

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

Dissertation

**Der Einfluss von HDL und dem HDL-
assoziierten Sphingosin-1-Phosphat auf
proinflammatorische Signalwege**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sönke Labza
aus Oldenburg

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet
 2. Prof. Dr. med. J. Hoyer
 3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter

Datum der Promotion: 03.09.2010

In Dankbarkeit für meine Eltern

Inhalt

| | Seite |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1 Einleitung | 10 |
| 1.1 Atherosklerose | 10 |
| 1.1.1 Pathogenese | 10 |
| 1.1.2 Risikofaktoren | 11 |
| 1.1.3 Chronisch inflammatorische Prozesse | 13 |
| 1.1.4 Klinische Manifestation der Atherosklerose | 13 |
| 1.2 proinflammatorische Enzyme | 14 |
| 1.2.1 induzierbare NO-Synthase (iNOS) | 14 |
| 1.2.1.1 NO-Synthese, Abbau und Wirkung | 14 |
| 1.2.1.2 NOS II (induzierbare NO-Synthase, iNOS) | 15 |
| 1.2.2 Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) | 16 |
| 1.2.2.1 Funktion der Matrix Metalloproteinasen | 16 |
| 1.2.2.2 Plaque-Instabilität und Aneurysmaentstehung | 17 |
| 1.2.2.3 Stimuli der MMP-Expression und –Aktivierung | 18 |
| 1.2.3 Phospholipase A2 (PLA2) | 18 |
| 1.2.3.1 Biologie der Phospholipase A2 | 18 |
| 1.2.3.2 sPLA2 und seine Interaktionen | 19 |
| 1.3 antiinflammatorische Wirkstoffe | 20 |
| 1.3.1 HDL | 20 |
| 1.3.1.1 Zusammensetzung der HDL | 20 |
| 1.3.1.2 Epidemiologie | 21 |
| 1.3.1.3 Funktionen der HDL | 21 |
| 1.3.2 Sphingosin-1-Phosphat (S1P) | 23 |
| 1.3.2.1 Synthese und Abbau des S1P | 23 |
| 1.3.2.2 S1P-Rezeptoren | 24 |
| 1.3.2.3 Funktionen des Sphingosin-1-Phosphat | 26 |
| 1.4 Fragestellung | 28 |
| 2 Methoden und Material | 29 |
| 2.1 Methoden | 29 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.1 | Versuchstiere und deren Haltung | 29 |
| 2.1.2 | Aortenexplantation | 29 |
| 2.1.3 | Verwendung der Aorten als Versuchsorgan | 29 |
| 2.1.4 | Zellkultur | 30 |
| 2.1.5 | RNA-Isolierung | 31 |
| 2.1.5.1 | RNA-Isolierung nach Zellkultur | 31 |
| 2.1.5.2 | RNA-Isolierung aus Zellverbänden (Aorten) | 31 |
| 2.1.6 | RNA-Konzentrationsbestimmung am Nano-Drop ® | 32 |
| 2.1.7 | Reverse Transkription | 33 |
| 2.1.8 | Polymerase Kettenreaktion | 33 |
| 2.1.8.1 | PCR-Zyklen | 34 |
| 2.1.8.2 | Primer | 34 |
| 2.1.8.3 | Thermocycler und Temperaturprofil | 35 |
| 2.1.8.4 | Interkalierende Farbstoffe – ROX ® | 36 |
| 2.1.8.5 | Auswertung der PCR | 36 |
| 2.1.8.6 | relative Quantifizierung | 37 |
| 2.1.8.7 | Statistik | 39 |
| 2.2 | Material | 39 |
| 2.2.1 | Chemikalien/Reagenzien/Puffer | 39 |
| 2.2.2 | Kits und fertige Lösungen | 40 |
| 2.2.3 | Verbrauchsmaterialien | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 43 |
| 3.1 | Einfluss der Inkubationszeit auf die Expression proinflammatorischer Gene | 43 |
| 3.2 | Einfluss von HDL auf die Expression proinflammatorischer Gene | 44 |
| 3.2.1 | iNOS | 44 |
| 3.2.2 | MMP9 | 45 |
| 3.2.3 | sPLA2 | 45 |
| 3.3 | Einfluss von S1P auf die Expression proinflammatorischer Gene | 46 |
| 3.3.1 | iNOS | 46 |
| 3.3.2 | MMP9 | 47 |
| 3.3.3 | sPLA2 | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Expression proinflammatorischer Gene unter Blockierung des S1P3-Rezeptors | 49 |
| 3.4.1 | iNOS | 49 |
| 3.4.2 | MMP9 | 50 |
| 3.4.3 | sPLA2 | 51 |
| 3.5 | Antiinflammatorische Effekte von HDL und S1P unter dem Einfluss verschiedener Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems | 52 |
| 3.5.1 | iNOS | 52 |
| 3.5.2 | MMP9 | 54 |
| 3.5.3 | sPLA2 | 55 |
| 3.6 | antiinflammatorische Effekte verschiedener S1P-Rezeptoragonisten auf die proinflammatorischen Gene iNOS, MMP9 und sPLA2 | 58 |
| 4 | Diskussion | 59 |
| 5 | Zusammenfassung / Abstract | 63 |
| 6 | Literaturliste | 65 |
| 7 | Lebenslauf | 83 |
| | Danksagung | 84 |
| | Erklärung | 85 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AC | Adenylcyclase |
| AG | Arbeitsgruppe |
| asc. | ascendens |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| Ca | Calcium |
| cDNA | cyclische DNA |
| CETP | Cholesteryl Ester Transfer Protein |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CT | Cyclethreshold |
| DMEM | Dulbecco's minimum essential medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| et al. | et altera |
| FCS | fetal calf serum |
| Fwd | Forward |
| g | Gramm |
| G | Gravitationskraft |
| Gi | inhibitorischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HDL | High Density Lipoproteins |
| ICAM | Interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| IDL | Intermediate-Density-Lipoproteins |

| | |
|-------------|--|
| IFN | Interferon |
| IL1 β | Interleukin-1 β |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| kDa | Kilo Dalton |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| l | Liter |
| LCAT | Lecithin Cholesterol Acyltransferase |
| LDL | Low Density Lipoproteins |
| LF | Luftfeuchtigkeit |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LpPLA2 | LipoproteinPLA2 |
| lysoPA | Lysophospholipid acid |
| LysoPC | Lysophosphatidylcholin |
| LysoPS | Lysophosphatidylserin |
| MCP-1 | Monocyte-Chemoattractand-Protein 1 |
| min | Minute |
| mg | Milligramm |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| μ l | Mikroliter |
| μ mol | Mikromol |
| MMP | Matrix Metallo Proteinase |
| n | Anzahl |
| nm | Nanometer |
| ng | Nanogramm |
| nM | nanomolar |
| nNOS | neuronale NO-Synthase |
| NO | Nitroxid |
| NOS | Nitroxid-Synthase |
| OD-Wert | Optische-Dichte-Wert |
| o.g. | oben genannt |
| OxyHb | oxydiertes Hämoglobin |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PAF | Platelet-Activating-Factor |

| | |
|-------|---|
| PBS | Purified Buffer Solution |
| PCR | Polymerase chain reaction/Polymerase Kettenreaktion |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PLC | Phospholipase C |
| PTX | Pertussis-Toxin |
| Rev | Reverse |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | reverse Transcriptase |
| s | Sekunde |
| S1P | Sphingosin 1 Phosphat |
| S1PK | Sphingosin-Kinase |
| S1PL | S1P-Lyase |
| S1PP | S1P-Phosphatase |
| siRNA | short interfering RNA |
| s.o. | siehe oben |
| sog. | so genannte |
| SphK | Sphingosin-Kinase |
| s.u. | siehe unten |
| sPLA2 | sekretorische Phospholipase2 |
| TGFβ | Transforming growth factor β |
| TIMP | Tissue Inhibitor of Metalloproteinase |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| u.a. | unter anderem |
| v.a. | vor allem |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |
| VLDL | Very Low Density Lipoproteins |
| VSMC | Vascular Smooth Muscle Cell |
| WKY | Wistar-Kyoto-Ratten |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems, die in verschiedenen Stadien diskontinuierlich über Jahre bis Jahrzehnte verläuft und durch spezifische zelluläre und azelluläre Prozesse gesteuert wird [Ross, R. 1999]. Trotz intensiver therapeutischer Bemühungen stellt die Atherosklerose weiterhin die häufigste Ursache für Tod und Behinderung in den westlichen Industriestaaten dar [Breslow JL. 1997, Braunwald E. 1997]. Atherosklerotische Läsionen kommen in großen und mittelgroßen elastischen und muskulären Arterien vor und können zu Ischämie von Herz, Gehirn und Extremitäten führen. Prädispositionsstellen solcher Läsionen sind Gefäßverzweigungen, Bifurkationen und Kurvaturen, da es hier zu nicht-laminärem Blutfluss kommt [Gottlieb AI, Labgille BL. 1996] und in der Folge Zellen der Gefäßwand ihr Expressionsmuster spezifisch verändern. So werden insbesondere Adhäsionsmoleküle, wie z.B. ICAM, PEA-1 oder Selektine, vermehrt gebildet, die als Rezeptoren fungieren, zu deren Liganden mit Makrophagen und T-Zellen pathophysiologisch bedeutende Entzündungszellen gehören.

1.1.1 Pathogenese

Als frühester Läsionstyp atherosklerotischer Gefäßveränderungen gelten die sog. Fatty streaks, die in jedem Lebensalter vorkommen und bereits bei Kindern und Jugendlichen beobachtet werden [Napoli, C et al. 1997]. Sie stellen eine durch wandständige Makrophagen und T-Zellen unterhaltene inflammatorische Reaktion dar [Stary, HC. 1994]. Bei Patienten mit Hypercholesterinämie geht dem Influx dieser Zellen eine fokale Akkumulation von Lipoproteinen voraus, die nach Bindung an die Intima bzw. Bestandteile der intimalen Extrazellulärmatrix internalisiert werden und einen Angriffspunkt für weitere Reaktionen darstellen [Napoli, C et al. 1997, Simionescu N. 1986].

Ein entscheidender Mechanismus der Atherogenese ist die resultierende endotheliale Dysfunktion. Man versteht hierunter die Unfähigkeit des Endothels, seinen physiologischen Eigenschaften nachzukommen: der Regulierung von Gefäßradius und Gerinnung sowie der Synthese antiinflammatorischer Zytokine [Gimbrone, MA, Jr. 1995].

Als Ursachen dafür gelten erhöhte Plasmakonzentrationen von LDL und chemisch modifizierten LDL, freie Radikale – etwa durch Zigarettenrauchen –, Hypertonus, Diabetes mellitus, genetische Alterationen, erhöhte Plasmakonzentrationen von Homocystein und

infektiöse Mikroorganismen (*Chlamydia pneumoniae*, Herpesviren) [Ross, R. 1999]. Im Rahmen endothelialer Dysfunktion kommt es zu gesteigerter Adhäsionskraft und Gefäßpermeabilität für Thrombozyten und Leukozyten, was zusammen mit veränderten Syntheseigenschaften für vasoaktive Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren des Endothels zu prokoagulatorischen Eigenschaften führt [Sachais, BS. 2001]. Ist das Immunsystem nicht in der Lage, den inflammatorischen Prozess zu neutralisieren oder zu reduzieren, chronifiziert sich dieser und stimuliert die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen zwischen die inflammatorischen Areale – es entstehen sog. intermediäre Läsionen. Bei unverändert wirksamen inflammatorischen Einflüssen kommt es zur Verdickung der Gefäßwand, der im Anfangsstadium durch Remodelling entgegengewirkt werden kann. Man versteht darunter kompensatorische vasodilatative Einflüsse über das Endothel [Glagov S. et al. 1987] sowie Reorganisation der extrazellulären Matrix durch spezielle Enzyme, die Matrix Metalloproteinasen (MMPs, siehe unten)[Zorina S. et al. 2002]. Während Granulozyten im Rahmen der Atherogenese nur vereinzelt ausgemacht werden können [Stary HC. 1996], sind Makrophagen und spezifische T-Lymphozyten die pathophysiologisch bedeutsamen Zellen dieser Entzündungsvorgänge [Jonasson L. et al. 1986, van der Wal AC. 1989]; ihre Aktivierung resultiert in einer gesteigerten Freisetzung hydrolytischer Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren [Libby P. et al. 1996, Raines EW. et al. 1996], die wiederum weitere Schädigungen induzieren und fokale Nekrosen ausbilden [Falk E. et al. 1996]. Durch die Kombination aus Akkumulation mononukleärer Zellen und Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen kommt es in der Folge zur Ausbildung einer fibrösen Kappe, die den Kern aus Lipiden und Nekrosen bedeckt. Man spricht in diesem Stadium von einer komplizierten oder fortgeschrittenen Läsion, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Einengung des Gefäßlumens nicht länger durch Dilatation kompensiert werden kann und der Blutfluss beeinträchtigt ist.

Eine verdünnte Kappe, etwa durch Metalloproteinasen [Galis ZS. et al. 1994] und hydrolytische Enzyme aus Makrophagen, kann zur Plaque-Ruptur führen, die durch spontane Bildung eines Thrombus im Gefäßverschluss enden kann, der sich zumeist im akuten Koronarsyndrom klinisch manifestiert [Falk E. et al. 1996, Ross R. 1993].

1.1.2 Risikofaktoren

Bereits seit längerem sind metabolische Störungen im Sinne von Hypercholesterinämien, modifizierten Lipiden und Lipoproteinen als Risikofaktoren der Atherogenese bekannt [Albu

J et al 2006]. Insbesondere die Endothelschädigung und die Bindung an Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen konnten als Pathomechanismen beschrieben werden [Steinberg D. 1997, Khoo JC et al. 1988, Griendling KK et al. 1997]. Da die durch LDL unterhaltene Inflammation wiederum die Bindung von LDL an das Endothel erhöht und die Transkription des LDL-Rezeptors steigert [Stoepck AT et al.1993], schließt sich ein Circulus vitiosus: Die durch modifizierte LDL ausgelöste Gefäßwandreaktion unterhält sich selbst [Han J et al 1997].

Zudem konnten Störungen im Glukosestoffwechsel sowie Hyperhomocysteinämie als bedeutende Risikofaktoren ausgemacht werden [AdlerAI et al. 2002, Nehler MR et al. 1997]. Neben Mikro- und Makroangiopathien ist die Hyperglykämie Ursache nicht-enzymatischer Glykosilierung von Lipoproteinen in der Arterienwand und beschleunigt so den Verlauf der Atherosklerose, was v.a. bei jungen Patienten eine signifikante Erhöhung von Gefäßläsionen zur Folge haben kann. [McGill HC Jr et al. 2001].

Hyperhomocysteinämien gehen mit endotheltoxischen Wirkungen [Harker LA et al. 1976], prothrombotischen Eigenschaften [Hajjar KA. 1993] und einer verringerten NO-Verfügbarkeit einher [Upchurch GR Jr et al. 1997].

Auch das Vorliegen einer Hypertonie kann als eigenständiger Risikofaktor im Rahmen der Atherosklerose gewertet werden. Entscheidenden pathophysiologischen Einfluss hat dabei das Angiotensin II, das potente vasokonstriktive Eigenschaften besitzt, das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert [Chobanian AV et al. 1996] und die Oxidation von LDL katalysiert.

Die Korrelation zwischen der Inzidenz von Atherosklerose und dem Vorliegen infektiöser Mikroorganismen (Herpesviren und Chlamydia pneumoniae) in sklerotischen Plaques konnte außerdem nachgewiesen werden [Libby P et al. 1997, Hendrix MG et al. 1990, Jackson LA et al. 1997, Danesh J et al. 1997].

Daneben gilt die Adipositas als Teil des metabolischen Syndroms als Risikofaktor für die Atherosklerose. Auch bei physiologischen Lipidprofilen weisen adipöse Männer signifikant mehr Fatty streaks auf als Normalgewichtige [McGill HC Jr et al. 2001].

Ferner ist das chronisch inhalative Zigarettenrauchen neben seinen Risiken für das bronchopulmonale System als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen zu werten [Turner RC et al. 1998]. Auch wenn der genaue Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Atherosklerose nicht genau geklärt ist, deuten Studien darauf hin, dass Zigarettenrauchen die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen und die Plaquestabilität bereits bei Patienten <35 Jahren beeinflusst [Dietel M, Suttorp N, Zeitz M et al. 2005, Strong JP, Richards ML. 1976].

1.1.3 Chronisch inflammatorische Prozesse

Trotz intensiver therapeutischer Beeinflussung klassischer Risikofaktoren (Hypercholesterinämie, Hypertonus, Rauchen) stellen kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin die häufigste Todesursache in den Industriestaaten dar [Breslow JL. 1997, Braunwald E. 1997].

Tatsächlich repräsentieren atherosklerotische Läsionen eine Vielzahl hochspezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen, so dass man die Pathogenese als inflammatorisch beschreibt [Ross R. 1993, Ross R. 1986]. Im Rahmen dieser entzündlichen Prozesse kommt der sekretorischen Phospholipase2 (sPLA2) eine besondere Bedeutung zu (s.u.). Sie ist bei Patienten mit Atherosklerose und nach akuten Myocardinfarkten besonders hoher Konzentration in sklerotischen Gefäßen und ischämischen Kardiomyocyten nachzuweisen [Niessen HWM et al. 2003]. Vermehrte Expression von sPLA2 geht mit verminderten Endothelfunktionen und gesteigerter Sauerstoffradikalbildung einher, die für den Krankheitsverlauf von entscheidender Bedeutung sind [Tietge UJ. 2005]. Daneben ist induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS) ganz entscheidend an der Atherogenese beteiligt (s.u.). In sklerotischen Plaques ist ihre Expression nicht nur in aktivierten Makrophagen sondern auch in glatten Gefäßmuskelzellen massiv erhöht. Die iNOS, eine hochpotente Isoform der NO-Synthasen, produziert unter inflammatorischen Bedingungen reaktive Sauerstoffradikale und kein protektives NO, da es aufgrund des Fehlens wichtiger Co-Faktoren (Tetrahydrobiopterin) zur chemischen Entkopplung kommt. Als weiteres wichtiges Enzym im Rahmen inflammatorischer Prozesse und bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen wurden die MMPs ausgemacht, die in Form der MMP9 die Stabilität atherosklerotischer Plaques reduzieren (s.u.). Eine verminderte Aktivität der MMP9 führt zur Plaquestabilisierung [Ross R. 1999, Newby AC. 2006]. Die Enzyme sPLA2, iNOS und MMP9 stellen zentrale Bestandteile chronisch inflammatorischer Prozesse im Rahmen der Atherosklerose dar. Der Einfluss durch HDL und S1P auf diese Vorgänge soll in dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

1.1.4 Klinische Manifestation der Atherosklerose

In Abhängigkeit davon, welche Gefäßanteile betroffen sind, kann die Atherosklerose eine Vielzahl von Symptomen zur Folge haben. Nicht selten verläuft sie jedoch bis zu Ischämie- oder Infarkt ereignissen klinisch stumm.

In den hirnversorgenden Gefäßen (Karotiden) kann sich die Atherosklerose als Schlaganfall oder Transitorische Ischämische Attacke (TIA) manifestieren, wobei meist große bis mittlere hirnversorgende Gefäße durch Plaqueruptur in der Aorta asc. oder im Aortenbogen verschlossen werden [Krozon I, Tunick PA. 2006]. In den koronaren Arterien kann auf dem Boden einer Atherosklerose ein Myokardinfarkt oder eine Angina pectoris entstehen. In den Koronararterien ereignen sich thrombembolische Ereignisse bevorzugt an lipidreichen Stellen der Gefäßwände, die im Vergleich zu kalzifizierten Plaques häufiger rupturieren. [Davies MJ et al. 1993]. Atherosklerose in den viszeralen Gefäßen kann als mesenteriale Ischämie oder Mesenterialinfarkt imponieren [Dietel M, Suttorp N, Zeitz M et al. 2005.]. Bei Patienten mit multiplen atherosklerotischen Plaques in der transoesophagealen Echokardiographie wurden sonographisch in 19% der Fälle Stenosen der renalen Arterien festgestellt [Reynolds HR et al. 2004], was insofern einen Circulus vitiosus darstellt, als dass die Nierenarterienstenose oftmals Ursache eines Hypertonus ist, der wiederum als Risikofaktor für die Atherogenese bekannt ist [Krozon I, Tunick PA. 2006]. In Gefäßen der Peripherie kann die Atherosklerose als periphere Arterielle Verschluss-krankheit (pAVK) oder als Claudicatio intermittens klinisch in Erscheinung treten [Dietel M, Suttorp N, Zeitz M et al. 2005.].

1.2 Proinflammatorische Enzyme

1.2.1 Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

1.2.1.1 NO – Synthese, Abbau und Wirkung

Nitroxid (NO) ist ein durch NO-Synthasen (NOS) gebildeter Faktor mit (in physiologischen Konzentrationen) wesentlichen skleroprotektiven Eigenschaften [Wever RMF et al. 1998, Lefer AM et al 1993], der nach Konversion eines terminalen Guanidins an L-Arginin entsteht [Kuhlencordt PJ et al. 2001]. NO ist Inhibitor der Leukozyten- und Monozyten-Adhäsion [De Caterina R et al 1995, Davenpeck KL et al. 1994, Kurose I et al. 1995, Gauthier TW et al. 1995] und hemmt die Interaktion zwischen Thrombozyten und Gefäßwand [de Graaf JC et al 1992]. Zudem wird die Aktivierung von Leukozyten herabgesetzt [Kuhlencordt PJ et al. 2001]. Weiterhin verringert es die Permeabilität des Endothels, hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und senkt die vaskuläre Spannung, was die Lipoproteineinlagerung in die Gefäßwand vermindert [Draijer R et al. 1995, Cardona-Sanclemente LE, Born GV 1995]. So vermag die Substitution von Arginin mit der daraus resultierenden gesteigerten NO-Synthese die Symptomatik der Angina pectoris zu verbessern [Creager MA et al. 1992]. Die

Halbwertszeit von NO wird im Wesentlichen durch Reaktion mit OxyHB und Superoxiden determiniert [Beckmann JS, Koppenol WH. 1996], wobei sich aus NO und Superoxid Peroxynitrit (ONOO-) bildet, das in physiologischen Konzentrationen vasorelaxierend [Liu S et al. 1994] und antiinflammatorisch [Lefer DJ et al. 1997] wirkt. Die o.g. Reaktionen werden von drei Mitgliedern der Familie der NO-Synthasen vermittelt, der nNOS (neuronal NOS, NOS I), der iNOS (induzierbare NOS, NOS II) und der eNOS (endotheliale NOS, NOS III), wobei im Rahmen atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen die iNOS entscheidend beteiligt ist.

Bei der nNOS und der eNOS handelt es sich um Isoformen, deren Aktivität über die intrazelluläre Ca-Konzentration reguliert wird. Als weiterer Co-Faktor der von den NOS I und III vermittelten NO-Synthese ist Tetrahydrobiopterin (BH₄) bekannt. Ihm wird eine NO-stabilisierende Funktion zugeschrieben [Klatt P et al. 1995, Klatt P et al 1996].

1.2.1.2 NOS II (induzierbare NO-Synthase, iNOS)

Ähnlich der nNOS ist auch die iNOS in gesundem vaskulären Gewebe nicht nachweisbar, in atherosklerotischen Läsionen jedoch in hohen Konzentrationen zu identifizieren [Wilcox JN et al. 1997]. Die iNOS-Aktivität ist (im Gegensatz zu nNOS und eNOS) nicht von intrazellulären Ca-Konzentrationen abhängig. Die Expression des Enzyms in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen wird durch Endotoxine und Cytokine (TNF- α , IL1 β , IFN- γ), die in atherosklerotischen Plaques vermehrt gebildet werden, reguliert [Kuhlencordt PJ et.al. 2001]. Bei der iNOS handelt es sich um ein sog. High-output-enzyme [Miyoshi T et al. 2006], das in der Lage ist, große Mengen NO zu produzieren [MacMicking J 1997]. Trotz der skleroprotektiven Wirkungen des NO wird dadurch die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen forciert. Die iNOS produziert neben hohen Mengen NO nämlich auch ROS (O₂⁻, H₂O₂); zudem werden in atherosklerotisch veränderten Gefäßen vermehrt Superoxide gebildet [Wever RMF et al. 1998]. NO und Superoxide reagieren in der Folge zu unphysiologisch hohen Mengen Peroxynitrit, das über seine Metaboliten toxische Wirkung (Proteinfragmentierung) auf den Organismus ausübt und Lipoproteine oxidiert [Radi R. 1991]. iNOS spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Studien zeigen, dass iNOS-Defizienz fortgeschrittene Läsionen deutlich reduziert [Miyoshi T et al. 2006].

1.2.2 Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9)

Aufbau und Einteilung der Matrix Metalloproteinasen

Bei den Matrix Metalloproteinasen (MMP) handelt es sich um eine Ca- und Zink-abhängige Familie von Endopeptidasen mit gemeinsamen funktionellen Domänen und Aktivierungsmechanismen [Zorina S et al. 2002]. Die Enzyme sind in der Lage, alle Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen und sind somit an einer Vielzahl physiologischer (Organentwicklung, Wundheilung) und pathologischer Gewebeumformungen (Entzündung, Tumorwachstum) beteiligt [Birkedal-Hansen H. 1995]. Man unterscheidet verschiedene Formen der MMPs voneinander, wobei neben der MMP-2 (Gelatinase A) v.a. die MMP-9 (Gelatinase B) an der Atherogenese beteiligt ist. Gemeinsam ist den MMPs ihre Freisetzung durch mesenchymale Zellen als inaktive Präkursorform. Die Aktivierung der MMPs wird auf verschiedenen Stufen streng reguliert. Erst die extrazelluläre Abspaltung einer aminoterminalen Sequenz durch Plasmin, reaktive Oxide oder membranständige MMPs legt die aktive katalytische Domäne frei [Thompson RW, Parks WC. 1996].

1.2.2.1 Funktion der Matrix Metalloproteinasen

Vascular Remodeling

Durch ihre Fähigkeit, alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen zu können, kommt den MMPs – sowohl in gesundem wie auch in sklerotischen Gefäßanteilen – eine Schlüsselrolle beim vaskulären Remodeling zu [Galis ZS et al. 1994, Shah PK et al. 1995]. Hierunter versteht man den Abbau und die Reorganisation der extrazellulären Matrix durch spezielle Enzyme, die MMPs, wobei insbesondere die MMP2 und MMP9 von Bedeutung sind [Zorina S et al. 2002].

Man differenziert eine physiologische von einer pathologischen Form des Remodeling. Erstere beinhaltet jede Änderung von Größe und Zusammensetzung des erwachsenen Blutgefäßes, die Adaptations- und Reparationsvorgänge ermöglicht. In der pathologischen Form des vascular remodeling im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen kommt es zu Umbauprozessen der Arterien, die in Membranschädigung, Plaqueruptur und Aneurysmaausbildung münden können [Gibbons GH, Dzau VJ. 1994]. Dabei greifen MMPs die endotheliale Basalmembran an und zerstören die Barrierefunktion, was zu Plasmaprotein- und Lipoprotein-Influx führt [Li Z et al. 1996]. Daneben vermitteln MMPs die Proliferation von VSMCs und deren Migration [Zempo N et al. 1994].

Outward Remodeling

Outward Remodeling beschreibt einen dilatativen Umbau der Arterie durch MMPs (v.a. MMP2 und MMP9), bei dem durch Wachstum nach außen eine flusslimitierende Stenose zunächst kompensiert wird [Armstrong ML et al. 1985]. Das Outward Remodeling bewirkt jedoch eine Destabilisierung der Gefäßwand, deren Ursache im vermehrten Matrixabbau vermutet wird. Plaqueinstabilität ist auffallend eng mit dieser Form des Gefäßumbaus assoziiert [Pasterkamp G et al. 1998]. Auch in Aneurysmen als Extremform des Outward Remodeling können bevorzugt MMP2 und MMP9 identifiziert werden [McMillan WD et al. 1997].

Constrictive/Negative Remodeling

Beim constrictive Remodeling kommt es im Rahmen der Wundheilung durch Kollageneinlagerung, VSMC-Migration und Gewebekontraktion zu einer Einengung des Lumens [Carmilet P, Collen D. 1998]. Es wird besonders häufig nach Ballondilatation beobachtet und v.a. durch MMP-9 unterhalten. Nach derartigen Eingriffen kann meist ein sog. Post-Ballon-MMP-Peak beobachtet werden [Zempo N et al. 1994].

1.2.2.2 Plaque-Instabilität und Aneurysmaentstehung

Zur Ruptur und zum Abgang eines atherosklerotischen Plaques kommt es infolge Frakturierung der fibrösen Kappe. Dabei wird der prothrombotische Kern der Läsion freigelegt [Davies MJ, Thomas A. 1984]. Weil in Plaquematerial große Mengen MMPs und hier insbesondere MMP9 [Brown DL et al. 1995] nachgewiesen werden kann, schreibt man dieser Enzymvariante eine Schlüsselrolle bei der Plaqueruptur akuter kardiovaskulärer Ereignisse zu. Eine Reduzierung der MMP9-Aktivität hingegen führt zu Plaquestabilisierung [Horton DB et al. 2001]. Das Aneurysma stellt die Maximalvariante des Outward Remodeling dar. Hier kommt es durch Inflammation und exzessiven Abbau der extrazellulären Matrix zur Gefäßexpansion und Aneurysmaformation [Thompson RW et al. 1996, Freestone T et al. 1995]. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass MMPs wesentlich an den ursächlichen Umbauprozessen beteiligt sind, zumal neben MMP1 und MMP3 vor allem MMP2 und MMP9 in Aneurysmagewebe zu isolieren sind [Newman KM et al. 1994]. Insbesondere MMP9 wurde in hohen Konzentrationen in den beteiligten Inflammationszellen und VSMCs nachgewiesen; sie scheint die zentrale Rolle bei der Initiierung der Aortenexpansion zu spielen.

1.2.2.3 Stimuli der MMP-Expression und –Aktivierung

Bei den treibenden Kräften des MMP-vermittelten Vascular Remodeling handelt es sich um Hämodynamik, Gefäßverletzung, Inflammation und oxidativen Streß [Godin D et al. 2000]. So induziert transmuraler Druck die Bildung von MMP2 und MMP9, was die Vermutung nahelegt, dass die Enzyme bereits in frühen Stadien der Atherosklerose aktiv sind [Chesler N et al. 1999].

Inflammationszellen, v.a. aktivierte Makrophagen, steigern die Expression von MMP2 und MMP9 durch die Freisetzung von Zytokinen. Reaktive Oxidanzien wie Peroxynitrit oder Hydroxyperoxid modulieren die Aktivität der MMPs über einen vermehrten Abbau ihrer Inhibitoren. Auch Schaumzellen aktivieren durch die Produktion reaktiver oxidativer Spezies (ROS) latente MMP-Zymogene [Fears ER et al. 1996, Rajagopalan S et al. 1996]. Der Einfluss von NO auf die Expression und Aktivität von MMPs ist ambivalent: In gesunden Gefäßen vermag NO die Aktivität der MMPs herabzusetzen, so dass die remodelierende Antwort herabgesetzt wird. Außerdem vermittelt NO eine reduzierte Expression von MMPs. Bei einem Überangebot an NO hingegen führt die Bildung von Peroxynitrit über die Hemmung von TIMPs zu einer gesteigerten Aktivität von MMPs [Tronc F et al. 2000, Zorina S et al. 2002].

1.2.3 Phospholipase A2 (PLA2)

1.2.3.1 Biologie der Phospholipase A2

Die Phospholipase A2 ist eine etwa zehn Mitglieder umfassende Superfamilie von strukturell verschiedenen Enzymen, die durch Hydrolyse von Phospholipiden an der sn-2-Position Lysophospholipide und freie Fettsäuren generieren [Six DA, Denis EA 2000]. Sie stellen den limitierenden Schritt in der Produktion von Eicosanoiden und Platelet-Activating-Factor (PAF) dar, weshalb man die Phospholipase A2 eng mit Apoptose, Tumorwachstum und Inflammation assoziiert [Tatullian SA 2001]. Ihre Genexpression erfolgt zeit- und dosisabhängig von IL1 β .

Die sekretorische Isoform der Phospholipase A2 stellt eine kleine Gruppe homologer Proteine von 14 kDa dar, die 5-8 Disulfid-Brücken in ihrem Rückgrat aufweisen. Die Position dieser Disulfid-Brücken ermöglicht die Einteilung in verschiedene Unterklassen. Neben den Enzymvarianten, sPLA2-V und sPLA2-X ist in atherosklerotischen Läsionen vor allem sPLA2-II präsent und an der Atherogenese maßgeblich beteiligt [Rosengreen B et al. 2006]. Sie ist ein extrazelluläres Enzym, das in Milz, Thymus, Darm, Leber, Endothel,

Gefäßmuskulatur, Blutzellen und Knochenmark sowie in geringen Anteilen auch in Lunge, Niere und Ovar gebildet wird.

sPLA2 ist ein Akute-Phase-Protein, seine Konzentration kann, durch Zytokine oder Hypoxie stimuliert, im Rahmen akuter inflammatorischer Reaktionen bis zu 100fach ansteigen [Schwemmer M et al. 2001, Niessen HWM et al. 2003]. Die vermehrte Expression von sPLA2 ist mit einer verstärkten Sauerstoffradikalbildung assoziiert. Ferner vermittelt sPLA2 Kontraktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [Lambeau G et al. 1994].

1.2.3.2 sPLA2 und seine Interaktionen

sPLA2 und Membranen

Unter physiologischen Bedingungen sind Membranen mit ihrer inneren hydrophilen und äußeren hydrophoben Lipidschicht nicht durch sPLA2 hydrolysierbar. Kommt es in den Membranen z.B. durch Ischämie jedoch zu einem Rearrangement mit Umkehr der beiden Blättchen, dem sog. „Flip-flop“, stellt die Membran einen idealen Angriffspunkt für sPLA2 dar. Dabei schädigt sPLA2 die Integrität der Membranen und generiert verschiedene Lysophospholipide (lysoPC, lysoPS, lysoPA), die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Kontraktion und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen vermitteln [Kuwata H et al. 1999, Jaross W et al. 2002, Snitko Y et al. 1997].

Weiterhin steuert sPLA2 die Signaltransduktion in inflammatorischen Zellen. So induziert sie gemeinsam mit PAF die Exozytose neutrophiler Granulozyten [Lambeau G et al. 1994].

sPLA2 und Lipoproteine

Während native LDL ein schlechtes Ziel darstellen, sind im Rahmen atherosklerotischer Prozesse veränderte Lipoproteine ein geeignetes Substrat für die sPLA2 [Niessen HWM et al. 2003]. Einer der ersten Schritte im Rahmen der Atherosklerose ist die Modifikation und Oxidation der in der Arterienwand akkumulierten LDL (s.o.). sPLA2 induziert mit der 15-Lipoxygenase ein Enzym, das wesentlich an der Oxidation beteiligt ist [Neuzil J et al. 1998]. Die veränderten LDL stellen ein gut angreifbares Ziel für die sPLA2 selbst dar, so dass polyungesättigte Fettsäuren und bioaktive Phospholipide freigesetzt werden können [Leitinger N et al 1999]. Diese stimulieren die Interaktion von Monozyten und Endothelzellen.

Bei Interaktion mit HDL vermag die sPLA2 skleroprotektive Eigenschaften der HDL durch Hydrolyse sowohl quantitativ wie auch qualitativ zu verringern, indem mit sPLA2 überladene HDL die schützende Wirkung auf LDL verlieren [Leitinger N et al 1999, Jaross W et al. 2002, Tietge UJ et al. 2002].

sPLA2 und Myocard

Im Herzmuskel scheint sPLA2 an inflammatorischen Prozessen im Rahmen von Infarktgeschehen beteiligt zu sein, zumal es zellulär gebunden in den Randzonen eines Infarktes nachweisbar ist, nicht jedoch in gesunden Kardiomyozyten [Nijmeijer R et al. 2002]. Während einer Ischämie der Herzmuskelzellen übt die sPLA2 apoptotische Funktionen aus und generiert Bindungsstellen für CRP an den Kardiomyozyten [Hack CE et al. 1997].

sPLA2 und Atherosklerose

Aufgrund einer Vielzahl von atherogenen Eigenschaften korreliert das Vorhandensein von sPLA2 eng mit dem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse und kann als eigenständiger Marker für das Risiko einer KHK betrachtet werden [Vadas P et al. 1995]. Die sPLA2 findet sich in allen drei Wandschichten sklerotischer Gefäße, in Schaumzellen, Kalzifizierungen, Nekrosen und extrazellulärer Matrix [Menschikowski M et al. 1995]. Sie steuert eine Vielzahl von Prozessen, die in allen Stadien sklerotischer Veränderungen die Atherogenese unterhalten. Sie modifizieren Lipoproteine, so dass diese von Makrophagen angegriffen werden können, was zur Ausbildung von Schaumzellen führt [Jaross W et al. 2002]. Die Makrophagen selbst werden dabei durch sPLA2 bzw. durch sPLA2 freigesetzte Cytokine aktiviert. Ferner stimuliert die sPLA2 iNOS, was zytotoxische Konzentrationen von Nitroxid und gesteigerte Sauerstoffradikalbildung zur Folge hat [Baek SH et al. 2000].

1.3 antiinflammatorische Wirkstoffe

1.3.1 HDL

1.3.1.1 Zusammensetzung der HDL

Als High Density Lipoproteins (HDL) bezeichnet man eine neben Chylomikronen, VLDL und LDL im Plasma vorkommende Unterklasse von Lipoproteinen hoher Dichte (1,063-1,210 g/ml), denen man eine Vielzahl antiatherogener Eigenschaften zuschreibt [Stein O. 1999; Von Eckstein A. 2000; Genest J Jr. 1999] Sie werden in Leber und Darmmukosa als HDL1 gebildet und im Blut zu HDL2 umgewandelt.

HDL sind Pseudo-Mizellen mit einem Protein-Lipid-Verhältnis von annähernd 50/50. Etwa ein Drittel der Masse machen verschiedene Apolipoproteine aus. Diese sind AI, AII, AIV, AV, CI, CII, CIII, E. und J. Weiterhin sind HDL Träger zahlreicher Enzyme (u.a. Paraoxonase1,

PAF-AH, LCAT, CETP). In ihrem amphiphilen Teil transportieren die HDL Phospholipide und freies Cholesterol, im hydrophoben Kern Cholesterolester und Triglyceride.

HDL stellen strukturell und in ihren Funktionen und ihrem Metabolismus eine sehr heterogene Gruppe von Lipoproteinen dar, so dass folgende Gruppen unterschieden werden:

- HDL 2b (1,063-1,087 g/ml)
- HDL 2a (1,088-1,110 g/ml)
- HDL 3a (1,111-1,129 g/ml)
- HDL 3b (1,129-1,154 g/ml)
- HDL 3c (1,154-1,170 g/ml).

1.3.1.2 Epidemiologie

Zwischen der Konzentration von HDL im Plasma und dem Risiko der Atherosklerose besteht ein inverses Verhältnis [Birjmohun RS et al. 2005]. Eine reduzierte Konzentration von HDL stellt einen eigenständigen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen dar.

Sie kann zum einen durch genetische Defizienz für das Apolipoprotein AI verursacht sein, außerdem können auch vermehrte Aktivität des CETP und der Hepatischen Lipase Auslöser einer Dyslipoproteinämie sein [Ng DS et al. 1995, Tato F et al. 1995]. Schließlich werden noch Aktivitätsverluste der LCAT und der LPL als Ursachen niedriger HDL-Konzentrationen beschrieben [Kuivenhoven JA et al. 1997, Blades B et al. 1993]. Neben der Einnahme bestimmter Medikamente (β -Blocker, anabole Steroide und Progesteron) sind auch Faktoren der Lebensführung (Rauchen, Diabetes mellitus II, Adipositas, physische Inaktivität) mit niedrigen HDL-Konzentrationen assoziiert [Chapman MJ 2006]. Zahlreiche Studien zeigen, dass Patienten mit ebensolchen niedrigen HDL-Konzentrationen im Rahmen einer Dyslipoproteinämie eine hohe Prävalenz für die Entwicklung vorzeitiger sklerotischer Gefäßveränderungen zeigen [Kontush A et al. 2005]. Weil bei Patienten mit niedrigen HDL-Konzentrationen außerdem eine Dysfunktion ihrer verminderten HDL vorliegt, kommt es neben einem quantitativen auch zu einem qualitativen Verlust skleroprotektiver Eigenschaften.

1.3.1.3 Funktionen der HDL

HDL und die Cholesterol-Homöostase

Die Cholesterol-Homöostase verläuft grundsätzlich in zwei Richtungen, von der Leber in die Peripherie und von dort wieder zur Leber zurück. Der Transport in die Körperperipherie (und

in Läsionen der Gefäßwand) erfolgt über die ApoB enthaltenden VLDL, IDL und LDL. Der Rücktransport zur Leber wird durch HDL gewährleistet, wobei hierzu drei verschiedene Mechanismen Anwendung finden:

- 1) HDL nehmen freies Cholesterol (und Cholesterinester) auf und transportieren es zu spezifischen hepatischen Rezeptoren, über die es selektiv in die Leberzellen aufgenommen wird [Ji Y et al. 1999].
- 2) HDL nehmen erneut Cholesterol (und Cholesterinester) auf und bringen es zur Leber, wo sie als beladene Komplexe endozytotisch internalisiert werden [Chapman MJ 2006].
- 3) HDL nehmen Cholesterol und Cholesterinester auf und übertragen diese auf ApoB-haltige Lipoproteine, die dadurch ultimativ von hepatischen LDL-Rezeptoren aufgenommen werden. HDL sind somit in der Lage, den Efflux von Cholesterol aus Gefäßläsionen und Schaumzellen zu vermitteln [Chapman MJ 2006].

HDL und Inflammation

Während der inflammatorischen Atherogenese kommt es zur Akkumulation von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Intima mit der Folge verringerter NO-Verfügbarkeit, gesteigerter Leukozyten-Affinität, erhöhter Konzentration freier Sauerstoffradikale und gesteigertem Gefäßtonus. [Libby P et al. 2002, Weissberg PL. 2000]. HDL wirken diesen Prozessen entgegen, indem sie die Expression von VCAM und MCP1 hemmen und somit die Adhäsion von Leukozyten an die Arterienwand erschweren. Zusätzlich wirken HDL antiadhäsiv, indem sie die PAF – induzierte Leukozytenadhäsion inhibieren [Barter PJ et al. 2002, Sugatani J 1996]. Entgegen den antiinflammatorischen Eigenschaften physiologischer HDL zeigen Studien mittlerweile, dass dysfunktionelle HDL im Rahmen einer Dyslipoproteinämie pro-inflammatorisch wirken [Ansell BJ et al. 2005].

Antioxidative Eigenschaften der HDL

Freie Sauerstoffradikale führen bei der Atherogenese zu einer Zunahme oxidiertes LDL, die wiederum inflammatorisch wirksames Substrat für Makrophagen bei der Ausbildung von Schaumzellen darstellen [Ross R 1999, Quinn MT et al. 1987]. HDL vermögen diese Vorgänge dahingehend zu beeinflussen, dass sie LDL vor Oxidation schützen. Hierbei reduziert ApoI Peroxide von Phospholipiden und Cholesterolestern und entfernt außerdem Produkte der 12-Lipoxygenase aus nativen LDL. Ferner inaktivieren Paraoxonase 1 und LpPLA2 oxidierte Phospholipide aus den LDL [Assmann G, Gotto AM Jr 2004, Navab M et

al. 2001]. Die antioxidativen Fähigkeiten sind vom Bau der HDL abhängig; small dense HDL gelten als potenteste Fraktion (3c>3b=3a>2a=2b) [Kontush A et al. 2005]. Neben den antiinflammatorischen Funktionen sind auch die antioxidativen Effekte der HDL bei Dyslipoproteinämie stark beeinträchtigt; bei Patienten mit Metabolischem Syndrom sind Abnahmen der antioxidativen HDL-3-Aktivität um bis zu 50% beschrieben worden [Hansel B et al. 2004].

Wirkung des HDL auf die Endothelfunktion

HDL wirken über eine Stimulierung der endotheliale NO-Synthase (eNOS) vasodilatatorisch, die Aktivierung erfolgt via S1P3-Rezeptor. Weiterhin vermitteln HDL in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose ihre endothelial schützenden Effekte über bioaktive Lysophospholipide und schützen dadurch die Endothelzellen vor Apoptose [Nofer JR et al. 2004].

Weitere antiatherogene Funktionen des HDL

Neben den o.g. Funktionen schreibt man HDL antiinfektiöse Eigenschaften zu. Sie reduzieren die entzündliche Aktivität bakterieller Lipopolysaccharide und lysieren Trypanosoma Brucei [Hajduk SL et al. 1989]. Durch Stimulation der Prostacyclin-Synthese wirken HDL zudem antithrombotisch [Navab M et al. 1991].

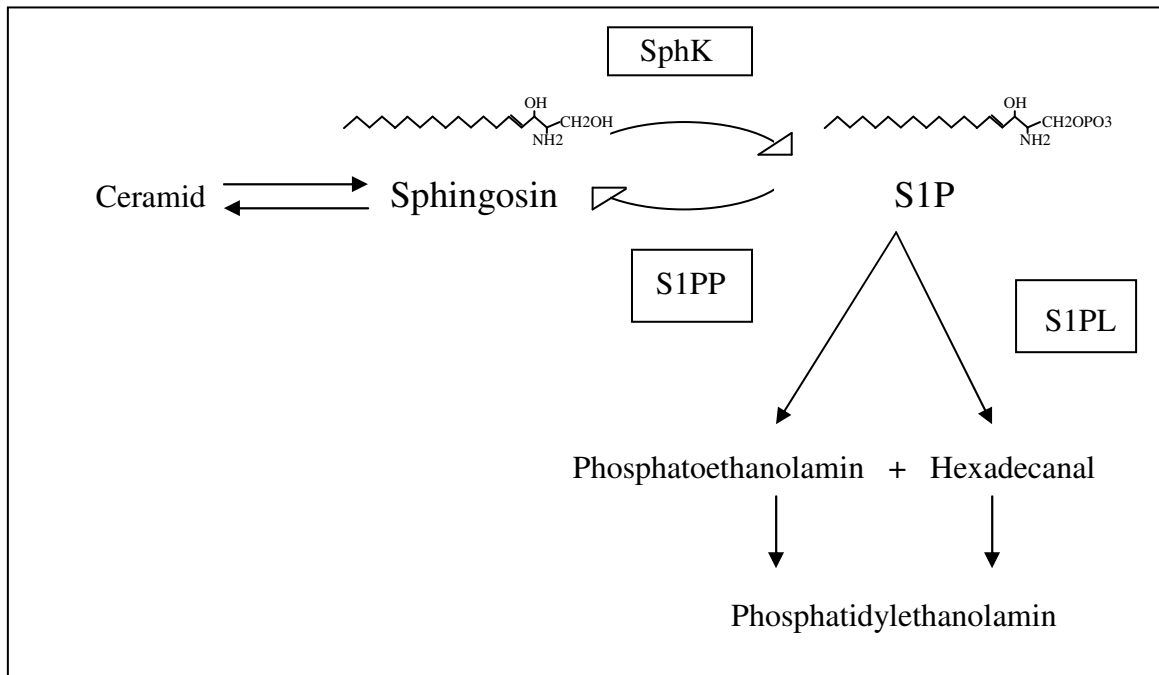
1.3.2 Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

Beim Sphingosin-1-Phosphat handelt es sich um einen im Blutplasma zirkulierenden Sphingolipid-Metaboliten, der in Thrombozyten gebildet wird [Yatomi Y et al. 1995] und eine Vielzahl biologischer Prozesse in unterschiedlichen Geweben reguliert. Dabei ist S1P einerseits Ligand spezifischer Rezeptoren, andererseits intrazellulärer Botenstoff [Spiegel S, Milstien S 2003]. S1P wird aus Sphingosin hergestellt, dem Rückgrad der meisten Sphingolipide, das wegen seiner geheimnisvollen Eigenschaften 1884 durch Thudichum nach der Sphinx („Sphinx-like“) benannt wurde [Thudicum JLWA. 1884].

1.3.2.1 Synthese und Abbau des S1P

Die intrazellulären Konzentrationen von S1P sind niedrig und strikt über Synthese und Abbau reguliert. Dabei wird aus Ceramiden Sphingosin hergestellt, das durch Phosphorylierung zu

S1P umgewandelt wird. S1P wiederum kann nach Dephosphorylierung wieder zu Sphingosin werden oder zu Phosphoethanolamin und Hexadecanal gespalten werden.



(aus Spiegel S, Milstien S 2003)

S1P wirkt antagonistisch zu seinen Vorläufern: S1P fördert Zellwachstum und Überleben verschiedener Zellen, Ceramide und Sphingosin hingegen wirken proapoptotisch [Hannun YA, Obeld LM 2002]. An Synthese und Abbau des Sphingosin-1-Phosphat sind verschiedene Enzyme beteiligt. Die Sphingosin-Kinase (S1PK) gehört zur Klasse der Lipid-Kinasen und katalysiert die Phosphorylierung von Sphingosin zu S1P. Sie kommt in zwei Isoformen vor, wobei die SphK1 v.a. in der Lunge und die SphK2 v.a. in der Milz vorkommt [Liu H et al. 2002]. Die Sphingosin-Kinasen liegen nahezu ausschließlich im Cytosol vor, lediglich ein geringer Anteil ist an Membranen assoziiert. Die S1P-Lyase (S1PL) ist ein (v.a. in der Leber vorkommendes) auf der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiertes Enzym, das auf dem menschlichen Chromosom 10q21 kodiert ist. Bei der S1P-Phosphatase (S1PP) handelt es sich um ein Enzym, das in zwei Isoformen vorkommt. S1PP1 findet sich v.a. in Plazenta und Niere, S1PP2 v.a. in Hirn, Herz, Kolon, Niere und Dünndarm. Die S1PPs gehören zu einer Familie magnesiumabhängiger Enzyme, die nur phosphopylierte Sphingosin-Basen abbauen [Ogawa C et al. 2003].

1.3.2.2 S1P-Rezeptoren

Sphingosin-1-Phosphat vermittelt seine multiplen Funktionen als Ligand spezifischer Rezeptoren. Dabei handelt es sich um membranständige, heptahelikale Rezeptoren der Edg-

Familie, die Signale über heterodimere G-Proteine transduzieren [Takuwa Y. 2002]. Es sind derzeit fünf Mitglieder bekannt, die S1P mit hoher Affinität binden (siehe Tabelle). Sie sind mit verschiedenen G-Proteinen gekoppelt, so dass sie Bestandteil z.T. unterschiedlicher Signalkaskaden sind. Durch die Verteilung der einzelnen Rezeptortypen ist S1P Regulator verschiedener physiologischer Prozesse wie z.B. Angiogenese, Gefäßreifung, Herzentwicklung oder Immunität [Wang F et al. 1999, Kuppermann E et al. 2000, Brinkmann V et al. 2002].

| Rezeptor | G-Protein | Signalkaskade |
|-------------|--|---|
| S1P1 / Edg1 | G _i | Adenylcyclase (AC) Phospholipase C (PLC) |
| S1P2 / Edg5 | G _i G _q G _{12/13} | Adenylcyclase (AC) Rac Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Phospholipase C (PLC) Rho |
| S1P3 / Edg3 | G _i G _q G _{12/13} | Adenylcyclase (AC) Rac Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Phospholipase C (PLC) Rho |
| S1P4 / Edg6 | G _i G _{12/13} | Phospholipase C (PLC) ERK Rho |
| S1P5 / Edg8 | G _{12/13} JNK | Rho |

Die ausbleibende Zellantwort via S1P1-Rezeptor nach Applikation von Pertussis-Toxin konnte die Gi-gekoppelte Wirkung dieses Rezeptor-Subtyps nachweisen. Im Gegensatz dazu sind die S1P-Rezeptoren -2 und -3 nicht PTX-sensibel. Man vermutet, dass die PLC-Kopplung hier Gq-assoziiert verläuft [Gosh TK et al. 1994].

1.3.2.3 Funktionen des Sphingosin-1-Phosphat

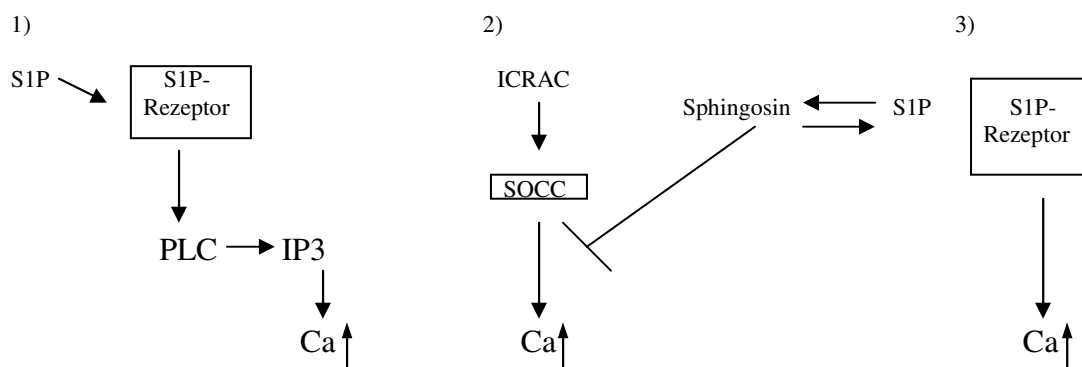
S1P und Ca^{2+} -Homöostase

Sphingosin-1-Phosphat ist über PLC-gekoppelte IP₃-Aktivierung und IP₃-unabhängig an der Ca-Homöostase beteiligt [Meyer zu Heringdorf D et al. 1999].

So konnten Studien belegen, dass ein mittlerweile als S1P identifiziertes Sphingosin-Derivat, Ca aus intrazellulären Speichern freisetzt, ohne PLC und IP₃ zu aktivieren [Gosh TK et al. 1994, Mattie M et al. 1994].

Hierbei kommt der SphK zentrale Bedeutung zu, denn Stimuli dieses Enzyms, die nicht auf die PLC wirken, ließen die Ca-Spiegel ansteigen [Melendez AJ et al. 2002], während Inhibitoren der SphK keinen Ca-Anstieg bewirkten. Sphingosin, das die Freisetzung und Speicherauffüllung von Calcium verhindert, verliert durch SphK-Konversion zu S1P seine hemmenden Funktionen [Mathes C et al. 1998].

S1P scheint zusätzlich zu diesen Funktionen noch eine universelle intrazelluläre Signalfunktion bzgl. der Ca-Homöostase zu besitzen, zumal es auch in Hefen und Pilzen die Ca-Konzentration reguliert, obwohl diese keine S1P-Rezeptoren ausbilden [Spiegel S, Milstien S 2003].



S1P und kardiovaskuläres System

Neben seinen Funktionen auf den Ca-Haushalt wird dem S1P und seinen Rezeptoren zentrale Bedeutung bei der Herz- und Gefäßentwicklung beigemessen. Während der normalen Entwicklung des menschlichen Herzens wandern kardiale Präkursorzellen zur dorsalen Mittellinie und formen dort das Organ aus. Bei pathologischem Mangel an S1P₂-Rezeptoren kommt es infolge Beeinflussung kardialer Präkursorzellen gehäuft zur Ausbildung sog. Split-Hearts. Bei der Entwicklung und Reifung von Gefäße vermitteln S1P und seine Rezeptoren über die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen die gezielte Rekrutierung und Migration von VSMCs [Spiegel S, Milstien S 2003].

Weiterhin induziert S1P die Freisetzung von Komponenten der extrazellulären Matrix und die Rho-abhängige Integrin-Aktivierung, wodurch Matrix-abbauende Proteinase aktiviert werden können [Paik JH et al. 2001, Benaud C et al. 2002].

S1P1-Rezeptor-defiziente Mäuse hingegen sterben bereits in-uteri infolge Gefäßmißbildung durch abnorme Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) und Perizyten. Die Fibrozyten dieser Tiere waren zu keiner Rac-Aktivierung fähig, die Rekrutierung von glatten Gefäßmuskelzellen blieb aus [Liu H et al. 2000].

S1P und das Immunsystem

Die Wirkung des Sphingosin-1-Phosphat auf das Immunsystem wurde durch Studien mit Agonisten der S1P-Rezeptoren -1, -3, -4, -5 untersucht [Brinkmann V et al. 2002, Mandela S et al. 2002]. Hier konnte eine Lymphopenie durch reversible Verlagerung zirkulierender Lymphozyten in sekundär lymphatisches Gewebe beobachtet werden [Spiegel S, Milstien S 2003]. Weiterhin beeinflussen die S1P-Rezeptoren die chemotaktische Antwort, so dass zirkulierende Lymphozyten nicht an inflammatorischen Läsionen angreifen [Sanna MG et al. 2004].

1.4 Fragestellung

Wie in der Einleitung geschildert, handelt es sich bei der Atherosklerose um eine chronisch-inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, die durch HDL und seine Komponenten in ihrer Manifestation und ihrer Progression gehemmt werden kann. Unklar ist bislang, ob HDL auch in späten Stadien der Atherosklerose protektiv wirksam sind.

In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob HDL und S1P in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose einen schützenden Effekt haben. Hierzu wird der Einfluss von HDL und S1P auf proinflammatorische Systeme der chronischen Gefäßwand-Inflammation in glatten Gefäßmuskelzellen überprüft.

Im Zentrum dieser Untersuchungen stehen sPLA₂, iNOS und MMP9. Die Effekte sollen dahingehend hinterfragt werden, ob sie rezeptorvermittelt ablaufen und ob es Rezeptorsubtypen gibt, die für die antiinflammatorische Reaktion von besonderer Bedeutung sind.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Versuchstiere und deren Haltung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) verwendet, die von der Firma *Charles River, Sulzfeld (Deutschland)*, bezogen wurden.

Es handelte sich dabei um männliche Versuchstiere in einem Alter von durchschnittlich 114 Tagen. Das mittlere Körpergewicht betrug 257 g.

Die Tiere wurden in Kolonien von 5 Stück in einem begehbaren Stall ohne Fenster gehalten.

Die Temperatur in diesem Stall betrug ca. 20 °C bei einer Luftfeuchte von 50-70%.

Ein Tag-Nacht-Rhythmus wurde mittels Zeitschaltprogramm simuliert, in dem die Tiere von 6 – 18 Uhr einer Dauerbeleuchtung ausgesetzt wurden. Als Nahrung erhielten die Tiere Trockenfutter der Firma *Altromin, Soest (Deutschland)* und Trinkwasser. Ergänzt wurde dieses Angebot dreimal wöchentlich durch die Gabe von Obst und Körnern. Als Streu wurde entstaubte und entkeimte Weichholzfaser der Firma *Altromin, Soest (Deutschland)*, eingesetzt.

Die Tiere hatten nach dem Zeitpunkt Ihrer Anlieferung mindestens fünf Tage Akklimatisierungszeit, ehe sie zu Versuchen herangezogen wurden.

2.1.2 Aortenexplantation

Die Anästhesie erfolgt durch Inhalation von Chloroform unter Abschluss von der Frischluftzufuhr. Nach Lagerung auf dem Operationstisch und ausgiebiger Desinfektion wird zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt und die abdominale Aorta aufgesucht. Anschließend erfolgt die Verlängerung des Schnittes durch eine mediane Sternotomie, so dass die thorakale Aorta einzusehen ist. Diese wird vorsichtig aus dem umliegenden Bindegewebe dargestellt, wobei jede Dehnung des Gefäßes zu vermeiden ist.

Die mobilisierte Aorta wird proximal direkt unter dem Aortenbogen und distal auf Höhe des Zwerchfells durchtrennt und entnommen. Nach Entfernung des adventitiellen Bindegewebes unter dem Mikroskop (4fache Vergrößerung) wird die Aorta umgehend in ein steriles Gefäß mit 37°C warmen DMEM (10%FCS) überführt.

2.1.3 Verwendung der Aorten als Versuchsorgan

Die Aorten werden zweimal in 40 ml PBS gewaschen, ehe sie in ein Reaktionsgefäß mit vorgewärmten (37°C) Medium überführt werden und darin 24h bei 37°C, 5%Co₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubieren.

Um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen, werden die Aorten nach Ablauf dieser Zeit erneut zweimal in PBS gewaschen. Es folgt die Zugabe von 10 ml Phenolrot-freiem Medium (0,1%) und der zu untersuchenden Testsubstanz und Inkubation bei 37°C, 5%CO₂ und 95 % LF für 30 min. Anschließend wird die bestimmte Menge IL1 β zugegeben und für weitere 24h inkubiert.

2.1.4 Zellkultur

Die Aorten werden unter der sterilen Bench in longitudinaler Richtung eröffnet. Mit einem runden Skalpell wird dann die Intima vorsichtig herausgeschält. Anschließend erfolgt die Zerteilung in kleine Plättchen und deren Überführung auf den Boden einer 25-cm²-Flasche mit einem Saugeraufsatz. Nach Antrocknung der Plättchen werden 5 ml Medium DMEM (10%FCS) dazugegeben und die Flaschen bei 37°C, 5%CO₂, 95 % LF so lange inkubiert, bis die Zellen eine Konfluenz von >90% aufweisen. Alle 2-3 Tage erfolgt ein Mediumwechsel und die optische Kontrolle unter dem Mikroskop.

Bei Konfluenz >90% erfolgt das Übertragen in die nächste Passage mit einem Teilungsverhältnis von 1:2 – 1:3. Hierbei werden unter der sterilen Bench zunächst das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen zweimal in 5 ml PBS gewaschen. Weil es sich bei VSMCs um wandadhärente Zellen handelt, werden diese durch 1 ml Trypsin über >1min bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Es folgt das Abspülen mit 5 ml Medium DMEM (10%) und Überführen in ein 15 ml Röhrchen. Die am Flaschenboden verbliebenen Zellen werden im nächsten Schritt mittels Cellscrapper mobilisiert und erneut mit 5 ml Medium DMEM (10%) abgespült und in das 15 ml Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 2000 G über 5 min erfolgt das Absaugen des Überstands, so dass lediglich das Pallet im Röhrchen verbleibt. Dieses wird durch wiederholtes leichtes Anschlagen des Röhrchens vollständig gelöst.

Bei Splitting im Verhältnis 1:2 wird das gelöste Pallet mit 4 ml Medium DMEM (10%) verdünnt und anschließend jeweils 2 ml in eine mit 3 ml Medium DMEM (10%) gefüllte Zellkulturflasche pipettiert. Bei Splitting im Verhältnis 1:3 wird das gelöste Pallet entsprechend mit 6 ml Medium DMEM (10%) verdünnt und anschließend ebenfalls in Portionen von 2 ml in Zellkulturflaschen mit 3 ml Medium DMEM (10%) eingebracht.

Bei einem Versuchsansatz aus der Zellkultur werden die >90% konfluenten Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgt anschließend die Inkubation mit Medium DMEM (0,1%) bei 37°C für 24h.

Um auch hier einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen, werden die Zellen nach Ablauf dieser Zeit wiederum zweimal mit PBS gewaschen, ehe ihnen Phenolrot-freies Medium (0,1%) und die zu untersuchende Testsubstanz zugegeben werden. Nach Inkubation über 30 min bei 37°C wird IL1 β ergänzt und über weitere 24h bei gleichen Bedingungen inkubiert.

2.1.5 RNA-Isolierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt zunächst die RNA-Isolierung, die sich in ihrem Verfahren für Zellen und Aorten unterscheidet:

2.1.5.1 RNA-Isolierung nach Zellkultur

Die zu >90% konfluenten Zellen werden mit 600 μ l RLT-Puffer (enthält 1% β -Mercaptoethanol) lysiert und anschließend abpipettiert, um in eine Qia-Shredder-Säule gegeben zu werden. Diese wird dann bei 15800 G für zwei Minuten zentrifugiert. Der Filter mitsamt dem zurückgehaltenen Material wird verworfen und dem Eluat 600 μ l 70%iger Ethanol (vergällt) zugegeben. 700 μ l dieser Lösung werden in eine Qia-Säule pipettiert und bei 8000 G für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wird dies Verfahren wiederholt (bis das Eluat aus der Shredder-Säule überführt ist). Es folgt das Waschen mit 700 μ l RW1-Puffer und Zentrifugation bei 8000 G über 15 Sekunden. Nach Verwerfen von Eluat und Tube wird der Filter in ein neues Tube gesetzt. Anschließend wird in zwei Schritten die RNA mit 500 μ l RPE-Puffer ausgefällt. Nach der ersten RPE-Gabe wird bei 8000 G für 15 Sekunden zentrifugiert, nach der zweiten RPE-Gabe bei 15800 G für 2 Minuten. Eluat und Tube werden verworfen, der Filter in ein 1,5 ml Tube gesetzt. Die Ablösung der RNA aus der Filter Matrix erfolgt nun mit 50 μ l RNase freiem Wasser. Für eine optimale RNA-Gewinnung weist der Hersteller darauf hin, dass das Wasser mindestens zwei Minuten auf den Filter einwirken sollte. Abschließend wird bei 8000 G für eine Minute zentrifugiert und der Filter verworfen. Nach der Konzentrationsbestimmung am NanoDrop® (s.u.) werden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.1.5.2 RNA-Isolierung aus Zellverbänden (Aorten)

Die inkubierten Aorten werden unter der Bench mit einer sterilen Pinzette aus ihren 15 ml Röhren entnommen und in einer 6-Well-Plate getrocknet. Die getrockneten Aorten werden dann zusammen mit einer Bleikugel in ein 2 ml Tube gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Anschließend folgt die Zerkleinerung in der Retsch-Mühle für 1 Minute bei einer Frequenz von 30/s und die Lagerung des dabei entstehenden Pulvers (in einem 2ml Tube) in Flüssigstickstoff.

Die RNA-Isolierung erfolgt über Trizol[®], eine Lösung aus Phenol und Guynidin-Isothiocyanat. Trizol[®] vermag Zellwände und Membranen aufzureißen und Zellkomponenten aufzulösen, ohne dabei die RNA anzugreifen.

In einem ersten Schritt wird den zerkleinerten Aorten 1 ml Trizol[®] zugegeben und bei 12000 G und 4°C für über 15 min zentrifugiert, so dass sich größere Partikel absetzen. Es folgt das Abpipettieren und Überführen des Überstandes in ein neues Tube sowie die Zugabe von 200µl Chloroform, um die Phasen zu separieren. Nach Inkubation über 3 min bei Raumtemperatur wird erneut bei 12000 G und 4°C über 15 min zentrifugiert, ehe der RNA-haltige klare Überstand abgetragen und in ein neues Tube überführt wird. Diesem Überstand werden 500 µl Isopropanol zur Präzipitation zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur gelagert. Es wird dann bei 12000 G und 4°C über 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgt das Waschen des Pallets in 1 ml 75%igem, -20°C gekühlten Ethanol und das Zentrifugieren bei 7500 G und 4°C über 5 min. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, ehe der Überstand dekantiert und das Pallet 5 min luftgetrocknet wird. Es wird abschließend in 50 µl DEPC-H₂O bei 55 °C über 3 min gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung am NanoDrop[®] (s.u.) werden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.1.6 RNA-Konzentrationsbestimmung am Nano-Drop[®]

(Das Verfahren zur Konzentrationsbestimmung am NanoDrop[®] ist für Proben aus dem Qia-Gen-Verfahren und dem Trizol[®]-Verfahren identisch.)

Beim NanoDrop[®] handelt es sich um ein Spektrophotometer zur Analyse von Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA-Proben. Dazu werden Extinktionen von 1 µl der gelösten RNA bei 260 und 280 nm photometrisch vermessen. Die Konzentration lässt sich ermitteln, indem die Extinktion bei 260 nm gemessen wird, wobei ein OD-Wert von 1 näherungsweise einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht. Bei OD-Werten zwischen 0,05 und 1,0 kann von der Linearität der Messung ausgegangen werden. Die Berechnung der Konzentration erfolgt mittels der Formel:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} : 1000$$

Die Reinheit der Proben wird ermittelt, indem der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm gebildet wird (OD_{260}/OD_{280}). Werte zwischen 1,8 und 2,2 weisen auf eine saubere RNA-Isolierung hin. Werte außerhalb dieses Bereichs lassen eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Trizol vermuten.

2.1.7 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgt enzymatisch über die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zur Klasse der Retroviren gehört. Sie sorgt für das Einschleusen viraler RNA in einen komplementären DNA-Strang. Nach Abtrennen der RNA aus dem RNA-DNA-Hybrid kann sich ein zweiter DNA-Einzelstrang bilden, so dass ein doppelsträngiges DNA-Molekül entsteht. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgt am RNase-freien Arbeitsplatz nach etablierten Arbeitsschritten.

Zunächst wird für jede Probe ein sog. Mastermix hergestellt. Die einzelnen Komponenten (ABI High Capacity cDNA Archive Kit), die bei einer Temperatur von 4° auf Eis zusammengestellt werden, sind im Folgenden aufgelistet:

| | |
|--------------------------|-------|
| H2O (RNase frei) | 20 µl |
| RNAsin | 1 µl |
| 10xRT-Buffer | 10 µl |
| dNTP's 10mM | 4 µl |
| 10 x Random Primers | 10 µl |
| MultiScribe RT (50 U/µl) | 5 µl |
| <hr/> | |
| Gesamtvolumen | 50 µl |

Es werden 6 µg RNA einer Probe mit H2O (RNase frei) zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 70°C im Eppendorf-Cycler werden die Proben sofort auf Eis gelagert, ehe ihnen 50 µl Mastermix zugefügt werden. Anschließend folgt die Inkubation bei 25°C über 10 min und bei 37°C über 120 min im Eppendorf-Cycler. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgt bis zu ihrer Verwendung bei -20°C.

2.1.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Technik, mit deren Hilfe man in vitro geringste Mengen spezifischer Nukleinsäuren amplifizieren kann. Sie ist seit ihrer Entdeckung zu einer der wichtigsten Techniken in der modernen Biomedizin entwickelt worden. Durch zunehmende Vereinfachung, Automatisierungen sowie immer günstiger werdende Reagenzien ist sie heute Bestandteil vieler Routineuntersuchungen.

2.1.8.1. PCR-Zyklen

Die PCR besteht aus drei Reaktionsschritten (Denaturierung, Annealing, Elongation), deren Abfolge einen Zyklus bildet. Der Doppelstrang wird zunächst durch Erhitzen auf 95°C über 15 sec denaturiert. Dabei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären DNA-Strängen auf, so dass nun Einzelstränge vorliegen.

Vor dem ersten Zyklus wird einmalig eine längere Zeitspanne (in der vorliegenden Arbeit 10 min) zur Denaturierung gewählt, weil zu diesem Zeitpunkt die DNA als komplexes Molekül vorliegt, das es vollständig zu trennen gilt. Eine unvollständige Trennung der ds-DNA kann eine herabgesetzte Annealing-Effizienz der Primer zur Folge haben. In späteren Zyklen der Reaktion werden die Zeiten dann möglichst kurz gehalten, um potentielle Schädigungen von Reaktionskomponenten zu vermeiden. Nach der Denaturierung wird das Reaktionsgemisch auf 60°C herabgekühlt, so dass sich spezifische Oligonukleotide, sog. Primer, über Wasserstoffbrücken an einen DNA-Einzelstrang binden können. Die genaue Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers ergibt sich aus der Schmelztemperatur, also der Temperatur, bei der die Hälfte der Primer-ssDNA-Helixstruktur zerstört ist.

Die Annealing-Temperaturen werden meist empirisch erfasst, ehe die PCR als etabliert gilt.

In der nun folgenden Phase der Elongation dienen die Primer als Ausgangspunkte, von denen aus matritzenabhängig die Bildung eines komplementären DNA-Stranges erfolgt. Die Synthese wird durch DNA-Polymerasen katalysiert, die dNTP's an die ss-DNA anlagern. Die Elongation ist in ihrer Dauer der Amplifikatgröße anzupassen und findet im Temperaturoptimum der jeweiligen DNA-Polymerase statt (hier 60°C).

2.1.8.2 Primer

Primer sind synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide die als Initiator der Polymerasekettenreaktion wirken. Die Primer-Sequenz ist komplementär zum 3'- bzw. 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, so dass sie in der Annealingphase über Wasserstoffbrücken gebunden werden (Hybridisierung) und die matritzenabhängige Synthese

katalysieren können. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer werden von der Firma Oligoservice bezogen und haben folgende Sequenzen:

| | |
|----------------------|--|
| MMP9 Rev: (5'→3') | CCA TAC AGC TTA TCC TGG TCA TAG TT-3' |
| MMP9 Fwd: (5'→3') | CCC CAG TGA GAA TCT CTA CAC G-3' |
| MMP9-Sonde (5'→3') | 6FAM- AAC GGA GAC GGC AAA CCC TGC-Dabcyl- 3' |
| INOS Rev. (5'→3') | CCGACTTTCCTGTCTCAGTAGCA |
| INOS-Fwd. (5'→3') | TGGTGAAAGCGGTGTTCTTTG |
| INOS-Sonde (5'→3') | 6FAM-AAGGTAATGGCTTCCC GCGTCA-Tamra |
| PLA2-Rev. (5'→3') | TTCCGGGCAAAACATTCAG |
| PLA2-Fwd. (5'→3') | CAGGACTCCTGCCGGAAA |
| PLA2-Sonde (5'→3') | 6FAM-AGCTGTGCCAGTGCGATAAAGCTGC-Tamra |
| β-Actin-Rev. (5'→3') | CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT |
| β-Actin-Fwd. (5'→3') | TCGCTGACAGGATGCAGAAG |
| β-Actin-Sonde(5'→3') | 6FAM-AGATTACTGCCCTGGCTCCTAGCACCA-TMR |

Um ein Reannealing der DNA-Stränge zu verhindern, wird Primer - relativ zur DNA-Menge – im Überschuss zugegeben.

2.1.8.3 Thermocycler und Temperaturprofil

Heute verwendete Thermocycler heizen auf der Basis von Peletier-Elementen oder mit Hilfe von Flüssigkeit, so dass die früher übliche Zeitnahme und manuelle Umsetzung der Proben vereinfacht wird. Anforderungen an einen Thermocycler sind die wiederholte, exakte Ansteuerung der Inkubationszeiten und –temperaturen innerhalb der PCR-Zyklen. Die Wechselzeit zwischen den einzelnen Inkubationsschritten sollte dabei möglichst kurz sein.

Die Wahl der Temperatur für die einzelnen Inkubationsschritte richtet sich nach dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase, wobei die Elongationszeit je nach Größe der Zielsequenz variiert werden sollte. Um nach dem letzten Zyklus unvollständig verlängerte Ketten zu vervollständigen, kann eine zusätzliche Elongationsphase angeschlossen werden.

2.1.8.4 Interkalierende Farbstoffe – ROX®

Mit Hilfe interkalierender Farbstoffe kann das entstehende Amplifikat sichtbar gemacht werden. Der erste dafür verwendete Farbstoff war Ethidiumbromid; mittlerweile sind eine Reihe weiterer Farbstoffe verfügbar, deren gemeinsames Merkmal ein planarer Molekülaufbau ist, so dass sie sich in Windungen der ds-DNS einlagern können. Angeregt durch energiereiches UV-Licht vermögen sie Licht in energieärmeren Wellenlängen zu emittieren.

Liegt der Farbstoff interkaliert in DNA-Windungen, kann ein starkes Signal registriert werden. Liegt der Farbstoff hingegen in freier Form vor, kommt es nur zu schwacher Emission.

2.1.8.5 Auswertung der PCR

Bei der realtime-PCR ist es möglich, zeitgleich zum Amplifikationsvorgang die Reaktion auszuwerten, indem die emittierte Fluoreszenz eines Farbstoffes gemessen wird. Dabei verhalten sich Amplifikation und emittierte Fluoreszenz linear proportional zueinander und man kann über die Bestimmung der Fluoreszenz auf die entstehende Menge des Amplifikats rückschließen. Die realtime-PCR lässt sich auf zwei verschiedene Weisen analysieren, die Endzeitmessung und die Echtzeitmessung.

Die Endpunktmessung bestimmt die Fluoreszenz der Probe am Startpunkt und am Ende des jeweiligen Zyklus. Einige Geräte messen zusätzlich in der Mitte des Zyklus. Da hierbei nur bestimmt wird, ob während der PCR eine vermehrte Fluoreszenz zu verzeichnen ist, ermöglicht sie eine qualitative Aussage (ja/nein). Die Beobachtung der Ergebnisse während der einzelnen Zyklen und deren Quantifizierung ist bei diesem Verfahren nicht möglich.

Das Verfahren der Echtzeitmessung beruht auf der Fluoreszenzbestimmung während jedes einzelnen Zyklus. Welcher Schritt des Amplifikationsvorganges als Messpunkt definiert wird, hängt im Wesentlichen von der Art der verwendeten Sonde ab.

Weil die zur realtime-PCR verwendeten Farbstoffe wie auch die verschiedenen Reaktionsmaterialien eine Grundfluoreszenz aufweisen, ist der Fluoreszenzwert zu Beginn der Reaktion nicht gleich Null. Bei negativer quantitativer realtime-PCR verläuft eine Linie bis zum Ende; die Fluoreszenz bleibt unterhalb des Schwellenwertes. Bei positiver quantitativer realtime-PCR kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Die aufgezeichnete Linie verbleibt trotz Amplifikation für einige Zyklen als parallel zur Abszisse verlaufende sog. Basislinie unter dem Schwellenwert, da die gebildeten Produktmengen zu gering sind. In dieser Phase der Reaktion sind oftmals leichte Unregelmäßigkeiten im Kurvenverlauf

auszumachen, die auf Schwankungen der gemessenen Fluoreszenz basieren. Es wird daher ein Punkt definiert, ab dessen Überschreitung die Fluoreszenz des Amplifikats als signifikante Überschreitung der Hintergrundfluoreszenz definiert werden kann. Dieser Punkt ist die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz zwischen Zyklus 3 und 15, multipliziert mit dem Faktor zehn. Den auf die Abszisse projizierten Schnittpunkt zwischen Fluoreszenz und Schwellenwert bezeichnet man als Cyclethreshold (CT). Er stellt diejenige Zyklenzahl dar, zu der der niedrigste (positive) Wert einer quantitativen realtime-PCR zu bestimmen ist.

Der CT-Wert steht in direktem Zusammenhang zur eingesetzten Probenmenge: Bei niedrigem CT-Wert ist die eingesetzte DNA-Menge hoch, bei hohem CT-Wert entsprechend gering.

2.1.8.6 relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung vermag Änderungen in einem im Gleichgewicht befindlichen System zu registrieren und ist somit geeignet als Methode zur Erfassung von Genexpressionen.

Bei der Quantifizierung wird das Verhältnis von DNS/RNS einer zu untersuchenden Probe X zur Menge DNS/RNS einer bekannten Probe Y bestimmt. Dabei muss weder die Konzentration der Zielsequenz noch eine Standardkurve mit bekannter Konzentration erstellt werden, weil ein Verhältnis beider Proben zueinander berechnet wird (Bustin S.A., 2000). Die unbekannte Menge X wird semiquantitativ abgeschätzt, d.h. sie wird auf das Signal der Probe Y abgeschätzt, wobei zwei verschiedene Rechenwege möglich sind: Die Standardkurvenmethode und die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [Livak KJ, Schmittgen TD. 2001].

Gemeinsamkeit beider Rechenwege ist das notwendige Vorhandensein eines Referenzgens als endogene Kontrolle (sog. Housekeeping Gene), das mitbestimmt wird. Hierbei handelt es sich um eine aktive Referenz, die eine Bestimmung der Ziel RNS/DNS gegen die gesamte in der Probe vorhandene RNS/DNS ermöglicht. Als Housekeeping-Gene eignen sich z.B. 18s rRNA, GAPDH oder β -Actin, also solche Gene, die ubiquitär in den verwendeten Zellen vorkommen und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant exprimiert werden. Da 18s rRNA keinen Poly-A-Schwanz hat, eignet sie sich nicht für eine rt-PCR, bei der Oligo-dTs für die reverse Transkription verwendet werden. GAPDH scheint eine geringe Konstanz in seiner Expression zu haben, weshalb seine Verwendung kritisch betrachtet und β -Actin der Vorzug gegeben wird.

Bei der Berechnung per Standardkurven-Methode werden neben der zu analysierenden Probe in der realtime-PCR serielle Verdünnungen eines Housekeeping-Gens und eine der Zielsequenz ähnliche Standardprobe mit untersucht, wobei die genauen Konzentrationen nicht

bekannt sein müssen. Bei gleicher Effizienz von Standard und Housekeeping-Gen in der PCR reicht es aus, für die weitere Berechnung die Standardkurve des Housekeeping-Gens zu verwenden. Anschließend werden CT-Werte der zu untersuchenden Proben gegen die Housekeeping-Werte „normalisiert“, ehe der resultierende niedrigere Wert als Kalibrator definiert und gleich eins gesetzt wird. Hieraus resultiert eine Relation beider Proben zueinander. Bei der Berechnung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ist keine Standardkurve nötig. Hier werden die CT-Werte miteinander verrechnet, wobei eine gleiche Effizienz von Housekeeping-Gen und Zielsequenz in der PCR die Basis der Berechnung darstellt.

Zur Durchführung der realtime PCR werden von der durch reverse Transkription gewonnenen cDNA 5 μl in eine Vertiefung einer 96-well-plate pipettiert. Anschließend wird die Vertiefung mit 20 μl Mastermix auf ein Gesamtvolumen von 25 μl aufgefüllt. Der verwendete Mastermix besteht aus:

| | |
|-----------------------|--------------------|
| Universal-Master-Mix | 12,5 μl |
| Fwd-Primer [400nM] | 1,0 μl |
| Rev-Primer [400nM] | 1,0 μl |
| Sonde [400nM] | 0,5 μl |
| DEPC-H ₂ O | 5,0 μl |
| <hr/> | |
| 20,0 μl | |

Die Platte wird nach Befüllen bei 500G für 5 min zentrifugiert und anschließend im TaqMan amplifiziert. Hier folgten auf einen 10minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C 45 Zyklen von jeweils 1min Denaturierung bei 95°C und Extension bei 60°C. Alle Proben werden aus technischen Gründen als Triplikat analysiert und gegen β -Actin als Housekeeping-Gen berechnet.

Die Berechnung erfolgte mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode:

Berechnung des ΔCT -Wertes: $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{ProbeX}} - \text{CT}_{\beta\text{-Actin}}$

Berechnung des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes: $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$

Berechnung der Transkripthäufigkeit: relative Transkripthäufigkeit = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

2.1.8.7 Statistik

Die Ergebnisse wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 als signifikant angesehen. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Computerprogramm Prism 5.02 (Graphpad, Ca, USA) durchgeführt.

Die Darstellungen zeigen einen Mittelwert \pm SEM.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien/Reagenzien/Puffer

| | |
|--|--------------------------------------|
| H ₂ O deionisiert | Millipore Corporation, Bedford, USA |
| DMSO | Sigma, St. Louis/USA |
| Dulbecco's MEM | Biochrom AG, Berlin |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe/D |
| Ethidiumbromid | Boehringer-Mannheim |
| EDTA | Sigma, St. Louis/USA |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin/D |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt/D |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt/D |
| Magnesiumchlorid (MgCl) | Sigma, St. Louis/USA |
| Magnesiumsulfat (Mg ₂ SO ₄) | Sigma, St. Louis/USA |
| Methanol | Merck, Darmstadt/D |
| PBS Dulbecco | Biochrom AG, Berlin/D |
| Penicillin-Streptomycin | Biochrom AG, Berlin/D |
| β -Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt/D |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt/D |
| Taq-Polymerase | Biolabs, New England/USA |
| Taq-Polymerase (Go-Taq) | PROMEGA GmbH, |
| RT-Puffer | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| DMEM I (mit Phenolrot) | 10 % FCS |
| | 1% Penicillin-Streptomycin |
| | 1 mmol/l L-Glutamin |
| | 0,5 mmol/l Na-Pyruvat |

| | |
|---------------------------|--|
| | 4,5g/l D-Glucose |
| DMEM II (mit Phenolrot) | 0,1 % FCS 1% Penicillin-Streptomycin 1 mmol/l L-Glutamin 0,5 mmol/l Na-Pyruvat 4,5g/l D-Glucose |
| DMEM III (ohne Phenolrot) | 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin 1% L-Glutamin 0,5 mmol/l Na-Pyruvat 4,5g/l D-Glucose |
| DMEM IV (ohne Phenolrot) | 0,1% FCS 1% Penicillin-Streptomycin 1% L-Glutamin 0,5 mmol/l Na-Pyruvat 4,5g/l D-Glucose |
| RLT-Puffer | Qiagen, Hilden/D |
| PBS (10x) | 80 g NaCl 2 g KCl 36,3 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ pH 7,2 ad 1000 ml Aqua dest |

2.2.2 Kits und fertige Lösungen

| | |
|-----------------|------------------|
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden/D |
| - RLT-Puffer | |
| - W 1 Puffer | |

| | |
|---|--|
| ROX Supermix | BioRad, München/D |
| High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| - RNase Inhibitor [20U/μl] | |
| - RNasin [40U/l] | |
| - Multiscribe Reverse Transcriptase [50 U/μl] | |
| - Random Primer (10x) | |
| TaqMan [®] -Mastermix | BioRad, München/D |
| Primer | Oligoservice, Berlin, Deutschland |
| MMP9 Rev: (5'→3') | CCA TAC AGC TTA TCC TGG TCA TAG TT-3' |
| MMP9 Fwd: (5'→3') | CCC CAG TGA GAA TCT CTA CAC G-3' |
| MMP9-Sonde (5'→3') | 6FAM- AAC GGA GAC GGC AAA CCC TGC-Dabcyl- 3' |
| | |
| INOS Rev. (5'→3') | CCGACTTTCCTGTCTCAGTAGCA |
| INOS-Fwd. (5'→3') | TGGTGAAAGCGGTGTTCTTTG |
| INOS-Sonde (5'→3') | 6FAM-AAGGTAATGGCTTCCCGCGTCA-Tamra |
| | |
| PLA2-Rev. (5'→3') | TTCCGGGCAAAACATTCAG |
| PLA2-Fwd. (5'→3') | CAGGACTCCTGCCGGAAA |
| PLA2-Sonde (5'→3') | 6FAM-AGCTGTGCCAGTGC GATAAAGCTGC-Tamra |
| | |
| β-Actin-Rev. (5'→3') | CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT |
| β-Actin-Fwd. (5'→3') | TCGCTGACAGGATGCAGAAG |
| β-Actin-Sonde(5'→3') | 6FAM-AGATTACTGCCCTGGCTCCTAGCACCA-TMR |

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| Cover Slides BD Falcon Culture Slides | BD Bioscience, Bedford/USA |
| Deckgläser | Roth, Karlsruhe/D |
| Eppendorf-Tubes (0,5 ml und 1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg/D |
| Filterspitzen | Eppendorf, Hamburg/D |
| Glaspipetten (1-25 ml) | Roth, Karlsruhe/D |
| Kulturflaschen | Nunc, Roskilde/DK |
| Kryo-Röhrchen | Eppendorf, Hamburg/D |
| Pipetten | |

| | | |
|--|----------------|---|
| (10µl, 20µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl) | | Eppendorf, Hamburg/D |
| Pipettenspitzen | | Eppendorf, Hamburg/D |
| (10µl, 20µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl) | | |
| Plastikpetrischalen (35er, 60er) | | Eppendorf, Hamburg/D |
| Pasteurpipetten | | Eppendorf, Hamburg/D |
| Präparationsbesteck | | FST, Foster City/USA |
| Skalpelle | | Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan |
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml | Sarstedt, Nürnberg/D |
| | 1,5 und 2,0 ml | Eppendorf, Hamburg/D |
| | 15 und 20 ml | Falcon, Oxnard/USA |
| Spritzen und Kanülen (Sterican) | | Braun, Melsungen/D |
| Sterilpipetten 5ml, 10ml, 25ml | | Eppendorf, Hamburg/D |
| Zellkulturartikel | | BD Bioscience, Bedford/USA |
| Zellkulturflaschen (75 ml) | | BD Bioscience, Bedford/USA |
| Zellkulturflaschen (35 ml) | | BD Bioscience, Bedford/USA |
| Zellschaber | | BD Bioscience, Bedford/USA |
| 96well Platte | | Greiner, Fracht/D |
| Whatman-Papier | | Whatman International Ltd., Maidstone /UK |
| Brutschrank | | Heraeus, Osterode, Deutschland |
| Gefrierschrank -80°C | | Heraeus, Osterode, Deutschland |
| Gefrierschrank -20°C | | Liebherr, Biberach, Deutschland |
| Kühlschrank | | Bosch, Stuttgart, Deutschland |
| NanoDrop Spectrophotometer ND 1000 | | NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |
| Sterilwerkbank | | Heraeus, Osterode, Deutschland |
| Thermogerät | | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge | | Heraeus, Osterode, Deutschland |
| Mastercycler | | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Milli-Q Water purification system | | Millipore Corporation, Bedford, USA |

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Expression proinflammatorischer Gene

Abbildung 1 zeigt die dosis- und zeitabhängige Expressionssteigerung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene der iNOS, der MMP9 und der sPLA2 durch das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β .

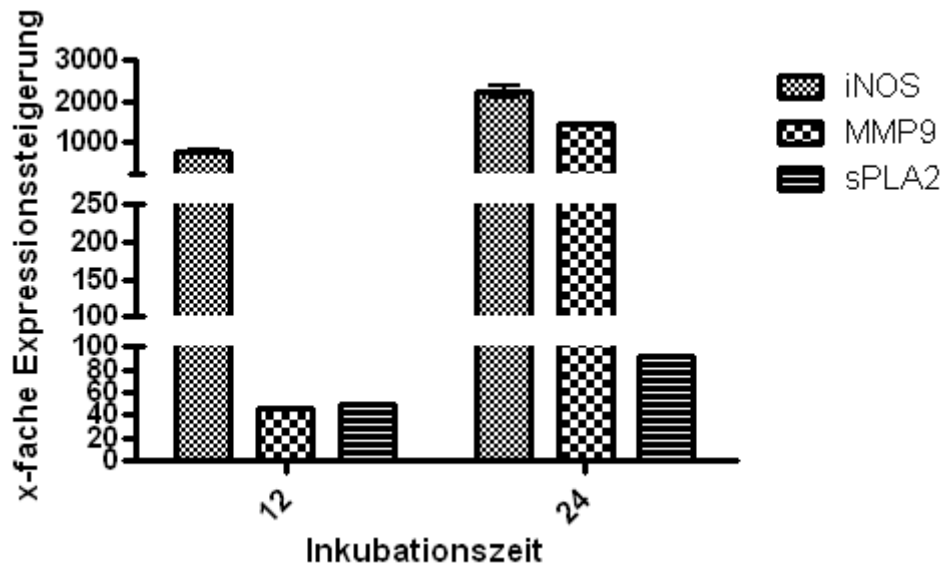


Abb. 1: Zeitabhängige Expressionssteigerung von iNOS, MMP9 und sPLA2 in VSMCs unter Stimulierung mittels IL1 β über 12 und 24h zur Etablierung der IL1 β -Konzentration [10ng/ml] und -stimulierungszeit..

Die verwendeten Primer waren zum Zeitpunkt der Arbeit bereits etabliert.

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Ratten-VSMC aus der thorakalen Aorta, die in Generation p4 nach Inkubation mit DMEM 10% - Medium für 24h in DMEM 0,1% - Medium (phenolrot-frei) überführt wurden. Es wurden mit jeweils 1, 10, 20 und 30 ng/ml verschiedene Konzentrationen getestet, wobei eine Konzentration von 10 ng/ml IL1 β eine konstante Stimulation bewirkte (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen Konzentrationen wurden in Abständen von 6, 12, 18, 24 und 30 h gemessen; hier zeigte eine Inkubationszeit von 24h eine für alle Gene konstante Expressionssteigerung (exemplarisch für 12 und 24h in Abb. 1 gezeigt).

In den folgenden Versuchen (Abb. 2-14) wurde die Konzentration von IL1 β daher mit 10 ng/ml und die Inkubationszeit mit 24h festgelegt. Für alle Versuche dieser Arbeit wurden die Werte aus jeweils drei Proben gemittelt, die Gesamtversuchszahl je Abb. beträgt n=5.

3.2 Einfluss von HDL auf die Expression proinflammatorischer Gene

3.2.1 iNOS

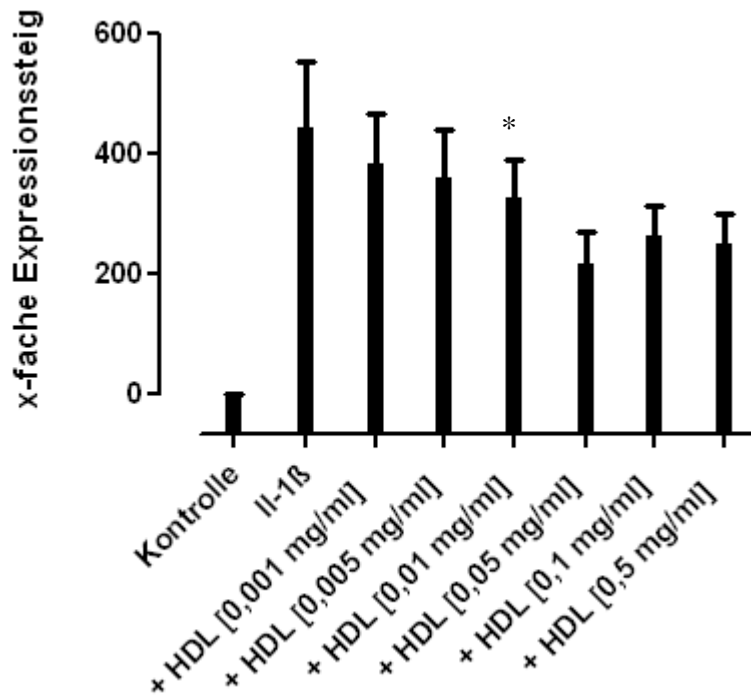


Abb. 2: Relative Expression von iNOS in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen HDL bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

Abbildung 2 beschreibt den konzentrationsabhängigen Einfluss von High-Density-Lipoproteinen auf die Expression der iNOS.

Bis zum Splitting zur Generation p4 erfolgte die Inkubation mit DMEM 10% - Medium (s.o.). Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde das Medium abgesaugt und phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h ergänzt. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss von Phenolrot auf IL1 β ausgeschlossen werden. Anschließend wurde eine Kontrolle VSMCs ohne IL1 β und HDL belassen und die übrigen VSMC-Proben 24h mit 10ng/ml IL1 β und mit 0 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,5mg/ml HDL inkubiert. Der Versuch fand mit einer Versuchszahl von n=5 mit jeweils drei parallel zu vermessenden Proben statt. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der Stimulierung bei Inkubation mit 0,01 mg/ml HDL mit einer maximalen Hemmung bei 0,05 mg/ml HDL. Die Hemmung folgte einer Dosis-Wirkungsbeziehung.

3.2.2 MMP9

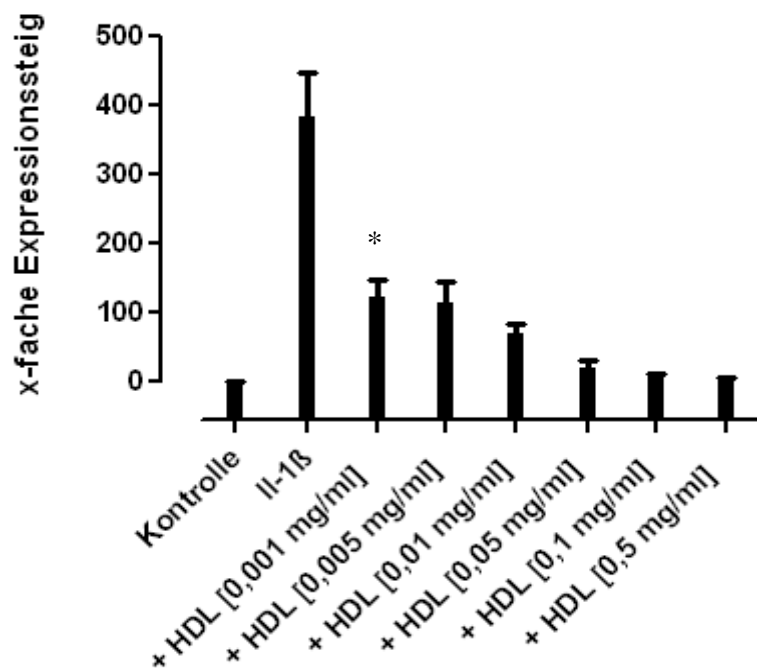


Abb. 3: Relative Expression von MMP9 in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen HDL bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

In Abbildung 3 wird der konzentrationsabhängige Einfluss von High-Density-Lipoproteinen auf die Expression der MMP9 beschrieben.

Bis zum Splitting zur Generation p4 erfolgte die Inkubation mit DMEM 10% - Medium (s.o.). Nach Konfluenz der p4-VSMCs erfolgte das Absaugen des Mediums und die Zugabe von phenolrotfreiem Medium DMEM 0,1% für 24h. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss von Phenolrot auf IL1 β ausgeschlossen werden. Auch in dieser Versuchsanordnung wurde anschließend eine VSMC-Kontrolle von der IL1 β -Simulierung und der Inkubation mit HDL ausgenommen. Die übrigen Proben wurden für 24h mit 10 ng/ml IL1 β und mit 0 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,5mg/ml HDL inkubiert. Bei n=5 mit je drei parallel untersuchten Proben konnte bereits bei 0,001 mg/ml HDL eine signifikante Hemmung registriert werden, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 0,5 ml/mg HDL erreichte.

3.2.3 sPLA2

In Abbildung 4 wird der konzentrationsabhängige Einfluss von High-Density-Lipoproteinen auf die Expression der sPLA2 gezeigt.

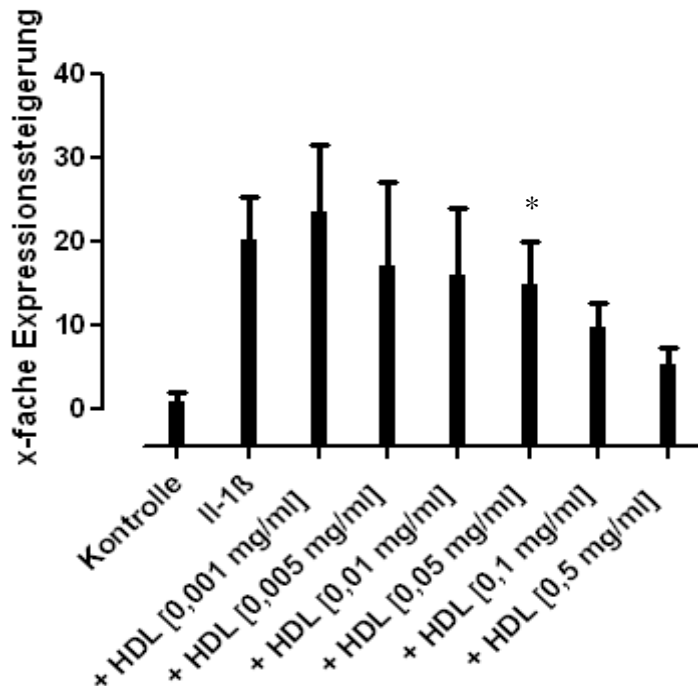


Abb. 4: Relative Expression von sPLA2 in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen HDL bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen (Abb. 2 + 3) wurde bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium inkubiert (s.o.). Nach Konfluenz der p4-VSMCs erfolgte das Absaugen des Mediums und die Zugabe von phenolrotfreiem Medium DMEM 0,1% für 24h. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss von Phenolrot auf IL1 β ausgeschlossen werden. Anschließend wurde auch in diesem Experiment eine VSMC-Kontrolle von der IL1 β -Simulierung und der Inkubation mit HDL ausgenommen. Alle weiteren Proben wurden mit IL1 β über 24h stimuliert und mit 0 mg/ml, 0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,5mg/ml HDL inkubiert. Dabei wurde ein Abfall der Genexpression im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet mit einem Maximum bei 0,5 mg/ml HDL. Eine signifikante Hemmung lag bei 0,05 mg/ml HDL vor.

3.3 Einfluss von S1P auf die Expression proinflammatorischer Gene

3.3.1 iNOS

Abbildung 5 beschreibt den konzentrationsabhängigen, antiinflammatorischen Effekt des Sphingosin-1-Phosphat gegenüber IL1 β -stimulierter iNOS-Expression.

Die Untersuchungen der Abb. 5 fanden mit n=5 und drei parallel vermessenen Proben statt. In diesen Versuchen wurde bis zum Splitting der VSMCs zur Generation p4 mit DMEM 10% -

Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs erfolgte das Absaugen des Mediums und die Zugabe von phenolrotfreiem Medium DMEM 0,1% für 24h. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss von Phenolrot auf IL1 β ausgeschlossen werden.

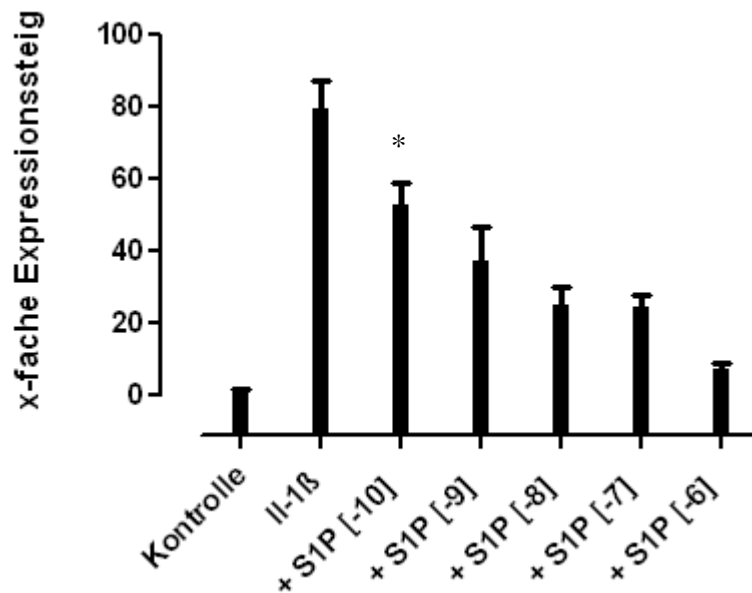


Abb. 5: Relative Expression von iNOS in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen S1P bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

Zur Kontrolle wurde eine Probe VSMCs nicht mit IL1 β stimuliert. Alle weiteren Proben wurden mit der etablierten Menge von 10 ng/ml IL1 β sowie mit 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 10 nmol/l, 0,1 μ mol/l und 1 μ mol/l Sphingosin-1-Phosphat über 24h inkubiert.

Es zeigte sich dabei eine kontinuierliche Abnahme der iNOS-Expression mit maximaler Hemmung bei 1 μ mol/l S1P. Bereits bei 0,1 nmol/l gab es eine signifikante Hemmung.

3.3.2 MMP9

Abbildung 6 zeigt die Abnahme der Genexpression von MMP9 unter steigenden Konzentrationen von S1P.

Auch hier erfolgte die Inkubation der VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.). Nach Konfluenz der p4-VSMCs und Absaugen des Mediums wurde dies durch phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h ersetzt. Hierdurch sollte ein möglicher Einfluss von Phenolrot auf IL1 β ausgeschlossen werden. Als Kontrolle wurde einer

Probe in jedem der n=5 Versuche die Stimulierung mit IL1 β und die Inkubation mit S1P vorenthalten.

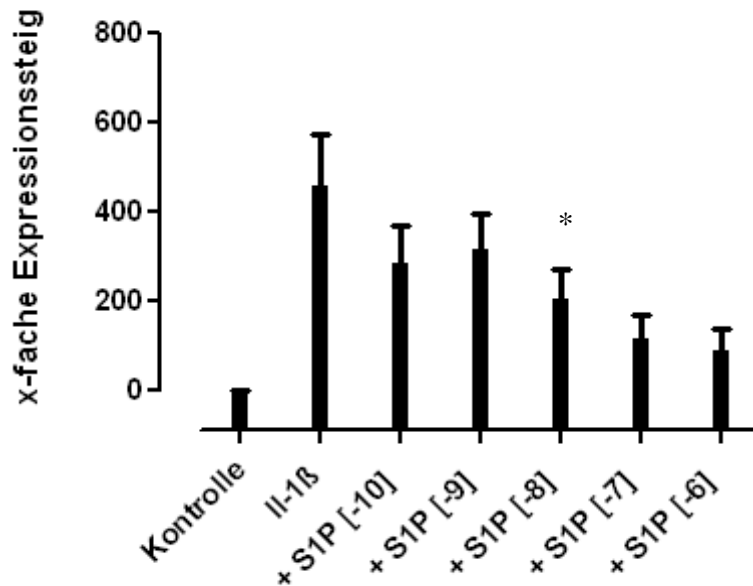


Abb. 6: Relative Expression von MMP9 in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen S1P bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

Die übrigen Proben wurden mit IL1 β [10 ng/ml] stimuliert und mit 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 10 nmol/l, 0,1 μ mol/l und 1 μ mol/l Sphingosin-1-Phosphat inkubiert.

Es zeigte sich auch hier eine deutlich reduzierte Genexpression im Vergleich zur alleinig mit IL1 β stimulierten Probe bei maximaler Hemmung in den Konzentrationen 0,1 μ mol/l und 1 μ mol/l S1P, wobei eine signifikante Hemmung bereits bei 10 nmol/l vorlag.

3.3.3 sPLA2

In Abbildung 7 wird der Einfluss verschiedener Konzentrationen des antiinflammatorischen S1P auf die Expression von sPLA2 dargestellt.

Wie in den Versuchen aus Abb. 5 und 6 wurde bis zum Splitting der VSMCs zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs erfolgte das Absaugen des Mediums und die Zugabe von phenolrotfreiem Medium DMEM 0,1% für 24h, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen.

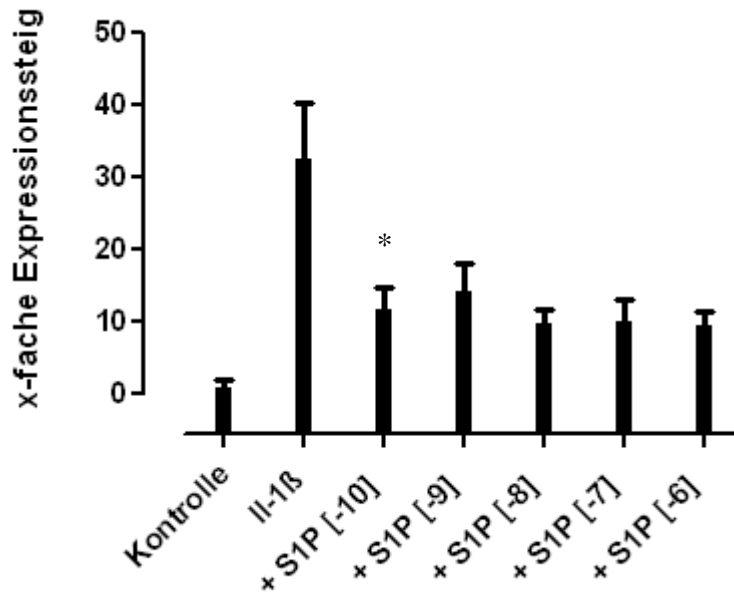


Abb. 7: Relative Expression von sPLA2 in VSMCs: Einfluss verschiedener Konzentrationen S1P bei Stimulierung mittels IL1β [10 ng/ml] über 24h

Eine Kontrollprobe wurde ohne IL1β und S1P belassen, die übrigen mit IL1β stimuliert und mit 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 10 nmol/l, 0,1 μmol/l und 1 μmol/l S1P inkubiert.

Nach Auswertung der n=5 Versuche konnte gezeigt werden, dass die sPLA2-Expression unter S1P-Einfluss deutlich abnahm, wobei bereits bei 0,1 nmol/l eine signifikante Hemmung nachzuweisen war.

3.4. Expression proinflammatorischer Enzyme unter Blockierung des S1P3-Rezeptors

3.4.1 iNOS

Abbildung 8 zeigt den Einfluss von HDL und S1P auf die Expression von iNOS in glatten Gefäßmuskelzellen, wo der S1P3-Rezeptor durch Zugabe von siRNA reduziert ausgebildet war. Das Zellmaterial und die siRNA wurden von der AG Prof. van der Giet zur Verfügung gestellt.

Wie in den vorangehenden Versuchen wurden die VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1β auszuschließen.

Als Kontrolle wurde einer Probe in jedem der n=5 Versuche die Stimulierung mit IL1β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten.

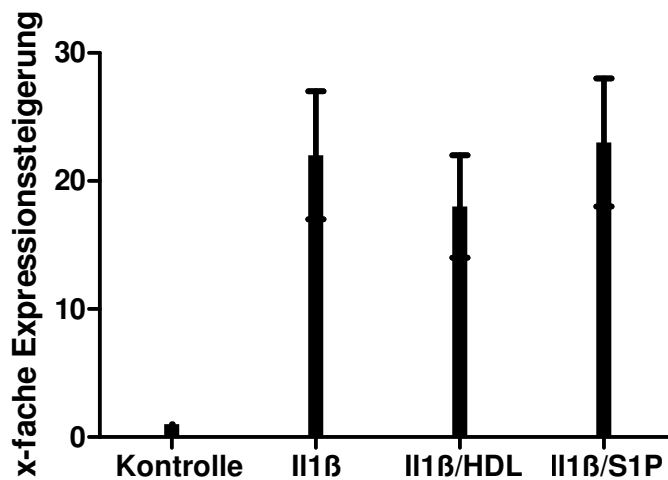


Abb. 8: relative Expression von iNOS - siRNA in VSMCs: Einfluss von HDL [0,5mg/ml] und S1P [1 μ mol/l] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

Den übrigen Proben wurden 10 ng/ml IL1 β zugeführt. Eine Probe inkubierte dann mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 μ mol/l S1P. Trotz der hohen Dosierung der antiinflammatorischen Testsubstanzen kam es zu keiner wesentlichen Hemmung der Expression. Lediglich bei HDL gibt es eine leichte, nicht signifikante, Hemmung der IL1 β -induzierten Expression.

3.4.2 MMP9

In Abbildung 9 wird der Einfluss von HDL und S1P auf die Expression von MMP9 unter Ausschalten des S1P3-Rezeptors durch Zugabe von siRNA untersucht.

Auch hier wurden die entsprechenden Materialien durch die AG Prof. van der Giet zur Verfügung gestellt. Es wurden hierzu VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen. Einer Kontrolle wurde die Stimulierung mit IL1 β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten. Den übrigen Proben wurden 10 ng/ml IL1 β zugeführt. Eine Probe inkubierte dann mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 μ mol/l S1P.

In allen der n=5 Versuche mit jeweils drei parallel vermessenen Proben war trotz der hohen Dosierung der antiinflammatorischen Testsubstanzen keine wesentliche Hemmung der

Expression festzustellen. Wie bereits in Abb. 8 zeigte sich lediglich beim HDL ein nicht signifikanter Expressionsrückgang.

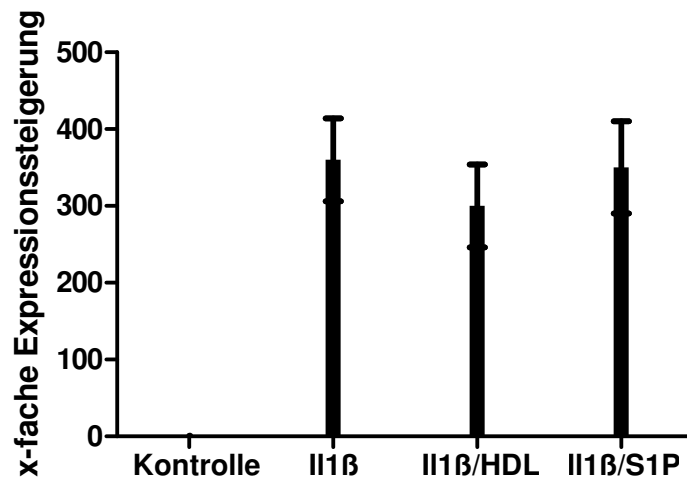


Abb. 9: Relative Expression von MMP9 - siRNA in VSMCs: Einfluss von HDL[0,5mg/ml] und S1P [1 μ mol/l] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

3.4.3 sPLA2

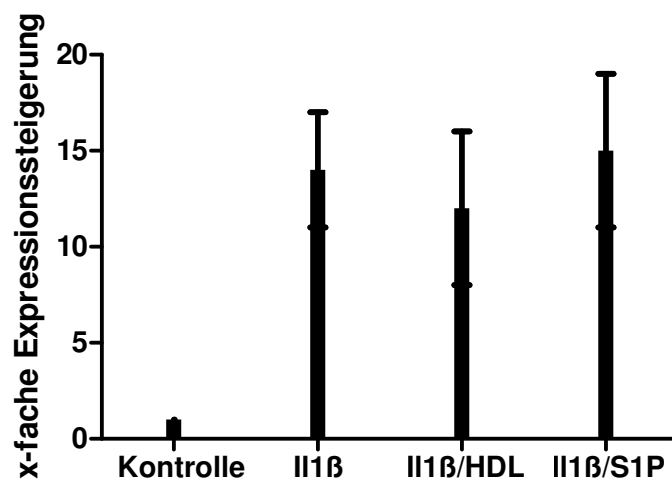


Abb. 10: Relative Expression von MMP9 - siRNA in VSMCs: Einfluss von HDL[0,5mg/ml] und S1P [1 μ mol/l] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

In Abbildung 10 wird der Einfluss von HDL und S1P auf die Expression von sPLA2 bei Blockierung von S1P3-Rezeptoren gezeigt.

In diesem Versuch wurden VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen. Einer Kontrollprobe wurde die Stimulierung mit IL1 β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten, während den übrigen Proben wurden 10 ng/ml IL1 β zugeführt wurde. Eine Probe inkubierte dann mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 μ mol S1P. In allen der n=5 Versuche mit jeweils drei parallel vermessenen Proben war trotz der hohen Dosierung der antiinflammatorischen Testsubstanzen keine signifikante Hemmung der Expression festzustellen.

3.5 Antiinflammatorische Effekte von HDL und S1P unter dem Einfluss verschiedener Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems

3.5.1 iNOS

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, durch welchen Rezeptor S1P und HDL die iNOS-Expression hemmen. Hierzu wurden verschiedene Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems getestet.

PTX inhibiert Gi-gekoppelte Reaktionswege und wurde in einer Konzentration von 1 μ mol/l verwendet. JTE wirkt als Antagonist am S1P2-Rezeptor und wurde mit 10 μ mol/l dosiert. Bei CAY 10444 handelt es sich um einen Antagonisten der S1P1- und S1P3-Rezeptoren. Cay 10444 wird mit 1 μ mol/l getestet.

Abbildung 11 beschreibt nun den Einfluss von S1P und HDL auf die Expression von iNOS.

In dieser mehrgliedrigen Versuchsanordnung wurden VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde auch hier phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen. Die Proben wurden auf 4 Gruppen verteilt und wie folgt bearbeitet:

In der ersten Kontrollgruppe (iNOS) wurde einer Kontrollprobe die Stimulierung mit IL1 β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten, während den übrigen Proben 10 ng/ml IL1 β für 24h zugeführt wurde. Es inkubierte dann eine Probe mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 μ mol/l S1P für ebenfalls 24h.

In der zweiten Gruppe (PTX) wurde ebenfalls eine Kontrolle ohne IL1 β , HDL und S1P belassen, die anderen Proben hingegen mit 10 ng/ml IL1 β über 24h stimuliert. Einer Probe

wurden dann 0,5 mg/ml HDL und PTX, einer anderen 10 μ mol/l S1P und PTX für ebenfalls 24h hinzugegeben.

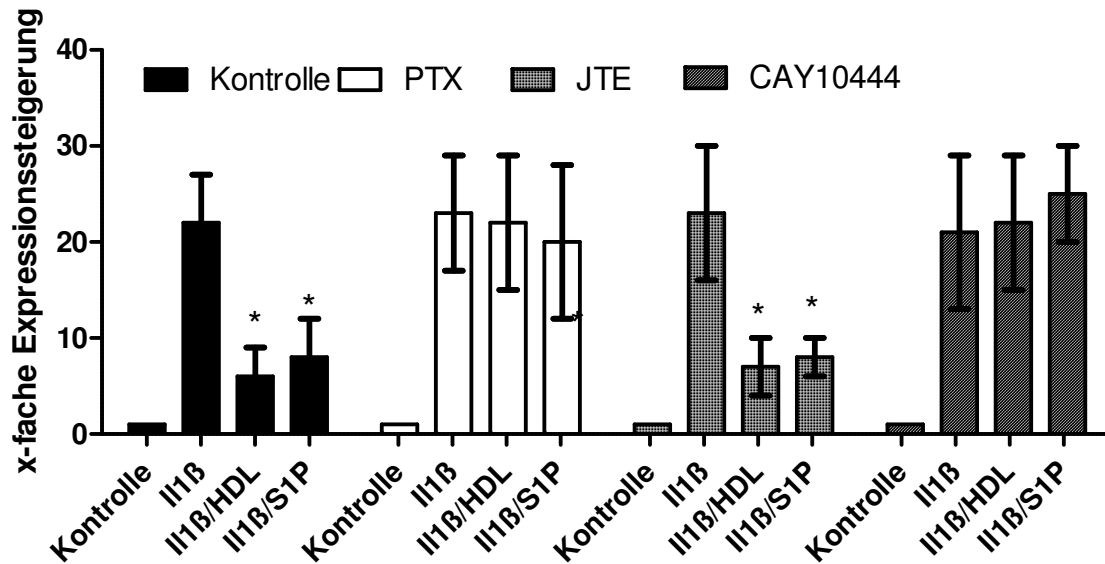


Abb. 11: Relative Expression von iNOS in VSMCs: Einfluss von HDL [0,5mg/ml] und S1P [10^{-6} mol/l] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] sowie verschiedener Agonisten und Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems über 24h

Den übrigen Proben wurde für 24h IL1 β [10 ng/ml] hinzugegeben.

In Gruppe drei (JTE) verblieb eine Kontrolle ohne IL1 β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1 β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und JTE, einer anderen 1 μ mol/l S1P und JTE für ebenfalls 24h hinzugegeben. Den übrigen Proben wurde für 24h IL1 β [10 ng/ml] hinzugegeben.

In Gruppe vier (CAY 10444) verblieb eine Kontrolle ohne IL1 β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1 β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und CAY 10444, einer anderen 1 μ mol/l S1P und CAY 10444 für ebenfalls 24h hinzugegeben.

Die Versuchsanzahl betrug n = 5 bei drei parallel vermessenen Proben.

Es zeigte sich in Gruppe eins eine signifikante Hemmung der Genexpression von iNOS sowohl unter Inkubierung mit HDL und S1P. In Gruppe zwei kommt es unter S1P und HDL unter gleichzeitiger Inkubation mit dem Gi-Pathway-Antagonisten PTX zu keiner signifikant reduzierten Expression von iNOS in VSMCs.

Gruppe drei steht neben S1P und HDL unter dem Einfluss des S1P2-Rezeptor-Antagonisten JTE. Es zeigt sich hier eine signifikant verminderte Expression von iNOS. Gruppe vier zeigt unter S1P und HDL und gleichzeitigem Einfluss des S1P1- und S1P3-Rezeptor-Antagonisten CAY 10444 eine unveränderte Expression von iNOS in VSMCs im Vergleich zur allein mit IL1 β stimulierten Probe.

3.5.2 MMP9

Im Versuch der Abbildung 12 sollte überprüft werden, durch welchen Rezeptor S1P und HDL die MMP9-Expression hemmen. Hierzu wurden die o.g. Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems getestet.

PTX (Gi-Antagonist) wurde in einer Konzentration von 1 μ mol/l verwendet, JTE (S1P2-Rezeptor-Antagonist) mit 10 μ mol/l dosiert, CAY 10444 (S1P1- und S1P3-Rezeptor-Antagonist) mit 1 μ mol/l getestet.

In dieser mehrgliedrigen Versuchsanordnung wurden VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde auch hier phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1 β auszuschließen. Die Proben wurden auf 4 Gruppen verteilt und wie folgt bearbeitet:

In der ersten Kontrollgruppe (MMP9) wurde einer Kontrollprobe die Stimulierung mit IL1 β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten, während den übrigen Proben 10 ng/ml IL1 β für 24h zugeführt wurde. Es inkubierte dann eine Probe mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 μ mol/l S1P für ebenfalls 24h.

In der zweiten Gruppe (PTX) wurde ebenfalls eine Kontrolle ohne IL1 β , HDL und S1P belassen, die anderen Proben hingegen mit 10 ng/ml IL1 β über 24h stimuliert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und PTX, einer anderen 1 μ mol S1P und PTX für ebenfalls 24h hinzugegeben.

In Gruppe drei (JTE) verblieb eine Kontrolle ohne IL1 β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1 β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und JTE, einer anderen 1 μ mol/l S1P und JTE für ebenfalls 24h hinzugegeben.

In Gruppe vier (CAY 10444) verblieb eine Kontrolle ohne IL1 β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1 β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und CAY 10444, einer anderen 1 μ mol/l S1P und CAY 10444 für ebenfalls 24h hinzugegeben. Die Versuchszahl betrug n = 5 bei drei parallel vermessenen Proben.

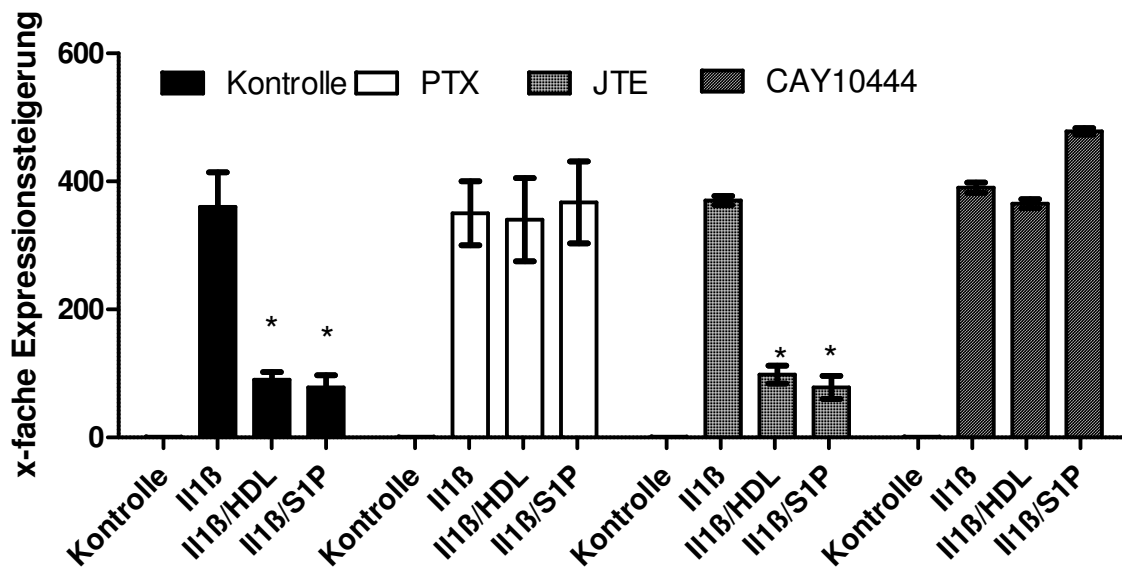


Abb. 12: Relative Expression von MMP9 - siRNA in VSMCs: Einfluss von HDL [0,5mg/ml] und S1P [1 μ mol/l] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] sowie verschiedener Agonisten und Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems über 24h

Es zeigte sich in Gruppe eins eine deutliche Hemmung der Genexpression von MMP9 sowohl unter Inkubation mit HDL und S1P. In Gruppe zwei kommt es unter S1P und HDL unter gleichzeitiger Inkubation mit dem Gi-Pathway-Antagonisten PTX zu einer unveränderten Expression von MMP9 in VSMCs. Gruppe drei steht neben S1P und HDL unter dem Einfluss des S1P2-Rezeptor-Antagonisten JTE. Es zeigt sich hier eine signifikante Reduzierung der Expression von MMP9. Gruppe vier hingegen zeigt unter S1P und HDL und gleichzeitigem Einfluss des S1P1- und S1P3-Rezeptor-Antagonisten Cay 10444 eine unveränderte Expression von MMP9 in VSMCs.

3.5.3 sPLA2

Im Versuch der Abbildung 13 wurde getestet, durch welchen Rezeptor S1P und HDL die Expression von sPLA2 hemmen. Hierzu wurden die o.g. Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems verwendet.

PTX (Gi-Antagonist) wurde in einer Konzentration von 1 μ mol/l getestet, JTE (S1P2-Rezeptor-Antagonist) mit 10 μ mol/l dosiert, CAY 10444 (S1P1- und S1P3-Rezeptor-Antagonist) mit 1 μ mol/l getestet.

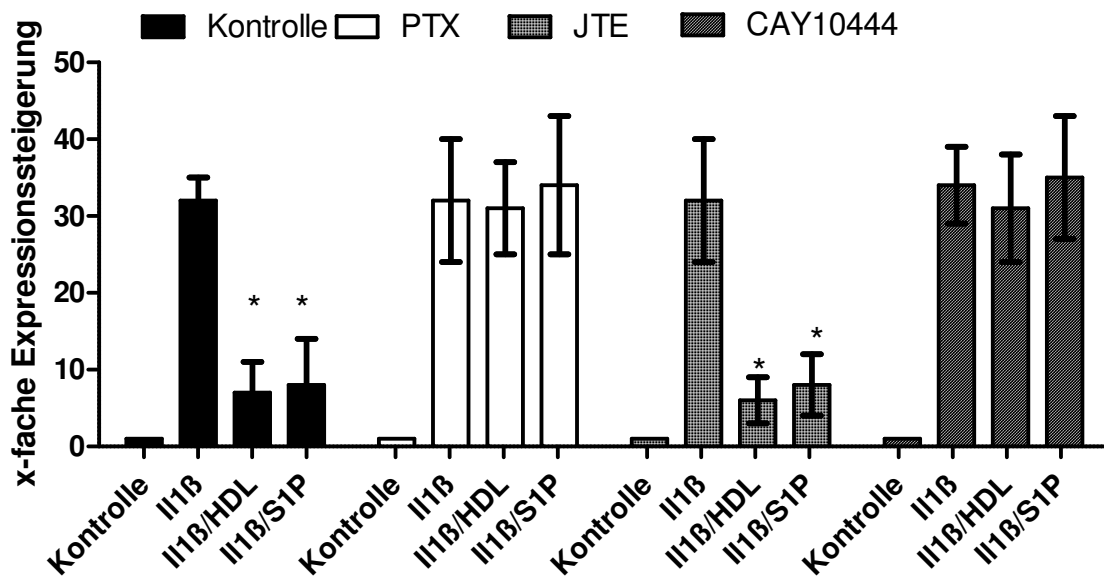


Abb. 13: Relative Expression von sPLA2 in VSMCs: Einfluss von HDL [0,5mg/ml] und S1P [1 µmol/l] bei Stimulierung mittels IL1β [10 ng/ml] sowie verschiedener Agonisten und Antagonisten des S1P-Rezeptorsystems über 24h

In dieser mehrgliedrigen Versuchsanordnung wurden VSMCs bis zum Splitting zur Generation p4 mit DMEM 10% - Medium (s.o.) inkubiert. Nach Konfluenz der p4-VSMCs wurde auch hier phenolrotfreies Medium DMEM 0,1% für 24h verwendet, um einen möglichen Einfluss von Phenolrot auf IL1β auszuschließen. Die insgesamt 24 Proben wurden auf 6 Gruppen verteilt und wie folgt bearbeitet:

In der ersten Kontrollgruppe (sPLA2) wurde einer Kontrollprobe die Stimulierung mit IL1β und die Inkubation mit S1P und HDL vorenthalten, während den übrigen Proben 10 ng/ml IL1β für 24h zugeführt wurde. Es inkubierte dann eine Probe mit zusätzlich 0,5 mg/ml HDL, eine andere mit 1 µmol/l S1P für ebenfalls 24h.

In der zweiten Gruppe (PTX) wurde ebenfalls eine Kontrolle ohne IL1β, HDL und S1P belassen, die anderen Proben hingegen mit 10 ng/ml IL1β über 24h stimuliert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und PTX, einer anderen 1 µmol/l S1P und PTX für ebenfalls 24h hinzugegeben.

In Gruppe drei (JTE) verblieb eine Kontrolle ohne IL1β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und JTE, einer anderen 1 µmol/l S1P und JTE für ebenfalls 24h hinzugegeben.

In Gruppe vier (CAY 10444) verblieb eine Kontrolle ohne IL1 β oder HDL und S1P, alle anderen wurden mit IL1 β [10ng/ml] für 24h inkubiert. Einer Probe wurden dann 0,5 mg/ml HDL und CAY 10444, einer anderen 1 μ mol/l S1P und CAY 10444 für ebenfalls 24h hinzugegeben. Die Versuchszahl betrug n = 5 bei drei parallel vermessenen Proben.

Es zeigte sich in Gruppe eins eine signifikante Hemmung der Genexpression von sPLA2 bei Inkubation mit HDL und S1P. In Gruppe zwei kommt es unter S1P und HDL bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Gi-Pathway-Antagonisten PTX zu einer nahezu unveränderten Expression von sPLA2 in VSMCs. Gruppe drei steht neben S1P und HDL unter dem Einfluss des S1P2-Rezeptor-Antagonisten JTE. Es zeigt sich hier eine signifikante Reduzierung der Expression von sPLA2. Gruppe vier kommt es unter S1P und HDL und gleichzeitigem Einfluss des S1P1- und S1P3-Rezeptor-Antagonisten Cay 10444 zu einer unveränderten Expression von sPLA2 in VSMCs.

3.6 antiinflammatorische Effekte verschiedener S1P-Rezeptoragonisten auf die proinflammatorischen Gene iNOS, sPLA2 und MMP9

In diesem Versuch wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Agonisten des S1P-Rezeptorsystems auf die in der Inflammation relevant beteiligten Enzyme haben. Hierzu wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Generation p4 nach Inkubation mit DMEM 10%-Medium für 24h mit DMEM-Medium 0,1% für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Proben wie folgt bearbeitet: Zunächst wurde mit IL1 β für 24h inkubiert. Einer Kontrolle wurde das IL1 β jeweils vorenthalten. Außerdem wurden die Proben zusätzlich mit dem S1P1/3-Agonisten FTY720 (10 μ mol/l) bzw. dem S1P1 selektiven Agonisten SEW (10 μ mol/l) für 24h inkubiert.

Die Expression der proinflammatorischen Enzyme sPLA2, MMP9 und iNOS wurde anschließend untersucht. Es zeigte sich, dass FTY720 signifikant die Induktion von sPLA2, MMP9 oder iNOS blockieren kann, während SEW keinen hemmenden Effekt hatte.

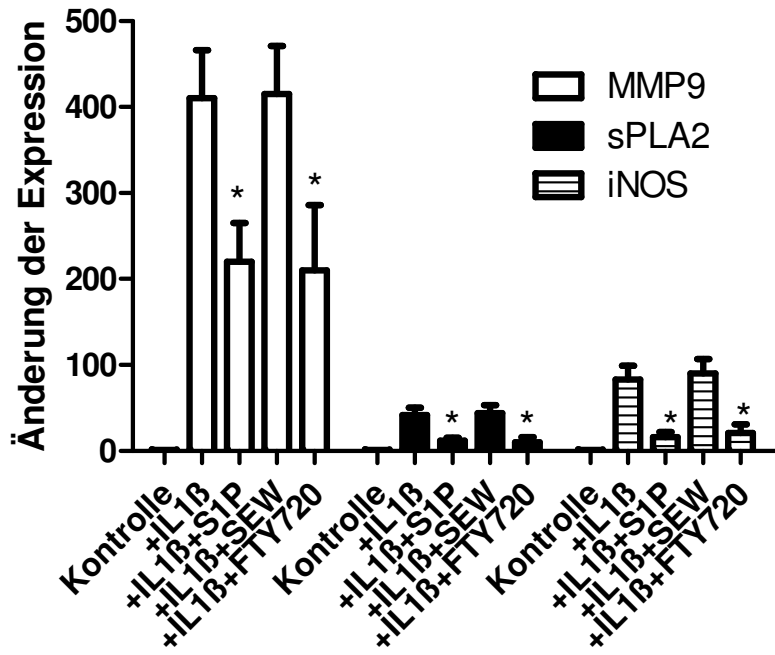


Abb. 14: Relative Expression von MMP9, sPLA2 und iNOS in VSMCs: Einfluss von FTY 720 [1 $\mu\text{mol/l}$] und SEW [1 $\mu\text{mol/l}$] bei Stimulierung mittels IL1 β [10 ng/ml] über 24h

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HDL auf die Expression von mehreren an der Atherosklerosegenese wesentlich beteiligten proinflammatorischen Enzymen untersucht. Es kann erstmalig gezeigt werden, dass HDL in der Lage ist, die Induktion von iNOS, sPLA2 und MMP9 signifikant zu hemmen. Ganz wesentliche Bedeutung hat dabei die Komponente S1P im HDL [Spiegel S, Milstien S. 2003]. Über die Aktivierung von membranständigen S1P-Rezeptoren und hier insbesondere den Subtyp S1P3-Rezeptor kann HDL bzw. S1P die Induktion von proinflammatorischen Genen inhibieren.

Seit vielen Jahren ist die besondere Bedeutung von HDL bei der Hemmung von Initiation und Progression der Atherosklerose beim Menschen bekannt und in multiplen epidemiologischen Untersuchungen nachgewiesen [Libby P et al. 2002, Weissberg PL. 2000, Barter PJ et al. 2002, Sugatani J 1996]. Über welche Mechanismen HDL seine skleroprotektiven Wirkungen vermittelt, ist jedoch nur in Teilen verstanden und erforscht. Viele Jahre ging man davon aus, dass HDL vor allem durch seine Funktion als Cholesterintransporter antiatherosklerotisch wirkt, zumal dieser sogenannte reverse Cholesterintransport intensiv untersucht wurde [Ji Y et al. 1999, Chapman MJ 2006].

HDL ist jedoch ein weitaus komplexeres Lipidpartikel, das sich neben Apolipoproteinen aus verschiedenen Lipiden zusammensetzt, deren Bedeutung erst nach und nach Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen wurde.

So sind in den letzten Jahren zunehmend die sogenannten pleiotropen Effekte von HDL beschrieben worden. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass HDL auch direkt für die Bildung von Cytokinen verantwortlich ist, die proinflammatorisch wirksam die Atherosklerose initiieren können: HDL kann die Bildung und Sezernierung von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) sehr effektiv direkt hemmen, einem Protein, das im Rahmen der initialen inflammatorischen Gefäßumbauten von entscheidender Bedeutung ist [Tölle M et al. 2008]. Ferner konnte gezeigt werden, dass HDL die endotheliale Funktion durch Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) positiv beeinflussen kann [Nofer JR et al. 2004, Igarashi J et al. 2001].

In den vorliegenden Versuchen bestätigt sich nun die Vermutung, dass HDL noch weitere inhibitorische und somit skleroprotektive Effekte auf proinflammatorische Gene hat, die dosisabhängig und reproduzierbar sind.

Zur Beantwortung der Frage, welche Komponenten des HDL für die antiinflammatorische Antwort von Bedeutung sind, gibt es in der Literatur einige wegweisende Hinweise. So konnte bereits vor einigen Jahren nachgewiesen werden, dass eine Sphingolipidkomponente

im HDL für antiinflammatorische Wirkungen von HDL möglicherweise von Bedeutung sein könnte. Es handelt sich dabei um das S1P, einen potenten Aktivator der eNOS und einen dosisabhängigen Inhibitor des MCP-1.

Schon in den Arbeiten damals konnte gezeigt werden, dass S1P rezeptovermittelt eine komplexe Signaltransduktionskaskade auslöst. Für die eNOS Aktivierung durch S1P in Endothelzellen wird eine AKT-Aktivierung benötigt. Für die Hemmung von MCP-1 durch S1P findet ein Eingriff in die Bildung intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffradikale statt. Dabei wird mit der Hemmung der membranständigen NADPH-Oxidase im Bereich der Gefäße das zentrale Enzym für die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen blockiert [Tölle M et al. 2008, Nofer JR. 2004].

Anschließend wurde überprüft, ob S1P auch in fortgeschritteneren Stadien der Atherosklerose wirksam ist. Hierzu wurde der Einfluss auf die Induktion von sPLA₂, iNOS bzw. MMP9 untersucht und auch hier zeigten sich dosisabhängige inhibierende Effekte. Die Beobachtungen stimmen auch mit der Beobachtung von Xu und Mitarbeitern überein, die bereits hemmenden Effekte von S1P auf proinflammatorische Gene beschrieben haben [Xu et al. 2004].

S1P vermag verschiedene S1P Rezeptorsubtypen zu aktivieren, in glatten Gefäßmuskelzellen sind jedoch vorrangig die Subtypen S1P1-3 (Edg1,5,3) exprimiert [Takuwa Y 2002]. Es ergab sich somit die Frage, ob die inhibierende Wirkung von HDL und S1P durch einen spezifischen Rezeptormechanismus oder –subtyp induziert ist. Über die S1P-Rezeptoren ist bekannt, dass sie über einen G_i-gekoppelten Mechanismus ihre Signaltransduktion vermitteln. Die Aktivierung von G_i gekoppelten Mechanismen kann durch Pertussistoxin (PTX) sehr effektiv gehemmt werden [Idzko M. 2004, English D et al. 2000]. Sowohl HDL wie auch S1P war in Anwesenheit von Pertussistoxin nicht mehr in der Lage, die Induktion der untersuchten proinflammatorischen Gene herabzusetzen, sodass von einem rezeptormediierten hemmenden Effekt ausgegangen werden muss.

In einem ersten Schritt wurde daher überprüft, welcher S1P-Rezeptorsubtyp die Hemmung der proinflammatorischen Gene vermittelt. Hierzu wurde zunächst mittels S1P-Rezeptorantagonisten getestet, welcher Rezeptor involviert ist.

S1P-Rezeptorantagonisten sind nur in geringer Anzahl und z.T. sehr unspezifisch wirksam verfügbar. Verwendet wurden für die Versuche mit JTE ein S1P2-Rezeptorantagonist und mit Cay 10444 ein S1P3- Rezeptorantagonist, wobei JTE keinen Einfluss hatte und nur Cay 10444 die S1P/HDL-vermittelte Hemmung der Expression proinflammatorischer Gene aufheben konnte, sodass der S1P3-Rezeptor von zentraler Bedeutung erschien.

Im zweiten Schritt wurde mittels Agonisten der S1P Rezeptoren versucht, die Wirkung von S1P/HDL zu simulieren. Verwendet wurden mit SEW ein S1P1-Rezeptoragonist und mit FTY 720 ein S1P1/3-Rezeptoragonist, wobei SEW keinen Effekt auf die Expression von iNOS, sPLA2 und MMP9 hatte, während FTY 720 einen potenten inhibitorischen Effekt zeigte.

Um die Bedeutung des S1P3-Rezeptors für die antiinflammatorische Regulation weiter einzugrenzen wurde seine Expression im nächsten Schritt mittels siRNA in den untersuchten glatten Gefäßmuskelzellen molekular ausgeschaltet. In diesen Zellen gelang es in der Folge nicht mehr, die Induktion der proinflammatorischen Gene iNOS, sPLA2 und MMP9 durch HDL und S1P zu beeinflussen. Damit war offensichtlich, dass der S1P3-Rezeptor zentral in die antiinflammatorische Wirkung von HDL/S1P einbezogen ist. Bereits bei der Aktivierung der eNOS, wie auch bei der Hemmung der MCP-1-Induktion konnte gezeigt werden, dass der S1P3-Rezeptor für die antiinflammatorischen Wirkungen eine essenzielle Rolle spielt [Tölle M et al. 2008, Nofer JR. 2004].

Limitation der Studie

In der vorliegenden Untersuchung wurden nur die Änderungen der Expression von iNOS, sPLA2 und MMP9 untersucht. Bei allen drei Proteinen handelt es sich jedoch um aktive Proteine, deren Synthesenachweis im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgte, zumal hierzu bereits eine andere Arbeit der AG van der Giet existiert (unveröffentlichte Daten). Diese zeigt, dass die Proteine funktionell synthetisiert werden und die Bildung durch HDL/S1P gehemmt ist.

Zudem behandelt die vorliegende Arbeit nicht die intrazellulären Signaltransduktionswege, über die S1P die Bildung von proinflammatorischen Genen inhibiert. Auch hierzu wurden in der AG van der Giet bereits umfangreiche Untersuchungen initiiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Aktivierung des S1P3-Rezeptors eine Transaktivierung des TGF β -Rezeptors stattfindet. In der Folge kommt es zusammen mit aktivierten SMAD-Proteinen zu einer Blockade der Expressionsinduktion proinflammatorischer Gene (noch unpublizierte Daten).

Bedeutung der Studie für das Verständnis der antiinflammatorischen Wirkungen von HDL

Die vorliegende Arbeit soll einen Aspekt der Bedeutung von HDL bei der Hemmung inflammatorischer Gefäßprozesse vermitteln. Der (HDL-)Komponente S1P scheint dabei eine

zentrale Bedeutung zuzukommen. Bislang konnte nur gezeigt werden, dass HDL vor allem in der Frühphase der sklerotischen Gefäßveränderungen mit gestörten Endothelfunktionen und Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie MCP-1 eine Wirkung entfalten.

Nun deutet sich an, dass HDL über S1P auch in späteren Phasen der Atherosklerose wirksam sind, da sowohl iNOS wie auch sPLA2 und MMP9 in ihrer Expression inhibiert werden.

Die iNOS wird in der Regel von glatten Gefäßmuskelzellen produziert, um protektives NO zu sezernieren. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse kommt es jedoch zu einer Entkopplung des Enzyms, so dass reaktive Sauerstoffradikale generiert werden [Miyoshi T et al. 2006, MacMicking J 1997, Wever RMF et al. 1998].

Die sPLA2 ist ein typisches Akutephaseprotein, welches Arachidonsäuren durch Degradierung membranständiger Phospholipide bereitstellt. Arachidonsäure wiederum wird durch die im Gefäß vorhanden Cyclooxygenasen zu Prostaglandinen verarbeitet, die dann selbst wieder schädigenden Einfluss in der Inflammation haben [Six DA, Denis EA 2000, Tatulian SA 2001, Rosengreen B et al. 2006].

Bei dem dritten proinflammatorischen Protein handelt es sich um die MMP-9, eine Kollagenase, die den systematischen Verband von glatten Gefäßmuskelzellen auflösen kann.

Sie beeinflusst dadurch die Migration sowie das ungeordnete Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen [Birkedal-Hansen H. 1995, Zorina S et al. 2002, Horton DB et al. 2001].

Die drei Proteine wirken damit vor allem in den späteren Stadien der Atherosklerose, wo sie die Plaquestabilisierung aber auch den Progress der Inflammation beeinflussen. HDL wird dadurch eine wichtige Funktion in der Beruhigung der Inflammation zuteil.

Weitere Studien müssen jetzt in vivo zeigen, welche Bedeutung S1P oder Varianten für die Atherosklerose haben. Hier deutet sich bereits an, dass die Gabe von FTY 720, einem S1P1/3-Rezeptoragonisten, über einen Zeitraum von mehreren Wochen in Mäusen mit Atheroskleroseneigung protektive Effekte hat [Tölle M et al. 2005]. Diese Mäuse haben in der Folge eine deutlich reduzierte Gefäßwandveränderungen. Die Mechanismen sind bisher nur unzureichend verstanden, es ist aber durchaus möglich, dass FTY 720 auch über die in dieser Arbeit gezeigten Mechanismen seine Wirkung entfaltet.

5 Zusammenfassung / Abstract

Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems, die in verschiedenen Stadien über Jahre bis Jahrzehnte fortschreitet und sich in Form von koronaren Infarkten, Apoplex, pAVK oder Mesenterialinfarkt klinisch manifestiert. Sie ist häufigste Ursache für Tod und Behinderung in den westlichen Industriestaaten. Neben einer Reihe gesicherter Risikofaktoren konnte in den letzten Jahren die Bedeutung inflammatorischer Prozesse als Ursache sklerotischer Gefäßveränderungen nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung, wie HDL und sein assoziiertes Sphingosin-1-Phosphat antiinflammatorische Signalwege im Rahmen der Atherosklerose beeinflussen.

MATERIAL UND METHODEN: Es wurde die Expression der im Rahmen der Atherosklerose beteiligten proinflammatorischen Gene iNOS, MMP9 und sPLA2 überprüft. Untersuchungsmaterial waren glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs), die aus der thorakalen Aorta von Wistar-Kyoto-Ratten gewonnen wurden. Nach Inkubation mit pro- und antiinflammatorischen Testsubstanzen (nach etablierten Arbeitsschritten) erfolgten RNA-Isolierung, reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Expressionsbestimmung der untersuchten Gene.

ERGEBNISSE: HDL und das assoziierte Sphingosin-1-Phosphat waren in der Lage, die Expression der proinflammatorischen Gene iNOS, sPLA2 und MMP9 signifikant zu hemmen. Die Blockierung des S1P3-Rezeptors durch das Einschleusen von siRNA hob die antiinflammatorischen Effekte des S1P und der HDL auf. Bei Inkubation mit verschiedenen Antagonisten und Agonisten der S1P-Rezeptorsystems zeigte sich, dass die Beeinflussung der S1P-Rezeptoren1 und -2 die antiinflammatorischen Wirkungen von HDL und S1P nicht verändern. Die Antagonisierung des S1P3-Rezeptors hingegen hob die antiinflammatorische Wirkung von HDL und S1P auf, die Stimulierung des S1P3-Rezeptors mit dem selektiven Agonisten FTY 720 vermittelte eine signifikante Hemmung der Expression proinflammatorischer Gene.

SCHLUSSFOLGERUNG: Es konnte gezeigt werden, dass HDL und seine Komponente S1P die Induktion der proinflammatorischen Enzyme iNOS, MMP9 und sPLA2 über S1P-Rezeptoren hemmen, wobei der Subtyp S1P3-Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt. Somit sind HDL auch in späten Stadien der Atherosklerose skleroprotektiv wirksam. Weitere Untersuchungen müssen nun klären, inwieweit die untersuchten Mechanismen auch in vivo wirksam sind. In ersten Untersuchungen an Mäusen deutet sich jedoch bereits an, dass der S1P3-Rezeptoragonist FTY 720 die Atheroskleroseeigung deutlich reduziert.

Abstract

BACKGROUND: Atherosclerosis is known as an inflammatory disease of the arterial vessel system which develops in several stadiums for years. The clinical manifestation is possible as infarction of the heart, of the brain, of the gastrointestinal system or of extremities. Today atherosclerosis is the main reason for death and disability in the western world. There are a lot of well known risk factors but in the last years chronic inflammatory processes of the arterial wall were identified to play a key role in the development of atherosclerosis. With this dissertation we will show how HDL and it's associated Sphingosine-1-Phosphate influence anti-inflammatory pathways in atherosclerosis.

MATERIALS AND METHODS: We examined the expression of pro-inflammatory genes, such as iNOS, MMP9 and sPLA2. We used vascular smooth muscle cells (VSMCs) from the thoracic aorta of Wistar-Kyoto-rats. After incubation with test solutions RNA was isolated, then cDNA was synthesized by reverse Transcription and amplified by Polymerase chain reaction (PCR) to identify the expression of the examined genes.

RESULTS: HDL and the associated Sphingosine-1-Phosphate were able to decrease the expression of the pro-inflammatory genes of iNOS, MMP9 and sPLA2 significant. The inhibiting of the S1P3-Receptor by using siRNA blocked the anti-inflammatory effects of HDL and the associated S1P.

Using agonists and antagonists of the S1P1- and S1P2-receptors had no effect on the anti-inflammatory effects of HDL and S1P but an antagonized S1P3-receptor inhibited the anti-inflammatory effects. Stimulation by the S1P3-selective Agonist FTY 720 decreased the expression of pro-inflammatory genes significant.

CONCLUSIONS: It was possible to prove, that HDL and the associated Sphingosine-1-Phosphate inhibited the induction of pro-inflammatory genes such as iNOS, MMP9 and sPLA2 via S1P3-receptor. That suggests that HDL has a protective role even in later stadiums of atherosclerosis. Further examinations now have to prove these results in vivo. First tests showed a decreased rate of atherosclerosis in FTY 720 – treated mice.

6 Literaturliste

Albu J, Gottlieb SH, August P, Nesto RW, Orchard TJ. Modifications of coronary risk factors. *Am J Cardiol* 2006;47:41-52

Adler AI, Stevens RJ, Neil A, Stratton IM, Boulton AJM, Holman RR and UK Prospective Diabetes Study Group. UKPDS 59 hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:894-9

Armstrong ML, Heistad DD, Marcus ML, Megan MB, Piegors DJ. Structural and hemodynamic response of peripheral arteries of macaque monkeys to atherogenic diet. *Arteriosclerosis* 1985;5:336-46

Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1792-8

Assmann G, Gotto AM Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III8-III14

Baek SH, Kwon TK, Lin JH et al. Secretory phospholipase A2-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. *J Immunol* 2000;164:6359-65

Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:285-8

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424 –C1437

Benaud C, et al. Sphingosine-1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 2002;277:10539-46

Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Cell Biol* 1995;7:728-735

Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:185-97

Blades B, Vega GL Grundy SM. Activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1227-35

Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med* 1997; 3:600-1

Braunwald E. Shattuck Lecture – cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concern, and opportunities. *N Engl J Med* 1997;337:1360-9

Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kd gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995;91:2125-31

Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY 720 targets the sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 2002;277:21453-7

Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br J Pharmacol* 1995;114:1490 –1494

Carmilet P, Collen D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 1998;91:255-85

Chobanian AV, Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In:Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary artery disease. Vol.1. Philadelphia:Lippincott-Raven,1996:237-42

Chesler N, Ku D, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 1999;277:H2002-H2009

Chapman, MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacology and Therapeutics* 2006;111:893-908

Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-Arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992;90:1248 –1253

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997;350:430-6

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993;69:377-381

Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary lesions in sudden ischemic death. *N Engl J Med* 1984;310:1137-40

Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994;107:1050 –1058

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60 –68

de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992;85:2284 –2290

Dietel M, Suttorp N, Zeitz M et al. *Harrisons Innere Medizin*. 16. Auflage 2005. ABW Wissenschaftsverlag. Band 2. 1582-602.

Draijer R, Atsma DE, van der Laarse A, van Hinsbergh VW. cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability: regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:199 –208

English D, Welch Z, Kovals AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN, Garcia JG. Sphingosine-1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J* 2000;14:2255-65

Falk E, Shah PK, Fuster V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:492-510

Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1145-51

Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett* 1996;381:21-24

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-503

Galis, ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a

complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994;75:181-9

Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1652-1659

Genest J Jr, Marcil M, et al. High density lipoproteins in health and disease. *Investig Med* 1999;47:31-42

Gibbons GH Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994;330:1431-8

Gimbrone, MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 67B-70B

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5

Gottlieb AI, Labgille BL. The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease. In: Fuster V, Ross R, Topol BJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 595-606

Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000;102:2861-6

Gosh TK, Bian J, Gill DL. Sphingosine-1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem* 1994;269:22628-35

Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997;96:3264-5

Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 1997;272:21654-9

Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976;58:731-41

Hajjar KA. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. *J Clin Invest* 1993;91:2873-9

Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 1990;136:23-8

Hack CE, Wolbink GJ, Schalwijk C et al. A role for secretory phospholipase A2 and C-reactive protein in the removal of injured cells. *Immunol Today* 1997;18:111-5

Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, Siqueira H, Torri AF, Tytler EM, et al. Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264:5210-7

Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4963-71

Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 2002;277:25487-850

Horton DB, Libby P, Schonbeck U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:329-36..

Idzko M, Laut M, Panther E, Sorichter S, Dürk T, Fluhr JW, Herouy Y, Mockenhaupt M, Myrtek D, Elsner P, Norgauer J. Lysophosphatidic acid induces chemotaxis, oxygen radical production, CD11b up-regulation, Ca²⁺ mobilization, and actin reorganization in human eosinophils via pertussis-toxin-sensitive G proteins. *J Immunol.* 2004; 172(7):4480-5

Igarashi J, Bernier SG, Michel T. Sphingosine-1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase: differential regulation of AKT and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:12420-6

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;6:131-8

Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, et al. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 1997;150:1785-90

Jaross W, ecky R, Menschikowski M. Biological effects of secretory phospholipase A2 group IIA on lipoproteins and in atherogenesis. *Eur J Clin Invest* 2002;32:383-93

Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL et al. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem* 1999;274:33398-402

Khoo JC, Miller E, McLoughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988;8:348-58

Klatt P, Schmidt K, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Mayer B. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J* 1995;14:3687–3695

Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP, Werner ER, Schmidt K, Mayer B. Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role

for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem* 1996;271:7336–7342

Kontush A, de Faria EC, Chantepine S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis* 2005;182:277-85

Kuhlen cordt PJ, Chen J, Han Fastern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E–knockout mice. *Circulation* 2001;103:3099-3104.

Krozon I, Tunick PA. Aortic atherosclerotic disease and stroke. *Circulation* 2006; 114:63-75

Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, et al. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 1997;38:191-205

Kupperman E, An S, Osborne N, Waldron S, Stainier DY. A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* 2000;406:192-5

Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Aw TY, Specian RD, Granger DN. Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production: role of active oxidants. *Circ Res* 1995;76:30–39

Kuwata H, Sawada H, Murakami M et al. Role of type IIA secretory phospholipase A2 in arachidonic acid metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1999;469:183-8

Lambeau G, Ancian P, Barhanin J et al. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994;269:1575-8

Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J, Lefer AM. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997;99:684–691

Lefer AM, Ma XL, Weyrich A, et al. Endothelial dysfunction and neutrophil adherence as critical events in the development of reperfusion injury. *Agents Actions Suppl* 1993;41:127–135

Leitinger N, Watson AD, Hama SY, et al. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 2. Potential involvement of biologically active oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1291-8

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43

Libby P, Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia:Lippincott-Raven,1996:585-94

Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997;96:4095-103

Li Z, Li L Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow Mt, Stetler-Stevenson Wg, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1996;148:121-8

Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002;71:493-511

Liu H, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000;106:951-61

Liu S, Beckman JS, Ku DD. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:1114–1121

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8

MacMicking J, Xie QW, Nathan C., Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50.

Mattie M, Brooker G, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol triphosphate-independent pathway. *J Biol Chem* 1994;269:3181-8

Mathes C, Fleig A, Penner R. Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. *J Biol Chem* 1998;273:25020-30

Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002;296:346-9

McGill HC Jr, McMahan A, Zieske AW, Gray TM, Tracy RE, Strong JP. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation* 2001;103:1546

Mc Millan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228-32

Menschikowski M, Kasper M, Lattke P et al. Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1995;118:173-81

Melendez AJ, Khaw AK. Dichotomy of Ca-signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J Biol Chem* 2002;277:17255-62

Meyer zu Heringdorf D, et al. Role of sphingosine kinase in Ca signalling by epidermal growth factor receptors. *FEBS Lett* 1999;461:217-22

Miyoshi T, Li Y, Shih DM, Wang X, Laubach VE, Matsumoto AH, Helm GA, Lusis AJ, Shi W. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* 2006;79(6):525-31.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-90

Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, et al. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:481-8

Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991;88:2039-46

Nehler MR, Taylor LM J, Porter JM. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Surg* 1997;6:559-67

Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol.* 2006;17(5):556-61.

Niessen HWM, Krijnen PAJ, Visser CA, Meijer CJLM, Hack CE. Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes?. *Cardiovasc Res* 2003;60:68-77

Newman KM, Malon AM, Shin, RD, Scholes JV, Ramey WG, Tilson MD. matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysm: characterization, purification, and their possible sources. *Connect Tissue Res* 1994; 30:265-276

Neuzil J, Upston JM, Witting PK et al. Secretory phospholipase A2 and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in low-density lipoproteins. *Biochemistry* 1998;37:9203-10

Nijmeijer R, Lagrand WK, Baidoshvili A et al. Secretory type II phospholipase A2 binds to ischemic myocardium during acute myocardial infarction in humans. *Cardiovasc Res* 2002;53:138-46

Ng DS, Vezina C, Wolever TS, et al. Apolipoprotein A-I deficiency biochemical and metabolic characteristics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2157-64

Nofer JR, van der Giet M, Toelle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Goedecke A, Ihii I, Kleuser B, Schaeffers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004;113:569-81

Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, Igarashi Y. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. *J Biol Chem* 2003;278:1268-72

Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Haudenschild CC, Clarijs RJ, Becker AF, Hillen B, Borst C. Relation of arterial geometry to luminal narrowing and histologic markers for plaque vulnerability: the remodeling paradox. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:655-62

Paik JH, Chae S, Lee MJ, Thangada S, Hia T. Sphingosine-1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of $\alpha\beta3$ - and $\beta1$ -containing integrins. *J Biol Chem* 2001;276:11830-11827

Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2995-8

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991, 1;288(2):481-7.

Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.1. Philadelphia: Lippincott-Raven,1996:539-55

Reynolds HR, Tinick PA, Benenstein RJ, Nakra NC, Shah A, Spevack DM, Krozon I. Severe renal artery stenosis is common in patients with severe thoracic aortic plaque. *Am J Cardiol*. 2004;94:844-46

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. *J Clin Invest* 1996;98:2572-9

Ross, R. „Atherosclerosis – An inflammatory disease.“ *N Engl J Med* 1999;340(2): 115-126

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis —an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500

Rosengreen B, Peilot H, Umaerus M, Jonsson-Rylander AC, Mattsson-Hulten L, Hallberg C, Cronet Prodriguez-Lee M, Hurt-Camejo E. Secretory phospholipase A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1579-85

Sachais, BS. Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3:412-6

Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, Rosen H. Sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem* 2004;279:13839-48

Schwemmer M, Aho H, Michel JB. Interleukin-1-beta-induced type IIA secreted phospholipase A2 gene expression and extracellular activity in rat vascular endothelial cells. *Tissue Cell* 2001;33:233-40

Shah PK, Falk E, Badimon J, Fernandez-Ortiz AF, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 1995;92:1565-9

Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1986;123:109-25

Six DA, Denis EA. The expanding superfamily of phospholipases A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:1-19

Snitko Y, Yoon ET, Cho W. High specificity of human secretory class II phospholipase A2 for phosphatidic acid. *Biochem J* 1997;321:737-41

Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999;144:285-301

Sary HC. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:463-74

Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions

of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462-78

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-6.

Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:17489-94

Strong JP, Richards ML. Cigarette smoking and atherosclerosis in autopsied men. *Atherosclerosis*. 1976;23:451-476

Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells.

J Lipid Mediat Cell Signal. 1996;13(1):73-88.

Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. *Nat Rev* 2003;4:397-407

Tato F, Vega GL, Grundy SM. Bimodal distribution of cholesteryl ester transfer protein activities in normotriglyceridemic men with low HDL cholesterol concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:446-51

Tatulian SA. Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation. *Biophys J* 2001;80:789-800

Takuwa Y. Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2002;1582:112-120

Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 1996;800:157-174

Thudicum JLWA. Treatise on the chemical constitution of brain. 149 (Balliere, Tindall and Cox,1884

Tietge UJ, Pratico D, Ding T, Funk CD, Hildebrand RB, Van Berkel T, Van Eck M. Macrophage-specific expression of group IIA sPLA2 results in accelerated atherogenesis by increasing oxidative stress. *J Lipid Res.* 2005;46(8):1604-14.

Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: Interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:e120-e126

Tietge UJ, Maugeais C, Lund-Katz S et al. Human secretory phospholipase A2 mediates decreased plasma levels of HDL cholesterol and apoA-1 in response to inflammation in human apoA-1 transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1213-18

Toelle M, Levkau B, Keul P, Brinkmann V, Giebing G, Schoenfelder G, Schaefers M, von Wnuck Lipinski K, Jankowski J, Jankowski V, Chun J, Zidek W, van der Giet M. Immunomodulator FTY 720 induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res* 2005;96:913-20

Toelle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(8):1542-8.

Turner RC, Millns H, Neil HAW, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR, and United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS:23). *BMJ*1998;316:823-28

Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012-7

van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989;61:166-70

Vadas P, Stefanski E, Grouix B et al. Inhibition of human group II phospholipase A2 by C-reactive protein in vitro. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;11:187-200

Von Eckstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol?. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:627-37

Wever, RMF, Thomas F. Lüscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998;97:108-112

Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2479 –2488

Weissberg PL. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*. 2000;83(2):247-52.

Wang F, et al. Sphingosine-1-phosphate stimulates cell migration through a Gi-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:35343-50

Xu CB, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 2004;25(7):849-54

Yatomi Y, Ruan FQ, Hakomori SI, Igarashi Y. Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood* 1995;86:193-202

Zorina S. Galis, Jaikirshan J. Khatri. Matrix Metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, the ugly. *Circulation research* 2002;90:251

Zempo N, Kenagy RD, Au YPD, Bendeck M, Clowes MM, Reidy MA, Clowes AW. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg* 1994;20:209-17

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich danke allen, die an der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben:

Prof. Dr. M. van der Giet für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Einarbeitung und Betreuung, für Anregungen, Kritik und Ansporn sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Prof. Dr. W. Zidek für die Möglichkeit, in den Laborräumen und mit den Materialien der Klinik die Versuche durchzuführen.

Dr. med. M. Tölle für die gute Einarbeitung und Betreuung, für diverse Problemlösungen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mirjam Schuchardt für die gute Zusammenarbeit während der Versuche und für die Unterstützung während der Materialrecherche.

meinen Eltern für die Unterstützung, ohne die ich das Studium und diese Arbeit niemals hätte durchführen können.

Julia Zickler für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die moralische Unterstützung.

Erklärung

„Ich, Sönke Labza, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Der Einfluss von HDL und dem HDL-assoziierten Sphingosin-1-Phosphat auf proinflammatorische Signalwege* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift