

1. Einleitung**1.1. Die endotheliale Funktion**

Die Gefäßendothelzellen bilden ein einfaches aber funktionelles Organ, das die unterschiedlichsten biologischen Prozesse, wie Hämostase, Fibrinolyse, Entzündung, Blutdruck, Angiogenese und Lipoproteinmetabolismus reguliert (O'Connell and Genest 2001). Das Endothel hat die Aufgabe eine antithrombogene Oberfläche zu bilden, es produziert eine Anzahl Mediatoren für die Regulation des Gefäßtonus und der Gefäßstruktur (Alexander and Griendling 1996). Ein besonders bedeutsamer durch das Endothel gebildeter Faktor ist das Stickstoffmonoxid (NO). Das Endothel besteht aus nur einer Schicht Zellen, trotzdem umfasst es ein bedeutendes Oberflächenareal und Masse (Alexander and Griendling 1996).

1.1.1 NO-Synthasen

Eine Vasodilatation wird unter anderem durch Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. Dieses wird durch spezifische Enzymsysteme, den NO-Synthasen (NOS), als Antwort auf verschiedene Reize, wie etwa intraluminale Scherkräfte oder durch Einwirkung neurohumeraler Faktoren wie Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin und Substanz P gebildet (O'Connell and Genest 2001). Die Relaxation wird durch die Aktivierung der Guanylatcyclase eingeleitet (Bode-Boger, Boger et al. 1996). NO hemmt ebenfalls die Thrombozytenaggregation und die Leukozytenadhäsion an das Endothel (Moncada and Palmer 1991). Obwohl nur kurz wirksam ist NO der einflussreichste Vasodilatator der glatten Muskelzellen (Vanhoutte 1997), es besitzt eine Halbwertszeit von 2-5 Sekunden (Moncada and Palmer 1991). Durch drei Isoformen der NO-Synthasen, die endotheliale NOS (eNOS) (Cannon 1998), die neuronale NOS (nNOS) (Charles, Chubb et al. 1993) und die induzierbare NOS (iNOS) (MacNaul and Hutchinson 1993), wird NO auf einen Reiz hin mehr oder weniger schnell gebildet. Die NO-Synthasen benötigen als Co-Substrat Flavin-Mono-Nukleotid (FMN), Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH), Calmodulin und Fe-Protophyrin IX (Häm). Durch die Abspaltung der Guaninogruppe der Aminosäure L-Arginin bei gleichzeitigem Verbrauch von Sauerstoff und protoniertem NADPH wird NO und L-Citrullin gebildet. Dabei wird die Aktivität der NO-Synthasen durch den Anteil des freien Calciums im intrazellulären Raum und Calmodulin bestimmt. Wenn das freie Calcium über den Wert von 500 nM ansteigt, wird die NO-Synthase aktiviert und führt zur Bildung von NO (Schmidt, Pollock et al. 1992).

1.2. Pathogenese der endothelialen Dysfunktion

Unter einer endothelialen Dysfunktion versteht man die Unfähigkeit des Gefäßendothels, die physiologischen Mechanismen zur Regulation des Gefäßradius, der Blutgerinnung, der Produktion antiinflammatorischer Cytokine oder der morphologischen Regulation der Gefäße in einer angemessenen Weise zu leisten (Gimbrone, Cybulsky et al. 1995). Heute bezeichnet man darunter, häufig unpräzise, eine verminderte Fähigkeit des Endothels auf einen adäquaten Reiz hin mit einer NO-Freisetzung zu reagieren. Dabei besitzt die endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Atherosklerose, diese wird durch eine verminderte NO Bioverfügbarkeit und einer erhöhten Affinität der Endotheloberfläche für Makrophagen charakterisiert (Assmann and Nofer 2003). Das Fehlen eines Substrates wie L-Arginin oder Fe-Protophyrin führt zur Bildung von Superoxidradikalen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieser Vorgang wird auch als Abkopplung bezeichnet (Heinzel, John et al. 1992). Die Abkopplung führt zum oxidativen Stress und verursacht eine endotheliale Dysfunktion über mehrere Mechanismen. Es kommt zu einer Reduzierung der NO Produktion, dadurch sind Sauerstoffradikale in der Lage die Zellen anzugreifen. Gleichzeitig produzieren die NO-Synthasen zusätzlich O_2^- und erhöhen so die Konzentration der Sauerstoffradikale. Unter einer partiellen Abkopplung versteht man die simultane Produktion von NO und O_2^- . Veränderungen in einer oder mehreren physiologischen Funktionen der Gefäßendothelien führt zur endothelialen Dysfunktion. Die Hemmung der Endothel abhängigen Relaxation durch die Abnahme der Bioverfügbarkeit des NO, durch Veränderungen der NO-Bildung, ist das auffälligste Ereignis der endothelialen Dysfunktion (Genest 2001; Igarashi, Bernier et al. 2001). Neben der verminderten NO-Bioverfügbarkeit stellt die vaskuläre Sauerstoffradikalproduktion einen wichtigen Mechanismus für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion dar. Dabei bildet das Endothel den wesentlichen Anteil der vaskulären Sauerstoffradikalproduktion.

1.2.1 Sauerstoffradikalspezies

Radikale sind Reaktionsprodukte, die ein ungepaartes Elektron in ihrer äußeren Hülle tragen, dadurch erhalten sie eine hohe Potenz mit anderen Molekülen chemische Reaktionen einzugehen. Es werden eine Reihe von Radikalen, insbesondere Superoxidanion (O_2^-) und eine Reihe von Nitrosylradikalen ($ONOO^-$) gebildet. Andere Sauerstoffabkömmlinge besitzen keine ungepaarten Elektronen in ihrer Hülle und sind damit per Definition keine Radikale, aber auch

sehr reaktionsfähig und werden klassischen Sauerstoffradikalen gleichgestellt, etwa Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Sauerstoffabkömmlinge können zahlreiche oxidative Veränderungen an Molekülen des Organismus auslösen und dadurch die physiologischen Funktionen verändern. Aus der Reaktion von O_2^- und NO entsteht Peroxynitrit ONOO^- , dieses zerfällt sehr schnell zu $\text{OH} + \text{NO}_2$. Es wurde bewiesen, dass jeder Zelltyp der Gefäßwand ROS produziert und ebenfalls durch ROS reguliert wird (Griendling and Alexander 1997; Suzuki, Malekan et al. 1999). In früheren Arbeiten wurde die Xanthinoxidase als primäre Quelle der Endothel abhängigen O_2^- Produktion angesehen (Zweier, Kuppusamy et al. 1988; Phan, Gannon et al. 1989). Es existieren aber noch weitere Enzymsysteme, die ROS produzieren, insbesondere NAD(P)H-Oxidasen, daneben mitochondriale Oxidase, Cyclooxygenase, Lipoxygenase und NO-Synthasen. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass unter diesen verschiedenen ROS produzierenden Enzymsystemen die NAD(P)H-Oxidasen die Hauptquellen der ROS-Produktion in den Endothelzellen und Myozyten darstellen (Mohazzab, Kaminski et al. 1994; Rajagopalan, Kurz et al. 1996; Griendling, Sorescu et al. 2000). Daher soll auf dieses Enzymsystem näher eingegangen werden.

1.2.2 NAD(P)H Oxidasen

Die NAD(P)H Oxidasen des kardiovaskulären Systems sind Membran assoziierte Enzyme, die die Reduktion eines Elektrons des Sauerstoffs mit Hilfe von NADH oder NAD(P)H als Elektronenspende katalysieren:

NADPH-Oxidase:



Diese enzymatische Aktivität bildet die wesentliche Oxidase in Gefäßgewebe und in den Herzzellen (Mohazzab, Kaminski et al. 1994; Pagano, Ito et al. 1995; Rajagopalan, Kurz et al. 1996). NADH und NAD(P)H scheinen gleichwertig als Substrat der Oxidase in VSMCs zu sein (Sorescu, Somers et al. 2001). In Endothelzellen herrscht aber die NADH getriebene O_2^- Produktion vor (Harrison, Cai et al. 2003). Die verschiedenen NAD(P)H-Oxidasen besitzen unterschiedliche Mechanismen zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Die in den neutrophilen Granulozyten nachgewiesene membranständige NAD(P)H-Oxidase nutzt intrazellulär

vorhandenes NADPH oder NADH, zur Übertragung von Elektronen auf extrazellulär vorhandenen molekularen Sauerstoff (Meier and Habermehl 1991). Dieser Ablauf findet auch in Fibroblasten und Endothelzellen statt, wobei in Endothelzellen NADH überwiegend als Substrat Verwendung findet (Zulueta, Yu et al. 1995). Auch intrazellulär kommt es zur Bildung von Sauerstoffradikalen durch ein Ektoenzym (Griendling, Minieri et al. 1994; Zafari, Ushio-Fukai et al. 1998). Es wurde ermittelt, dass die kardiovaskulär gelegenen NAD(P)H-Oxidasen nur ein Drittel der Aktivität der sich in neutrophilen Granulozyten befindlichen NAD(P)H-Oxidasen besitzen. Die Sauerstoffradikalenbildung ist in neutrophilen Granulozyten innerhalb von Millisekunden nachweisbar, wohingegen die Bildung dieser ROS in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten erst nach Minuten bis Stunden nachweisbar ist (Murohara, Kugiyama et al. 1994). Die NAD(P)H-Oxidasen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wirkmechanismus, der Aktivität und ihrer Lage innerhalb der Zelle, besitzen aber die gleiche Funktion (Pagano, Chanock et al. 1998). Gemeinsam ist den NAD(P)H-Oxidasen ebenfalls, dass sie durch Diphenyleneiodonium (DPI), einen Hemmer von Flavin enthaltenden Oxidasen, inhibiert werden. Eine Stimulation der NAD(P)H-Oxidasen erfolgt durch Arachidonsäure oder deren Abkömmlinge (Griendling and Ushio-Fukai 1998). Die Struktur der NAD(P)H-Oxidasen der Gefäßzellen entspricht nahezu der von neutrophilen Granulozyten. Die vaskulären und neutrophilen NAD(P)H-Oxidasen sind verschiedene Enzyme mit zum Teil ähnlichen Eigenschaften (Souza, Laurindo et al. 2001; Touyz and Schiffrin 2004). Es handelt sich dabei um Oxidasen, welche aus einem membranständigen Flavocytochrom, dem Cytochrom b 558 besteht. Dieses Cytochrom besteht aus zwei Glykoproteinen -gp91phox und p22phox, sowie den zytosolischen Komponenten p40phox, p47phox, p67phox und dem G-Protein Rac2 (Dang, Babior et al. 1999). Die zytosolische Komponente p47phox transferiert FAD zum Cytochrom b 558 und ermöglicht somit die Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff, es entsteht O_2^- (Dang, Babior et al. 1999).

1.3. Atherosklerose

Atherosklerose ist die häufigste krankhafte Gefäßveränderung, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lichtungseinengung der Arterien einhergeht (Ross 1999). Atherosklerose bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen stehen in der deutschen Todesursachenstatistik an vorderster Stelle.

Tabelle 1: Die Daten der unten aufgeführten Tabelle geben einen Überblick über den Anteil kardiovaskulärer Erkrankungen in der deutschen Todesursachenstatistik von 1999 (Quelle: Statistisches Bundesamt)

Todesursache	Anzahl (gesamt)	Anteil (in %)
Alle Todesursachen	852.382	100
Kardiovaskuläre Erkrankungen	408.121	48
- Ischämische (koronare) Herzkrankheit	175.081	21
- davon: Akuter Myokardinfarkt	70.149	8
- Krankheiten des zerebrovaskulären Systems	85.775	10
- davon: Schlaganfall	47.110	6
im Vergleich:		
Krebserkrankungen	216.264	26
Krankheiten des Atmungssystems	51.505	6
Krankheiten des Verdauungssystems	40.154	5

1.3.1. Ätiologie

Risikofaktoren für das Entstehen der Atherosklerose sind zum einen unbeeinflussbare, wie die familiäre Disposition, das Lebensalter und männliches Geschlecht. Beeinflussbare Risikofaktoren werden in 1. Ordnung und 2. Ordnung unterteilt. Zu den Faktoren der 1. Ordnung zählen die Fettstoffwechselstörungen, der Anstieg von Gesamtcholesterin, LDL und Triglyzeriden, bei gleichzeitigem Absinken des HDL. Sowie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, das metabolische Syndrom [Am Beginn dieser Erkrankungen steht die Insulinresistenz der Skelettmuskulatur mit konsekutiver Hyperinsulinämie und Entwicklung einer vorzeitigen Atherosklerose: Stammbetonte Adipositas, pathologische Glukosetoleranz bzw. Typ 2-Diabetes, Dyslipoproteinämie (Triglyzeride steigen, HDL fällt), Hyperurikämie, essenzielle Hypertonie. Insulinresistenz als Ursache aller Erkrankungen dieses Syndroms.], sowie Zigarettenrauchen auch passiv Rauchen.

Risikofaktoren 2. Ordnung: Lipoprotein (a) steigt, Hyperfibrinogenämie (>300 mg/dl), Hyperhomocysteinämie (>12 µmol/l), Antiphospholipid-Ak, Genetisch bedingte t-Pa-Defekte, Bewegungsmangel, psychosoziale Risikofaktoren (Harper and Jacobson 1999; von Eckardstein, Nofer et al. 2000). Sind zwei Risikofaktoren 1. Ordnung vorhanden, ist das Infarkttrisiko im Vergleich zu einer Normalperson vierfach erhöht, bei Vorliegen von drei Risikofaktoren 1. Ordnung zehnfaches Risiko (von Eckardstein, Nofer et al. 2000). Auch eine entzündliche-infektiöse Genese der Atherosklerose, durch persistierende Chlamydia pneumoniae-Infektion (Blanchard, Bailey et al. 1993) wird in Betracht gezogen.

1.3.2. Pathophysiologie

Der Auslöser der Atherosklerose ist ein Endothelschaden, die Ursache dieser Läsion ist strittig. Eine These geht von einer Anlagerung von T-Lymphozyten aus, die über Zytokine zu einer verminderten Zelladhäsion des Endothels führen (Sachais 2001). Dadurch gelangen Lipide aus dem Blut in die Intima. Dieses vorgeschädigte Endothel ist der Angriffsort der Thrombozyten, die zum einen den Wachstumsfaktor PDGF abgeben und andererseits Prostaglandine und Leukotriene produzieren, die die entzündliche Reaktion verstärken. Makrophagen und Monozyten phagozytieren die eingepressten Lipide (Jonasson, Holm et al. 1986). Es kommt zur Bildung von Schaumzellen. Gleichzeitig bilden sie HLA-DR aus, wodurch T-Lymphozyten zur Bildung von TNF- α und Interferon- γ angehalten werden, dadurch wird der Entzündungsprozess aufrechterhalten (Geng, Wu et al. 1996). Die Wachstumsfaktoren führen zu einer Proliferation des Bindegewebes und Synthese von Proteoglykanen. Es kommt zur irreversiblen Verhärtung des Gefäßes (Glagov, Weisenberg et al. 1987). Adhäsionsmoleküle werden induziert und entzündungsfördernde Zytokine und Wachstumsfaktoren werden von den Zellen produziert, die den arteriosklerotischen Prozess eingeleitet haben (Raines and Ross 1996). Das Lumen der Arterien wird verkleinert, das führt zu ischämischen Symptomen. Innerhalb der Läsionen kommt es unter dem Einfluss von proteolytischen Enzymen, die von den aktivierten Makrophagen, den Schaumzellen, den Wahrzeichen der Atherosklerose, stammen, zur Verflüssigung der Zentren der Plaques, sie nehmen ihr typisches Aussehen an. Die Seiten dieser Plaques erweichen und werden anfällig für Rupturen. Die Ruptur einer Plaque kann zu katastrophalen Thrombosen der Koronargefäße oder der Cerebralgefäße führen. Die großen Mengen Gewebefaktor, die von den Makrophagen produziert werden machen dieses Szenario wahrscheinlich. An ulzerierten Plaques kommt es zur Bindung von Thrombozyten und zur Thrombusbildung, diese können zu den oben beschriebenen ischämischen Attacken führen.

1.4. HDL (High Density Lipoprotein)

Als HDL werden eine Anzahl heterogener Lipoproteine bezeichnet, deren gemeinsames Kennzeichen eine Dichte > 1.063 g/ml und ein Durchmesser geringer Stokes's Durchmesser 5-17 nm ist (von Eckardstein et al. 1994). Die meisten HDL Teilchen enthalten Apolipoprotein A-I (apo)A-I. Die Unterschiede im Anteil an Lipiden, Apolipoproteinen, Enzymen und Lipid Transfer Proteinen führen zu einer Anzahl verschiedener HDL-Unterklassen. Sie unterscheiden sich in Form, Dichte, Größe, Ladung und Antigenität (von Eckardstein, Huang et al. 1994). In der klinischen Routine wird HDL normalerweise als HDL-Cholesterin quantifiziert. Die Mehrheit des HDL-Cholesterins ist in nur einer HDL Fraktion enthalten, diese wandert während der Elektrophorese im Agarosegel zur α -Bande. Diese α -Fraktion besteht aus großen, lipidreichen, sphärischen Teilchen und beinhaltet die beiden häufigsten HDL-Subfraktionen HDL₂ und HDL₃. Die sich nur durch den Dichtegradienten bei Ultrazentrifugation unterscheiden. Zwischen 5% und 15% des im menschlichen Plasma vorkommenden HDL gehören zur prä- β Fraktion, die sich wesentlich vom α -HDL unterscheiden. Es sind kleine, diskusförmige Teilchen, die Apolipoprotein A-I entweder als Lipid freies Apolipoprotein enthalten oder in Assoziation mit Sphingomyelin und Phosphatidylcholin (Barrans, Jaspard et al. 1996). Ähnliche Lipid arme Teilchen enthalten Apolipoprotein E oder Apolipoprotein IV als ihr einziges Apolipoprotein (Duverger, Ghalim et al. 1993; Geng, Wu et al. 1996). Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass in Relation zur Konzentration des Lipid reichen α -HDL, die Konzentration der lipidarmen prä- β HDL Teilchen im extravaskulärem Kompartiment erhöht ist (Nanjee, Cooke et al. 2000; Asztalos, Brousseau et al. 2001). Es wird angenommen, dass die antiatherogene Aktivität dieser Partikel dort stattfindet (Assmann and Nofer 2003). Beobachtungsstudien haben überwältigende Beweise für die Rolle erniedrigter HDL-Cholesterin Spiegel als unabhängige Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen geliefert (Gordon and Rifkind 1989; Genest, McNamara et al. 1991; Bolibar, von Eckardstein et al. 2000; Garcia, Liu et al. 2001).

1.4.1. Epidemiologie

Mehr als 40% der Patienten mit myokardialem Infarkt haben als einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen niedrige HDL-Spiegel (Genest, McNamara et al. 1991). In der prospektiven und multizentrischen European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities – Studie (ECAT) (Bolibar, von Eckardstein et al. 2000) wurden niedriges HDL-C und niedriges

apoA-I als die wichtigsten biochemischen Risikofaktoren für koronare Ereignisse bei Patienten mit angiographisch bestätigter KHK ermittelt (Bolibar, von Eckardstein et al. 2000). Die Risikoschwelle für HDL-C zwischen 35 mg/dl (0,9mmol/l) und 45 mg/dl (1.15mmol/l) definiert (Cullen and Assmann 2000). Aufgrund der Wechselwirkung hängt die Stärke des Vorkommens des kardiovaskulären Risikos und HDL-C besonders von zusätzlichen Risikofaktoren ab. Risikoschwellen sind erniedrigt bei Menschen mit Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie, oder bei mehreren anderen Risikofaktoren. Die Helsinki Heart Study (Frick, Elo et al. 1987) und das HDL-Cholesterin Intervention Trial of the Department of Veterans Affairs (VA-HIT) (Robins, Collins et al. 2001) zeigten, dass die Zunahme des HDL-Spiegels unter der Behandlung mit Gemfibrozil mit einer Abnahme der koronaren Ereignisse einherging (Rubins, Robins et al. 1999). Die Rolle des HDL, als wichtiger Bestandteil des Lösungsweges zur Ermittlung des koronaren Risikos ist etabliert (Gordon and Rifkind 1989).

1.4.2. Effekte des HDL auf die LDL Oxidation

Der schützende Effekt des HDL wurde vor allem seiner Rolle im reversen Cholesterintransport (RCT) zugeschrieben. Der RCT ist ein Weg um Cholesterin aus extrahepatischen Zellen und Geweben zu entfernen und zur Leber zu transportieren, um es dort auszuscheiden. Dadurch wird die Akkumulation von Cholesterin in den Arterien reduziert (Stein, Dabach et al. 1999; von Eckardstein, Nofer et al. 2000; Genest 2001). Allerdings haben in vitro Experimente, sowie genetische Familien- und Populationsstudien, aber auch transgenetische Tiere gezeigt, dass HDL Cholesterin Spiegel nicht notwendigerweise die Effizienz und Antiatherogenität des RCT bestimmen (von Eckardstein, Nofer et al. 2001). Wichtige Determinanten des HDL Metabolismus und des RCT sind die HDL assoziierten Enzyme Paraoxonase und Lecithin Cholesterin Acyltransferase (LCAT), diese werden inaktiviert durch mildes und extensiv oxidiertes LDL, dies resultiert in einer Störung des RCT. Es wurde demonstriert, dass das Cholesterin, das von oxidierten LDL zu Makrophagen geliefert wurde, primär in den Lysosomen sequestriert wurde und nicht dem normalen Efflux unterlag (Dhaliwal and Steinbrecher 2000). Diese Prävention der Oxidation von LDL durch HDL ist ebenfalls nützlich für die aktive Rolle des HDL im RCT und der Rückbildung der artherosklerotischen Plaques. HDL und Apolipoprotein A I stärken den Widerstand des LDL gegenüber der Oxidation und reduzieren die chemotaktische Aktivität des LDL (Navab, Berliner et al. 2001). Paraoxonase, ein HDL assoziiertes Enzym, verhindert die LDL Oxidation. Es verstärkt ebenfalls den Widerstand des

HDL gegenüber Oxidation, es erhält somit die Kapazität des HDL um den RCT zu induzieren (Mackness, Hine et al. 2004). Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, dass LCAT die Akkumulation von oxidierten Lipiden in LDL verhindert (Vohl, Neville et al. 1999). Sobald minimal oxidiertes LDL vorhanden ist, wird die Plasmaaktivität der LCAT gehemmt und somit der HDL Metabolismus und der RCT gestört (Bielski and Forte 1999). Die frühe Entzündungsphase der Atherosklerose beinhaltet die Generation des Platelet Activating Faktors (PAF) und oxidiertes Phospholipide mit PAF ähnlicher Bioaktivität in LDL (Subbanagounder, Leitinger et al. 1999). PAF ist ein potenter Lipidmediator, der Makrophagen stimuliert Superoxidanion zu produzieren, somit sind sie am Fortschreiten der Atherosklerose beteiligt. PAF und PAF ähnliche oxidierte Phospholipide werden inaktiviert durch die PAF-Acetylhydrolase PAF-AH (Stafforini, Zimmerman et al. 1992). Es wurde demonstriert, dass Adenovirus vermittelter Gentransfer von PAF-AH in Apolipoprotein E knockout Mäusen in einer Abnahme des oxidativen Stresses, Speicherung von oxidiertem LDL, und zu einer Ansammlung von glatten Muskelzellen und Makrophagen in der Arterienwand führt (Theilmeyer, De Geest et al. 2000). Dies führt zu einer Reduktion der verletzungsbedingten Neointimabildung und damit zu einer Prävention der spontanen Atherosklerose, dies deutet auf einen direkten antiatherogenen Effekt der PAF-AH (Theilmeyer, De Geest et al. 2000; Quarck, De Geest et al. 2001). Als Schlussfolgerung kann festgestellt werden, dass oxidiertes LDL und HDL wirkliche Antagonisten bei der Entwicklung der kardiovaskulären Erkrankungen sind (Mertens and Holvoet 2001).

1.4.2. Antiatherosklerotische und antiinflammatorische Funktionen des HDL

Verschiedene in vivo Studien haben Beweise für den unterstützenden Effekt des HDL auf die Endothelfunktion geliefert (O'Connell and Genest 2001). HDL beeinflusst ebenfalls antioxidative und antiinflammatorische Aktivitäten (Navab, Hama et al. 2000; Barter, Brewer et al. 2003). Einer der hauptsächlichsten antioxidativen/antiinflammatorischen Funktionen des HDL ist durch den Transportmechanismen begründet, mit dem oxidative Moleküle gebunden und abtransportiert werden (Barter, Nicholls et al. 2004). HDL transportiert auch Enzyme, die die Lipidhydroperoxide des oxidierten LDL zerstören (Navab, Berliner et al. 2001). Zu diesen Enzymen gehören Paraoxonase-1 und Paraoxonase-3 (Bowry, Stanley et al. 1992; Shih, Xia et al. 2000; Reddy, Wadleigh et al. 2001; Mackness, Hine et al. 2004) und möglicherweise Gluthation Phospholipid Peroxidase (Navab, Berliner et al. 2001). HDL transportiert auch Platelet

Activating Factor Acetylhydrolase (Watson, Navab et al. 1995) und Lecithin Cholesterol Ester Acetyltransferase (Forte, Subbanagounder et al. 2002), die in der Lage sind EO-6 positive oxidierte Phospholipide zu entfernen.

Ein früher Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist die Adhäsion der Monozyten an verletzte oder stimulierte Endothelzellen, die Adhäsionsproteine präsentieren. Shih et. al. haben berichtet, dass dieser Prozess mit der Adhäsion der Monozyten an das Endothel-Verbindungs Segment 1 durch die Aktivierung des $\beta 1$ Integrins beginnt (Shih, Elices et al. 1999). Aktivierte Endothelzellen präsentieren verschiedene Adhäsionsproteine, darunter auch das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), das Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), und E-Selectin (Carlos, Schwartz et al. 1990; Blankenberg, Barboux et al. 2003). Es ist bekannt dass diese Proteine in vivo an Arterien präsentiert werden, an denen es zur Entwicklung von Atherosklerose kommt (O'Brien, McDonald et al. 1996). Gelöste Formen dieser Proteine sind in erhöhten Konzentrationen im Plasma von Menschen mit koronarer Herzerkrankung nachweisbar (Blankenberg, Barboux et al. 2003). Sobald Monozyten an das Adhäsionsprotein auf der Oberfläche von Endothelzellen gebunden haben, sind sie durch Chemokine wie das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) in den subendothelialen Raum rekrutierbar. Die Entdeckung, dass menschliches HDL die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle und MCP-1 hemmt ist von großer Bedeutung (Barter and Rye 1996; Shah, Kaul et al. 2001).

Es wurde eine inverse Beziehung zwischen der NO-abhängigen Vasodilatation und den Plasmaspiegeln des HDL beobachtet, es konnte sogar die Wiederherstellung der Endothelfunktion bei Hypercholesterinämie nach Infusion von rekombiniertem HDL beobachtet werden (Spieker, Sudano et al. 2002). Die Erhöhung der HDL Plasmakonzentration reduzierte die Expression von Leukozyten Adhäsionsmolekülen (Cockerill, McDonald et al. 2001). Ebenso wurde die Inhibition endothelialer VCAM-1 Expression (Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül 1) und Neointimabildung in einem Tiermodell mit Arteria carotis Verletzung nachgewiesen (Dimayuga, Zhu et al. 1999). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte die Überexpression von apoA-I in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen zu einer signifikant reduzierten Monozytenrekrutierung in der Arterienwand (Theilmeyer, De Geest et al. 2000). Die Injektion von apoA-I oder rekombinierten HDL-Teilchen reduzierte die Thrombusformation an verletzter Endotheloberfläche (Li, Weng et al. 1999). Vor kurzem konnte ein direkter Rezeptorvermittelter antiatherosklerotischer Effekt von HDL-Molekülen nachgewiesen werden. HDL-Moleküle bewirken über die Aktivierung des Scavenger Rezeptor SR - BI Rezeptors (Yuhanna, Zhu et al. 2001) und des S1P₃ Rezeptors (Nofer, van der Giet et al. 2004) eine direkte

konzentrationsabhängige Aktivierung der eNOS mit direkter Freisetzung von NO mit einhergehender Vasodilatation (Nofer, van der Giet et al. 2004).

1.4.3. Lysophospholipide

Die Lysophospholipide basieren auf Sphingosin und Glycerol, sie sind Bestandteile der Zellmembran und können in verschieden polare Metaboliten verstoffwechselt werden. Die so entstandenen Lysophospholipide können in Sphingosin 1-Phosphat (S1P), Sphingosylphosphorylcholin (SPC), Lysosulfatid (LSF), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidsäure (LPA) unterteilt werden. Sie sind extra- und intrazelluläre Signalübertragungsmoleküle (Spiegel and Merrill 1996). In Endothelzellen wurde gezeigt, dass S1P eine großen Anzahl zellulärer Aktivitäten wie Angiogenese, Wundheilung, Apoptose und Atherosklerose reguliert (Kimura, Watanabe et al. 2000; Igarashi, Bernier et al. 2001). Das S1P wird durch eine große Anzahl unterschiedlicher Zellen sezerniert, darunter Thrombozyten, Mastzellen und Monozyten (Spiegel and Merrill 1996). Intrazelluläre Enzyme, wie Sphingomyelinase, die Ceramidase und die Sphingokinase scheinen für die Biosynthese dieser Mediatoren verantwortlich zu sein (Tabas 1999). Das S1P fördert die Zellmigration (Paik, Chae et al. 2001), die DNA-Synthese (Kimura, Watanabe et al. 2000), das Zellüberleben (Lee, Thangada et al. 1999), die Zellwandintegrität (Tamama, Kon et al. 2001), die NO-Produktion (Garcia, Liu et al. 2001), sowie die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (Okajima 2002).

1.4.4. S1P Rezeptoren

Die Lysophospholipide entfalten ihre Wirkung über extrazelluläre Rezeptoren, diese wurden früher als EDG (Endothelial Differentiation Gene) Rezeptoren bezeichnet. Heute werden diese Rezeptoren in 2 Gruppen mit 8 Rezeptoren eingeteilt, diese Einteilung folgt der IUPHAR (Chun, Goetzl et al. 2002). Der S1P₁-Rezeptor ist ein ubiquitär vorkommender, heptahelikaler G-Protein gekoppelter Rezeptor. S1P bindet mit hoher Spezifität und einer hohen Affinität. Auch andere Lysophospholipide binden an den S1P₁-Rezeptor, so aktiviert auch Sphingosylphosphorylcholin (SPC) den S1P₁-Rezeptor. Die Affinität ist etwa 10-100fach geringer (Okamoto, Takuwa et al. 1998). Auch der S1P₂-Rezeptor ist ein ubiquitär vorkommender, heptahelikaler, G-Protein gekoppelter Rezeptor. Der S1P₂-Rezeptor koppelt mit G_i-, G_q- und G_{12/13}-heteromeren Proteinen, während der S1P₁ –Rezeptor nur mit dem G_i-Protein koppelt (Lee, Thangada et al.

1999; Windh, Lee et al. 1999). Der S1P₃-Rezeptor koppelt über G_i-, Gq- und G_{12/13}-heteromere Proteine (Ancellin and Hla 1999; Lee, Kim et al. 1999) und die Guanosin-Tri-Phosphatase (GTPase) Rho (Paik, Chae et al. 2001). Suramin, ein polyzyklisches Anion hemmt diesen Rezeptor (Ancellin and Hla 1999). Dieser Rezeptortyp wird im Gefäßsystem, den Endothelzellen und in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Ishii, Friedman et al. 2001). Homologe Rekombinanten des S1P₃ Gens der Maus zeigten keinen veränderten Phänotyp, es wird angenommen, dass dieser Rezeptortyp redundante Funktionen als Heteromer mit anderen S1P-Rezeptoren eingeht (Ishii, Friedman et al. 2001). Das redundante Vorkommen der S1P-Rezeptorsubtypen maskiert eine Vielzahl physiologischer Funktionen, die erst in entsprechenden Rezeptor-defizienten Mäusen in Erscheinung treten. So führen HDL und S1P etwa über die Aktivierung des S1P₁- und des S1P₃-Rezeptors zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von Endothelzellen und zu einer Förderung der Endothelzellmigration (Kimura, Sato et al. 2003; Sato, Markiewicz et al. 2003). S1P vermittelt ebenfalls über den S1P₁- und den S1P₃-Rezeptoren Wachstum und morphologische Veränderungen neuronaler Progenitorzellen (Harada, Foley et al. 2004). Die physiologischen Funktionen der S1P₄- und S1P₅-Rezeptoren sind noch nicht abschließend untersucht. Es wurde festgestellt, dass sie vornehmlich in hämatopoetischen und neuronalen Zellen exprimiert werden (Van Brocklyn, Graler et al. 2000).

1.4.5. Lysophospholipide Bestandteil von HDL

Es ist bekannt, dass S1P das Zellwachstum und den programmierten Zelltod beeinflussen kann (Cuvillier, Pirianov et al. 1996). Alle komplex aufgebauten Sphingoide bestehen aus drei Komponenten, einer polaren Kopfgruppe aus Sphingomyelin oder Phosphatidylcholin, einem langkettigen auf Sphingoid basierendem Hauptteil und einer Fettsäure, die durch eine Amidgruppe am Hauptteil befestigt ist. Die Hauptgruppe kann aus Sphingosin, Dihydrosphingosin oder Phytosphingosin bestehen (Boujaoude, Bradshaw-Wilder et al. 2001). Durch die Hydrolyse von Sphingosinen aus der Plasmamembran entstehen hauptsächlich Ceramide. Diese können einerseits durch Ceramidasen zu Sphingosin metabolisiert werden, dass entweder reacytiliert wird oder durch Sphingokinase zu S1P phosphoryliert werden kann (Clair, Aoki et al. 2003). Dieser metabolische Zusammenhang ist von großer Bedeutung. Dabei ist besonders das Verhältnis von Ceramiden / Sphingosinen zu S1P von besonderer Bedeutung für den Erhalt der Zelle (Spiegel and Merrill 1996). Durch S1P wird die Wachstumsrate und die Überlebenszeit verschiedener Zelltypen verlängert (Spiegel and Kolesnick 2002). Die Ceramide

N-Acetylsphingosin und Sphingosin sind andererseits mit einem Wachstumsarrest und verstärktem Zelltod assoziiert (Spiegel and Kolesnick 2002).

SPC wurde in verschiedenen Zelltypen als Mitogen nachgewiesen (Nava, Cuvillier et al. 2000). Ausserhalb der Zellen bewirkt SPC einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Chen, Chin et al. 1998). Gleichfalls wurden SPC vermittelte Veränderungen des zellulären Zytoskelettes (Seufferlein and Rozengurt 1995), sowie eine Aktivierung der Kaliumkanäle der Herzmuskelzellen beschrieben (Bunemann, Liliom et al. 1996). Darüber hinaus wurden Veränderungen der Zellbeweglichkeit registriert (Boguslawski, Lyons et al. 2000). Die zum Teil ähnliche Wirkung des S1P und des SPC beruht auf einer Ähnlichkeit bezüglich der Affinität für die S1P –Rezeptoren. Dabei besitzt S1P allerdings eine höhere Bindungsfähigkeit für diese Rezeptoren. SPC kann intrazellulär keine Wirkung entfalten und wird auch nicht intrazellulär gebildet (Pyne and Pyne 2000). Andere Wirkungen des SPC erfolgen S1P-Rezeptoren unabhängig, durch spezifische SPC-Rezeptoren. Der erste SPC spezifische G-Protein gekoppelte SPC-Rezeptor wurde durch Xu et al. identifiziert. Dieser Rezeptor kann nicht durch S1P aktiviert werden und wird als Ovarian cancer G-Protein coupled receptor (ORG-1) bezeichnet (Xu, Zhu et al. 2000). SPC kommt ubiquitär vor, dabei wurde seine Konzentration im Plasma mit 50nM (Liliom, Sun et al. 2001), im Serum mit 130 nM (Liliom et al. 2001), im HDL mit 4 µM / mg Protein (Nofer, Fobker et al. 2000) sowie im LDL als geringer als im HDL (Nofer, Junker et al. 2001) ermittelt.

SPC bewirkt unter anderem einen mitogenen Effekt auf verschiedene Zellarten wie etwa auf Fibroblasten (Sewdarsen, Desai et al. 1991), oder Endothelzellen (Sun, Xu et al. 1996), oder auch auf humane Keratinozyten (Wakita, Matsushita et al. 1998), sowie VSMCs (Chin and Chueh 1998). Es wurde bewiesen, dass SPC auch direkt das Zellwachstum von Brusttumorzellen oder Ovarialtumorzellen hemmt (Xu et al. 1995). Diese doch sehr unterschiedlichen Effekte unterliegen dem jeweils aktivierten Rezeptor. Die Aktivierung des OGR-1 Rezeptors bewirkt die Inhibition des Zellwachstums (Xu, Zhu et al. 2000), im Gegensatz dazu führt die Aktivierung des G-Protein coupled receptors 4 (GPR-4 Rezeptors) (Yuhanna, Zhu et al. 2001) zu einer Zunahme des Zellwachstums. Darüberhinaus vermittelt SPC ebenso wie S1P die endotheliale Zellmigration und ist ein Vermittler der Gefäßneubildung (Chin et al. 1998).

Erst kürzlich wurde berichtet, dass S1P akkumuliert in der Lipoproteinfraktion, insbesondere in der HDL-Fraktion vorkommt, und das HDL assoziiertes S1P die zytoprotektiven Eigenschaften des HDL auf humane Nabelvenen - Endothelzellen (HUVECs) vermittelt (Okajima 2002). SPC und LSF sind ebenfalls als Bestandteile des HDL bekannt, die für dessen zytoprotektive

Eigenschaften verantwortlich sind (Nofer, Levkau et al. 2001). Eine neue Studie (Kimura, Sato et al. 2003) zeigte, dass HDL die Endothelzellmigration und das Endothelzellüberleben durch Aktivierung des S1P₁- und S1P₃-Rezeptor bewirkt. Sowohl HDL als auch S1P stimulieren frühe Signalwege die mit Zellmigration und Zellüberleben assoziiert sind (Kimura, Sato et al. 2003). Die HDL induzierte eNOS Stimulation wird zu einem großen Teil durch die HDL-assoziierten Lysophospholipide, S1P, SPC und LSF über die Aktivierung des S1P₃ Rezeptors vermittelt.

1.5. Fragestellung:

Es ist bekannt, dass das HDL und die assoziierten LPL die Entstehung der Atherosklerose über eNOS Aktivierung vermindern. Dabei spielen ROS eine wesentliche Rolle in der Atherogenese. Vermittelt das Lysophospholipid SPC über eine Verminderung der ROS Produktion, eine Verminderung der Atherosklerose und bewirkt es somit eine Gefäßprotektion?