) vermutet. Eine langanhaltende Vasokonstriktion wurde durch Zugabe von Kulturüberstand, der aus Endothelzellen von Rinderaorten gewonnen wurde, auf isolierte Schweinekoronarien zufällig beobachtet, obwohl der labile EDRF bereits abgebaut war. Da dieser Effekt proteasensitiv war, wurde angenommen, dass ein Peptid dafür verantwortlich sei [10]. Dieses konnte aus Schweineaortenendothelzellen isoliert und identifiziert werden [11] und wurde aufgrund seines Ursprungsortes Endothelin genannt. Es sind inzwischen drei weitere Endotheline bekannt, welche der Reihenfolge ihrer Entdeckung entsprechend als Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3 bezeichnet werden. Mittlerweile wurden auch nichtpeptidische EDCF entdeckt. So konnten beispielsweise Jankowski und Tölle 2005 das Dinukleotid Uridin-Adenosintetraphosphat, kurz Up_4A , als potenten EDCF identifizieren [12]. Das Nukleotid Ap_4 und seine Analoga werden ebenfalls zu den nichtpeptidischen EDCF gezählt. Überwiegt die Produktion von EDCF kann eine Hypertonie begünstigt werden. Die Balance zwischen der Synthese von EDRF und EDCF wird bei Gefäßen im Alter oder durch chronischen hypertensiven Stress gestört, wobei die Produktion der EDCF überwiegt [13], [14], [15].

Eine häufige Komplikation einer Hypertonie ist die Arteriosklerose. Zudem kann eine koronare Herzerkrankung, die sich als Angina pectoris, Herzinfarkt, Linksherzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen oder plötzlichem Herztod manifestiert, auftreten. Darüber hinaus vermag die Hy-

pertonie eine hypertensive Nephropathie mit Albuminurie, Nephrosklerose und schließlich Niereninsuffizienz hervorzurufen.

1.2 Nukleotide und Dinukleotide

Nukleotide bestehen aus einem Nukleosid, welches sich aus einer Nukleobase und einer Pentose zusammensetzt, sowie einer oder mehrerer Phosphatgruppen, verknüpft an der 5'-Hydroxylgruppe der Pentose. Sie erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. So dienen sie beispielsweise als Grundbausteine von DNA und RNA, aber auch als Energielieferanten (Adenosin-5'-triphosphat = ATP), sind Bestandteile von Enzymen (CoEnzym A) und kommen als Signalmoleküle (cyclisches Adenosin-3'5'-monophosphat = cAMP) vor.

Die allgemeine Formel der Nukleotide lautet Np_x , wobei das N für das Nukleosid, x für die Anzahl der Phosphatgruppen steht.

Eine neu entdeckte Gruppe der Nukleotide ist das Adenosin 5'-tetraphosphat (Ap_4) sowie die stabilen Analoga α,β -Methylene-Adenosin 5'-tetraphosphat (α,β -met Ap_4), β,γ -Methylene-Adenosin 5'-tetraphosphat (β,γ -met Ap_4) und γ,δ -Methylene-Adenosin 5'-tetraphosphat (γ,δ -met Ap_4). Die Strukturformeln sind aus den Abbildungen 1 - 4 ersichtlich [16].

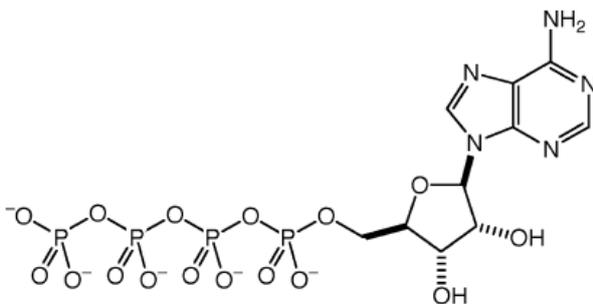


Abbildung 1 Struktur des Ap_4

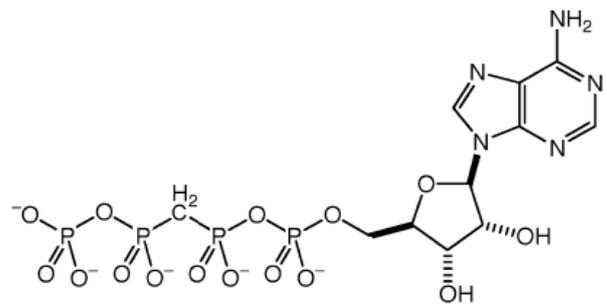


Abbildung 3 Struktur des β,γ -met Ap_4

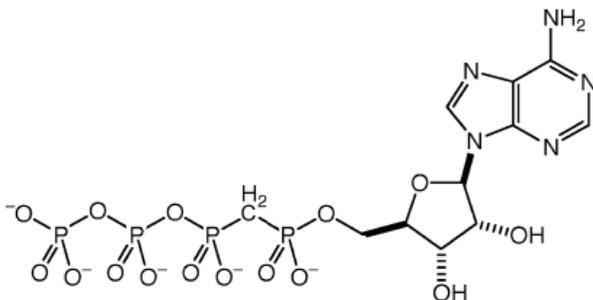


Abbildung 2 Struktur des α,β -met Ap_4

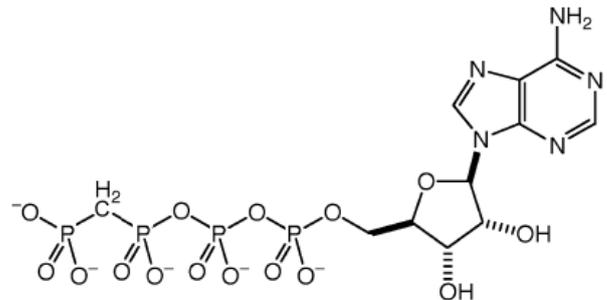


Abbildung 4 Struktur des γ,δ -met Ap_4

Ap₄ wurde erstmals in Muskelzellen von Säugetieren entdeckt [17]. Inzwischen wurde es auch in anderen Geweben, unter anderem in Thrombozyten und in der Rattenleber, in Hefesporen [18], [19], [20] und im humanen Myocardgewebe [21] gefunden.

Drei Wege, die intrazelluläre Konzentration des Ap₄ zu steigern, sind bekannt. Zum einen sind Enzyme beteiligt, die den Transfer des Phosphatrestes eines Phosphatdonors zu ATP katalysieren, zum Beispiel die muskuläre Adenylatkinase [22]. Zum anderen bewirken Enzyme, die in der Lage sind, Adenylat- oder Nucleotidreste auf Triphosphate zu übertragen, eine Konzentrationssteigerung von Ap₄. Der Adenylatrest stammt dabei entweder von einem gemischten Acyl-Adenylat-Anhydrid, das bei einigen Ligasen und auch bei der Luciferase der Leuchtkäfer [23], [24], [25], [26], [27] vorkommt oder von einem Enzym-Adenylat Komplex, wie er bei der DNA- und RNA-Ligase vorliegt [28], [29]. Die dritte Möglichkeit der Konzentrationssteigerung wird durch Enzyme ermöglicht, die Diadenosinpolyphosphate, beispielsweise Ap₅A oder Ap₆A, degradieren können, wobei unter anderem auch Ap₄ entsteht [30].

Ap₄ wird in neurochromaffinen Zellen gespeichert [31]. Bei Freisetzung kann es sowohl die metabotropen P2Y- als auch die ionotropen P2X-Rezeptoren aktivieren. Dabei bewirkt Ap₄ über den P2Y-Rezeptor eine Blutdrucksenkung, während es über den P2X-Rezeptor bei Stressreaktionen eine Vasokonstriktion hervorruft [32], [33]. Außerdem inhibiert es kompetitiv die asymmetrische Ap₄A - Hydrolase [19], [34], [35].

Die hochspezifische Mononucleosidtetraphosphatase EC 3.6.1.14 aus den Samen der gelben Lupine (*Lupinus luteus*) [36] und aus der menschlichen Plazenta sowie die Exopolyphosphatase EC 3.6.1.11 aus dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* sind in der Lage, Ap₄ in ATP und Phosphate zu hydrolysieren [37]. Diese Enzyme wurden auch bei den stabilen Analoga des Ap₄ getestet. Dabei wurde festgestellt, dass nur α,β -metAp₄ gespalten wird [16].

Die Analoga von Ap₄ sind in der Lage, die asymmetrische Dinucleosidtetraphosphatase EC 3.6.1.17 aus dem Menschen und der schmal-blättrigen Lupine zu inhibieren. Dabei stellte sich heraus, dass β,γ -metAp₄ und γ,δ -metAp₄ die stärkste Inhibition der asymmetrischen Dinucleosidtetraphosphatase hervorrufen [16].

Dinukleotide sind aus zwei Nucleosidresten zusammengesetzt, die durch Phosphatketten unterschiedlicher Länge verbunden sind. Die Phosphatketten sind dabei über eine Phosphorsäureester-

bindung an den 5'-Sauerstoff der Riboseeinheit miteinander verbunden. Die Länge der Kette variiert von zwei bis zu acht Phosphatgruppen. Die allgemeine Struktur der Dinukleosidpolyphosphate wird in der Abb. 5 dargestellt [38], [39].

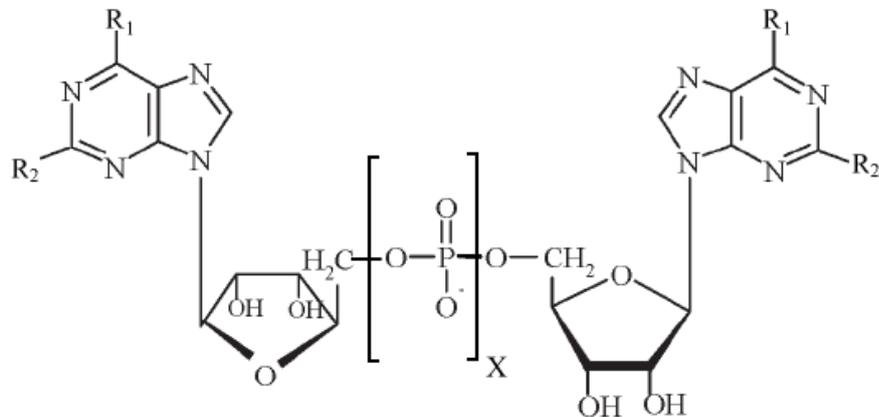


Abbildung 5 Struktur der Dinukleosidpolyphosphate

Guanosin	R ₁ : O	R ₂ : NH ₂
Adenosin	R ₁ : NH ₂	R ₂ : kein Rest
Inosin	R ₁ : O	R ₂ : kein Rest
X	Anzahl der Phosphatgruppen	

Natürliche Dinukleotide wurden erstmals 1963 in eingekapselten, dehydrierten Embryonen der Salzwasserkrabbe *Artemia* gefunden [40]. Seither wurden sie in einer Vielzahl von Geweben entdeckt, unter anderem in Baby Hamster Kidney (BHK)-Zellen, im humanen Hepatotom [41], in der humanen Milz, in Hirn, Herz, Testes, Niere sowie Leber der Ratte [42], humanen Thrombozyten [43] und in humanen Erythrozyten [44], wobei diese Auflistung nur einen kleinen Einblick bieten soll.

Die Wirkungen der Dinukleotide sind vielfältig, ebenso die Zielstrukturen. In dieser Dissertation werden deshalb nur einige Wirkungen der Diadenosinpolyphosphate aufgelistet. Zu nennen ist unter anderem die Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation durch Ap₅₋₇A [43], die Senkung des Blutdrucks bei Kaninchen mittels Ap₃A / Ap₄A [45], die Verzögerung der Apoptose in humanen Neutrophilen mit Ap₃₋₆A [46], [47] und die gesteigerte Glukoneogenese im proximalen Tubulus der Ratte durch Ap₃A / Ap₄A [48]. Sie wirken dabei sowohl über die G-Protein-gekoppelten P1- und P2Y-Rezeptoren, als auch über die Liganden-gesteuerten Ionenkanäle P2X-Rezeptoren.

Der Abbau von Dinukleotiden erfolgt über Ektonukleotidasen, vor allem über die Familie E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase), welche in der Lage ist, die Pyrophosphatbindung zu spalten. Es handelt sich dabei um eine asymmetrische Degradation [49], [50], das

heißt es entsteht ein Nukleosidmonosphosphat sowie ein Nukleosidpolyphosphat mit einer um eine Phosphatgruppe kürzeren Polyphosphatkette. Die allgemeine Formel lautet:



N steht dabei für das Nukleosid, x für die Anzahl der Phosphatgruppen.

1.3 Purinerge Rezeptoren

Die purinergen Rezeptoren bilden eine heterogene Gruppe, die jedoch alle über Purinverbindungen aktiviert werden. Sie wurden 1978 erstmalig von Burnstock in die Hauptklassen P1- und P2-Rezeptoren eingeteilt.

1.3.1 P1-Rezeptoren

P1-Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an und werden durch Adenosin und dessen Analoga aktiviert. Sie werden in die Klassen A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 eingeteilt [51], [52]. Die A_1 - und A_3 -Rezeptoren rufen über die G_i - und G_o -Proteine eine Hemmung der Adenylylzyklase hervor, während die A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren mittels der G_s -Proteine eine Stimulierung der Adenylylzyklase verursachen. Es wird außerdem vermutet, dass A_{2B} -Rezeptoren über die Aktivierung von G_q -Proteine die Phospholipase C aktiviert [53].

Eine Aktivierung der A_1 -Rezeptoren führt zu einer Hemmung der AV-Reizleitung, zu einer Bronchokonstriktion, sowie einer Vasokonstriktion in der Niere und einer präsynaptischen Hemmung im ZNS. Eine Vasodilatation, eine Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie eine Stimulation der nozizeptiven afferenten Neuronen, speziell des Herzens wird durch Stimulation der A_2 -Rezeptoren hervorgerufen. Über eine Aktivierung des A_3 -Subtypes kommt es zur Degranulierung der Mastzellen und damit unter anderem zur Bronchokonstriktion.

1.3.2 P2-Rezeptoren

Aufgrund der unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften wurden die P2-Rezeptoren 1985 durch Burnstock und Kennedy in die Subtypen P2X- und P2Y-Rezeptoren unterteilt [54]. Die P2X-Rezeptoren konnten als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle und die P2Y-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren klassifiziert werden [55], [56]. Gordon entdeckte 1986 auf Thrombozyten einen weiteren Subtypen, den er als P2T bezeichnete [57]. Die Rezeptoren, die in Mastzellen [58] und in Makrophagen [59] durch ATP^{4-} aktiviert werden, wurden als P2Z

klassifiziert. Die P2D- und P2U-Rezeptoren wurden nach ihren Hauptagonisten Diadenosinpolyphosphat bzw. Uridin 5'-triphosphat (UTP) benannt [60], [61], wobei es sich bei letzterem genau genommen um einen Pyrimidin- und nicht um einen Purinrezeptor handelt. Der P2U-Rezeptor wurde inzwischen als P2Y₂-Rezeptor klassifiziert [62].

1.3.2.1 P2X-Rezeptoren

P2X-Rezeptoren gehören zu den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen, welche aus zwei transmembranen Domänen sowie einer großen extrazellulären Schleife zusammengesetzt sind, das N- und C-terminale Ende befindet sich dabei intrazellulär. Die ATP-Bindestelle [63], [64] sowie die Bindungsstellen für Antagonisten und Modulatoren [65] sind auf der extrazellulären Schleife lokalisiert. Die Abbildung 6 gibt die Struktur des P2X-Rezeptors wieder [66].

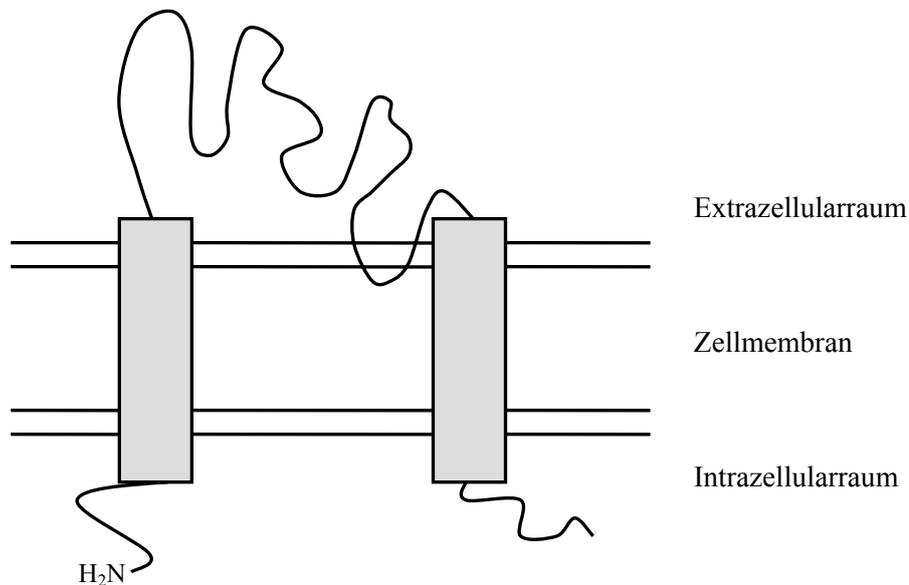


Abbildung 6 Struktur des P2X-Rezeptors

Legende:  transmembrane Domäne

Bisher sind sieben Subtypen der P2X-Rezeptoren bekannt (P2X₁ - P2X₇), ein weiterer Subtyp (P2X₈) wird allerdings vermutet [67], [68]. Zwischen ihnen ist die Aminosäuresequenz zu 26 – 47 % identisch. Die Aminosäureanzahl variiert von 379 bis 595, wobei P2X₆ der Rezeptor mit der kürzesten, P2X₇ der mit der längsten Aminosäurekette ist.

Die Subtypen wirken, mit Ausnahme des P2X₆, als Homomere, bilden aber häufig auch Ionenkanäle aus heteromeren Einheiten. So hat man zum Beispiel bei Neuronen der Spinalganglien

der Ratte [69] einen P2X-Rezeptor entdeckt, der sich aus P2X₂- und P2X₃-Untereinheiten zusammensetzt.

Die P2X-Rezeptoren sind kationenselektive Kanäle, wobei alle Subtypen fast die gleiche Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen besitzen. Die Permeabilität für Calciumionen variiert jedoch stark [70]. Im Gegensatz zu anderen Kationenkanälen nimmt bei den P2X-Rezeptoren die Selektivität für Kationen zeitlich ab [71].

Die P2X-Rezeptoren werden durch ATP und seine Analoga in folgender Reihenfolge stimuliert: α,β -Methylene-ATP (α,β -metATP) > β,γ -Methylene-ATP (β,γ -metATP) > ATP = 2-Methylthio-ATP (2-MeSATP) = ADP [72]. α,β -metATP wird im Gegensatz zu ATP weniger schnell durch extrazelluläre Ekto-ATPasen enzymatisch abgebaut [73] und kann daher zur Identifizierung von P2X-Rezeptoren sowohl in vielzelligen Präparaten als auch in Ganztierexperimenten verwendet werden [73], [74]. Diadenosinpolyphosphate aktivieren ebenso die Rezeptoren. Dabei scheint die unterschiedliche Länge der Phosphatkette eine Rolle für die Affinität zu den P2X- und P2Y-Rezeptoren zu spielen [75]. An P2X₁₋₄ Rezeptoren zeigen beispielsweise Ap₂A und Ap₃A kaum oder gar keine agonistische Wirkung, Ap₄₋₆A sind jedoch, außer am P2X₃-Subtyp, potente Agonisten [76], [77].

Zu den spezifischen Antagonisten der P2X-Rezeptoren zählen Pyridoxalphosphat-6-Azophenyl-2',4'-Disulfonat (PPADS) und sein Stereoisomer isoPPADS [73]. Die Subtypen P2X₁, P2X₃ sowie das Heteromer P2X_{2/3} werden durch Trinitrophenyl-substituiertes ATP spezifisch antagonisiert [78]. α,β -metATP blockiert ebenfalls den P2X₁- und, je nach Dosis, auch den P2X₃-Rezeptor. Die Synthesevorstufe von PPADS, Pyridoxal-5'-phosphat (P-5-P) [79], [80] und Suramin [81] zeigen sowohl auf P2X-, als auch auf P2Y-Rezeptoren eine unspezifische antagonistische Wirkung.

P2X-Rezeptoren kommen in vielen Zelltypen vor. Der P2X₁-Subtyp wurde in glatten Muskelzellen der Gefäße entdeckt. Dort löst er durch ATP, welches von sympathischen Neuronen ausgeschüttet wird, eine Gefäßkonstriktion aus [82]. Außerdem wurde dieser Subtyp noch im unreifen Rattenhirn [83], im Cerebellum [84] und in Thrombozyten [85] gefunden. P2X₃ kommt entweder als homomerer oder als heteromerer Rezeptor (P2X_{2/3}) in afferenten nozizeptiven Neuronen vor und ist vermutlich bei der Verursachung von Schmerz mittels ATP durch Gewebeschädigung beteiligt [86]. Tabelle 2 fasst die Eigenschaften der einzelnen P2X-Subtypen zusammen.

Tabelle 2 Charakteristika der P2X-Rezeptoren [67], [68], [87]

Name	selektive Agonisten	Blockade durch PPADS	Desensitivierung	Vorkommen
P2X ₁	α,β-metATP	Ja	Ja	Gefäßmuskulatur
P2X ₂	ATP-γ-S	Ja	Nein	Nervensystem
P2X ₃	2-MeSATP	Ja	Ja	Afferente nozizeptive Neurone
P2X ₄	ATP-γ-S	Nein (Ratte) Ja (Mensch)	Nein	ZNS
P2X ₅	-	Ja	Nein	Gehirn, Herz, Adrenalindrüse, Thymus, Lymphozyten
P2X ₆	-	Nein	Nein	ZNS, besonders in zerebellären Purkinje Zellen und in der Ependyma
P2X ₇	dBz-ATP	Nicht getestet	Nein	Gehirn und Makrophagen der Ratte
P2X ₈	2-MeSATP	Ja	Ja	Skelettmuskulatur von Hühnerembryonen

Abkürzungen: ATP-γ-S: Adenosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat, dBz-ATP: 2',3'-O-Di(benzoyl)-ATP

1.3.2.2 P2Y-Rezeptoren

P2Y-Rezeptoren zählen zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die aus einem Protein mit 7-Helix-Motif bestehen, bei dem das C-terminale Ende der Aminosäurenkette intrazellulär und das N-terminale Ende extrazellulär liegt [88], [89], [90]. Abbildung 7 zeigt die allgemeine Struktur des P2Y-Rezeptors.

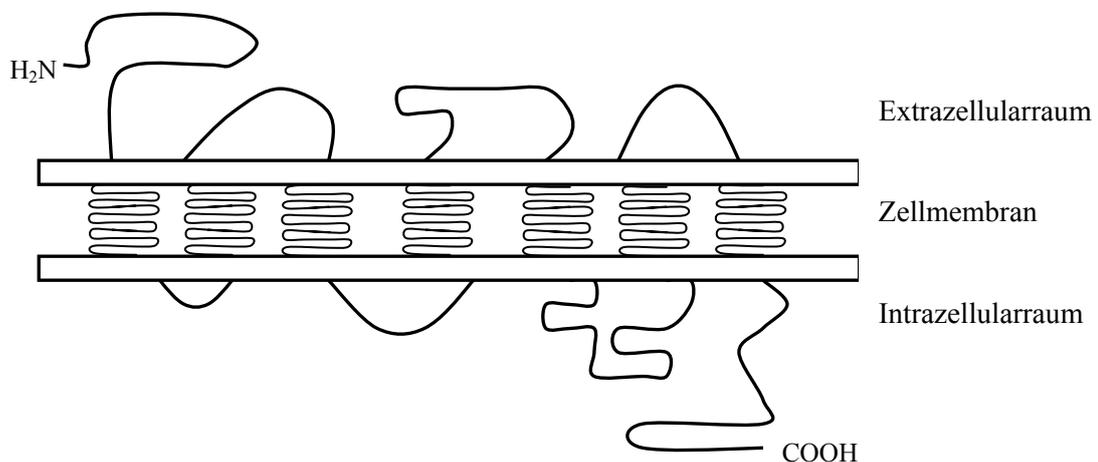


Abbildung 7 Struktur des P2Y-Rezeptors

Legende:  intramembrane Domäne

Nach der aktuellen Nomenklatur werden bei P2Y-Rezeptoren, die funktionell sind und von Säugetieren geklont wurden, Großbuchstaben verwendet. Kleinbuchstaben werden bei Rezeptoren verwendet, die entweder von Säugetieren stammen, bei denen jedoch noch kein Ligand gefunden

wurde, oder aber bei funktionellen Rezeptoren von Nicht-Säugetieren, die nicht ortholog zu Säugetier-Rezeptoren sind. Der Index gibt die chronologische Reihenfolge der Klonierung wieder.

Inzwischen sind acht menschliche P2Y-Rezeptoren bekannt: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄ [91]. Die fehlenden Zahlen stehen für Rezeptoren, die entweder ortholog sind und von Nicht-Säugetieren stammen, oder von Rezeptoren, die zwar homologe Sequenzen zu P2Y-Rezeptoren besitzen, aber nicht auf Nukleotide ansprechen. Der p2y3-Rezeptor beispielsweise wurde aus Hühnergehirnzellen geklont und ist wahrscheinlich ortholog zum humanen P2Y₆-Rezeptor [92].

Zu den physiologischen Agonisten zählen die Nukleotide ATP, ADP, UDP und UTP. Auch Dinukleotide sind in der Lage einige Subtypen der P2Y-Rezeptor-Familie zu aktivieren. Fast alle P2Y-Rezeptoren können durch Suramin und reactive blue 2 blockiert werden. Näheres ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3 Charakteristika der P2Y-Rezeptoren [62]

	Agonisten	Antagonisten	Vorkommen	Funktion
P2Y₁	ADP	MRS2179, MRS2279, reactive blue 2, Suramin	Gehirn, Placenta, Prostata, Herz, Skelettmuskulatur, Thrombozyten, Nervengewebe	Relaxation der glatten Muskulatur, ADP-induzierte intrazelluläre Ca ²⁺ -Mobilisation, Thrombozytenaggregation
P2Y₂	ATP = UTP	Suramin	Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Milz, Lymphocyten, Makrophagen	Cl ⁻ -Sekretion aus Epithelialzellen, Surfactantsekretion, NO-Ausschüttung
P2Y₄	UTP	PPADS, ATP (Mensch) Reactive blue 2 (Ratte)	Darm, Hypophyse, Gehirn	Vasodilatation durch NO Ausschüttung, mitogene Wirkung auf glatte Gefäßmuskulatur, Regulation des Chlorid-Transportes im Jejunum
P2Y₆	UDP	Reactive blue 2 > PPADS > Suramin	Placenta, Thymus, Darm, glatte Gefäßmuskulatur, Lunge	Regulation der Chemokinproduktion und Freilassung in Monocyten, NaCl-Sekretion in Epithelzellen des Kolons
P2Y₁₁	ATP	Hydrolyse durch anorganische Phosphate: Suramin, reactive blue 2 cAMP-Messungen: Suramin	Gehirn, Milz, Lymphocyten, Darm	Beteiligung an Reifung und Migration von dendritischen Zellen sowie Differenzierung von Granulozyten
P2Y₁₂	ADP	Reactive blue 2, Suramin, AR-C66096, AR-C69931MX, Ticlopidine, Clopidogrel	Gliazellen, Rückenmark, Thrombozyten	Beteiligung bei Fibrinogenrezeptor-Aktivierung, Thrombusformierung, Rekrutierung von Thrombozyten und Verstärkung der Thrombozytenaktivierung durch andere Agonisten
P2Y₁₃	ADP	AR-C69931MX > PPADS > Suramin	Milz, Gehirn, Leber, Pankreas, Knochenmark, Herz, periphere Leukozyten	unbekannt, vermutlich Beteiligung am Immunsystem
P2Y₁₄	UDP-Glucose	keine getestet	Plazenta, Fettgewebe, Magen, Darm, Gehirn, Milz, Lunge Herz	Beteiligung als Chemorezeptor in hämopoetischen Knochenmarksstammzellen, neuroimmune Funktion

Abkürzungen: MRS2179: 2'-Deoxy-N6-methyladenosine-3',5'-bisphosphate, MRS2279: (N)-Methanocarba-N6-methyl-2-chloro-2'-deoxyadenosin-3',5'-bisphosphat, AR-C66096: 2-propylthio-D-β,γ-difluoromethyleneATP, AR-C69931MX: N6-[2-methylthioethyl]-2-[3,3,3-trifluoropropylthio]-5'-Laktazidogen

Die Stimulierung der P2Y₁-, P2Y₂-, P2Y₄- sowie P2Y₆-Rezeptoren mittels G_q-Proteine führt über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Erhöhung der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Konzentration. Dies bedingt eine Mobilisierung von Calcium aus den intrazellulären Speichern [93], [94]. Die Konzentration des cAMP wird durch P2Y₁₁-Rezeptoren über PLC und Adenylylcyclase erhöht [95]. Außerdem kommt es durch Aktivierung einiger P2Y-Rezeptoren zum Verschluss von M-Strom K⁺- und / oder N-Typ Ca²⁺-Kanälen sowie zur Stimulierung der einwärts gerichteten K⁺-Kanäle [96], [97], [98], [99], [100], [101], [102], [103].

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, welche Rolle das Nukleotid Ap₄ beziehungsweise seine Analoga auf den peripheren Blutfluss, den Blutdruck und die Herzfrequenz ausüben, verglichen mit der Wirkung von den bisher bekannten P2X-Rezeptor-Agonisten, insbesondere des α,β -metATP. Des Weiteren soll dargestellt werden, über welchen Rezeptor sie wirken und mit welchen Substanzen ihre Wirkung gehemmt werden kann.

Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus und den Rezeptor könnten einen möglichen Ansatz zur Therapie der Hypertonie bieten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Tiere

Für die Versuche wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) beiderlei Geschlechts verwendet. Diese Tiere sind zum Zeitpunkt der Präparation zwischen 110 - 130 Tage alt und haben ein Gewicht von zirka 250 - 300g. Sie werden im Campus Benjamin Franklin bei Standard-Pellet-Futter und Wasser bei Zimmertemperatur (22 °C) in Kolonien gehalten. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt dabei durchschnittlich 60%. Die Einstreu der Käfige (Firma Altromin) besteht aus entstaubten und entkeimten Weichholzfasern. Die Tiere werden in einem fensterlosen Tierstall mittels einer Dauerbeleuchtung in einem Tagesrhythmus von 12 Stunden gehalten und werden frühestens am sechsten Tag nach Anlieferung für Tierversuche genutzt.

2.1.2 Substanzen

α,β -Methylene-ATP	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jacek Jemielity, Universität Warschau, Polen
α,β -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jacek Jemielity, Universität Warschau, Polen
β,γ -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jacek Jemielity, Universität Warschau, Polen
γ,δ -Methylene-Adenosin 5'-tetrphosphat	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jacek Jemielity, Universität Warschau, Polen
Acetylcholin	Merck; Darmstadt
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich; St. Louis
Adenosin 5'-tetrphosphat	Sigma-Aldrich; St. Louis
Angiotensin II	Sigma-Aldrich; St. Louis
Bidestilliertes Wasser	Fluka; Buchs
Carbogen	Sigma-Aldrich; St. Louis
Dinatriumethyldiaminetetraessigsäure	Merck; Darmstadt
Essigsäure	Merck; Darmstadt

Ethanol	Merck; Darmstadt
Ethylcarbamate	Sigma-Aldrich; St. Louis
Glucose	Merck; Darmstadt
Heparin	Sigma-Aldrich; St. Louis
Kaliumchlorid	Merck; Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich; St. Louis
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich; St. Louis
N ω -Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME)	Sigma-Aldrich; St. Louis
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich; St. Louis
Natriumchlorid	Merck; Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck; Darmstadt
Natriumnitroprussid	Sigma-Aldrich; St. Louis
Norepinephrin	Sigma-Aldrich; St. Louis
Phenylephrin	Sigma-Aldrich; St. Louis
Suramin	Sigma-Aldrich; St. Louis

2.1.3 Lösungen

Falls nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden alle Pufferlösungen auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Tabelle 4 Tyrode-Lösung

Stoff	Molekülmasse	1 L (g)	2 L (g)
NaCl	58,44	6,95	13,91
Mg-Sulfat	120,37	0,30	0,59
NaHCO ₃	84,01	2,10	4,20
KCl	24,56	0,35	0,70
Glucose	180,2	1,98	3,96
EDTA	372,24	0,01	0,02
KH ₂ PO ₄	136,1	0,16	0,33
Ca-Chlorid	147,02	0,24	0,47

Tabelle 5 Depolarisierende KCl-Lösung

Stoff	Molekülmasse	1 L (g)	2 L (g)
KCl	24,56	9,69	19,38
Mg-Sulfat	120,37	0,30	0,59
NaHCO ₃	84,01	2,10	4,20
Glucose	180,2	1,98	3,96
EDTA	372,24	0,01	0,02
KH ₂ PO ₄	136,1	0,16	0,33
Ca-Chlorid	147,02	0,24	0,47

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Einwegskalpelle	Rüttgers; Solingen
Fadenmaterial	Firma Johnson & Johnson; Norderstedt
Glasbehälter (Kolben etc.)	Brand; Wertheim
Magnetrührer	IKA-Werk; Staufen Breisgau
Pipettenspitzen	Süd Laborbedarf; Gauting
Präparationsbesteck	FST; Foster City
Reaktionsgefäße 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf; Hamburg
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun; Melsungen

2.1.5 Geräte und Software

2.1.5.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius; Göttingen
Computer	Fujitsu Siemens; Sunnyvale
ISOTEC pressure transducers	Harvard Apparatus; Holliston
Gefrierschränke - 80 °C	Heraeus, Forma; Osterode; Marietta
Gefrierschränke - 20 °C	Bosch, Liebherr; Stuttgart, Biberach
Heiztischregulator	Heating Controller Typ 861
Multi Myograph System - 610M	Danish Myotechnology; Aarhus
Kühlschränke	Bosch, Liebherr; Stuttgart, Biberach
Mikroskope	Zeiss, Nikon; Tokio

Monitor	LG; Seoul
Myo-Interface	Danish Myotechnology; Aarhus
OP-Table size 5H	HUGO Sachs Elektronik-Havard, March
pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes; Bedford
Rotator	Rettenberg; Göttingen
Transonic® perivascular flowprobe-Sonde	Transonic Systems Inc., Ithaca, NY
Wasserbäder	Haake, Julabo; Karlsruhe, Seelbach
Welch Vacuum pump	Rietschle Thomas Schopfheim GmbH; Schopfheim
Verstärker	HUGO Sachs Elektronik-Havard, March

2.1.5.2 Software

HSE-BDAS	Harvard Apparatus; Holliston
EndNote X2	Thomson Corporation; Stamford (Connecticut)
MS Office 2003 Professional	Microsoft Corporation; Redmond
Myodaq 2.2	Danish Myotechnology; Aarhus
Myodata 2.2	Danish Myotechnology; Aarhus
PRISM 5.0	GraphPad Software; San Diego

2.2 Methoden

2.2.1 Small Vessel Myograph (SVM) = Kleingefäßmyograph

2.2.1.1 Allgemeine Aussagen über den Kleingefäßmyographen (KGM)

Der KGM wurde 1976 erstmalig von Mulvany und Halpern [104] beschrieben. Durch dieses Gerät können die morphologischen, pharmakologischen sowie die mechanischen Eigenschaften von kleinen Gefäßen, wie die Mesenterialgefäße der Ratte oder die Aorta der Maus, aber auch von größeren Gefäßen, beispielsweise die thorakale Aorta der Ratte, gemessen werden. Dazu werden Gefäßsegmente als Ringpräparaten in den Myographen eingespannt. Die Präparate können dabei sowohl aus elastischen, arteriellen Gefäßen, als auch aus kleinen Widerstandsgefäßen stammen und ein Lumen bis zu 100 µm besitzen. Eine beinahe atraumatische Präparation und Einspannung der Gefäße ist ein großer Vorteil dieser Methodik, wodurch unter festgesetzten isometrischen Bedingungen Messungen erfolgen können. Diese umfassen neben der klassischen Perfusionsmessung auch die pharmakologische Charakterisierung eines einzelnen Widerstandsgefäßes.

2.2.1.2 Allgemeine physiologische Gegebenheiten

Die proximalen Widerstandsgefäße haben einen Innenlumendurchmesser von größer als 100 µm und sind an dem Aufbau und der Erhaltung des peripheren Widerstands beteiligt. Sie sind vermutlich für die Anpassung der Durchblutung einzelner Organe auf den jeweiligen Bedarf zuständig. Diese These konnte mittels Gefäßinnendruckmessung an verschiedenen Gefäßbettsystemen gestellt werden. Die weiter distal gelegenen Gefäßabschnitte regulieren, abhängig von der Stoffwechsellage, den direkten Blutfluss zu den einzelnen Zellen eines Organs.

Mit Hilfe des Kleingefäßmyographen ist es möglich, Aussagen über die proximalen Widerstandsgefäße mit einem Innendurchmesser von 100µm - 2 mm treffen zu können. Die distalen Gefäßabschnitte sind dagegen mit dieser Methode nicht erfassbar. Es wurden mittels des KGM Unterschiede zwischen Gefäßen aus verschiedenen Gefäßgebieten desselben Tieres, aber auch bei Gefäßen, die aus den gleichen Gefäßgebieten, aber von verschiedenen Tierarten stammten, entdeckt. Beispielsweise wurde herausgefunden, dass die proximalen renalen, mesenterialen und femoralen Widerstandsgefäße auf Norepinephrin mit einer Kontraktion reagieren. Bei den proximalen zerebralen und koronaren Widerstandsgefäßen löst Norepinephrin jedoch eine Relaxa-

tion aus [105]. Daher sind die Aussagen des KGM nur unter Vorbehalt und nach weiteren physiologischen Untersuchungen auf Gefäße anderer Regionen oder auf andere Spezies anwendbar.

2.2.1.3 Versuchsaufbau und -ablauf

Das Multi Myograph System - 610M der Firma Danish Myo Technology A/S besteht aus vier Kleingefäßmyograph-Modulen. Jedes Modul ist aus einem Gehäuse aufgebaut, welches eine rostfreie Edelstahlkammer mit einem Kammervolumen von max. 8 ml enthält. Zudem sind eine Heizung und ein Kraftmesser in das Gehäuse eingebaut. An dem Multi Myograph System werden eine Begasungsanlage, eine Vakuumpumpe, ein Myo-Interface und ein Computersystem angeschlossen.

Die einzelne Kammer beinhaltet zwei Trägerbacken, zwischen denen die Gefäßpräparate eingespannt werden. Die eine Trägerbacke ist mit dem Kraftmesser, die andere mit einer Mikrometerschraube verbunden. Mit Hilfe dieser Schraube können die beiden Trägerbacken in μm -Schritten einander genähert bzw. voneinander entfernt werden. Die Kammern werden mit einer Abdeckung verschlossen, um eine Evaporation des Kammerinhaltes zu minimieren sowie den Sauerstoffpartialdruck konstant zu halten. Die Abdeckung weist mehrere Zugänge auf, über die Substanzen hinzugefügt oder entfernt werden können. Dadurch ist auch eine Begasung mit Carbogen (95 % Sauerstoff und 5 % CO_2) möglich, wodurch in der Kammer über den gesamten Verlauf des Versuches ein konstanter pH-Wert von 7,4 erzeugt wird. Dieser wird mehrfach während des Ablaufes mittels einer pH-Sonde überprüft. Das Vakuumsystem, bestehend aus einer Vakuumpumpe, die über ein Vakuumventil mit einem Auffanggefäß verbunden ist, entfernt die Testsubstanzen aus der Kammer. Ein Thermometer, welches über einen eigenen Zugang verfügt, misst kontinuierlich die Temperatur innerhalb der Kammer. Es ist in der Lage, die Temperatur mit einem Auflösungsvermögen von $0,1^\circ\text{C}$ zu messen und wird mit der Heizung des Myographen verschaltet, damit eine konstante Temperatur in der Kammer herrscht. Die Heizung, die Temperaturen von 0° bis 50°C erzeugen kann, wird während des Versuches auf 37°C gestellt. Die Lösungen, die in die Kammern eingebracht werden, werden über ein externes Wasserbad auf 37°C erwärmt, um relevante Temperaturveränderungen zu verhindern, die den Kraftmesser thermisch beeinflussen können. Dieser verfügt über einen Piezo-gesteuerten Widerstandssensor, der mit einem externen Myo-Interface in Verbindung steht. Der Kraftmesser hat einen Messbereich von 250mN und ein Auflösungsvermögen von $0,01\text{ mN}$. Deswegen können kleinste Kraftänderungen, ausgelöst durch Kontraktion der glatten Muskulatur der Gefäßmedia, gemessen werden. Das

Myo-Interface wird an ein Computersystem angeschlossen, um die gesammelten Messdaten digital speichern und auswerten zu können. Zur Datengewinnung wird das Messprogramm Myodag 2.2 der Firma DMT, Aarhus verwendet. Alle erhobenen Daten werden parallel auf verschiedene Kanäle übertragen und gemeinsam mit der Messzeit gespeichert. Nach der Messung werden die Daten mit dem Analyseprogramm Myodata 2.2 von DMT, Aarhus ausgewertet.

Die Abbildung 8 zeigt eine mögliche Versuchsanordnung des Multi Myograph System.

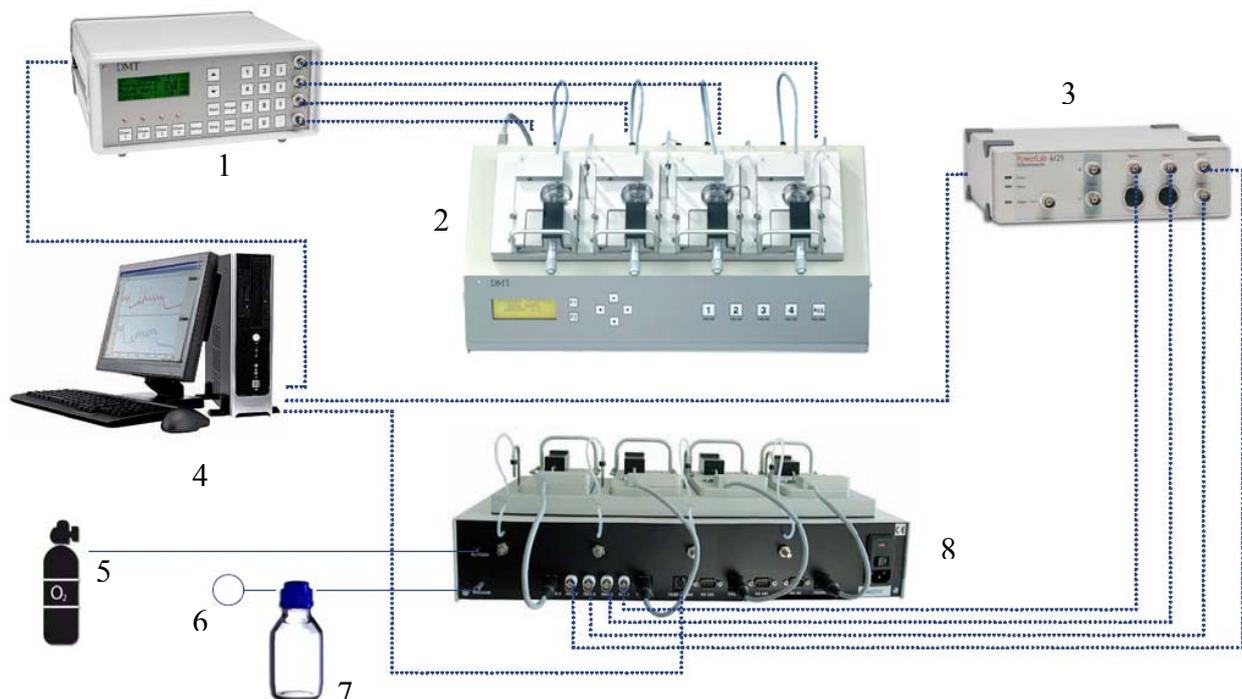


Abbildung 8 Versuchsanordnung des Multi Myograph Systems

Legende:

1 - DMT CS200 Pulse/Train Stimulator (optional)	2 - Myo Interface Frontansicht
3 - PowerLab Datenerfassungssystem (optional)	4 - PC Datenerfassungs- und Analysesoftware
5 - Oxygenzufuhr	6 - Vakuumpumpe
7 - Auffanggefäß	8 - Myo Interface Rückseite

Für die einzelnen Versuche wurden Arteriae renales von Wistar-Kyoto Ratten benutzt. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Applikation von Urethan (Ethylcarbamate) (1,4 g / kg Körpergewicht) betäubt. Für die Präparation des Gefäßes wurde zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt, dann die linke Niere mit den dazugehörigen Gefäßen aufgesucht, da diese aufgrund der Anatomie leichter zugänglich ist. Im Anschluss wurden die Gefäße mit Hilfe einer Mikroschere vorsichtig mobilisiert und voneinander gelöst. Danach wurde die Arterie am Abgang von der Aorta abdominalis sowie am Nierenhilus durchtrennt und behutsam entfernt. Um strukturelle Schäden zu vermeiden, musste dringend darauf geachtet werden, dass die

Gefäße bei der Präparation weder in longitudinaler, noch transversaler Ebene gedehnt werden. Sie wurden im direkten Anschluss an die Präparation in ein Becherglas mit physiologischer Kochsalzlösung (Tyrode-Lösung) überführt, die im Kühlschrank auf 4°C gekühlt und 10 min mit Carbogen begast wurde. Anschließend wurden die Gefäße in eine mit Tyrode-Lösung gefüllte Petri-Schale transferiert und mittels eines binokkularen Mikroskops bei 10 facher Vergrößerung weiterpräpariert. Der Boden der Petri-Schale war mit einer ca. 5 mm dicken Schicht eines Polymers (Sylgaard) versehen, welches die Arterien schonend und ohne Hilfsmittel fixiert und damit eine Feinpräparation ohne Strukturschädigung ermöglichte. Nach vollständiger Ablösung des periadventitiellen Bindegewebes wurden die Gefäße in ca. 2 mm lange Stücke zerschnitten. Zwei Drähte mit einem Durchmesser von 40 µm wurden dann vorsichtig eingeführt, wobei das Endothel möglichst geschont wurde. Das Gefäßpräparat und die Drähte wurden in den mit warmer, begaster Tyrode-Lösung gefüllten Myographen überführt und durch Fixierung der Drähte an den Schrauben der jeweiligen Trägerbacken eingespannt. Dabei war darauf zu achten, keine Gefäßteile einzuklemmen. Zudem musste das Gefäßstück frei beweglich auf den Drähten liegen. Durch Drehung an den Mikrometerschrauben wurden die Träger soweit auseinander geschoben, bis sie sich nicht mehr berührten und das Gefäß spannungsfrei auf den Drähten lag. Diese Trägerstellung wurde als Ausgangsstellung festgelegt und die Kraftanzeige am Myo-Interface wurde auf Null eingestellt.

Am Anfang jedes Versuches wurden die Gefäße auf ihre Funktionalität der glatten Muskulatur und des Endothels überprüft. Um die rezeptorunabhängige Kontraktion zu testen, wurde Kaliumchlorid verwendet, welches zu einer Depolarisation der glatten Muskelzellen führte. Des Weiteren wurde die rezeptorabhängige Kontraktion mit Hilfe von Phenylephrin kontrolliert. Im Anschluss wurde Acetylcholin appliziert, welches über eine endothelabhängige Vasodilatation eine Aussage über die Funktionalität des Endothels lieferte. Die endothelunabhängige Dilatation wurde mittels Natriumnitroprussid getestet.

Für die Versuche wurden nur Gefäße benutzt, die diese Vorbedingungen, auch bekannt als Vorkaskade, erfüllt haben. Falls dies nicht der Fall war, wurden sie aus dem Myographen gespannt und durch neue Gefäßpräparate ersetzt.

Es wurden drei Versuchsreihen am Myographen durchgeführt. In der ersten Reihe wurde den Gefäßen nur die Testsubstanz zugefügt. Diese Reihe wurde als Kontrollreihe bezeichnet. In der zweiten Reihe wurden zunächst 50 µmol Suramin für einen Zeitraum von 20 Minuten in die

Kammer des Myographens gegeben, um unspezifisch P2X-Rezeptoren zu blockieren. Im Anschluss wurden dann direkt die zu testenden Substanzen hinzugegeben. Bei der letzten Versuchsreihe wurden die Gefäße in den Kammer für 20 Minuten mit $10\mu\text{mol } \alpha,\beta\text{-metATP}$ inkubiert. Diese Dosis wurde gewählt, um gezielt P2X₁-Rezeptoren zu blockieren. Danach wurden die Testsubstanzen ohne vorherige Waschung zugefügt.

2.2.1.4 Die Festlegung der normalisierten Lumendurchmesser

Um die Messdaten verschiedener Gefäße vergleichen zu können, ist es erforderlich, einem Gefäß einen definierten Lumendurchmesser zuzuordnen. Die Sensitivität der präparierten Gefäße bezogen auf ihre Reaktivität gegenüber Agonisten ist dabei vom Ausmaß der Vorspannung des Gefäßes abhängig. Daher ist es erforderlich, bei pharmakologischen Versuchen definierte Normen zu erzeugen. Um bestmöglich zusammenwirken zu können, benötigen die kontraktile Elemente der glatten Gefäßmuskulatur Myosin und Aktin eine Vorspannung, welche die beiden Moleküle optimal gegeneinander ausrichtet. Diese Vorspannung setzt sich dabei aus der Relation von aktiver Wandspannung und innerem Lumendurchmesser zusammen. Mulvany spricht von einem optimalen inneren Lumendurchmesser, wenn ein vollständig relaxiertes Gefäß mit einem transmuralen Druck von 100 mmHg vorliegt [104]. Dieses bei der Normalisierung angestrebte Verhältnis wird als IC₁₀₀ bezeichnet.

Die Wandspannung kann als Quotient aus gemessener Kraft und Gefäßlänge ermittelt werden. Die Entfernung der Myographenträger, zwischen die das Gefäß eingespannt ist, wird dazu durch Drehen an den Mikrometerschrauben in μm -Schritten erhöht, wodurch die Wandspannung schrittweise erhöht wird. Dabei wird neben der Mikrometerveränderung auch die Kraft ermittelt, die durch die einzelnen Dehnungsschritte entsteht. Zur Bestimmung der Gefäßlänge wird ein kalibriertes Objektiv verwendet, welches auf das binokuläre Mikroskop aufgesetzt wird. Da das Gefäßsegment aus einer oberen und einer unteren Gefäßwand besteht, muss die Länge des unter dem Mikroskop gemessenen Gefäßpräparates verdoppelt werden.

Der Gefäßinnenumfang kann berechnet werden, indem man die Entfernung der beiden Träger des Myographen ausmisst und die Dicke der benutzten Drähte berücksichtigt. Mit Hilfe der Gleichung nach Laplace kann der effektiv wirkende Innendruck P_i des Gefäßes berechnet werden [104]. Es gilt:

$$P_i = \text{Wandspannung} / [\text{Innerer Gefäßumfang} / (2 * \pi)]$$

Der effektive Druck wird definiert als der Druck, welcher aufgebracht werden muss, um das Gefäß auf den gemessenen inneren Umfang zu erweitern. Mittels dem Normalisierungsprogramm Myodaq, wird jedes Datenpaar, bestehend aus innerem Gefäßumfang und Wandspannung, erfasst und zudem der effektive Gefäßinnendruck, der sich daraus ergibt, berechnet. Überschreitet der effektive Druck 100 mmHg, so wird die Gefäßextension abgeschlossen. Es kann mit den auf diese Weise erhobenen Daten eine exponentielle Kurve ermittelt werden, bei welcher der Gefäßinnendurchmesser gegen die dabei entstehende Wandspannung aufgetragen wird. Mit Hilfe des Laplace'schen Verhältnisses kann der Gefäßinnendurchmesser innerhalb der entsprechenden Kurve bestimmt werden, bei dem eine Wandspannung von 100 mmHg vorliegt. Diese wird, wie oben erwähnt, als IC_{100} bezeichnet. Anhand von Versuchen wurde festgestellt, dass die aktive Kraftproduktion der Gefäße bei einem Innendurchmesser, der 90% des IC_{100} beträgt, maximal ist. Dieser Gefäßinnendurchmesser wird als IC_1 bezeichnet [104]. Die Versuche am Myographen wurden mit Gefäßen durchgeführt, die einen Gefäßinnendurchmesser von $IC_1 = 0.9 * IC_{100}$ aufweisen. Somit ist es möglich, einzelne Gefäße zu vergleichen.

Abbildung 9 zeigt einen Normalisierungsvorgang. Am Messpunkt B liegt die tarierte Nullwandspannung vor. Danach wurden die Gefäße um einige Mikrometer gedehnt. Die Wandspannung, die eine Minute nach manueller Dehnung aufbaut wird, wird in den Messpunkten 1 - 4 wiedergegeben. Da am Messpunkt 4 eine Wandspannung von über 100 mmHg vorliegt, wird die Ruhespannung um einen definierten Betrag gesenkt, damit eine IC_{100} der Gefäße erreicht werden soll. Der endgültige Innendurchmesser IC_1 wird am Messpunkt N eingestellt.

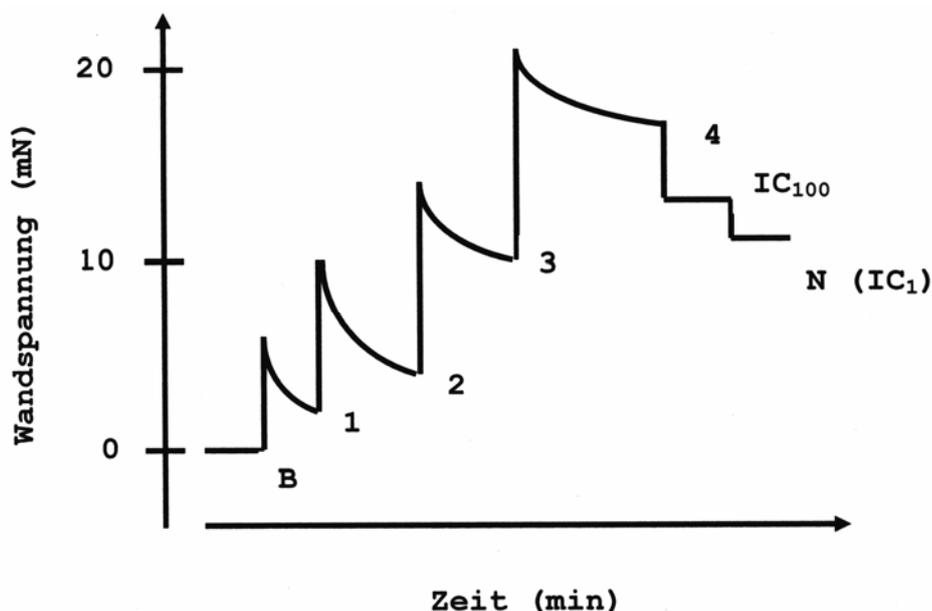


Abbildung 9 Darstellung eines Normalisierungsvorganges

2.2.2 Perivaskulärer Blutfluss

2.2.2.1 Funktionsweise der Transonic[®] perivascular flowprobe-Sonde

Die Transonic[®] perivascular flowprobe-Sonde 1PR besteht aus einem Gehäuse, welches zwei nebeneinander angeordnete Ultraschall-Messfühler (Transducer) und einen akkustischen Reflektor beinhaltet. Das zu untersuchende Gefäß liegt in dem V-förmigen Reflektor, die Transducer sind über dem Gefäß angeordnet.

Zur Messung des Blutflusses werden zwei Messgrößen ermittelt: die Flussaufwärts-Transit-Zeit und die Flussabwärts-Transit-Zeit. Bei ersterer wird von dem Transducer, der flussabwärts liegt, eine breite Ultraschallwelle abgegeben. Diese durchwandert das Gefäß und wird am Reflektor zum zweiten, flussaufwärts liegenden Transducer umgeleitet, wobei das Gefäß wiederum durchwandert wird. Das Ultraschallsignal wird dann in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die Messung der Flussabwärts-Transit-Zeit erfolgt in umgekehrter Reihenfolge. Die Zeit, die die Ultraschallwelle benötigt, um das Gefäß zu durchwandern, hängt dabei von der Fließgeschwindigkeit ab. Die Flussaufwärts-Transit-Zeit erfolgt gegen die Flussrichtung und ist daher bei Zunahme der Geschwindigkeit erhöht, während die Flussabwärtsmessung mit der Flussrichtung erfolgt und die Transit-Zeit dabei dementsprechend verkürzt ist. Die Transonic Sonde subtrahiert die Flussabwärts- von der Flussaufwärts-Transit-Zeit und ermittelt damit den Volumenfluss innerhalb des Gefäßes mit einer absoluten Messgenauigkeit von $\pm 10\%$ und einem Zero Offset von $\pm 0,2\%$.

Abbildung 10 gibt einen Überblick über die korrekte Lage der Sonde in der Seiten- und Frontansicht während des Versuches sowie über die Funktionsweise der Transducer.

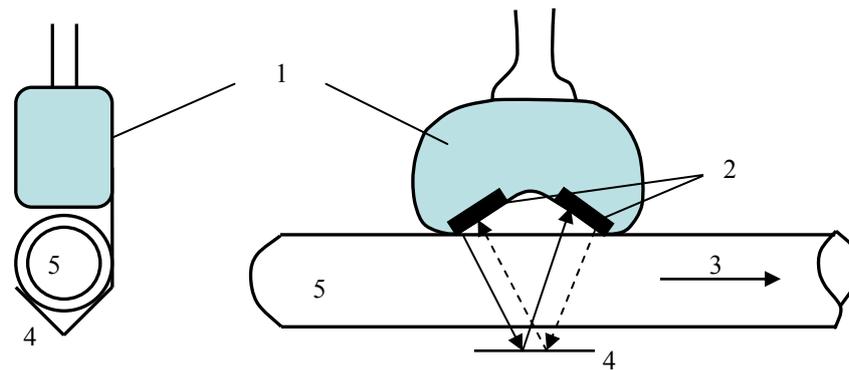


Abbildung 10 Seiten- und Frontansicht der Transonic® perivascular flowprobe-Sonde IPR

Legende: 1 - Sondenkopfstück 2 - Transducer 3 - Flußrichtung
4 - Reflektor 5 - Gefäß

2.2.2.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Es wurden drei bis vier Monate alte Wistar-Kyoto-Ratten, die zwischen 250 - 300 g schwer waren, verwendet. Die Anästhesie erfolgte mit Hilfe einer vom Körpergewicht abhängigen intraperitonealen Urethan-Injektion (80 mg / kg Körpergewicht). Die Narkose-Tiefe wurde durch gezielte kurze Schmerzreize, zum Beispiel durch Zwicken in die Hinterbeine, überprüft. Nach Erreichen der Schmerzfreiheit wurde das Tier in Rückenlage mit Hilfe von Klemmen am Wärmetisch fixiert. Eine mit dem Wärmetisch gekoppelte Rektalsonde hielt die Körpertemperatur über den gesamten Versuch konstant. Im Anschluss wurde die Regio mediana cervicalis sinistra desinfiziert. Dann wurde die Haut abgetragen und der Musculus sternocleidomastoideus aufgesucht. An diesem entlang wurde vorsichtig die Arteria carotis externa sinistra aufgesucht und von der Vena jugularis interna getrennt. Die Arteria carotis externa wurde dann knapp oberhalb des Abgangs vom Truncus brachiocephalicus abgeklemmt und eröffnet. Darauf wurde ein Katheter eingeführt, welcher intracarotal mit Fäden von außen fixiert und mit heparinierter Kochsalzlösung durchgespült wurde. Anschließend wurde ein 3-Wege-Hahn zur Applikation der Testsubstanzen und zur Infusion mit NaCl-Lösung angebracht. Nach Anlage des Katheters wurde die linke Regio abdominis media desinfiziert. Durch einen horizontalen Schnitt in der Mitte dieser Region wurde die Bauchhöhle eröffnet. Dann wurde der Hilus renalis sinistra aufgesucht und die Arteria renalis sinistra, die sich meist dorsokranial von der Vena renalis befindet, von dieser getrennt. Durch stumpfe Dissektion wurde das Gefäß vom umliegenden Bindegewebe frei präpariert. Dann wurde die Ultraschall-Sonde Flowprobe so platziert, dass die Arterie genau in der V-förmigen Mulde lag. Anschließend wurde mikroblasenfreies Ultraschall-Gel mit Hilfe einer Braunüle unter Sichtkontrolle in die Mulde gegeben, um einen optimalen Kontakt zwischen dem Ge-

fäß und der Sonographie-Sonde herzustellen. Anschließend wurde eine Äquilibrationszeit von 60 Minuten abgewartet. Um die Funktionstüchtigkeit der Niere zu überprüfen, wurde bei jedem Versuch zu Beginn folgende Substanzen appliziert: Angiotensin II (1 µg) und Phenylephrin (1 µg).

Die Reaktion der renalen Gefäße durch die getesteten Substanzen wurde als Änderung des Blutflusses über die Flowprobe-Sonde registriert, über einen Brückenverstärker gesteigert und mit Hilfe des Programmes HSE-BDAS digital aufgezeichnet. Zur Auswertung der Daten wurde die Prism-Software benutzt.

2.2.3 Intraarterieller Blutdruck

2.2.3.1 Funktionsweise des ISOTEC™ Pressure Transducers

Der ISOTEC™ Pressure Transducer wandelt Druck in ein analoges elektrisches Signal um. Er ist aus einem Gehäuse zusammengesetzt, welches die Messeinheit und eine Plastikkuppel enthält, die durch eine Membran voneinander getrennt werden und so eine Kammer bilden. Die Plastikkuppel ist mit Zugängen versehen, um den Transducer mit dem Gefäß zu verbinden. Die Kammer sowie der Katheter wurden in den Versuchen mit steriler, heparinisierter 0,9%iger Kochsalz-Lösung gefüllt. Der Druck im Gefäß wurde über den Katheter in die Plastikkuppel übertragen, wo er eine Auslenkung der Membran erzeugte, welche von der Messeinheit registriert und in ein Signal proportional zum Druck umgewandelt wurde. Der ISOTEC™ Pressure Transducer ist in der Lage, Druck von -50 bis +300 mmHg bei einer Messgenauigkeit von $< \pm 1,5\%$ des Messwertes bzw. $\pm 1,0$ mmHg zu registrieren. Zudem besitzt er eine Sensivität von 5μ V/V/mmHg sowie ein Zero Offset von maximal ± 30 mmHg.

In Abbildung 11 wird der Transducer mit zwei optionalen Zugangshähnen dargestellt.



Abbildung 11 ISOTEC™ Pressure Transducer

Legende: 1 - Messeinheit 2 - Plastikkuppel 3 - optionaler Zugangshahn

2.2.3.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Zunächst wurde ein Katheter in die A. carotis externa sinistra gelegt, die Vorbereitung und Präparation erfolgten wie bei 2.2.2.2 (siehe Seite 26). Dieser Katheter diente der Applikation der zu testenden Substanzen. Ein zweiter Katheter wurde in die A. femoralis sinistra eingeführt. Dazu wurde das rechte Trigonum femoris desinfiziert. Danach wurde die Haut durch einen geraden Schnitt eröffnet. Im Anschluss wurde der Hiatus saphenus aufgesucht, wo die Vena von der Arteria femoralis vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette von einander getrennt wurde. Die A. femoralis wurde darauf knapp unterhalb des Hiatus abgeklemmt. Dann wurde ein Katheter in das Gefäß eingeführt, mit 0,1 ml heparinierter NaCl-Lösung durchgespült, um eine Okklusion des Katheters zu verhindern und von außen fixiert. An diesem wurde der ISOTEC™ Pressure Transducer zur Messung des Blutdruckes angeschlossen.

Somit konnte während des gesamten Versuches neben der Herzrate auch der systolische und diastolische Blutdruck und der daraus berechnete mittlere arterielle Blutdruck (MAD) gemessen werden. Nach der Anlage der Katheter wurde der Blutdruck über eine Äquilibrationszeit von ca. 30-40 min kontinuierlich aufgezeichnet. Der Versuch wurde erst nach Stabilisierung der Werte gestartet.

2.3 Reproduzierbarkeit und Statistik

Die Effekte wurden als Perfusionsdruckänderungen (in mmHg) registriert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM = standard error mean) dargestellt.

Die Ergebnisse aus den Dauerperfusionsexperimenten mit ATP, α,β -metATP, Ap_4 und den stabilen Analoga α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 sowie γ,δ -met Ap_4 stellen Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potentiell unterschiedlicher Standardabweichung dar.

Aus diesem Grund wurde für die statistische Signifikanztestung der verteilungsunabhängige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verwendet. Als Nullhypothese (H_0) wurde angenommen, dass die Perfusionsdruckmittelwerte der Testsubstanzen unter Dauerperfusion mit den Antagonisten den Perfusionsdruckmittelwerten der Testsubstanzen unter Tyrode entsprechen. Als Alternativhypothese (H_1) wurde angenommen, dass unter der Dauerperfusion die Perfusionsdruckmittelwerte größer oder kleiner wären als unter Tyrode.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 > \mu_2 \text{ oder } \mu_1 < \mu_2$$

μ_1 : = Perfusionsdruckmittelwert nach Applikation einer Testsubstanz unter Tyrode

μ_2 : = Perfusionsdruckmittelwert nach Applikation einer Testsubstanz unter Dauerperfusion mit ATP, α,β -metATP, Ap_4 und den stabilen Analoga α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 sowie γ,δ -met Ap_4

Der Stichprobenumfang (n) über Tyrode betrug n_1 und über der jeweiligen Dauerperfusion n_2 . Es wurde nun eine Rangordnung der erhaltenen Perfusionsdrücke erstellt und den einzelnen Messwerten Rangzahlen (R) zugeordnet. Die Summe der R der Messwerte über Tyrode war R_1 und die Summe der Rangzahlen über der jeweiligen Dauerperfusion R_2 . Die in diesem Test verwendeten Prüfungsgrößen (U) U_1 und U_2 errechneten sich nun folgendermaßen:

$$U_1 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_1 \times (n_1 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 \times n_2 + 0,5 \times n_2 \times (n_2 + 1) - R_2$$

Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn U als der kleinere Wert von U_1 und U_2 kleiner als der tabellierte kritische Wert $U(n_1, n_2)$ war. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.05$ wurde im verwendeten Test als signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 In vitro-Messung am Kleingefäßmyographen

3.1.1 Dosisabhängige Vasokonstriktion an Gefäßringen aus der *A. renalis* durch Ap_4 , $\alpha,\beta\text{-metAp}_4$, $\alpha,\beta\text{-metATP}$ und ATP

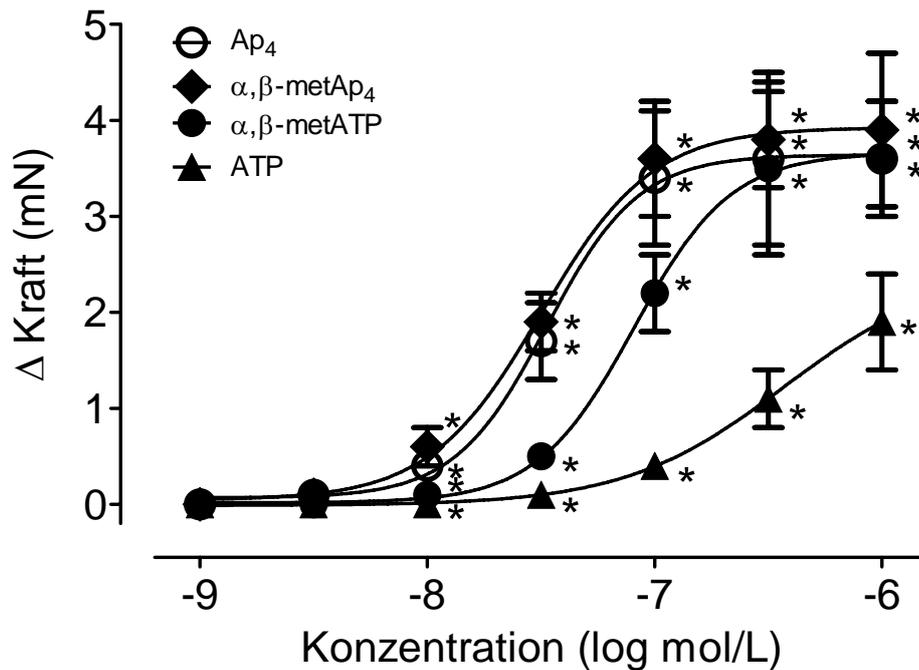


Abbildung 12 Wirkung von Ap_4 , $\alpha,\beta\text{-metAp}_4$, $\alpha,\beta\text{-metATP}$ und ATP auf die Wandspannung von Gefäßringen der *A. renalis*

Dargestellt ist die Analyse von sechs unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Gefäßringen der *A. renalis* von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen. Dabei ist eine dosisabhängige Vasokonstriktion durch die Testsubstanzen erkennbar. Die gemessene Kraft (mN) ist gegen die Konzentration (log mol/L) aufgetragen. Eine Signifikanz besteht bei allen Substanzen ab einer Konzentration von 10 nmol/L.

Abbildung 12 gibt die dosisabhängige Vasokonstriktion ausgelöst durch Ap_4 ($\log\text{EC}_{50}$ $-7,48 \pm 0,05$; V_{\max} $3,64 \pm 0,15$ %), $\alpha,\beta\text{-metAp}_4$ ($\log\text{EC}_{50}$ $-7,50 \pm 0,05$; V_{\max} $3,93 \pm 0,14$ %), $\alpha,\beta\text{-metATP}$ ($\log\text{EC}_{50}$ $-7,09 \pm 0,05$; V_{\max} $3,66 \pm 0,16$ %) und ATP ($\log\text{EC}_{50}$ $-6,43 \pm 0,18$; V_{\max} $2,46 \pm 0,52$ %) in der *A. renalis* von WKY-Ratten wieder. Dabei konnte festgestellt werden, dass Ap_4 und $\alpha,\beta\text{-metAp}_4$ in vitro identische potente Wirkungen zeigen, wohingegen ATP sowie das stabile Analogon eine geringere Potenz aufweisen.

3.1.2 Dosisabhängige Vasokonstriktion an Gefäßringen aus der *A. renalis* von WKY-Ratten durch Ap_4 sowie die stabilen Analoga α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 und γ,δ -met Ap_4

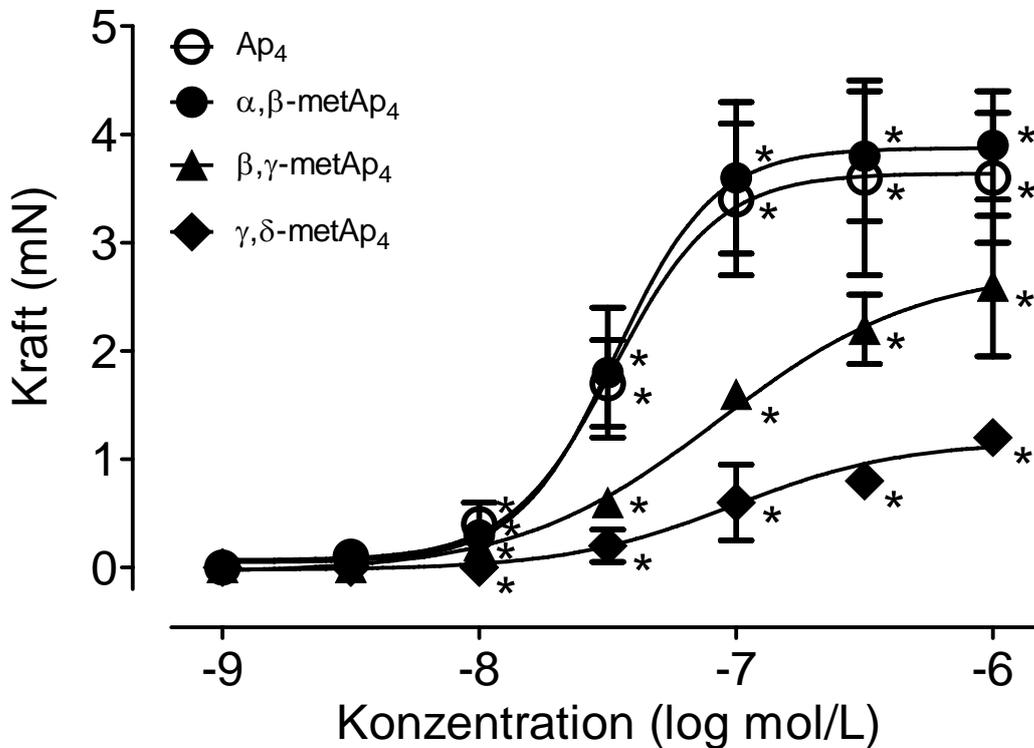


Abbildung 13 Wirkung von Ap_4 , α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 und γ,δ -met Ap_4 auf die Wandspannung von Gefäßringen der *A. renalis*

Gezeigt ist die Auswertung von sechs unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Gefäßringen der *A. renalis* am Kleingefäßmyographen. Dabei ist eine dosisabhängige Vasokonstriktion durch die Testsubstanzen erkennbar. Die gemessene Kraft (mN) ist gegen die Konzentration (log mol/L) aufgetragen. Eine Signifikanz besteht bei allen Substanzen ab einer Konzentration von 10 nmol/L.

In Abbildung 13 wird die Wirkung des Adenosintetraphosphates und der stabilen Analoga verglichen. Die hervorgerufene dosisabhängige Vasokonstriktion durch Ap_4 ($\log EC_{50} -7,48 \pm 0,05$; $V_{\max} 3,64 \pm 0,15$ %), α,β -met Ap_4 ($\log EC_{50} -7,48 \pm 0,04$; $V_{\max} 3,88 \pm 0,14$ %), β,γ -met Ap_4 ($\log EC_{50} -7,07 \pm 0,15$; $V_{\max} 2,76 \pm 0,15$ %) und γ,δ -met Ap_4 ($\log EC_{50} -7,01 \pm 0,15$; $V_{\max} 1,16 \pm 0,21$ %) in der *A. renalis* von WKY-Ratten wird dabei ersichtlich. Es ist erkennbar, dass γ,δ -met Ap_4 das Analogon mit der schwächsten Potenz ist, während der Effekt von Ap_4 und α,β -met Ap_4 in vitro identisch ist.

3.1.3 Inhibition der Vasokonstriktion von Ap₄ und ATP sowie den stabilen Analoga durch Suramin und α,β -metATP

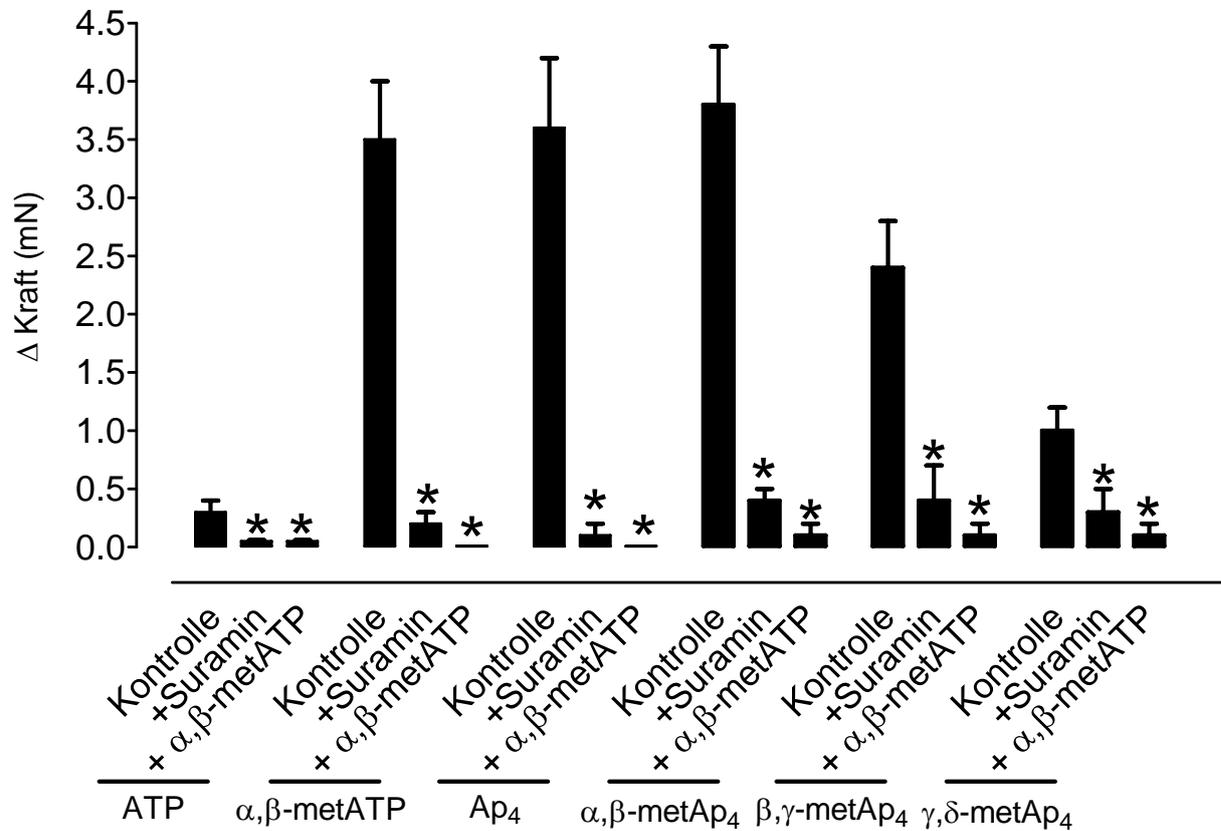


Abbildung 14 Wirkung von Suramin und α,β -metATP auf die Vasokonstriktion von Ap₄ und ATP sowie den stabilen Analoga

Dargestellt ist die Analyse von jeweils fünf unabhängigen Versuchsreihen an unterschiedlichen Gefäßringen der A. renalis am Kleingefäßmyographen. Dabei ist eine Inhibition der Vasokonstriktion durch Suramin und α,β -metATP erkennbar. Die gemessene Kraft (mN) ist gegen die jeweilige Substanz aufgetragen. Die Inhibition der Vasokonstriktion ist bei allen Substanzen durch die Gabe von Suramin und α,β -metATP signifikant.

In Abbildung 14 wird die Wirkung von Suramin und α,β -metATP auf die von Ap₄ bzw. ATP sowie den stabilen Analoga ausgelösten Vasokonstriktion gezeigt. Die Wirkung von ATP ($0,3 \pm 0,1$ mN) wird mittels Suramin ($0,05 \pm 0,01$ mN) um 83,33%, durch α,β -metATP ($0,05 \pm 0,01$ mN) ebenfalls um 83,33% vermindert. Die Vasokonstriktion von α,β -metATP ($3,50 \pm 0,5$ mN) wird dabei durch Suramin ($0,2 \pm 0,1$ mN) um 94,29%, durch α,β -metATP ($0,01 \pm 0,1$ mN) um 97,14% gehemmt. Der Effekt von Ap₄ ($3,60 \pm 0,6$ mN) wird durch Suramin ($0,1 \pm 0,1$ mN) um

97,22%, mittels α,β -metATP ($0,01 \pm 0,01$ mN) um 99,72% verringert. Die Inkubation von Suramin bewirkt bei α,β -metAp₄ ($3,8 \pm 0,5$ mN) eine Inhibition der Vasokonstriktion um $0,4 \pm 0,1$ mN bzw. 89,47%, α,β -metATP verursacht eine Reduktion um 97,37% respektive um $0,1 \pm 0,1$ mN. Die maximale Wandspannung, ausgelöst durch β,γ -metAp₄ wird durch Suramin von $2,4 \pm 0,4$ mN auf $0,4 \pm 0,3$ mN respektive um 83,33% gesenkt, α,β -metATP vermindert sie um 95,83% bzw. auf $0,1 \pm 0,1$ mN. Der Effekt von γ,δ -metAp₄ wird mittels Suramin von $1,00 \pm 0,2$ mN auf $0,3 \pm 0,2$ mN oder um 70% vermindert, durch α,β -metATP auf $0,1 \pm 0,1$ mN bzw. um 90% herabgesetzt.

3.2 In vivo-Messungen mittels perivaskulärem Blutfluss

3.2.1 Dosisabhängige Reduktion des Blutflusses durch α,β -metATP und α,β -metAp₄

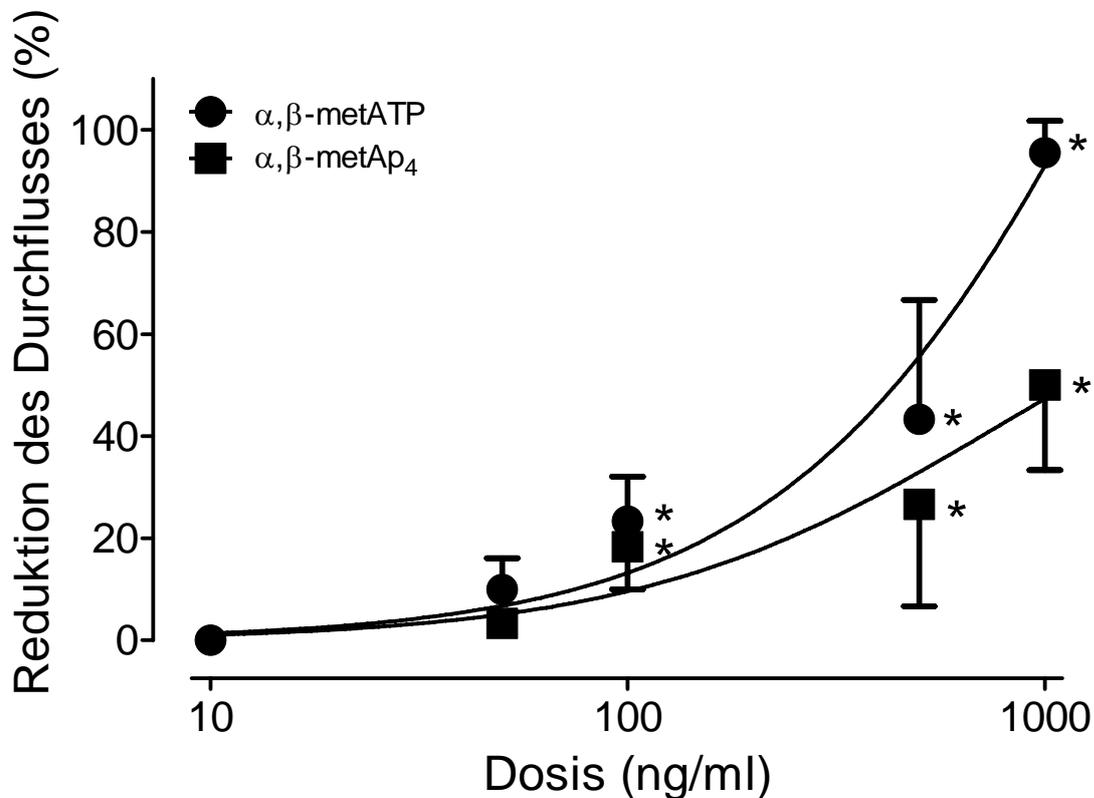


Abbildung 15 Wirkung von α,β -metATP und α,β -metAp₄ auf den Blutfluss der A. renalis

Gezeigt ist die Analyse von sechs unabhängigen Versuchen an der A. renalis von unterschiedlichen WKY-Ratten. Die Reduktion des Blutflusses in % ist auf der Ordinate gegen die Konzentration in ng / ml auf der Abszisse abgebildet. Eine Signifikanz ist ab 100 ng / ml gegeben.

In Abbildung 15 ist eine dosisabhängige Vasokonstriktion durch Gabe von α,β -metATP und α,β -metAp₄ abgebildet. Dies bewirkt eine verminderte Nierendurchblutung. Dabei reduziert α,β -metATP bei einer Dosis von 1 μ g/ml den Blutfluss durchschnittlich um 95,56%, α,β -metAp₄ im Schnitt um 50%.

3.3 In vivo-Messungen mittels intraarteriellem Blutdruck

3.3.1 Dosisabhängige Senkung des MADs durch Applikation von ATP

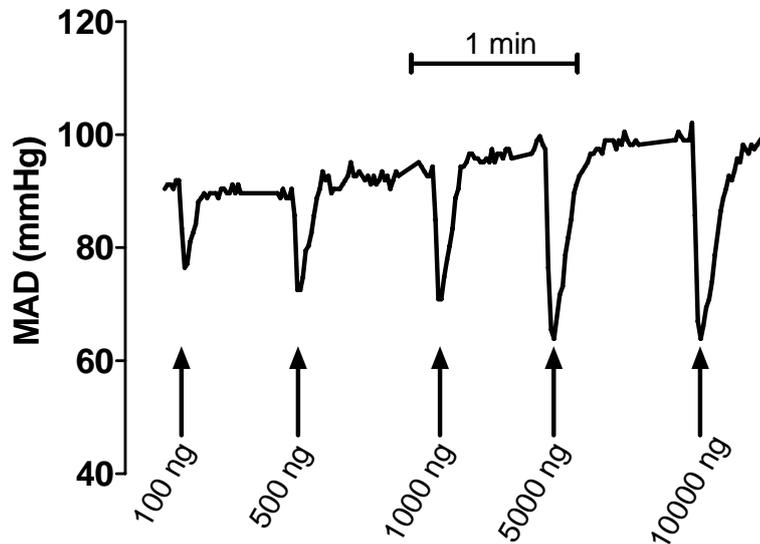


Abbildung 16 Wirkung von ATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Es handelt sich um eine repräsentative Originalabbildung von sechs unabhängigen ($N = 6$) Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Dabei ist eine dosisabhängige Senkung des MADs durch Spaltung des ATP in ADP und AMP zu verzeichnen. Nach jeder Gabe wurde abgewartet, bis die Baseline wieder erreicht wurde. Der gemessene Abfall des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse abgebildet.

In Abbildung 16 wird eine dosisabhängige Vasodilatation, ausgelöst durch Spaltprodukte ADP und AMP des Nukleotids ATP, in der A. femoralis von WKY-Ratten wiedergegeben. ATP wirkt demnach im Gegensatz zu den oben erwähnten in vitro-Versuchen in vivo aufgrund der Spaltung als Vasodilatator. Die maximale Vasodilatation (D_{\max}) wird bei einer Konzentration von $5 \mu\text{g}$ erreicht.

3.3.2 Dosisabhängiger Anstieg des MAD durch Gabe von α,β -metATP

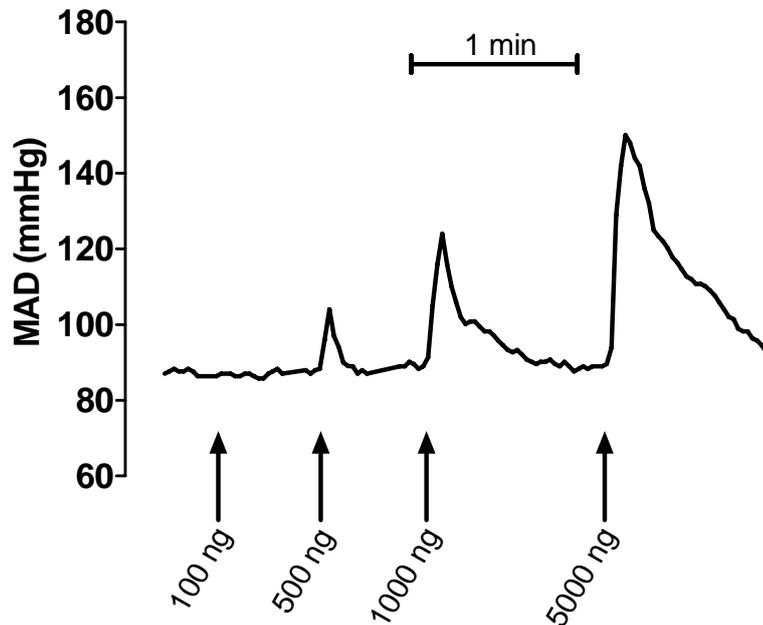


Abbildung 17 Wirkung von α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Dargestellt ist eine repräsentative Originalabbildung von fünf unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Ein dosisabhängiger Anstieg des MAD mittels α,β -metATP ist festgestellt worden. Erst nach Wiedererreichen der Baseline wurde die Konzentration erhöht. Der gemessene Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate wiedergegeben, auf der Abszisse wird die Zeit in Minuten registriert.

Eine dosisabhängige Vasokonstriktion in der A. femoralis von WKY-Ratten, hervorgerufen durch α,β -metATP, wird in Abbildung 17 gezeigt. Die maximale Vasokonstriktion (V_{\max}) ist dabei nicht verzeichnet.

3.3.3 Dosisabhängiger Anstieg des MADs durch Gabe von α,β -metAp₄

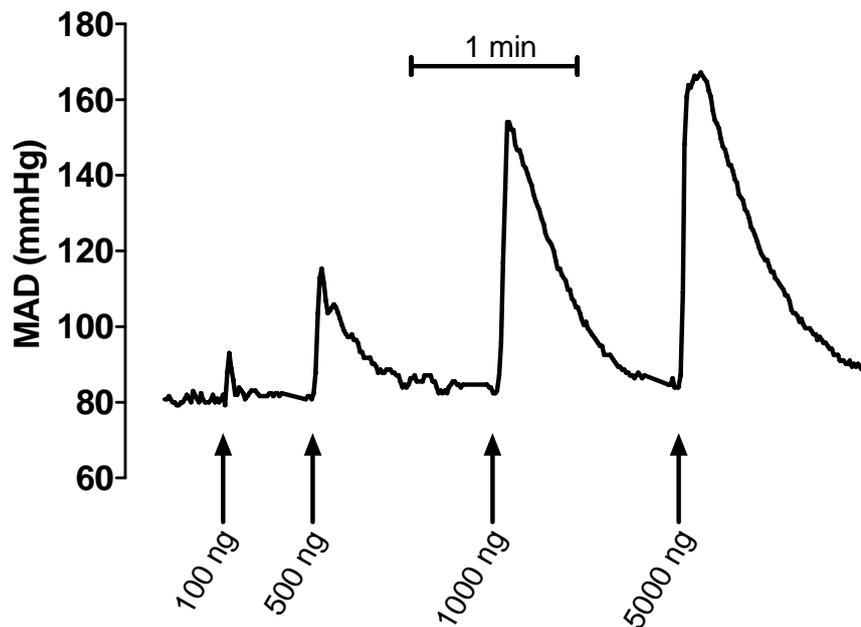


Abbildung 18 Wirkung von α,β -metAp₄ auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Abgebildet ist eine repräsentative Originalabbildung von sechs unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Durch progrediente Gabe α,β -metAp₄ ist eine kurzfristige Erhöhung des MADs erkennbar. Vor jeder Konzentrationserhöhung wurde das Wiedererreichen der Baseline abgewartet. Auf der Ordinate ist dabei der gemessene Anstieg des Blutdruckes in mmHg dargestellt, auf der Abszisse die Zeit in Minuten.

In Abbildung 18 ist eine dosisabhängige Vasokonstriktion in der A. femoralis von WKY-Ratten durch α,β -metAp₄ ersichtlich. V_{\max} ist dabei nicht registriert worden.

3.3.4 Dosisabhängiger Anstieg des MADs durch Gabe von Ap₄

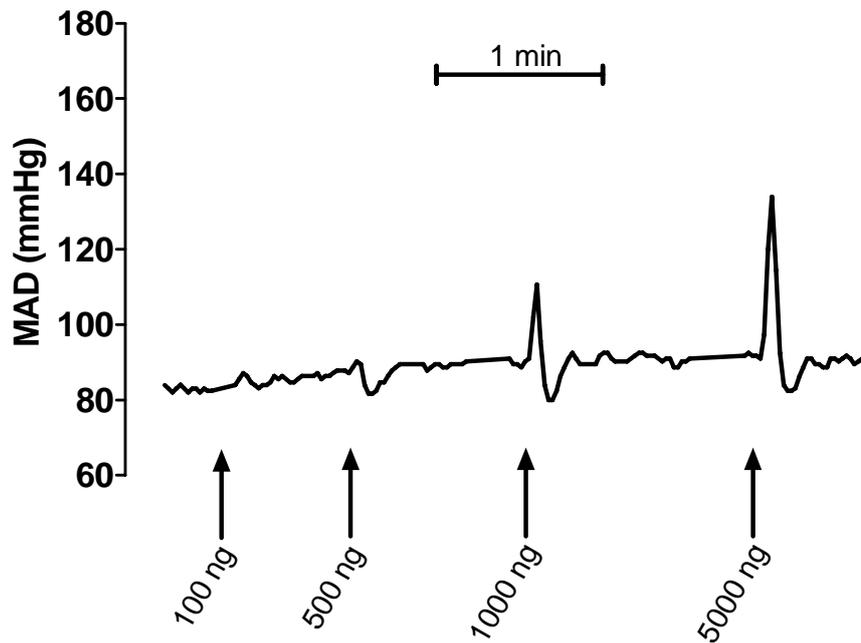


Abbildung 19 Wirkung von Ap₄ auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Dargestellt ist eine repräsentative Originalabbildung von fünf unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Erkennbar ist eine dosisabhängige Steigerung des MAD durch Gabe von Ap₄. Die nächst höhere Konzentration wurde abgewartet, bis die Baseline wieder erreicht wurde. Der gemessene Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse abgebildet.

Abbildung 19 zeigt eine durch Ap₄ ausgelöste dosisabhängige Vasokonstriktion in der A. femoralis von WKY-Ratten. Ein V_{max}-Wert wurde nicht erreicht.

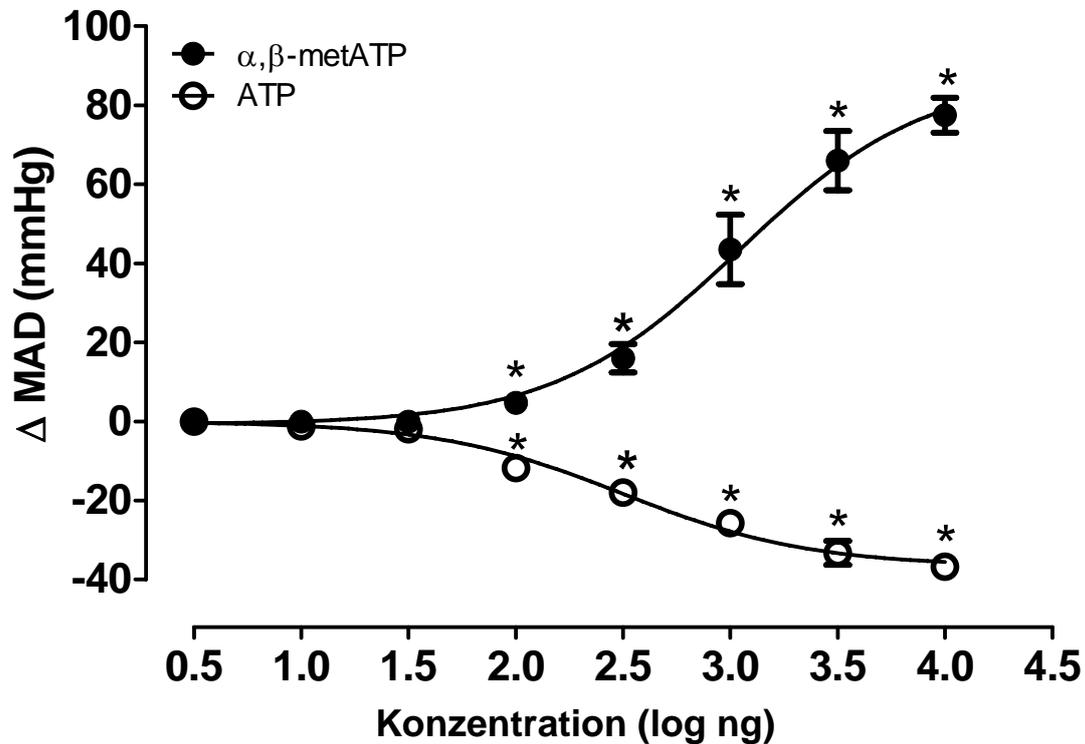
3.3.5 Dosisabhängige Wirkung von α,β -metATP und ATP im Vergleich

Abbildung 20 Effekt von α,β -metATP und ATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Gezeigt ist die Auswertung von sieben unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Der durchschnittliche Anstieg bzw. Abfall des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die logarithmisch steigende Konzentration in ng auf der Abszisse abgebildet. Die Signifikanz bei beiden Kurven ist jeweils ab einer Konzentration von 10^2 ng gegeben.

In Abbildung 20 wird die dosisabhängige Wirkung von ATP mit der des stabilen Analogon α,β -metATP verglichen. Dabei wird eine dosisabhängige Vasokonstriktion durch α,β -metATP ($\log EC_{50}$ $3,04 \pm 0,08$; V_{\max} $87,56 \pm 4,29$ %) hervorgerufen, während durch die endogene Spaltung des ATP in ADP und AMP eine Vasodilatation ($\log EC_{50}$ $2,50 \pm 0,06$; V_{\max} $-36,63 \pm 0,50$ %) verursacht wird. Das stabile Analogon wird demzufolge nicht endogen abgebaut und wirkt daher auch in vivo als Vasokonstriktor.

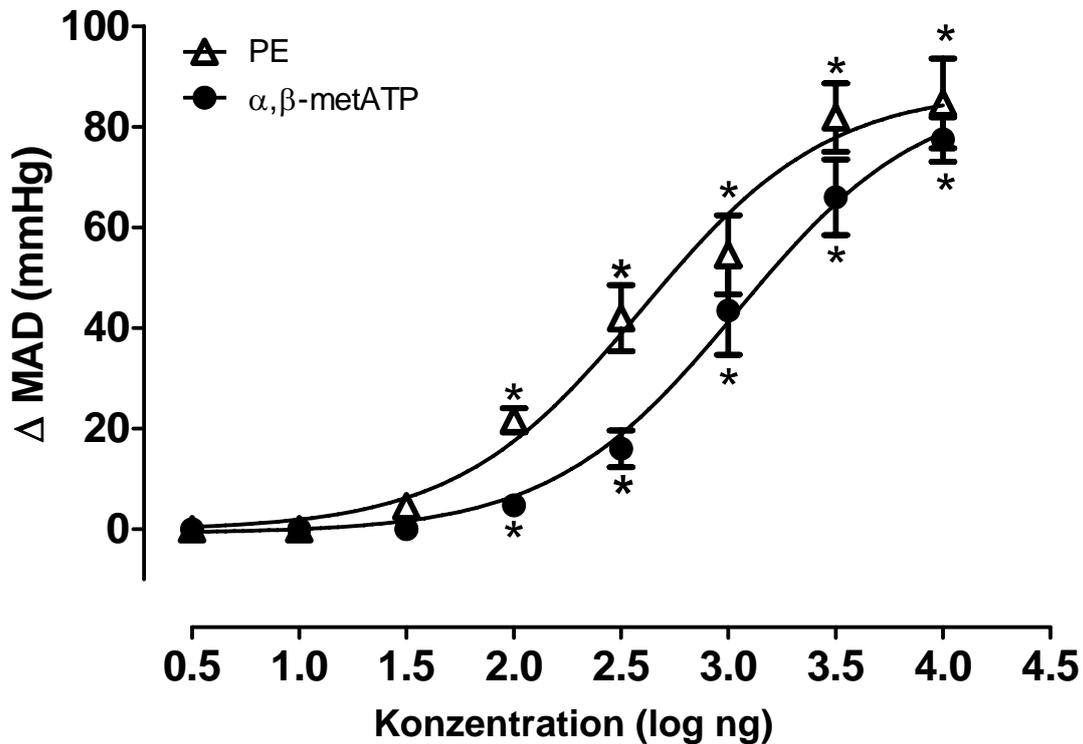
3.3.6 Dosisabhängiger Effekt von PE und α,β -metATP im Vergleich

Abbildung 21 Wirkung von PE und α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Gezeigt ist die Analyse von sechs unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Der durchschnittliche Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die logarithmisch steigende Konzentration in ng auf der Abszisse abgebildet. Die Signifikanz bei beiden Kurven ist jeweils ab einer Konzentration von 10^2 ng gegeben.

In Abbildung 21 ist eine dosisabhängige Vasokonstriktion durch Gabe von PE ($\log EC_{50}$ $2,60 \pm 0,08$; V_{\max} $87,64 \pm 3,71$ %) sowie α,β -metATP ($\log EC_{50}$ $3,04 \pm 0,08$; V_{\max} $87,56 \pm 4,29$ %) erkennbar. Dabei konnte festgestellt werden, dass PE ein potenterer Vasokonstriktor als das stabile Analogon α,β -metATP ist.

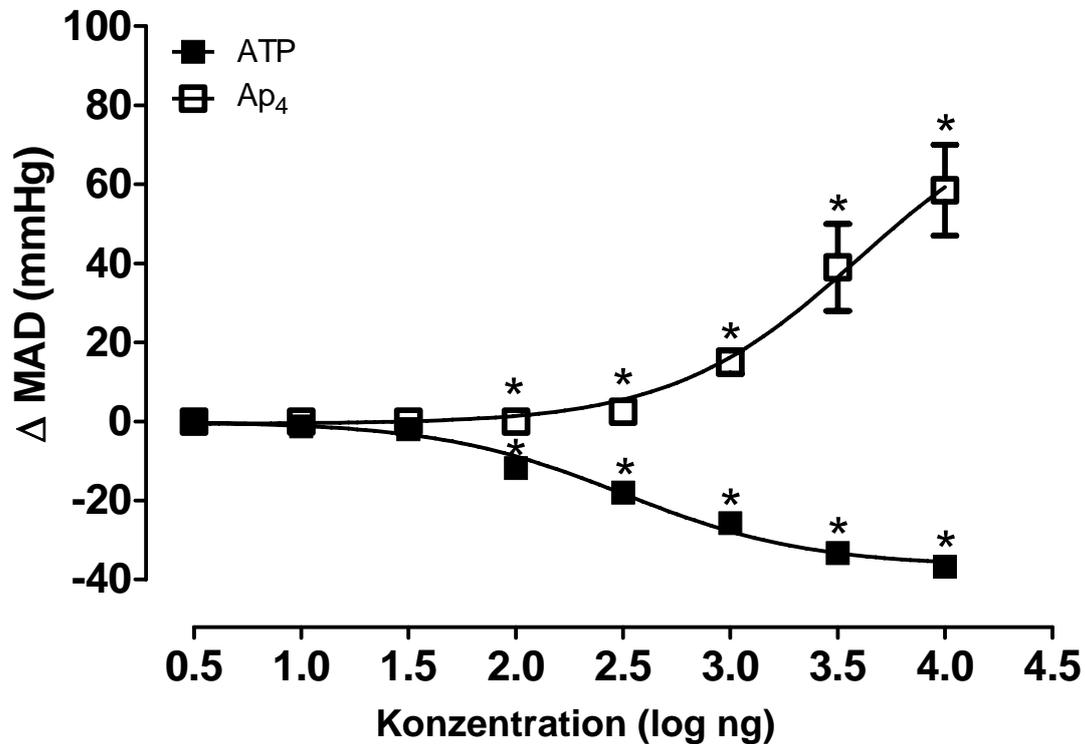
3.3.7 Dosisabhängige Wirkung von ATP sowie Ap₄ im Vergleich

Abbildung 22 Effekt von ATP und Ap₄ auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Gezeigt ist die Auswertung von fünf unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Der durchschnittliche Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die logarithmisch steigende Konzentration in ng auf der Abszisse abgebildet. Die Signifikanz bei beiden Kurven ist jeweils ab einer Konzentration von 10² ng gegeben.

In Abbildung 22 wird die dosisabhängige Wirkung von ATP mit Ap₄ verglichen. Dabei wird gezeigt, dass Ap₄ eine dosisabhängige Vasokonstriktion ($\log EC_{50} 3,60 \pm 0,14$; $V_{\max} -83,03 \pm 10,83$ %) auslöst, wohingegen durch Spaltprodukte des ATPs eine Vasodilatation ($\log EC_{50} 2,50 \pm 0,06$; $V_{\max} -36,63 \pm 0,50$ %) hervorgerufen wird. Ap₄ ist somit verglichen mit ATP auch in vivo ein potenterer Vasokonstriktor.

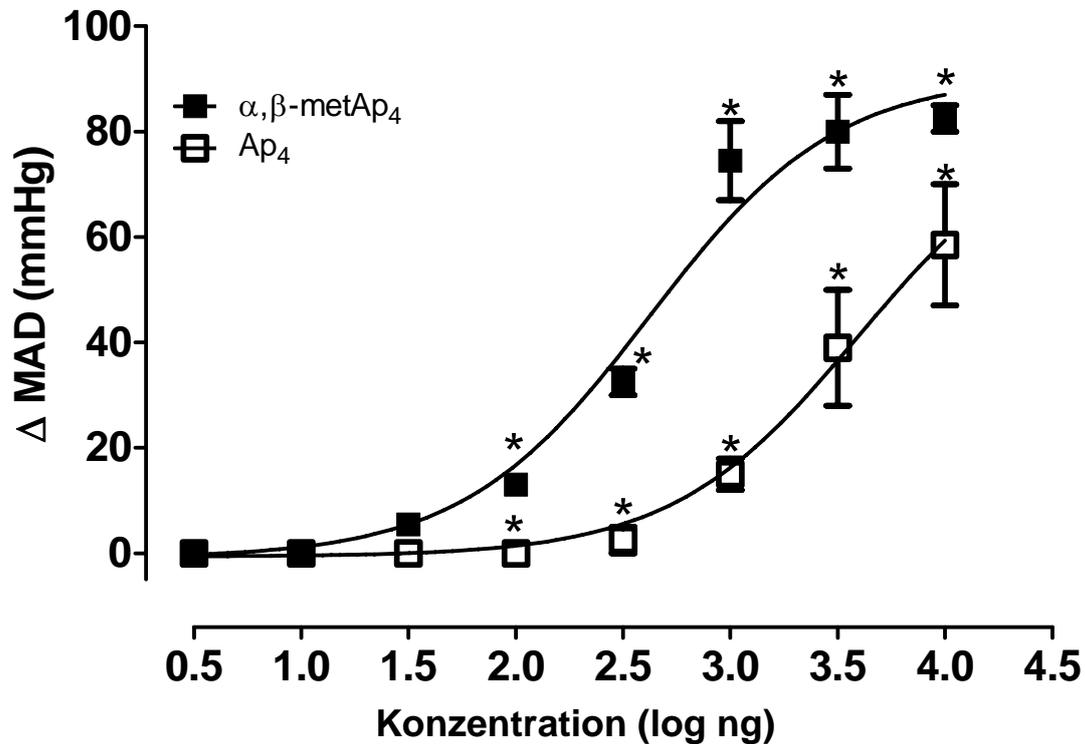
3.3.8 Dosisabhängige Wirkung von α,β -metAp₄ sowie Ap₄ im Vergleich

Abbildung 23 Effekt von α,β -metAp₄ sowie Ap₄ auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Gezeigt ist die Analyse von sechs unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Der durchschnittliche Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die logarithmisch steigende Konzentration in ng auf der Abszisse abgebildet. Die Signifikanz bei beiden Kurven ist jeweils ab einer Konzentration von 10² ng gegeben.

Abbildung 23 gibt wieder, dass α,β -metAp₄ ($\log EC_{50}$ $2,62 \pm 0,07$; V_{\max} $90,68 \pm 3,34$ %) sowie Ap₄ ($\log EC_{50}$ $3,60 \pm 0,14$; V_{\max} $-83,03 \pm 10,83$ %) eine dosisabhängige Vasokonstriktion auslösen, wobei α,β -metAp₄ in Gegensatz zu der in vitro-Applikation in vivo der potentere Vasokonstriktor ist.

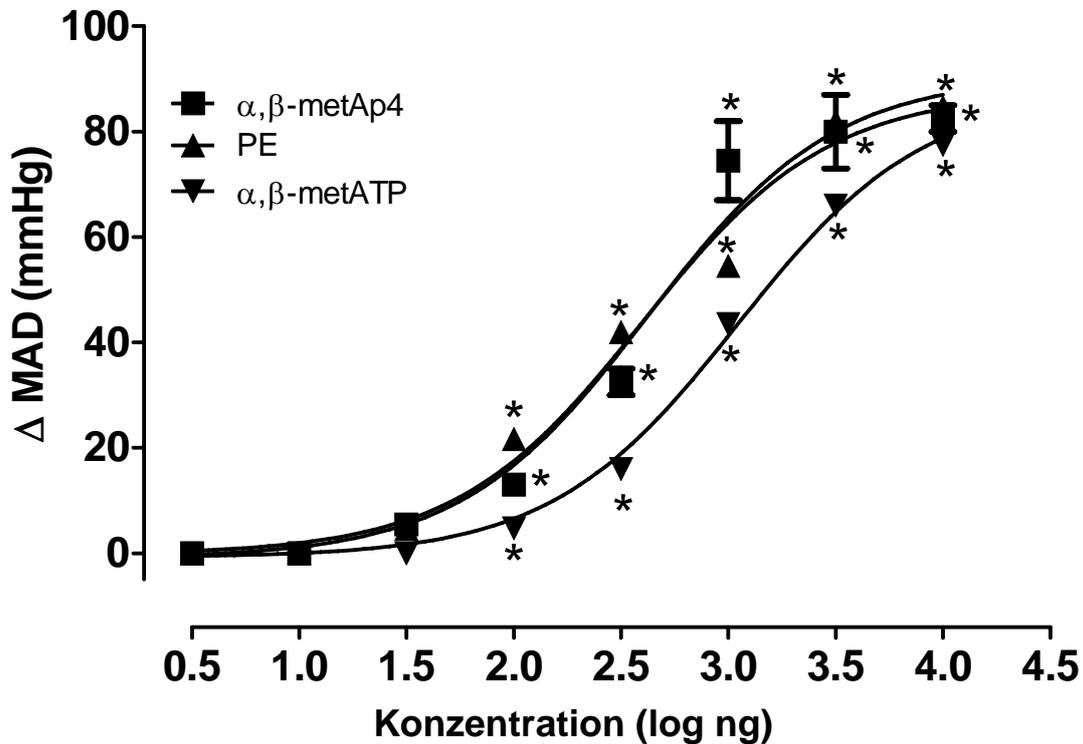
3.3.9 Dosisabhängiger Effekt von α,β -metAp₄, PE sowie α,β -metATP im Vergleich

Abbildung 24 Effekt von α,β -metAp₄, PE sowie α,β -metATP auf den intraarteriell gemessenen Blutdruck

Gezeigt ist die Auswertung von 7 unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen WKY-Ratten. Der durchschnittliche Anstieg des Blutdruckes in mmHg ist auf der Ordinate gegen die logarithmisch steigende Konzentration in ng auf der Abszisse abgebildet. Die Signifikanz bei beiden Kurven ist jeweils ab einer Konzentration von 10^2 ng gegeben.

Die Abbildung 24 vergleicht die Wirkung der bisher bekannten potentesten Vasokonstriktoren PE und α,β -metATP mit α,β -metAp₄. Die dadurch hervorgerufene dosisabhängige Vasokonstriktion durch Applikation von α,β -metAp₄ ($\log EC_{50}$ $2,62 \pm 0,07$; V_{\max} $90,68 \pm 3,34$ %), PE ($\log EC_{50}$ $2,60 \pm 0,08$; V_{\max} $87,64 \pm 3,71$ %) sowie α,β -metATP ($\log EC_{50}$ $3,04 \pm 0,08$; V_{\max} $87,56 \pm 4,29$ %) wird wiedergegeben. Die Wirkung von α,β -metAp₄ und PE ist dabei identisch, während α,β -metATP verglichen mit diesen beiden eine geringere Potenz vorweist.

4 DISKUSSION

Die arterielle Hypertonie kann zu Arteriosklerose, koronaren Herzerkrankungen sowie zu weiteren Organschäden, beispielsweise Läsionen der Nieren oder der Augen, führen. Dabei spielt das Endothel eine wichtige Rolle bei der Vasoregulation und hat somit einen Einfluss auf den Blutdruck. Das Verständnis über Wirkungsmechanismen und Rezeptoren von Faktoren, die eine Vasokonstriktion auslösen, sind deswegen bei der Therapie der Hypertonie von Bedeutung.

In dieser Dissertation konnten das Adenosintetraphosphat Ap_4 und seine stabilen Analoga α,β -met Ap_4 , β,γ -met Ap_4 sowie γ,δ -met Ap_4 als hochpotente Vasokonstriktoren identifiziert werden. Mit Hilfe dieser Versuche wurde ebenfalls festgestellt, dass Ap_4 und seine Analoga zu den Endothel-abgeleiteten gefäßkontrahierenden Faktoren (EDCF) zählen. Zu diesen EDCF gehört auch ATP [107], [108], [109], welches ein bekannter unspezifischer purinerges Agonist ist und eine Vielzahl von P2-Rezeptoren aktiviert, wodurch entweder eine vasodilatatorische, eine vasokonstriktive oder keine Wirkung auf Gefäße ausgeübt wird. Ap_4 hingegen scheint ein hochpotenter und hochspezifischer Vasokonstriktor zu sein, vermutlich sogar der natürliche Ligand des P2X₁-Rezeptors mit der höchsten Affinität.

Die Messungen an der isolierten Arteria renalis mittels Kleingefäßmyographen sowie die Messung des perivaskulären Blutfluss ferner die intraarterielle Blutdruckmessung ergaben, dass Ap_4 die P2X₁- und P2X₃-Rezeptoren aktiviert. Der P2X₁-Rezeptor ist in der glatten Gefäßmuskulatur der Arteria renalis der dominante Subtyp des P2X-Rezeptors. Entgegen der bisherigen Beobachtung von Turner et al. [110] wurde der P2X₃-Rezeptor in einer geringen Ausprägung in renalen Geweben und Gefäßen entdeckt [111]. Die Aktivierung der Subtypen wurde dadurch ersichtlich, dass der selektive P2X_{1/3}-Rezeptorblocker α,β -metATP die Vasokonstriktion mittels Ap_4 in vitro fast vollständig inhibiert. Da momentan noch kein idealer Inhibitor bekannt ist, der zwischen den Subtypen P2X₁ und P2X₃ unterscheiden kann [112], wurde α,β -metATP in einer Konzentration appliziert, die stark genug war, um den P2X₁-Subtyp zu inhibieren, dabei aber weit unter der IC₅₀ lag. Diese blockiert bekannterweise den P2X₃-Subtyp.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das stabile Analogon des Mononukleotids ATP α,β -metATP, welches bisher als stärkster purinerges vasokonstriktiver Agonist galt [75], [106], in vitro im Vergleich mit Ap_4 eine signifikant geringere Vasokonstriktion auslöst. In vivo hingegen wurde festgestellt, dass Ap_4 im Gegensatz zu α,β -metATP enzymatisch abgebaut wurde und damit eine geringere vasokonstriktive Wirkung hatte. Darüber hinaus wurde

demonstriert, dass α,β -metAp₄, das stabile Analogon des Ap₄, in vivo potenter ist als α,β -metATP.

Nach Desensibilisierung mittels α,β -metATP wurde durch eine hohe Dosis von Ap₄ eine leichte Vasodilatation ausgelöst. Daraus könnte geschlossen werden, dass Ap₄ über die P2Y₁-Rezeptoren eine Vasodilatation hervorrufen. Westhoff et al. konnten zwar demonstrieren, dass Ap₄ über die Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren in Coronararterien eine Gefäßerweiterung auslöst [21], die P2Y₁-Rezeptoren sind jedoch nicht im renalen Endothel nachweisbar [110]. Somit ist die Vasodilatation wahrscheinlich durch Abbau von Ap₄ in ATP und seiner Derivate bedingt, welche starke Vasodilatoren in der Niere der Ratte darstellen [106]. Die stabilen Analoga des Ap₄ sind allerdings unempfindlicher gegenüber der enzymatischen Hydrolyse und lösen vermutlich deshalb unter α,β -metATP-Desensibilisierung keine Vasodilatation aus.

Der verhinderte Abbau der Analoga ist vermutlich auch der Grund, warum Ap₄ im direkten Vergleich mit ihnen eine schwächere vasokonstriktive Wirkung zeigt. Des Weiteren hängt die Stabilität anscheinend auch von der Position der Methyl-Gruppe ab. Je näher sie dem Nukleosidrest verortet ist, desto geringer ist offenbar der Abbau und desto stärker ist die vasokonstriktive Potenz.

Es wurde gezeigt, dass Ap₄ weit stabiler ist als ATP [113]. Der Grad des Abbaus des Ap₄ innerhalb von 2 Minuten beträgt 1,89%, während der des ATPs im selben Zeitraum bei 26,64% liegt. Dies bestätigt die Potenz und den verlängerten vasokonstriktiven Effekt sowie die höhere Affinität des Ap₄s zum P2X-Rezeptor.

Die vasokonstriktive in vitro-Wirkung des Ap₄ entspricht den hypertensiven in vivo-Effekten. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Ap₄ nach intraarterieller Applikation bei narkotisierten Ratten einen dosisabhängigen Anstieg des Blutdruckes auslöst. Die Vasokonstriktion hervorgerufen durch das stabile Analogon α,β -metAp₄ ist genauso potent wie NE und sogar noch potenter als α,β -metATP. Daher ist anzunehmen, dass Ap₄ ein Vasokonstriktor ist, der von menschlichen Endothelzellen sezerniert wird und bei der Regulation des systemischen Blutdruckes unter physiologischen und pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung bestätigt, dass der Plasmaspiegel des Ap₄ in einem Bereich liegt, der Vasokonstriktion auslöst. Dieser ist mit $255,6 \pm 82,4$ nmol/L [111] ca. 2 mal so hoch wie der Plasmaspiegel des ATPs (138 nmol/L) [114].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Hinblick auf diese Ergebnisse die pharmakologische Inhibition des Adenosintetraphosphat Ap_4 einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen könnte, die arterielle Hypertonie und der daraus resultierenden Entwicklung von Folgekrankheiten entgegenzuwirken.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die arterielle Hypertonie erhöht die Wahrscheinlichkeit, Arteriosklerose, koronare Herzerkrankungen, wie zum Beispiel Angina pectoris, Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen oder plötzlichen Herztod, sowie Schädigung der Niere und anderer Organe zu erleiden. Bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie ist das Endothel von Bedeutung. Dieses führt unter anderem über die Endothel-abgeleiteten gefäßkontrahierenden Faktoren (EDCF) zu einer Verengung des Gefäßes. Durch Versuche am Kleingefäßmyographen und der Messung des perivaskulären Blutflusses sowie der intraarteriellen Blutdruckmessung konnte bestätigt werden, dass das Mononukleotid Ap_4 und die stabilen Analoga neuartige, hochpotente EDCF sind, die die Potenz des α,β -metATP, dem stabilen Analogon des ATPs, sogar noch übersteigen. Damit ist Ap_4 der potenteste purinerge vasokonstriktive Agonist, der momentan bekannt ist, und über die $P2X_1$ - und $P2X_3$ -Rezeptoren wirkt. Das Mononukleotid wird von menschlichen Endothelzellen in einer effektiven Konzentration sezerniert, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass Ap_4 bei der Vasoregulation eine zentrale Rolle spielt.

Die stabilen Analoga des Ap_4 die hauptsächlich über den $P2X_1$ -Rezeptor wirken, weisen eine noch höhere vasokonstriktive Wirkung auf, wobei die Potenz von der Stellung der Methyl-Gruppe abhängig zu sein scheint. So nimmt der gefäßverengende Effekt von α,β -met Ap_4 zu β,γ -met Ap_4 und γ,δ -met Ap_4 ab. Dabei wird der Abbau des Analogon durch die Entfernung der Methyl-Gruppe vom Nukleosidrest wahrscheinlich noch begünstigt, was die geringere Potenz erklären könnte.

Diese Arbeit hebt die vasokonstriktiven Eigenschaften des Adenosintetraphosphat Ap_4 und seiner stabilen Analoga hervor und stellt die Rolle dieser Faktoren auf den peripheren Blutfluss, den Blutdruck und die Herzfrequenz dar. Des Weiteren wird auf deren pharmakologische Inhibition als eine mögliche Therapie der arteriellen Hypertonie aufmerksam gemacht.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Landsberg, L., *Obesity and hypertension: experimental data*. J Hypertens Suppl, 1992. **10**(7): p. S195-201.
2. Alderman, M.H., *Non-pharmacological treatment of hypertension*. Lancet, 1994. **344**(8918): p. 307-11.
3. Beilin, L.J. and I.B. Puddey, *Alcohol and hypertension*. Clin Exp Hypertens A, 1992. **14**(1-2): p. 119-38.
4. Falkner, B., *Blood pressure response to mental stress*. Am J Hypertens, 1991. **4**(11): p. 621S-623S.
5. Rudnick, K.V., et al., *Hypertension in a family practice*. Can Med Assoc J, 1977. **117**(5): p. 492-7.
6. Danielson, M. and B. Dammstrom, *The prevalence of secondary and curable hypertension*. Acta Med Scand, 1981. **209**(6): p. 451-5.
7. Sinclair, A.M., et al., *Secondary hypertension in a blood pressure clinic*. Arch Intern Med, 1987. **147**(7): p. 1289-93.
8. Moncada, S., et al., *An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation*. Nature, 1976. **263**(5579): p. 663-5.
9. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
10. Hickey, K.A., et al., *Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells*. Am J Physiol, 1985. **248**(5 Pt 1): p. C550-6.
11. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
12. Jankowski, V., et al., *Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 223-7.
13. Luscher, T.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. Hypertension, 1986. **8**(4): p. 344-8.
14. Luscher, T.F., *Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension?* Am J Hypertens, 1990. **3**(4): p. 317-30.

15. Vanhoutte, P.M., M. Feletou, and S. Taddei, *Endothelium-dependent contractions in hypertension*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(4): p. 449-58.
16. Guranowski, A., et al., *Methylene analogues of adenosine 5'-tetraphosphate. Their chemical synthesis and recognition by human and plant mononucleoside tetraphosphatases and dinucleoside tetraphosphatases*. FEBS J, 2006. **273**(4): p. 829-38.
17. Marrian, D.H., *A new adenine nucleotide*. Biochim Biophys Acta, 1954. **13**(2): p. 278-81.
18. Small, G.D. and C. Cooper, *Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate*. Biochemistry, 1966. **5**(1): p. 26-33.
19. Lobaton, C.D., et al., *Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: Acitivity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate*. Eur J Biochem, 1975. **50**(3): p. 495-501.
20. Van Dyke, K., et al., *An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP*. Pharmacology, 1977. **15**(5): p. 377-91.
21. Westhoff, T., et al., *Identification and characterization of adenosine 5'-tetraphosphate in human myocardial tissue*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 17735-40.
22. Kupriyanov, V.V., J.A. Ferretti, and R.S. Balaban, *Muscle adenylate kinase catalyzes adenosine 5'-tetraphosphate synthesis from ATP and ADP*. Biochim Biophys Acta, 1986. **869**(1): p. 107-11.
23. Randerath, K., et al., *Isolation and characterization of dinucleoside tetra- and triphosphates formed in the presence of lysyl-sRNA synthetase*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **24**(1): p. 98-105.
24. Ortiz, B., A. Sillero, and M.A. Gunther Sillero, *Specific synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine (n > 4) catalyzed by firefly luciferase*. Eur J Biochem, 1993. **212**(1): p. 263-70.
25. Guranowski, A., M.A. Gunther Sillero, and A. Sillero, *Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase*. J Bacteriol, 1994. **176**(10): p. 2986-90.
26. Dieckmann, R., M. Pavela-Vrancic, and H. von Dohren, *Synthesis of (di)adenosine polyphosphates by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS)*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1546**(1): p. 234-41.

27. Pietrowska-Borek, M., et al., *4-Coumarate:coenzyme A ligase has the catalytic capacity to synthesize and reuse various (di)adenosine polyphosphates*. Plant Physiol, 2003. **131**(3): p. 1401-10.
28. Madrid, O., et al., *T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates*. FEBS Lett, 1998. **433**(3): p. 283-6.
29. Atencia, E.A., et al., *T4 RNA ligase catalyzes the synthesis of dinucleoside polyphosphates*. Eur J Biochem, 1999. **261**(3): p. 802-11.
30. Guranowski, A., *Metabolism of diadenosine tetraphosphate (Ap4A) and related nucleotides in plants; review with historical and general perspective*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 1398-411.
31. Gualix, J., et al., *Presence of epsilon-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of epsilon-ATP*. FEBS Lett, 1996. **391**(1-2): p. 195-8.
32. Lee, J.W., et al., *Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta*. Yonsei Med J, 1995. **36**(6): p. 487-96.
33. Lewis, C.J., et al., *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**(1): p. 124-30.
34. Moreno, A., et al., *Dinucleosidetetraphosphatase from Ehrlich ascites tumour cells: inhibition by adenosine, guanosine and uridine 5'-tetraphosphates*. Int J Biochem, 1982. **14**(7): p. 629-34.
35. McLennan, A.G., et al., *Lanterns of the firefly Photinus pyralis contain abundant diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(8): p. 3706-9.
36. Guranowski, A., et al., *Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase from yellow lupin seeds: purification to homogeneity and some properties*. Biochem J, 1997. **328** (Pt 1): p. 257-62.
37. Guranowski, A., et al., *Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1380**(2): p. 232-8.
38. Reiss, J.R. and J.G. Moffatt, *Dismutation reactions of nucleoside polyphosphates. 3. The synthesis of alpha, omega-dinucleoside 5'-polyphosphates*. J Org Chem, 1965. **30**(10): p. 3381-7.

39. Zamecnik, P.C., et al., *Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **24**(1): p. 91-7.
40. Finamore, F.J. and A.H. Warner, *The occurrence of P1, P4-diguanosine 5'-tetraphosphate in brine shrimp eggs*. J Biol Chem, 1963. **238**: p. 344-8.
41. Rapaport, E. and P.C. Zamecnik, *Presence of diadenosine 5',5''' -P1, P4-tetraphosphate (Ap4A) in mamalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(11): p. 3984-8.
42. Weinmann-Dorsch, C., et al., *Drastic rise of intracellular adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine correlates with onset of DNA synthesis in eukaryotic cells*. Eur J Biochem, 1984. **138**(1): p. 179-85.
43. Jankowski, J., et al., *Identification and characterization of P(1), P(7)-Di(adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23926-31.
44. Luo, J., et al., *Identification of diadenosine hexaphosphate in human erythrocytes*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 872-5.
45. Pohl, U., et al., *Potent effects of AP3A and AP4A on coronary resistance and autacoid release of intact rabbit hearts*. Am J Physiol, 1991. **260**(5 Pt 2): p. H1692-7.
46. Gasmi, L., A.G. McLennan, and S.W. Edwards, *The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3442-9.
47. Gasmi, L., A.G. McLennan, and S.W. Edwards, *Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap5A and Ap6A: synergism with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Br J Haematol, 1996. **95**(4): p. 637-9.
48. Edgecombe, M., et al., *Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules*. Biochem J, 1997. **323** (Pt 2): p. 451-6.
49. Gasmi, L., J.L. Cartwright, and A.G. McLennan, *The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1405**(1-3): p. 121-7.
50. Grobber, B., et al., *An ecto-nucleotide pyrophosphatase is one of the main enzymes involved in the extracellular metabolism of ATP in rat C6 glioma*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 826-34.

51. van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht, *Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells*. J Neurochem, 1979. **33**(5): p. 999-1005.
52. Zhou, Q.Y., et al., *Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7432-6.
53. Feoktistov, I. and I. Biaggioni, *Adenosine A2B receptors*. Pharmacol Rev, 1997. **49**(4): p. 381-402.
54. Burnstock, G. and C. Kennedy, *Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?* Gen Pharmacol, 1985. **16**(5): p. 433-40.
55. Dubyak, G.R., *Signal transduction by P2-purinoceptor receptors for extracellular ATP*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **4**(4): p. 295-300.
56. Abbracchio, M.P. and G. Burnstock, *Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?* Pharmacol Ther, 1994. **64**(3): p. 445-75.
57. Gordon, J.L., *Extracellular ATP: effects, sources and fate*. Biochem J, 1986. **233**(2): p. 309-19.
58. Dahlquist, R. and B. Diamant, *Interaction of ATP and calcium on the rat mast cell: effect on histamine release*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1974. **34**(5): p. 368-84.
59. Steinberg, T.H. and S.C. Silverstein, *Extracellular ATP4- promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3118-22.
60. Hilderman, R.H., et al., *Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate*. J Biol Chem, 1991. **266**(11): p. 6915-8.
61. O'Connor, S.E., I.A. Dainty, and P. Leff, *Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(4): p. 137-41.
62. Abbracchio, M.P., et al., *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**(3): p. 281-341.
63. Ennion, S., S. Hagan, and R.J. Evans, *The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(38): p. 29361-7.
64. Jiang, L.H., et al., *Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34190-6.
65. Buell, G., et al., *P2X1 receptor activation in HL60 cells*. Blood, 1996. **87**(7): p. 2659-64.
66. Brake, A.J., M.J. Wagenbach, and D. Julius, *New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor*. Nature, 1994. **371**(6497): p. 519-23.

67. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
68. Bo, X., R. Schoepfer, and G. Burnstock, *Molecular cloning and characterization of a novel ATP P2X receptor subtype from embryonic chick skeletal muscle*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14401-7.
69. Vulchanova, L., et al., *Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals*. Neuropharmacology, 1997. **36**(9): p. 1229-42.
70. Evans, R.J., et al., *Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells*. J Physiol, 1996. **497** (Pt 2): p. 413-22.
71. Surprenant, A., et al., *The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)*. Science, 1996. **272**(5262): p. 735-8.
72. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
73. Humphrey, P.P., et al., *New insights on P2X purinoceptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **352**(6): p. 585-96.
74. Khakh, B.S., A. Surprenant, and P.P. Humphrey, *A study on P2X purinoceptors mediating the electrophysiological and contractile effects of purine nucleotides in rat vas deferens*. Br J Pharmacol, 1995. **115**(1): p. 177-85.
75. Ralevic, V., C.H. Hoyle, and G. Burnstock, *Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries*. J Physiol, 1995. **483** (Pt 3): p. 703-13.
76. Bianchi, B.R., et al., *Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes*. Eur J Pharmacol, 1999. **376**(1-2): p. 127-38.
77. Wildman, S.S., et al., *Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits*. Eur J Pharmacol, 1999. **367**(1): p. 119-23.
78. Virginio, C., et al., *Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(6): p. 969-73.
79. Trezise, D.J., et al., *P2 purinoceptor antagonist properties of pyridoxal-5-phosphate*. Eur J Pharmacol, 1994. **259**(3): p. 295-300.

80. Trezise, D.J., I. Kennedy, and P.P. Humphrey, *The use of antagonists to characterize the receptors mediating depolarization of the rat isolated vagus nerve by alpha, beta-methylene adenosine 5'-triphosphate*. Br J Pharmacol, 1994. **112**(1): p. 282-8.
81. Hoyle, C.H., G.E. Knight, and G. Burnstock, *Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli*. Br J Pharmacol, 1990. **99**(3): p. 617-21.
82. Evans, R.J. and A. Surprenant, *Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(2): p. 242-9.
83. Kidd, E.J., et al., *Localization of P2X purinoceptor transcripts in the rat nervous system*. Mol Pharmacol, 1995. **48**(4): p. 569-73.
84. Loesch, A. and G. Burnstock, *Electron-immunocytochemical localization of P2X1 receptors in the rat cerebellum*. Cell Tissue Res, 1998. **294**(2): p. 253-60.
85. Clifford, E.E., et al., *The P2X1 receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes*. Blood, 1998. **91**(9): p. 3172-81.
86. Burnstock, G., *A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain*. Lancet, 1996. **347**(9015): p. 1604-5.
87. Khakh, B.S., et al., *International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 107-18.
88. Barnard, E.A., G. Burnstock, and T.E. Webb, *G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family*. Trends Pharmacol Sci, 1994. **15**(3): p. 67-70.
89. Boarder, M.R., et al., *G protein-coupled P2 purinoceptors: from molecular biology to functional responses*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(4): p. 133-9.
90. North, R.A. and E.A. Barnard, *Nucleotide receptors*. Curr Opin Neurobiol, 1997. **7**(3): p. 346-57.
91. Abbracchio, M.P., et al., *Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(2): p. 52-5.
92. Li, Q., et al., *Evidence that the p2y3 receptor is the avian homologue of the mammalian P2Y6 receptor*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(3): p. 541-6.

93. Harden, T.K., J.L. Boyer, and R.A. Nicholas, *P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995. **35**: p. 541-79.
94. Schachter, J.B., et al., *Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinoceptor*. *Br J Pharmacol*, 1996. **118**(1): p. 167-73.
95. Communi, D., et al., *Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 31969-73.
96. Filippov, A.K., et al., *Inhibition by heterologously-expressed P2Y2 nucleotide receptors of N-type calcium currents in rat sympathetic neurones*. *Br J Pharmacol*, 1997. **121**(5): p. 849-51.
97. Filippov, A.K., et al., *P2Y2 nucleotide receptors expressed heterologously in sympathetic neurons inhibit both N-type Ca²⁺ and M-type K⁺ currents*. *J Neurosci*, 1998. **18**(14): p. 5170-9.
98. Filippov, A.K., et al., *Dual coupling of heterologously-expressed rat P2Y6 nucleotide receptors to N-type Ca²⁺ and M-type K⁺ currents in rat sympathetic neurones*. *Br J Pharmacol*, 1999. **126**(4): p. 1009-17.
99. Filippov, A.K., D.A. Brown, and E.A. Barnard, *The P2Y(1) receptor closes the N-type Ca(2+) channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists*. *Br J Pharmacol*, 2000. **129**(6): p. 1063-6.
100. Filippov, A.K., et al., *Coupling of the nucleotide P2Y4 receptor to neuronal ion channels*. *Br J Pharmacol*, 2003. **138**(2): p. 400-6.
101. Filippov, A.K., et al., *Activation and inhibition of neuronal G protein-gated inwardly rectifying K(+) channels by P2Y nucleotide receptors*. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(3): p. 468-77.
102. Brown, D.A., A.K. Filippov, and E.A. Barnard, *Inhibition of potassium and calcium currents in neurones by molecularly-defined P2Y receptors*. *J Auton Nerv Syst*, 2000. **81**(1-3): p. 31-6.
103. Simon, J., et al., *Characterization and channel coupling of the P2Y(12) nucleotide receptor of brain capillary endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 31390-400.
104. Mulvany, M.J. and W. Halpern, *Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ*. *Nature*, 1976. **260**(5552): p. 617-9.

105. Nyborg, N.C., J. Byg-Hansen, and M.J. Mulvany, *Effect of felodipine on resistance vessels from spontaneously hypertensive and normotensive rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1985. **7 Suppl 6**: p. S43-6.
106. Eltze, M. and B. Ullrich, *Characterization of vascular P2 purinoceptors in the rat isolated perfused kidney*. Eur J Pharmacol, 1996. **306**(1-3): p. 139-52.
107. Bodin, P. and G. Burnstock, *ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **27**(6): p. 872-5.
108. Ralevic, V., et al., *Flow-induced release of adenosine 5'-triphosphate from endothelial cells of the rat mesenteric arterial bed*. Experientia, 1992. **48**(1): p. 31-4.
109. Yang, S., et al., *Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells*. Circ Res, 1994. **74**(3): p. 401-7.
110. Turner, C.M., et al., *The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study*. Cells Tissues Organs, 2003. **175**(2): p. 105-17.
111. Tolle, M., et al., *Adenosine 5'-Tetraphosphate Is a Highly Potent Purinergic Endothelium-Derived Vasoconstrictor*. Circ Res, 2008.
112. North, R.A., *Molecular physiology of P2X receptors*. Physiol Rev, 2002. **82**(4): p. 1013-67.
113. Gomez-Villafuertes, R., et al., *Adenosine 5'-tetraphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors*. Neuropharmacology, 2000. **39**(12): p. 2381-90.
114. Gorman, M.W., et al., *Measurement of adenine nucleotides in plasma*. Luminescence, 2003. **18**(3): p. 173-81.

7 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet für die ansprechende Themenstellung, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und Laborräume sowie für die kritische Durchsicht meiner Dissertation.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Markus Tölle für die Einarbeitung und die Hilfestellung während der Labortätigkeit sowie für die Unterstützung bei dieser Dissertation.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Myriam Lallinger für die Einarbeitung und auch bei Frau Dr. Alenka Vogel sowie Herrn Matthias Fröhde für die gute Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Nutzung der Arbeitsgeräte. Mein Dank gilt zudem allen übrigen Mitarbeitern des Labors für die angenehme kollegiale Atmosphäre.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während des Studiums und während meiner Dissertation. Ich bedanke mich an dieser Stelle besonders für das Korrekturlesen und die damit verbundene Mühe.

8 CURRICULUM VITAE

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 ERKLÄRUNG

„Ich, Antonjas Tozman, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Charakterisierung stabiler Analoga von Adenosintetraphosphat als potenteste Aktivatoren des P2X₁-Rezeptors* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

9. September 2009

Datum

Unterschrift