

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

DISSERTATION

Das endogene Lysophospholipid Sphingosylphosphorylcholin ist ein  
potenter Aktivator der endothelialen NO-Synthase.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Marco Maudrich  
aus Leipzig

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
2. Prof. Dr. med. G. Schönfelder  
3. Prof. Dr. med. B. Levkau

**Datum der Promotion: 23.3.02007**

**Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:**

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

**I. Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Die endotheliale Funktion .....	1
1.1.1 NO-Synthasen .....	1
1.2. Pathogenese der endothelialen Dysfunktion .....	2
1.2.1 Sauerstoffradikalspezies.....	2
1.2.2 NAD(P)H Oxidasen .....	3
1.3. Atherosklerose.....	4
1.3.1. Ätiologie.....	5
1.3.2. Pathophysiologie .....	6
1.4. HDL (High Density Lipoprotein).....	7
1.4.1. Epidemiologie .....	7
1.4.2. Effekte des HDL auf die LDL Oxidation.....	8
1.4.2. Antiatherosklerotische und antiinflammatorische Funktionen des HDL.....	9
1.4.3. Lysophospholipide .....	11
1.4.5. Lysophospholipide Bestandteil von HDL .....	12
1.5. Fragestellung .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	15
2.1. Material .....	15
2.1.1. Verwendete Pufferlösungen und Substanzen.....	15
2.1.2. Substanzen.....	16
2.1.3. Tiere zur Explantation .....	17
2.2. Verwendete technische Materialien .....	17
2.2.1. Geräte und Hilfsmittel .....	17
2.2.2. Verbrauchsmaterial .....	18
2.2.3. Software .....	18
2.2.4. Firmenverzeichnis .....	19
2.3. Der Kleingefäß-Myograph: .....	20
2.3.1. Allgemeine Arbeitsweise des Myographen: .....	20
2.3.2. Die allgemeinen physiologischen Gegebenheiten: .....	21
2.3.3. Aufbau des Kleingefäß-Myographen:.....	23
2.3.4. Der Versuchsablauf: .....	24
2.3.5. Eichung des Kraftmessers: .....	25

2.3.6. Die Standardisierung des normalisierten Lumendurchmesser .....	26
2.3.7. Beweise für die Vitalität der Gefäße: .....	27
2.3.8. Dosiswirkungskurven verschiedener Agonisten: .....	28
2.3.9. Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse: .....	29
2.3.10. Deendothelialisierung der Gefäße: .....	29
2.3.11. Statistik: .....	29
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1. Dosisabhängige Vasokonstriktion an thorakalen Aorten von WKY Ratten durch Phenylephrin .....	31
3.2 Dosisabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin an vorkontrahierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten .....	32
3.3. Dosisabhängige Vasodilatation an vorkontrahierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten durch SNP .....	33
3.4. Vasodilatation an mit L-NAME vorbehandelten und PE vorkontahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten mittels ACh und SNP .....	34
3.5. Dosisabhängige Wirkung von Ach und SNP auf vorkontrahierte Aortenringe der in dieser Arbeit eingesetzten Tierstämme .....	35
3.6. Wirkung einzelner HDL-Komponenten auf den Vasotonus von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratte .....	38
3.7. Vasodilatation an PE vorkontahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten mittels SPC .....	40
3.8. Dosisabhängige Wirkung von SPC auf thorakale Aortenringe von eNOS defizienten-Mäusen und C57BL/6-Mäusen .....	41
3.9. Wirkung von SPC und ACh auf die Vasodilatation unter eNOS Inhibition durch L-NAME und chemischer Endothelentfernung von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten .....	42
3.13. Dosisabhängige Wirkung des Lysophospholipids SPC an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten unter basalen Bedingungen .....	44
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>45</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>51</b>
<b>7. Danksagung</b> .....	<b>62</b>
<b>8. Curriculum vitae</b> .....	<b>63</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>64</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geräteanordnung des Kleingefäß-Myographen (aus „Procedure for investigation of small vessel using small vessel myograph“, Mulvany M.J., 1996) .....	22
Abbildung 2: Darstellung der Kalibrierungswaage bei Eichung des Kraftmessers .....	25
Abbildung 3: Darstellung eines Normalisationsvorganges.....	27
Abbildung 4: Dargestellt ist die nicht kumulative DWK von PE in der Anwendung an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	31
Abbildung 5: Dargestellt ist eine kumulative DWK von ACh an durch PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	32
Abbildung 6: Dargestellt ist die kumulative DWK von SNP an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratte am Kleingefäßmyographen.....	33
Abbildung 7: Dargestellt ist die Wirkung von ACh und SNP auf mit PE vorkontrahierte thorakale Aortenringe von WKY-Ratten, sowie nach eNOS Inhibition durch L-NAME am Kleingefäßmyographen.....	34
Abbildung 8: Dargestellt sind kumulative Dosis-Wirkungskurven von ACh und SNP an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	36
Abbildung 9: Dargestellt sind kumulative DWK von ACh und SNP an unterschiedlichen thorakalen Aortenringen von C57BL/6-Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	37
Abbildung 10: Dargestellt sind kumulative Dosiswirkungskurven von ACh und SNP an thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten-Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	37
Abbildung 11: DWK von ACh und SNP an thorakalen Aortenringpräparaten von S1P <sub>3</sub> defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	38
Abbildung 12: Wirkung der aufgereinigten Lipid- und Proteinfraction des HDL-Moleküls auf den Gefäßtonus thorakaler Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	38
Abbildung 13: Dargestellt ist der Einfluss von SPC auf den Gefäßtonus von verschiedenen vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	40
Abbildung 14: Dargestellt sind kumulative DWK des HDL-assoziierten Sphingolipids SPC an verschiedenen vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defiziente-Mäusen und C57BL/6-Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	41
Abbildung 15: Wirkung von SPC auf thorakale Aorten von WKY-Ratten unter verschiedenen Bedingungen.....	42
Abbildung 16: Wirkung von SPC auf die thorakalen Aortenringe von S1P <sub>3</sub> -Rezeptor +/+ und S1P <sub>3</sub> -Rezeptor -/- Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	43

Abbildung 17: Dargestellt ist eine kumulative DWK der Wirkung des Lysosphospholipides SPC ohne Vorkontraktionsbedingungen an thorakaen Aortenringen von WKY-Ratten. .... 44

**III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Deutsche Todesursachenstatistik von 1999 (Quelle: Statistisches Bundesamt) ..... 5  
Tabelle 2: PSS (Tyrodelösung)..... 15  
Tabelle 3: HBSS (HEPES modifizierte Salzlösung)..... 15



## IV. Abkürzungsverzeichnis

**Abkürzungen:**

ACh	Acetylcholin
Ang II	Angiotensin II
Antiphospholipid-Ak	Antiphospholipid-Antikörper
apoA-I	Apolipoprotein A-I
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DNA (engl.)	Deoxyribonucleid Acid (Deoxyribonukleotid Säure)
DPI	Diphenylene iodonium
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
ECAT (engl.)	European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study
EDG (engl.)	Endothelial Differentiation Gene (endotheliales Differenzierungsgen)
eNOS (engl.)	endothelial Nitric Oxide Synthase (endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase)
FAD	Flavin Adenin Dinucleotid
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
g	Gramm
G2A (engl.)	G2 accumulation protein (G2 Akkumulationsprotein)
GC	Guanylatcyclase
GMP	Guanosin-Mono-Phosphat
GPR-4 (engl.)	G-Protein coupled receptor 4 (G-Protein gebundener Rezeptor 4)
GTP	Guanosin-Tri-Phosphat
H	Wasserstoff
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
Häm	Fe-Protophyrin
HBSS	HEPES modifizierte Salzlösung
HDL (engl.)	High Density Lipoprotein (Lipoprotein hoher Dichte)

HDL-C (engl.)	High Density Lipoprotein-Cholesterin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffsuperoxid
HLA-DR (engl.)	Human Leukocyte Antigen –DR (humanes Leukozyten Antigen-DR)
HUVEC (engl.)	Humane Umbilical Venose Endothel Cells (humane umbilikale venöse Endothelzellen)
IC (engl.)	Internal Circumference (Innendurchmesser)
ICAM-1 (engl.)	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
iNOS (engl.)	induced Nitric Oxide Synthase (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase)
γ- <i>INF</i>	γ-Interferon
IUPHAR (engl.)	International Union of Pharmacology (Internationale Union für Pharmakologie)
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
Kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LCAT (engl.)	Lecithin Cholesterin Azytransferase
LDL (engl.)	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein geringer Dichte)
L-NAME	L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipid
LPS	Lipopolysaccharid
LSF	Lysosulfatid
MCP-1 (engl.)	Monocyte Chemotactic Protein-1 (Chemotaktisches Monozyten Protein- 1)
min	Minuten
ml	Milliliter
M	Mol

mm	Millimeter
mM	Millimol
$\mu\text{M}$	Mikromol
$\mu\text{m}$	Mikrometer
mN	Millinewton
NaCl	Natriumchlorid
$\text{NAD}^+$	Nikotinamid-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, protonierte Form
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Dinatriumethylendiaminetetraessigsäure
$\text{NaHCO}_3$	Natriumhydrogencarbonat
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Natriumhydrogenphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NE (engl.)	Norepinephrin (Noradrenalin)
nM	Nanomol
nNOS (engl.)	neuronal Nitric Oxide Synthase (neuronale Stickstoffmonoxid Synthase)
NO	Stickstoffmonoxid
$\text{NO}_2$	Stickstoffdioxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
$\text{O}_2$	Sauerstoff
$\text{O}_2^-$	Superoxidradikal
OH	Hydroxygruppe
$\text{ONOO}^-$	Peroxyinitrit
ORG-1 (engl.)	Ovarian cancer G-Protein coupled receptor ( ovarial Carzinom gekoppelter G-Protein Rezeptor)
oxLDL (engl.)	oxidierte Form des Low Density Lipoproteins
P (engl.)	Pressure (Druck)
PAF (engl.)	Platlet Activating Factor (Plättchen Aktivierungsfaktor)
PAF-AH (engl.)	Platlet Activating Factor – Acetylhydrolase (Plättchen Aktivierungsfaktor-Acetylhydrolase)
PDGF (engl.)	Platelet Derived Growth Factor (Plättchen gebildeter

	Wachstumsfaktor)
PE	Phenylephrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostacyclin
pM	Picomol
PSS	physiologische Salzlösung
RCT (engl.)	Reverse Cholesterin Transport (reverser Cholesterintransport)
ROS (engl.)	Reactive Oxygen Species (Radikale Sauerstoffabkömmlinge)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SNP (engl.)	Sodiumnitroprussid (Natrium Nitroprussid)
SOD	Superoxiddismutase
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
SR –BI (engl.)	Scavenger Rezeptor BI
TGF (engl.)	Tumor Growth Factor (Tumor Wachstumsfaktor)
TNF- $\alpha$ (engl.)	Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ )
t-PA (engl.)	tissue Plasminogen Activator (Gewebe Plasminogen Aktivator)
VA-HIT (engl.)	High-Density-Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial of the Department of Veterans Affairs
VCAM-1 (engl.)	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (Gefäßzelladhäsionsmolekül 1)
VLDL (engl.)	Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotein sehr geringer Dichte)
VSMCs (engl.)	Vascular Smooth Muscle Cells (glatte Gefäßmuskelzellen)
WKY	Wistar Kyoto

### **7. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Laborräume und Arbeitsmittel sowie die freundliche Hilfe in allen Situationen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med Markus Tölle für die Betreuung während der Labortätigkeit und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Besonders möchte ich Ihm danken für die verständnisvolle Förderung, die Bereitschaft Fragen geduldig zu beantworten, sowie seine Fähigkeit Probleme zu lösen. All das hat zur guten und entspannten Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen.

Für die gute Kooperation im Labor und die gemeinsame Nutzung der Arbeitsgeräte, möchte ich Frau Julia Steinhagen und Frau Nadja Müller danken.

Frau Daniela Blaschke und Herr Konrad Henze haben ebenfalls wesentlich zum guten Klima und zur unkomplizierten Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe beigetragen und für regen Gedankenaustausch gesorgt.

Ich danke meiner Frau Barbara Mathis, die zu mir gehalten und mich in kritischen Stunden aufgebaut und motiviert hat.

Besonders wichtig war und ist die Unterstützung meiner Familie, die mir den Rücken gestärkt und an mich geglaubt hat, sowohl während meines Studiums als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich danke ganz besonders meiner Großmutter Frau Hildegard Wollmann und meiner Tante Frau Dagmar Wollmann.

## 8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Name Maudrich (geborener Schmidt)

Vorname Marco

**Erklärung**

„Ich, Marco Maudrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Das endogene Lysophospholipid Sphingosylphosphorylcholin ist ein potenter Aktivator der endothelialen NO-Synthase selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

gez. Marco Maudrich

Datum

Unterschrift