

I. Einleitung

1. *Vaskuläre Homöostase*

Das feinregulierte Gleichgewicht verschiedener, zum Teil konkurrierender oder gegensätzlicher Funktionen von Zellen der Gefäßwand wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die vom autonomen Nervensystem freigesetzten Neurotransmitter, die im Blut zirkulierenden vasoaktiven Substanzen und die im Gewebe gebildeten Metaboliten. Eine zentrale Bedeutung hat hierbei das Gefäßendothel durch die regulierte Freisetzung von Autakoiden, einer chemisch heterogenen Gruppe kurzlebiger, vasoaktiver Substanzen mit auto- und parakriner Wirkung. Zu den wichtigsten, die glatte Gefäßmuskulatur relaxierenden Autokoide gehören Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂) und der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF). Wichtige vasokonstriktorisches Autokoide sind Endothelin-1, Superoxidanionen und Prostaglandin H₂ (Harrison und Cai, 2003; Raghavan und Dikshit, 2004; Spieker et al., 2005; Brunner et al., 2006; Fleming und Busse, 2006). Das Endothel, das als kontinuierliche, einschichtige Zellschicht die innere Oberfläche des gesamten Gefäßsystems auskleidet und eine selektive Barriere zwischen dem strömenden Blut und dem Gewebe darstellt, weist vielfältige Funktionen auf. Neben der Regulation des lokalen Gefäßtonus gehören die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand, die Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen, die Regulation der plasmatischen Fibrinolysefaktoren sowie die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen dazu (Moncada und Higgs, 1991; Busse und Fleming, 1995; Spieker und Luscher, 2005; Esper et al., 2006).

1.1. NO- und PGI₂-abhängige Vasodilatation

Die bedeutende Rolle des Endothels bei der Gefäßdilatation durch Acetylcholin (ACh) wurde 1980 erstmals durch Furchgott und Zawadzki aufgezeigt. Der Mechanismus dieser acetylcholininduzierten Vasodilatation war jedoch unbekannt. Es wurde ein Faktor angenommen, der im Gefäßendothel synthetisiert wird und an der Gefäßmuskelzelle relaxierend wirkt. Dieser wurde als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet und konnte 1987 als NO identifiziert werden (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Fleming und Busse, 1999). NO wird im Endothel durch die NO-Synthase aus L-Arginin gebildet und führt über eine

Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels. cGMP-abhängige Proteinkinase führen dann über verschiedene Mechanismen, unter anderem durch die Hemmung der IP₃-vermittelten Freisetzung von Calcium, zu einer Reduktion des Gefäßtonus (Llorens et al., 2002; Raghavan und Dikshit, 2004).

Neben NO können Prostaglandine, insbesondere deren Vertreter Prostaglandin I₂ (=Prostacyclin), zu einer Vasodilatation führen. PGI₂ führt zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und so zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in glatten Gefäßmuskelzellen. Dies führt unter anderem zu einer Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie der Kalziumsensitivität und damit zur Gefäßrelaxation.

1.2. NO- und PGI₂-unabhängige Vasodilatation

Durch eine pharmakologische Blockade der endothelialen NO- und PGI₂-Produktion ist unter experimentellen Bedingungen eine acetylcholininduzierte, endothelabhängige Vasodilatation, nicht komplett hemmbar. Aufgrund dessen wurde auf einen weiteren, NO- und PGI₂-unabhängigen, vasodilatierenden Faktor geschlossen, der aufgrund der einhergehenden Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur als endothelialer hyperpolarisierender Faktor (*endothelium derived hyperpolarizing factor* (EDHF)) bezeichnet wird (Taylor und Weston, 1988; Vanhoutte und Shimokawa, 1989; Quilley und McGiff, 2000; McGuire et al., 2001).

Ein Endothelialer hyperpolarisierender Faktor (EDHF) ist per definitionem eine Substanz, die vom Endothel freigesetzt wird, in der glatten Muskulatur eine Hyperpolarisation auslöst und dadurch zu einer Relaxation glatter Muskelzellen führt. Man vermutet, daß es sich bei der chemischen Identität des EDHF, je nach Spezies und Gefäßbett, um unterschiedliche Substanzen handelt. Als mögliche EDHF-Kandidaten werden Kaliumionen (Edwards et al., 1998), Wasserstoffperoxide (Matoba et al., 2000; Shimokawa und Matoba, 2004) und Epoxyeicosatriensäuren (EET), die Cytochrom P 450-abhängig aus Arachidonsäure metabolisiert werden (Hecker et al., 1994; Fisslthaler et al., 1999; Fleming und Busse, 2006), diskutiert. Während in Mesenterialgefäßen von Menschen und Mäusen der EDHF Wasserstoffperoxiden zu entsprechen scheint (Shimokawa et al., 2003), weisen in Koronar- und Nierenarterien von Menschen, Schweinen, Rindern, Hunden, Ratten

und Kaninchen Epoxyeicosatriensäuren (EET) die Charakteristika eines EDHF auf (Fissthaler et al., 1999; Fleming 2000, Fleming und Busse, 2006). Aus Arachidonsäure synthetisierte, biologisch aktive Eicosanoide sind seit über 20 Jahren bekannt (Capdevila et al., 1981). Der Hypothese, dass Cytochrom P 450 (CYP)-Enzyme an der Synthese eines EDHF beteiligt sind, fußt u.a. auf folgenden Argumenten: die Applikation von exogener Arachidonsäure führt zu einer Vasodilatation bei isolierten Gefäßen, CYP-Inhibitoren verringern deutlich die EDHF-vermittelte Vasodilatation in einigen Gefäßtypen, u.a. in humanen Koronarendothelien, und in diesen Gefäßtypen werden CYP Epoxygenasen exprimiert (Fissthaler et al., 1999; Node et al., 1999). Da jedoch pharmakologische Inhibitoren der CYP 450-Epoxygenasen zusätzlich direkt K^+ -Kanäle blockieren, bleibt unklar, ob die EDHF-vermittelte Vasodilatation durch CYP 450-Epoxygenasen vermittelt wird. Ein wichtiges Experiment, das dafür spricht, dass es sich bei dem EDHF um ein Produkt der CYP 450-Epoxygenasen handelt, beruht auf einer Inkubation von Schweinekoronarien mit Antisense Oligonukleotiden der kodierenden Region von CYP 2C8/9. Dies führt zu einer deutlichen Reduktion von CYP 2C mRNA und CYP 2C8/9. Die EDHF-vermittelte Vasodilatation wird dadurch, ohne Beeinflussung der NO-vermittelten Vasodilatation, gehemmt (Fissthaler et al., 1999).

Nicht alle Arterienabschnitte weisen eine NO/ PGI_2 -unabhängige Vasodilatation auf. Die Bedeutung des EDHF als vasodilatierende Substanz nimmt mit abnehmendem Gefäßdiameter zu (Shimokawa et al., 1996). Die Ursache dafür bleibt weiterhin unklar. Neben der möglichen Bedeutung von myoendothelialen Gap junctions, die vermehrt in kleineren Arterien vorkommen (Chaytor et al., 1997; Taylor et al., 1998; Sandow and Hill, 2000), und von der Anzahl an Kalziumkanälen vom L-Typ (Bolz et al., 1999) spielt sicherlich die unterschiedliche Expression von EDHF-synthetisierenden Enzymen eine bedeutende Rolle. Sowohl die Expression der endothelialen NO-Synthase als auch der endothelialen CYP-Enzyme variiert in Abhängigkeit des Gefäßtyps (Fissthaler et al., 1999; Node et al., 1999).

Interessanterweise scheint die EDHF-vermittelte Vasodilatation von Östrogenspiegeln beeinflusst zu sein. In mehreren Arbeiten konnte eine verringerte EDHF-abhängige Vasodilatation bei männlichen Ratten oder bei weiblichen Ratten mit Östrogenmangel im Vergleich zu weiblichen Ratten mit normalem

Östrogenspiegel gezeigt werden (Liu et al., 2001; Sakuma et al., 2002; Huang und Kaley, 2004). Im Gegensatz dazu zeigt sich bezüglich der NO-vermittelten Vasodilatation dieser Östrogeneinfluss nicht (Liu et al., 2001).

2. Cytochrom P450 Enzyme

Im Jahre 1962 wurde durch Omura und Sato ein zuvor beschriebenes Hämprotein, das ein Absorptionsmaximum des Kohlenmonoxid-Komplexes in reduziertem Zustand bei einer Wellenlänge von 450 nm besitzt, als Cytochrom P450 bezeichnet (Omura und Sato, 1962). Cytochrom P450 Enzyme sind ubiquitär vorkommende, membrangebundene Monooxygenasen. Sie übertragen mit Hilfe von Kofaktoren (NADPH Reductase und CYP_{b5}) ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf ein Substrat, das dadurch oxidiert oder peroxidiert wird (Capdevila et al., 1981).

Die Existenz des Cytochrom P 450 (CYP) Systems ist in verschiedenen Spezies wie Vertebraten, Insekten, Pflanzen, Bakterien als auch Hefen belegt (Nelson et al., 1996). Es existieren unterschiedliche Cytochrom P 450 Isoformen nebeneinander, die sich bezüglich ihrer Substratspezifität und –affinität unterscheiden. Während die Mehrzahl der CYP Enzyme chemischen Reaktionen an unterschiedlichen Substraten katalysieren, weisen einige dieser Enzyme eine hohe Substratspezifität aus.

Die CYP-Enzyme bilden eine Gruppe von Isoenzymen und werden aufgrund der Identität der Aminosäuresequenz in Familien und Subfamilien eingeteilt. Mit arabischen Ziffern werden Enzyme ab einer Homologie von 40% einer Familie zugeordnet und ab einer Homologie von 55% werden die Enzyme in Subfamilien unterteilt, die durch Buchstaben gekennzeichnet werden. Beim Menschen sind 17 Familien und mehr als 40 Subfamilien beschrieben.

Ein Großteil der CYP Enzyme wird in der Leber exprimiert und ist am Stoffwechsel von Vitaminen, Cholesterin, Steroiden und der Entgiftung von Pharmaka und anderen Fremdstoffen beteiligt (Nelson et al., 1996; Omura, 1999). Neben der wichtigen hepatischen Entgiftungsfunktion gewannen die CYP Enzyme aufgrund der möglichen Beeinflussung der Endothelfunktion große Bedeutung. In den letzten Jahren zeigte sich, daß humane CYP Enzyme nicht nur in der Leber, sondern auch im Endothel exprimiert werden und von dort aus die vaskuläre Homöostase

beeinflussen können (Roman 2002). Die CYP Enzyme sind in der Lage, Arachidonsäure zu metabolisieren und spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung aktiver Metabolite aus dieser Fettsäure (Capdevila et al., 1981; Schwartzman et al., 1985). Weitere extrahepatische CYP-Isoenzyme kommen in Geweben wie Herz, Niere, Gastrointestinaltrakt und Lunge vor (Campbell et al., 1996).

Epoxygenasen und ω -Hydrolasen gehören zu den CYP Isoenzymen, die wichtige Funktionen im vaskulären System einnehmen. Vor allem handelt es sich dabei um die Epoxygenasen der Genfamilie 2, deren Subfamilien CYP 2B, 2C und 2J im Endothel vorkommen (Lin et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999; Node et al., 1999) und um ω -Hydrolasen der 4A Subfamilie, die hauptsächlich in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert werden (Roman 2002).

3. Cytochrom P450-abhängiger Arachidonsäuremetabolismus

Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A₂ aus membrangebundenen Phospholipiden synthetisiert und kann über drei Hauptmetabolisierungswege verstoffwechselt werden: 1. über die Cyclooxygenase zu Prostaglandinen und Thromboxan, 2. über die Lipooxygenase zu Leucotrienen und 3. über Cytochrom P 450 Enzyme zu Epoxyeicosatriensäuren (EET) und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE).

Während ω -Hydrolasen Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE) synthetisieren, bilden CYP-Epoxygenasen Epoxyeicosatriensäuren (EET). Das Verhältnis, der durch CYP-Epoxygenasen gebildeten regio- und stereospezifischen EET-Isomere (5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15- EET) hängt von der jeweiligen CYP Isoform ab. So bildet z.B. CYP 2C9 die drei Isomere 14,15-EET, 11,12-EET und 8,9-EET in einem Verhältnis 2,3:1:0,5, während CYP 2C8 14,15-EET und 11,12-EET in einem Verhältnis 1:1,3 und kaum 8,9-EET synthetisiert (Daikh et al., 1994).

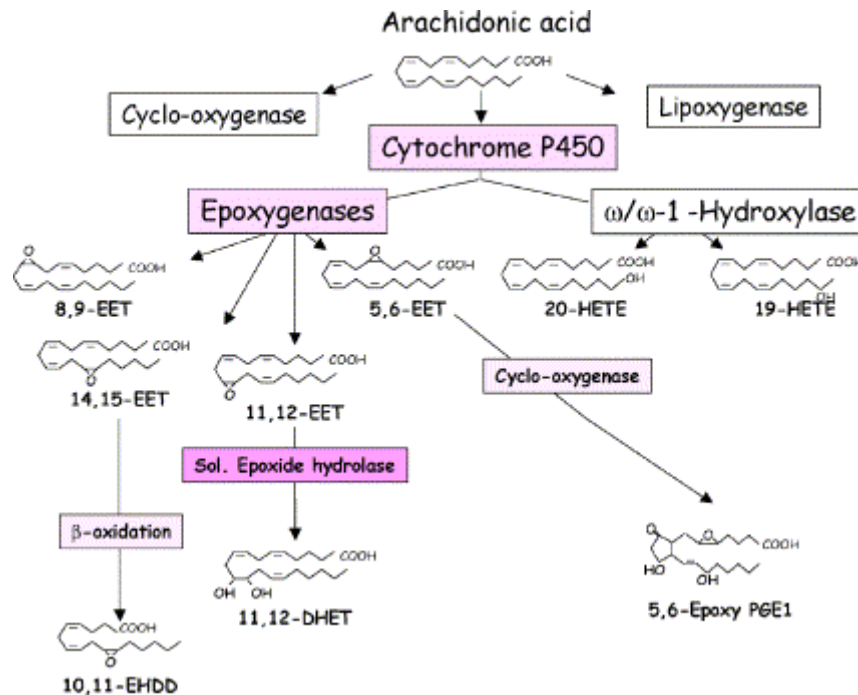


Abbildung 1.3.1: CYP 450-abhängige Synthese von Epoxyeicosatriensäuren und Hydroxyeicosatriensäuren aus Arachidonsäure nach Fleming (Fleming, 2004).

3.1. Synthese von Epoxyeicosatriensäuren (EETs)

Die endogene Synthese von EET erfolgt vornehmlich in der Leber, den Nieren und in Endothel- und Gefäßmuskelzellen. Sie können in Kardiomyozyten (Wu et al., 1997), Endothelzellen (Van Rollis et al., 1996) und Thrombozyten (Balazy, 1991) aufgenommen werden und in Phospholipide eingebaut werden. Es wird vermutet, daß diese Lipide als intrazellulärer Speicher dienen, von dem aus EETs unabhängig von einer Enzymaktivierung freigesetzt werden können (Weintraub et al., 1997). Die Synthese der Eicosanoide aus Arachidonsäure ist NADPH-abhängig. Während des CYP-Reaktionszyklus kommt es zu einer relevanten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Fleming et al., 2001/b).

3.2. Abbau von Epoxyeicosatriensäuren (EETs)

Der Abbau von EET erfolgt in vielen Geweben hauptsächlich über lösliche Epoxyhydrolasen (sEH). 5,6-EET können jedoch auch über die Cyclooxygenase metabolisiert werden (McGiff und Quilley, 1999). In Endothelzellen kommt es zu einer β -Oxidation oder einer Kettenverlängerung der EETs, wenn der Abbau der EETs über Epoxyhydrolasen gehemmt wird (Fang et al., 2001). EETs können ferner ins

Plasma abgegeben werden, wo sie zu 90% an Phospholipide gebunden vorliegen (Karara et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Abbauprodukte der Epoxyhydrolasen, Dihydroxyeicosatriensäuren (DHET), in geringen Konzentrationen relaxierend auf Schweineaorten wirken (Fang et al., 1997; Oltman et al., 1998). Sie gelten im Vergleich zu EETs als chemisch stabilere und biologisch weniger aktive Substanzen (Spiecker und Liao, 2005). Aufgrund ihrer chemischen Stabilität sind diese im Plasma und Urin messbar.

4. Funktionen der Epoxyeicosatriensäuren (EETs)

Die Epoxyeicosatriensäuren gelten als intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle und nehmen eine zentrale Bedeutung bei der Regulation der vaskulären Homöostase ein (Flemming, 2001/a; Roman, 2002). Neben der Gefäßrelaxation konnten antiinflammatorische und fibrinolytische Effekte sowie die Beeinflussung der Proliferation von Gefäßmuskelzellen und von Apoptose gezeigt werden.

4.1. Vasodilatation

Epoxyeicosatriensäuren besitzen eine bedeutende vasodilatierende Eigenschaft (Fisslthaler 1999). In der Abbildung 1.4.1 ist die antagonistische Wirkung von EETs und 20-HETEs an der Gefäßmuskelzelle nach Fleming dargestellt (Fleming et al., 2001/a). Die Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2), die Arachidonsäure (AA) aus membrangebundenen Phospholipiden (PL) freisetzt, erfolgt durch Erhöhung des transmuralen Drucks oder durch Stimulation von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 oder Angiotensin II. In Endothelzellen werden aus der freigesetzten Arachidonsäure über CYP 2C EETs synthetisiert. Diese werden entweder in membrangebundene Phospholipide über die Acetyl CoA Synthase inkorporiert oder in der Endothelzelle belassen.

Das Ruhemembranpotential von glatten Gefäßmuskelzellen wird hauptsächlich durch die Offenheitswahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen aber auch von Chloridkanälen bestimmt. Die EETs erhöhen die Offenheitswahrscheinlichkeit des kalzium-abhängigen Kaliumkanals (K^+_{Ca}) (Campbell et al., 1996; Hu und Kim, 1993) der Gefäßmuskelzelle und führen durch Hyperpolarisation zur Inhibition des spannungsabhängigen Kalziumkanals vom L-Typ (Ca^{2+} (L-Typ)), was eine Relaxation der Gefäßmuskelzelle zur Folge hat.

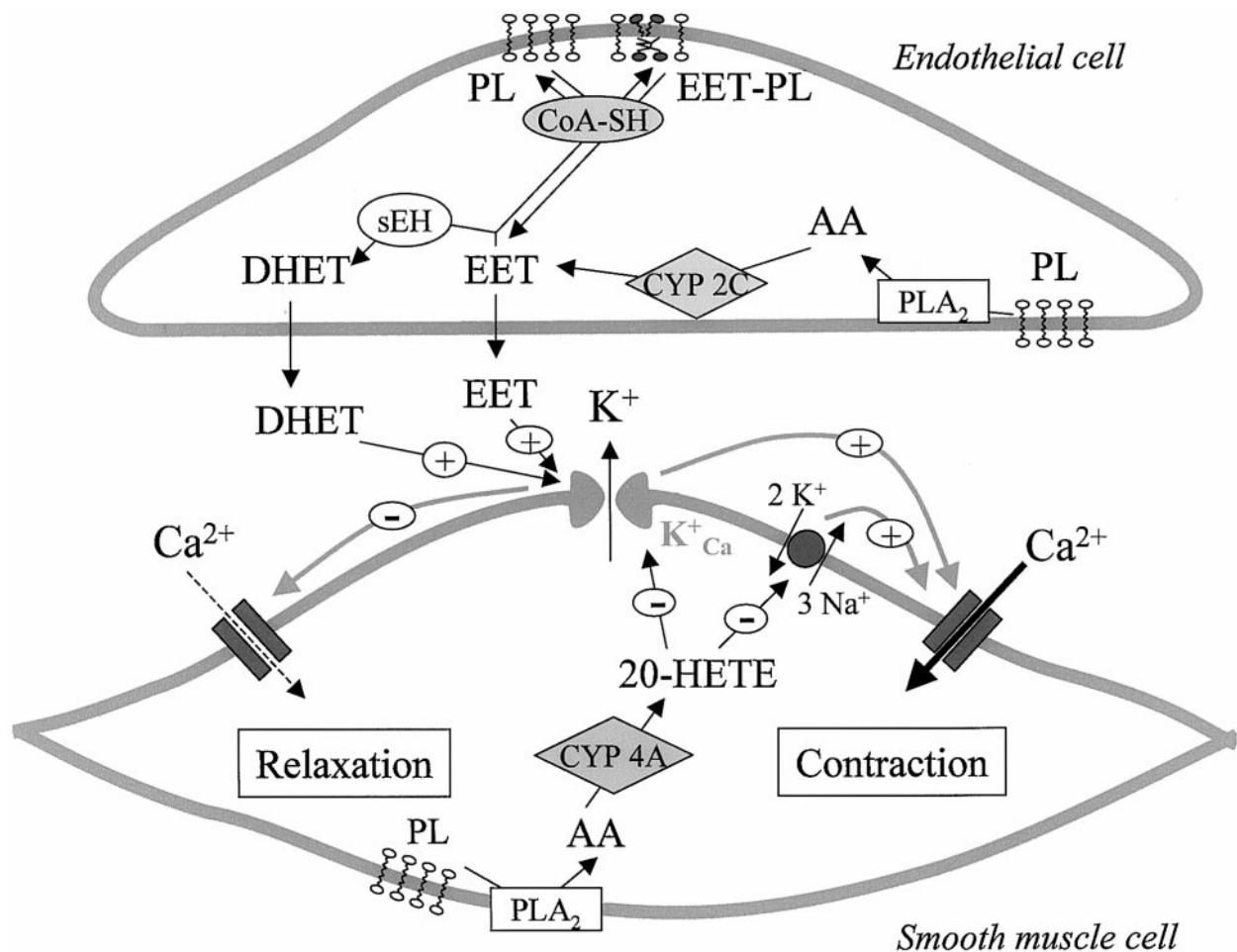


Abbildung 1.4.1: Regulation des Gefäßtonus durch EET und 20-HETE nach Fleming.

EETs bewirken über die Aktivierung von Kaliumkanälen (K^+_{Ca}) eine Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzelle, die über die Inhibition von Kalziumkanälen (Ca^{2+} (L-Typ)) zu dessen Relaxation führt. 20-HETEs führen über die Inhibition von Kaliumkanälen (K^+_{Ca}) und der Na-K-ATPase zu einer Depolarisation der Gefäßmuskelzelle und damit zur Gefäßkontraktion (Fleming, 2001/a).

In der glatten Gefäßmuskulatur dient Arachidonsäure (AA) als Substrat für die Synthese von 20-HETE durch CYP 4A. 20-HETE verringert die Offenheitswahrscheinlichkeit des kalziumabhängigen Kaliumkanals (K^+_{Ca}) und inhibiert die Na-K-ATPase. Dies führt durch Depolarisation zu der Aktivierung des spannungsabhängigen Kalziumkanals vom L-Typ (Ca^{2+} (L-Typ)) und dadurch zu einer Kontraktion der Gefäßmuskelzelle. 20-HETE stellen somit funktionelle Antagonisten der EETs dar.

An gesunden Individuen konnte, im Gegensatz zu Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung, kein Einfluß des CYP 2C auf die EDHF-vermittelte Vasodilatation nachgewiesen werden (Fichtlscherer, 2004). Man weiß, dass hohe Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO) die CYP-abhängige EDHF-Synthese inhibieren, so dass in Anwesenheit von NO nur eine minimale EDHF-Antwort beobachtet wird. Die EDHF-vermittelte Vasodilatation ist als eine Art „back-up“- oder Reservesystem anzusehen (Bauersachs et al., 1996, Larsen et al., 2006).

4.2. Antiinflammatorische Wirkung

Die Inflammation von Gefäßen nimmt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arteriosklerose ein. Der proinflammatorische Transkriptionsfaktor, *nuclear factor – κ B* (NF- κ B) spielt dabei durch eine Aktivierung von inflammatorischen Mediatoren eine bedeutende Rolle (Brand et al., 1996; Bourcier et al., 1997). Zu den proatherogenen Mediatoren, die durch NF- κ B aktiviert werden, gehören u.a. Zytokine, wie Interleukin-6, und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und E-selectin (Davies et al., 1993; Collins et al., 1995). Für 11,12-, 8,9-, 5,6-EET und 11,12-DHET konnte in physiologischer Gewebs- und Plasmakonzentration ein antiinflammatorischer Effekt durch die verminderte Expression von NF- κ B, TNF- α und VCAM-1, nachgewiesen werden. Die Inhibition dieser proinflammatorischen Mediatoren ist unabhängig von einer Membranhyperpolarisation und ist durch selektive K^+_{Ca} -Blocker nicht reversibel (Node et al., 1999; Spiecker und Liao 2005).

4.3. Fibrinolytische Wirkung und Hemmung der Thrombozytenadhäsion

Die thrombotische Aktivität des Gerinnungssystems wird u.a. durch endogene Mediatoren, wie proteolytische Enzyme, *tissue-type Plasminogenaktivator* (t-PA) und seinen Gegenspieler *Plasminogenaktivator-Inhibitor-1* (PAI-1) reguliert (Collen, 1980). Eine fibrinolytische Wirkung kann entweder durch eine erhöhte t-PA Expression und/oder eine verminderte PAI-1 Expression erreicht werden. Physiologische Konzentrationen von EETs oder die vermehrte Expression von der endothelialen Epoxygenase CYP 2J2 führen zu einer vermehrten t-PA-Protein-Expression. Die fibrinolytische Aktivität des t-PA kann dadurch auf das 2,5 fache gesteigert werden (Node et al., 2001). Wie die antiinflammatorische ist auch die fibrinolytische Wirkung der EETs unabhängig von einer Membranhyperpolarisation (Node et al., 2001).

EETs können die Adhäsion von Thrombozyten an das Gefäßendothel hemmen. Sie führen zu einer Hyperpolarisation der Thrombozyten und zu einer Inhibition der Expression von Adhäsionsmolekülen (Krötz et al., 2004).

4.4. Hemmung der Migration von Gefäßmuskelzellen

EETs zeigen ferner einen inhibitorischen Effekt auf die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (Sun et al., 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt. Man weiß jedoch, dass es zu einer Erhöhung der cAMP und Proteinkinase A (PKA) kommt und dass dieser Effekt durch Inhibitoren der cAMP und PKA geblockt werden kann.

4.5. Bildung von Sauerstoffradikalen

Bei Reaktionszyklen von gewissen CYP-Isoenzymen, u.a. bei CYP 2C9, findet man eine Radikalbildung, die mit einer NADPH Oxidation verknüpft ist (Thurman et al., 1972; Hildebrandt und Roots, 1975). Während des Reaktionszyklus kann es, wenn Elektronen vom zentralen Eisenion des Enzyms auf den gebundenen aktiven Sauerstoff übertragen werden, zu einer signifikanten Synthese von Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxylradikalen kommen (Puntarulo und Cederbaum, 1998). Eine Induktion der CYP Enzyme durch Phenobarbital führt z.B. zu einem achtfachen Anstieg der Superoxidbildung (Auclair et al., 1978). Das Ausmaß der Radikalbildung ist isoform- und substratspezifisch (Puntarulo und Cederbaum, 1998).

Da davon ausgegangen wird, daß oxidativer Streß eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt, wird die Bedeutung der CYP Epoxygenasen unter dem Gesichtspunkt der Generation von Sauerstoffradikalen kontrovers diskutiert (Fleming 2001/b). Neben ihrer vasoprotektiven Rolle (vasodilatierend, antimigratorisch, antiinflammatorisch, profibrinolytisch) besteht eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese der Arteriosklerose über die Produktion von Sauerstoffradikalen. In Koronararterien von Schweinen kommt es über eine CYP-abhängige Produktion freier Radikale zu einer verschlechterten NO-vermittelten Relaxation, zu einer Erhöhung des Adhäsionsmoleküls *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und einer gesteigerten Aktivität des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors NF- κ B (Fleming et al., 2001/b).

4.6. Kardiodepressive Wirkung

Eine Applikation von Bradykinin (BK) führt zu einer Reduktion der myokardialen Kontraktilität, welche durch eine Inhibition der CYP 450 vollständig reversibel ist (Rastaldo et al., 2001) Diese scheint von der Freisetzung von EETs abhängig zu sein. Auch Acetylcholin (ACh) kann zu einer Reduktion der myokardialen Kontraktilität führen. Dieser negativ inotrope Effekt des AChs scheint nicht nur von einer direkten Wirkung auf das Myokard, sondern von einer endothelialen CYP Aktivierung abhängig zu sein (Pagliaro et al., 2004).

5. Cytochrome P450 2C9, 2C8 und 2J2

Wie bereits beschrieben, hat die CYP 2C Subfamilie ihre zentrale Bedeutung bei der Metabolisierung wichtiger Pharmaka. In der Leber macht diese Subfamilie 18% des CYP Proteingehaltes aus und verstoffwechselt mehr als 20% der gängigen Medikamente. Die CYP-Isoformen 2C9, 2C8 und 2J2 sind ferner als mögliche EDHF-Synthase anzusehen (Fisslthaler 1999). Die EDHF-abhängige Wirkung an Widerstandsgefäßen von Hamstern konnte mit Hilfe von Antisense Oligonukleotiden gegen CYP 2C8/9 um bis zu 70% gesenkt werden (Bolz et al, 2000).

5.1. CYP 2C9

CYP 2C9 stellt einen der am besten untersuchten Vertreter der CYP 2C Subfamilie dar. Dieses CYP Isoenzym ist für die Verstoffwechlung vieler klinisch wichtiger Medikamente wie orale Antikoagulantien Warfarin und Acenocoumarol, orale Antidiabetika Tolbutamid und Glipizid, Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonist Losartan, Antikonvulsivum Phenytoin, Diuretikum Torasemid, COX-2-Inhibitor Celecoxib, HMG-CoA-Hemmer Fluvastatin und mehrere nicht steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) verantwortlich (Miners und Birkett, 1998). Insbesondere bei Medikamenten mit enger therapeutischer Breite wie Warfarin und Phenytoin besteht der Zusammenhang zwischen CYP 2C9 – Polymorphismen und klinisch relevanten Arzneimittelunverträglichkeiten oder ungenügender therapeutischer Wirksamkeit (Xie et al., 2002).

5.1.1. CYP 2C9 Polymorphismen

Das CYP 2C9 Gen liegt auf Chromosom 10 (10q24.2) und mißt etwa 55 kb. Es besteht aus neun Exons und acht Introns (Goldstein et al., 1994). Mehr als 50 *single*

nucleotide polymorphisms (SNPs) und mehr als 11 Polymorphismen (CYP 2C9*2-*12) wurden im CYP 2C9 Gen beschrieben (Ingelman-Sundberg, 2002). Die Prävalenz der CYP 2C9-Allele besitzt eine bedeutende interethische Varianz. Nur zwei der Allelvarianten, nämlich CYP 2C9*2 und 2C9*3, kommen bei Kaukasien häufig vor und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit betrachtet. Die Allelfrequenz liegt bei Kaukasiern für 2C9*2 bei 11% und für 2C9*3 bei 7% (Kirchheiner und Brockmöller, 2005). Die Polymorphismen CYP 2C9 *2 und*3 wurden nie auf demselben Chromosom entdeckt, so dass aus den zwei SNPs drei Allele resultieren.

Die CYP 2C9*2 und 2C9*3 Varianten entstehen durch einzelne Punktmutationen, welche den Austausch von jeweils einer Aminosäure (AS) an der Position 144 bzw. 359 der Aminosäurekette bewirken. Der Genotyp CYP 2C9*1/*1 (Wildtyp) besitzt in der Position 144 die AS Arginin, an der Position 359 die AS Isoleucin (Arg144/Ile359). Bei der CYP 2C9*2 Variante ist das Arginin durch die AS Cytosin (Cys144/Ile359) ersetzt, und bei CYP 2C9*3 das Isoleucin durch die AS Leucin (Arg144/Leu359). Die CYP 2C9*2 Allelvariante befindet sich im Exon 3 (Crespi und Miller, 1997; Rettie et al., 1994), die Variante CYP 2C9*3 wie CYP 2C9*4 und 2C9*5 im Exon 7. Bemerkenswert ist, daß die CYP 2C9*3-*5-Mutationen alle sehr nahe beieinander im Exon 7 (Position 1075 bis 1080) im Bereich der *substrate recognition site 5* (SRS 5), einer wichtigen Substratbindungstelle der CYP 2 Familie, liegen (Gotoh, 1992). Der CYP 2C9*6 Variante liegt eine seltene Nukleotiddeletion (818delA) im Exon 5 zugrunde, die zu einem *frame shift* und dadurch zu einem inaktiven Protein führt (Kidd et al., 2001). Weitere CYP-Polymorphismen 2C9*7 - *12 wurden 2002 von Goldstein et al. beschrieben.

5.1.2. Vorkommen der CYP 2C9 Polymorphismen in ethnischen Gruppen

In den bisher durchgeführten epidemiologischen Studien der CYP 2C9 Polymorphismen kommen die Allelvarianten *2 und *3 bei ungefähr 35% der Kaukasier vor und stellen in dieser Gruppe den häufigsten CYP 2C9 Polymorphismen dar. In Tabelle 1.5.1 (nach Kirchheiner und Brockmöller, 2005) wurden die Genotypverteilung der CYP 2C9 Polymorphismen dargestellt. Bei Kaukasiern wurden keine geschlechtsspezifischen Häufigkeitsunterschiede festgestellt (Lee et al., 2002). Bei Afroamerikanern, Japanern, Chinesen und

Koreanern kommen die 2C9*2 und 2C9*3 Varianten sehr viel seltener vor. CYP 2C9*2/*2 und *3/*3 wurde bei Asiaten und Afrikanern bisher nicht entdeckt (Sullivan-Klose et al., 1996; Kirchhainer und Brockmöller, 2005). CYP 2C9*3 kommt bei weniger als 5% der Asiaten (Japaner 4,1%, Chinesen 3,5% und Koreaner 2,3%) und bei 1% der Afroamerikaner vor (Lee et al., 2002). Den CYP 2C9 *4 Polymorphismus ist bisher nur bei japanischen Epilepsie Patienten entdeckt worden (Dickmann et al., 2001; Xie et al., 2002), während die Allelvariante CYP 2C9*5 bisher nur bei Afroamerikanern und Hispano-Amerikanern beschrieben wurde (Dickmann et al., 2001; Xie et al., 2002). Die CYP 2C9*6 Variante wurde bisher nur bei einem Afroamerikaner entdeckt, der starke Arzneimittelnebenwirkungen bei der Einnahme von Phenytoin erlitten hatte.

5.1.3. Funktionelle Bedeutung der CYP 2C9 Polymorphismen

Einige Polymorphismen des CYP 2C9 Gens gehen mit einer reduzierten katalytischen Aktivität einher (Sullivan-Klose et al., 1996; Crespi et al., 1997; Rettie et al., 1999; Ieiri et al., 2000; Goldstein et al., 2001). Diese Beeinträchtigung der Enzymfunktion beruht bei den CYP 2C9 *3, *4 und *5 Polymorphismen auf der Substitution einer Aminosäure (AS) im Bereich der *substrate recognition site 5* (SRS 5). Diese führt zu einer verminderten intrinsischen Clearance durch sowohl eine Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) als auch zu einer Reduktion der maximalen Metabolisierungsrate (V_{max}). (Gotoh et al., 1992). Bei der CYP 2C9*2 Variante befindet sich die AS-Substitution nicht in einer SRS und führt deshalb nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Bindungskapazität des Enzymes. Es wird vermutet, daß hier die Reduktion der V_{max} an einer eingeschränkten Interaktion zwischen dem CYP Enzym und der NADPH-CYP P450 Reduktase liegt (Crespi et al., 1997). Für die Allelvarianten CYP 2C9 *2, *3, *4 und *5 konnte eine verminderte Enzymfunktion in vitro nachgewiesen werden. Diese zeigt sich am Deutlichsten beim CYP 2C9 *3 Polymorphismus. Bei den Varianten CYP 2C9 *3 und *5 ist das Ausmaß der Funktionsreduktion substratabhängig (Yamazaki et al., 1998; Rettie et al., 1999).

CYP 2C9	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Kaukasier	65,3%	21,9%	11%	0,9%	1,4%	0,4%
Afrikaner	87,0%	8,7%	4,3	0	0	0
Asiaten	96,5%	0	3,5%	0	0	0
Reduktion der Enzymaktivität	keine	geringe	mäßige	mäßige	mäßige	starke

Tabelle 1.5.1: Verteilung des CYP 2C9*2 und*3 Genotyps bei Kaukasiern, Afrikanern und Asiaten und deren funktionelle Bedeutung (nach Kirchheiner und Brockmüller, 2005).

Studien der CYP 2C9 Enzymfunktion wurden anhand von in-vivo Messungen der oralen Clearance von CYP 2C9-Substraten durchgeführt. Insbesondere der Genotyp CYP 2C9*3/*3 zeigte sich phenotypisch als „*poor metabolizer*“ der meisten CYP 2C9-Substrate. Dabei ist z.B. die orale Clearance von (S)-Warfarin bei Heterozygoten und Homozygoten des CYP 2C9*3 um 66 und 90% im Vergleich zum Wildtyp verringert (Takahashi et al., 1998). Auch bei weiteren CYP 2C9-Substraten wie Acenocoumarol (Verstuyft et al., 2001) Tolbutamid (Sullivan-Klose et al., 1996), Losartan (Lee et al., 2003), Phenytoin (Kidd et al., 1999) und Glipizid (Kidd et al., 1999) findet sich eine verringerte Metabolisierung bei CYP 2C9*3-Trägern. Die Allelvariante 2C9*2 führt, wie auch 2C9*3, zu einem geringeren Bedarf der Erhaltungsdosis bei einer Warfarin-Therapie und führt zu stärkeren Blutungsereignissen als der CYP 2C9 Wildtyp (Higashi et al., 2002).

5.2. CYP 2C8

Das Cytochrom P450 2C8 kommt in relativ hohen Konzentrationen in der Leber vor. Hier hat es ebenfalls eine große Bedeutung in der Metabolisierung einiger wichtiger Medikamente wie z.B. Paclitaxel, Verapamil, Carbamazepin, Cerivastatin und Amiodaron. CYP 2C8 ist ferner an der Oxidation von Retinoiden (*all-trans retinic acid*) und von Fettsäuren wie Arachidonsäure beteiligt. Es wird in vielen extrahepatischen Geweben (Klose et al., 1999) und in Endothelzellen exprimiert und hat dort eine wichtige Rolle bei der Synthese von Epoxyeicosatriensäuren (Zeldin et al., 1995). Das menschliche *CYP 2C8 Gen* liegt auf dem Chromosom 10 (10q24.1) und besteht aus neun Exons und acht Introns (Inoue et al., 1994). Für das Gen CYP 2C8 wurden bisher zehn Polymorphismen beschrieben. Während der CYP 2C8*2 Polymorphismus (Exon 5) bisher nur bei Afro-Amerikaner entdeckt wurde, tritt

der CYP 2C8*3 Polymorphismus (Exon 3 und 8) bei Afro-Amerikaner und bei Kaukasiern (Allelfrequenz 13%) auf und stellt den häufigsten CYP 2C8-Polymorphismus bei Kaukasiern dar. Bei Asiaten kommen diese beiden Polymorphismen nicht vor (Dai et al., 2001). Kürzlich wurden die Varianten CYP 2C8*6-*10 bei Japanern beschrieben (Hichiya 2005).

Den Einfluß der CYP 2C8*2 und 2C8*3-Polymorphismen auf die Enzymaktivität wurde anhand von in-vitro Studien bezüglich des Paclitaxel- und Arachidonsäure-Metabolismus von Dai und seiner Arbeitsgruppe untersucht. Beide Polymorphismen führen zu einer Reduktion der Enzymaktivität (Dai et al, 2001).

5.3. Linkage zwischen CYP 2C9 und CYP 2C8

Die CYP-Polymorphismen 2C8*3 und 2C9*2 sind die funktionell bedeutensten Genvarianten dieser CYP-Enzyme bei Kaukasiern. Yasar und seine Arbeitsgruppe konnten eine signifikante Linkage der Allelvarianten 2C8*3 und 2C9*2 beschreiben. In der Studienpopulation von 1468 Personen zeigten sich 96% der CYP 2C8*3-Träger auch als CYP 2C9*2-Träger. 85% der Individuen mit der CYP 2C9*2 Variante zeigten sich auch als CYP 2C8*3-Träger. Die räumliche Nähe der CYP 2C9 und 2C8-Gene im Exon 3 des Chromosoms 10 spricht für diese mögliche genetische Linkage (Yasar et al., 2002).

5.4. CYP 2J2

Die CYP 2J Subfamilie wurde erstmalig im Jahre 1991 durch Kikuta et al. beschrieben (Kikuta et al., 1991). CYP 2J2 wird in hohem Maße im Herzen, v.a. in Kardiomyozyten und Endothelzellen der Koronargefäße, aber auch in anderen Geweben wie Leber, Lunge, Niere, Pancreas und Gastrointestinaltrakt exprimiert (Wu et al., 1996, 1997; Node et al., 1999). CYP 2J2 verstoffwechselt Arachidon- und Linolensäure (LA) sowie Xenobiotika wie Diclofenac und Bufuralol. Die CYP 2J2 Produkte wie EETs und Epoxyoctacenoinsäuren (EOAs) besitzen wichtige biologische Funktionen im Bereich des Herzen und der Gefäße. Auf die Bedeutung von EETs wurde bereits eingegangen. EAOs sind Metabolite der LA, die durch CYP 2J2 Enzyme synthetisiert werden. Sie steigern die Gefäßpermeabilität und können zu einer verschlechterten kardialen Pumpfunktion führen. Bei Hunden wurden schwere Lungenödeme und Herzstillstand nach intravenöser Injektion von EAOs beobachtet.

Das menschliche *CYP 2J2* Gen liegt auf dem Chromosom 1 und besteht, wie alle der bisher beschriebenen Gene der CYP 2-Familie, aus neun Exons und acht Introns (Wu et al., 1996; Ma et al., 1998). Im Bereich des Gens *CYP 2J2* wurden bisher neun Polymorphismen beschrieben (King et al., 2002).

Auch die Varianten der CYP 2J2 führen zu einer reduzierten Enzymaktivität. Die Varianten CYP 2J2*2, CYP 2J2*3 und CYP 2J2*6 zeigten in-vitro eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität für Arachidonsäure und Linolensäure (King et al., 2002).

6. *CYP 2C9*2* und *2C9*3* Polymorphismen und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Ergebnisse von mehreren Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und CYP 2C9 Polymorphismen hin. Insbesondere scheint es einen Einfluss der CYP 2C9 Polymorphismen auf die Endothelfunktion, auf die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung und eines arteriellen Hypertonus zu geben.

6.1. Endotheliale Dysfunktion

Die Bedeutung von CYP 2C9 als eine mögliche EDHF-Synthase im Koronargefäßsystem wurde bereits beschrieben. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die CYP-abhängige Vasodilatation erst bei verminderter NO-Produktion an Bedeutung gewinnt (Hillig et al., 2002), da die EDHF-Produktion in Anwesenheit von NO supprimiert wird (Bauersachs et al., 1996).

In einer Untersuchung aus dem Jahre 2003 konnten Paussauer und seine Arbeitsgruppe bei gesunden Individuen keinen Einfluss CYP 2C9-abhängiger Metaboliten auf den Ruheblutfluss und auf die bradykinin-induzierte, NO/PGI₂-unabhängige Vasorelaxation finden (Passauer et al., 2003).

Fraglich blieb die Bedeutung von CYP 2C9-abhängigen Metaboliten bei endothelialer Dysfunktion. In einer Arbeit von Fichtlscherer et al. wurde der Einfluss des selektiven CYP 2C9 Inhibitors *Sulphenazol* bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung untersucht (Fichtlscherer 2003). Es fand sich eine Verbesserung der

endothelabhängigen Vasodilatation durch die selektive Blockade von CYP 2C9 bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Die Autoren vermuten, dass dieser Effekt durch die Reduktion der CYP 2C9-abhängigen Bildung von Sauerstoffradikalen und der damit verursachten Verbesserung der Bioverfügbarkeit von NO verursacht ist.

6.2. Koronare Herzerkrankung

Ob CYP 2C9 Polymorphismen bei der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung eine Rolle spielen, ist nicht geklärt. In der Arbeit von Yasar et al. konnte jedoch eine Überrepräsentation von CYP 2C9 und 2C8 Polymorphismen in der Gruppe der Herzinfarktpatienten (n=1172) im Vergleich zum Kontrollkollektiv (n=1502) festgestellt werden. Dabei waren die Genotypen 2C8*3/*3 und 2C9*3/*3 in der Gruppe der Myokardpatienten zwei Mal so häufig wie in der Kontrollgruppe (Yasar et al., 2003).

6.3. Arterielle Hypertonie

EETs wird eine antihypertensive Wirkung zugeschrieben. Diese scheint einerseits über die EDHF-abhängige Vasodilatation und andererseits über die Beeinflussung der Nierenperfusion als auch des tubulären Ionen- und Wassertransportes zu erfolgen.

Die 1989 erschienene Studie von Sacerdoti ist eine der ersten, die einen Zusammenhang zwischen der CYP-abhängigen Arachidonsäuremetaboliten und der Blutdruckregulation aufzeigt. Die Induktion von CYP Enzymen schützt junge *spontaneously hypertensive rats* (SHR) vor der Entwicklung einer Hypertonie (Sacerdoti et al., 1989). Zhao et al. konnte ferner einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Regulation der CYP 2C und 2J Expression und der Entstehung einer salzinduzierten Hypertonie herstellen (Zhao et al, 2003).

Entgegen dieser Ergebnisse konnten in einer größeren Populationsstudie keine Assoziation zwischen den Varianten der CYP 2C9 und 2C8 und einer arteriellen Hypertonie gefunden werden (Yasar et al., 2003). Auch in einer kürzlich erschienenen Untersuchung besteht keine Assoziation zwischen dem CYP 2C8/2C9 Genotyp und einer arteriellen Hypertonie bei Afroamerikaner (Dreisbach et al., 2005).

6.4. Arzneimittelinteraktionen kardiovaskulärer Medikamente

Die Auswirkungen von CYP 2C9 Polymorphismen auf die Verstoffwechslung von Arzneimitteln wurde bereits ausgiebig untersucht. Für 17 Pharmaka wurde ein Effekt dieser Allelvarianten in pharmakokinetischen Studien nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, kommt es bei CYP 2C9*2 und*3 Polymorphismen meist zu einer verminderten intrinsischen Clearance. Eine Ausnahme stellt Diclofenac dar.

Der Lipidsenker Fluvastatin wird durch CYP 2C9 in der Leber verstoffwechselt. Die Pharmakokinetik ist von CYP 2C9 Polymorphismen abhängig (Kirchheiner et al., 2003). In einer Arbeit von Fisslthaler aus dem Jahre 2003 konnte gezeigt werden, dass Statine die Konzentration von CYP 2C mRNA und CYP 2C in Endothelzellen erhöhen. Es kommt zu einer verstärkten NO/PG-unabhängigen Vasodilatation von Arterien. (Fisslthaler, 2003).

Der Angiotensin antagonist Losatan wird über CYP 2C9 in den aktiven und lang wirkenden Metaboliten E-3174 metabolisiert. Für *slow metabolizer* der CYP 2C9 Genotypen wird eine weniger effektive und weniger stabile Blutdrucksenkung vermutet (Yasar et al., 2002). Eine klinische Relevanz konnte bisher nicht gezeigt werden. Irbesartan, ein weiteres CYP 2C9-Substrat, zeigt eine stärkere Reduktion des Blutdrucks bei CYP 2C9*1/*2 und *1/*3 Genotypen im Vergleich zum Wildtyp (Hallberg et al., 2002).

Orale Antidiabetika wie Glibenclamid, Glipizid, Tolbutamid und Glimepirid werden durch CYP 2C9 metabolisiert. Die Allelvariante CYP 2C9*1/*3 weist eine 50% reduzierte orale Clearance dieser Medikamente im Vergleich zum Wildtyp auf. Die homozygote Variante führt sogar zu einer 80%igen Reduktion der Clearance. In klinischen Studien besteht bei Gesunden kein oder kaum ein Effekt auf die Glukoseregulation. Bei Patienten (n=20) kam es unter den „*slow metabolizern*“ zu einem erhöhten Risiko von Hypoglykämien (Kirchheiner und Brockmöller, 2005).

7. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Polymorphismen der CYP 2C9 auf die Endothelfunktion und auf kardiovaskuläre Erkrankungen zu untersuchen. Wie bereits dargestellt, führen CYP 2C9 Polymorphismen zu einer eingeschränkten Enzymfunktion dieser Cytochrome. Dies kann einerseits zu einer verminderten EET-vermittelten Vasodilatation, aber andererseits auch über eine verminderte Bildung von Sauerstoffradikalen zu einer Erhöhung der NO-Wirkung am Gefäßendothel führen. Bei 284 jungen, gesunden männlichen Probanden und bei 706 Patienten beider Geschlechter mit kardiovaskulären Erkrankungen wurde die Endothelfunktion mittels Venenverschlussplethysmographie sowie der Genstatus bezüglich CYP 2C9 Polymorphismen bestimmt. Des Weiteren wurden Daten zur Anamnese, zum klinischen Status und den Befunden der kardiovaskulären Erkrankungen erfasst.