

Aus der Klinik für Nephrologie, Endokrinologie und
Transplantationsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung des Lysophospholipids Lysosulfatid als Bestandteil
des HDL auf die Aktivierung der NO-Synthase

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Schwarz

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis	2
3	Abstrakt	4
4	Einleitung	6
4.1	Endothel.....	6
4.1.1	NO und NO-Synthasen.....	7
4.1.2	Endotheliale Dysfunktion.....	8
4.2	Atherosklerose	10
4.3	Lipoproteine.....	12
4.4	HDL	13
4.4.1	HDL und reverser Cholesterintransport	14
4.4.2	Antiinflammatorische Wirkung.....	15
4.4.3	Wirkung auf endotheliale Funktionen.....	15
4.4.4	Antioxidative Wirkung.....	16
4.5	HDL-assoziierte Lysophospholipide	16
4.5.1	S1P	17
4.5.2	SPC.....	18
4.5.3	LSF	18
4.6	S1P Rezeptoren.....	19
4.7	SPC Rezeptoren	20
4.8	Fragestellung	21
5	Material und Methoden	22
5.1	Material.....	22
5.1.1	Versuchstiere.....	22
5.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	22

5.1.3	Physiologische Tyrode-Lösung für den Kleingefäßmyographen.....	23
5.1.4	Laborgeräte.....	24
5.1.5	Verbrauchsmaterial	25
5.1.6	Software	25
5.2	Methoden.....	26
5.2.1	Präparation der bei den Versuchen verwendeten thorakalen Aorten	26
5.2.2	Kleingefäßmyograph.....	26
5.2.3	Aufbau des Kleingefäßmyographen.....	27
5.2.4	Festlegung des inneren Gefäßumfangs der Gefäßringpräparate	29
5.2.5	Eichung des Kraftmessers	30
5.2.6	Versuchsdurchführung	30
5.2.6.1	Kontrolle der Gefäßvitalität	30
5.2.6.2	Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse.....	31
5.2.6.3	Hemmung der eNOS durch L-Name	31
5.2.6.4	Chemische Deendothelialisierung durch Saponin	32
5.2.7	Statistik.....	32
6	Ergebnisse	33
6.1	Dosisabhängige Vasokonstriktion an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Phenylephrin.....	33
6.2	Dosisabhängige Vasodilatation an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Acetylcholin	34
6.3	Dosisabhängige Vasodilatation an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Natriumnitroprussid	35
6.4	Wirkung von SNP und Ach auf den Gefäßtonus der Aorten von Wistar-Kyoto Ratten nach Applikation von PE und L-Name	36
6.5	Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von C57BL/6- Mäusen, eNOS- und S1P ₃ -defizienten Mäusen	37

6.5.1	Dosisabhängige Vasodilatation von Ach und SNP an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen	38
6.5.2	Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von eNOS-defizienten Mäusen	39
6.5.3	Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von S1P ₃ -defizienten Mäusen	40
6.6	Vasodilatation an den Aorten von C57BL/6-Mäusen durch LSF	41
6.7	Ach und LSF vermittelte Effekte auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen mit und ohne Deendothelialisierung/Applikation von L-Name	42
6.8	Dosisabhängiger Effekt von LSF auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen sowie eNOS- und S1P ₃ - defizienten Mäusen	43
6.9	Dosisabhängige Vasokonstriktion von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P ₃ -defizienten Mäusen	45
7	Diskussion	47
8	Literaturverzeichnis	51
9	Eidesstattliche Versicherung	62
10	Lebenslauf	63
11	Danksagung	64

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: abgebildet ist die Versuchsanordnung eines Kleingefäßmyographen	28
Abbildung 2: Nicht kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Phenylephrin.....	33
Abbildung 3: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Acetylcholin	34
Abbildung 4: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Natriumnitroprussid.....	35
Abbildung 5: Effekte auf den Gefäßtonus durch SNP und Ach an durch PE vorkontrahierten und mit L-Name behandelten Aorten.	36
Abbildung 6 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an C57BL/6- Mäusen.....	38
Abbildung 7 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an eNOS- defizienten Mäusen.....	39
Abbildung 8 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an S1P₃- defizienten Mäusen.....	40
Abbildung 9: Vasodilatation thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen durch LSF.	41
Abbildung 10: Effekte auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen durch Ach und LSF mit und ohne Deendothelialisierung/L-Name Applikation.	42
Abbildung 11: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen (S1P₃ +/+), eNOS- und S1P₃-defizienten Mäusen.....	44
Abbildung 12: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P₃-defizienten Mäusen, welche sich bei Versuchsbeginn in einem basalen Gefäßtonus befanden.	46

2 Abkürzungsverzeichnis

ABC-A1	englisch: ATP-binding cassette transporter A1
ACE	englisch: angiotensin-converting enzyme
Ach	Acetylcholin
ADMA	englisch: asymmetric dimethylarginine
AKT-Kinase	Proteinkinase B
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CETP	englisch: cholesteryl ester transfer protein
COX-2	Cyclooxygenase-2
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
EDG	englisch: endothelial differentiation gene
EDHF	englisch: endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	englisch: endothelium-derived relaxing factor
HDL	english: high density lipoprotein
HL	hepatische Lipase
IC	internal circumference
ICAM-1	englisch: intercellular adhesion molecule-1
IDL	intermediate-density lipoprotein
IUPHAR	englisch: international union of pharmacology
INF	Interferon
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	englisch: low density lipoprotein
ox LDL	oxidierte Form des LDL
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LPL	Lysophospholipide
LPS	Lipopolysaccharid
LSF	Lysosulfatid
MAP Kinase	mitogen-activated protein Kinase
MCP-1	englisch: monocyte chemotactic protein 1
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NO	englisch: Nitric oxide, deutsch: Stickstoffmonoxid
NOS	englisch: Nitric oxide synthase
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
OGR1	ovarian cancer G protein-coupled receptor 1
PAF	englisch: platelet-activating factor
PAF-AH	englisch: platelet-activating factor acetylhydrolase
PDGF	englisch: platelet-derived growth factor
PE	Phenylephrin
PECAM-1	englisch: platelet endothelial cellular adhesion molecule-1
PEF	englisch: platelet-endothelial factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI-PLC	Phosphatidylinositolspezifische-Phospholipase C
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
ROS	englisch: reactive oxygen species
RCT	reverser Cholesterintransport
SR-BI	scavenger receptor class B, Type I
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SNP	Natriumnitroprussid
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
TK	Tyrosinkinase
TNF- α	englisch: tumor necrosis factor α
TGF- β	englisch: transforming growth factor β
VCAM-1	englisch: vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	englisch: very low density lipoprotein

3 Abstrakt

Einleitung: Herz-Kreislaufkrankungen stellen noch immer die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Auf der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten befasst sich die Forschung seit vielen Jahren intensiv mit den Ursachen atherosklerotischer Gefäßveränderungen. Einen zentralen Schritt stellt hierbei die funktionelle Beeinträchtigung des Endothels (endotheliale Dysfunktion) dar, welche mit einem zunehmenden Verlust vasoprotektiver Mechanismen einhergeht. Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO spielt hierbei eine Schlüsselrolle. Die NO Synthese erfolgt mittels der NO-Synthase, deren Aktivität unter anderem durch Lipoproteine hoher Dichte (HDL) reguliert wird.

Methode: Mit Hilfe des Kleingefäßmyographen wurden Versuche an den thorakalen Aorten von Ratten und verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt. In den Versuchsreihen wurde die Wirkung unterschiedlicher vasoaktiver Substanzen auf den Gefäßtonus untersucht. Hierbei wurde der Fokus insbesondere auf die Effekte des Lysophospholipids Lysosulfatid, als bioaktivem Bestandteil des HDL, gelegt.

Ergebnisse: In den Versuchen am Kleingefäßmyographen zeigte sich, dass LSF bei vokontrahierten Gefäßen einen vasodilatierenden Effekt vermittelt. Im Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass LSF als Ligand am $S1P_3$ Rezeptor fungiert und darüber zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase führt. Über die Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit ist Lysosulfatid in der Lage, gefäßschützende und somit atheroprotektive Effekte zu vermitteln.

Schlussfolgerung: Auf der Suche nach neuen Möglichkeiten zur Behandlung der endothelialen Dysfunktion und atherosklerotischer Gefäßveränderungen, stellt LSF einen interessanten neuen Therapieansatz dar.

Introduction: Cardiovascular disease remains the leading cause of death in Germany. There has been intense research for many years into the causes of atherosclerotic vascular changes to identify new therapeutic strategies. Endothelial dysfunction has played a central role in prior investigations due to its importance in the loss of vasoprotective mechanisms. The decreased bioavailability of NO (nitric oxide) plays a key role in this process. The synthesis of NO occurs with the help of NO-synthase, which is regulated, among others, by HDL (high-density lipoprotein).

Method: With the help of the small vessel myograph, experiments were performed on the thoracic aortas of rats and different mice species. The effect of different vasoactive substances on

vessel tone was analyzed during the experiments. Special focus was given to the effects of lysophospholipid lysosulfatide (LSF) which is a bioactive component of HDL.

Results: The experiments with the small vessel myograph showed that LSF has a vasodilative effect on vasoconstricted vessels. Furthermore, it could be demonstrated that LSF activates the endothelial NO-synthase when binding to the S1P₃ receptor. LSF is able to elicit vascularprotective effects via the increase of NO-bioavailability.

Conclusion: In the search for new strategies for the treatment of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular changes, LSF illustrates an interesting new therapeutic approach.

4 Einleitung

4.1 Endothel

Das Endothel, welches als einlagige Zellschicht eine Barriere zwischen zirkulierendem Blut und der Gefäßwand darstellt, vermittelt durch die Produktion verschiedenster Mediatoren eine Vielzahl wichtiger homöostatischer Funktionen: Es reguliert als Barriere den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe, verhindert die Adhäsion von Blutzellen, reguliert den Gefäßtonus und verhindert die Proliferation glatter Muskelzellen¹. Endothelzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßradius durch die Produktion vasodilatierender (NO, Prostacyclin, EDHF) und vasokonstriktorischer (Endothelin-1, Angiotensin II) Mediatoren. Die endotheliale NO-Synthase produziert aus L-Arginin Stickstoffmonoxid. NO wirkt vasodilatierend, hemmt die Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen². Prostacyclin, welches im Endothel bei der Metabolisierung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase entsteht, wirkt vasodilatierend durch Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen und hemmt darüber hinaus die Thrombozytenaggregation³. Einen weiteren potenten Vasodilatator stellt der endotheliale hyperpolarisierende Faktor (EDHF) dar. EDHF wird von Endothelzellen als Reaktion auf Acetylcholin, Bradykinin, Histamin und Substanz P gebildet. Es stimuliert kalziumaktivierte Kaliumkanäle in den glatten Gefäßmuskelzellen und ist in der Lage, eine verringerte NO-Produktion des Endothels zu kompensieren⁴. Thrombomodulin dient der Hemmung der Blutgerinnung. Es ist ein transmembraner Rezeptor, welcher von Endothelzellen exprimiert wird und Thrombin bindet. Thrombin wird durch Modifikation inaktiviert, ist jedoch weiterhin in der Lage, Protein C zu aktivieren, welches Faktor Va und VIIIa der Gerinnung inaktiviert⁵⁻⁶. Um den Gefäßtonus zu regulieren, produziert das Endothel neben den zuvor genannten vasodilatierenden Substanzen auch vasokonstriktorisches wirkende Mediatoren. Endothelin-1 entfaltet seine Wirkung an den glatten Gefäßmuskelzellen und induziert konzentrationsabhängig eine hochwirksame langanhaltende Vasokonstriktion. Es wird kontinuierlich in geringer Menge gebildet und durch NO suprimiert, bzw. Thrombozytenaggregation stimuliert⁷. Das Endothel exprimiert Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE), welches Angiotensin I in das vasokonstriktorisches wirkende Angiotensin II umwandelt⁸. Unter physiologischen Bedingungen produzieren Endothelzellen vorwiegend vasoaktive Substanzen mit vasodilatierender Wirkung. Den wichtigsten Mediator stellt hierbei das Stickstoffmonoxid dar. Unter pathologischen

Bedingungen, die mit der Beeinträchtigung endothelialer Funktionen einhergehen, scheint die Bildung vasokonstriktorischer Mediatoren zu überwiegen⁹.

4.1.1 NO und NO-Synthasen

Furchgott und Zawadzki entdeckten 1980 bei Versuchen an Aortenringen eine vom Endothel gebildete Substanz mit vasodilatierenden Eigenschaften. Sie bezeichneten diese Substanz als endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF)¹⁰. Einige Jahre später konnte EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden¹¹. NO ist ein gasförmiges freies Radikal, welches ein ungepaartes Elektron besitzt und Reaktionen mit zahlreichen Molekülen eingehen kann. Es ist lipophil und wirkt sowohl oxidativ, als auch reduktiv¹². NO hat eine biologische Halbwertszeit von 2-5 Sekunden¹³. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der vaskulären Homöostase. Indem das synthetisierte NO in glatte Muskelzellen diffundiert und dort die Guanylatcyclase aktiviert, induziert es durch das Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und trägt auf diesem Wege entscheidend zur Regulation des Gefäßtonus und Blutdrucks bei¹⁴. NO hemmt die Thrombozytenaktivierung¹⁵ und die Adhäsion von Entzündungszellen an der Gefäßwand durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen¹⁶. Zudem inhibiert es die Migration glatter Muskelzellen und deren Proliferation in der Gefäßwand¹⁷.

Da NO ein hoch reaktives Molekül darstellt, das durch Membranen diffundieren und deshalb nicht am Produktionsort gespeichert werden kann, unterliegt die Synthese komplexen Regulationsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen¹⁸. NO wird von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Hierbei lassen sich drei Isoformen unterscheiden: die konstitutive endotheliale NO-Synthase (eNOS), die konstitutive neuronale NO-Synthase (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS)¹⁹. Die iNOS, welche sich unter anderem in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen befindet, wird durch proinflammatorische Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide stimuliert und produziert unter pathologischen Bedingungen hohe zytotoxische Konzentrationen an NO. Unter physiologischen Bedingungen wird NO im Endothel hauptsächlich durch die eNOS in nicht zellschädigenden Konzentrationen produziert²⁰⁻²¹. Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase erfolgt durch unterschiedliche physikalische und biochemische Einflüsse. Hierzu gehören unter anderem Thrombin, Serotonin, Acetylcholin und Scherkräfte²². Die Funktion der eNOS wird neben den oben genannten Faktoren unter anderem auch von Lipoproteinen reguliert, welche zudem die Lokalisation der eNOS beeinflussen²³. Caveolae sind Invaginationen der

Plasmamembran, die sich besonders zahlreich in Endothel-, Muskel- und Fettzellen finden. Die Membran der Caveolae enthält Lipide (Cholesterin, Glykosphingolipide) und Proteine. Dabei stellt Caveolin das wichtigste Strukturprotein dar. Caveolae scheinen durch die Anreicherung von Signalproteinen sowie verschiedenen Transportern und Kanälen mit unterschiedlichen Mechanismen der Signalübertragung in Zusammenhang zu stehen²⁴. Die endotheliale NO-Synthase ist in Endothelzellen bevorzugt in Caveolae lokalisiert und im Grundzustand an Caveolin 1 gekoppelt. Die Bindung an Caveolin führt zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität. Die Bindung der eNOS an Caveolin kann aufgehoben und die eNOS aktiviert werden über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und Bildung von Calcium-Calmodulin sowie die Phosphorylierung der eNOS mittels einer Kinase Signalkaskade, welche in den folgenden Kapiteln noch eingehender beschrieben wird^{25,26,27,28}. Oxidiertes LDL nimmt Cholesterin aus den Caveolae endothelialer Zellen mittels des scavenger Rezeptor CD 36 auf, induziert die Verlagerung der eNOS aus den Caveolae und beeinträchtigt somit die eNOS Aktivierung und folgend die endotheliale NO Bildung²⁹⁻³⁰. Dieser Prozess könnte bei Dyslipidämien eine wichtige Rolle in der Genese der endothelialen Dysfunktion spielen. HDL kann den Prozess, der durch oxLDL induzierten Verminderung der Caveolae assoziierten Cholesterin-Konzentration, über die Bereitstellung von Cholesterinestern an die Caveolae entgegensteuern und somit den Verlust der eNOS aus diesem Kompartiment verhindern. Die Lokalisation und Funktion der eNOS in der Domäne kann also durch die Anwesenheit von HDL aufrechterhalten werden³¹.

Die endotheliale NO Produktion stellt einen entscheidenden Mechanismus in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase dar. Über eine Vielzahl vasoprotektiver Funktionen schützt NO das Gefäß vor pathologischen Veränderungen. Eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO, als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion, stellt einen bedeutsamen Mechanismus in der Genese früher Atherosklerosestadien dar³².

4.1.2 Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose³³. Verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Nikotinkonsum und arterieller Hypertonus sind assoziiert mit einer Funktionsstörung des Endothels³⁴. Die physikalische oder biochemische Beschädigung des Endothels beeinträchtigt dessen homöostatische Funktion und auf diesem Wege die Gesundheit des Gefäßes. Der Verlust der

regulatorischen Aufgaben des Endothels äußert sich in der gesteigerten Bildung vasokonstriktorischer Substanzen, einer zunehmenden Thrombozytenaktivierung, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und in verstärkt ablaufenden inflammatorischen Prozessen³⁵. Endothelzellen übernehmen eine bedeutende Rolle für den Ablauf immunologischer Reaktionen. Bei inflammatorischen Prozessen wird das Endothel durch die Anwesenheit von Endotoxinen und Zytokinen, wie Interferon- γ , Interleukin- β und Tumornekrosefaktor- α aktiviert, spezifische Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1) und Selektine zu exprimieren. Diese ermöglichen die Adhäsion und Migration von Entzündungszellen durch das Endothel³⁶.

Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und zunehmenden oxidativen Stress durch die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Produktion von ROS, vorzugsweise von Superoxidanion (O_2^-), erfolgt hauptsächlich mit Hilfe der NADPH-Oxidase, welche in Endothelzellen und glatten Muskelzellen als Reaktion auf Angiotensin II, Tumornekrosefaktor- α oder erhöhten mechanischen Stress, aktiviert wird^{37,38,39}. Eine weitere wichtige Quelle für die ROS Produktion stellt das Enzym Xanthin Oxidase dar⁴⁰. Die Akkumulation von Sauerstoffradikalen führt zu einer Veränderung zellulärer Strukturen und Funktionen. Es kommt zur Schädigung von Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und DNA und letztendlich zum Verlust der endothelialen Intaktheit⁴¹. Der Einfluss von ROS auf die oxidative Modifikation von Lipoproteinen ist hinsichtlich der Atheroskleroseentwicklung von großer Bedeutung. Oxidiertes LDL (oxLDL) stellt ein wichtiges Substrat in der Genese atherosklerotischer Veränderungen dar⁴². Die absinkende Bioverfügbarkeit von NO kommt durch unterschiedliche Mechanismen zustande. Neben der verminderten Expression der eNOS⁴³ kann sich bei Substratmangel der strukturelle Aufbau der eNOS ändern. Dies wird als Entkopplung bezeichnet. Es resultiert eine Funktionsstörung, bei welcher bevorzugt ROS anstatt NO synthetisiert wird⁴⁴. Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) stellt einen kompetitiven Inhibitor der eNOS dar. Der ADMA Spiegel im Blutplasma korreliert mit dem Schweregrad der endothelialen Dysfunktion⁴⁵. Durch die Interaktion mit ROS, insbesondere Superoxid, wird NO oxidativ modifiziert und dadurch inaktiviert⁴⁶. Darüber hinaus ist auch oxidiertes LDL in der Lage, NO zu inaktivieren⁴⁷. Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO führt zu einer Dysregulation des Gefäßtonus. Während Acetylcholin bei gesunden Patienten in Koronargefäßen eine NO vermittelte Vasodilatation induziert, kommt es bei atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßen zu einer vasokonstriktorisches Reaktion⁴⁸.

Die Gesamtheit der für die endotheliale Dysfunktion charakteristischen pathologischen Prozesse, führt zu einem Verlust der protektiven Mechanismen der Gefäßwand und kann den Beginn atherosklerotischer Veränderungen darstellen.

4.2 Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine inflammatorische Erkrankung der Arterien. In Anlehnung an die mehrfach modifizierte „response to injury“ Hypothese von Ross geht man von der Annahme aus, dass eine Beeinträchtigung endothelialer Funktionen zur Entwicklung von Atherosklerose führt⁴⁹.

Unterschiedliche Mechanismen spielen hierbei eine Rolle: Es kommt zur Einwanderung und Akkumulation von Lipoproteinen und Plasmamolekülen in die Intima. Die subendotheliale LDL-Konzentration ist proportional zur Serumkonzentration⁵⁰. Die Ansammlung und chemische Modifikation von LDL in der Arterienwand stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese atherosklerotischer Plaques dar. LDL wird oxidiert und wirkt nun in gesteigertem Maße zytotoxisch, chemotaktisch und proinflammatorisch⁵¹. Das auf diesem Wege durch proinflammatorische Mediatoren aktivierte Endothel exprimiert verstärkt Adhäsionsmoleküle, um Entzündungszellen zur atherosklerotischen Läsion zu rekrutieren⁵². Die dazu gehörenden Selektine sind Glykoproteine, die sich in Gruppen einteilen lassen. L-Selektine werden von Leukozyten, E-Selektine von Endothelzellen und P-Selektine von Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Durch die Interaktion mit ihren Liganden sind Selektine in der Lage, schwache Bindungen zwischen Endothelzellen und Leukozyten zu bilden. Vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1), interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) und Integrine vermitteln eine stabile Adhäsion der Entzündungszellen am Endothel. Plättchen-Endothelzelladhäsionsmoleküle (PECAM-1) werden auf Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen exprimiert. Sie stimulieren die transendotheliale Migration von T-Lymphozyten und Monozyten⁵³. Mit Hilfe dieser Adhäsionsmoleküle kommt es zur Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten an die Endotheloberfläche und zu deren Einwanderung in die Intima. Die transendotheliale Migration wird durch chemotaktische Zytokine stimuliert. Oxidiertes LDL stellt neben dem Monozyten-chemotaktischen Protein-1 (MCP-1) das wirkungsvollste Chemokin dar⁵⁴. Die Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche das chemisch modifizierte LDL mit Hilfe des Scavenger-Rezeptors ungehemmt aufnehmen und speichern. Aufgrund fehlender regulatorischer Mechanismen kommt es zur Entwicklung lipidbeladener Makrophagen, welche massiv mit Cholesterinestern gefüllt sind. Sie werden als Schaumzellen bezeichnet und sind ein

Kennzeichen früher und fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen. Mit ansteigender intrazellulärer Lipidkonzentration gehen zahlreiche Schaumzellen zugrunde⁵⁵. Die T-Lymphozyten produzieren aufgrund der antigenpräsentierenden Makrophagen verstärkt Zytokine und Chemokine, wie Interferon- γ (IFN- γ) und fördern dadurch die inflammatorische Entwicklung. Die Progression der atherosklerotischen Veränderung führt neben der immunologischen, auch zu einer zunehmend fibroproliferativen Reaktion. Glatte Muskelzellen proliferieren und bilden Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Kollagen und Proteoglykane. Dieser Mechanismus führt zu einer Stabilisierung der atherosklerotischen Läsion, kann jedoch bei entsprechender Intensität über die Jahre hinweg auch zu einer voranschreitenden Einengung des Gefäßlumens führen⁵⁶. Im weiteren Verlauf gehen zahlreiche Schaumzellen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen durch Nekrose oder Apoptose zugrunde und hinterlassen eine Plaque mit lipidreichen, weichen Kern und einer fibrösen Kappe. In späteren Stadien können die Plaques kalzifizieren⁵⁷. Durch die Erosion oder Ruptur der Plaques, kann es zur Thrombusbildung und im schlimmsten Fall zu einem akuten Gefäßverschluss kommen⁵⁸.

Frühe, asymptomatische und noch reversible Stadien der Atherosklerose („fatty steaks“) lassen sich bereits bei Kindern und jungen Menschen nachweisen⁵⁹. Unterschiede in der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Veränderungen bezüglich ihrer Lokalisation im Blutgefäßsystem legen die Bedeutung hämodynamischer Faktoren, abgesehen von den kardiovaskulären Risikofaktoren, nahe. Studien zeigten, dass frühe atherosklerotische Läsionen bei Kindern und Jugendlichen vornehmlich in der Aorta, geringer auch in den Koronargefäßen, zu finden waren⁶⁰. Regionen des arteriellen Gefäßsystems, in welchen aufgrund einer Bifurkation oder kurvenförmiger Verläufe erhöhte Scherkräfte und turbulente Strömungsverhältnisse herrschen, scheinen anfälliger für das Auftreten atherosklerotischer Veränderungen zu sein. Die hämodynamischen Kräfte, die in solchen Gebieten auf die Endothelzellen einwirken, beeinflussen deren Struktur und Funktion. Neben Veränderungen der metabolischen und synthetischen Aktivitäten kommt es auch zu einer Reorganisation der Komponenten des Zytoskeletts und zur verstärkten Expression von Adhäsionskomplexen⁶¹.

In zahlreichen Studien konnten Risikofaktoren für das Voranschreiten der Atherosklerose gefunden werden, die für Kinder und Erwachsene gleichermaßen gelten. Hierzu zählen Dyslipidämie, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum.

Die Dyslipidämie, im Sinne eines Ungleichgewichts zwischen atheroprotektiven und atherogenen Lipiden im Plasma, scheint einen wichtigen Risikofaktor bei der Atheroskleroseentwicklung darzustellen. Erhöhte LDL Cholesterin- und erniedrigte HDL

Cholesterin-Spiegel stellen bedeutsame, jeweils voneinander unabhängige Risikofaktoren bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar⁶².

Bei Bluthochdruck wirken erhöhte Scherkräfte auf das Endothel ein und die Infiltration von LDL wird gesteigert⁶³.

Diabetes mellitus beschleunigt im Rahmen der bestehenden Fettstoffwechselstörung sowie der Glykosilierung von Plasmaproteinen, eingeschlossen dem LDL, die Atherogenese⁶⁴.

Zahlreiche Substanzen, die im Tabak enthalten sind, beeinflussen ungünstig das Lipidprofil, begünstigen die Entstehung von oxidiertem LDL und wirken toxisch auf Endothelzellen⁶⁵.

Trotz des Versuches, durch verschiedenste präventive Ansätze, Risikofaktoren der Atherosklerose zu reduzieren, stellen atherosklerosebedingte kardiovaskuläre Erkrankungen weiterhin die Haupttodesursache in Deutschland dar⁶⁶. Einen Schwerpunkt in der Atheroskleroseforschung stellt die Dyslipidämie, als einen der wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktoren, dar⁶⁷.

4.3 Lipoproteine

Lipoproteine sind Transportproteine im Blutplasma, die der Beförderung der wasserunlöslichen Lipide dienen. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern, der durch Cholesterinester und Triglyceride gebildet wird und einer hydrophilen Hülle, die durch Apolipoproteine, unverestertem Cholesterin und Phospholipiden gebildet wird. Apolipoproteine bilden den Proteinanteil der Lipoproteine. Entsprechend ihrer Dichte werden Lipoproteine in 5 Hauptklassen unterteilt. Ihre Dichte steigt mit zunehmendem Protein- und abnehmendem Lipidanteil an. Man unterscheidet Chylomikronen, VLDL (very low-density lipoprotein), IDL (intermediate-density lipoprotein), LDL (low-density lipoprotein) und HDL (high-density lipoprotein). Mit der Nahrung aufgenommene Lipide werden mittels Chylomikronen befördert. Von der Leber gebildete oder von ihr aufgenommene Lipide werden durch VLDL transportiert. Durch die Modifikation des VLDL mittels der Lipoproteinlipase entsteht IDL. Im weiteren Verlauf wird LDL gebildet, welches den Hauptträger des Cholesterins im Plasma darstellt und dieses zu den peripheren Geweben transportiert. HDL dient im Rahmen des reversen Cholesterintransports dem Rücktransport des Cholesterins vom peripheren Gewebe zur Leber und übernimmt nicht nur auf diesem Wege eine protektive Aufgabe in der Genese atherosklerotischer Gefäßveränderungen⁶⁸⁻⁶⁹.

4.4 HDL

Lipoproteine hoher Dichte (HDL) stellen keine einheitliche Population dar. Sie können in zahlreiche Subfraktionen unterteilt werden, welche sich in ihrer Dichte, Form, Größe und Zusammensetzung unterscheiden. Die Dichte der HDL Partikel liegt zwischen 1,063 und 1,21 g/ml und die Größe zwischen 5 und 17 nm (Stoke Durchmesser). Sie können eine scheibenförmige oder sphärische Gestalt annehmen. Fast ein Drittel bis die Hälfte des HDL Partikels wird aus hochspezialisierten Proteinen, den Apolipoproteinen gebildet. Hierbei spielen vor allem apo A-I und apo A-II eine entscheidende Rolle bei der Strukturbildung des HDL sowie dessen Funktionen im intravaskulären Stoffwechsel⁷⁰⁻⁷¹. Weitere Komponenten des HDL stellen Phospholipide, Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceride dar⁷². Darüber hinaus noch verschiedene Enzyme, wie die Paraoxonase, die Lecithin-Cholesterin-Acetylhydrolase (LCAT), das Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und die platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)⁷³. Während der HDL Kern durch die wasserunlöslichen Cholesterinester und Triglyceride gebildet wird, entsteht die hydrophile Hülle durch Phospholipide, freies Cholesterin und Apolipoproteine⁷⁴.

Die verschiedenen HDL Subpopulationen können unter anderem mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese und Anti-ApoA-I-Immunblot differenziert werden. Der Großteil des HDL enthält Apolipoprotein A-I und zeigt eine α -Mobilität. Diese Fraktion wird als α -LpA-I bezeichnet und stellt den hauptsächlichen Teil des im klinischen Alltag bestimmten HDL Cholesterins dar. Es lässt sich aufgrund seiner Dichte durch Ultrazentrifugation in zwei lipidreiche HDL Fraktionen, dem HDL₂ und HDL₃, isolieren. 5-15 % der Apolipoprotein A-I assoziierten, lipidarmen Partikel zeigen eine prä- β -Mobilität in der Gelelektrophorese. Sie lassen sich weiter in eine prä- β_1 -LpA-I, prä- β_2 -LpA-I und prä- β_3 -LpA-I Fraktion separieren und kommen verstärkt im extravasalen Raum vor^{75,76,77,78}.

Zahlreiche epidemiologische Studien haben gezeigt, dass niedrige HDL Konzentrationen im Plasma einen Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen. Diesbezüglich konnte in der Framingham Studie sowie der PROCAM Studie ein inverser Zusammenhang zwischen dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und der HDL Konzentration im Blut beobachtet werden. HDL stellt demnach einen wichtigen und potenten atheroprotektiven Faktor im menschlichen Körper dar^{79,80,81}. Die Erhöhung der HDL Konzentration im Plasma durch die medikamentöse Therapie mit Fibraten oder Nikotinsäure geht einher mit einem verminderten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse^{82,83,84}.

Aufgrund der Heterogenität der HDL Partikel scheint die Vermittlung der atheroprotektiven Effekte des HDL sehr komplex zu sein. Wie im Folgenden ausführlicher dargestellt, besitzt HDL zusätzlich zu dem bisher bekannten Mechanismus des reversen Cholesterintransports, antiinflammatorische, antioxidative, antiapoptotische und vasodilatierende Eigenschaften, welche in ihrer Gesamtheit zur atheroprotektiven Wirkung des HDL beitragen.

4.4.1 HDL und reverser Cholesterintransport

Die Cholesterin Homöostase wird im Organismus durch zwei Mechanismen aufrechterhalten. Der Transport endogenen und exogenen Cholesterins von der Leber zu peripheren Geweben wird über VLDL, IDL und LDL vermittelt. Der Rücktransport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zur Leber wird über HDL vermittelt. Der letztgenannte Mechanismus wird auch als reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet. Er stellt einen der Mechanismen dar, über den HDL seine antiathersklerotische Wirkung vermittelt⁸⁵⁻⁸⁶.

Lipidfreies Apolipoprotein A-I und lipidarmes, scheibenförmiges prä- β HDL stellen die Vorläuferstadien des lipidreichen α -HDL dar. Sie werden von Leberzellen und Mukosazellen des Darmes oder bei der durch das Enzym Lipoproteinlipase vermittelten Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen (Chylomikronen, VLDL) gebildet^{87,88,89,90}. Zudem können sie bei der Umwandlung von HDL₂ und HDL₃ mittels des Cholesterinester-Transferproteins (CETP), des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) und der hepatischen Lipase (HL) entstehen⁹¹⁻⁹².

Eine wichtige Funktion beim RCT übernehmen die HDL assoziierten Apolipoproteine. Über den ATP-binding cassette Transporter A1 (ABC-A1) wird die Ausschleusung intrazellulären, nicht veresterten Cholesterins und von Phospholipiden aus den peripheren Zellen vermittelt. Der ABC-A1 Transporter interagiert dabei mit dem Apolipoprotein A-I. Das aufgenommene freie Cholesterin wird mittels der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) zu Cholesterinestern umgewandelt. Es entsteht ein sphärischer HDL₃ Partikel. In einem weiteren Prozess entstehen durch Umwandlung, unter anderem unter Einwirkung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und des Phospholipid-Transferproteins (PLTP), größere HDL₂ Partikel⁹³. Es gibt verschiedene Wege, die dazu dienen, die Cholesterinester wieder aus den HDL Partikeln zu entfernen. Hierzu gehören unter anderem die Aufnahme der Cholesterinester des HDL in die Leberzelle mittels des scavenger receptor class B, Type I (SR-B1)⁹⁴ und der CETP vermittelte Transfer der Cholesterinester zur VLDL und LDL Fraktion. Wie in einem Zyklus werden fortlaufend lipidfreie Apolipoproteine A-I und lipidarme prä- β HDL als Akzeptoren für die

Cholesterinaufnahme im peripheren Gewebe regeneriert und damit der reverse Cholesterintransport ermöglicht⁹⁵.

4.4.2 Antiinflammatorische Wirkung

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche charakterisiert ist durch die inflammatorische Aktivierung des Endothels und die Akkumulation von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Arterienwand⁹⁶. HDL beeinflusst über unterschiedliche Mechanismen die bei der Atherosklerose ablaufenden entzündlichen Prozesse. Durch eine verminderte Expression Zytokin induzierter Adhäsionsmoleküle, wie intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) und E-Selektin, inhibiert HDL die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten an den Endothelzellen und darüber die sich daran anschließende Transmigration dieser Zellen in die Arterienwand⁹⁷. Darüber hinaus hemmt HDL die Synthese des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF)⁹⁸. Es stimuliert die Expression des Transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β) in den Endothelzellen. TGF- β wirkt antiinflammatorisch durch die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Reduktion der Zytokinsynthese⁹⁹.

4.4.3 Wirkung auf endotheliale Funktionen

Wenn das Endothel unter dem Einfluss physikalischer und toxischer atherogener Stimuli nicht mehr in der Lage ist, seine physiologischen Aufgaben zu erfüllen, so betrifft dies eine Vielzahl gefäßschützender Funktionen, wie die Regulation des Gefäßtonus, die Hemmung der Adhäsion von Entzündungszellen, die Aufrechterhaltung einer antithrombogenen Oberfläche sowie die Regulation der Proliferation glatter Muskelzellen¹⁰⁰. Wie einleitend erwähnt, ist eine Vielzahl dieser Funktionen auch an die Verfügbarkeit von NO gekoppelt. Eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO spielt bei der endothelialen Dysfunktion und damit auch bei der Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen eine entscheidende Rolle. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HDL in der Lage ist, die endotheliale NO-Synthase zu aktivieren und auf diesem Wege die Produktion des atheroprotektiven Moleküls NO zu stimulieren¹⁰¹. Diese Beobachtung wird durch Studien unterstützt, in welchen durch die intravenöse Applikation von HDL bei Patienten mit bekannter Dyslipoproteinämie die Bioverfügbarkeit von NO erhöht und eine endothelvermittelte Vasodilatation induziert werden konnte¹⁰². HDL bindet mittels

Apolipoprotein A1 an den scavenger receptor class B, Type I (SR-BI) und führt über weitere Mechanismen zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase (TK). Die resultierende Signalkaskade, an deren Ende die Phosphorylierung und damit Aktivierung der eNOS steht, beinhaltet die Aktivierung der Akt Kinase und der mitogen-activated protein (MAP) Kinase mittels der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)¹⁰³⁻¹⁰⁴. Darüber hinaus induziert HDL die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und auf diesem Wege unter anderem die Synthese des potenten Vasodilatators Prostacyclin¹⁰⁵.

In vitro Versuche konnten zudem zeigen, dass HDL über die Aktivierung der Proteinkinase Akt in der Lage ist, die Apoptose endothelialer Zellen zu hemmen¹⁰⁶. Neben der Förderung des Überlebens von Endothelzellen vermittelt HDL zudem deren Proliferation und Migration¹⁰⁷⁻¹⁰⁸.

4.4.4 Antioxidative Wirkung

Oxidativer Stress ist ein gut untersuchter Risikofaktor für die Progression atherosklerotischer Veränderungen. Ein Ungleichgewicht zwischen verminderter NO Bioverfügbarkeit und zunehmender Synthese freier Sauerstoffradikale führt in der Arterienwand zu vermehrten oxidativem Stress. Infolgedessen kommt es zunehmend zur oxidativen Modifikation von LDL¹⁰⁹. Oxidiertes LDL wirkt proinflammatorisch und trägt auf diesem Wege maßgeblich zum Voranschreiten der Atherosklerose bei. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Schaumzellen, die für atherosklerotische Läsionen charakteristisch sind¹¹⁰. Untersuchungen zeigen, dass HDL in der Lage ist, LDL vor der chemischen Modifikation zu oxidiertem LDL zu schützen¹¹¹.

4.5 HDL-assoziierte Lysophospholipide

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass HDL ein Transportpartikel für äußerst bioaktive Signalmoleküle darstellt, die an der Regulation zahlreicher biologischer Prozesse beteiligt sind¹¹²⁻¹¹³. Man beobachtete zum Beispiel, dass die Bindung des kompletten HDL Moleküls, nicht jedoch von isoliertem Apolipoprotein A-I oder A-II, die NO Synthese beeinflusst und schloss daraus, dass zusätzlich andere biologisch aktive Bestandteile des HDL die eNOS aktivieren¹¹⁴. In weiteren Studien konnten die Lysophospholipide (LPL) als bioaktive Bestandteile des HDL identifiziert werden¹¹⁵.

Phospholipide sind amphiphile Lipide, die am Aufbau von Zellmembranen beteiligt sind. Hierzu zählen Glycerophospholipide und Sphingomyeline. Sie können enzymatisch zu verschiedenen

Metaboliten umgewandelt werden, zu denen unter anderem auch die Lysophospholipide gehören¹¹⁶⁻¹¹⁷. Zu diesen zählen das Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Lysosulfatid (LSF) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC). Ihnen gemeinsam ist neben der chemischen Grundstruktur die Wirkungsentfaltung über Zelloberflächenrezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Diese wurden zunächst als EDG (endothelial differentiation gene) -Rezeptoren bezeichnet¹¹⁸. Im Verlauf wurde von der IUPHAR eine neue Klassifikation eingeführt, in der die Rezeptoren nach ihrem Hauptliganden benannt und entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung durchnummeriert wurden¹¹⁹. So konnten unter anderem verschiedene S1P und SPC Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zu den einzelnen Lysophospholipiden identifiziert werden.

In den letzten Jahren fand man heraus, dass die HDL assoziierten Lysophospholipide eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der vielfältigen Eigenschaften des HDL, insbesondere der protektiven Effekte, übernehmen. Eine besondere Rolle scheint hierbei das Sphingosin-1-Phosphat zu spielen¹²⁰.

4.5.1 S1P

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) leitet sich vom Sphingosin ab und wird aus diesem durch Sphingosinkinase gebildet. S1P ist in Thrombozyten und auch Erythrozyten gespeichert, da diese Zellen nicht über die S1P Lyase verfügen, welche den Abbau des S1P katalysiert¹²¹⁻¹²². Die Plasmakonzentration von S1P liegt in einem hohen nanomolaren Bereich. Maximal 40% - 60% des im Plasma vorkommenden S1P sind an HDL, der andere Teil an Albumin gebunden¹²³. Die Konzentration von S1P in der LDL Fraktion ist um das vier- bis sechsfache geringer als in der HDL Fraktion¹²⁴. S1P ist beteiligt an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse und vermittelt, ebenso wie andere Lysophospholipide auch, seine Wirkung über G-Proteinen-gekoppelte Rezeptoren¹²⁵. Bei eingehenderen Untersuchungen hinsichtlich der Wirkungsweise ergaben sich unterschiedliche Mechanismen, über die S1P einen antiatherogenen Effekt vermittelt.

S1P scheint in der Lage zu sein, die endotheliale Barrierefunktion über die Aktivierung des G-Proteins Rac-1 zu unterstützen. Rac-1 ist beteiligt an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Endothelzellen¹²⁶. Darüber hinaus ist S1P in der Lage, weitere, überaus wichtige Schutzfunktionen an Endothelzellen zu entfalten, indem es deren Proliferation, Migration und Überleben fördert. So hemmt S1P unter anderem die durch oxidiertes LDL und Wachstumsfaktormangel hervorgerufene Apoptose von Endothelzellen über eine Inhibition der

Caspase-3 Aktivierung^{127,128,129}. Einen weiteren zentralen atheroprotektiven Effekt des S1P stellt die Aktivierung der eNOS dar. Während Apolipoprotein A-1 an SR-B1 bindet, stimuliert S1P gleichzeitig den entsprechenden G-Protein gekoppelten Oberflächenrezeptor. Dies ist essentiell für die Aktivierung der eNOS, welche nicht, wie zuvor dargelegt, durch isolierte Apolipoproteine erfolgen kann. Über die Aktivierung der Tyrosinkinase wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, in deren Verlauf die PI3 Kinase, die Akt und MAP Kinasen im Weiteren und letztendlich die eNOS durch Phosphorylierung aktiviert werden. NO wird freigesetzt^{130,131,132}. S1P beeinflusst die Zytokin-Sekretion von Lymphozyten. Es fördert bei Lymphozyten verstärkt die Sekretion antiatherogener Zytokine, wie IL-10, und reduziert die Bildung proatherogener Zytokine, wie IL-4 und INF- γ ¹³³. Zudem ist bekannt, dass S1P über die Aktivierung der Proteinkinase Akt die Apoptose von Monozyten und Makrophagen hemmt¹³⁴. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass S1P die durch TNF- α stimulierte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, Selektine) reduziert¹³⁵⁻¹³⁶. S1P vermittelt weitere regulatorische Effekte auf das Immunsystem, indem es über den S1P₁ Rezeptor die Rezirkulation von Lymphozyten hemmt¹³⁷.

Darüber hinaus ist S1P in der Lage, die PDGF (platelet-derived growth factor) induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen zu inhibieren¹³⁸⁻¹³⁹.

4.5.2 SPC

SPC wird durch das Enzym Sphingomyelinase aus Sphingomyelin synthetisiert und kann durch die Serum-Lysophospholipase zu S1P umgewandelt werden¹⁴⁰. Die Plasmakonzentration des SPC entspricht der des S1P¹⁴¹. SPC übernimmt ähnliche Funktionen in der Regulation physiologischer Prozesse wie das strukturverwandte S1P und fungiert als ein Ligand mit geringerer Affinität für S1P Rezeptoren¹⁴²⁻¹⁴³. Viele zelluläre Effekte des SPC lassen sich durch dessen Bindung an S1P Rezeptoren erklären, andere Mechanismen unterscheiden sich jedoch von denen des S1P. Sie scheinen durch spezifische SPC Rezeptoren vermittelt zu werden¹⁴⁴.

4.5.3 LSF

Lysosulfatid (Galactosylsphingosin-3-O-Sulfat, LSF) gehört ebenfalls zur Gruppe der strukturverwandten Lysophospholipide. Die Mechanismen der Synthese und des Abbaus von Lysosulfatid sind bisher, ebenso wie die physiologische Plasmakonzentration, kaum bekannt¹⁴⁵.

Größere Konzentrationen lassen sich bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie finden, welche durch einen Mangel an Arylsulfatase A und folgend der Akkumulation von Sulfatiden in verschiedenen Organen gekennzeichnet ist¹⁴⁶. In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien durchgeführt, welche zeigten, dass auch LSF als bioaktives Signalmolekül des HDL fungiert. Dennoch sind die genauen zellulären Mechanismen, über die dieses Lysophospholipid seine Wirkung entfaltet, bisher nur wenig bekannt. LSF bindet ebenso wie S1P und SPC an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und vermittelt über diese seine Wirkung¹⁴⁷. Wie zuvor erwähnt, stellt die Adhäsion mononukleärer Zellen am Endothel mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und deren transendotheliale Migration in die Arterienwand einen bedeutenden Schritt in der Atherogenese dar. Es konnte gezeigt werden, dass LSF über die Aktivierung der Proteinkinase Akt in der Lage ist, die TNF- α induzierte E-Selektin Expression auf der Endothelzelloberfläche zu vermindern. Dieser Effekt konnte auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden und wurde im Versuch durch die Zugabe von Suramin, einem Antagonisten am S1P₃ Rezeptor, aufgehoben. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass LSF die Expression der Adhäsionsmoleküle über die Bindung an den S1P₃ Rezeptor beeinflusst¹⁴⁸⁻¹⁴⁹. Ein Merkmal atherosklerotischer Läsionen ist der Untergang endothelialer Zellen durch Apoptose. LSF ist in der Lage, Endothelzellen aufgrund seiner antiapoptotischen Effekte zu schützen. Es hemmt die Aktivierung von Caspasen und stimuliert die Aktivierung der Akt Kinase¹⁵⁰. Darüber hinaus zeigte sich, dass LSF über die Aktivierung der Phosphatidylinositolspezifischen-Phospholipase C (PI-PLC) die Proliferation von Fibroblasten stimuliert¹⁵¹.

4.6 S1P Rezeptoren

Wie bereits erwähnt, vermitteln Lysophospholipide ihre Wirkung über die Bindung an G-Protein gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren. Durch die Kopplung der Rezeptoren an unterschiedliche G-Proteine ist es möglich, über vielfältige intrazelluläre Signalwege verschiedene biologische Prozesse zu regulieren. Hierzu zählen unter anderem die Regulation der Zellproliferation und des Zellüberlebens, der Calcium Konzentration sowie Calcium abhängiger Funktionen, der Architektur des Zellskeletts, der Zellmigration und der Expression von Adhäsionsmolekülen^{152,153,154,155}. S1P bindet an unterschiedliche Rezeptoren. Der S1P₁ Rezeptor

findet sich ubiquitär und ist ausschließlich an G_i Rezeptoren gekoppelt. Die Aktivierung des $S1P_1$ Rezeptors führt unter anderem zur Stimulation der Akt-Kinase, der extracellular signal-related Kinase (ERK) und des G-Proteins Rac. Über diese Signalwege werden die Proliferation, Migration und das Überleben von Zellen vermittelt¹⁵⁶⁻¹⁵⁷. Der $S1P_2$ Rezeptor findet sich ebenfalls ubiquitär und ist an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt. Hierzu gehören G_i , G_q und $G_{12/13}$ – Proteine. $S1P_2$ führt neben einer Aktivierung der Phospholipase C zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und ERK Stimulierung¹⁵⁸. Rho und Rac stellen Untergruppen der Familie der Rho-GTPasen dar. Sie sind beteiligt an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge und spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts¹⁵⁹. Während das G-Protein Rho über $S1P_2$ aktiviert wird, wird Rac inhibiert. $S1P$ hemmt die PDGF induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen über die Wirkung am $S1P_2$ Rezeptor¹⁶⁰. Zudem wird die Migration weiterer Zell-Typen, unter anderem auch von Melanomzellen, gehemmt¹⁶¹. Der Lysophospholipidrezeptor $S1P_3$ wird, ebenso wie der $S1P_2$ Rezeptor, ubiquitär exprimiert und ist an G_i -, G_q - und $G_{12/13}$ - Proteine gekoppelt. Neben der Aktivierung der Phospholipase C wird der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gefördert. $S1P_3$ aktiviert die G-Proteine Rho und Rac sowie ERK und die Akt Kinase¹⁶². Darüber hinaus wird über diesen Rezeptor eine NO vermittelte Vasodilatation stimuliert. Da in Versuchen an $S1P_3$ defizienten Mäusen durch FTY720, einem Strukturanalogon des $S1P$ und Agonisten an verschiedenen $S1P$ Rezeptoren, keine Vasodilatation induziert werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass hauptsächlich der $S1P_3$ Rezeptor für die lysophospholipidvermittelte eNOS Aktivierung und die dadurch induzierte Vasodilatation verantwortlich ist¹⁶³. Genauere Untersuchungen hinsichtlich der Kopplung der $S1P_4$ und $S1P_5$ Rezeptoren an spezifische G-Proteine und deren physiologische Funktionen stehen weitgehend noch aus. Beide Rezeptoren scheinen zumindest G_i -Proteine zu aktivieren¹⁶⁴.

4.7 SPC Rezeptoren

OGR1 (ovarian cancer G protein-coupled receptor 1) und GPR4 stellen Rezeptoren mit hoher Affinität zu Sphingosylphosphorylcholin als Liganden dar. Beide Rezeptoren vermitteln SPC induziert eine intrazelluläre Erhöhung der Calcium-Konzentration. Während OGR1 jedoch eine Wachstumshemmung in verschiedenen Zellen bewirkt, führt GPR4 zu einer DNA Synthese. OGR1 wird bevorzugt von Zellen der Plazenta, Milz und Hoden exprimiert. GPR4 findet sich gehäuft in der Leber, Niere und den Ovarien¹⁶⁵.

4.8 Fragestellung

Es ist bekannt, dass HDL und S1P in der Lage sind, die endotheliale NO Synthase zu aktivieren und durch die damit einhergehende NO Produktion eine atheroprotektive Wirkung im Endothel zu vermitteln. Es soll geprüft werden, ob auch das HDL assoziierte Lysophospholipid LSF (Lysosulfatid) die Fähigkeit besitzt, die eNOS zu aktivieren und über diesen Mechanismus die endotheliale NO Produktion zu stimulieren. Darüber hinaus soll untersucht werden, über welchen Lysophospholipid-Rezeptor die eNOS Aktivierung erfolgt.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden durchgeführt an den Gefäßen von männlichen Wistar-Kyoto Ratten (WKY, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland), männlichen C57BL/6-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Amerika), eNOS-defizienten Mäusen (eNOS -/-) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Amerika) und S1P₃-Rezeptor defizienten Mäusen (S1P₃ -/-) (Herrn PD. Dr. Bodo Levkau, Zentrum für Atheroskleroseforschung, Westfälische Wilhelms-Universität Münster). Die Ratten waren zum Zeitpunkt der Präparation durchschnittlich 114 Tage alt (105 bis 134 Tage) und wogen durchschnittlich 257 g (247 bis 284 g). Die C57/B6- Mäuse hatten ein Durchschnittsalter von 54 Tagen (48-65 Tage) und ein Durchschnittskörpergewicht von 27 g (23-34 g). Die eNOS defizienten Mäuse waren durchschnittlich 58 Tage alt (51-64 Tage) und wogen durchschnittlich 27 g (24-36 g). Die S1P₃-Rezeptor defizienten Mäuse hatten ein Durchschnittsalter von 57 Tagen (49-62 Tage) und ein Durchschnittskörpergewicht von 25 g (22-33 g).

Die Haltung der Versuchstiere entsprach Standardlaborbedingungen. In den fensterlosen Ställen wurde ein 12-stündiger Tag-Nacht Rhythmus simuliert. Die Raumtemperatur betrug 19-21 °C. Es herrschte eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-70 %. Ernährt wurden die Tiere mit Pressfutter (Firma Altromin, Soest, Deutschland) und Trinkwasser sowie Körnern und Obst an jedem zweiten Tag. Sie wurden in Kolonien gehalten und nach Lieferung zur Akklimatisierung für mindesten fünf Tage in den Tierställen bewahrt. Die Entnahme der für die Versuche benötigten Aorten erfolgte zwischen 6 Uhr und 18 Uhr.

5.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Die für den jeweiligen Versuch verwendeten Substanzen wurden entsprechend der Richtlinien des Calbiochem - bzw. des Sigma Katalogs frisch aufgelöst und auf Eis kalt gehalten.

Acetylcholin	Sigma, St. Louis/USA
Aprotinin	Sigma, St. Louis/USA

Bidestilliertes Wasser	Fluka, Buchs/CH
Cholesterin	Sigma, St.Louis/USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D
Essigsäure	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethylendiamintetraacetylsäure	Merck, Darmstadt/D
Glukose	Merck, Darmstadt/D
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma, St. Louis/USA
Ketamin	Sigma, St. Louis/USA
Lysosulfatid (LSF)	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumsulfat (Mg ₂ SO ₄)	Sigma, St. Louis/USA
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt/D
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, St. Louis/USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt/D
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma, St. Louis/USA
N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME)	Sigma, St. Louis/USA
Phenylephrin	Sigma, St. Louis/USA
Phosphatidylcholin	Sigma, St. Louis/USA
Saponin	Sigma, St. Louis/USA
Stickstoff	Linde, Wiesbaden/ D
Urethan	Sigma, St. Louis/USA
Xylazin	Sigma, St. Louis/USA

5.1.3 Physiologische Tyrode-Lösung für den Kleingefäßmyographen

Grundlage der Tyrode-Lösung ist bidestilliertes Wasser, in welchem verschiedene Elektrolyte in den unter Tabelle 1 angegebenen Konzentrationen gelöst wurden. Die Lösung wurde vor jedem Versuch neu angesetzt und bei einer konstanten Temperatur von 37 °C warm gehalten.

Substanz	Konzentration (mmol/l)
NaCl	119,54
KCl	4,69
Mg ₂ SO ₄	1,22
CaCl ₂	1,61
KH ₂ PO ₄	1,17
NaHCO ₃	25,01
Glukose	10,98
EDTA	0,024

Tabelle 1: Zusammensetzung der physiologischen Tyrode-Lösung

5.1.4 Laborgeräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen/D
Computer	Fujitsu Siemens, Sunnyvale/USA Compaq/HP, Berlin/D
Druckaufnehmer Isotec Pressure Transducer	Hugo Sachs, March-Hugstetten/D
Gefrierschränke	-80°C Heraeus, Osterode/D Firma Scientific, Marietta/USA -20°C Liebherr, Biberach an der Riß/D Bosch, Stuttgart/D
Glasinstrumente (Kolben, Pipetten etc.)	Brand, Wertheim/D
Kleingefäßmyograph Modell 410A	Danish Myotechnology, Aarhus/DK
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart/D Liebherr, Biberach an der Riß/D
Magnetrührer	IKA-Werk, Staufen in Breisgau/D
Mehrkanalpipette	Biohit, Helsinki/SN
Mikroskope	Zeiss, Jena/D Nikon, Tokio/J
Monitor	LG, Seoul/KO

pH-Messgeräte	Beckmann, Palo Alto/USA
pH-Messgerät PHM210	Radiometer, Copenhagen/DN
pH-Messelektrode MI-410	Microelectrodes, Bedford/USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/D
Vortex	Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe/D
	Julabo, Seelbach/D
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg/D

5.1.5 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Roth, Karlsruhe/D
Einwegskalpelle	Rüttgers, Solingen/D
Pipettenspitzen	Süd Laborbedarf, Gauting/D
Präparationsbesteck	FST, Foster City/USA
Schläuche	VWR, Darmstadt/D
Spritzen und Kanülen (Sterican)	Braun Melsungen, Melsungen/D

5.1.6 Software

Adobe Acrobat 7.0 Professional	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
Endnote X2	ISI Research Soft, Berkeley/USA
MS-Office 2007 Profession	Microsoft Corp., Redmond/USA
Windows XP	Microsoft Corp., Redmond/USA
MS Explorer 6.0	Microsoft Corp., Redmond/USA
Myodaq 2.2	DMT Danish Myo Technology
Myodata 2.2	DMT Danish Myo Technology
Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego/USA

5.2 Methoden

5.2.1 Präparation der bei den Versuchen verwendeten thorakalen Aorten

Die Mäuse und Ratten der o.g. Stämme wurden mittels einer intraperitonealen Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (10 mg/kg KG) Applikation anästhesiert.

Nach Fixation des jeweiligen Tieres in Rückenlage wurde mittels eines medianen Bauchschnitts der Bauchraum eröffnet und die abdominelle Aorta dargestellt. Durch eine mediane Sternotomie verschaffte man sich Zugang zum thorakalen Anteil der Aorta und präparierte diesen äußerst vorsichtig mit Hilfe einer Mikroschere frei. Bei zu starken longitudinalen oder transversalen Traktionen am Gefäß hätte es zu Verletzungen des Endothels oder muskulärer Strukturen kommen können, die letztlich zu Funktionseinbußen des Präparates geführt hätten. Nach der vollständigen Mobilisation der thorakalen Aorta wurde diese auf Höhe des Zwerchfells vom abdominalen Teil getrennt und in eine mit Tyrodelösung gefüllte Petrischale transferiert. Diese wurde zuvor im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt und über 10 Minuten mit Carbogen begast.

Anschließend erfolgte die Entfernung des umgebenden Fett- und Bindegewebes unter Zuhilfenahme eines binokularen Mikroskops bei zehnfacher Vergrößerung sowie die Abtrennung von jeweils ca. 2 mm großen Gefäßstücken. Diese wurden mit einem Draht von 40 µm Durchmesser in den Myographen eingespannt.

5.2.2 Kleingefäßmyograph

Das Prinzip des Small Vessel Myographen wurde 1976 von Professor M. J. Mulvany und Professor W. Halpern etabliert. Gefäßsegmente, welche annähernd atraumatisch von Aorten bzw. kleinen Widerstandsgefäßen entnommen werden, können in Form von Ringpräparaten in den Myographen eingespannt und auf ihre pharmakologischen, morphologischen und mechanischen Eigenschaften hin untersucht werden. Der Hauptvorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, pharmakologische Messungen unter definierten isometrischen Bedingungen durchführen zu können. Der Kleingefäßmyograph erlaubt die pharmakologische Charakterisierung von proximalen Widerstandsgefäßen mit einem Lumendurchmesser von 100 µm bis 2 mm. Gefäße verschiedener Gefäßgebiete einer Tierart sowie Gefäße des gleichen Gefäßgebiets unterschiedlicher Tierarten zeigen im Versuch eine andere Reaktion. Während die koronaren und zerebralen Widerstandsgefäße der Ratte auf Noradrenalin mit einer

Vasodilatation antworten, kontrahieren die proximalen renalen, mesenterialen und femoralen Widerstandsgefäße¹⁶⁶⁻¹⁶⁷. Eine Ausweitung gewonnener Untersuchungsergebnisse auf andere Spezies oder andere Gefäßregionen kann also erst nach weiterführenden physiologischen Untersuchungen erfolgen.

5.2.3 Aufbau des Kleingefäßmyographen

Mit Hilfe des Kleingefäßmyographen 410A der Firma JP Trading ist es möglich, zwei Gefäßringpräparationen gleichzeitig zu untersuchen. Das Gehäuse des Myographen enthält eine Heizung, einen Kraftmesser sowie eine rostfreie Edelstahlkammer mit einem Volumen von 15 ml. In dieser Kammer befinden sich jeweils zwei, sich gegenüberliegende Trägerbacken, zwischen denen die präparierten Gefäßsegmente mittels eines Drahtes, der an Schrauben fixiert wird, eingespannt werden. Die eine Trägerbacke hat Kontakt zu einer Mikrometerschraube, die der Veränderung des Trägerbackenabstands in Mikrometerschritten dient. Die andere Trägerbacke ist mit dem sich im Myographengehäuse befindenden Kraftmesser verbunden. Dieser hochsensible Widerstandsmesser misst Kraftänderungen der sich relaxierenden oder kontrahierenden Gefäßmuskulatur in einem Bereich von 250 mN mit einem Auflösungsvermögen von 0,01 mN und gibt die gemessenen Daten an das außerhalb gelegene Myo-Interface mittels Kabelverbindung weiter. Das Myo-Interface ist wiederum an einem Computersystem angeschlossen, welches die digitale Speicherung und Auswertung der gemessenen Daten erlaubt. Das Messprogramm Myodaq 2.2 transferiert und speichert die Informationen des Kraft- und Temperaturmessers in Abhängigkeit von der Zeit. Nach Beendigung des Versuches erfolgt die Auswertung der Versuchsergebnisse mittels des Analyseprogramms Myodata 2.2.

Die Kammer ist gefüllt mit einer physiologischen Kochsalzlösung (Tyrodelösung) und wird durch eine spezielle Abdeckung verschlossen. Diese soll zum Einen den Sauerstoffpartialdruck konstant halten und zum Anderen eine Verdunstung des Kammerinhalts reduzieren. Die Abdeckung verfügt über mehrere Öffnungen, über welche Substanzen und Lösungen hinzugefügt und entfernt werden können. Der Kammerinhalt wird mit Hilfe der im Myographengehäuse befindlichen Heizung konstant auf einer zuvor festgelegten Temperatur von 37 °C gehalten. In der Kammer befindet sich ein mit der Heizung verbundenes Thermometer, welches mit einer Auflösung von 0,1 °C die aktuelle Temperatur ermittelt. Bei Temperaturschwankungen erfolgt automatisch eine Anpassung der Heizkraft zur Aufrechterhaltung der vorgegebenen Temperatur. Zudem werden alle in die Kammer

kommenden Flüssigkeiten in einem externen Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Auf diesem Wege können relevante thermische Beeinflussungen der Gefäßringe sowie des Kraftmessers vermieden werden.

Ein an den Myographen zusätzlich angeschlossenes Vakuumsystem, bestehend aus einer Vakuumpumpe, einem Ventil und einer Auffangflasche, dient der Entfernung des Kammerinhalts bei Substanzwechsel und beim Waschen der Gefäßringe.

Über ein externes Begasungssystem erfolgt während des Versuches die kontinuierliche Zufuhr von Carbogen (95% O₂ / 5 % CO₂), wodurch in der Kammer ein physiologischer pH-Wert von 7,4 aufrechterhalten wird. Dieser Wert wird mittels einer an einem pH-Meter angeschlossenen pH-Elektrode während des Versuchs mehrfach überprüft.

Nach jedem Versuch werden die Kammern des Kleingefäßmyographen mehrfach mit bidestilliertem Wasser gespült. Anschließend wirkt 8%ige Essigsäure über 10 Minuten ein, wird mit Aqua bidest ausgespült und die Kammern werden vorsichtig trocken gelegt.

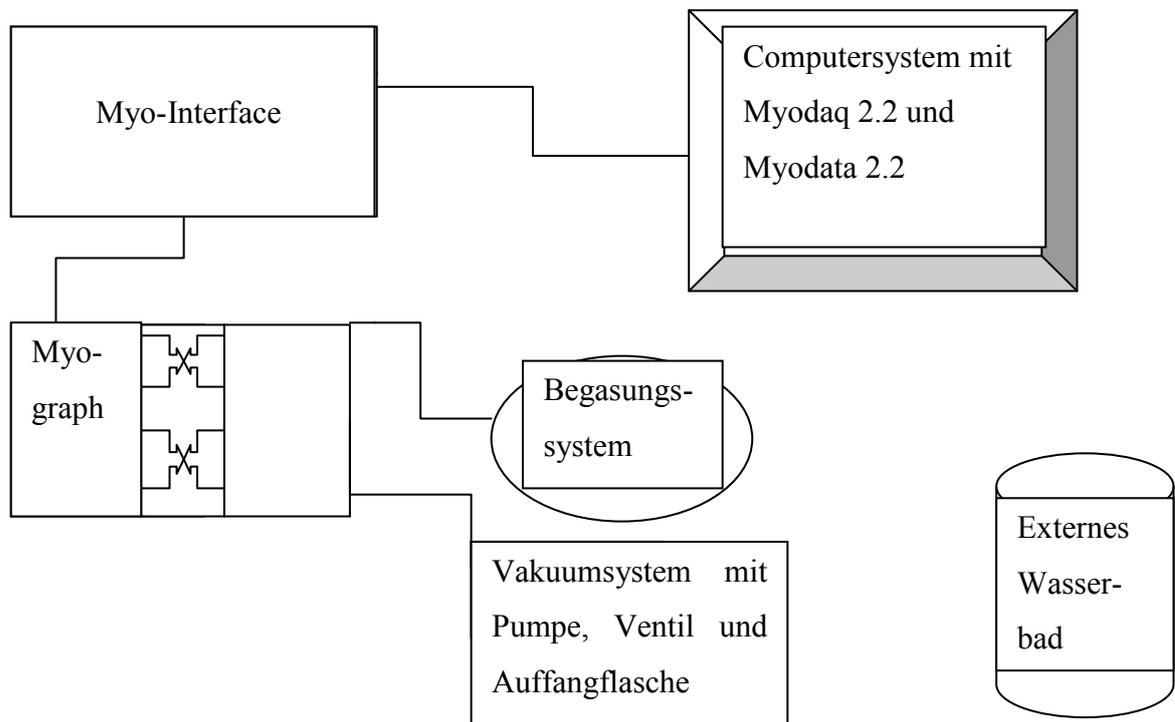


Abbildung 1: abgebildet ist die Versuchsanordnung eines Kleingefäßmyographen

5.2.4 Festlegung des inneren Gefäßumfangs der Gefäßringpräparate

Um mit Hilfe des Kleingefäßmyographen das Verhalten der verschiedenen Gefäßringpräparate auf die im Versuch angewendeten Testsubstanzen miteinander vergleichen zu können, ist es notwendig, den inneren Gefäßumfang der Gefäße festzulegen. Die maximal mögliche Kraftentwicklung eines Gefäßes ist abhängig von dessen vorgegebener Wandspannung, da diese die Ausrichtung der kontraktilen Aktin- und Myosinfilamente der glatten Muskulatur bestimmt.

Die Gefäßsegmente werden zunächst so eingespannt, dass keine Spannung auf das Gefäß ausgeübt wird. Anschließend werden beim Normalisierungsprozess die beiden Trägerbacken in Mikrometerschritten voneinander entfernt. Es wird zum Einen die dabei entstehende Kraft und zum Anderen die Mikrometerveränderung gemessen. Der innere Gefäßumfang lässt sich nun unter Kenntnis des Abstands beider Trägerbacken sowie der Dicke der verwendeten Drähte ermitteln. Die Länge des verwendeten Gefäßsegments wird mit Hilfe eines speziellen Objektivs, welches auf das Mikroskop aufgesetzt wird, bestimmt und ergibt sich aus der verdoppelten unter dem Mikroskop gemessenen Länge, da sowohl die Gefäßober- als auch -unterseite zu berücksichtigen sind. Errechnet man den Quotienten aus gemessener Kraft und Gefäßlänge, so erhält man die Wandspannung. Nun kann mit Hilfe der Gleichung nach Laplace der effektiv wirkenden Druck P_i ermittelt werden¹⁶⁸.

Es gilt:

$$P_i = \text{Wandspannung} / (\text{Innerer Gefäßumfang} / (2 \cdot \pi)).$$

Der effektive Druck entspricht jenem Druck, der auf das Gefäß wirken müsste, um es auf den gemessenen Wert zu dehnen. Das Messprogramm Myodaq erfasst jedes Datenpaar, bestehend aus Wandspannung und innerem Gefäßumfang und errechnet den sich daraus ergebenden effektiven Druck. Sobald ein effektiver Druck von 100 mmHg überschritten wird, wird die Gefäßextension abgeschlossen. Mittels der gemessenen Daten wird eine exponentielle Kurve errechnet, bei welcher die Wandspannung gegen den inneren Gefäßumfang (IC=internal circumference) aufgetragen wird. IC_{100} bezeichnet den inneren Gefäßumfang, den das nicht eingespannte Gefäß bei einem transmuralen Druck von 100 mmHg haben würde¹⁶⁹. Da in Experimenten gezeigt werden konnte, dass Gefäße bei einem inneren Umfang, der 90 % des IC_{100} beträgt, ein Kraftmaximum entwickeln, wird jedes Gefäßpräparat vor Versuchsbeginn auf diesen inneren Gefäßumfang, welcher im Folgenden als IC_1 bezeichnet wird, eingestellt¹⁷⁰. Da somit die in den Experimenten verwendeten Gefäße über den gleichen inneren Gefäßumfang (IC_1) verfügten, ist ein Vergleich der Versuchsergebnisse möglich.

5.2.5 Eichung des Kraftmessers

Um Verfälschungen der Versuchsergebnisse durch ungenaue bzw. falsche Kraftmessungen vorzubeugen, wird der Kraftmesser in regelmäßigen Abständen mit einer speziell für den Kleingefäßmyographen hergestellten Kalibrierungswaage auf 9,81 mN/g geeicht. Hierbei wird, wie bei einem normalen Versuchsaufbau, ein Draht an diejenige Trägerbacke gespannt, die Kontakt zum Kraftmesser hat. Anschließend bringt man den Hebelarm der Kalibrierungswaage zwischen Draht und Trägerbacke, ohne den Draht zu berühren und ohne einen Ausschlag des Kraftmessers zu bewirken. Nun wird der Kraftarm der Kalibrierungswaage mit einem Gewicht von 2 g beschwert. Das Verhältnis zwischen Kraftarm und Hebelarm beträgt 2 cm zu 4 cm.

Nach der Gleichung:

$$F_{\text{Kraftmesser}} = W \cdot g \cdot (\text{Kraftarmlänge} / \text{Hebelarmlänge})$$

wirkt auf den Kraftmesser jetzt nur noch die Kraft g , die der Gravitationskonstanten g ($g = 9,81$ mN/g) entspricht.

5.2.6 Versuchsdurchführung

Jeder Versuch wurde an mindestens 6 Aortenringpräparaten ($n \geq 6$) verschiedener Tiere der gleichen Spezies wiederholt.

5.2.6.1 Kontrolle der Gefäßvitalität

Die in den Myographen eingespannten Aortenringe verblieben zunächst für 60 Minuten ohne Manipulation in der gewärmten Tyrode Lösung und wurden dann auf ihre funktionellen Eigenschaften hin untersucht. Gefäße mit eingeschränkter Funktion wurden verworfen. Zur Vitalitätskontrolle der Gefäße wurden Substanzen verwendet, welche ihre kontrahierende bzw. dilatierende Wirkung entweder rezeptorunabhängig oder rezeptorabhängig entfalten. Zu den rezeptorunabhängigen Stimulatoren gehören der konstringierende Stimulator Kaliumchlorid (KCl, 130 mmol/l) und der dilatierende Stimulator Natriumnitroprussid (SNP, 1 μ mol/l). Zu den rezeptorabhängigen Substanzen gehören das konstringierende Phenylephrin (PE, 1 μ mol/l) und das dilatierende Acetylcholin (ACh, 10 μ mol/l).

Nach Einstellung des optimalen inneren Gefäßumfangs wurde die Gefäßvitalität eines jeden Gefäßringpräparates im Rahmen der Vorkaskade in folgender Reihenfolge getestet: Es wurde

mit Kaliumchlorid (130 mmol/l) begonnen, bis zwei einander entsprechende Kontraktionen gemessen wurden. Ebenso verfuhr man mit Phenylephrin (1 $\mu\text{mol/l}$). Nachdem auf diesem Wege das Kontraktionsvermögen des Gefäßes nachgewiesen wurde, prüfte man die Dilatationsfähigkeit. Hierfür wurde Ach (10 $\mu\text{mol/l}$) auf ein durch Phenylephrin kontrahiertes und dadurch vorgespanntes Gefäß appliziert. Als letzte Substanz am Ende des Versuches wurde Natriumnitroprussid (SNP, 1 $\mu\text{mol/l}$) auf eine durch PE (1 $\mu\text{mol/l}$) induzierte Kontraktion appliziert, um eine endothelunabhängige Dilatation nachzuweisen. SNP ist ein NO-Donor. Es induziert eine lang dauernde Dilatation, welche die Wirkung nachträglich applizierter Stoffe stark beeinträchtigt.

Gefäße, welche unter PE (1 $\mu\text{mol/l}$) nicht ausreichend kontrahierten ($< 5 \text{ mN}$) oder keine konstante Kontraktion zeigten bzw. unter Acetylcholin nur schwach dilatierten ($< 70\%$), wurden ausgesondert und durch neue ersetzt.

5.2.6.2 Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse für Maximalkontraktionen und Dosis-Wirkungskurven der vasokonstriktischen Stimulatoren wurde im Laufe der bis zu 8 Stunden dauernden Versuche mehrfach überprüft. Hierfür wurden regelmäßig Maximalkontraktionen und Dosis-Wirkungskurven der Agonisten angefertigt und dadurch die kontraktiven Eigenschaften der Gefäße kontrolliert. Die Gefäßkontraktilität zeigte im Laufe der mehrstündigen Versuche keine signifikante Veränderung.

5.2.6.3 Hemmung der eNOS durch L-Name

Zur irreversiblen Hemmung der endothelialen NO-Synthase wurde in einigen Versuchen die Substanz L-Name (N^{G} -Nitro-L-Arginine-Methyl Ester) verwendet. Nachdem L-Name (100 μM) appliziert worden war, erfolgte eine Vorkontraktion der Gefäßringe mit Phenylephrin (1 μM) und anschließend die Applikation von Acetylcholin (1 μM). Wenn die thorakalen Aortenabschnitte auf Acetylcholin nicht mehr mit einer Vasodilatation reagierten, konnte von einer effektiven Hemmung der eNOS ausgegangen werden und die Gefäße wurden für den geplanten Versuchsablauf weiter verwendet.

5.2.6.4 Chemische Deendothelialisierung durch Saponin

Saponin ist ein Substrat, welches die Endothelzellpermeabilität beeinflusst. Dadurch kommt es zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und zu einem Funktionsverlust des Endothels. Werden die Aortenringe mehrfach (3 x 10 Minuten und 1 x 20 Minuten) einem Tyrode/Saponin Gemisch (Saponinkonzentration: 0,05 mg/ml) ausgesetzt, so erfolgt die chemische Entfernung des Endothels¹⁷¹.

5.2.7 Statistik

Das Analyseprogramm Myodata 2.2 wertete die Versuchsdaten statistisch aus. Ist der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau ($p < 5\%$), gilt das Ergebnis als statistisch signifikant. Die Ergebnisse resultieren aus der in mN gemessenen Kraftänderung und werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Da es sich um Gruppen von unabhängigen Stichproben handelt, wurde zur Kontrolle der Signifikanz der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney herangezogen.

Bei der Nullhypothese (H_0) wurde davon ausgegangen, dass die Mittelwerte der gemessenen Kraftänderung gleich bleiben, unabhängig davon, ob Tyrode (μ_1) oder aber Agonisten bzw. Antagonisten (μ_2) hinzugegeben werden.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Bei der Alternativhypothese (H_1) wurde davon ausgegangen, dass sich die Mittelwerte der gemessenen Kraftänderung unter Zugabe von Tyrode (μ_1) von denen unter Zugabe von Agonisten bzw. Antagonisten unterscheiden (μ_2).

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Mit Hilfe der folgenden Gleichungen können die Prüfgrößen U_1 und U_2 ermittelt werden:

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + 0,5 \cdot n_1 \cdot (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + 0,5 \cdot n_2 \cdot (n_2 + 1) - R_2$$

Dabei bezeichnet n_1 den Stichprobenumfang bei Tyrode und n_2 den Stichprobenumfang bei dem getesteten Stimulator. Für die gemessenen Werte wurde eine Rangordnung angefertigt, in der jeder Wert eine Rangzahl erhielt. R_1 bezeichnet die Summe der Rangzahlen von Tyrode und R_2 die Summe der Rangzahlen des getesteten Stimulators.

Die gesuchte Prüfgröße U ist die kleinere von U_1 und U_2 . Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn der berechnete U-Wert kleiner als der kritische U-Wert (n_1, n_2) war.

6 Ergebnisse

6.1 Dosisabhängige Vasokonstriktion an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Phenylephrin

In der folgenden Abbildung (Abbildung 2) zeigt sich der dosisabhängige, vasokonstriktorische Effekt von Phenylephrin (PE) an den thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto (WKY) Ratten. PE vermittelt diesen Effekt durch seine agonistische Wirkung an α_1 -Adrenozeptoren.

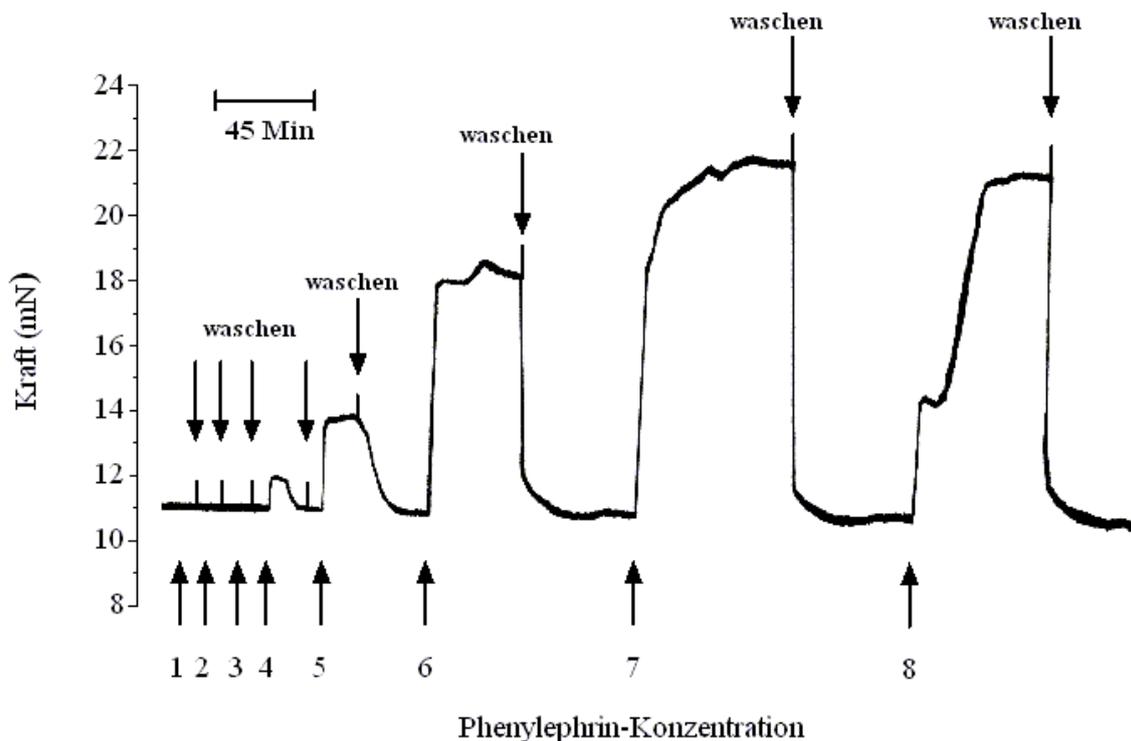


Abbildung 2: Nicht kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Phenylephrin.

Dargestellt ist die nicht kumulative DWK von Phenylephrin an Ringpräparaten der thorakalen Aorten von WKY-Ratten. Die repräsentative Originalabbildung zeigt das Ergebnis mindestens sechs unabhängiger Versuche ($n \geq 6$) verschiedener Tiere der gleichen Spezies (WKY-Ratten) am Kleingefäßmyographen. Aus der Abbildung geht eine dosisabhängige Steigerung der Vasokonstriktion durch Phenylephrin hervor. Nach jeder untersuchten PE Konzentration wurde durch einen Waschvorgang die Baseline wieder erreicht, bevor die nächsthöhere PE Konzentration appliziert wurde. Auf der Ordinate ist die Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Die verwendeten PE Konzentration stiegen in folgenden Schritten an: Schritt 1: 3 nmol/l; Schritt 2: 10 nmol/l; Schritt 3: 30 nmol/l; Schritt 4: 100 nmol/l; Schritt 5: 300 nmol/l; Schritt 6: 1 μ mol/l; Schritt 7: 3 μ mol/l und Schritt 8: 10 μ mol/l.

6.2 Dosisabhängige Vasodilatation an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Acetylcholin

In der folgenden Abbildung (Abbildung 3) zeigt sich der dosisabhängige, vasodilatatorische Effekt von Acetylcholin (Ach) an den thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto (WKY) Ratten, welche zuvor durch Phenylephrin Applikation vorkontrahiert wurden. Eine maximale Vasodilatation ließ sich nach der Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ Ach (Schritt 7) beobachten.

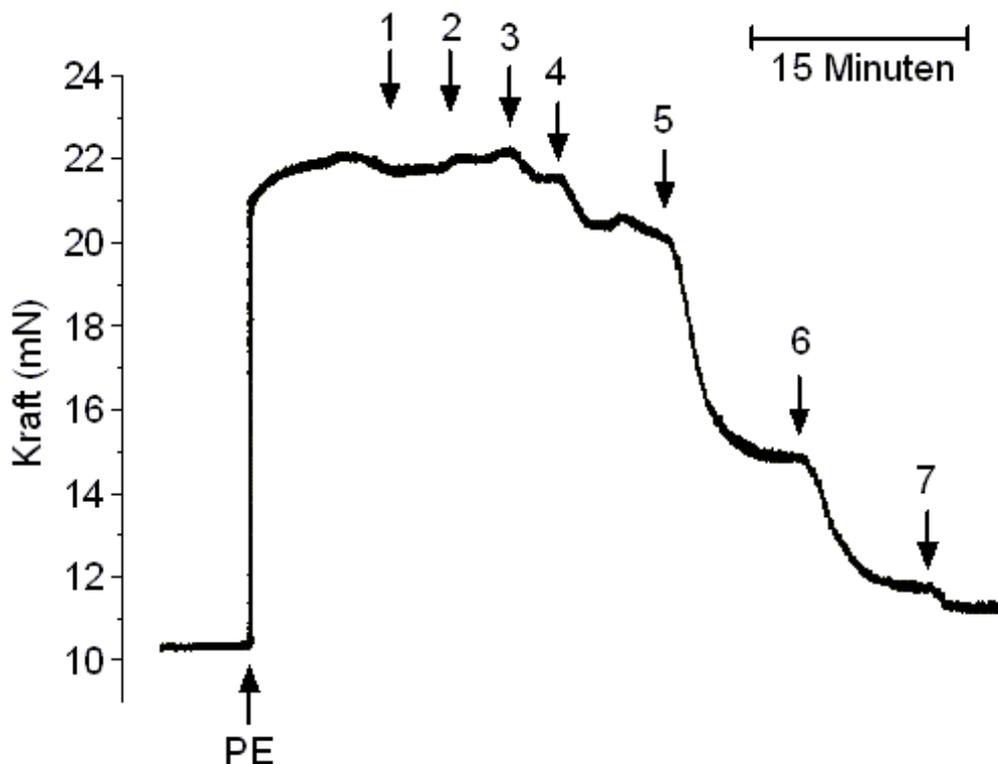


Abbildung 3: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Acetylcholin

Abgebildet ist die kumulative Wirkung von Acetylcholin auf thorakale Aortenringe von WKY-Ratten, welche mittels PE vorkontrahiert wurden. Die Abbildung gibt die Ergebnisse mindestens 6 voneinander unabhängiger Versuchsläufe ($n \geq 6$) am Kleingefäßmyographen wieder. Auf der Ordinate ist die Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Die Vorkontraktion der Gefäße erfolgte durch die Applikation von PE (1 $\mu\text{mol/l}$). Durch die kumulative Applikation von Acetylcholin (Ach) wurde eine konzentrationsabhängige Vasodilatation induziert. Die verwendeten Ach Konzentrationen stiegen in folgenden Schritten an: Schritt 1: 100 pmol/l; Schritt 2: 1 nmol/l; Schritt 3: 10 nmol/l; Schritt 4: 100 nmol/l; Schritt 5: 1 $\mu\text{mol/l}$; Schritt 6: 10 $\mu\text{mol/l}$; Schritt 7: 100 $\mu\text{mol/l}$.

6.3 Dosisabhängige Vasodilatation an den Aorten von Wistar-Kyoto Ratten durch Natriumnitroprussid

Die folgende Abbildung (Abbildung 4) zeigt den konzentrationsabhängigen, vasodilatatorischen Effekt von Natriumnitroprussid (SNP) an zuvor durch Phenylephrin vorkontrahierten, thorakalen Aorten von WKY-Ratten. Eine maximale Vasodilatation ließ sich nach der Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ SNP (Schritt 7) beobachten.

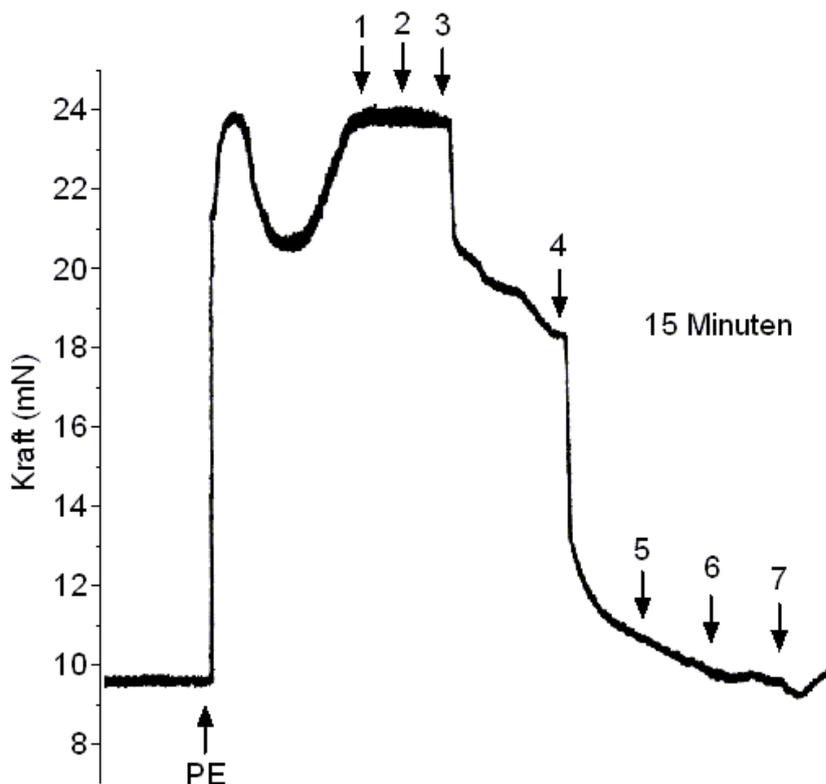


Abbildung 4: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) von Natriumnitroprussid

Dargestellt ist die kumulative Wirkung von SNP auf thorakale Aortenringe von WKY-Ratten, welche mittels PE vorkontrahiert wurden. Die Abbildung gibt die Ergebnisse mindestens 6 voneinander unabhängiger Versuchsläufe ($n \geq 6$) am Kleingefäßmyographen wieder, bei welchen die Aorten verschiedener Tiere der gleichen Spezies verwendet wurden. Auf der Ordinate ist die Kraft in mN, gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen. Die Vorkontraktion der Gefäße erfolgte durch die Applikation von PE in der Konzentration 1 $\mu\text{mol/l}$. Anschließend erfolgte die kumulative Applikation von SNP. Es konnte eine konzentrationsabhängige Vasodilatation induziert werden. Die verwendeten SNP Konzentrationen stiegen in folgenden Schritten an: Schritt 1: 100 pmol/l; Schritt 2: 1 nmol/l;

Schritt 3: 10 nmol/l; Schritt 4: 100 nmol/l; Schritt 5: 1 µmol/l; Schritt 6: 10 µmol/l; Schritt 7: 100 µmol/l.

6.4 Wirkung von SNP und Ach auf den Gefäßtonus der Aorten von Wistar-Kyoto Ratten nach Applikation von PE und L-Name

In der folgenden Abbildung (Abbildung 5) zeigt sich der vasodilatatorische Effekt von SNP an den thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto (WKY) Ratten, welche zuvor durch Phenylephrin Applikation vorkontrahiert und mit L-Name behandelt wurden. L-Name stellt einen spezifischen Antagonisten der endothelialen NO-Synthase dar. Der zuvor in der Abbildung 3 dargestellte vasodilatatorische Effekt des Acetylcholins ließ sich nach Inhibition der eNOS durch L-Name in diesem Versuch nicht reproduzieren. Die Applikation von Ach löste im Gegensatz zu SNP keine Vasodilatation aus. Die Versuche konnten zeigen, dass SNP seine vasodilatatorischen Effekte eNOS unabhängig entfaltet, während die Ach induzierte Vasodilatation eNOS abhängig erfolgt.

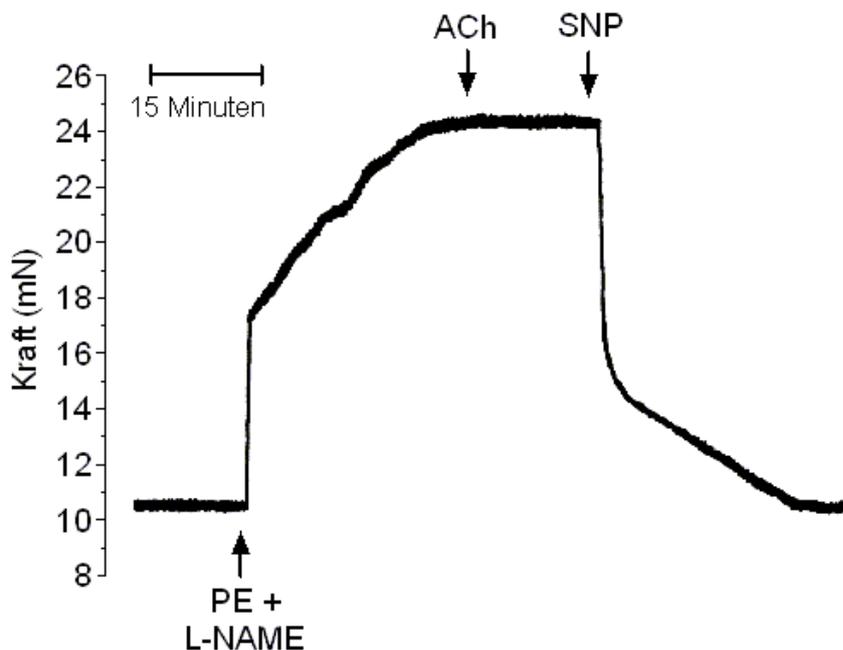


Abbildung 5: Effekte auf den Gefäßtonus durch SNP und Ach an durch PE vorkontrahierten und mit L-Name behandelten Aorten.

Dargestellt ist die Gefäßwirkung von Acetylcholin (1 µmol/l) und SNP auf die thorakalen Aortenringe von WKY-Ratten, nachdem diese durch Phenylephrin (1 µmol/l) vorkontrahiert und mit L-Name (100 µmol/l über 20 Minuten Einwirkzeit) behandelt wurden. In dieser Abbildung werden die Ergebnisse mindestens 6 voneinander unabhängiger Versuchsläufe ($n \geq 6$) am

Kleingefäßmyographen wiedergegeben. Auf der Ordinate ist die Kraft in mN, gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen.

Acetylcholin konnte in den durchgeführten Versuchen an den Aorten der WKY-Ratten eine dosisabhängige Vasodilatation induzieren, die durch Inhibition der eNOS mittels L-Name nicht reproduzierbar war. Auch SNP war in der Lage, eine Vasodilatation zu stimulieren, welche nicht durch L-NAME gehemmt werden konnte.

6.5 Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von C57BL/6- Mäusen, eNOS- und S1P₃-defizienten Mäusen

Im Laufe der Versuche dieser Doktorarbeit kamen unterschiedliche Tierstämme zum Einsatz. Neben den thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto (WKY) Ratten wurden die Gefäße von C57BL/6-Mäusen, eNOS-defizienten Mäusen und S1P₃-defizienten Mäusen untersucht. Hierbei wurden, wie in den zuvor beschriebenen Versuchen an den Aorten von WKY-Ratten, am Kleingefäßmyographen Dosis-Wirkungs-Kurven von Acetylcholin und Natriumnitroprussid, an durch Phenylephrin vorkontrahierte, thorakale Aortenabschnitte der genannten Tiere, durchgeführt. Im Weiteren wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP erstellt, nachdem die jeweiligen Gefäße durch PE vorkontrahiert und mit L-Name als spezifischen Antagonisten der eNOS inkubiert worden waren (+L-NAME). Im nächsten Schritt wurden die untersuchten Gefäße auf chemischem Weg deendothelialisiert (-Endothel) und erneut DWK von Ach und SNP erstellt.

6.5.1 Dosisabhängige Vasodilatation von Ach und SNP an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen

Die Abbildung 6 A zeigt, dass Ach an den Aorten von C57BL/6-Mäusen eine dosisabhängige Vasodilatation induzieren konnte, die sich jeweils durch die Applikation von L-Name und Deendothelialisierung hemmen ließ (Kontrolle: $\log EC_{50} -7,2 \pm 0,1$ maximale Dilatation: $83,3 \pm 3,0\%$, $n \geq 6$; +L-NAME: $\log EC_{50} -6,8 \pm 0,1$ maximale Dilatation: $-1,5 \pm 1,7\%$, $n \geq 6$; -Endothel $\log EC_{50} -5,1 \pm 0,1$ maximale Dilatation: $-0,9 \pm 1,6\%$, $n \geq 6$). Die durch SNP stimulierte Vasodilatation konnte weder durch L-Name, noch durch Deendothelialisierung unterbunden werden (Abbildung 9 B), (Kontrolle: $\log EC_{50} -8,2 \pm 0,1$ maximale Vasodilatation: $96,1 \pm 1,3\%$, $n \geq 6$; +L-Name: $\log EC_{50} -8,0 \pm 0,1$ maximale Dilatation: $95,9 \pm 1,4\%$, $n \geq 6$; -Endothel: $\log EC_{50} -7,9 \pm 0,1$ maximale Dilatation: $97,4 \pm 1,6\%$, $n \geq 6$).

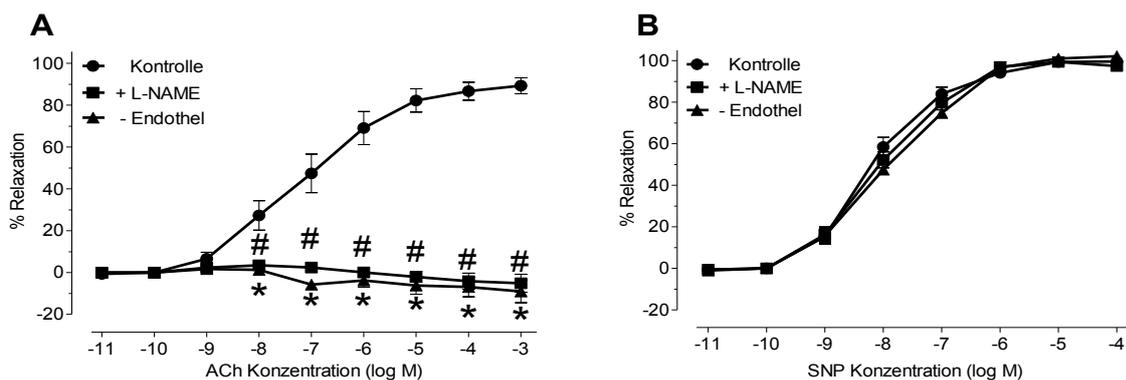


Abbildung 6 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an C57BL/6-Mäusen.

Dargestellt sind die kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an den thorakalen Aortenringen von C57BL/6-Mäusen. Die Versuche wurden als Kontrollversuche ohne weitere Manipulation sowie nach Inkubation mit L-Name, bzw. nach Deendothelialisierung durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse mindestens sechs verschiedener Versuche ($n \geq 6$). Auf der Ordinate ist die prozentuale Vasorelaxation, bezogen auf die maximale PE induzierte Vorkontraktion, gegen die applizierte Konzentration von Ach und SNP (in log M) auf der Abszisse aufgetragen. #, * = $p < 0,05$

6.5.2 Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von eNOS-defizienten Mäusen

Die Abbildung 7 A zeigt, dass Ach an den Aorten eNOS defizienter-Mäuse nicht in der Lage war, eine Vasodilatation zu induzieren. Eine Beeinflussung des Ergebnisses durch L-Name oder Deendothelialisierung fand nicht statt (Kontrolle: $\log EC_{50}$ -7,3 \pm 0,1 maximale Vasodilatation: -13,9 \pm 0,3%, $n \geq 6$; +L-NAME: $\log EC_{50}$ -7,3 \pm 0,1 maximale Vasodilatation -15,3 \pm 0,4%, $n \geq 6$; - Endothel: $\log EC_{50}$ -7,0 \pm 0,2 maximale Vasodilatation: -17,4 \pm 0,5%, $n \geq 6$). SNP hingegen war in der Lage, eine Vasodilatation zu stimulieren (Kontrolle: $\log EC_{50}$ -8,0 \pm 0,1 maximale Vasodilatation: 93,1 \pm 0,8%, $n \geq 6$). So konnte eine generell beeinträchtigte, vasodilatatorische Kapazität der Aorten eNOS-defizienter Mäuse ausgeschlossen werden. Die SNP induzierte Vasodilatation ließ sich weder durch L-Name noch durch Deendothelialisierung inhibieren (Abbildung 10 B), (+L-NAME: $\log EC_{50}$ -8,0 \pm 0,1 maximale Vasodilatation: 96,4 \pm 0,7%, $n \geq 6$; - Endothel: $\log EC_{50}$ -8,1 \pm 0,1 maximale Vasodilatation: 99,4 \pm 0,9%, $n \geq 6$).

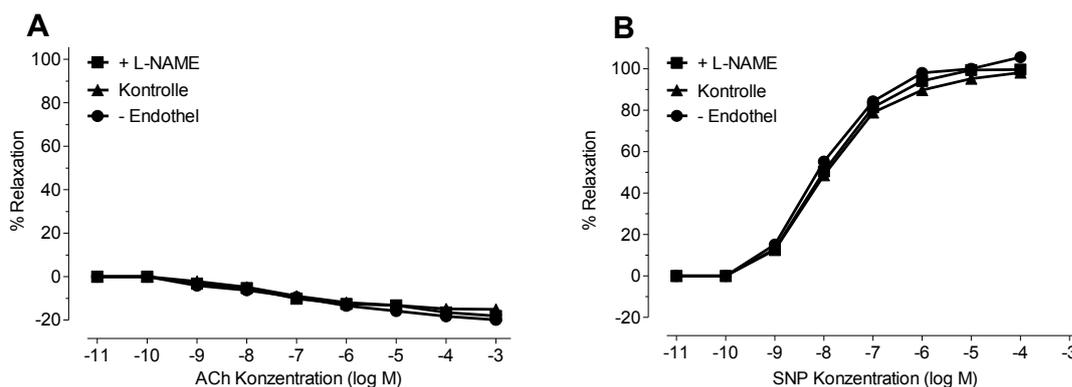


Abbildung 7 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an eNOS-defizienten Mäusen.

Abgebildet sind kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an den thorakalen Aortenringen eNOS-defizienter Mäuse. Die Versuche wurden ohne zusätzliche Manipulation (Kontrolle) sowie nach Inkubation mit L-Name bzw. nach Deendothelialisierung durchgeführt. Auf der Ordinate ist die prozentuale Vasorelaxation, bezogen auf die maximale PE induzierte Vorkontraktion, gegen die applizierte Konzentration von Ach und SNP (in log M) auf der Abszisse aufgetragen. Es wurden mindestens sechs voneinander unabhängige Experimente durchgeführt ($n \geq 6$).

6.5.3 Dosisabhängige Effekte von Ach und SNP auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von S1P₃-defizienten Mäusen

Die Abbildung 8 A zeigt, dass Ach an den Aorten S1P₃-defizienter Mäuse eine dosisabhängige Vasodilatation stimulieren konnte. Dies war nach Applikation von L-Name und Deendothelialisierung nicht der Fall (Kontrolle: logEC₅₀-7,2±0,1 maximale Vasodilatation: 84,4±1,9%, n≥6; +L-NAME: logEC₅₀-7,3±0,1 maximale Vasodilatation -15,6±0,5%, n≥6; - Endothel: logEC₅₀-7,1±0,1 maximale Vasodilatation: -17,7±0,7%, n≥6). SNP konnte eine Vasodilatation induzieren (Kontrolle: logEC₅₀-8,0±0,1 maximale Vasodilatation: 91,7±0,8%, n≥6). Dies war auch nach Applikation von L-Name oder Deendothelialisierung der Fall (Abbildung 11 B), (+L-NAME: logEC₅₀-8,0±0,1 maximale Vasodilatation: 93,1±0,7%, n≥6; - Endothel: logEC₅₀-8,0±0,1 maximale Vasodilatation: 97,0±0,9%, n6≥).

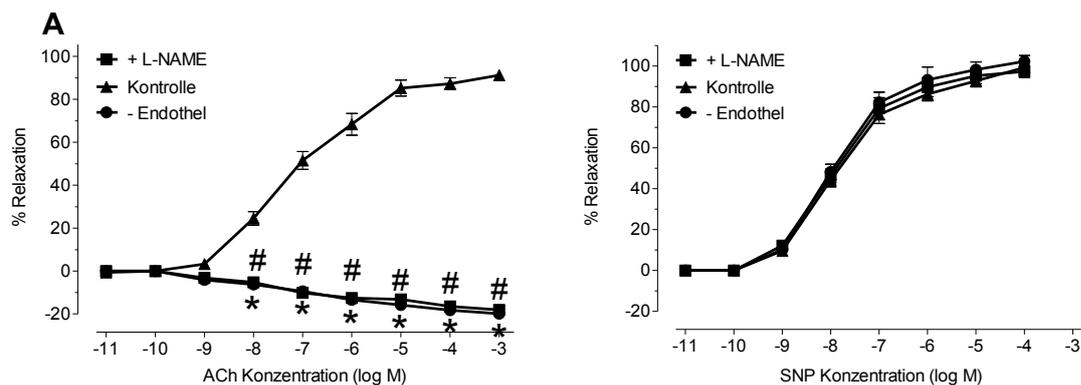


Abbildung 8 A und B: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an S1P₃-defizienten Mäusen.

Dargestellt sind die kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven von Ach und SNP an den thorakalen Aortenringen S1P₃-defizienter Mäuse. Die Versuche wurden ohne zusätzliche Manipulation als Kontrolle durchgeführt sowie nach Inkubation mit L-Name und nach Deendothelialisierung. Es wurden mindestens sechs unterschiedliche Experimente durchgeführt (n ≥ 6). Auf der Ordinate ist die prozentuale Vasorelaxation, bezogen auf die maximale PE induzierte Vorkontraktion, gegen die applizierte Konzentration von Ach und SNP (in log M) auf der Abszisse aufgetragen. #, * =p<0,05

6.6 Vasodilatation an den Aorten von C57BL/6-Mäusen durch LSF

Die folgende Abbildung (Abbildung 9) zeigt den vasodilatatorischen Effekt des Lysophospholipids Lysosulfatid (LSF), welches in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ auf durch PE vorkontrahierte thorakale Aorten von C57BL/6-Mäusen appliziert wurde. LSF war in der Lage, eine signifikante und anhaltende Vasodilatation zu induzieren.

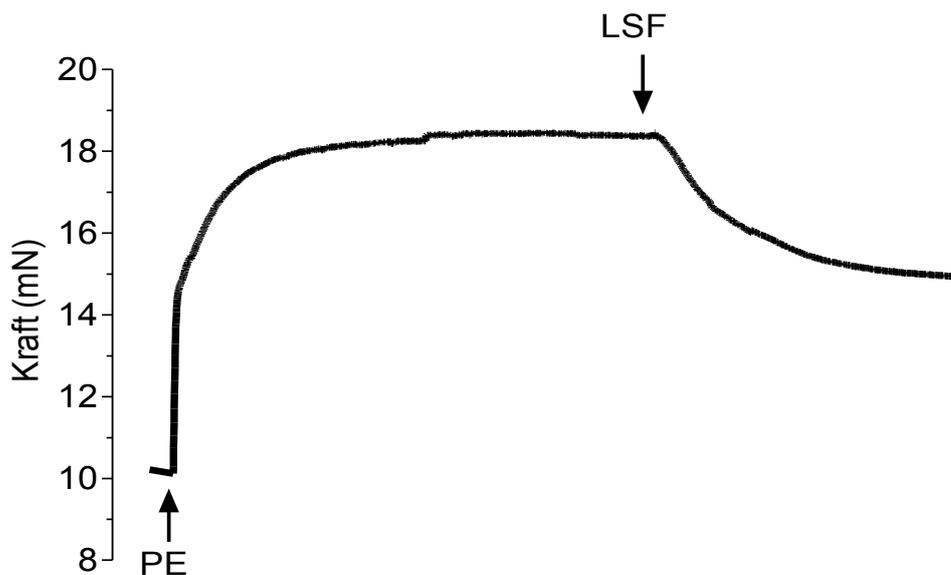


Abbildung 9: Vasodilatation thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen durch LSF.

Abgebildet ist die LSF induzierte Vasodilatation thorakaler Aortenringe von C57BL/6-Mäusen, welche zuvor durch Phenylephrin (1 $\mu\text{mol/l}$) vorkontrahiert wurden. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse von mindestens sechs voneinander unabhängigen Experimenten ($n \geq 6$) am Kleingefäßmyographen dargestellt. Auf der Ordinate ist die Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten auf der Abszisse aufgetragen.

6.7 Ach und LSF vermittelte Effekte auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen mit und ohne Deendothelialisierung/Applikation von L-Name

Die folgende Abbildung (Abbildung 10) zeigt verschiedene Versuchsabläufe.

Zunächst sind die jeweiligen vasodilatatorischen Effekte von Ach und LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen, welche durch PE vorkontrahiert, aber darüber hinaus nicht weiter vorbehandelt wurden, dargestellt (Ach: maximale Vasodilatation $71,5 \pm 3,5 \text{mN}$; LSF: maximale Vasodilatation $37,9 \pm 3,5 \text{mN}$; $n \geq 6$).

Nach chemischer Deendothelialisierung der untersuchten Gefäße und spezifischer Antagonisierung der eNOS mittels L-Name Applikation waren weder Acetylcholin noch LSF in der Lage, eine Vasodilatation zu stimulieren (Ach: maximale Vasodilatation $-7,0 \pm 3,3 \text{mN}$; LSF: maximale Vasodilatation $-3,2 \pm 1,2 \text{mN}$; $n \geq 6$).

Nach chemischer Deendothelialisierung, aber fehlender L-Name Applikation, blieb das Ergebnis unverändert. Es trat weder Ach noch LSF vermittelt eine Vasodilatation der Aortenringpräparationen ein (Ach: maximale Vasodilatation $-11,1 \pm 2,5 \text{mN}$; LSF: $-2,8 \pm 3,1 \text{mN}$; $n \geq 6$).

Anhand dieser Versuchsergebnisse zeigte sich, dass Lysosulfatid, ebenso wie Acetylcholin, die Vasodilatation der thorakalen Aorten in Abhängigkeit eines intakten Endothels vermittelt.

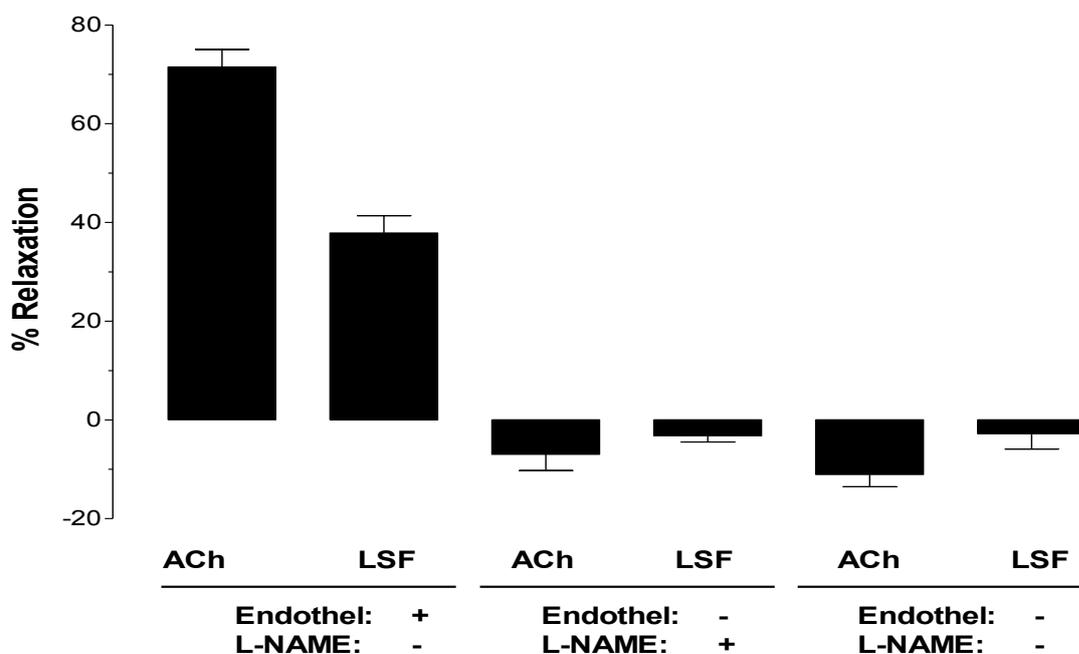


Abbildung 10: Effekte auf den Gefäßtonus thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen durch Ach und LSF mit und ohne Deendothelialisierung/L-Name Applikation.

Abgebildet sind verschiedene Versuchsabläufe, welche die Ergebnisse von jeweils mindestens sechs, voneinander unabhängigen Experimenten ($n \geq 6$), am Kleingefäßmyographen darstellen. Acetylcholin und LSF induzierten jeweils eine signifikante Vasodilatation thorakaler Aortenringe von C57BL/6-Mäusen, welche zuvor durch Phenylephrin ($1 \mu\text{mol/l}$) vorkontrahiert worden waren. Wurden die durch PE vorkontrahierten Gefäße chemisch deendothelialisiert und mit L-Name inkubiert, dann konnten weder Ach noch LSF eine Vasodilatation induzieren. Gleiche Ergebnisse zeigten sich nach ausschließlicher Deendothelialisierung der Gefäße (ohne L-Name Applikation). Auch hier konnten weder Ach noch LSF eine Vasodilatation vermitteln. Dargestellt ist die jeweilige prozentuale Vasorelaxation in Bezug auf die vorherige PE vermittelte Maximalkontraktion.

6.8 Dosisabhängiger Effekt von LSF auf den Gefäßtonus der thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen sowie eNOS- und S1P₃- defizienten Mäusen

Die folgende Abbildung (Abbildung 11) zeigt die kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven von LSF an den thorakalen Aorten verschiedener Tierstämme, welche zuvor durch PE vorkontrahiert wurden.

Zunächst zeigt sich eine dosisabhängige, signifikante Vasodilatation von LSF an den Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen (S1P₃ +/+ : $\log\text{EC}_{50}$ -7,4 \pm 0,1 maximale Vasodilatation: 31,0 \pm 1,2%, $n \geq 6$).

Im Weiteren wurde derselbe Versuchsablauf an den thorakalen Aorten von eNOS- und S1P₃-defizienten Tieren durchgeführt. Bei beiden Tierstämmen war Lysosulfatid nicht in der Lage, eine relevante Vasodilatation an den untersuchten Gefäßen zu entfalten (S1P₃ -/- : $\log\text{EC}_{50}$ -7,1 \pm 0,1 maximale Vasodilatation 3,3 \pm 0,3%, $n \geq 6$; eNOS -/- : nicht kalkulierbar, da kein Effekt, $n \geq 6$). Aus den Ergebnissen dieser Experimente lässt sich ableiten, dass Lysosulfatid seine, wie zuvor dargelegt, endothelabhängigen, vasodilatatorischen Effekte in Abhängigkeit von der endothelialen NO-Synthase entfaltet. Zudem lässt sich sagen, dass die Vasodilatation über den Lysophospholipid-Rezeptor S1P₃ vermittelt wird, da sich die LSF induzierte Vasodilatation bei Abstinenz dieses Rezeptors in den durchgeführten Versuchen nicht nachweisen ließ.

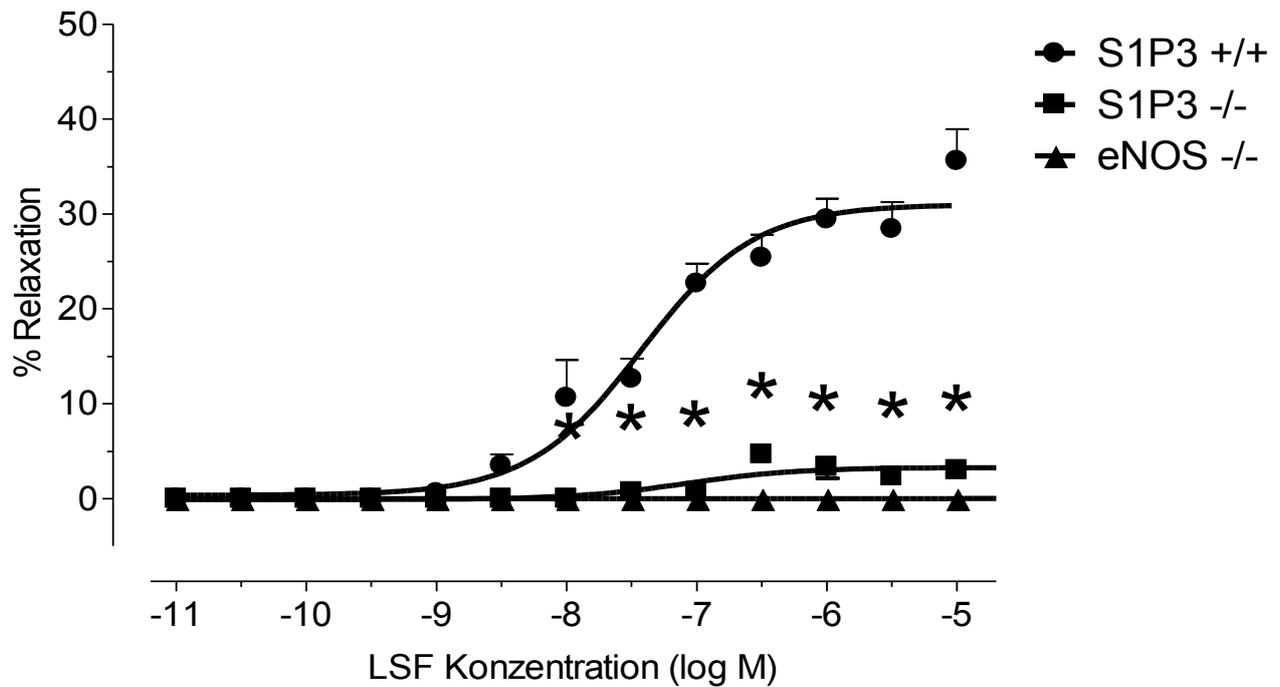


Abbildung 11: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen (S1P3 +/+), eNOS- und S1P₃-defizienten Mäusen.

Abgebildet sind die kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven von LSF, welche mittels des Kleingefäßmyographen an den Aortenringpräparationen verschiedener Tierstämme durchgeführt wurden. Die thorakalen Aorten wurden zunächst jeweils mit PE vorkontrahiert und anschließend ansteigende Konzentrationen von LSF kumulativ appliziert. An den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen zeigte sich eine LSF induzierte, dosisabhängige Vasodilatation. Der gleiche Versuchsablauf wurde auch an den Aorten von eNOS- und S1P₃-defizienten Mäusen durchgeführt. Bei beiden Tierstämmen ließ sich durch LSF keine relevante Vasodilatation induzieren.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von jeweils mindestens sechs verschiedenen Versuchen ($n \geq 6$). Auf der Ordinate ist die prozentuale Vasorelaxation, bezogen auf die maximale PE induzierte Vorkontraktion, gegen die jeweils applizierte Konzentration von LSF in log M auf der Abszisse aufgetragen. * = $p < 0,05$

6.9 Dosisabhängige Vasokonstriktion von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P₃-defizienten Mäusen

Die folgende Abbildung (Abbildung 12) zeigt die kumulativen Dosis-Wirkungs-Kurven von LSF, welche an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P₃-defizienten Mäusen durchgeführt wurden. Die Gefäße verfügten zu Versuchsbeginn jeweils über einen basalen Gefäßtonus, wurden also nicht mittels PE vorkontrahiert.

Es zeigte sich, dass LSF unter diesen Versuchsbedingungen dosisabhängige, vasokonstriktorische Effekte an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen entfaltet (S1P₃ +/+ : logEC₅₀-6,4±0,1 maximale Vasokonstriktion: 14,8±0,8%, n≥6).

Da sich in den zuvor dargelegten Versuchsergebnissen gezeigt hatte, dass LSF als ein Ligand am S1P₃-Rezeptor fungiert und über diesen seine vasodilatatorischen Effekte vermittelt, wurde in einem zweiten Schritt überprüft, ob auch die hier beobachteten vasokonstriktorischen Mechanismen des LSF über den S1P₃-Rezeptor vermittelt werden. In einem gleichen Versuchsablauf wurde die Wirkung von LSF an thorakalen Aorten von S1P₃-defizienten Mäusen untersucht, die nicht durch PE vorkontrahiert waren. Es wurde hierbei eine gleichwertige, dosisabhängige Vasokonstriktion durch LSF beobachtet (S1P₃ -/- : logEC₅₀-6,3±0,1 maximale Vasokonstriktion: 17,4±0,8%, n≥6).

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse lässt sich sagen, dass LSF an thorakalen Aorten, welche sich bei Versuchsbeginn in einem basalen Gefäßtonus befinden, eine Vasokonstriktion induziert, die nicht über den S1P₃-Rezeptor vermittelt wird.

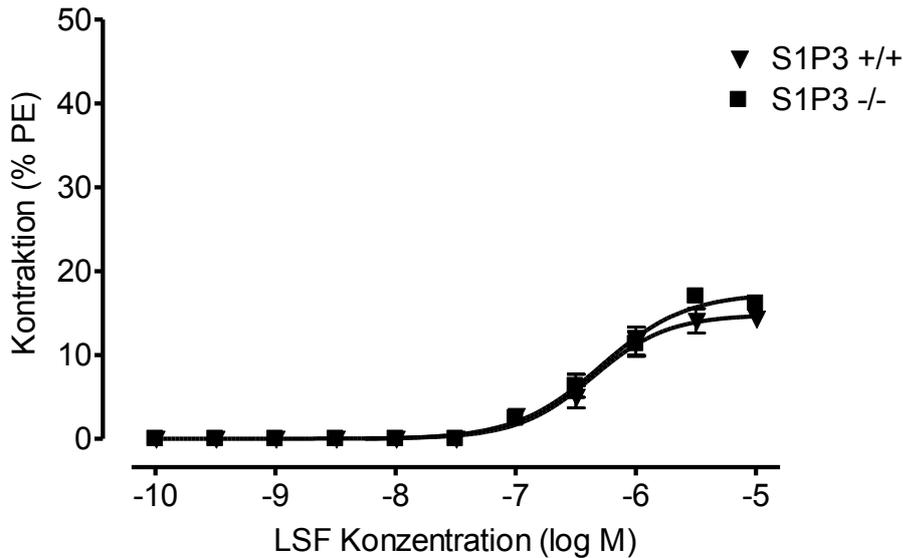


Abbildung 12: Kumulative Dosis-Wirkungs-Kurven von LSF an den thorakalen Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P₃-defizienten Mäusen, welche sich bei Versuchsbeginn in einem basalen Gefäßtonus befanden.

Abgebildet ist die kumulative Wirkung von LSF an den thorakalen Aorten verschiedener Tierstämme, welche sich zu Beginn in einem basalen Gefäßtonus befanden, also nicht mittels PE vorkontrahiert wurden. Mit ansteigender Dosierung induzierte LSF an den Aortenringpräparationen sowohl von C57BL/6-Mäusen (S1P₃ +/+) als auch von S1P₃-defizienten Mäusen eine zunehmende Vasokonstriktion.

Die Abbildungen geben die Ergebnisse von mindestens 6 voneinander unabhängigen Versuchsabläufen ($n \geq 6$) am Kleingefäßmyographen wieder. Auf der Ordinate ist die prozentuale Vasokonstriktion, bezogen auf die maximale PE induzierte Kontraktion, gegen die applizierte Konzentration von LSF in log M auf der Abszisse aufgetragen

7 Diskussion

Im Rahmen der vaskulären Homöostase spielt NO eine bedeutsame Rolle. Zu den atheroprotektiven Effekten zählen die NO vermittelte Vasodilatation sowie die Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Leukozytenadhäsion¹⁷². Die verminderte Bioverfügbarkeit von NO führt zu einem Verlust vasoprotektiver Mechanismen und ist ein wesentliches Merkmal in der Genese der endothelialen Dysfunktion. Diese übernimmt in der Initiation und Progression der Atherosklerose eine zentrale Rolle¹⁷³.

Verschiedene Studien der vergangenen Jahre konnten den Nachweis erbringen, dass Lipoproteine hoher Dichte (HDL) eine Vielzahl endothelialer und atheroprotektiver Effekte vermitteln¹⁷⁴. In der Framingham Studie ergab sich ein inverser Zusammenhang zwischen der HDL Plasmakonzentration und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen¹⁷⁵. Über einen langen Zeitraum wurde die protektive Wirkung des HDL, seiner Rolle im reversen Cholesterintransport, also dem Transport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zur Leber, angerechnet¹⁷⁶⁻¹⁷⁷. Zusätzlich scheinen insbesondere die HDL induzierte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, Erhöhung der NO Bioverfügbarkeit und die dadurch unter anderem vermittelte Vasodilatation einen bedeutenden vasoprotektiven Effekt darzustellen¹⁷⁸. In einer 2002 veröffentlichten Studie wurden die Effekte von rekombinant hergestelltem HDL auf die Endothelfunktion bei Männern mit Hypercholesterinämie untersucht. Die Erhöhung der HDL Konzentration mittels intravenöser HDL Infusion konnte die durch Hypercholesterinämie beeinträchtigte Endothelfunktion, insbesondere die endothelvermittelte Vasodilatation, wieder normalisieren¹⁷⁹. Die Erhöhung der HDL Konzentration im Plasma durch die medikamentöse Therapie mit Fibraten oder Nikotinsäure geht einher mit einem verminderten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse^{180,181,182}.

In weiteren Studien konnten gezeigt werden, dass HDL ein Transportmolekül für potente bioaktive Substanzen, die Lysophospholipide (LPL), darstellt. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gehört ebenso wie Lysosulfatid (LSF) zu den HDL assoziierten Lysophospholipiden¹⁸³⁻¹⁸⁴. In den vergangenen Jahren konnten die vasoprotektiven Eigenschaften, vor allem des S1P, eingehender erforscht werden. Es zeigte sich, dass S1P über die Bindung an den S1P₃ Rezeptor in der Lage ist, zu einer Signalkaskade verschiedener Kinasen zu führen, die über die Aktivierung der Tyrosin-, PI3- und Akt-Kinase zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der eNOS führt. Die Bindung des HDL Moleküls an den SR-BI Rezeptor mittels des Apolipoprotein

A1 könnte die notwendige räumliche Nähe zwischen den HDL assoziierten Lysophospholipiden und den Lysophospholipidrezeptoren herstellen¹⁸⁵⁻¹⁸⁶.

Die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten mit Hilfe des Kleingefäßmyographen an isolierten Aortenringpräparaten verschiedener Tierstämme zeigen, dass auch das Lysophospholipid LSF in der Lage ist, die endotheliale NO-Synthase zu aktivieren und eine Vasodilatation zu induzieren. LSF führte zu keiner Vasodilatation an den Aorten eNOS defizienter Mäuse sowie nach Behandlung der Gefäße mit L-Name, einem Inhibitor der eNOS oder deren chemischer Deendothelialisierung. Die LSF induzierte Vasodilatation ließ sich zudem nicht an Aortenringpräparaten S1P₃-defizienter Mäuse induzieren. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass LSF die eNOS über diesen spezifischen G-Protein gekoppelten Oberflächenrezeptor aktiviert. Die vorliegenden Daten zeigen in ihrer Gesamtheit, dass LSF über die Bindung an einen speziellen Lysophospholipid-Rezeptor, den S1P₃ Rezeptor, die endotheliale NO-Synthase aktiviert und darüber zu einer Vasodilatation führt. LSF ist demnach in der Lage, die endotheliale Bioverfügbarkeit von NO zu erhöhen und darüber als Bestandteil des HDL, vasoprotektive Effekte zu vermitteln.

Hinsichtlich der Wirkung des LSF auf die untersuchten Gefäße ergab sich bei den durchgeführten Versuchen eine weitere wichtige Beobachtung. Der induzierte Effekt ist abhängig von dem Spannungszustand des Gefäßes. Bei einer durch PE vorkontrahierten Aorta rief LSF, wie zuvor dargelegt, eine Vasodilatation hervor. Bei einem basalen Gefäßtonus jedoch eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion. Die vasokonstriktorische Wirkung des LSF scheint jedoch nicht durch den S1P₃ Rezeptor vermittelt zu werden. So wirkte LSF in den durchgeführten Versuchen sowohl an nicht-vorkontrahierten Aortenringpräparationen von Wildtyp Mäusen (C57BL/6- Mäusen) als auch von S1P₃-defizienten Mäusen vasokonstriktorisch. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass LSF bei einem erhöhten arteriellen Gefäßtonus, über den S1P₃ Rezeptor eine Vasodilatation und bei einem basalen Gefäßtonus eine nicht S1P₃ vermittelte Vasokonstriktion bewirkt. In verschiedenen Publikationen wurde, entsprechend der in diesen Versuchen gemachten Beobachtung, ebenfalls von vasokonstriktorisches Effekten eines anderen Lysophospholipids (S1P) berichtet¹⁸⁷⁻¹⁸⁸.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche konnten zeigen, dass auch das Lysophospholipid LSF in der Lage ist, über die Bindung an den S1P₃ Rezeptor zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und damit zu einer Vasodilatation zu führen. Ob die dazwischenliegenden Schritte, denen des bisher gut untersuchten S1P gleichen, müsste in weiteren Studien eingehender untersucht werden.

Die Beobachtung, dass der S1P₃ Rezeptor als ein Rezeptor für die HDL assoziierten Lysophospholipide dient und diese in der Lage sind, vasodilatatorische Eigenschaften zu vermitteln, wirft viele Fragen hinsichtlich der atheroprotektiven Eigenschaften der Lysophospholipide und deren Rezeptoren auf. Neben der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, konnten auch andere gefäßschützende Effekte der LPL, wie die Förderung der Proliferation und Migration und die Hemmung der Apoptose von Endothelzellen, nachgewiesen werden^{189,190,191}. Auch wenn die bisherigen Versuchsergebnisse ein besseres Verständnis für die Mechanismen, über welche HDL seine atheroprotektiven Effekte vermittelt, erlauben, so existieren noch immer wenig Informationen zur Regulation und Funktion der Lysophospholipide und deren Rezeptoren in verschiedenen Stadien der Atherosklerose. So gibt es beispielsweise bisher keine Daten zu den Lysophospholipidkonzentrationen und deren Zusammensetzung im HDL bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

In Versuchen konnte gezeigt werden, dass HDL die zytokininduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 und ICAM-1, hemmt. Obwohl S1P in der Lage ist, verschiedene atheroprotektive Effekte des HDL zu vermitteln, hat sich gezeigt, dass es die Expression proatherogener Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1) und damit die Monozytenadhäsion an Endothelzellen stimuliert. Gleichzeitig wurde im Gegensatz dazu beobachtet, dass S1P über den S1P₁ Rezeptor in der Lage ist, eine TNF α induzierte Adhäsion von Monozyten am Endothel zu inhibieren¹⁹². Die in dieser Studie beobachtete Diskrepanz zwischen der Wirkung des vollständigen HDL Moleküls und des S1P als einem isolierten Bestandteil lässt sich durch Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration sowie der Wirkung auf unterschiedliche Rezeptoren der einzelnen Subfraktionen in der heterogenen HDL Population erklären. Die Vielfalt biologisch aktiver Substanzen, für die HDL einen Transportpartikel darstellt, bedingen dessen Eigenschaften und Funktionen. Neben der Heterogenität des HDL Partikels muss auch die spezifische Ausstattung an Lysophospholipidrezeptoren am Wirkungsort Beachtung finden. Das entsprechende Profil hat Auswirkungen auf die jeweils vornehmlich entfaltete Wirkung der LPL. Die teilweise differierenden Studienergebnisse spiegeln somit die Komplexität, der durch die verschiedenen bioaktiven HDL Komponenten und Rezeptoren induzierten, vielfältigen intrazellulären Signalwege und dadurch induzierten Effekte, wieder. Hinsichtlich der atheroprotektiven Effekte des HDL und seiner Lysophospholipide wird die Notwendigkeit deutlich, in den kommenden Jahren eine Überprüfung der bisher hauptsächlich in vitro gewonnenen Versuchsergebnisse durch in vivo Studien zu bestätigen.

In einigen Studien wurden signifikant höhere Konzentrationen von HDL und seinen Komponenten verwendet, als diese physiologischerweise im Blut vorkommen¹⁹³. Dieser Fakt sollte bei der Bewertung einzelner Studienergebnisse nicht außer Acht gelassen werden, auch wenn von relevanten synergistischen Effekten einzelner Komponenten des HDL in vivo auszugehen ist. Genauere Forschungsergebnisse stehen hinsichtlich der physiologischen LSF Konzentration noch aus und wären dringend notwendig.

Viele bisherige Versuchsergebnisse, auch in dieser Arbeit, wurden aus Studien mit genetisch veränderten Tieren gewonnen. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse sollte die Komplexität genetischer Manipulationen bedacht werden. Dies betrifft die zahlreichen miteinander verwobenen intra- und extrazellulären Signalwege ebenso wie den auf verschiedensten Ebenen gesteuerten Stoffwechsel der untersuchten Substanzen.

Dennoch eröffnen die Erkenntnisse der letzten Jahre, insbesondere die Entdeckung, dass HDL einen Transporter für Lysophospholipide als bioaktive Signalmoleküle darstellt, bereits jetzt neue Perspektiven hinsichtlich der Therapiemöglichkeiten der Atherosklerose und anderer Krankheitsbilder. So weisen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Studien vergangener Jahre darauf hin, dass spezifische S1P Rezeptor Agonisten und Analoga spezifischer Lysophospholipide eine Therapieoption darstellen könnten. FTY720 (Fingolimod) ist ein solches Struktur analogon des S1P. Es aktiviert verschiedene S1P Rezeptoren und wird in einer Phase III Studie bereits als Immunsuppressivum für die Behandlung von Multipler Sklerose getestet. Zudem finden Studien hinsichtlich seiner Einsatzmöglichkeiten zur Prävention der Abstoßung transplanterter Nieren statt^{194,195,196}.

Durch die weiterführende Erforschung der Rolle der Lysophospholipide und ihrer Rezeptoren bei der Vermittlung der atheroprotektiven Eigenschaften des HDL können neue Perspektiven hinsichtlich der Prävention und Behandlung der Atherosklerose ermöglicht werden.

8 Literaturverzeichnis

-
- ¹ Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94: 295-314
- ² Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Cardiovasc Surg* 1994; 9: 361-371
- ³ Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall: an explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 1977; 11: 323-344
- ⁴ Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric-oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92: 3337-3349
- ⁵ Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; 257: 7944-7947
- ⁶ Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membranebound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 859-864
- ⁷ Masaki T. The discovery, the present state and the future prospects of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: 1-4
- ⁸ Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res* 1987; 60: 422-428
- ⁹ Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 1-4
- ¹⁰ Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376
- ¹¹ Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526
- ¹² Kanner JH, Granit R, Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 289: 130-136
- ¹³ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142
- ¹⁴ Walter U. Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the kardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1989; 113: 41-88
- ¹⁵ Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: 81-90
- ¹⁶ Lefler AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 771-776
- ¹⁷ Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78: 225-230
- ¹⁸ Oess S, Icking A, Fulton D. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J* 2006; 396: 401-409
- ¹⁹ Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Cardiovasc Surg* 1994; 9: 361-371
- ²⁰ Geiger M., Stone A, Mason N, Oldham KT, Guice KS. Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 273: 275-281

-
- ²¹ Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064
- ²² Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 876-884
- ²³ Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 32512-32519
- ²⁴ Mineo C, Shaul PW. Caveolins and Caveolae. *Advances in experimental medicine and biology* 2012; Vol 729: 51-62
- ²⁵ Feron O, Saldana F, Michel JB. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 1998; 273: 3125-3128
- ²⁶ Bache RJ. Coronary artery disease: Regulation of coronary blood flow. *Cardiovascular Medicine* 2007. 659-666
- ²⁷ Oess S, Icking A, Fulton D. Subcellular targeting and trafficking of NO synthases. *Biochem J* 2006; 398: 401-409
- ²⁸ Goligorsky MS, Li H, Brodsky S. Relationships between caveolae and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F1-F10
- ²⁹ Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 32512-32519
- ³⁰ Kincer JF, Uittenbogaard A, Dressman J. Hypercholesterolemia promotes a CD36-dependent and endothelial nitric-oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *J Biol Chem* 2002; 277:23525-23533
- ³¹ Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localisation and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000; 275: 11278-11283
- ³² Napoli C, Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LI. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric oxide* 2006; 15: 265-279
- ³³ Ross R. The Pathogenesis of atherosclerosis: an update: a perspective for the 1990`s. *Nature* 1993; 362: 801-809
- ³⁴ Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 546-549
- ³⁵ Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: Nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vasc Pharmacol* 2002; 38, 259-269
- ³⁶ Eberhardt RT, Loscalzo J. In: Loscalzo J, Vita JA. Nitric oxide and the cardiovascular System. Vol.4. Humana Press , Towata NJ 2000, S 273-295
- ³⁷ Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148
- ³⁸ De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumor necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998; 329: 653-657
- ³⁹ Hishikawa K, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96, 3610-3616
- ⁴⁰ Pongnimitprasert N. Atherosclerosis and NADPH Oxidase. *Silpakorn U Sience Tech J* 2009; 3: 13-24
- ⁴¹ Stocker R, Keaney Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478
- ⁴² Ross R. The Pathogenesis of atherosclerosis: an update: a perspective for the 1990`s. *Nature* 1993; 362: 801-809
- ⁴³ 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

-
- ⁴⁴ Ignarro LJ, Napoli C. Novel features on nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 278-287
- ⁴⁵ Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004; 109: 1813-1818
- ⁴⁶ Beckmann JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437
- ⁴⁷ Noll G, Lüscher TF. Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thromb Res* 1994; 74: 45-54
- ⁴⁸ Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced bei Acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051
- ⁴⁹ Ross R. Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126) (Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695
- ⁵⁰ Björkbacka H. Multiple roles of toll-like receptor signalling in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17:527-533
- ⁵¹ Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-1792
- ⁵² Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-434
- ⁵³ Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203
- ⁵⁴ Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874
- ⁵⁵ Yl-Herttuala S. Biochemistry of the arterial wall in developing atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1991; 623: 40-59
- ⁵⁶ Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analyses of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation* 1989; 80: 1747-1756
- ⁵⁷ Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma; a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1370-1380
- ⁵⁸ Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1859-1867) (Falk E, Shah PK, Fuster V. Atherothrombosis and thrombosis-prone plaques. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, et al, editors. *Hurst's the Heart*. 11 th Edition. New York, NY: McGraw-Hill, 2004: 1123-1139
- ⁵⁹ Berenson, GS, Wattingey, WA, Tracey, RE et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol* 1992; 70: 851
- ⁶⁰ Shanti M, Nordet P, Fernadez-Britto JE, Sternby N. Atherosclerosis in children and young adults: An overview of the World Health Organization and International Society and Federation of Cardiology study on Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth study. *Prevention and Control* 2005; 1: 3-15
- ⁶¹ Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1-5. Ohyama N, Nishiyama A, Okamura T. Secondary flow and atherogenesis In: Yoshida Y, Yamaguchi T, Caro GC, Glagov RM, Nerem RM (Eds.). *Role of blood flow in atherogenesis*. Springer, Tokyo. 55-59
- ⁶² Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714

-
- ⁶³ Gibson M, Diaz L, Kandarpa K, Sacks F, Pasternak R, Sandor T et al. Relation of vessel wall shear stress to atherosclerosis progression in human coronary arteries. *Arterioscler Thrombos* 1993; 13: 310-315
- ⁶⁴ Barrett-Connor E, Laakso M. Ischemic heart disease risk in postmenopausal women: effects of estrogen use on glucose and insulin levels. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 531-534
- ⁶⁵ Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M. Cholesterylester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2344-2348
- ⁶⁶ Todesursachenstatistik 2010, Gesundheitsberichtserstattung des Bundes; www.gbe-bund.de
- ⁶⁷ Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924
- ⁶⁸ Koolmann J, Röhm K-H. Taschenatlas der Biochemie. Thieme. 3. Auflage. 2003, 278-279
- ⁶⁹ Barter, Ph. The Role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *Eur Heart J* 2005; 7: F4-F8
- ⁷⁰ Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 404-16
- ⁷¹ Thompson MM, Reed SC, Cockerill GW. Therapeutic approaches to raising plasma HDL-Cholesterol levels. *Nat Clin Pract* 2004; 1: 84-89
- ⁷² Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, McNamara JR, Horvath KV, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2670-2676
- ⁷³ Gotto Jr AM, Brinton EA. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 717-724
- ⁷⁴ Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated Lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 265-271)
- ⁷⁵ Von Eckardstein A, Nofer Jr, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 13-27
- ⁷⁶ Kunitake ST, La Sala KJ, Kane JP. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J Lipid Res* 1985; 26: 549-555
- ⁷⁷ Francone OL, Gurakar A, Fielding CJ. Distribution and functions of lecithin: cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins A-I and D that catalyzes the esterification and transfer of cell-derived cholesterol. *J Biol Chem* 1989; 264: 7066-7072
- ⁷⁸ Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984; 259: 12201-12209).
- ⁷⁹ Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714
- ⁸⁰ Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated levels of lipoprotein (a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol.* 1996; 77: 1179-1184

-
- ⁸¹ Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124: 11-20
- ⁸² Assmann G, Nofer JR. The protective role of HDL. In: Carlson LA, ed. *Lectures in Clinical Atherosclerosis and Dyslipidemia. Part 3*. London: science Press, Current Medical Group; 2005
- ⁸³ Brown BG, Zhao XQ, Chait A. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Eng J Med* 2001; 345: 1583-1592
- ⁸⁴ Rubins HB, Robins SJ, Collins D. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-418
- ⁸⁵ Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. Acceleration of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol*. 2000; 15: 348-354
- ⁸⁶ Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 2003; 108: 661-663
- ⁸⁷ Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005; 115: 1333-42
- ⁸⁸ Assman G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors on atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109:III8-III14
- ⁸⁹ Musliner TA, Long MD, Forte TM et al. Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J.Lipid Res*. 1991; 32: 917-33
- ⁹⁰ Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J.Cell Biol*. 1993;120:1347-56
- ⁹¹ Rye KA, Moira AC, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238
- ⁹² Francone OL, Royer L, Haghpassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res* 1996; 37: 1268-77
- ⁹³ Brewer Jr HB, Remaley AT, Neufeld EB, Basso F, Joyce C. Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1755-1760
- ⁹⁴ Williams DL, Connely MA, Temel RE, Swarnakar S, Phillips MC, de la Llera-Moya M, et al. Scavenger receptor B1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 329-339
- ⁹⁵ Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III8-III14
- ⁹⁶ Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
- ⁹⁷ Cockerill GW, Rye KA, Gamble Jr. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-1994
- ⁹⁸ 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: 73-88

-
- ⁹⁹ Norata GD, Callegari E, Marchesi M, et al. High-density lipoproteins induce transforming growth factor-beta2 expression in endothelial cells. *Circulation* 2005; 111: 2805-2811
- ¹⁰⁰ Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94: 295-314
- ¹⁰¹ Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat med* 2001; 7: 853-857
- ¹⁰² Spiecker LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105: 1399-1402
- ¹⁰³ Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 9142-9
- ¹⁰⁴ Mineo C, Deguchi H, Griffin JH. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-1364
- ¹⁰⁵ Norata GD, Callegari E, Inoue H, et al. HDL induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 871-877
- ¹⁰⁶ Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high-density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001; 276: 34480-34485
- ¹⁰⁷ Tauber JP, Cheng J, Gospodarowicz. Effect of high and low density lipoproteins on proliferation of cultured bovine vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1980; 66: 696-708
- ¹⁰⁸ Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1283-1288
- ¹⁰⁹ Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551
- ¹¹⁰ Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 1999; 340: 115-126
- ¹¹¹ Mackness M, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:383-388
- ¹¹² Sachinidis A, Kettenhofen R, Seewald S, Gouni-Berthold I, Schmitz U, Seul C, Ko Y, Vetter H. Evidence that lipoproteins are carriers of bioactive factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2412-2421
- ¹¹³ Nofer JR, Fobker M, Höbbel G, et al. Activation of phosphatidylinositol-specific Phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochem* 2000; 39: 15199-15207
- ¹¹⁴ Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001; 7: 853-57
- ¹¹⁵ Nofer JR, Levkau B, Wolinska I. Suppression of endothelial cell apoptosis by high-density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *JBC Papers* 2001: 34480-34485
- ¹¹⁶ Koolmann, J, Röhm K-H. *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme. 3. Auflage. 2003, 50-51
- ¹¹⁷ Goetzl EJ, An S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J* 1998; 12: 1589-98
- ¹¹⁸ Lee MJ, Thangada S, Liu CH, Thompson BD, Hla T. Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist. *J Biol Chem* 1998; 273: 22105-22112

-
- ¹¹⁹ Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 265-269
- ¹²⁰ Nofer JR. High-density lipoprotein, sphingosine 1-phosphate, and atherosclerosis. *J Clin Lipid* 2008; 2: 4-11
- ¹²¹ Spiegel S, Milstein S. Sphingosine 1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 397-407
- ¹²² Ito K, Anada Y, Tani M. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 212-217
- ¹²³ Murata N, Sato K, Kon J. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J* 2000; 3: 809-815
- ¹²⁴ Kimura T, Sato K, Kuwabara A. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 31780-31785
- ¹²⁵ Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2004; 279: 20555-20558).
- ¹²⁶ Garcia JG, Liu F, Verin AD, et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*. 2001; 108: 689-701
- ¹²⁷ Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, et al. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 4293-4299
- ¹²⁸ Kimura T, Sato K, Kuwabara A. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 1780-1785
- ¹²⁹ Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1013-1019
- ¹³⁰ Igarashi J, Michel T. Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae, eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275: 32363-32370
- ¹³¹ Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 9142-9
- ¹³² Mineo C, Deguchi H, Griffin JH. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-1364
- ¹³³ Wang W, Graeler M, Goetzl EJ. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. *FASEB J* 2005; 19: 1731-1733
- ¹³⁴ Gomez-Munoz A, Kong J, Salh B, Steinbrecher UP. Sphingosine-1-phosphate inhibits acid sphingomyelinase and blocks apoptosis in macrophages. *FEBS Lett* 2003; 539: 56-60
- ¹³⁵ Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW. Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor-(alpha)-mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 976-981
- ¹³⁶ Kimura T, Tomura H, Mogi C. Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal* 2006; 18: 841-850
- ¹³⁷ Goetzl EJ, Rosen H. Regulation of immunity by lysophingolipids and their G protein-coupled receptor. *J Clin Invest* 2004; 114: 1531-1537

-
- ¹³⁸ Tamama K, Kon J, Sato K, et al. Extracellular mechanism sphingosine 1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* 2001; 353: 139-146
- ¹³⁹ Tamama K, Tomura H, Sato K. High-density lipoprotein inhibits migration of vascular smooth muscle cells through its sphingosine 1-phosphate component. *Atheroscler* 2005;178: 19-23
- ¹⁴⁰ Clair T, Aoki J, Koh E. Autotoxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 2003; 63: 5446-5453
- ¹⁴¹ Liliom K, Sun G, Bunemann M. Sphingosylphosphorylcholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma: a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochem J* 2001; 355: 189-197
- ¹⁴² Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated Lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 265-271
- ¹⁴³ Heringdorf D, Himmel HM, Jakobs KH. Sphingosylphosphorylcholine - biological functions and mechanisms of actions. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1582: 178-189
- ¹⁴⁴ Zhu K, Baudhuin LM, Hong FS, et al. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G-protein coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 2001; 276: 41325-41335
- ¹⁴⁵ Nofer JR, Assmann G. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein-associated lysosphingolipids. *Trends Cardiovasc Med* 2005; 15: 265-271
- ¹⁴⁶ Toda K, Kobayashi T, Goto I, et al. Lysosulfatide (sulfogalactosylsphingosine) accumulation in tissues from patients with metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem* 1990; 55: 1585-1591
- ¹⁴⁷ Schmidt A, Geigenmüller S, Völker W, Buddecke E. The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt → NF-κB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 109-116
- ¹⁴⁸ Schmidt A, Geigenmüller S, Völker W. The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt → NF-κB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 109-116
- ¹⁴⁹ Nofer JR, Geigenmüller S, Gopfert C. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 98-103
- ¹⁵⁰ Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated Lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001; 276: 34480-34485
- ¹⁵¹ Nofer JR, Fobker M, Höbbel G, et al. Activation of phosphatidylinositol-specific Phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochem* 2000; 39: 15199-15207
- ¹⁵² Ishii I, Fukushima N, Ye X. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 321-354
- ¹⁵³ Spiegel S, English D, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 236-242
- ¹⁵⁴ Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1 phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 397-407
- ¹⁵⁵ Dev KK, Mullershausen F, Mattes H, Kuhn RR, Bilbe G, Hoyer D, Mir A. Brain sphingosine-1-phosphate receptors: implication for FTY 720 in the treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 2008; 117: 77-93

-
- ¹⁵⁶ Liu CH, Thangada S, Lee MJ, Van Brocklyn JR, Spiegel S, Hla T. Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1179-1190
- ¹⁵⁷ Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 2007; 1768: 923-940
- ¹⁵⁸ Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 2007; 1768: 923-940
- ¹⁵⁹ Hall A. GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279: 509-514
- ¹⁶⁰ Ryu Y, Takuwa N, Sugimoto N. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002; 90:325-32
- ¹⁶¹ Arikawa K, Takuwa H, Yamaguchi N, Sugimoto N, Kitayama H, Nagawa K, Takechara K, Takuwa Y. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P₂ G Protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular Rac activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 32841-32851
- ¹⁶² Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochem Biophys Acta* 2007; 1768: 923-940
- ¹⁶³ Tolle M, Levkau B, Keul P. Immunomodulator FTY720 induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res.* 2005; 96(8): 913-920
- ¹⁶⁴ Kihara A, Mitsutake S, Mizutani Y, Igarashi Y. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate. *Prog Lipid Res* 2007;46:126-144
- ¹⁶⁵ Zhu K, Baudhuin LM, Hong G. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 2001;276:41325-41335
- ¹⁶⁶ Nyborg, NCB, Mikkelsen EO. In vitro studies on responses to noradrenaline, serotonin and potassium of intramyocardial and mesenteric resistance vessels from Wistar rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7: 417-423
- ¹⁶⁷ Mulvany MJ. Procedures for investigation of small vessels using small vessel myograph. *DMT* 2004
- ¹⁶⁸ Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260: 617-619
- ¹⁶⁹ Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260: 617-619
- ¹⁷⁰ Mulvany MJ, Halpern W. Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 1976; 260: 617-619
- ¹⁷¹ Saiag B, Shacoori V, Bodin P. Free radical involvement in endothelium-dependent responses of the rat thoracic aorta in moderate hypoxic conditions. *Eur J Pharmacol* 1999; 372: 57-63
- ¹⁷² Napoli C, Nigris F, Williams-Ignarro S. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric oxide* 2006; 15: 265-279
- ¹⁷³ Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev* 2003; 8:71-86)
- ¹⁷⁴ Mineo C, Deguchi H, Griffin JH. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98: 1352-1364
- ¹⁷⁵ Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714

-
- ¹⁷⁶ Miller NE, La Ville A, Crook D. Direct evidence, that reverse cholesterol transport is mediated by high density lipoprotein in rabbit. *Nature* 1985; 314: 109-111
- ¹⁷⁷ Shaul PW, Mineo C. HDL action on the vascular wall: is the answer NO? *J Clin invest* 2004; 113: 509-513
- ¹⁷⁸ Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat med* 2001; 7: 853-857
- ¹⁷⁹ Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105: 1399-1402
- ¹⁸⁰ Assmann G, Nofer JR. The protective role of HDL. In: Carlson LA, ed. *Lectures in Clinical Atherosclerosis and Dyslipidemia. Part 3*. London: science Press, Current Medical Group; 2005
- ¹⁸¹ Brown BG, Zhao XQ, Chait A. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Eng J Med* 2001; 345: 1583-1592
- ¹⁸² Rubins HB, Robins SJ, Collins D. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 410-418
- ¹⁸³ Nofer JR, Levkau B, Wolinska I. Suppression of endothelial cell apoptosis by high-density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *JBC Papers* 2001: 34480-34485
- ¹⁸⁴ Nofer JR. High-density lipoprotein, sphingosine 1-phosphate, and atherosclerosis. *J Clin Lipid* 2008; 2:4-11
- ¹⁸⁵ Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278: 9142-9
- ¹⁸⁶ Nofer JR. High-density lipoprotein, sphingosine 1-phosphate, and atherosclerosis. *J Clin Lipid* 2008; 2:4-11
- ¹⁸⁷ Salomone S, Yoshimura S, Reuter U. S1P3 receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *Eur J Pharmacol* 2003; 469: 125-134
- ¹⁸⁸ Ohmori T, Yatomi Y, Osada M. Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. *Cardiovas Res* 2003; 58: 170-177
- ¹⁸⁹ Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, et al. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood* 1999; 93: 4293-4299
- ¹⁹⁰ Kimura T, Sato K, Kuwabara A. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 1780-1785
- ¹⁹¹ Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1013-1019
- ¹⁹² Kimura T, Tomura H, Mogi C. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 37457-37467
- ¹⁹³ Schmidt A, Geigenmüller S, Völker W. The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt->NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 109-116
- ¹⁹⁴ Alewijnse AE, Peters SLM. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: Good, bad, or both? *Europ J Pharmacol* 2008; 585: 292-302

¹⁹⁵ Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH. Lysophospholipid receptors: Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1768: 923-940

¹⁹⁶ Tölle M, Levkau B, Keul P. Immunomodulator FTY 720 induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res* 2005; 29: 913-920

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Susanne Schwarz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wirkung des Lysophospholipids Lysosulfatid als Bestandteil des HDL auf die Aktivierung der NO-Synthase, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Susanne Schwarz

10 Lebenslauf

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

11 Danksagung

*In Liebe meiner Familie und einem
ganz besonderen Menschen*