

#### **4. Diskussion**

Eine Vielzahl an klinisch-epidemiologischen Studien haben zeigen können, dass es einen signifikanten und inversen Zusammenhang zwischen der Plasma-Konzentration an HDL und Apolipoprotein A-I und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen durch atherosklerotische Gefäßwandveränderungen gibt (Gordon and Rifkind 1989). Eine niedrige HDL-Konzentration ist ein selbständiger und von der Konzentration des LDL unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung. Eine niedrige Konzentration an HDL-Molekülen ist ein führender Befund bei Männern mit früh einsetzender Atherosklerose (Abbott, Wilson et al. 1988). Auf der anderen Seite konnte durch eine leichtgradige Erhöhung des HDL-Spiegels durch Behandlung mit Niacin und Fibraten eine signifikante Verminderung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen erzielt werden (Rubins, Robins et al. 1999; Ishii, Friedman et al. 2001). Lange Zeit wurde diese schützende Wirkung von HDL auf dessen Einfluss auf den Rücktransport von Cholesterin aus den Gefäßen zur Leber bezogen. Dieser Rücktransport des Cholesterols durch HDL ist abhängig von der Interaktion des Apolipoproteins A-I mit dem Scavenger-Receptor - BI (Krieger and Kozarsky 1999). Diese erstmals 1968 erhobene These ist heute schon lange nicht mehr alleinstehend gültig (Glomset 1968). Eine Vielzahl an Mechanismen wurde vermutet, die für diese atheroprotektiven Eigenschaft des HDL-Moleküls verantwortlich sein sollen. So schwächt HDL die bei Endotheldefekt zu erkennende abnormale Acetylcholin induzierte Vasokonstriktion in atherosklerotischen Koronararterien ab (Zeiger, Schachlinger et al. 1994). Die Verabreichung von HDL bei Männern mit Hypercholesterinämie führt zu einer signifikanten Verbesserung der Unterarmdurchblutung, durch die Verbesserung der endothelialen Funktion in vivo. Diese Verbesserung der endothelialen Funktion konnte durch den Inhibitor der endothelialen NOS, L-NAME, aufgehoben werden (Spieker, Sudano et al. 2002). Der Mechanismus, der diesem HDL-induzierten antiatherogenen Effekt zugrunde liegt, konnte lange Zeit nicht näher charakterisiert werden. HDL soll zu einer Synthesesteigerung von vasodilatativ wirkenden Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>) aus vermehrt zur Verfügung stehender Arachidonsäure führen (Fleisher, Tall et al. 1982; Vinals, Martinez-Gonzalez et al. 1999). In früher erschienenen Studien wurde gezeigt, dass HDL über einen SR-BI Rezeptor abhängigen Prozess eine Stimulierung der endothelialen NOS bewirkt und die HDL-induzierte Vasodilatation vollständig durch Hemmung dieser eNOS mittels L-NAME zu hemmen ist (Yuhanna, Zhu et al. 2001; Li, Titlow et al. 2002; Nofer, van der Giet et al. 2004). Um die bioaktiven Fraktionen des komplex aufgebauten HDL-Moleküls zu untersuchen, wurden die einzelnen Unterfraktionen des HDL-Moleküls, bestehend aus

Proteinfraktion, Lipidfraktion, Apolipoprotein A-I, einzeln isoliert und unabhängig von einander untersucht. Im gefäßphysiologischen Versuch an vorkontrahierten isolierten Aortenringpräparaten induziert die Lipidfraktion des HDL in Konzentrationen, die den physiologisch im HDL-Molekül vorliegenden entsprechen, eine zum nativen HDL vergleichbare Vasodilatation. Diese Vasodilatation ist durch Hemmung der endothelialen NOS zu inhibieren. Im Gegensatz dazu zeigt die Proteinfraktion des HDL, insbesondere das quantitativ bedeutende Apolipoprotein A-I, keine signifikante Wirkung auf den Gefäßtonus. Zur weiteren Differenzierung des vasoaktiven Effektes der Lipidfraktion wurde diese weiter aufgetrennt und weitere Bestandteile auf ihre Vasoaktivität getestet. Frühere Studien demonstrierten, dass HDL als ein Träger bioaktiver Lysophospholipide, insbesondere S1P und SPC dient (Nofer et. al. 2001; Nofer et. al. 2004; Murata, Sato et al. 2000). Beide Bestandteile sind verantwortlich für eine große Anzahl pleiotropischer protektiver Effekte dieser Lipoproteine. So schützen S1P und SPC endotheliale Zellen vor Apoptose die durch Wachstumsfaktorentzug entsteht, induzieren die Aktivierung der eNOS und Vasorelaxation in isolierten Rattenarterien, und hemmen die TNF- $\alpha$  vermittelte Expression von E-Selectin an der Oberfläche der Endothelzellen (Nofer et. al. 2001 ;2003; 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lysophospholipid SPC die eNOS aktiviert und dosisabhängig zu einer Vasodilatation an Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen führt. Nach chemischer Endothelentfernung kann diese Vasodilatation nicht mehr beobachtet werden, so dass diese Vasodilatation Endothel vermittelt verläuft. An Aortenringpräparaten von eNOS defizienten Mäusen und an Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen, an denen die eNOS pharmakologisch mittels L-NAME irreversibel inhibiert wurde, konnte ebenfalls keine SPC induzierte Vasodilatation beobachtet werden, so dass diese Endothel vermittelte Vasodilatation über die Aktivierung der endothelialen NOS verläuft. Die pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase mittels Indometacin konnte die SPC induzierte Vasorelaxation nicht beeinflussen, damit können die vasoaktiven Prostaglandine, insbesondere Prostazyklin (P<sub>g</sub>I<sub>2</sub>), als Mediatoren für die Vasorelaxation ausgeschlossen werden. Die Konzentrationen, in denen SPC eine signifikanten eNOS Aktivierung und Vasorelaxation bewirkt, liegen im Bereich der physiologisch im HDL-Molekül vorliegenden Konzentration. Ein mg des HDL-Moleküls beinhaltet ungefähr 300 pmol S1P und 300 pmol SPC (Nofer, van der Giet et al. 2004). Etwa 50 % der maximalen Vasorelaxation durch SPC wird bei Konzentrationen erreicht, die zwischen 0,1 und 1  $\mu$ M liegen. Eine HDL-Konzentration von 1 mg/ml beinhaltet eine Konzentration an bioaktivem SPC, die eine signifikante Veränderung der Vorkontraktion auslöst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des Lysophospholipides SPC über einen S1P<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsweg erfolgt. Die Bindung von HDL

über das Apolipoprotein A-I an den SR-BI Rezeptor scheint die lokale Konzentration der im HDL Molekül enthaltenden Lysophospholipide in der Umgebung dieses S1P<sub>3</sub>-Rezeptors deutlich zu erhöhen. Somit ist es nicht möglich, die Wirkung auf die eNOS durch die im HDL enthaltenen Konzentrationen der Lysophospholipide mit der jeweiligen isoliert untersuchten äquimolaren Konzentration im in vitro Modell zu vergleichen. Bioaktive Moleküle, wie die Lysophospholipide interagieren mit einer Vielzahl an spezifischen Rezeptoren. SPC aktiviert eine Reihe von G-Protein gekoppelter Lysophospholipidrezeptoren, insbesondere den S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>2</sub>- als auch den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor, welche alle auf Endothelzellen exprimiert werden (Lee, Thangada et al. 1999; Zhang, Contos et al. 1999; Ishii, Friedman et al. 2001). Zusätzlich dazu aktiviert SPC weitere Rezeptoren, wie den OCR-1-, GPR4- oder G2A-Rezeptor (Xu 2002). Lysophospholipide bewirken unterschiedliche Effekte auf die Gefäßphysiologie, die abhängig sind von dem jeweiligen Niveau der Vorspannung. An nicht vorkontrahierten Widerstandsgefäßen, wie z.B. Mesenterialgefäßen, bewirken Lysophospholipide eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion, wohingegen, wie in dieser Arbeit gezeigt, nach Vorkontraktion durch PE eine konzentrationsabhängige Vasodilatation beobachtet werden kann. Dabei ist die vasodilatierende Wirkung der Lysophospholipide unter Vorkontraktionsbedingungen stärker ausgeprägt als die vasokonstringierende Wirkung unter Basalbedingungen. Um die Bedeutung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors in der HDL bzw. Lysophospholipid vermittelten Vasodilatation zu untersuchen, wurden Versuch am Kleingefäßmyographen, an Aortenringpräparaten von S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen, durchgeführt. SPC konnte keine Vasodilatation an diesen vorkontrahierten Aortenpräparaten bewirken. Dabei zeigen die Gefäße von S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen eine nicht signifikante, aber dem Trend nach, bessere vasodilatierende Reaktion auf Acetylcholin als Aortenringe von C57BL/6-Mäusen, was eine schlechtere Endothelfunktion der S1P<sub>3</sub> defizienten Mäuse für dieses Phänomen ausschließt. Anscheinend wird die eNOS Aktivierung durch die Lysophospholipide entweder allein durch den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor gesteuert, oder der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wirkt im Sinne einer Co-Aktivierung zusammen mit anderen Lysophospholipid-Rezeptoren, wie z.B. mit dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor. Jedenfalls ist ein funktionsfähiger S1P<sub>3</sub>-Rezeptor für die Lysophospholipid induzierte eNOS Aktivierung unabkömmlich. Die vasokonstringierende Wirkung der Lysophospholipide ist unabhängig von der Anwesenheit des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors, da keine Unterschiede zwischen C57BL/6-Mäusen und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen bezüglich der Lysophospholipid induzierten Vasokonstriktion zu erkennen sind. Somit scheinen die Lysophospholipide unter basalen Bedingungen die Gefäße auf einem S1P<sub>3</sub>-Rezeptor unabhängigen Mechanismus zu kontrahieren, wohingegen unter Vorkontraktionsbedingungen eine Dilatation über einen S1P<sub>3</sub>-

Rezeptor abhängigen Signaltransduktionsweg initiiert wird. Die entsprechenden Angriffspunkte scheinen dabei entweder auf den Endothelzellen (Dilatation) oder auf den glatten Gefäßmuskeln (Kontraktion) zu liegen (Bischoff, Czyborra et al. 2000).

In dieser Arbeit konnte erfolgreich das HDL-assoziierte Lysophospholipid Sphingosylphosphorylcholin als eNOS aktivierender Faktor herausgearbeitet werden. Diese eNOS Aktivierung verläuft über die Stimulation des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors, der ein funktioneller HDL-Rezeptor zu sein scheint. Lysophospholipide und insbesondere der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor könnten somit einen neuartigen Ansatz in der antiatherogenen Therapie darstellen.