

1. Einleitung

Kurz vor seinem Tod schrieb Alfred Nobel einem Freund, es sei doch eine Ironie des Schicksals, dass er gegen seine wiederholten Brustschmerzen Nitroglycerin verordnet bekam. Warum aber die als Sprengstoff bekannte Substanz gegen die wiederholten Angina – pectoris – Anfälle wirkte, war nicht bekannt. Erst in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts begann sich das Geheimnis zu lüften. Die Arbeiten von Furchgott, Murad und Ignarro wiesen schließlich nach, dass Nitroxid (NO), ein volatiles Gas, identisch war mit dem zuvor beschriebenen EDRF (endothelium – derived relaxing factor) und eine Vasodilatation bewirkte. Seither wird immer augenscheinlicher, dass dieses kleine unscheinbare Molekül nicht nur eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gefäßweite spielt, sondern eine ganze Reihe von Funktionen im menschlichen Körper durch NO gesteuert werden. Dazu gehören so unterschiedliche Vorgänge wie Neurotransmission, Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger und Regulation der Funktion von Hohlorganen.

1.1 NO und NO – Synthesen

NO entsteht aus L- Arginin unter der Wirkung des Enzyms Nitroxidsynthetase unter der Mitwirkung von NADPH, FMN, FAD, BH₄ (Tetrahydrobiopterin) und Haem als Cofaktoren. Diese sind relativ fest an das Enzym gebunden. Die Summenformel der Reaktion ist in Abbildung 1 dargestellt (Moncada et Higgs 1993).

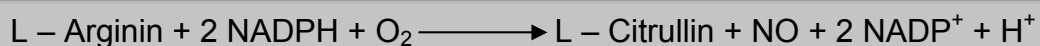


Abbildung 1: Summenformel der NO – Synthese aus L – Arginin.

Das Enzym Nitroxidsynthase ist derzeit in 3 verschiedenen Isoformen bekannt. Zwei dieser Isoenzyme werden Ca / Calmodulin – abhängig konstitutiv vor allem im Gehirn und Endothel exprimiert (eNOS und nNOS), wohingegen die andere Isoform Calcium – unabhängig durch Zytokinaktivität aktiviert wird (Tabelle 1).

Bisheriger Name	Aktuelle Bezeichnung	Molekulargewicht (kDa)	Aktivierung	Genlocus
nNOS	NOS I	161	Ca – Calmodulin	12q24.2 – 12q24.3
iNOS	NOS II	131	Zytokine	17cen – 17q11.2
eNOS	NOS III	133	Ca - Calmodulin	7q35 – 7q36

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten NO – Synthase – Isoformen (Davignon et Ganz 2004).

Alle NOS – Gene haben eine gemeinsame genomische Struktur. Dies lässt vermuten, dass ein gemeinsamer „Urahne“ dieser Genfamilie besteht. Das NOS – Protein besteht jeweils aus einer Oxygenase – Domäne, die über eine Calmodulin – erkennende Brücke mit einer Reduktase – Domäne verbunden ist (Abbildung 2).

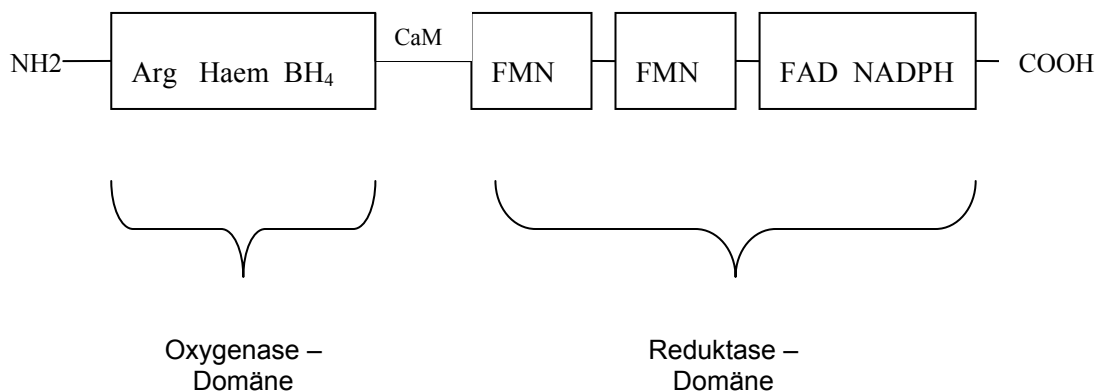


Abbildung 2: Allgemeine Struktur der NOS – Genfamilie mit Darstellung der Bindungsstellen für Arginin (Arg), Haem, BH₄ (Tetrahydrobiopterin), FAD, FMN und NADPH. (Alderton et al., 2001).

Die Homologie zwischen den einzelnen Proteinen beträgt 50 – 57% (Alderton et al., 2001). Alle 3 Isoformen sind also auf die Gegenwart von Calmodulin angewiesen. Allerdings zeigen NOS I und NOS III eine weitaus stärkere Calciumabhängigkeit als NOS II (=iNOS). Der Grund dafür scheint in einem 40 – 50 Aminosäuren umfassenden

Insert in der Mitte der FMN – Bindungsstelle zu liegen. Dieses Insert zeigt eine autoinhibitorische Wirkung, indem es bei niedrigen Ca^{2+} - Konzentrationen die Bindung des Calmodulins destabilisiert und zudem den Elektronentransfer vom FMN zum Haem behindert (Alderton et al., 2001). Bei der katalysierten Reaktion werden Elektronen vom NADPH auf die Reduktase – Domäne übertragen und über FAD und FMN an die Oxygenase – Domäne weitergegeben. Durch Interaktion der Elektronen mit Haem und Tetrahydrobiopterin wird hier die Reaktion von L – Arginin und Sauerstoff zu Citrullin und NO katalysiert.

Die Aktivierung des Enzyms führt bei allen Isoformen dazu, dass sich jeweils zwei NOS – Monomere mit der in Abbildung 2 gezeigten Struktur zu einem Dimer verbinden.

1.2. Physiologische und pathophysiologische Rolle von NO bei der Regulation der Gefäßfunktion

Die wohl bekannteste und sicher auch eine der bedeutendsten Funktionen von NO ist die vasodilatatorische Wirkung, die von Furchgott 1980 beschrieben wurde (Furchgott et Zawadzki, 1980). Diese ist Grundlage für den Einsatz NO – freisetzender Substanzen bei der KHK und der erektilen Dysfunktion. Der Mechanismus dieser Wirkung beruht auf der Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase in der glatten Gefäßmuskelzelle (vascular smooth muscle cell, VSMC) durch vom Endothel freigesetztes NO.

Daneben hat NO im Gefäß noch eine Vielzahl weiterer Funktionen. So wirkt es inhibierend auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC), die zytokininduzierte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie die Wirkung proinflammatorischer Zytokine (Katsuyama et al., 1998; Cornwell et al., 1994; De Caterina et al., 1995). Diese Vorgänge haben wesentliche Bedeutung bei der Pathogenese der Atherosklerose. Insofern kann man NO eine protektive Wirkung gegenüber atherogenen Stimuli zusprechen (Gewaltig et al., 2002).

Das im Gefäß vorhandene NO kann von zwei verschiedenen Zelltypen, nämlich Endothel- und glatten Muskelzellen (VSMC) produziert werden (Andrew et al., 1999; Beasley et al., 1991). Die endotheliale NO - Ausschüttung ist das Ergebnis der Wirkung der eNOS (NOS I, eNOS). Die hieraus resultierende NO - Menge genügt in normalen Gefäßen, um die vaskuläre Regulation aufrecht zu erhalten. Die NO - Produktion der

glatten Gefäßmuskulatur (VSMC) ist nicht aktiviert.

Bei Störungen der endothelialen Funktion als Reaktion auf verschiedene Einflüsse reicht die NO - Synthese des Endothels nicht, um den Bedürfnissen der Gefäßregulation gerecht zu werden.

1.3. Endotheliale Dysfunktion und Pathogenese der Atherosklerose

Im Gefäß wirkt das Endothel nicht nur als „Innenauskleidung“, vielmehr spielt es eine wichtige Rolle als Hauptregulator der vaskulären Homöostase. Es sorgt für die Balance zwischen Vasodilatation und –konstriktion, Inhibierung und Stimulierung von Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzelle sowie zwischen Thrombogenese und Fibrinolyse. Eine ganze Reihe von Mediatoren wie NO, Derivate der Arachidonsäure, Endothelin u.a. werden hierfür vom Endothel synthetisiert (Cross, 2002).

Durch verschiedene Einflüsse (Risikofaktoren) wird diese Homöostase gestört und das Endothel gerät in einen proinflammatorischen und prothrombotischen Zustand (Endemann et Schiffrin, 2004), gekennzeichnet durch:

1. eine veränderte Vasoreaktivität mit einer Einschränkung der endothelabhängigen Relaxation
2. eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine
3. eine Hyperadhäsivität für Leukozyten, insbesondere Monozyten
4. Sekretion chemotaktischer Substanzen mit Wirkung auf Leukozyten. (Rösen, 2002; Naseem, 2005).

Dieser Zustand, der rein funktioneller Natur ohne sichtbare morphologische Veränderungen ist, wird als endotheliale Dysfunktion (ED) bezeichnet und stellt den frühesten Schritt auf dem Weg zu dann auch morphologisch fassbaren Veränderungen der Atherosklerose dar.

Als Atherosklerose bezeichnet man einen chronischen Krankheitsprozess, der zur Bildung so genannter Atherome, also Ablagerungen breiartiger, lipidhaltiger Massen mit Zerstörung der normalen Gefäßarchitektur, führt. In der Pathogenese dieser

Erkrankung werden 4 Phasen unterschieden (Naseem, 2005):

1. *Endotheliale Dysfunktion*

2. *Inflammatorische Phase:*

Hier kommt es zur Adhäsion von Monozyten mit anschließender Migration in den subintimalen Raum. Hier nehmen die nun als Makrophagen bezeichneten Zellen Lipide auf und wandeln sich in so genannte Schaumzellen um.

3. *Reparative Phase:*

Hauptmerkmal dieser Phase ist die Umwandlung des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen von einem kontraktilen Zustand in einen sekretorischen. Die VSMC agieren dann wie Fibroblasten und sezernieren große Mengen von Kollagen und Glykoproteinen. Dadurch entsteht eine fibröse Kappe über den Lipidablagerungen in der Gefäßwand, die mechanischem Stress widerstehen kann und als Ersatzgewebe eine Art Narbe darstellt. Der Nachteil dieses Gebildes ist, dass es mit zunehmender Größe den Blutfluss behindert und zudem die Ernährung der Gefäßwand erschwert.

4. *Thrombotische Phase:*

Wenn die fibröse Kappe einreißt, kommt es zum schlagartigen Freisetzen prothrombotischer Substanzen in das Gefäßlumen. Dies und das nun freiliegende Kollagen sorgen für eine schlagartige Thrombozytenaktivierung und Bildung eines Thrombus mit konsekutivem Gefäßverschluss.

Augenscheinlichstes Merkmal der endothelialen Dysfunktion ist eine gestörte Vasodilatation (Endemann et Schiffrin, 2004). Die Veränderungen sind zunächst fokal und werden durch lokale Besonderheiten wie beispielsweise vermehrte Flussturbulenzen an Gefäßaufzweigungen begünstigt. Endotheliale Dysfunktion kann also als funktionelle Atherosklerose aufgefasst werden und ist das Bindeglied der vaskulären Veränderungen bei so unterschiedlichen Erkrankungen wie arteriellem Hypertonus, KHK, Diabetes und chronischer Niereninsuffizienz.

1.4. Endotheliale Dysfunktion und NO

Bei der Entstehung der ED kommt dem von eNOS synthetisierten NO eine besondere

Rolle zu. Dieses inhibiert im gesunden Gefäß die Plättchenaggregation, die Leukozytenadhäsion / Infiltration in die Gefäßwand und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzelle sowie die oxidative Modifikation von LDL – Cholesterol, einen wesentlichen Mechanismus des atherosklerotischen Prozesses.

Eine eingeschränkte NO – Produktion oder Verfügbarkeit führt im Umkehrschluss zu Prozessen, die bei der Atherosklerose eine Rolle spielen wie Vasokonstriktion, Plättchenaggregation und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Katsuyama et al., 1998). In dieser Situation verstärken die VSMC ihre NO – Produktion als Kompensationsmechanismus (Wilcox et al., 1997; Yan et al. 1996). Dem VSMC – produzierten NO kann somit unter den Bedingungen der endothelialen Dysfunktion eine Schlüsselrolle für den Progress der Veränderungen zusprechen.

Das von VSMC synthetisierte NO entstammt der Aktivität der induzierbaren Nitroxidsynthase iNOS, die auch in Leukozyten, aber nicht in Endothelzellen exprimiert wird. Eine gesteigerte NO – Produktion durch iNOS ist in die Pathogenese des vascular remodeling und der Atherosklerose mit involviert (Collins, 1993), weil es die Zellproliferation von VSMC inhibiert und ihre Apoptose auslöst (Cornwell et al., 1994; Fukuo et al., 1996), sowie zu einer Mesangiumzellproliferation und gesteigerten ECM – Synthese führt (Garg et Hassid, 1989 B).

1.5. Atherosklerose und chronisches Nierenversagen

Eine ganze Reihe von Studien haben gezeigt, dass ein chronisches Nierenversagen zu einer endothelialen Dysfunktion führt und dass insbesondere die NO – Bioverfügbarkeit stark reduziert ist (Passauer et al., 2000).

Atherosklerose ist der Hauptgrund für Morbidität und Mortalität beim chronischen Nierenversagen (CNV) (Raine et al., 1992; Moeslinger et Spieckermann, 2001). Die Lebenserwartung von Patienten mit einer chronischen Nierenersatztherapie älter als 45 Lebensjahre ist um 20 – 25 Jahre vermindert (US Renal Data System, www.usrds.org). Foley et al. verglichen die Mortalitätsraten durch kardiovaskuläre Erkrankungen in den USA in der Normalbevölkerung mit denen in der Gruppe der Dialysepatienten (Foley et al., 1998). Hierbei ergab sich für jüngere Dialysepatienten, im Vergleich zur gesunden Bevölkerung, ein etwa 500mal erhöhtes Risiko, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben. Bei den ältesten Studienteilnehmern war das Risiko immerhin noch 5mal

so hoch. Dafür verantwortlich ist zum einen schlicht die höhere Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Dialysepatienten. Damit einher geht eine höhere Rate an fatalen Verläufen (Herzog et al., 1998). Dieses erhöhte Risiko betrifft jedoch nicht nur Patienten im Endstadium einer Nierenerkrankung.

Aus den Daten des USRDS – Reports 2004 (US Renal Data System, www.usrds.org) geht hervor, dass bei den Todesursachen von Patienten mit ESRD plötzlicher Herztod, Myokardinfarkt, Kardiomyopathie und zerebrovaskuläre Erkrankungen weit oben stehen.

Im Wesentlichen sind es 3 Formen der kardiovaskulären Schädigung, die zur erhöhten Mortalität beitragen:

1. Veränderungen der kardialen Geometrie mit exzentrischer und konzentrischer LVH und LV remodeling.
2. Arteriosklerose als degenerativer Zustand mit reduzierter Elastizität und Wandverdickung der Arterien
3. Atherosklerose, die mit der Bildung von Atheromen in der Gefäßwand einhergeht.

Für diese Veränderungen sind zum Teil etablierte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterieller Hypertonus oder erhöhte Serumspiegel von LDL oder Lipoprotein(a) (Moeslinger et Spieckermann, 2001; Gupta et Robinson, 1997) verantwortlich. Daneben stellt aber der urämische Status per se einen bedeutenden Risikofaktor dar. Durch ihn kommt es zu Störungen im Calcium – Phosphat – Haushalt, zur Anämie, zur Volumenüberladung mit konsekutiver Hypertension und zur Akkumulation von normalerweise renal eliminierten Stoffwechselprodukten. Dazu tritt noch ein Zustand der chronischen Entzündung (Ikizler, 2002) und erhöhter oxidativer Stress.

Abnormalitäten des NO – Synthesewegs haben eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Atherosklerose bei Patienten mit CNV (Moeslinger et Spieckermann, 2001; Aiello et al., 1999). Im Zustand des CNV ist die NO – Bioverfügbarkeit reduziert (Passauer et al., 2000). Diese Reduktion von NO in der Gegenwart kontinuierlicher lokaler Generation von vasokonstriktorisches und mitogenen Substanzen trägt mit zur Zellproliferation,

intraglomerulären Hypertension (Aiello et al., 1998) und schließlich Atherosklerose bei. In Glomerula kommt es nach chirurgischer Entfernung zur exzessiven Bildung von renalen Entzündungsmediatoren wie PGDF (Floege et al., 1992) und TGF – β (Lee et al., 1995). Diese beiden Mediatoren sind potente Inhibitoren der NO – Synthese und blockieren dosisabhängig die IL – 1 β induzierte iNOS – mRNA in Mesangiumzellen von Ratten (Ketteler et al., 1994). Eine reduzierte NO – Produktion kann durch die Zufuhr von L – Arginin verbessert werden.

1.6. Mechanismen der reduzierten NO – Bioverfügbarkeit beim chronischen Nierenversagen

Mehrere Untersuchungen haben sich mit den Ursachen der verminderten NO – Bioverfügbarkeit beim Nierenversagen beschäftigt. Thuraisingham und Yaqoob (Thuraisingham et Yaqoob, 2003) machten einen erhöhten Verbrauch des synthetisierten NO durch Reaktionen mit oxidativen Sauerstoffspezies dafür verantwortlich. Im Rahmen einer chronischen Nierenfunktionseinschränkung kommt es zu einem erhöhten oxidativen Stress (Tepel, 2003; Descamps – Latscha et al., 2001). Eine regelmäßige Hämodialyse mit biokompatiblen Membranen hat keinen Einfluss auf den intrazellulär nachweisbaren Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (Tepel et al., 2000).

Ein anderer möglicher Mechanismus einer reduzierten NO – Menge ist eine Einschränkung des verfügbaren Substrats, also L – Arginin. In einem experimentellen Modell an jungen Ratten konnten Wu et al. eine reduzierte NO – Synthese als Folge einer eingeschränkten L – Arginin – Zufuhr nachweisen (Wu et al., 1999). Neben einer verminderten Zufuhr kann auch eine reduzierte Bioverfügbarkeit des Arginins eine Rolle spielen. Vorstellbare Mechanismen sind ein reduzierter Arginintransport in die Zelle oder ein erhöhter Metabolismus.

1.6.1. Urämietoxine

Einer reduzierten NOS – Aktivität durch eine Hemmung des Enzyms scheint im urämischen Status eine große Bedeutung zuzukommen. Eine Reihe verschiedener

Ursachen sind hierfür verantwortlich gemacht worden. So konnten Moeslinger et al. zeigen, dass eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration mit einer reduzierten iNOS – Aktivität einhergeht (Moeslinger et Spieckermann, 2001). Neben einer Erhöhung der Harnstoffkonzentration kommt es bei der terminalen Niereninsuffizienz zur Akkumulation einer ganzen Reihe weiterer Substanzen wie Oxalat, ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin), Hypoxanthin u.a., die normalerweise renal ausgeschieden werden. Aufgrund der fehlenden Entgiftungsfunktion der Niere akkumulieren diese Stoffe jedoch und können zum Teil exzessive Konzentrationen erreichen (Vanholder et al., 2003 A). Wenn diese Konzentrationserhöhung mit biologischen Funktionen interferiert, spricht man von Urämietoxinen (Vanholder 2003 B).

Die genaue biologische Wirkung der meisten Urämietoxine ist unklar. Bei einigen, wie z.B. dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) ist dies hingegen bekannt (Fliser et al., 2005; Kielstein et al., 2001). ADMA interferiert mit L - Arginin und führt zu einer kompetitiven Blockade des NOS – Enzyms.

1.6.2. Phenyllessigsäure als neues Urämietoxin

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Jankowski neue Urämietoxine identifizieren (Jankowski et al. 1998, 2003). Eines davon ist die Phenyllessigsäure (Phenylacetylsäure, PAA).

PAA ist eine schwache organische Säure mit der Summenformel $C_8H_8O_2$ und einem Molekulargewicht von 136,15 g/mol (Abbildung 3).

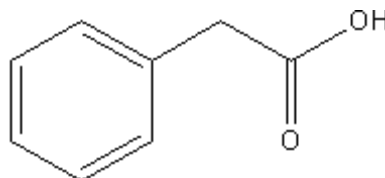


Abbildung 3: Strukturformel von PAA (Onlineenzyklopädie Wikipedia, http://en.wikipedia.org/wiki/Phenylacetic_acid).

Die Substanz stellt ein Degradationsprodukt der Aminosäure Phenylalanin dar und entsteht im Körper nach dem in Abbildung 4 gezeigten Mechanismus (Oberdoerster et al., 2000).

90% des im Körper abgebauten Phenylalanins werden zu Tyrosin hydroxyliert und nur 10% zu Phenylethylamin decarboxyliert. 90% des Phenylethylamins werden zu Phenylacetylessigsäure oxidiert, aus den übrigen 10% entsteht Mandelsäure.

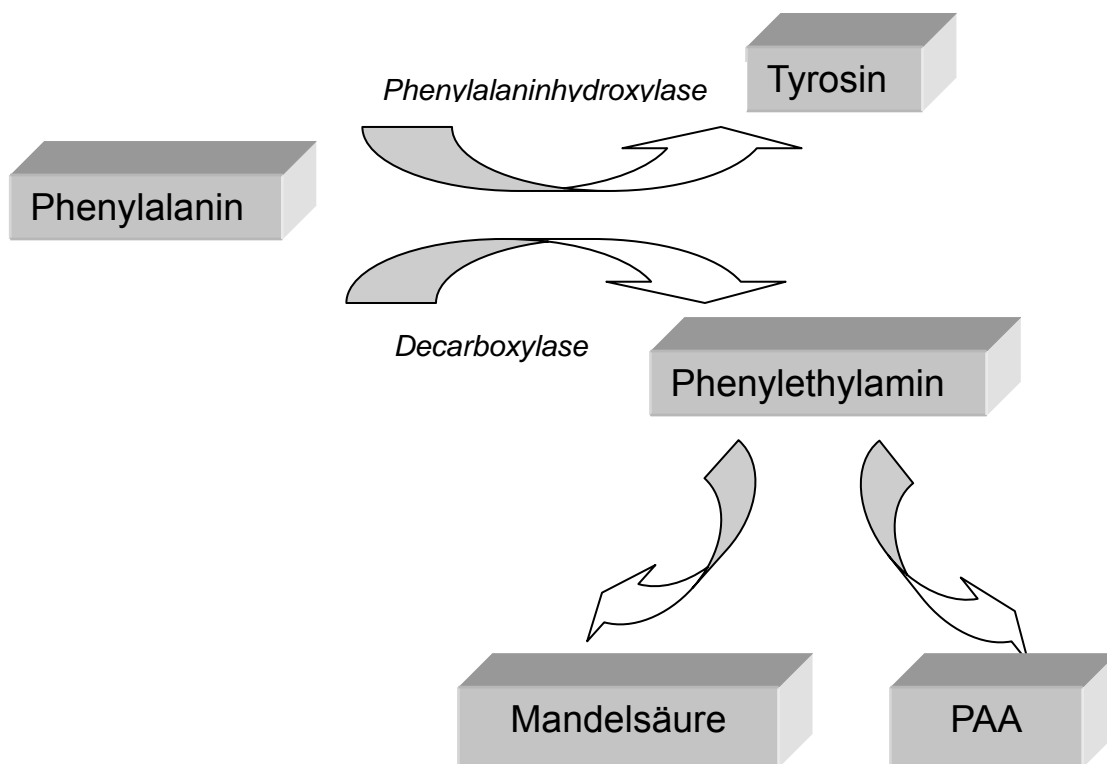


Abbildung 4: Übersicht über die Bildung von PAA im Körper (Oberdoerster et al., 2000).

1.7. Zielstellung

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben sich Hinweise, dass PAA in der Lage ist, die induzierbare NO – Synthase zu beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den Einfluss des Plasmas von Dialysepatienten auf die iNOS – Expression zu untersuchen. Damit soll gezeigt werden, dass bei Patienten mit Urämie in der Tat die

iNOS - Expression gehemmt werden kann. Weiterhin soll dann die Wirkung von PAA auf die iNOS – Expression und NO – Bioverfügbarkeit untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen an humanen Leukozyten durchgeführt werden, da diese für die menschliche Pathologie gute Aufschlüsse geben. Ziel der Arbeit ist die biologische Charakterisierung eines neuen Urämietoxins.