

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie des Campus  
Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3 in der  
HDL assoziierten Aktivierung der endothelialen NO-Synthase

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anissa Habib-El Chafchak

aus Berlin

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
                          2. Prof. Dr. med. K. Kisters  
                          3. Prof. Dr. B. Kleuser

Datum der Promotion:     09.09.2011

**Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:**

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

## I. Inhaltsverzeichnis

**Inhalt**

<b>Inhalt .....</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Physiologie des Endothels .....	1
1.2. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen .....	1
1.2.1. NO-Synthasen .....	3
1.2.2. Protektive Rolle der endothelialen NO Synthase .....	3
1.2.3. eNOS Domänen, Funktion und Aktivierung .....	3
1.2.4. eNOS Polymorphismus .....	4
1.3. Endotheliale Dysfunktion .....	4
1.4. Atherosklerose .....	5
1.5. High density lipoprotein (HDL) und Atherosklerose.....	7
1.5.1. HDL-Metabolismus .....	8
1.6. Sphingosin-1-Phosphat .....	9
1.6.1. S1P-Rezeptoren .....	12
1.6.2. Die vaskulären Effekte von S1P .....	14
1.7. S1P Agonisten .....	16
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1. Material .....	18
2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	18
2.1.2. Zellen .....	18
2.1.3. Antikörper.....	19
2.1.4. Reaktionssets (Kits).....	19
2.1.5. Filterpapier, Membranen und Säulen .....	19
2.1.6. Chemikalien und Biochemikalien .....	19
2.1.7. Puffer und Lösungen.....	22
2.1.8. Geräte und Laborhilfsmittel .....	23
2.1.9. Verbrauchsmaterial .....	24
2.1.10. Software.....	24
2.2. Methoden.....	25
2.2.1. Der Kleingefäß-Myograph .....	25
2.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von NO aus HUVECs.....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1. Dosisabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin an Aorten von WKY-Ratten .....	36
3.2. Wirkung von HDL .....	38
3.3. Einfluss der eNOS und des Endothels auf die HDL-Wirkung.....	39
3.4. HDL induzierte NO-Produktion .....	42
3.5. Bedeutung der isolierten Lipid- und Proteinfraction.....	43
3.6. Einfluss der einzelnen Lipidkomponenten der Lipidfraktion.....	44
3.7. Bedeutung von Lysphospholipide S1P, SPC und LSF.....	45
3.8. Einfluss von HDL und LPL auf den Vasotonus von S1P <sub>3</sub> -defizienten Aorten.....	46
3.8.1. Wirkung von HDL und S1P .....	47
3.9. S1P-Rezeptor Agonisten .....	49
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>71</b>

**8. Selbständigkeitserklärung .....72**

<b>Abbildung 1:</b> Endotheliale NO-Synthese.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Biosynthese von S1P. ....	11
<b>Abbildung 3:</b> Versuchsanordnung eines Kleingefäß-Myographen.....	26
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung eines Normalisationsvorganges am Kleingefäßmyographen.....	29
<b>Abbildung 5:</b> Zusammenhang zwischen Gefäßinnendurchmesser und Wandspannung.....	30
<b>Abbildung 6:</b> Nicht kumulative DWK von PE an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen. ....	35
<b>Abbildung 7:</b> Kumulative DWK von ACh an vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen. ....	36
<b>Abbildung 8:</b> Wirkung von Acetylcholin und SNP auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen. ....	37
<b>Abbildung 9:</b> DWK von ACh und SNP an thorakalen Aortenringpräparaten von C57/BL-6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	37
<b>Abbildung 10:</b> Wirkung von HDL auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyogrphen. ....	38
<b>Abbildung 11:</b> DWK der HDL-induzierten Vasodilatation an thorakalen Aortenringen von C57BL6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.....	39
<b>Abbildung 12:</b> Wirkung von HDL auf vorkontrahierte thorakale Aortenringe von C57BL6-Mäuse und von eNOS defizienten Mäusen. ....	40
<b>Abbildung 13:</b> Wirkung von HDL auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen nach Hemmung der eNOS und nach Endothelentfernung. ....	41
<b>Abbildung 14:</b> Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der HDL induzierten NO-Produktion an HUVECs.....	42
<b>Abbildung 15:</b> Wirkung der aufgereinigten Lipid- und Proteinfraction des HDL-Moleküls auf den Gefäßtonus thorakaler Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen. ....	43
<b>Abbildung 16:</b> Wirkung der aufgetrennten Komponenten der Lipidfraktion, Cholesterin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus thorakale vorkontrahierter Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	44
<b>Abbildung 17:</b> Wirkung der Lysophospholipide S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen mit und ohne Hemmung der eNOS und Endothelentfernung. ....	46
<b>Abbildung 18:</b> Wirkung der Sphingolipide S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten Aortenringen von C57BL/6 Mäusen und S1P <sub>3</sub> defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen. ....	47
<b>Abbildung 19:</b> Wirkung von S1P auf vorkontrahierte Gefäßstücke einer thorakalen Aorta von WKY Ratten.....	48
<b>Abbildung 20:</b> Wirkung der Sphingolipide HDL und S1P auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten Aortenringen von C57BL/6 Mäusen und S1P <sub>3</sub> defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. * = P < 0,01 vs. Kontrolle.....	49
<b>Abbildung 21:</b> Wirkung von SEW auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyogrphen. ....	50
<b>Abbildung 22:</b> Wirkung von FTY720-P auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyogrphen. ....	50
<b>Abbildung 23:</b> Wirkung von FTY720 und pFTY720 auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.....	51

## III. Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acetyl-CoA:Cholesterol-acyltransferase
AKT-Kinase	Proteinkinase B
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
cAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CETP	Cholesteryl-Ester-Transfer-Proteins
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
ECAT	englisch: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study
EDG	englisch: Endothelial differentiation gene
EDHF	englisch: endothelial derived hyperpolarization factor
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
HDL	englisch: high density lipoprotein
HUVEC	englisch: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IUPHAR	englisch: international union of pharmacology
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LDL	englisch: low density lipoprotein
oxLDL	oxidierte Form des LDL
L-NAME	L-Nitro-Arginin-N-Methyl-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	englisch: mitogen activating protein kinase
MCP-1	englisch: monocyte chemotactic protein 1
MCSF	englisch: monocyte colony stimulating factor
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NO	englisch: Nitric oxide, deutsch: Stickstoffmonoxid
NOS	englisch: Nitric oxide synthase
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
PE	Phenylephrine
PEAT	englisch: platelet-endothelial adhesion factor

PEF	englisch: platelet-endothelial factor
PI-3-Kinase	Phospho-Inositol 3 Kinase
$\gamma$ -INF	$\gamma$ -Interferon
GMP	Guanosin-Mono-Phosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-Mono-Phosphat
GTP	Guanosin-Tri-Phosphat
HDL	englisch "high density lipoprotein"
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
HETE	Hydroxyeicosatetraensäuren
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukin
LCAT	
LDL	englisch „Low density lipoprotein“
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPL	Lysophospholipide
LSF	Lysosulfatid
MCP-1	englisch „Monocyte chemoattractant factor 1“
MCSF	englisch "macrophage colony stimulating factor"
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PEAF	englisch "Platelets endothelial adhesion factor"
PEF	englisch "Platelets endothelial factor"
PLTP	Phospholipid-Transfer-Proteins
PG	Prostaglandin
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> , Prostacyclin
Remodelling	englisch: Umbau
ROS	englisch „reactive oxygen species“
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SOD	SOD
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
SPK 1	Sphingosinkinase 1
SPK 2	Sphingosinkinase 2
SPP 1	Sphingosinphosphohydrolase 1
SPP 2	Sphingosinphosphohydrolase 2



TGF	englisch: Tumor growth factor
TK	Tyrosin Kinase
TNF- $\alpha$	englisch: Tumor necrosis factor $\alpha$
(VA-HIT)	englisch: „High-Density-Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial of the Department of Veterans Affairs
VLDL	englisch: very low density lipoprotein
WKY	Wistar – Kyoto- Ratten

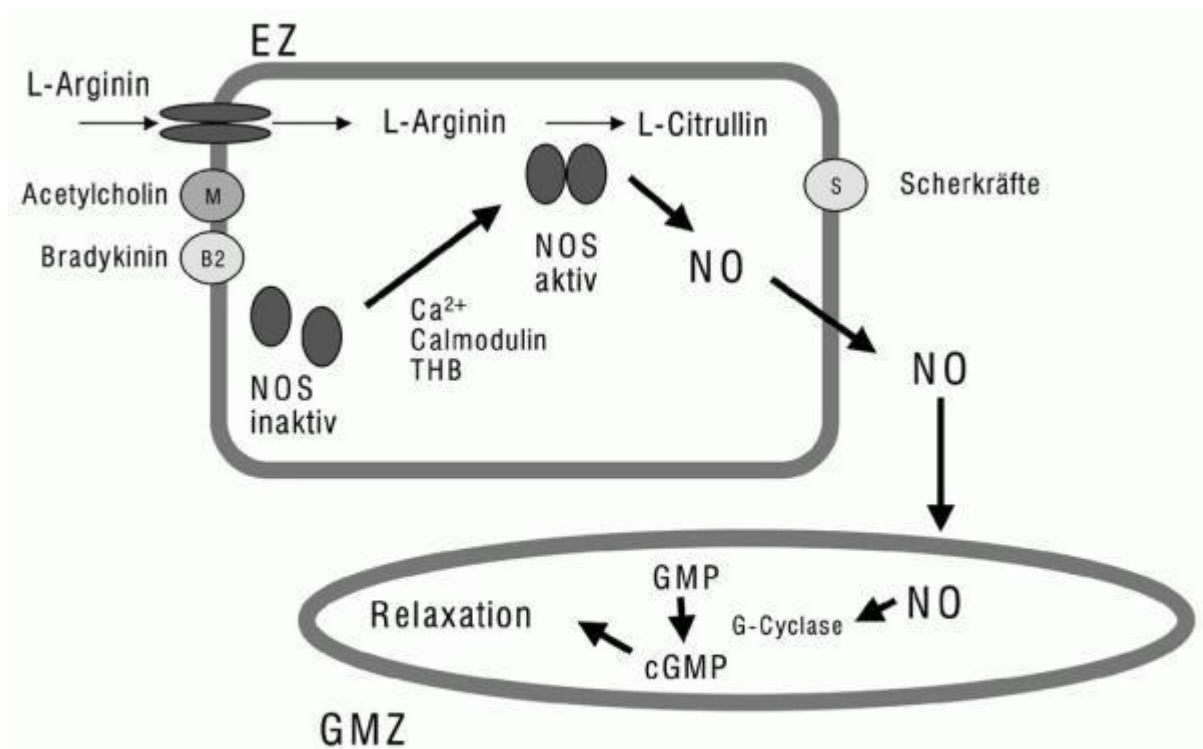
## **1. Einleitung**

### **1.1 Physiologie des Endothels**

Das Endothel stellt eine physikalische Barriere dar, die das intraluminale Blutkompartiment von allen Geweben und Organen des Körpers trennt. Trotz seiner nur mikroskopischen Dimensionen (mit einer Dicke, die häufig geringer als 1µm ist) stellt das Endothel eine lebende „Membran“ und ein multifunktionales, hochspezialisiertes Organ dar. Als Antwort auf verschiedene Substanzen, zirkulierende Hormone, Zytokine und physikalische Reize, wie Scherkräfte, produziert das Endothel verschiedene Faktoren, die die Angiogenese, inflammatorische Antworten, Hämostase und v.a den Gefäßtonus und die Gefäßpermeabilität modulieren. Die vasoaktiven Faktoren beinhalten vasodilatierende Substanzen, wie Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) [1], Stickstoffmonoxid (NO) [2, 3] und „Endothelium derived Hyperpolarizing factor“ (EDHF) [4-6], und vasokonstringierende Substanzen wie Thromboxan A<sub>2</sub> [7], Angiotensin II, Endothelin und reaktive Sauerstoffradikale [8].

### **1.2. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein anorganisches, farbloses, relativ stabiles wasser- und fettlösliches Gas [9] mit einer Halbwertszeit von 2-5 Sekunden [10-12]. NO gehört zur Familie der Nitroso-Verbindungen und wird aus L-Arginin gebildet. Die Reaktion ist stereospezifisch, L-Arginin wird dabei zu NO und L-Citrullin umgewandelt [13, 14]. Das ihm zugehörige Elektron macht aus NO ein hochaktives Radikal, das biologische Membranen durchdringt und leicht mit anderen Substanzen reagiert [15]. In glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert NO die lösliche Guanylat-Zyklase, was zu einem Anstieg von zyklischem Guanosin- Monophosphat (cGMP) mit nachfolgendem Absinken der intrazellulären Kalzium Konzentration führt, wodurch die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen gehemmt wird, also die Gefäßdilataion überwiegt [12, 16].



Festa A et al. Journal für Kardiologie 2003; 10 (10): 409-417 ©

**Abbildung 1:** Endotheliale NO-Synthese

Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der NO-Biosynthese in der Endothelzelle (EZ) und deren Wirkung an der glatten Muskelzelle (GMZ) in der Gefäßwand. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) bildet Calcium-abhängig aus L-Arginin L-Citrullin und NO. NO diffundiert durch die Zellwand aktiviert die Guanylatzyklase, die wiederum aus Guanosin-Monophosphat (GMP) zyklisches GMP (cGMP) bildet. Hieraus resultiert eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle mit nachfolgender Vasodilatation.

NO kann auch direkt Kalzium-abhängige Kalium-Kanäle aktivieren [17], was zu einer endothelabhängigen Hyperpolarisierung der glatten Gefäßmuskelzellen führt und somit in einer Vasodilatation mündet. Zusätzlich zur Regulierung des Gefäßtonus [3] hemmt NO die Leukozytenadhäsion an das Endothel [18], die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [19, 20] und die Plättchenaggregation [21]. Es reguliert die Knochenmasse und die Knochenumwandlung [22], den renalen Sauerstoffverbrauch [23] und die Angiogenese [24, 25]. Diese verschiedenen Funktionen geben dem endothelialen NO einen großen Einfluss auf die Gefäßfunktion und -integrität.

### 1.2.1. NO-Synthasen

NO wird durch eine Familie von drei Isoenzymen (NO-Synthasen = NOS) gebildet, die strukturelle Homologien aufweisen, aber in unterschiedlichen Geweben lokalisiert sind (Typ 1 = neuronale NOS [nNOS] [26]; Typ 2 = induzierbare NOS [iNOS], vorwiegend in Monozyten und Makrophagen [27]; Typ 3 = die endotheliale, konstitutiv exprimierte NOS [eNOS] [28]) und deren Regulationen sich voneinander unterscheiden [29, 30]. Die NO Synthasen kann man dabei in zwei funktionelle Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe ist konstitutiv und besteht aus der endothelialen NO Synthase (eNOS) und der neuronalen NO Synthase (nNOS), die Ca/Calmodulin abhängig sind. Die zweite Gruppe wird durch die induzierbare Form der NOS, die iNOS gebildet, die hauptsächlich von inflammatorischen Zellen nach der Induktion durch Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren exprimiert wird. Die Aktivität der iNOS ist von Calcium abhängig [31, 32].

### 1.2.2. Protektive Rolle der endothelialen NO Synthase

Während die eNOS als ein protektives Enzym angesehen wird [33-36] da sie Stickstoffmonoxid im physiologisch regulierenden Konzentrationsbereich (nmolar) produziert, synthetisiert die iNOS toxische Konzentrationen an NO ( $\mu\text{M}$ ) [37] und kann somit potenziell schädigende Wirkung haben. Die eNOS wird in Endothelzellen [3], Plättchen [16, 38], glatten Muskelzellen, kardialen Myozyten [39], Knochenzellen [22, 40, 41] und Neuronen [42, 43] exprimiert. Die eNOS ist überwiegend in spezifischen Mikrodomänen der Plasmamembran lokalisiert, die als Caveolae bezeichnet werden [44]. Caveolin, ein Netzwerkprotein der Caveolae, inhibiert die eNOS tonisch; die Bindung von Calcium und die Änderung der Acylierung des Enzyms gehen mit einer Änderung der subzellulären Lokalisation der eNOS und ihrer Aktivierung einher [31].

### 1.2.3. eNOS Domänen, Funktion und Aktivierung

Die eNOS ist ein Dimer, bestehend aus zwei identischen Monomeren von 134 kD. Das eNOS Monomer hat zwei funktionell unterschiedliche Domänen, eine N-terminale Oxygenase Domäne mit Bindungsstellen für L-Arginin und BH<sub>4</sub>, die die katalytische Stelle enthält und eine terminale Reduktase Domäne mit Bindungsstellen für NADPH, die Flavine FAD und FMN und Calmodulin (CaM) [45]. Das eNOS Enzym ist nur in seiner dimerischen Form vollkommen funktionsfähig. Die Dimerisierung der eNOS ist von der Bindung von Häm [46] und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), das zur Stabilisierung des Dimers führt [47-50] abhängig. Die Stabilisierung des Dimers ist ebenfalls von Zink Ionen abhängig, die die Integrität der BH<sub>4</sub> Bindungsdomäne bewahren [51]. Die funktionelle Aktivität des eNOS Dimers hängt von der

Anzahl der gebundenen BH4 Moleküle ab. Ein eNOS Dimer ohne BH4 produziert  $O_2^-$ . Die Bindung von einem BH4 Molekül resultiert in einem eNOS Dimer, das fähig ist beides, NO und  $O_2^-$  zu produzieren. Hohe Spiegel an BH4 führen zu einem gesättigten Dimer, das ausschließlich als NO Synthase fungiert [31]. Der erste Schritt in der Synthese von NO ist die Hydroxilierung von L- Arginin zu N-Hydroxy-L-Arginin. Danach wird N-Hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert [52-54].

#### **1.2.4. eNOS Polymorphismus**

Beim Menschen sind aktuell drei verschiedene polymorphe Variationen des eNOS Gens identifiziert worden [55, 56]. Zwei einzelne Nukleotid Substitutionen wurden in den Introns 18 (Ala27Cys) und 23 (Gly10Thr) identifiziert. Ein paar variable Repeat Sequenzen wurden auch in den Introns 4, 13, und 23 lokalisiert. Obwohl ein normales funktionelles Enzym gebildet wird, könnte dieser Polymorphismus zu einer veränderten Transkription und / oder Bearbeitungsrate (processing rates) führen, indem es mit der normalen Enzymfunktion interferiert. Individuen mit einem Polymorphismus in Intron 13 haben beispielsweise ein höheres Risiko für KHK [57], während der Polymorphismus in Intron 4 in einem höheren Risiko für diabetische Nephropathie bei Diabetes Typ 1 mündet [58] und zu einem Fortschreiten der Ig A Nephropathie führt [59]. Es wurde allerdings kein Zusammenhang zwischen Polymorphismus in Intron 4 und KHK gefunden [60, 61].

Der letzte der bekannten Polymorphismen ist auf Exon 7 lokalisiert, Glu298Asp [62]. Einige Studien haben eine Verknüpfung zwischen diesem Polymorphismus und Hypertonie [63, 64], KHK [65] und Koronararterienspasmus [66] hergestellt, während andere keinen Zusammenhang mit KHK [67] oder Hypertonie [68] finden konnten.

Diese Daten sind noch sehr umstritten und die funktionellen Konsequenzen dieser Polymorphismen sind noch nicht geklärt, könnten jedoch für therapeutische Interventionen in Erwägung gezogen werden um die eNOS Funktion wiederherzustellen.

#### **1.3. Endotheliale Dysfunktion**

Der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ wurde erstmals 1980 von Furchgott und Zawadzki [69] in Erwägung gezogen, als sie feststellten, dass eine adäquate Reaktion auf Acetylcholin im Sinne einer Vasodilatation in Aortenringen von hypertensiven Ratten nur in Anwesenheit eines intakten Gefäßendothels möglich war. Bereits 1976 gingen Ross und Glomset [70] in der “Response- to- injury“- Hypothese davon aus, dass es durch Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Hochdruck, Rauchen oder Diabetes zu rezidivierenden

Endothelschädigungen mit Ulzerationen kommt, was in der Folge zur lokalen Aktivierung von Blutplättchen und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren führt. Die Läsion des Endothels wurde als Ursache der Intimahyperplasie, der Akkumulation von Lipiden und der Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque angesehen. Inzwischen ist klar, dass nicht zwangsläufig eine morphologisch erkennbare Läsion des Endothels vorliegen muss, sondern dass neben der anatomischen Integrität der funktionelle Zustand der Endothelschicht für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen von entscheidender Bedeutung ist. Entsprechend der pathophysiologisch veränderten Vorstellungen wurde der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ vorgeschlagen [71, 72], um die phänotypische bzw. funktionelle Veränderung der Eigenschaften des Endothels durch die Einwirkung von Risikofaktoren zu beschreiben. Eine endotheliale Dysfunktion ist durch den Verlust oder die Beeinträchtigung der homöostatischen Mechanismen gekennzeichnet, die im gesunden, nicht aktivierten Endothel wirksam sind. Prinzipiell wird das vasodilatierend wirkende NO konstitutiv, d.h. permanent in basaler Konzentration in den Endothelzellen gebildet, so dass der Gefäßtonus in einem Gleichgewicht zwischen Dilatation und Kontraktion gehalten wird und kontrahierend wirkende Substanzen wie Endothelin, Angiotensin II und Noradrenalin ausbalanciert werden. Jedoch gibt es etliche Faktoren, die die basale Expression und Aktivität beeinträchtigen können, wie z.B. Hypoxie [73], Shear Stress [74], Hormone wie Östrogene [75], oxidiertes LDL [76] und mechanische Kräfte [77]. Dieses empfindliche Gleichgewicht hinsichtlich des Gefäßtonus kann nur aufrechterhalten werden, wenn alle Voraussetzungen für die physiologische NO Produktion optimal erfüllt werden. Sind die Prämissen für die normale Endothelfunktion nicht gegeben, führt eine verminderte Verfügbarkeit von biologisch aktivem NO zur endothelialen Dysfunktion [78].

Charakteristisch für eine endotheliale Dysfunktion sind folglich eine veränderte Vasoreaktivität mit einer Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation, eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine und eine selektive Hyperadhäsivität für Leukozyten und thrombotische Komplikationen, denen ein Missverhältnis zwischen Hämostase und Fibrinolyse zugrunde liegt. Inzwischen konnten die pathologischen Effekte einer gestörten eNOS Produktion und die mangelnde Bioverfügbarkeit von NO als Korrelat der endothelialen Dysfunktion mit Artherosklerose [79-81], Diabetes [82], Herzinsuffizienz [83] und schlechter Wundheilung [25] in Zusammenhang gebracht werden.

#### **1.4. Atherosklerose**

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische progressiv systemische Erkrankung der Gefäßwände mit Ablagerung von Monozyten (Makrophagen), T-Lymphozyten, Proliferation und

Migration von glatten Muskelzellen, Produktion von extrazellulärer Matrix und Neovaskularisation [84-86]. Die Atherogenese wird als eine Art immunologische Antwort auf einen schädigenden Reiz („response to injury“), mit Lipoproteinen oder anderen Risikofaktoren als schädigendes Agens gesehen [86-88]. Die endotheliale Dysfunktion ist dabei ein wesentlicher Grundmechanismus in der Entstehung der Atherosklerose.

Die ersten atherosklerotischen Läsionen werden in Bereichen gefunden, wo ein veränderter und verlangsamter Blutfluss herrscht und an Stellen wo es zu einer Zunahme von Scherkräften und turbulenten Strömungen kommt, wie z.B an Gefäßabgängen [89, 90].

Die Ätiologie der Atherosklerose ist dabei multifaktiell. Epidemiologische Studien in den letzten 50 Jahren haben verschiedenste Risikofaktoren für die Atherosklerose identifizieren können. Die Bedeutung genetischer Faktoren und des Umwelteinflusses wurden dabei vielfach in Familien- und Zwillingsstudien untersucht [91, 92].

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Vererbbarkeit von Atherosklerose bzw. der Anteil der Krankheit, der durch genetische Faktoren erklärt wird innerhalb einer Population meistens über 50% liegt. Andererseits hat man in Migrationsstudien festgestellt, dass die Umwelt einen Großteil der Unterschiede in Bezug auf die Inzidenz der Krankheit in den verschiedenen Bevölkerungen mitbestimmt. Beispielsweise haben Japaner eine weitaus niedrigere Inzidenz für koronare Herzerkrankungen als Amerikaner, wohingegen japanische Amerikaner, die einen westlichen Lebensstil entwickelt haben, die gleiche Inzidenz wie native Amerikaner aufweisen [93]. Die Ursache der Atherosklerose ist somit eine Kombination aus einer ungesunden Umwelt, genetischer Prädisposition und verlängerter Lebenszeit [94-96].

Dennoch können die ermittelten Risikofaktoren in zwei Gruppen unterteilt werden: Einerseits die Faktoren mit einer wichtigen genetischen Komponente und andererseits solche die mehrheitlich umweltbedingt sind.

Bedeutende genetische Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind v.a eine erhöhte Plasmakonzentration an LDL und VLDL, daher stellt die pharmakologische Senkung der Plasmakonzentrationen von Cholesterin und insbesondere des LDL einen wichtigen präventiven Ansatz dar [97]. Weitere Risikofaktoren sind ein erniedrigter HDL-Spiegel [98], erhöhte Konzentrationen an Lipoprotein (a) [99], arterieller Hypertonus [97, 100], erhöhte Konzentrationen an Homocystein [101], positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen [92], Diabetes und Adipositas, speziell das metabolische Syndrom [94, 96], erhöhte Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren [97, 102-104], Depression und andere Verhaltensstörungen [105], männliches Geschlecht [106], systemische Entzündungsprozesse,

insbesondere erhöhte Konzentrationen an inflammatorischen Molekülen wie C-reaktives Protein (CRP) [107-109] oder reaktive Sauerstoffradikale [110].

Vorwiegend Umweltbedingte Risikofaktoren sind u.a stark fetthaltige Ernährung [97, 104], Nikotinabusus [97], niedrige Konzentrationen an antioxidativen Substanzen wie Vitamin C und E [111, 112], Bewegungsmangel [113, 114] und infektiöse Erkrankungen, v.a Herpesviren, Zytomegalieviren, Chlamydia Pneumoniae u.a [115].

Zusätzlich kompliziert wird das Ganze durch Interaktionen zwischen den einzelnen Risikofaktoren, da sich diese meistens nicht nur additiv zueinander verhalten; beispielsweise werden die Effekte von arterieller Hypertonie auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit durch das zusätzliche Vorhandensein von erhöhten Plasma LDL Spiegel deutlich verstärkt [94].

### **1.5. High density lipoprotein (HDL) und Atherosklerose**

Es gibt eine inverse und unabhängige Beziehung zwischen der HDL-Plasmakonzentration und dem Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln [116]. Mehr als 40 % der Patienten mit einem Myokardinfarkt haben eine erniedrigte HDL-C-Plasmakonzentration. Eine erniedrigte HDL-Plasmakonzentration ist somit ein eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor [117-122]. Dies konnte u.a in der prospektiven und multizentrischen „European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities (ECAT) Angina Pectoris Study“ [123] gezeigt werden. Eine niedrige HDL und Apo AI-Plasmakonzentration sind bedeutende biochemische Risikofaktoren für die Inzidenz eines akuten Koronarsyndroms bei Patienten mit einer angiographisch gesicherten koronaren Herzkrankheit [123]. Folglich wurden per Konvention Normwerte für die HDL-Konzentration festgelegt. Diese sollte bei Männern über 35 mg/dl (0,9 mmol/l) und bei Frauen über 45 mg/dl (1,15 mM) liegen. Die Assoziationsstärke zwischen HDL-C-Plasmakonzentration und dem Atheroskleroserisiko hängt aber deutlich vom Vorliegen weiterer Risikofaktoren ab. Daher sind die Grenzwerte für die HDL-Plasmakonzentration bei Vorliegen eines Diabetes mellitus, einer Hypercholesterinämie, eines Hypertonus oder multiplen Risikofaktoren deutlich höher anzusetzen. Zu niedrige HDL-C-Plasmakonzentrationen sind als die häufigste familiäre Dyslipoproteinämie bei Patienten mit einem frühzeitigen Myokardinfarkt bekannt [124]. In der „Helsinki Heart Study“ [125] und in der „High-Density-Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial of the Department of Veterans Affairs (VA-HIT)“ [126], konnte gezeigt werden, dass eine Anhebung der HDL-C-Plasmakonzentration mit Hilfe des Fibrates Gemfibrozil eine signifikant präventive Wirkung auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit hat. Somit stellt heute das HDL-C einen äußerst bedeutenden Faktor im



Algorithmus zur Feststellung des kardiovaskulären Gesamtrisikos dar und dient gleichzeitig als ein wichtiger Ansatzpunkt in der Therapie der Atherosklerose [103, 127, 128].

### 1.5.1. HDL-Metabolismus

Lipidreiche  $\alpha$ -HDL entstehen aus lipidarmen Partikeln oder aus lipidlosen Apolipoproteinen [129-131]. Diese lipidarmen HDL-Vorstufen werden entweder als naszentes HDL von Hepatozyten [132] und der intestinalen Mukosa [133] gebildet, dissoziieren von Chylomikronen und „Very low density lipoproteins“ (VLDL) während der Lipoproteinlipase gesteuerten Hydrolyse von Triglyzeriden [134, 135] oder sie werden durch die Interkonversion von HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> durch den Einfluß des Cholesteryl-Ester-Transfer-Proteins (CETP) [136, 137], des Phospholipid-Transfer-Proteins (PLTP) [138] und der hepatischen Lipase [139] gebildet. Lipidfreie Apolipoproteine oder lipidarme Partikel nehmen Phospholipide und unverestertes Cholesterol von hepatischen und nicht hepatischen Zellen auf [140]. Unklar ist, ob diese Lipidaufnahme intra- oder extrazellulär stattfindet. Lipidfreie Apolipoproteine induzieren einen Phospholipid- und Cholesterolefflux aus verschiedenen Zellen, einschließlich Hepatozyten und Makrophagen, was für einen extrazellulären Zusammenbau spricht [141, 142]. Makrophagen, Hepatozyten und Fibroblasten sind in der Lage lipidfreie Apolipoproteine, HDL und Chylomikronen remnants zu internalisieren und im Anschluss veresterte Apolipoproteine zu sezernieren [143, 144]. Dieser physiologische Prozess wird als Retroendozytose bezeichnet, was eine intrazelluläre Bildung in diesem Zusammenhang wahrscheinlich macht. Lipidarme HDL Vorläufermoleküle werden zu reifen, lipidreichen  $\alpha$ -LpA-I Molekülen durch die Aufnahme von Phospholipiden und unverestertem Cholesterol, das sowohl von Zellen als auch von ApoB-tragenden Lipoproteinen transportiert wird, durch eine Lecithincholesterolacyltransferase (LCAT) gesteuerte Esterbindung und durch die Beteiligung von verschiedenen Apolipoproteinen [145, 146]. Die initial entstehenden Moleküle sind kleine HDL<sub>3</sub> Partikel, die durch Veresterung mit Cholesterol durch die LCAT und Fusion mit anderen HDL<sub>3</sub> Partikeln durch das PLTP und durch die PLTP gesteuerte Aufnahme von Remnants, die der Oberfläche von triglyceridreichen Lipoproteinen anhaften, zu größeren HDL<sub>2</sub>-Molekülen werden [147]. Die Lipide oder Proteine des  $\alpha$ -HDL-Moleküls werden durch 2 direkte Wege aus der Zirkulation entfernt, die die direkte Aufnahme von Lipiden durch den scavenger receptor B1 (SR-B1) und die Holopartikel Wiederaufnahme durch den ApoE und ApoA-I Rezeptor einschließen. Daneben gibt es noch 2 indirekte Wege, bei denen das CETP, die hepatische Lipase und die endotheliale Lipase beteiligt sind [148, 149]. Die Entfernung der Lipide des HDL<sub>2</sub> durch den Scavenger receptor BI, das

Cholesterol-Ester-Transfer-Protein und der hepatischen Lipase, die folgende Konversion von HDL<sub>2</sub> zu HDL<sub>3</sub> und die Konversion von HDL<sub>3</sub> zu HDL<sub>2</sub> durch das PLTP generiert prä-β1-LpA-I- oder lipidfreie ApoA-I-Moleküle [136, 137, 139]. Diese kleinen Apolipoproteine oder Partikel können aus dem Plasma in den extravaskulären Raum austreten, wo sie als Akzeptoren für zelluläre Lipide dienen und damit wiederholt die Bildung von HDL-Molekülen veranlassen [129-131]. Diese kleinen Partikel werden in den Nieren glomerulär filtriert und dem Plasma entzogen. In diesem Zusammenhang spielt der so genannte „reverse cholesterol transport“ (RCT) ebenfalls eine bedeutende Rolle. Der RCT beschreibt den Metabolismus und einen wichtigen antiatherogenen Mechanismus des HDL, nämlich die HDL-gesteuerte Entfernung des Cholesterols von nicht hepatischen Zellen und dessen Transport zur Leber und steroidabhängigen Organen (Ovar, Nebennierenrinde etc.), in denen das Cholesterin zum Aufbau von Lipoproteinen, Gallensäuren, Vitamin D und Steroidhormonen gebraucht wird [150, 151]. Ungefähr 9 mg Cholesterin pro Kilogramm Körpergewicht wird von peripheren Zellen täglich produziert, welches zu den oben genannten Erfolgsorganen transportiert werden muss [152]. Eine Veränderung der physiologischen Regulation des RCT scheint ein wichtiger Mechanismus für die Generierung atherosklerotischer Veränderungen zu sein.

### **1.6. Sphingosin-1-Phosphat**

Die biologisch aktive Form der Sphingomyelin Metaboliten (SMM), Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ist ein wichtiger Lipidmediator, der bei Zellaktivierung aus Membran- Phospholipiden als Teil des Sphingomyelin Zyklus neben anderen Lipidmediatoren wie Sphingosylphosphorylcholin (SPC), Sphingosin und Ceramiden gebildet wird [153-155]. Sphingomyelin (SM) wird durch die Sphingomyelinase zu Ceramid, Sphingosin, und Sphingosin-1-Phosphat metabolisiert (S1P) [153]. Die Teilung von SM durch die Sphingomyelinase ergibt Ceramid, welches als Lipidmediator an zellulären Stressantworten und Apoptose beteiligt ist. Die weitere Metabolisierung von Ceramid durch die Ceramidase führt zur Bildung von Sphingosin, welches wiederum durch Phosphorylierung durch die Sphingosin Kinase zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) umgewandelt wird [153, 156, 157].

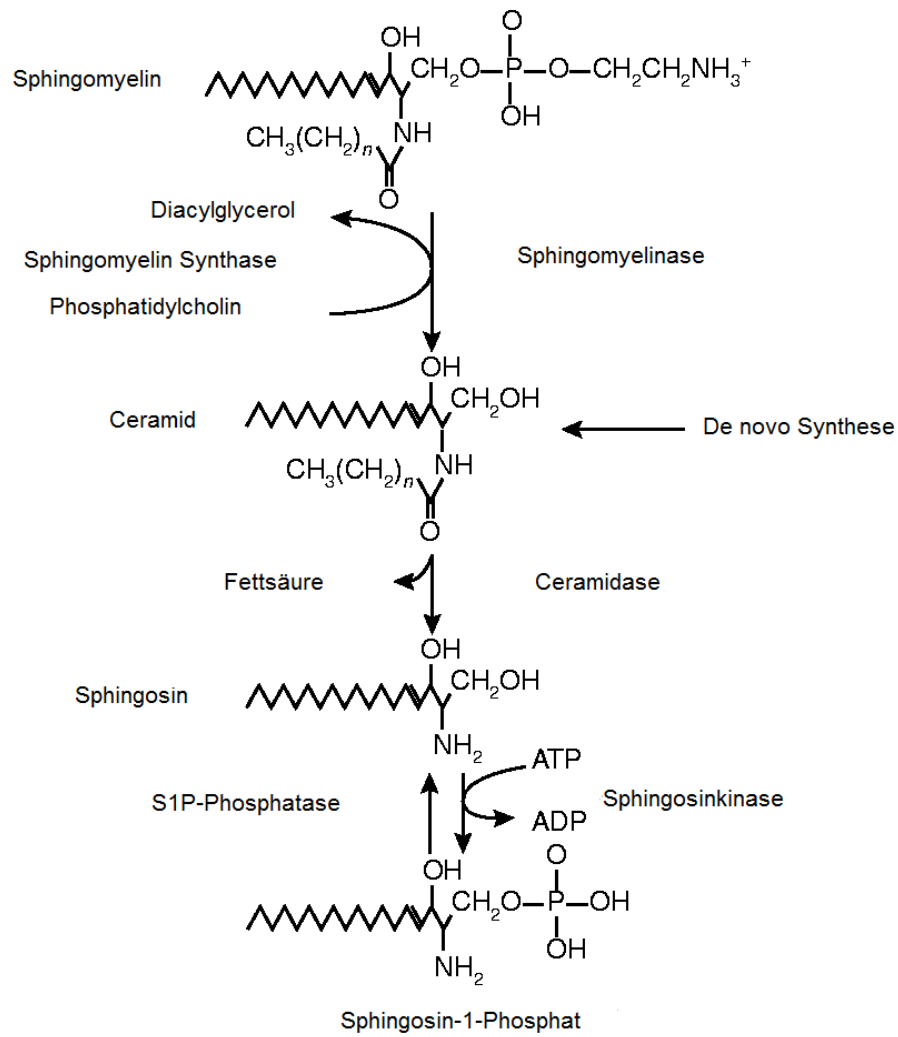
Die Plasma Konzentration von S1P liegt bei ca 200nM und verdoppelt sich im Serum auf ungefähr 500nM [158]. Die Hauptquelle für S1P im Plasma und Serum sind die Blutplättchen, jedoch sezernieren auch andere Blutzellen S1P, darunter Monozyten, Mastzellen und Endothelzellen [159]. Es werden hohe Konzentrationen an S1P in den Plättchen gespeichert, was an dem Vorhandensein der Sphingosinkinase und der Abwesenheit der Sphingosin-Lyase liegt [160]. Die Sphingosin-Kinase bildet S1P aus Sphingosin und den im Überschuss

vorhandenen Lipiden der Zellmembran, während die Sphingosin Lyase den Abbau und somit die Inaktivierung von S1P zu Hexadecanal und Ethanolaminphosphat katalysiert. Blutplättchen sind die einzigen Zellen, die die Sphingosin Lyase nicht exprimieren [158, 161]. Thrombotische Stimuli, wie z.B ADP, Thrombin oder Kollagen induzieren eine Plättchenaktivierung und führen zusammen mit der Plättchen Aggregation zur Freisetzung von S1P in den Extrazellularraum [160, 162, 163].

S1P ist im Plasma und im serum an Carrier Proteine wie Albumin gebunden [158] ebenso wie an Lipoproteine, speziell die High Density Lipoproteine (HDL) [164, 165] und oxidierten Low Density Lipoproteinen (oxLDL) [158].

Zusätzlich zum Serum und Plasma wird S1P in vielen anderen Organsystemen wieder gefunden, beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, im reproduktiven system, im Pulmonalen Sytem und den endokrinen Organen [166].

S1P hat einmalige Eigenschaften, da es sowohl als intrazellulärer sowie als interzellulärer Messenger fungieren kann [167-170]. Bis jetzt sind die intrazellulären Effekte von S1P noch nicht ganz geklärt, da die vermeintlichen intrazellulären Zielstrukturen, die diese Effekte vermitteln noch nicht vollständig identifiziert wurden [167, 170]. Die extrazellulären Effekte von S1P werden über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt.



**Abbildung 2:** Biosynthese von S1P. Modifiziert nach Pyne & Pyne (Sphingosin-1-Phosphate signalling in mammalian cells, 2000)

### 1.6.1. S1P-Rezeptoren

Die Existenz eines extrazellulären S1P Rezeptors wurde erstmalig in den frühen 90er Jahren erwähnt. Tatsächlich implizierten die ersten Untersuchungen zur S1P Wirkung die Beteiligung eines heterotrimeren G Proteins und kleiner GTPasen der Rho Familie [171-175]. Inzwischen ist klar, dass S1P an 5 verschiedene G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bindet und dies mit Affinitäten, die zwischen 2 – 63 nM betragen.

Der erste identifizierte S1P Rezeptor war der S1P1 (EDG-1) Rezeptor [176, 177]. Bereits kurze Zeit nach dem Klonen des ersten S1P Rezeptors wurden nacheinander die S1P2 (früher Edg-5), S1P3 (früher Edg-3), S1P4 (früher Edg-6) und S1P5 (früher Edg8) Rezeptoren geklont [168].

Lange Zeit wurden diese Rezeptoren als „endothelial differentiation gene“ (EDG) Rezeptoren bezeichnet, weil das korrespondierende Gen in sich differenzierenden Endothelzellen reichlich exprimiert wurde [178, 179]. Zu der Zeit waren die Liganden für die Rezeptoren noch unbekannt. Später stellte sich dann S1P als Ligand mit einer hohen Affinität für den EDG-1 Rezeptor heraus [176, 180, 181]. Die anderen Rezeptoren in dieser Subfamilie binden sowohl S1P als auch strukturell ähnliche Lysophospholipide, wie die Lysophosphatidsäure (LPA) als hoch affine Liganden. 2002 wurden nach der „International union of pharmacology“ (IUPHAR) die Rezeptoren nach dem Namen des stärksten natürlichen Agonisten benannt, welchem eine arabische Zahl folgt [182].

Somit kann man die mittlerweile 8 Rezeptoren in zwei verschiedene Gruppen einteilen: Die S1P-Rezeptoren, welche als stärksten natürlichen Agonisten das Sphingosin-1-Phosphat haben (S1P1/EDG-1, S1P2/EDG-5/H218/AGR16, S1P3/EDG-3, S1P4/EDG-6 und S1P5/EDG-8) und die LPA-Rezeptoren, welche die Lysophosphatidsäure als stärksten natürlichen Agonisten haben (LPA1/EDG-2, LPA2/EDG-4, LPA3/EDG-7) [183]. Die Einteilung durch die Nummerierung erfolgte entsprechend der zeitlichen Abfolge der Beschreibung [182]. Die grundlegenden Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren liegen primär an ihrem Kopplungsverhalten gegenüber den G-Proteinen.

#### S1P1 Rezeptor

Der S1P1 Rezeptor ist ein heptahelikaler transmembranöser Rezeptor und wird ubiquitär exprimiert. Windh et al. konnten 1999 zeigen [184], dass S1P1 ausschließlich an ein heterotrimeres, inhibitorisches G-protein (Gi) bindet.

Gi ist Pertussis Toxin sensibel und besteht aus zwei Untereinheiten, Gi $\beta\gamma$  und Gi $\alpha$ .

Über die die  $\beta\gamma$  Untereinheit des Gi kommt es zur Aktivierung von PLC, PI3K und Ras. Letzteres stimuliert die Phosphorylierung der Erk [185]. Die PI3K aktiviert die Akt, die durch

Phosphorylierung des S1P1 Rezeptors zur Aktivierung der Rac- vermittelten Signalkaskade führt [171, 172, 186].

Über die  $\alpha$ -Untereinheit des Gi wird die Adenylatzyklase (AC) gehemmt [181].

Zusätzlich zu dem heterotrimeren Gi- Protein, kann S1P1 an die kleinen GTPasen Rho und Rac koppeln: Es wurde gezeigt, dass die S1P induzierte morphogenetische Differenzierung und der Anstieg der P-Cadherin Konzentrationen S1P1/Rho abhängig sind [187].

Bei der Wundheilung spielt der S1P1 Rezeptor eine tragende Rolle in der Angiogenese und der morphogenetischen Ausdifferenzierung der Endothelzellen in einen kapillar- ähnlichen, tubulären Phenotyp [186]. Hierbei fungiert S1P als Wachstumsfaktor, zusammen mit „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), und fibroblast growth factor [158, 188]. Des Weiteren induziert der S1P1 Rezeptor die Zellproliferation und - Migration [25, 186, 189]. Dabei stellt S1P einen der potentesten Induktoren der Chemotaxis für Endothelzellen in vitro dar [189].

S1P1 reguliert die zytoskelettale Organisation in den Zellen. Zum Beispiel läuft die S1P induzierte interzelluläre junctionale Positionierung der VE-Kadherine und des kortikalen Aktins über diesen Rezeptor.

Der S1P1 Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung und Erhöhung der Gefäßintegrität, indem S1P über diesen Rezeptor der vermehrten Endotheldurchlässigkeit entgegenwirkt [190, 191]. Bei S1P1 defizienten Mäusen führte das Fehlen des S1P1 Rezeptors zur ungenügenden Gefäßreifung [192, 193].

### **S1P2 Rezeptor**

Ähnlich dem S1P1-Rezeptor ist der S1P2-Rezeptor ein heptahelikaler und ubiquitär vorkommender Rezeptor. Er ist ebenfalls an G-Proteine, wie Gi-, Gq- und G12/13-heteromere Proteine gekoppelt [184].

Über das Gi Protein wird beispielsweise die Erk aktiviert, wohingegen die PLC, anders als beim S1P1 Rezeptor, direkt über das Gq-Protein aktiviert wird [194] und so zur Alteration der intrazellulären Ca Konzentration führt. Des Weiteren wird die Rho über das G12/13 Protein aktiviert [185, 195, 196]. Diese Familie der GTPasen sind wichtige Regulatoren des Aktin Zytoskeletts und der Zell Motilität [197]. Weitere Signaltransduktionswege sind über Ras/MAPK, AC Rho, JNK und p38-MAP- und die AKT-Kinase zwischengeschaltet. In Melanomzellen [198] und glatten Gefäßmuskelzellen [199-201] hemmt S1P über diesen Rezeptor die Migration [202-204]. Dieser Effekt konnte mittlerweile durch JTE013, einem spezifischen S1P2 Antagonisten, verhindert werden [205].

### **S1P3 Rezeptor**

Der S1P3 Rezeptor wird im Gefäßsystem sowohl von Endothelzellen als auch von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und koppelt zusätzlich zu dem Gi an Gq und G13 [184]. Obwohl S1P2 und S1P3 beide über die gleichen G Proteine agieren, stimuliert dieser Rezeptor, anders als S1P2, die Zellmigration [206, 207] und führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von Endothelzellen [263]. Die Kopplung an Gi führt über die Aktivierung der Rac zur Zellmigration, während die Kopplung an G12/13 über eine Rho abhängige Hemmung der Rac zur Hemmung der Zellmigration führt, so dass vermutet wird, dass die Kopplungsaffinität der beiden Rezeptoren entsprechend ihrer Wirkung jeweils zu Gi für S1P3 und zu G12/13 für S1P2 höher sein muss [206, 207]. Diese Hypothese wird unter anderem dadurch bekräftigt, dass die Rho Stimulation durch S1P in embryonischen Fibroblasten bei S1P2 knock-out Mäusen gestört ist [208, 209].

### **S1P4 Rezeptor**

S1P4 wird im Lymphatischen und hämatopoetischen System exprimiert und koppelt an Gi. Darüber kommt es zur Aktivierung der ERK [210] und der PLC [211]. Zusätzlich koppelt der Rezeptor an G12/13 [212]. Außerdem aktiviert S1P4 Cdc42, ein Mitglied der Rho Familie der GTPasen [213].

### **S1P5 Rezeptor**

S1P5 wird im zentralen Nervensystem exprimiert und koppelt an Gi. Darüber führt er zur Hemmung der AC [214, 215]. Zusätzlich aktiviert er die c-jun N-terminale Kinase (JNK) und hemmt die Aktivierung der ERK über das G12 [215].

#### **1.6.2. Die vaskulären Effekte von S1P**

Die Exprimierung von S1P1 und S1P3 wurde in humanen Umbilikalen Zellen festgestellt, während S1P1 und S1P2 in Mikrovaskulären Endothelzellen von Rinderpulmonalarterien gefunden wurden [25, 186, 216]. Da die Plasma Konzentrationen an S1P höher als die der S1P Rezeptoren auf Endothelzellen ist, besteht eine Grundstimulation solcher Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen [25].

S1P ist ein potenter Induktor für das Überleben von Endothelzellen. Mangel an Wachstumsfaktoren und pharmakologische Stressoren induzieren die Apoptose von Endothelzellen über den klassischen Kaspase abhängigen Transduktionsweg. Extrazelluläres S1P

antagonisiert dies durch einen Signaltransduktionsweg, der die Aktivierung eines inhibitorischen G-Proteins und einer MAP Kinase benötigt. [25]. Die Aktivierung von Endothelzellen durch S1P führt zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), was weiterhin über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zur Vasorelaxation führt. Die Behandlung von Endothelzellen mit S1P führt zu einer PI-3-Kinase abhängigen Phosphorylierung des Proteinkinase B/Akt Enzyms, welches die endotheliale NO Synthase direkt phosphoryliert und dadurch die Bildung von NO durch Endothelzellen bewirkt [172, 216]. In bestimmten Gefäßbetten wie den mittleren zerebellären Arterien, den Koronararterien und den Nierenarterien kann S1P auch als Vasokonstriktor wirken [217-219]. Je nach Expressionsmuster des S1P Rezeptor Subtyps in den Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen, scheint S1P den Gefäßtonus als Vasodilatator oder Konstriktor zu modulieren.

Die Angiogenese, d.h die Gefäßneubildung, ist ein physiologischer Mechanismus, der durch die Wundheilung, Gewebewachstum und regenerative Prozesse hervorgerufen wird. Im Falle von Wundheilung führt die Plättchenaggregation zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die für die Angiogenese wichtig sind, z.B „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor und S1P [158, 161, 188, 220, 221]. Endothelzellen wandern in die provisorische, auf Fibrin basierende extrazelluläre Matrix, die bei der Blutgerinnung gebildet wird. Es ist erwiesen, dass von Plättchen abgeleitete angiogenetische Faktoren diesen chemotaktischen Prozess regulieren. Dabei stellt S1P einen der potentesten Induktoren der Chemotaxis für Endothelzellen in vitro dar [222]. Dieser Prozess beinhaltet die Aktivierung der PI-3-Kinase/ Akt und wird von der Phosphorylierung von S1P1 durch die Akt begleitet, was in der Induktion der GTPase Rac mündet [222]. Zusätzlich induziert S1P die Endothelzellproliferation. Es reguliert die morphogenetische Ausdifferenzierung der Endothelzellen in einen kapillar- ähnlichen, tubulären Phenotyp [25, 186]. S1P und erhöht die endotheliale Integrität [190]. In glatten Gefäßmuskelzellen scheint das Gleichgewicht zwischen S1P1/3 und S1P2 das Migrationsverhalten dieser Zellen gegenüber S1P zu definieren [202, 223]. Dies könnte in der Pathogenese der Atherosklerose und der Restenose nach Angioplastie, die durch das Einwandern von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima mit anschließender Proliferation charakterisiert ist, von Bedeutung sein.



### 1.7. S1P Agonisten

Alle fünf Rezeptoren binden S1P mit hoher Affinität, außer dem S1P<sub>4</sub> Rezeptor. Phytosphingosin-1 Phosphat bindet hier mit einer höheren Affinität als S1P an den Rezeptor [224].

Nicht phosphorylierte Sphingosinderivate wie Sphingosin, Ceramid, Sphingamin stellen keine kompetitiven Agonisten im Vergleich zu S1P dar. Phospholipide wie Sphingomyelin, Lysophosphatidsäure oder Phosphatidylinositol, denen eine Aminosäure fehlt konnten ebenfalls nicht mit S1P in physiologisch relevanten Konzentrationen um die Bindungsstelle an den S1P Rezeptoren konkurrieren [194]. Von allen möglichen Agonisten, die für S1P potentiell in Frage kommen, konnten lediglich Dihydro-S1P [210, 225], SPC [181, 226] und S1P- Homophosphonat [210, 225] gefunden werden, die S1P von seiner Bindungsstelle am S1P- Rezeptor verdrängen. Lim et al. konnten 2000 in Studien mit S1P Stereoisomeren zeigen, dass das Vorhandensein und die Konfiguration der C3-Hydroxylgruppe bei S1P für die Bindung an S1P Rezeptoren wichtig ist.

Kürzlich wurde ein neuer pharmakologischer Modulator der S1P Rezeptoren identifiziert, ein Immunmodulator namens FTY 720, der aus einem Pilz isoliert wurde [227- 228]. FTY wird in vivo phosphoryliert und ist dann ein potenter Agonist für S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>3</sub>-, S1P<sub>4</sub>- und S1P<sub>5</sub>-Rezeptoren [258-259]. FTY720-P hat durch seinen lipophilen Schwanz und die 2-Amino-Gruppe und die Phosphat Kopfgruppe strukturelle Ähnlichkeiten zu S1P [227-228], weist jedoch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften auf: Durch den Phenolring in seiner Mitte kommt es zu einem verstärkten Agonismus an dem S1P<sub>5</sub> und zu einer verminderten Aktivität an S1P<sub>2</sub>. Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor wird durch FTY720 aktiviert und nach der Aktivierung internalisiert. Danach ist der Signaltransduktionweg nicht mehr aktivierbar [259-260]. Der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor wird durch FTY720 nicht aktiviert. Der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wird aktiviert, aber nicht desensibilisiert. Die S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub>-Rezeptoren werden aktiviert, werden aber im vaskulären System nicht exprimiert. Daher stellt FTY720 einen primär über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wirkendes Sphingolipid dar [229].

Des Weiteren konnten spezifische S1P<sub>1</sub>-Rezeptor Agonisten entwickelt werden. Ein spezifischer S1P<sub>1</sub>-Rezeptor Agonist ist SEW2871. Dieses Sphingolipid aktiviert spezifisch den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor ohne diesen zu desensibilisieren.

**Fragestellung:**

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Dysfunktion in der Entstehung und dem Fortschreiten der Atherosklerose eine elementare Rolle spielt. Die Freisetzung von NO durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase soll einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Atherosklerose durch Verminderung einer endothelialen Dysfunktion haben. HDL soll ebenfalls einen protektiven Effekt in der Entstehung von Atherosklerose haben. Es induziert einen Cholesterolefflux aus peripheren Zellen und stimuliert die Cholesterolausscheidung über die Leber. Außerdem sind viele direkte zellvermittelte protektive Eigenschaften von HDL identifiziert worden, so zum Beispiel die Stimulation der endothelialen NO-Synthase [240]. HDL besteht unter anderem aus Lysophospholipiden wie das Sphingosin-1-Phosphat. Diese Lipide haben eine große Bedeutung innerhalb des Gefäßsystems und insbesondere im Zusammenspiel von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Die Lysophospholipide binden unter anderem an S1P-Rezeptoren. Von besonderem Interesse ist dabei der S1P3 Rezeptor, da er sowohl von Endothelzellen als auch von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von HDL und seiner Bestandteile auf die eNOS Aktivierung zu untersuchen und die HDL assoziierten Moleküle zu identifizieren, die diese eNOS Aktivierung vermitteln. Außerdem soll untersucht werden, welche Bedeutung der S1P3-Rezeptor in der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase hat.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Bei den eingesetzten Versuchstieren handelt es sich um männliche Wistar-Kyoto-Ratten, (WKY), männliche C57/B6, eNOS defiziente Mäuse (eNOS  $-/-$ ) und S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defiziente Mäuse (S1P<sub>3</sub>  $-/-$ ). Die WKY-Ratten haben ein Durchschnittsalter von 114 Tagen (105-134 Tagen) und ein durchschnittliches Körpergewicht von 257 g (247 – 284 g). Diese Ratten stammen von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Die C57BL/6-Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 54 Tagen (48 – 65 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 27 g (23 – 34 g). Diese C57BL/6-Mäuse stammen von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Amerika). Die eNOS defizienten Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 58 Tagen (51 – 64 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 27 g (24-36 g). Diese eNOS defizienten Mäuse stammen von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, Amerika). Die S1P3-Rezeptor defizienten Mäuse haben ein Durchschnittsalter von 57 Tagen (49 – 70 Tage) und ein Durchschnittsgewicht von 28 g (25 – 32 g). Die S1P3-Rezeptor defizienten Mäuse stammen aus dem Tierstall von Herrn PD Dr. Bodo Levkau (Zentrum für Atheroskleroseforschung, Westfälische Wilhelms-Universität Münster). Die Tiere werden in Kolonie bei einer Raumtemperatur zwischen 19 und 21°C und einer relativen Luftfeuchte von 50 bis 70 % in einem begehbaren SPF-geeigneten Tierstall ohne Fenster gehalten. Ein Zeitschaltprogramm gibt einen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden vor, wobei zwischen 6 Uhr und 18 Uhr eine Dauerbeleuchtung eingesetzt wurde. Als Einstreu wird entstaubte und entkeimte Weichholzfaser von der Firma Altromin (Soest, Deutschland) verwendet, die zweimal in der Woche gewechselt wird. Neben Trinkwasser und Trockenfutter (Firma Altromin, Soest, Deutschland), das ad libitum angeboten wird, steht zusätzlich 3-mal pro Woche Körner und Obst zur Verfügung. Zwischen dem Tag der Anlieferung und dem ersten Tierversuch befinden sich mindestens 5 Tage Akklimatisierungszeit. Die in vivo Versuche an WKY-Ratten wurden zwischen 6 Uhr und 17 Uhr durchgeführt. Die Aortenexplantation für die in vitro Versuche wurde zwischen 6 Uhr und 12 Uhr durchgeführt.

#### **2.1.2. Zellen**

In dieser Arbeit wurden humane umbilikale Endothelzellen (HUVEC) eingesetzt, die zwischen der Passage 3 und 6 benutzt wurden, wenn die Zellen ein Konfluenz von > 80 % aufwiesen.

### 2.1.3. Antikörper

Monoklonale Antikörper:

Kanninchen anti-AKT-AK	Cell Signaling Technology, Beverly/USA
Kanninchen anti-phospho-Ser <sub>473</sub> -AKT-AK	Cell Signaling Technology, Beverly/USA
Kanninchen anti-eNOS-AK	Cell Signaling Technology, Beverly/USA
Kanninchen anti-phospho-Ser <sub>1177</sub> -eNOS-AK	Cell Signaling Technology, Beverly/USA

Sekundärer Antikörper:

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly/USA
--------------------------------------	----------------------------------------

### 2.1.4. Reaktionssets (Kits)

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford/USA
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham, Piscataway/USA
Cell Lysis Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Total Phosphoprotein Isolation Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA

### 2.1.5. Filterpapier, Membranen und Säulen

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Einbeck/D
--------------	---------------------------------

### 2.1.6. Chemikalien und Biochemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt/D
Acetylcholin	Sigma, St. Louis/USA
Acryamid-Bis 30 % (37,5:1)	Merck, Darmstadt/D
Albumin	Roth, Karlsruhe/D
Amidoschwarz 10 B	Serva, Heidelberg/D
Ammoniumpersulfat (APS)	Life Technologies, Paisley/USA
Aprotinin	Sigma, St. Louis/USA
Bidestilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Fluka, Buchs/CH
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly/USA
n-Butanol	Merck, Darmstadt/D
Bromophenolblau	Serva, Heidelberg/D
BSA-Standard	Pierce, Rochford/USA

---

Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt/D
Cholesterin	Sigma, St. Louis/USA
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt/D
4,5-Diaminofluorescein Diacetate (DAF-2DA)	Merck, Darmstadt/D
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt/D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt/D Sigma, St. Louis/USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	
D-MEM	Life Technology, Paisley/USA
Endothelin	Sigma, St. Louis/USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt/D
Ethanol	Merck, Darmstadt/D
Ethylendiamintetraaxetylsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt/D
Ethylenglycoldiaminoethyltetraaxetylsäure (EGTA)	Merck, Darmstadt/D
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin/D
Glukose	Merck, Darmstadt/D
L-Glutamin	Sigma, St. Louis/USA
Glycerol (87 %)	Merck, Darmstadt/D
Glycergel	Dako, Hamburg/D
Glycin	Merck, Darmstadt/D
Hämatoxylin-Monohydrat	Merck, Darmstadt/D
Harnstoff	Sigma, St. Louis/USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt/D
Indometazin	Sigma, St. Louis/USA
Kalialaun	Merck, Darmstadt/D
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt/D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt/D
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma, St. Louis/USA
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma, St. Louis/USA
Ketamin	Sigma, St. Louis/USA
Leupeptin	Sigma, St. Louis/USA
Ly294002	Sigma, St. Louis/USA

---

Lysosulfatid (LSF)	Sigma, St. Louis/USA
Magnesiumsulfat ( $Mg_2SO_4$ )	Sigma, St. Louis/USA
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt/D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad/USA Serva, Heidelberg/D
Naphtol	Sigma, St. Louis/USA
Natriumazid	Sigma, St. Louis/USA
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt/D
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt/D
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	Merck, Darmstadt/D
Natriumbicarbonat ( $NaHCO_3$ )	Merck, Darmstadt/D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt/D
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, St. Louis/USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt/D
Natriumnitrit	Sigma, St. Louis/USA
Natriumnitroprussid (SNP)	Sigma, St. Louis/USA
Natriumjodat	Merck, Darmstadt/D
N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME)	Sigma, St. Louis/USA
Neufuchsin	Serva, Heidelberg/D
Nonidet P-40	Sigma, St. Louis/USA
Orthovanadat	Sigma, St. Louis/USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt/D
Pefabloc SC	Roche Diagnostik, Mannheim/D
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Biochrom, Berlin/D
Phenylephrin	Sigma, St. Louis/USA
Phosphatidylcholin	Sigma, St. Louis/USA
Pepstatin	Sigma, St. Louis/USA
Pertussistoxin	Sigma, St. Louis/USA
Ponceau S Solution (0,1 %)	Sigma, St. Louis/USA
Propandiol	Zymed, San Fransisco/USA
Roti <sup>®</sup> -Blue	Roth, Karlsruhe/D
RPMI 1640	Life Technology, Paisley/USA
Salzsäure (HCl), rauchend	Merck, Darmstadt/D
Saponin	Sigma, St. Louis/USA

SKF525A	Sigma, St. Louis/USA
Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	Avanti Polar Lipids, Alabaster/USA
Sphingosylphosphorylcholin (SPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster/USA
Stickstoff	Linde, Wiesbaden/D
Sucrose	Merck, Darmstadt/D
Tetramethyldiamin (TMED)	Sigma, St. Louis/USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCL (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt/D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Base (Tris-Base)	Merck, Darmstadt/D
Triton X-100	Merck, Darmstadt/D
Trypsin	Biochrom, Berlin/D
Tween20	Merck-Schuchart, Hohenbrunn/D
Xylazin	Sigma, St. Louis/USA
Xylol	Riedel-de Haen, Seelze/D

### 2.1.7. Puffer und Lösungen

#### Kleingefäßmyograph

##### Physiologische Tyrode-Lösung

119.54 mM	NaCl
4.69 mM	KCl
1.22 mM	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1.61 mM	CaCl <sub>2</sub>
1.17 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
25.01 mM	NaHCO <sub>3</sub>
10.98 mM	Glukose
0.024 mM	EDTA

## PBS

140 mM	NaCl
2 mM	KCl
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O
2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7.4

**2.1.8. Geräte und Laborhilfsmittel**

Analysewaage		Sartorius, Göttingen/D
Gefrierschränke	- 80 °C	Heraeus, Osterode/D
		Forma Scientific, Marietta/USA
	- 20 °C	Liebherr, Bibeach an der Riß/D
		Bosch, Stuttgart/D
Glaswaren (Kolben, Pipetten etc.)		Brand, Wertheim/D
Kleingefäß-Myograph 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/D
Monitor		LG, Seoul/Ko
OP-Tisch Größe 5 mit Heizung		Hugo Sachs, March-Hugstetten/D
pH-Messgeräte		Beckman, Palo Alto/USA
pH-Messgerät PHM210		Radiometer, Copenhagen/DK
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
Zentrifugen		Heraeus, Osterode/D



**2.1.9. Verbrauchsmaterial**

		Sorvall, Newtown/USA
Einwegsskalpelle		Rüttgers, Solingen/D
Fadenmaterial		Firma Johnson & Johnson, Norderstedt/D
Kulturflaschen		Nunc, Roskilde/DK
Kryogefäßen		Nunc, Roskilde/DK
Objektträger		Roth, Karlsruhe/D
Pipettenspitzen		Süd Laborbedarf, Gauting/D
Präparationsbesteck		FST, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	0.5 ml	Sarstedt, Nürnberg/D
	1.5 ml 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml 20 ml	Falcon, Oxnard/USA
		Greiner, Nürtingen/D
Schläuche		VWR, Darmstadt/D
Spritzen und Kanülen (Sterican)		Braun Melsungen, Melsungen/D

**2.1.10. Software**

Adobe Acrobat 8.0 Professional	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
Adobe Photoshop 9.0	Adobe Systems Inc., San Jose/USA
AxioVision 4.0	Carl Zeiss, Jena/Deutschland
Endnote 9.0	ISI ResearchSoft, Berkeley/USA
MS Office 2003 Professional	Microsoft Corp., Redmond/USA
MS Explorer 6.0	Microsoft Corp., Redmond/USA
Myodaq 2.2	JP Trading, Aarhus/DN
Myodata 2.2	JP Trading, Aarhus/DN
Prism 4.0	GraphPad Software, San Diego/USA

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Der Kleingefäß-Myograph

Der Kleingefäß-Myograph wurde zuerst 1976 von Mulvany und Halpern beschrieben. Durch diese Methodik ist es möglich geworden, Messdaten über mechanische, morphologische und pharmakologische Eigenschaften von kleinen Gefäßen zu bekommen. Diese Methode erlaubt es, Gefäßsegmente, die man entweder aus größeren elastischen Gefäßen, wie z.B. der Aorta, oder aus kleinen Widerstandsgefäßen entnimmt, in Form einer Ringpräparation in den Myographen einzuspannen. Ein bedeutender Vorteil dieser Methode besteht darin, dass diese Gefäße annähernd atraumatisch präpariert und in den Myographen eingespannt werden können und dass es damit möglich ist, unter festgesetzten isometrischen Bedingungen pharmakologische Messungen vorzunehmen.

#### 2.2.1.1. Aufbau des Kleingefäß-Myographen

Eine Übersicht über den Aufbau des Kleingefäß-Myographen ist in Abbildung 1 zu sehen. In der Übersicht ist das Kleingefäß-Myograph-Modell 410A der Firma JP Trading gezeigt, mit dem man 2 Gefäßringpräparate simultan innerhalb einer Messkammer messen kann. Der Kleingefäß-Myograph besteht aus einem Gehäuse, in das eine Heizung und ein Kraftmesser eingebaut sind. In dieses Gehäuse ist ein Edelstahlwasserbad eingelassen, dessen Kammervolumen 12 ml beträgt. Innerhalb der Kammer befinden sich 2 Trägerbacken, zwischen die das Gefäßringpräparat eingespannt wird. Als externe Geräte sind ein Myo-Interface, ein Computersystem, eine Vakuumpumpe und ein Begasungssystem angeschlossen. Die Edelstahlkammer wird mit einer dafür vorgesehenen Abdeckung verschlossen, um eine Evaporationen des Kammerinhaltes zu minimieren und den Sauerstoffpartialdruck in der Kammer konstant zu halten. Zur Begasung wird Carbogen (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) benötigt, wodurch in der Kammer über den gesamten Versuchsablauf ein konstanter pH von 7,4 vorhanden ist. Der pH-Wert der Lösungen wird mehrmals während eines Versuches überprüft mittels einer geeigneten pH-Elektrode, die an ein pH-Meter angeschlossen ist. Die Entfernung von Testsubstanzen erfolgte mit Hilfe eines Vakuumsystems.

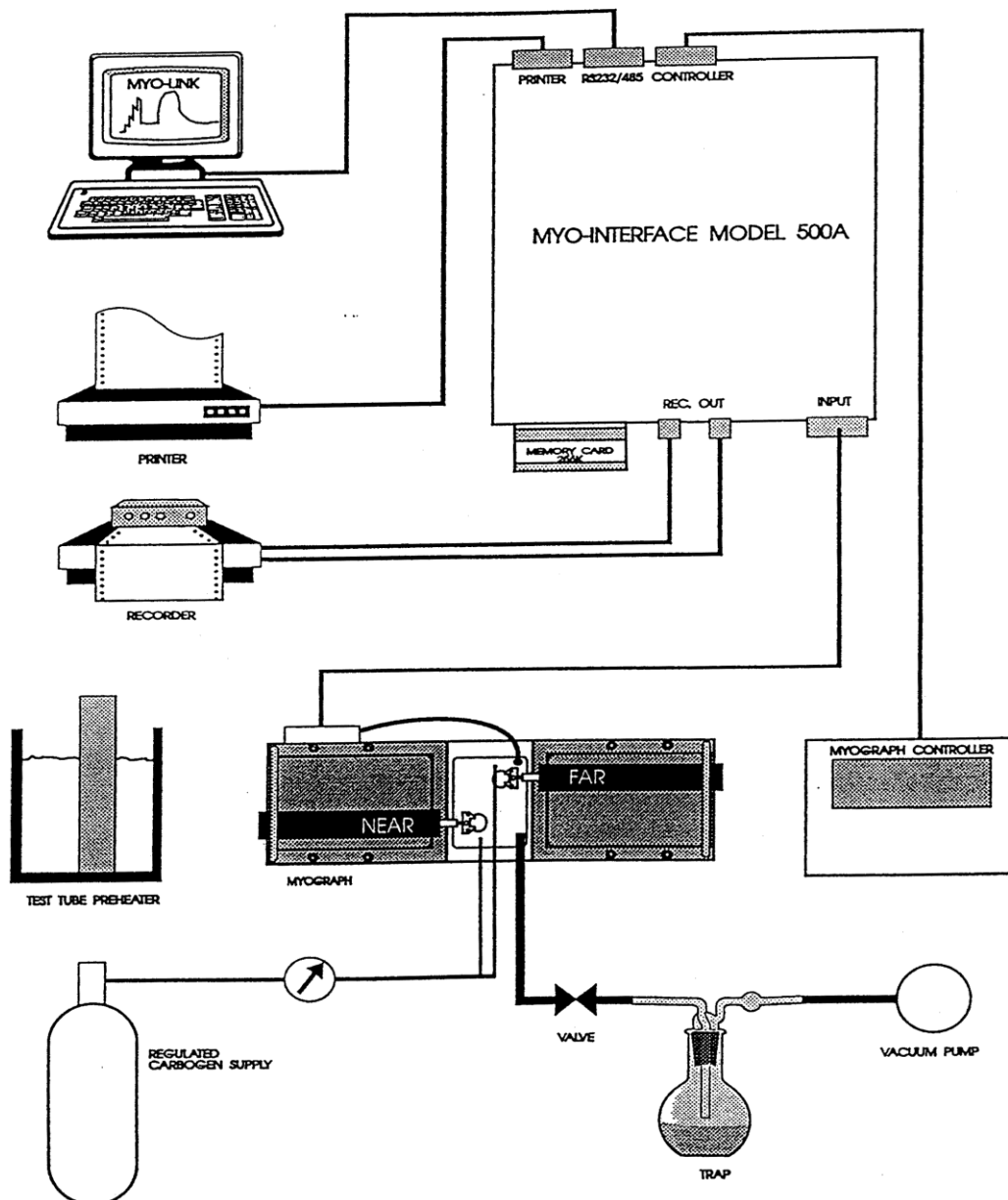


Abbildung 3: Dargestellt ist die Versuchsanordnung eines Kleingefäß-Myographen.

Das Myographgehäuse, in dem sich die Kraftaufnehmer befinden, ist mit dem Myograph-Interface verbunden, welches die Temperatur- und die Kraftaufnehmereinstellung kontrolliert. Das Interface ist mit einem Computer verbunden, über den die ermittelten Daten durch die Programme Myodaq und Myodata zum einen aufgezeichnet und zum anderen ausgewertet werden können. Die physiologische Kochsalzlösung in der Kammer wird über eine kontrollierte Begasung durch 5%iges Carbogen konstant auf einen pH von 7,4 eingestellt. Der Wechsel des Kammerinhaltes erfolgt über ein Vakkumpumpensystem (aus „Procedures for investigation of small vessel using small vessel myograph; Mulvany MJ, 1996“).

Die Temperatur wird mit Hilfe eines Temperatursensors kontinuierlich auf 37°C gehalten. Die in die Kammer eingebrachten Flüssigkeiten werden zuvor in einem externen Wasserbad auf 37°C erwärmt, so dass beim Wechseln des Kammerinhaltes keine relevanten Temperaturveränderungen auftreten, die zu einer thermischen Beeinflussung des Gefäßringes oder des Kraftmessers führen könnten. Die sich innerhalb der Kammer befindenden zwei Trägerbacken sind mit Strukturen des Myographgehäuses verbunden. Die eine Trägerbacke hat eine Verbindung mit dem Kraftmesser und die andere hat eine Verbindung mit der Mikrometerschraube. Durch diese Mikrometerschraube kann man den Abstand zwischen den Backen in µm-Schritten verändern und somit den Raum zwischen diesen Trägerbacken variieren. Der Kraftmesser besteht aus einem hoch sensitiven Piezo-gesteuerten Widerstandsensor, der mit dem extern gelegenen Myo-Interface über eine Kabelverbindung in Kontakt steht. Der Messbereich dieses Widerstandssensors liegt in einer Größenordnung von 250 mN, wobei mit einem Auflösungsvermögen von 0,01 mN gemessen werden kann und somit kleinste Kraftänderungen detektierbar werden. Das Myo-Interface ist an einen Computer angeschlossen, so dass die gesammelten Messdaten digital gespeichert und ausgewertet werden können. Die Messdatengewinnung erfolgt mit dem Messprogramm Myodaq 2.0. Nach einer Messung werden die gesammelten Daten mit dem Analyseprogramm Myodata 2.0 von JP Trading ausgewertet.

### **2.2.1.2. Präparation der Gefäße**

In den Versuchen werden Messungen an thorakalen Aorten durchgeführt. Die Aorten werden entweder aus männlichen Wistar-Kyoto-Ratten oder männlichen Mäusen verschiedener Stämme entnommen. Die Tiere werden mit Hilfe von Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) durch intraperitoneale Applikation anästhesiert. Nach einer medianen Laparotomie und Freilegung der abdominellen Aorta wird der Thoraxraum durch mediane Sternotomie eröffnet, die thorakale Aorta vorsichtig freigelegt und die Aorta unter Zuhilfenahme einer Mikroschere mobilisiert. Das Gefäß wird dabei nicht in longitudinaler oder transversaler Ebene gedehnt, so dass es zu keinen strukturellen Schäden kommt. Nach der Mobilisation wird die Aorta im Übergangsbereich vom thorakalen zum abdominellen Abschnitt auf Zwerchfellhöhe durchtrennt und vorsichtig von ihrem Untergrund gelöst. Die Aorta wird im direkten Anschluss an die Präparation in ein Becherglas mit der hergestellten Pufferlösung (Tyrodelösung) überführt, welche im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt und mit Carbogen über 10 Minuten begast wurde. Die weitere Präparation der Aorta geschieht unter einem biokkulären Mikroskop bei 4-facher Vergrößerung. Nach vollständiger Ablösung des periadventitiellen Bindegewebes trennt man ein 2 mm langes Stück

von der Aorta ab. Nach der Präparation wird das Gefäßstückchen mit einem 40 µm durchmessenden Draht in den Myographen eingespannt.

### 2.2.1.3. Festlegung des normalisierten Lumendurchmessers

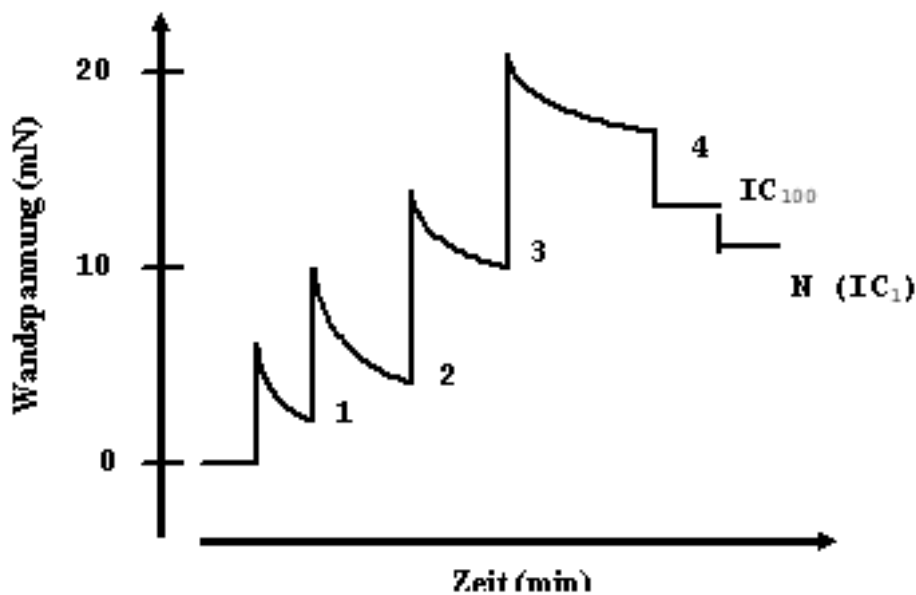
Damit man vergleichende Messungen an verschiedenen Gefäßen machen kann, muss man einem Gefäß eine definierte Vorspannung zuweisen, weil die Sensitivität der präparierten Gefäße in Hinsicht auf ihre Reaktivität auf Agonisten vom Ausmaß der Vorspannung der Gefäße abhängig ist. Der optimale innere Lumendurchmesser entspricht demjenigen, der vorliegt, wenn das Gefäß vollständig relaxiert und einem transmuralen Druck von 100 mmHg ausgesetzt ist [230]. Dieser Lumendurchmesser wird im Folgenden als  $IC_{100}$  bezeichnet. Bei der Normalisierung werden die beiden Träger, zwischen die das Gefäß eingespannt ist, in µm-Schritte auseinandergezogen und somit die Wandspannung des Gefäßes schrittweise erhöht. Dabei wird sowohl die Mikrometerveränderung, als auch die bei den einzelnen Distensionsschritten entstehende Kraft ermittelt. Der interne Umfang des Gefäßes lässt sich ermitteln, wenn man den Abstand der beiden Träger zueinander kennt und die Dicke der verwendeten Drähte. Die Gefäßlänge wird bestimmt mit einem speziellen Messobjektiv, welches auf das binokulären Mikroskop aufgesetzt wird. Die Gefäßlänge entspricht der doppelten Länge des unter dem Mikroskop auszumessenden Gefäßsegments. Die Wandspannung kann als Quotient aus gemessener Kraft und Gefäßlänge berechnet werden. Um den effektiv wirkenden Druck  $P_i$  berechnen zu können, benutzt man die Gleichung nach Laplace [230].

Dabei gilt:

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

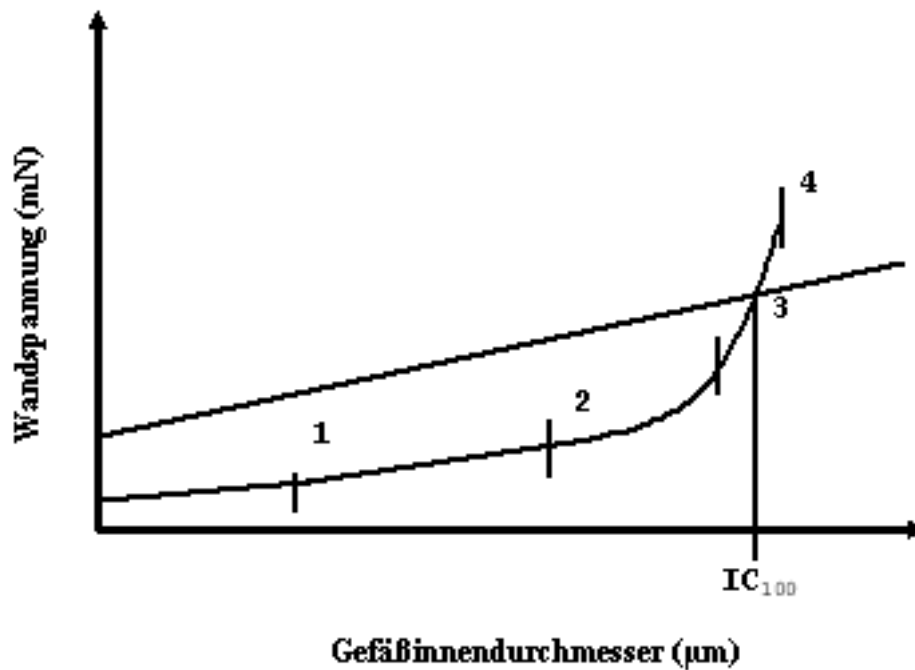
Der effektive Druck ist eine Schätzung desjenigen Druckes, der vorhanden sein müsste, um das Gefäß auf den gemessenen inneren Umfang zu erweitern. Jedes Datenpaar aus Wandspannung und innerem Gefäßumfang wird mit Hilfe des Normalisationsprogramms von Myodaq erfasst und gleichzeitig der sich daraus ergebende effektive Gefäßinnendruck errechnet. Die Gefäßextension wird abgeschlossen, sobald der effektive Druck 100 mmHg überschreitet. Aus den gemessenen Daten wird eine exponentielle Kurve errechnet, wobei man den Gefäßinnendurchmesser gegen die dabei entstehende Wandspannung aufträgt. Anhand der Laplace'schen Beziehung zwischen Wandspannung und Gefäßinnendurchmesser, kann man den Gefäßinnendurchmesser innerhalb der entsprechenden Kurve bestimmen, bei dem eine Wandspannung von 100 mmHg vorliegt ( $IC_{100}$ ). Bei einem Gefäßinnendurchmesser, der 90 % des

$IC_{100}$  beträgt, ist die aktive Kraftproduktion der Gefäße maximal ist. Dieser Gefäßinnendurchmesser wird als  $IC_1$  [230] bezeichnet. Somit wurden die Experimente mit Gefäßen durchgeführt, die einen Gefäßinnendurchmesser  $IC_1 = 0.9 * IC_{100}$  aufweisen. Damit ist es möglich, die einzelnen Gefäße miteinander zu vergleichen. In Abbildung 2 ist eine Normalisierungsprozedur dargestellt. In der Abbildung ist die exponentielle Beziehung zwischen dem Gefäßinnendurchmesser und der Wandspannung bei konstantem (100 mmHg) und variablen transmuralen Druck wiedergegeben.



**Abbildung 4:** Darstellung eines Normalisationsvorganges am Kleingefäßmyographen.

Die Gefäße werden um einige Mikrometer gedehnt. Die Messpunkte 1, 2, 3 und 4 zeigen die Wandspannung 1 Minute nach manueller Dehnung. Am Messpunkt 4 liegt eine Wandspannung über 100 mmHg vor, weshalb an diesem Punkt die Ruhespannung um einen definierten Betrag reduziert wird, so dass die Gefäße die  $IC_{100}$  besitzen. Am Messpunkt N werden die Gefäße auf den endgültigen Innendurchmesser  $IC_1$  eingestellt.



**Abbildung 5:** Zusammenhang zwischen Gefäßinnendurchmesser und Wandspannung

Darstellung des exponentiellen Kurvenverlaufes zwischen Gefäßinnendurchmesser und Wandspannung eines Gefäßes bei Normalisierung und des linearen Kurvenverlaufes zwischen Wandspannung und Gefäßinnendurchmesser bei einem konstanten transmuralen Druck von 100 mmHg. Am Schnittpunkt der beiden Kurven kann man den Gefäßinnendurchmesser ablesen, bei dem das nicht eingespannte Gefäß einem transmuralen Druck von 100 mmHg ausgesetzt wäre.

#### 2.2.1.4. Evidenz für die Viabilität der eingespannten Gefäße

Nachdem die Gefäße in den Myographen eingespannt worden sind, lässt man diese 60 Minuten in der physiologischen Kochsalzlösung äquilibrieren. Während jedes Versuches werden vor Beginn einer Messung die Gefäße auf ihre Eigenschaften getestet und diejenigen Gefäße verworfen, die sich als beschädigt erweisen. Dazu bedient man sich zum einen rezeptor-unabhängiger kontraktiler und dilatativer Stimulatoren durch Kaliumchlorid (KCl, 130 mM) oder Natrium-Nitroprussid (SNP, 1 µM). Außerdem werden verschiedene rezeptorabhängige vasokontraktive und vasodilatative Substanzen wie Phenylephrin (PE, 100 nM) und Acetylcholin (ACh, 1 µM) benutzt. Nach der Einstellung der Gefäße auf den optimalen Innendurchmesser wird zur Testung der Gefäßeigenschaften folgende Ablauf gewählt:

1. Kaliumchlorid (130 mM) bis zwei gleiche Kontraktionen registriert werden
2. PE (1  $\mu$ M) bis zwei gleiche Kontraktionen registriert werden
3. Nach Phenylephrin-induzierter (100 nM) Kontraktion Dilatation durch Acetylcholin (1  $\mu$ M)
4. Am Ende des Versuches nach PE-induzierter (100 nM) Kontraktion Dilatation durch SNP (1  $\mu$ M)

Wenn die GefäÙe keine konstante Kontraktion unter PE zeigen, nur schwach kontrahieren (< 5 mN unter PE (1  $\mu$ M)) oder keine ausreichende endothelvermittelte Vasodilatation unter Acetylcholin induziert werden kann (< 70 %), werden die GefäÙringe verworfen und durch neue ersetzt. GefäÙringpräparate, die die zuvor beschriebenen Vorbedingungen erfüllen, werden für die Versuche verwendet. Jeder Versuch wird an mindestens 6 Aortenringpräparationen jeweils unterschiedlicher Aorten verschiedener Tiere wiederholt.

#### **2.2.1.5. Durchführung der Versuche**

Die folgenden Versuche wurden entweder an WKY-Ratten, C57-BL/6 Mäusen, eNOS-defizienten Mäusen oder an S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen durchgeführt.

##### **2.2.1.5.1. Nicht-kumulative Dosis-Wirkungs-Kurve von PE**

Zur Bestimmung der effektiven Konzentration von PE, bei der 50 % der Maximalkontraktion (EC<sub>50</sub>) oder bei der 100 % der Maximalkontraktion (EC<sub>100</sub>) in den GefäÙringen vorliegen, wurden an den Aortenringpräparationen aller in dieser Studie benutzten Tierspezies nicht-kumulative Dosis-Wirkungskurven von PE erstellt. Dazu wurden durch die Applikation von ansteigenden PE-Konzentrationen und anschließendem Austauschen der Kammerflüssigkeit die dosisabhängigen Kontraktionen nicht-kumulativ registriert.

##### **2.2.1.5.2. Bestimmung der endothelialen rezeptorabhängigen Vasodilatation**

Um grundlegende Unterschiede in der endothelialen Dilatationsfähigkeit der einzelnen GefäÙe, insbesondere der Knock-out-Mäuse, auszuschließen, die eine veränderte Reagibilität auf HDL und seinen Komponenten unabhängig von diesen Mediatoren erklären würde, wurden an den entsprechenden Aortenpräparaten vor Beginn der einzelnen Versuche kumulative DWK von Acetylcholin (1 nM – 10  $\mu$ M) und von SNP (100 pM – 1  $\mu$ M) erhoben.



### **2.2.1.5.3. Hemmung der endothelialen NOS mit L-NAME**

Um die Abhängigkeit der ersichtlichen Vasodilatation von der endothelialen NOS und der damit verbundenen NO-Produktion zu überprüfen, wurde teilweise in den Versuchen die eNOS durch den spezifischen Hemmstoff N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine-Methyl Ester (L-NAME) (100 µM) irreversibel gehemmt. Um die effektive Hemmung der eNOS zu überprüfen, wurden die Aortenringe durch PE (1 µM) vorkontrahiert und nach Erreichen eines konstanten Vorkontraktionsniveaus mit Acetylcholin (1 µM) stimuliert. Die effektive Hemmung der eNOS wurde dadurch erkenntlich, dass die Gefäße nicht mehr auf Acetylcholinapplikation dilatieren haben. Nur an solchen Gefäßen wurden die weiteren Experimente durchgeführt. Die Applikation von L-NAME wurde so häufig wiederholt, bis die Gefäße nicht mehr auf Acetylcholin mit einer Dilatation reagiert haben. Konnte durch L-NAME die eNOS nicht effektiv gehemmt werden, wurden die Gefäße ausgespannt und durch neue Gefäßringe ersetzt.

### **2.2.1.5.4. Chemische Endothelentfernung durch Applikation von Saponin**

Die Endothelabhängigkeit der beobachteten Vasodilatation wurde durch chemische Entfernung des Endothels mittels Saponin überprüft. Dazu wurden die Gefäßringe repetitiv (3 x 10 Minuten und 1 x 20 Minuten) einer physiologischen Kochsalzlösung ausgesetzt, der Saponin in einer Konzentration von 0,05 mg/ml zugesetzt wurde [231]. Saponin ist ein Detergenz, das zu einer Permeabilisation von Endothelzellen und dadurch zu einem Zusammenbruch des intrazellulären Membranpotentials führt. Diese Art der Endothelentfernung ermöglicht es, die endothelabhängige Relaxation auf Acetylcholin zu unterbinden, wobei die kontraktile Eigenschaften des Aortenrings nur geringgradig verändert werden [232]. Somit ist es möglich, die Effekte von HDL und seinen Komponenten auf die Aortenringe zunächst mit intaktem Endothel (Kontrolle) und danach ohne funktionsfähiges Endothel zu überprüfen.

### **2.2.1.5.5. Einfluss von HDL und seiner Komponenten auf den Gefäßtonus**

Um die Eigenschaften von HDL und seiner verschiedenen Komponenten (Lipidfraktion, Proteinfraction, Cholesterin, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, S1P, SPC, LSF, Apolipoprotein A1) auf den Gefäßtonus zu überprüfen wurden initial Versuche an Aortenringpräparaten von WKY-Ratten durchgeführt. Dazu wurden die Gefäßringe durch die

Applikation von PE (1  $\mu\text{M}$ ) vorkontrahiert und anschließend, nach Erreichen eines konstanten Vorkontraktionsniveau, HDL oder seine Komponenten dem Medium in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. An WKY-Ratten wurde eine kumulative DWK von HDL (0,001 mg/dl – 0,5 mg/dl), S1P (10 pM – 10  $\mu\text{M}$ ), SPC (10 pM – 10  $\mu\text{M}$ ) und LSF (10 pM – 10  $\mu\text{M}$ ) erstellt. Darüber hinaus wurde an diesen Aortenringen der Einfluss der anderen HDL Komponenten, der HDL-Lipidfraktion (äquivalente Konzentration zu einer HDL-Konzentration von 0,5 mg/ml), der Proteinfraktion (äquivalente Konzentration zu einer HDL-Konzentration von 0,5 mg/ml), von ApoAI (0,1 mg/ml) von Sphingomyelin (10  $\mu\text{M}$ ), Cholesterin (10  $\mu\text{M}$ ) und Phosphatidylcholin (10  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Die Wirkung von HDL und der Lysophospholipide S1P, SPC und LSF auf Gefäßringpräparate von C57BL/6-Mäusen, S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen und eNOS defizienten Mäusen wurde durch die Erstellung von kumulativen Dosis-Wirkungskurven untersucht. Des Weiteren wurden die Versuche nach Hemmung der endothelialen NOS durch L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) und nach chemischer Endothelentfernung durch Saponin wiederholt, um den Einfluss des Endothels und der eNOS in der HDL vermittelten Vasorelaxation zu untersuchen.

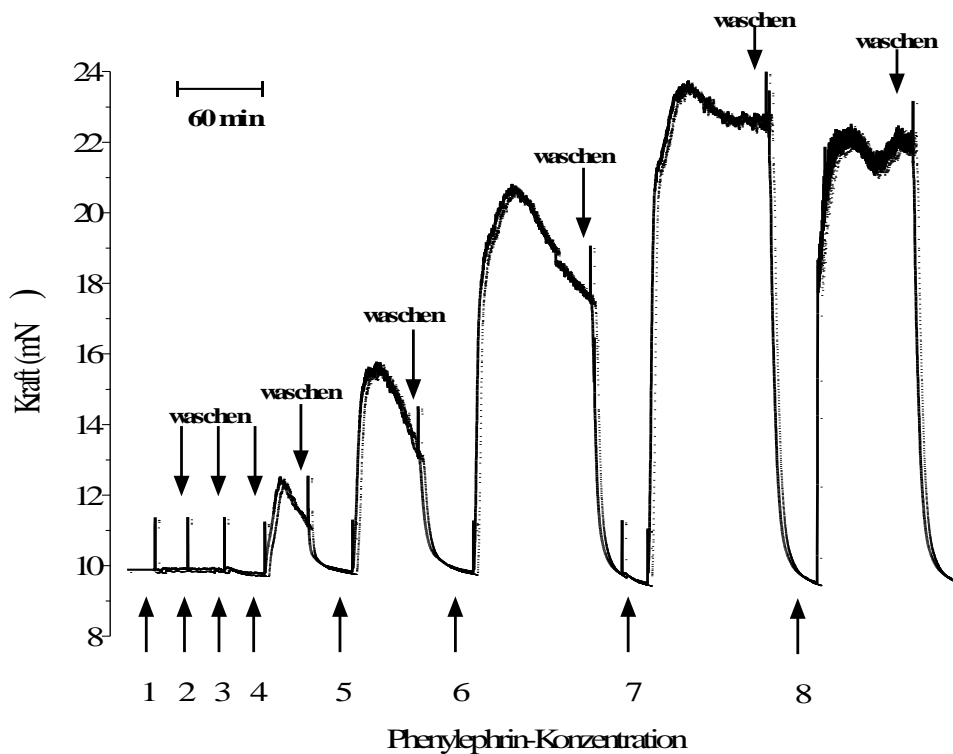
### **2.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von NO aus HUVECs**

Um die intrazelluläre Produktion von NO nachzuweisen, wurden Experimente an HUVEC mit Hilfe des NO-sensitiven Farbstoffes 4,5-Di-Amino-Fluorescein-Diacetat (DAF-2DA) wie vorher beschrieben [233, 234] durchgeführt. Die HUVECs sind eine freundliche Gabe von Herrn PD Dr. Roch Jerzy Nofer (Westfälische Wilhelms Universität Münster, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Münster), der diese aus frischen Plazentavenen angezchtet und kultiviert hat. DAF-2DA ist ein zellgängiges Fluoreszenzproteinderivat von DAF-2, welches dazu benutzt wird, die Zellen mit dem Fluorochrom zu beladen. Durch die intrazelluläre Hydrolyse von DAF-2DA durch zytosolische Esterasen entsteht DAF-2, welches unter physiologischen pH-Wert nicht fluoresziert. In der Gegenwart von NO und molekularem Sauerstoff wird DAF-2 zu seinem fluoreszierenden Triazol-Derivat, DAF-2T umgesetzt, welches fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist. Zur Detektion der NO-Bildung wurden die HUVECs ( $1,2 \times 10^5$ ) auf Gelatine beschichteten Cover slides ausplatiert und für 120 Minuten in RPMI 1640 (Biochrome KG, Berlin, Germany) inkubiert, welchem 1 % FCS (v/v) und 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die Zellen wurden für einen Zeitraum von 30 Minuten in einem Inkuabtionsschrank bei 37 °C mit DAF-2DA inkubiert. In Anschluss wurden die Zellen insgesamt vierfach gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit HDL (0,5 mg/ml), S1P (10  $\mu\text{M}$ ), SPC (10  $\mu\text{M}$ ) und LSF (10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. In einigen Versuchen wurde

die eNOS zuvor mit L-NAME (100  $\mu$ M) gehemmt. Die jeweiligen Reaktionen wurden durch die Fixierung der Zellen mit 2 % Paraformaldehydlösung (v/v) für 3 Minuten bei 4 °C gestoppt. Es wurden ausschließlich HUVEC bis maximal zur 4. Passage eingesetzt. Die Betrachtung der Zellen erfolgte unter einem invertierten Fluoreszenzmikroskop. Folgende Objektive kamen zum Einsatz: Plan Neofluar 10x/0,30; Plan Neofluar 20x/0,50; Plan Neofluar 40x/0,75. Für die Detektion von einem BP 470-490 nm Exzitationsfilter, einem dichromatischen Spiegel (505 nm) und einem LP 515 nm Emissionsfilter. Das Fluoreszenzmikroskop ist mit einer CCD-Kamera (AxioCam MRc5) zur digitalen Aufnahme der Bilder ausgestattet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe. Die ermittelten Bilder wurden mittels des speziell für dieses Mikroskop entwickelten Auswerteprogrammes Axiovision 4.0 bearbeitet.

### 3. Ergebnisse

Der  $\alpha$ 1-Adrenozeptoragonist PE induziert an thorakalen Aortenstücken im Kleingefäßmyographen eine dosisabhängige Vasokonstriktion. In Abbildung 1 ist eine repräsentative Originalabbildung einer nicht-kumulativen Dosis-Wirkungskurve von PE am Kleingefäßmyographen an thorakalen Aortenstücken von WKY-Ratten dargestellt. Die maximal ausgelöste Vasokonstriktion ( $V_{\max}$ ) wird ab einer PE-Konzentration von 10  $\mu$ M beobachtet.

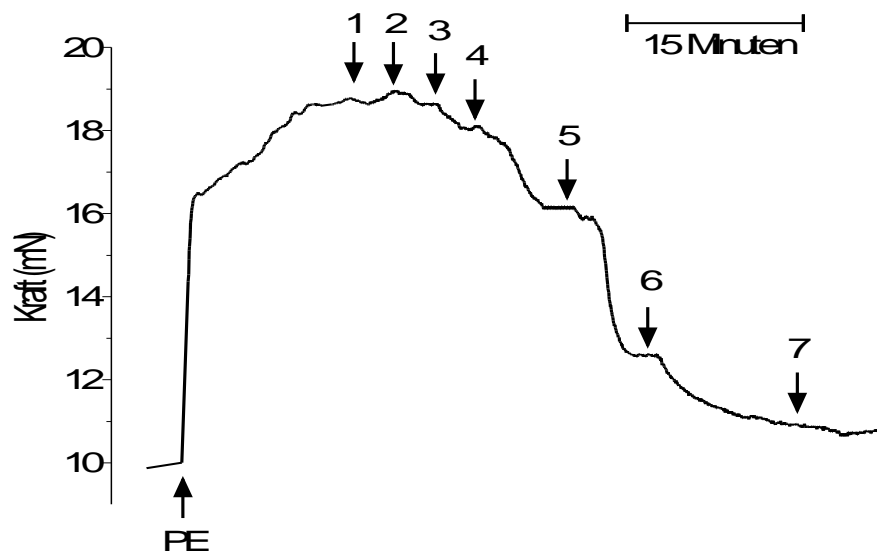


**Abbildung 6:** Nicht kumulative DWK von PE an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Dargestellt ist eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen an verschiedenen thorakalen Aortenringen am Kleingefäßmyographen. Man erkennt eine dosisabhängige Zunahme der PE induzierten Vasokonstriktion. Die gemessene Kraft (mN) ist auf der Ordinate gegen die Zeit (Minuten) auf der Abszisse aufgetragen. Von 1-7 Applikation ansteigender PE-Konzentrationen (1: 3 nM; 2: 10 nM; 3: 30 nM; 4: 100 nM; 5: 300 nM; 6: 1  $\mu$ M; 7: 3  $\mu$ M; 8: 10  $\mu$ M).

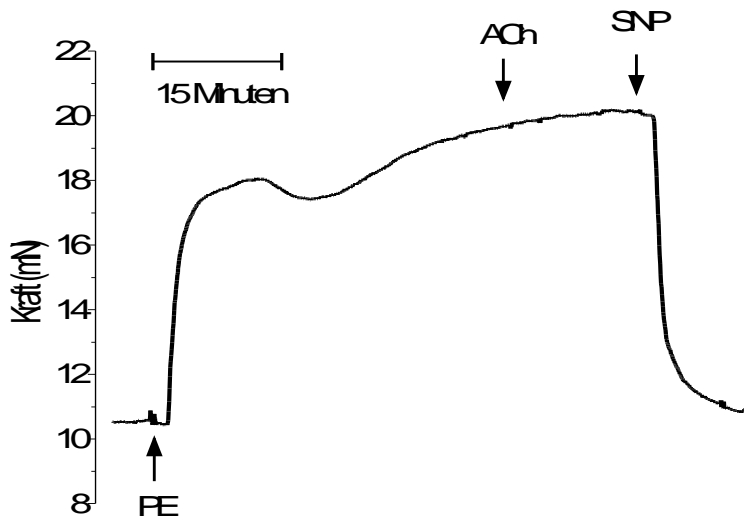
### 3.1. Dosisabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin an Aorten von WKY-Ratten

Acetylcholin löst an thorakalen Aortenstücken mit intaktem Endothel am Kleingefäßmyographen eine dosisabhängige endothelvermittelte Vasodilatation aus. In Abbildung 7 ist eine repräsentative Originalabbildung einer kumulativen Dosis-Wirkungskurve von Acetylcholin am Kleingefäßmyographen an einer thorakalen Aorta mit intaktem Endothel von WKY-Ratten dargestellt. Die Aortenstücke sind zuvor durch 1  $\mu$ M PE vorkontrahiert worden.



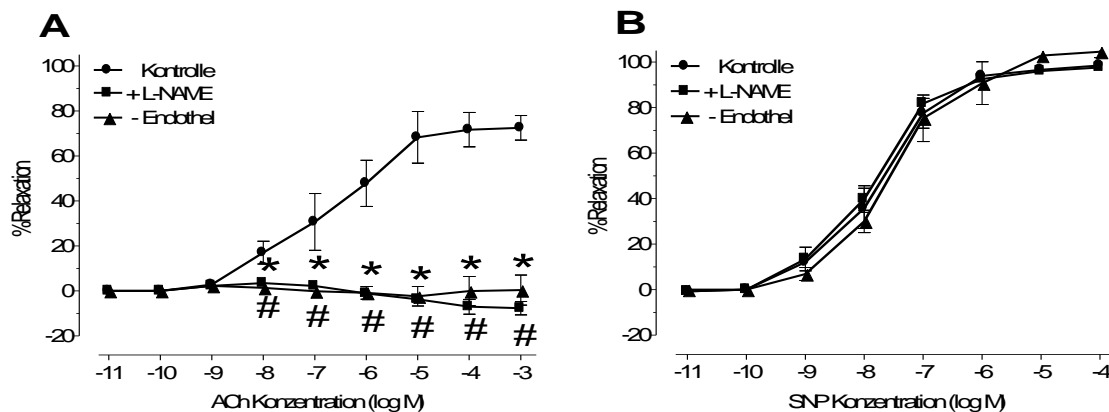
**Abbildung 7:** Kumulative DWK von ACh an vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Dargestellt ist eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen an verschiedenen thorakalen Aortenringen am Kleingefäßmyographen. Nach einer PE (1  $\mu$ M) induzierten Vorkontraktion der thorakalen Aorta bewirkt die kumulative Applikation von ACh eine konzentrationsabhängige Vasorelaxation. Die gemessene Kraft (mN) ist auf der Ordinate gegen die Zeit (Minuten) auf der Abszisse aufgetragen. Von 1-7 Applikation ansteigender Acetylcholinkonzentrationen (1: 100 pM; 2: 1 nM; 3: 10 nM; 4: 100 nM; 5: 1  $\mu$ M; 6: 10  $\mu$ M; 7: 100  $\mu$ M).



**Abbildung 8:** Wirkung von Acetylcholin und SNP auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen.

Aufgrund der nicht exprimierten eNOS wird der Gefäßtonus der Aorta durch ACh nicht beeinflusst. Durch die Zugabe von SNP (1  $\mu$ M) wird der Gefäßtonus nahezu bis zum Ausgangswert reduziert. Die gemessene Kraft (mN) ist gegen die Zeit (Minuten) aufgetragen.



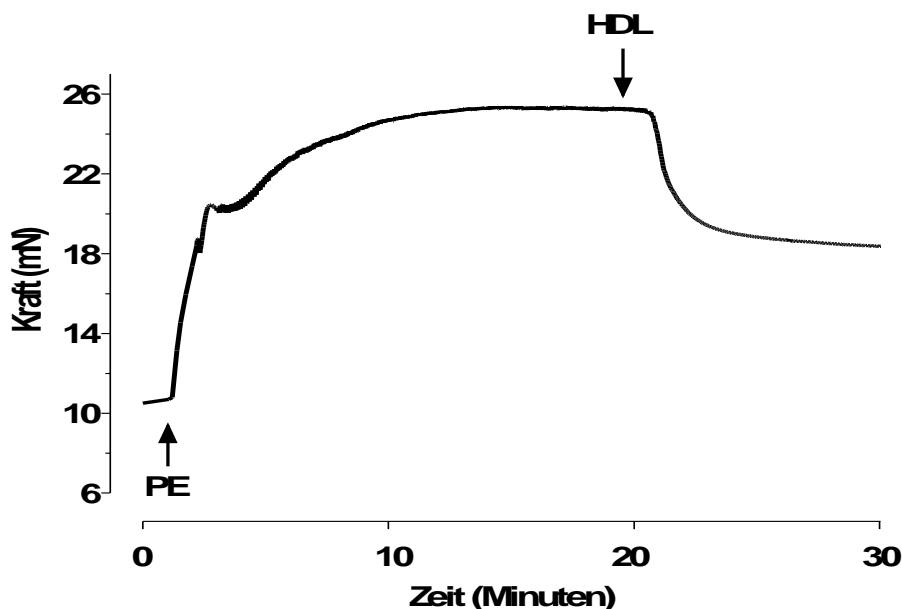
**Abbildung 9:** DWK von ACh und SNP an thorakalen Aortenringpräparaten von C57/BL-6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

Das Ausmaß der Vasorelaxation (in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion) ist gegen die jeweilige Konzentration (in log M) aufgetragen. Man erkennt eine dosisabhängige ACh induzierte Vasorelaxation, die durch pharmakologische eNOS-Hemmung durch L-NAME und Endothelentfernung vollständig aufgehoben werden kann. Die dosisabhängige SNP induzierte Vasorelaxation wird durch die eNOS-Hemmung oder die Endothelentfernung nicht beeinflusst. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert

aus mindestens sechs verschiedenen Experimenten ( $n \geq 6$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,05$

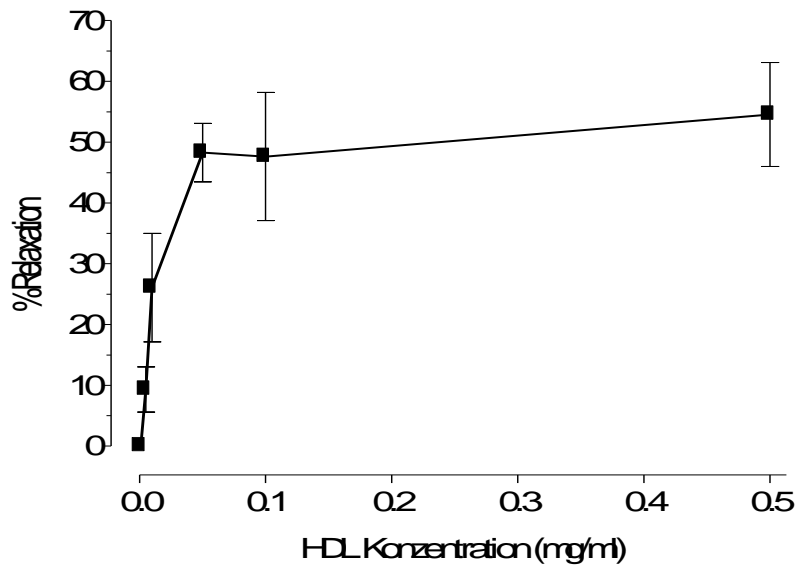
### 3.2. Wirkung von HDL

In Abbildung 10 ist eine repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen an thorakalen Gefäßstücken von unterschiedlichen WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen wiedergegeben. Dargestellt ist die Veränderung der Kraft gegen die Zeit. Die Aortenstücke wurden nach Normalisierung mit PE (1  $\mu\text{M}$ ) vorkontrahiert. Nach Erreichen einer konstanten Vorspannung wurde humanes HDL in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml der Messkammer zugegeben. Man erkennt eine lang anhaltende Vasodilatation von maximal 5,12 mN nach PE-Vorkontraktion von 14,85 mN (34,48 %).



**Abbildung 10:** Wirkung von HDL auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Aufgetragen ist die Änderung der Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten. Die Zugabe von HDL zu den vorkontrahierten Gefäßen bewirkt eine signifikante, lang anhaltende Vasodilatation. Repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 11:** DWK der HDL-induzierten Vasodilatation an thorakalen Aortenringen von C57BL/6 Mäusen am Kleingefäßmyographen.

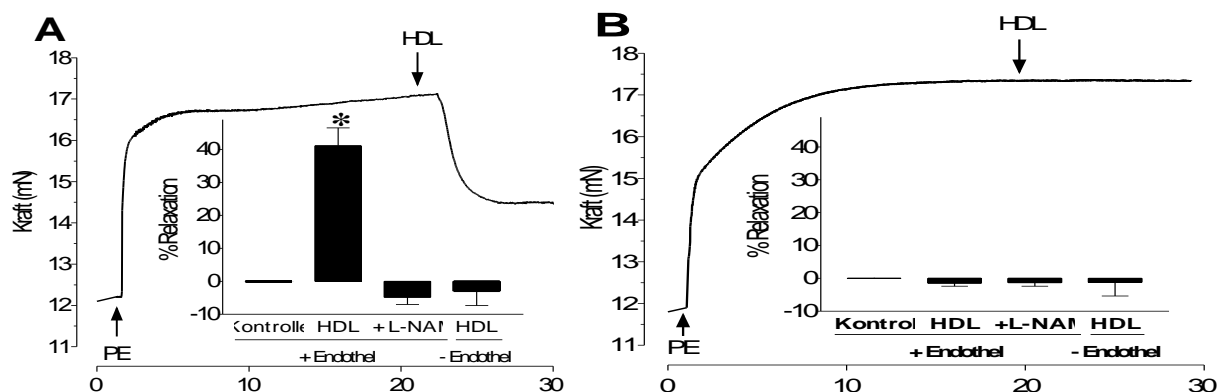
Die Vasodilatation in Prozent der Maximalkontraktion ist gegen ansteigende HDL-Konzentrationen dargestellt. Jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens acht verschiedenen Experimenten ( $n \geq 8$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.

### 3.3. Einfluss der eNOS und des Endothels auf die HDL-Wirkung

Um die vasodilatatorische Wirkung von HDL auf Aorten von C57BL/6-Mäusen zu untersuchen, wurden Aortenringe von C57BL/6-Mäusen in den Kleingefäßmyographen eingespannt. Die Versuche wurden an Aortenringen durchgeführt, die ein intaktes Endothel hatten oder bei denen das Endothel chemisch durch Saponin entfernt wurde. Um den Einfluss der eNOS zu zeigen, wurden die Versuche mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME durchgeführt. In der Teilabbildung A der Abbildung 12 sind die Ergebnisse an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen zum einen als repräsentative Originalabbildung von 5 verschiedenen Versuchen an Aorten unterschiedlicher C57BL/6-Mäusen mit intaktem Endothel ohne eNOS-Hemmung wiedergegeben. Zum anderen sind die Ergebnisse der Versuche an chemisch deendothelialisierten Aorten und an Aorten mit intaktem Endothel unter eNOS-Hemmung als Balkendiagramm im Insert wiedergegeben. Man kann erkennen, dass HDL (0,5 mg/ml) an Aorten mit intaktem Endothel eine Vasodilatation ( $41,09 \pm 5,42$  %) auslöst, die durch die gleichzeitige Hemmung der eNOS durch L-NAME ( $-4,85 \pm 2,15$  %) aufzuheben ist. Des Weiteren kann man erkennen, dass nach chemischer Endothelentfernung mittels Saponin ebenfalls keine Vasodilatation ( $-2,99 \pm 4,33$  %) mehr durch HDL auslösbar ist. In der Teilabbildung B der Abbildung 12 sind die Ergebnisse an

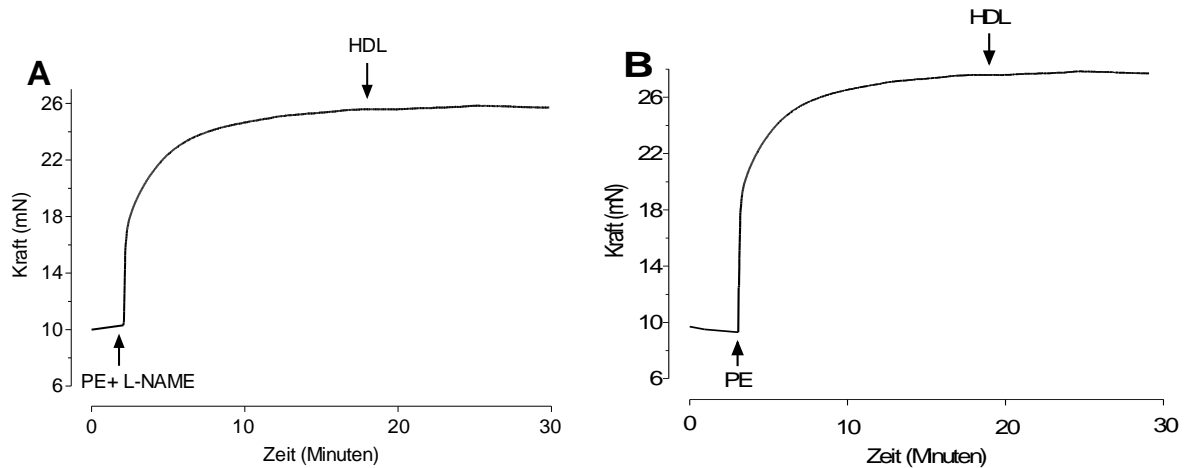


Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen zum einen als repräsentative Originalabbildung von 6 verschiedenen Versuchen an Aorten unterschiedlicher eNOS defizienter Mäuse mit intaktem Endothel ohne eNOS-Hemmung wiedergegeben. Zum anderen sind die Ergebnisse der Versuche an Aorten mit intaktem Endothel unter eNOS-Hemmung und an chemisch deendothelialisierten Aorten als Balkendiagramm im Insert wiedergegeben. Man kann erkennen, dass HDL an Aorten mit intaktem Endothel keine Vasodilatation ( $-1,49 \pm 0,92 \%$ ) auslöst. Die gleichzeitige Hemmung der eNOS durch L-NAME führt zu keiner signifikanten Veränderung ( $-1,31 \pm 1,13 \%$ ). Des weiteren kann man erkennen, dass nach chemischer Endothelentfernung mittels Saponin ebenfalls keine Vasodilatation ( $-1,20 \pm 4,16 \%$ ) mehr durch HDL auslösbar ist.



**Abbildung 12:** Wirkung von HDL auf vorkontrahierte thorakale Aortenringe von C57BL6-Mäusen und von eNOS defizienten Mäusen.

HDL (0,5 mg/ml) bewirkt an thorakalen Aortenstücken von C57BL6-Mäusen, die durch PE (1 µM) vorkontrahiert worden sind, eine signifikante Dilatation, die durch L-NAME und durch Endothelentfernung aufgehoben werden kann (Balkendiagramm im Insert der Teilabbildung A). An Aortenstücken von eNOS defizienten Mäusen zeigt HDL keine Wirkung auf den Gefäßtonus. Der gleiche Befund zeigt sich nach eNOS Hemmung und nach Endothelentfernung (Balkendiagramm im Insert der Teilabbildung B). Jede Säule in den Inserts repräsentiert den Mittelwert aus mindestens sieben verschiedenen Experimenten ( $n \geq 7$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,01$  HDL vs. Kontrolle.



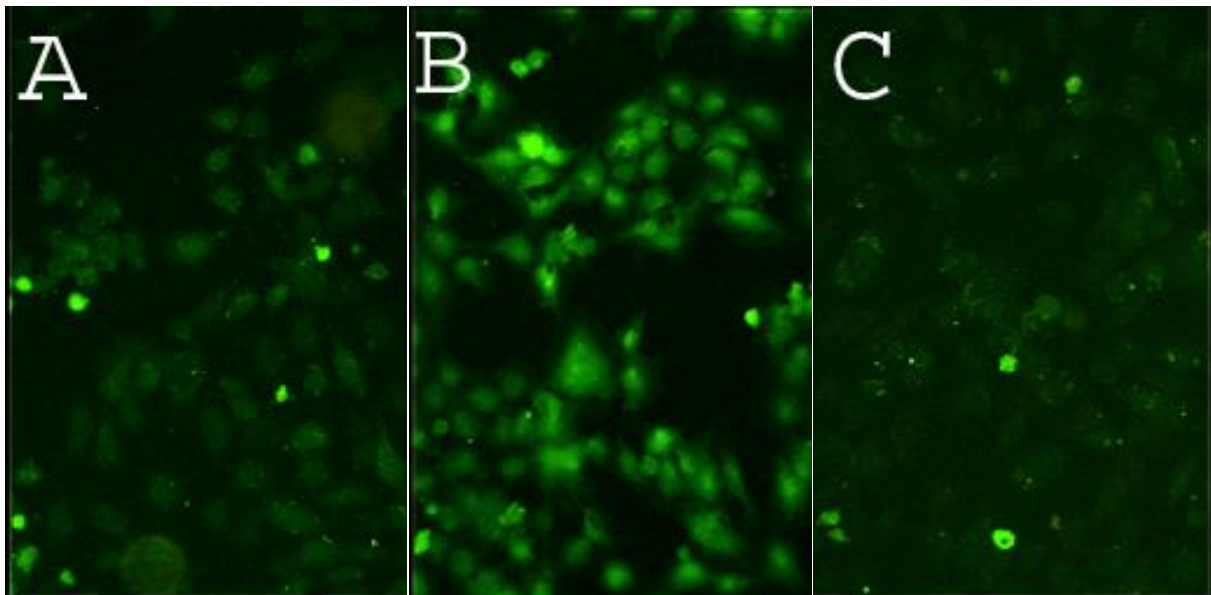
**Abbildung 13:** Wirkung von HDL auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von eNOS defizienten Mäusen nach Hemmung der eNOS und nach Endothelentfernung.

In Teilabbildung A ist der Einfluss von HDL (0,5 mg/ml) nach selektiver Hemmung der eNOS durch L-NAME (100  $\mu$ M) auf thorakale Aortenstücke, die durch PE (1  $\mu$ M) vorkontrahiert sind, dargestellt. In Teilabbildung B ist der Einfluss von HDL auf vorkontrahierte thorakale Aorten nach chemischer Endothelentfernung dargestellt. Sowohl durch Hemmung der eNOS als auch nach Endothelentfernung kann keine HDL-induzierte Vasodilatation erkannt werden. Repräsentative Originalabbildung von jeweils sieben unabhängigen Versuchen ( $n \geq 7$ ) am Kleingefäßmyograph an unterschiedlichen thorakalen Aortenstücken von WKY-Ratten.

Abbildung 13 zeigt zwei repräsentative Originalabbildungen von mindestens 7 unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen thorakalen Aorten von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen. Dargestellt ist die Veränderung der Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten. Zu erkennen ist zum einen, dass nach Blockade der endothelialen NOS durch L-NAME (50  $\mu$ M) die Zugabe von HDL in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml in der Messkammer zu Aortenstücken, die durch 1  $\mu$ M PE vorkontrahiert wurden, zu keiner signifikanten Veränderung des Vasotonus führt (Teilabbildung A). Zum anderen kann man erkennen, dass durch die chemische Endothelentfernung mittels Saponin die Zugabe von HDL in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml in der Messkammer zu durch 1  $\mu$ M PE vorkontrahierten Aortenstücken ebenfalls zu keiner Veränderung des Vasotonus führt (Teilabbildung B).

### 3.4. HDL induzierte NO-Produktion

Zum direkten Nachweis der HDL induzierten NO-Produktion wird der fluoreszenzmikroskopische Nachweis durch den NO-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff 4,5-Di-Amino-Fluorescein-Di-Acetat (DAF-2DA) an humanen Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVECs) durchgeführt. In Abbildung 14 sind drei repräsentative Originalabbildungen dargestellt. In Teilabbildung A erkennt man die basale NO-Produktion der HUVECs ohne Stimulation. Man kann ein schwaches Fluoreszenzsignal erkennen. Nach 10 Minuten Stimulation mit HDL (0,5 mg/ml ) erkennt man in Teilabbildung B eine signifikante Anhebung der NO-sensitiven Fluoreszenz als Zeichen einer erhöhten HDL induzierten NO-Produktion. Durch gleichzeitige Stimulation der HUVECs mit HDL (0,5 mg/ml) und dem eNOS-Inhibitor L-NAME (50  $\mu$ M) über 10 Minuten zeigt sich eine signifikante Verminderung der Fluoreszenz im Vergleich zu dem isolierten HDL induzierten Fluoreszenzanstieg aus Teilabbildung B. Die erkennbare NO-Produktion gleich der basalen NO-Produktion unstimulierter HUVECs.

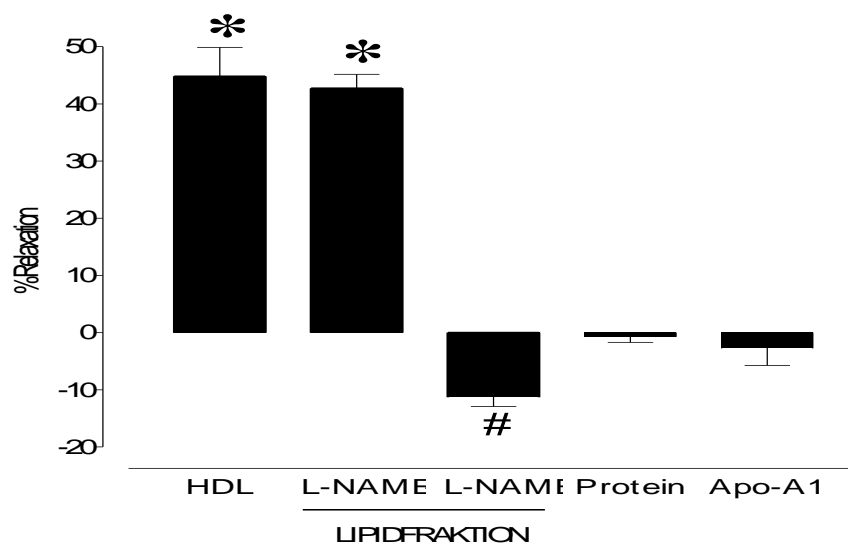


**Abbildung 14:** Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der HDL induzierten NO-Produktion an HUVECs.

In Teilabbildung A ist die basale, nicht stimulierte NO-Produktion der HUVECs zu erkennen. Die Stimulierung der HUVECs für 10 Minuten mit HDL (0,5 mg/ml) führt zu einer signifikanten Zunahme der NO-induzierten Fluoreszenz (Teilabbildung B). Durch gleichzeitige eNOS Hemmung durch parallele Inkubation mit L-NAME ist der HDL induzierte NO-bedingte Fluoreszenzanstieg nicht mehr zu erkennen (Teilabbildung C). Repräsentative Originalabbildung von sechs unabhängigen fluoreszenzmikroskopischen Versuchen.

### 3.5. Bedeutung der isolierten Lipid- und Proteinfraction

Um die Bedeutung der einzelnen Fraktionen des HDL auf Ihre Fähigkeit zur Aktivierung der eNOS zu überprüfen, wurden Versuche am Kleingefäßmyographen an Aorten von WKY-Ratten durchgeführt. Das HDL-Molekül wurde in seine beiden Hauptbestandteile aufgereinigt, die Lipidfraktion und die Proteinfraction, die beide auf Ihre vasodilatierende Funktion hin untersucht wurden. Von der Proteinfraction wurde das quantitativ bedeutende Apo-Lipoprotein A1 zusätzlich isoliert untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 wiedergegeben. Man kann erkennen, dass die Lipidfraktion des HDL an den Aortenringen nach Vorkontraktion eine Dilatation ( $42,72 \pm 2,47 \%$ ) induziert, welche durch L-NAME hemmbar ist ( $-11,29 \pm 1,65 \%$ ). Die Applikation der Proteinfraction ( $-0,72 \pm 0,96 \%$ ) des HDL, insbesondere des Apolipoprotein A1 ( $-2,72 \pm 3,04 \%$ ), führt zu keiner signifikanten Veränderung des Vasotonus an vorkontrahierten Aortenringen.

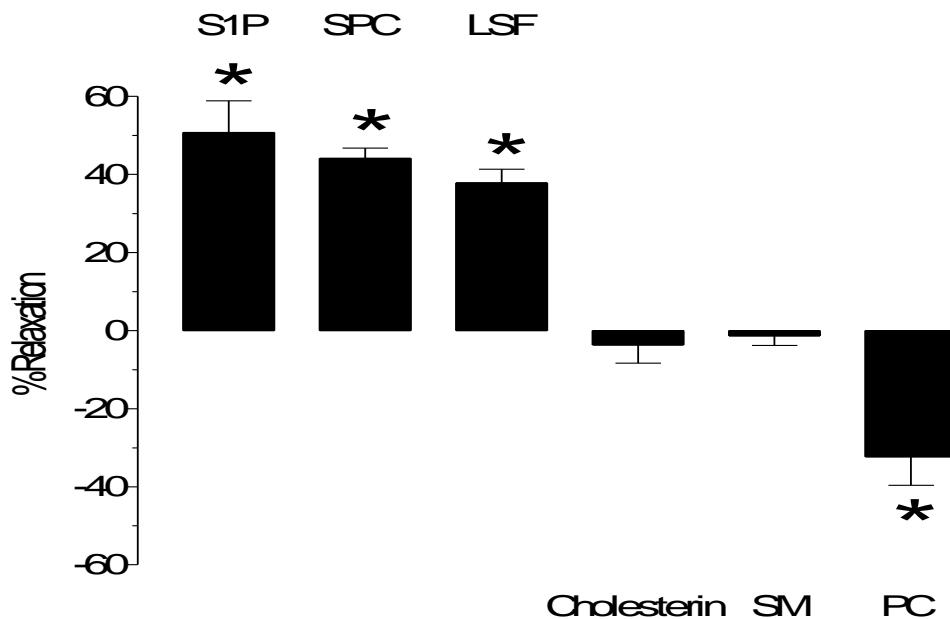


**Abbildung 15:** Wirkung der aufgereinigten Lipid- und Proteinfraction des HDL-Moleküls auf den Gefäßtonus thorakaler Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Zu erkennen ist, dass die Lipidfraktion aus dem HDL-Komplex zu einer signifikanten Vasodilatation führt, die selektiv durch L-NAME (100  $\mu$ M) gehemmt werden kann. Die Proteinfraction und insbesondere das Apolipoprotein A1 zeigen keinen Einfluss auf den Gefäßtonus. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus mindestens acht verschiedenen Experimenten ( $n \geq 8$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,01$  vs. Kontrolle, #  $p < 0,01$  vs. Lipidfraktion.

### 3.6. Einfluss der einzelnen Lipidkomponenten der Lipidfraktion

Um den Einfluss der Bestandteile der Lipidfraktion des HDL auf die jeweilige Beeinflussung des Vasotonus zu überprüfen wurden Versuche am Kleingefäßmyographen an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten durchgeführt. Es wurden die quantitativ bedeutendsten Lipide Cholesterin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und die Lysophospholipide Sphingosin-1-Phosphat, Sphingosinphosphatidylcholin und Lysosulfatid untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 wiedergegeben. Man kann erkennen, dass 10  $\mu\text{M}$  Cholesterin ( $-3,69 \pm 4,61 \%$ ) und 10  $\mu\text{M}$  Sphingomyelin ( $-1,31 \pm 2,52 \%$ ) den Vasotonus nicht signifikant verändern. 10  $\mu\text{M}$  Phosphatidylcholin führt zu einer signifikanten Vasokonstriktion mit Erhöhung des Vasotonus ( $-32,33 \pm 7,30 \%$ ). Die Lysophospholipide Sphingosin-1-Phosphat ( $50,78 \pm 8,11 \%$ ), Sphingosinphosphatidylcholin ( $44,15 \pm 2,62 \%$ ) und Lysosulfatid ( $37,89 \pm 3,49 \%$ ) induzieren in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Abnahme des Vasotonus durch Dilatation.

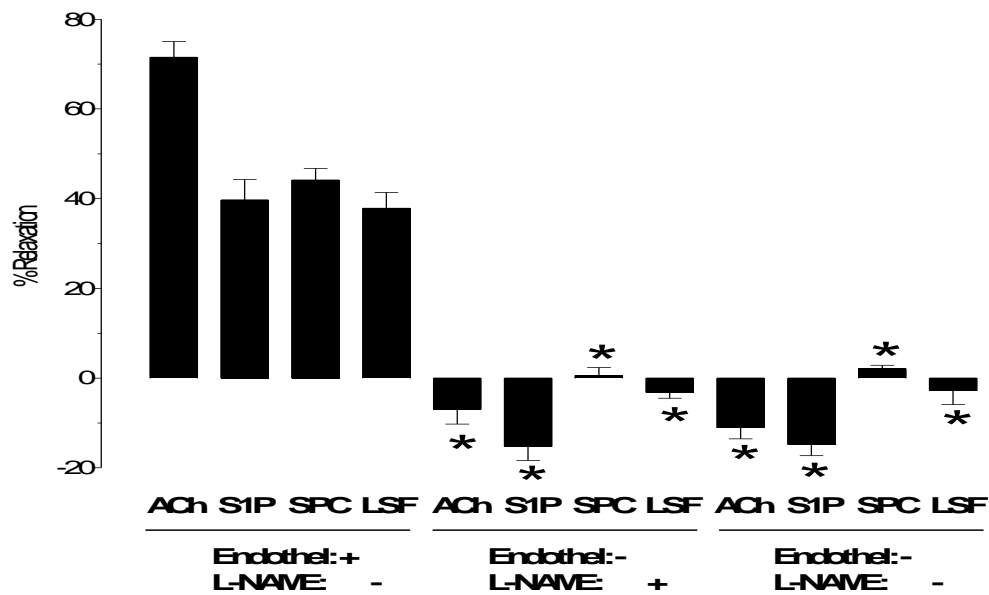


**Abbildung 16:** Wirkung der aufgetrennten Komponenten der Lipidfraktion, Cholesterin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus thorakale vorkontrahierter Aortenringe von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Zu erkennen ist, dass die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF zu einer signifikanten Vasodilatation führen, wohingegen Cholesterin und SM zu keiner signifikanten Beeinflussung des Gefäßtonus führen und PC eine signifikante Vasokonstriktion bewirkt. S1P stellt sich hierbei als der potenteste Vasodilatator heraus. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus mindestens acht verschiedenen Experimenten ( $n > 8$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,01$  vs. Kontrolle, #  $p < 0,01$  vs. HDL

### 3.7. Bedeutung von Lysophospholipide S1P, SPC und LSF

Um die Abhängigkeit der durch die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF induzierten Vasodilatation von der endothelvermittelten eNOS-abhängigen NO-Synthese zu überprüfen, wurden Versuche an thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten durchgeführt. Dabei wurden Versuche mit den Lysophospholipiden an Aorten durchgeführt, bei denen entweder die eNOS durch den spezifischen Inhibitor L-NAME (50  $\mu\text{M}$ ) gehemmt oder das Endothel chemisch mittels Saponin entfernt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3c wiedergegeben. Man kann erkennen, dass die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Acetylcholin an nativen nicht vorbehandelten Aortenringen mit intaktem Endothel zu einer signifikanten und starken Vasodilatation führt ( $71,50 \pm 3,55$  %,  $n=24$ ). Die Vasodilatation ist durch Hemmung der endothelialen NOS mit L-NAME (50  $\mu\text{M}$ ) ( $-6,97 \pm 3,29$  %,  $n=12$ ) und durch chemische Entfernung des Endothels ( $-11,08 \pm 2,46$  %,  $n=12$ ) aufzuheben, so dass Acetylcholin zu einer Vasokonstriktion führt. An nicht vorbehandelten Aorten von WKY-Ratten mit intaktem Endothel führt die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  S1P ( $39,71 \pm 4,57$  %,  $n=14$ ), 10  $\mu\text{M}$  SPC ( $44,15 \pm 2,62$  %,  $n=14$ ) oder 10  $\mu\text{M}$  LSF ( $37,89 \pm 3,49$  %,  $n=14$ ) zu einer signifikanten Vasodilatation. Nach Blockade der eNOS durch L-NAME konnte keine Dilatation durch S1P ( $-15,26 \pm 3,08$  %,  $n=7$ ), SPC ( $0,59 \pm 1,75$  %,  $n=7$ ) oder LSF ( $-3,23 \pm 1,22$  %,  $n=7$ ) induziert werden. Nach chemische Endothelentfernung mittels Saponin konnte an den Aorten gleichfalls durch S1P ( $-14,82 \pm 2,49$  %,  $n=7$ ), SPC ( $2,106 \pm 0,74$  %,  $n=7$ ) oder LSF ( $-2,82 \pm 3,11$  %,  $n=7$ ) keine Vasodilatation ausgelöst werden. Dabei führte die Applikation von Ach und S1P zu einer Kontraktion.

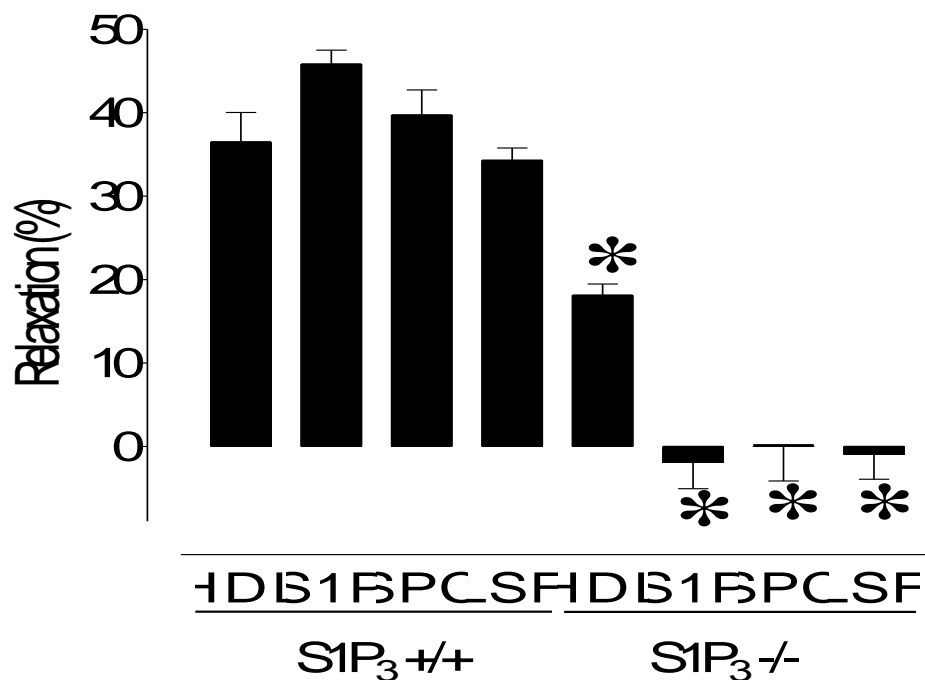


**Abbildung 17:** Wirkung der Lysophospholipide S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus von thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen mit und ohne Hemmung der eNOS und Endothelentfernung.

Zu erkennen ist, dass alle 3 Lysophospholipide an Gefäßen mit nicht gehemmter eNOS und intaktem Endothel zu einer signifikanten Vasodilatation führen. Sowohl die selektive Hemmung der eNOS mittels L-NAME (100  $\mu$ M) an Gefäßen mit intaktem Endothel als auch die Endothelentfernung der Gefäße führen zu einer vollständigen Unterbindung der Vasodilatation. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert aus mindestens sieben verschiedenen Experimenten ( $n > 7$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,05$  vs. Kontrolle

### 3.8. Einfluss von HDL und LPL auf den Vasotonus von S1P<sub>3</sub>-defizienten Aorten

Um den Einfluss der Lysophospholipide S1P, SPC und LSF auf den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor zu überprüfen, wurden Versuche am Kleingefäßmyographen an Aortenringpräparaten von S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt. Im Gegensatz zu Versuchen an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen lösten die Lysophospholipide an Aorten von S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen keine Dilatation aus (S1P 45,84 %  $\pm$  1,69 vs. -1,98 %  $\pm$  3,11,  $n=8$ , SPC 39,74 %  $\pm$  3,02 vs. 0,06 %  $\pm$  4,21,  $n=6$ ; LSF 34,30 %  $\pm$  1,46 vs. -0,98 %  $\pm$  2,96,  $n=6$ ). Im Vergleich zu den Ergebnissen an C57BL/6-Mäusen löst HDL eine signifikant verminderte Vasodilatation an Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen aus (36,52 %  $\pm$  3,52 vs. 18,14 %  $\pm$  1,32,  $n=8$ ).



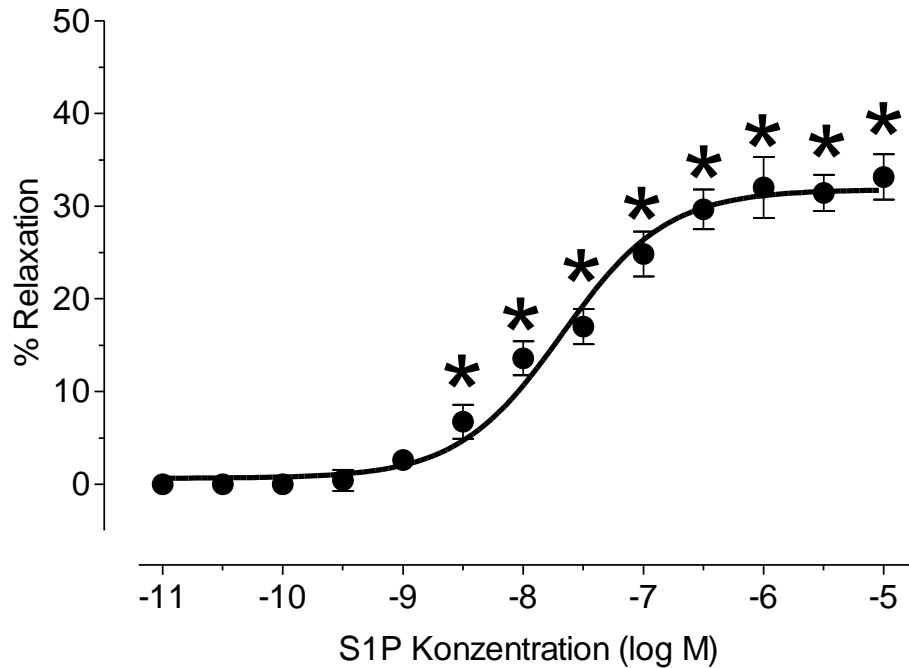
**Abbildung 18:** Wirkung der Sphingolipide S1P, SPC und LSF auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten Aortenringen von C57BL/6 Mäusen und  $S1P_3$  defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen.

Dargestellt sind die Ergebnisse von Versuchen am Kleingefäßmyographen an thorakalen Aortenstücken von C57BL/6-Mäusen ( $S1P_3^{+/+}$ ) und  $S1P_3$ -defizienten Mäusen ( $S1P_3^{-/-}$ ). Aufgetragen ist die Relaxation, die durch HDL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) und die Lysophospholipide S1P (10  $\mu\text{M}$ ), SPC (10  $\mu\text{M}$ ) und LSF (10  $\mu\text{M}$ ) an diesen Aortenstücke ausgelöst wurde, in Prozent der submaximalen Vorkontraktion durch PE (1  $\mu\text{M}$ ). Man erkennt, dass HDL, S1P, SPC und LSF an thorakalen Aortenringen von C57BL/6-Mäusen eine Relaxation auslösen. An Aortenringen von  $S1P_3$ -defizienten Mäusen löst HDL eine im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen signifikant geringe Dilatation aus, während die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF keine Dilatation auslösen. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens 6 unabhängigen Versuchen an verschiedenen Gefäßstücke unterschiedlicher thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen und  $S1P_3$  defizienten Mäusen ( $n \geq 6$ ).

### 3.8.1. Wirkung von HDL und S1P

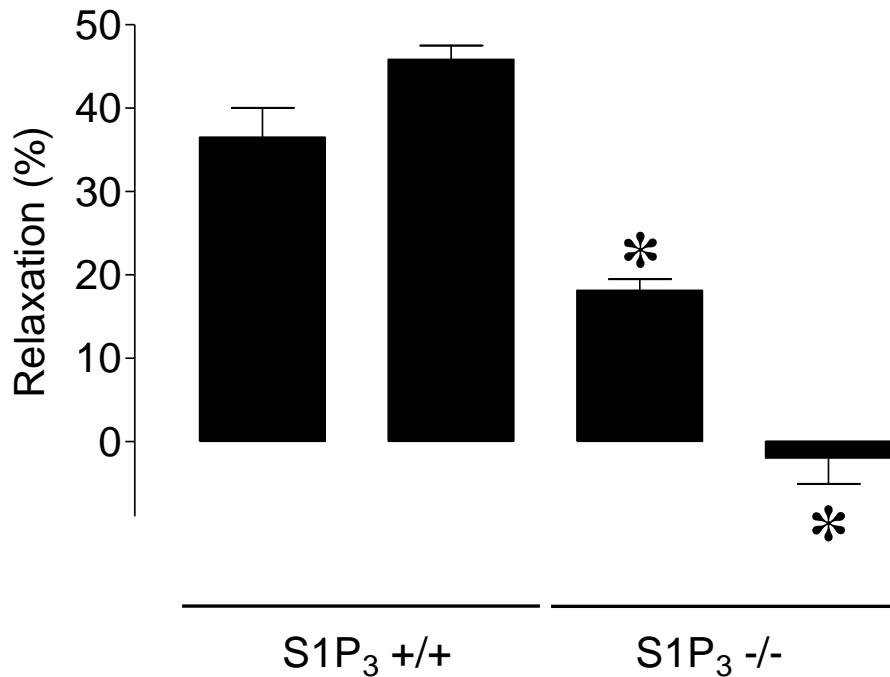
In der folgenden Abbildung ist eine Dosis-Wirkungskurve von S1P, dem natürlich vorkommenden Liganden aller bekannter  $S1P$ -Rezeptoren auf den basalen Tonus von Gefäßstücken einer thorakalen Aorta der WKY-Ratte dargestellt. S1P induziert hierbei eine dosisabhängige Vasodilatation.





**Abbildung 19:** Wirkung von S1P auf vorkontrahierte Gefäßstücke einer thorakalen Aorta von WKY Ratten

S1P induziert an mit PE vorkontrahierten Gefäßstücken einer thorakalen Aorta eine Vasodilatation. Aufgetragen ist die Vasodilatation in Prozent der maximalen PE-Vorkontraktion gegen die jeweilige Konzentration (in log M). In Abbildung 6 ist die DWK von S1P wiedergegeben S1P induziert hierbei eine dosisabhängige Vasodilatation. Bei der DWK handelt es sich um Mittelwerte von mindestens 7 unabhängigen Versuchen an verschiedenen Aortenringen ( $n > 7$ ). Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar.



**Abbildung 20:** Wirkung der Sphingolipide HDL und S1P auf den Gefäßtonus von vorkontrahierten Aortenringen von C57BL/6 Mäusen und S1P<sub>3</sub> defizienten Mäusen am Kleingefäßmyographen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* = P < 0,01 vs. Kontrolle

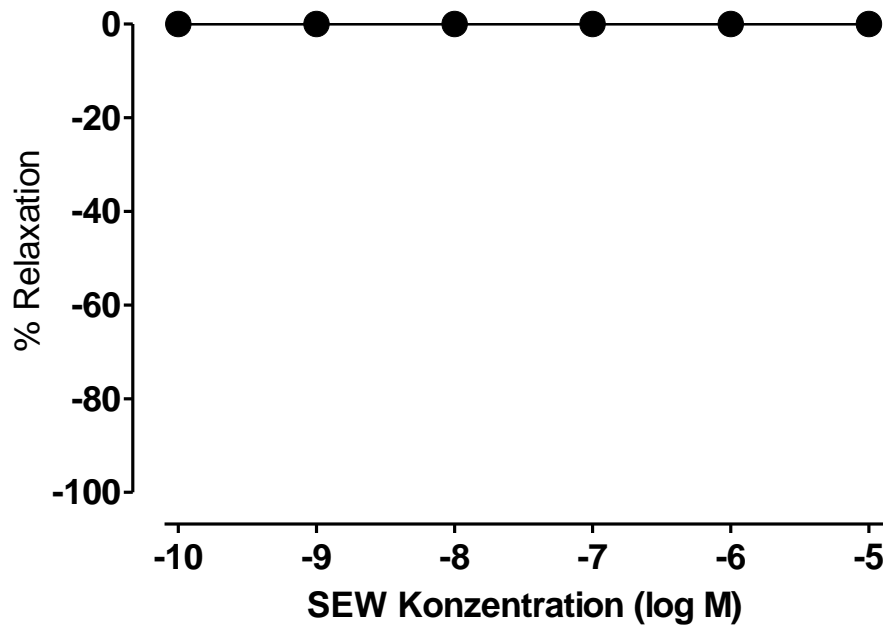
Dargestellt sind die Ergebnisse von Versuchen am Kleingefäßmyographen an thorakalen Aortenstücken von C57BL/6-Mäusen (S1P<sub>3</sub> +/+) und S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen (S1P<sub>3</sub> -/-). Aufgetragen ist die Relaxation, die durch HDL (1. Balken von links, 100 µg/ml) und das Lysophospholipid S1P (2. Balken von links, 10 µM) an diesen Aortenstücke ausgelöst wurde, in Prozent der submaximalen Vorkontraktion durch PE (1 µM). Man erkennt, dass HDL und S1P an thorakalen Aortenringen von C57BL/6-Mäusen eine Relaxation auslösen. An Aortenringen von S1P-3-Rezeptor defizienten Mäusen löst HDL (3. Balken von links) eine im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen signifikant geringere Dilatation aus, während das Lysophospholipid S1P (4. Balken von links) keine Dilatation auslöst. Dargestellt sind Ergebnisse von jeweils mindestens 6 unabhängigen Versuchen an verschiedenen Gefäßstücke unterschiedlicher thorakaler Aorten von C57BL/6-Mäusen und S1P<sub>3</sub> defizienten Mäusen (n ≥ 6).

### 3.9. S1P-Rezeptor Agonisten

Um die erhobenen Befunde pharmakologisch zu bestätigen, wurden Versuche mit dem spezifischen S1P<sub>1</sub>-Rezeptor Agonisten SEW2871 und dem unselektiven Agonisten FTY720 und dessen phosphorylierter Form pFTY720 durchgeführt.

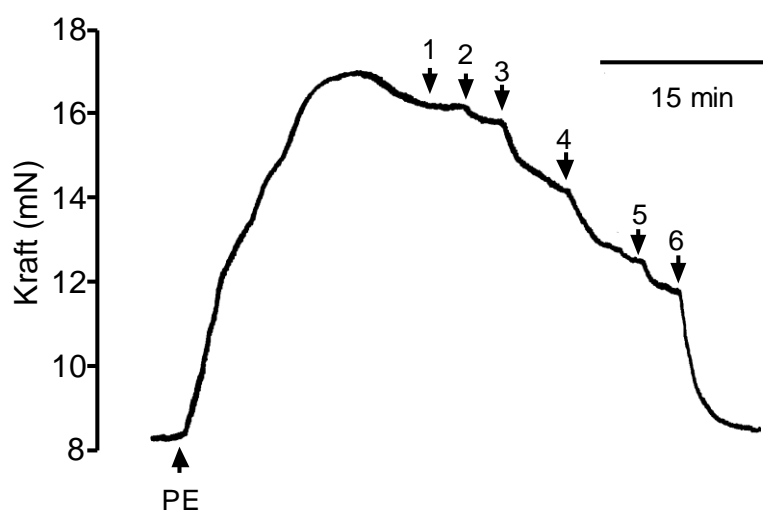
In den Versuchen mit SEW konnte gezeigt werden, dass durch die spezifische Aktivierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors keine signifikante Vasodilatation induziert werden konnte (Abbildung 21).

FTY720 und dessen biologisch aktive Form pFTY720, beides Agonisten am S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> Rezeptor, induzierten beide dosisabhängig eine potente und signifikante Vasodilatation (Abbildung 22 und 23).



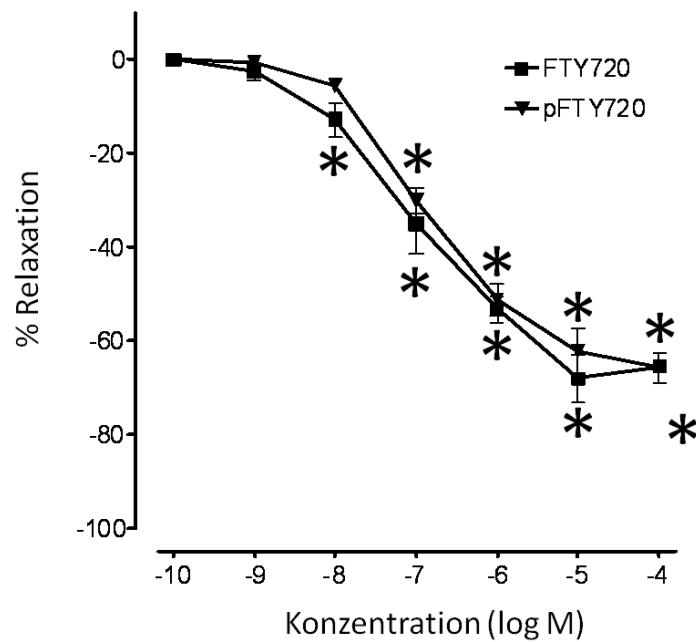
**Abbildung 21:** Wirkung von SEW auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Aufgetragen ist die Änderung der Kraft in % Relaxation der maximalen PE Kontraktion gegen die SEW Konzentration in log M. Die Zugabe von SEW zu den vorkontrahierten Gefäßen bewirkt keine signifikante Vasodilatation. Repräsentative Abbildung von 8 unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 22:** Wirkung von FTY720-P auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Aufgetragen ist die Änderung der Kraft in mN gegen die Zeit in Minuten. Die Zugabe von FTY720 zu den vorkontrahierten Gefäßen bewirkt eine signifikante, konzentrationsabhängige Vasodilatation. Repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 23:** Wirkung von FTY720 und pFTY720 auf den Gefäßtonus bei mit PE vorkontrahierten thorakalen Aortenringen von WKY-Ratten am Kleingefäßmyographen.

Aufgetragen ist die Änderung der Kraft in % Relaxation der maximalen PE induzierten Vorkontraktion gegen die Konzentration in log M. Die Zugabe von FTY720 und pFTY720 zu den vorkontrahierten Gefäßen bewirkt eine signifikante, dosisabhängige Vasodilatation. Repräsentative Originalabbildung von 8 unabhängigen Versuchen. Die vertikalen Linien stellen den Standardfehler dar. \* =  $P < 0,01$  vs. Kontrolle, # p < 0,01 vs. HDL

#### **4. Diskussion**

Die Verletzung des Gefäßendothels ist ein kritisches Moment in der Entstehung von Atherosklerose. Das Endothel hat viele physiologische Funktionen, die direkt oder indirekt an der Atheroprotektion beteiligt sind. Es reguliert die Adhäsion und Ausschwemmung von Leukozyten, moduliert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, trägt zur Erhaltung einer antithrombogenen Gefäßoberfläche bei und reguliert den Gefäßtonus [236].

Verschiedene klinische Studien haben eine starke inverse Beziehung zwischen den Plasma HDL Spiegel und der endothelabhängigen Vasodilatation zeigen können [237]. Es besteht außerdem eine starke inverse Beziehung zwischen Plasma HDL Konzentrationen und der Inzidenz von koronarer Herzkrankheit (KHK), die unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren ist [116]. Niedrige HDL Konzentrationen sind dabei häufig bei KHK-Patienten [118], während genetische Syndrome, die mit hohen HDL Spiegel einhergehen, oft mit einem niedrigen KHK Risiko und Langlebigkeit assoziiert sind. Durch eine leichtgradige Erhöhung des HDL-Spiegels durch Behandlung mit Niacin und Fibraten konnte beispielsweise eine signifikante Verminderung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen erzielt werden [264-265]. Spieker et al. [238] haben 2002 gezeigt, dass resynthetisiertes HDL die beeinträchtigte Endothelfunktion bei hypercholesterinämischen Männern wiederherstellen konnte. Diese epidemiologischen Erkenntnisse führten letztlich dazu, HDL als routinemäßigen Laborparameter in die Screeninguntersuchungen aller Erwachsenen aufzunehmen und als eigenständigen Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose und einer koronaren Herzkrankheit einzuführen [235]

Es wurden verschiedene Wirkmechanismen vermutet, die diesem HDL-induzierten antiatherogenen Effekt zugrunde liegen. HDL soll beispielsweise aus vermehrt zur Verfügung stehender Arachidonsäure zu einer Synthesesteigerung von vasodilatativ wirkenden Prostanoiden wie die Prostaglandine E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>) führen [239]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass HDL über einen SR-BI Rezeptor abhängigen Prozess eine Stimulierung der endothelialen NOS bewirkt [240]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wird in dieser Arbeit gezeigt, dass HDL in physiologisch relevanten Konzentrationen (0,05 – 0,5 mg/ml) im Versuch an isolierten thorakalen Aorten von WKY-Ratten und C57/B6 Mäusen am Kleingefäßmyographen zu einer signifikanten dosisabhängigen Vasorelaxation an vorkontrahierten Aortenstücken führt. Die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen, ist durch chemische Endothelentfernung der Aortenringpräparate und durch chemische Hemmung der eNOS mittels des spezifischen und irreversiblen Inhibitors L-NAME zu antagonisieren. Des Weiteren konnte in unseren Versuchen

an Aortenringpräparaten von eNOS defizienten Mäusen keine Vasorelaxation durch HDL ausgelöst werden. Alle Daten zeigen somit eindeutig, dass die durch HDL ausgelöste Vasorelaxation ausschließlich über eine endothelial vermittelte NO Freisetzung gesteuert wird und die NO-Freisetzung wiederum durch die Aktivierung der eNOS vermittelt ist. Die hierfür von uns verwendeten HDL Konzentrationen waren physiologisch relevant, da 0,8-1,2mg/ml HDL Protein äquivalent zu ca. 40-70mg HDL- Cholesterin/dl sind.

Viele verschiedene Stoffe können auf unterschiedliche Weise zu einer NO-Freisetzung führen. VEGF, Östrogene und IGF-1 stimulieren beispielsweise die Phosphorylase Akt und führen so über die Phosphorylierung der eNOS am Ser 1177 zu einer NO Produktion und Freisetzung. Alternativ dazu führen laminare Scherkräfte über die Proteinkinase A (PKA) zu einer Aktivierung der eNOS [241-246].

Die verschiedenen HDL-Moleküle sind komplex aufgebaut und können eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen induzieren, wobei verschiedene Bestandteile dieser heterogenen Moleküle für die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege verantwortlich sein können. Um die bioaktiven Fraktionen des komplex aufgebauten HDL-Moleküls zu untersuchen, wurden die einzelnen Unterfraktionen des HDL-Moleküls, bestehend aus Proteinfraction, Lipidfraction, Apo-AI-Lipoprotein, Lysophospholipide, Cholesterin, Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, einzeln isoliert und unabhängig von einander untersucht. Im gefäßphysiologischen Versuch an vorkontrahierten isolierten Aortenringpräparaten induziert die Lipidfraction des HDL in Konzentrationen, die den physiologisch im HDL-Molekül vorliegenden entsprechen, eine zum nativen HDL vergleichbare Vasodilatation. Diese Vasodilatation ist durch Hemmung der endothelialen NOS zu inhibieren. Im Gegensatz dazu zeigt die Proteinfraction des HDL, Apo-Lipoprotein AI, keine signifikante relaxierende Wirkung auf den Gefäßtonus.

Zur weiteren Differenzierung des vasoaktiven Effektes der Lipidfraction wurde diese weiter aufgetrennt und weitere Bestandteile auf ihre Vasoaktivität getestet. Die quantitativ bedeutenden Lipidbestandteile Cholesterin, Sphingomyelin und Phosphatidylcholin bewirken keine Vasodilatation und Aktivierung der eNOS im physiologischen Gefäßmodell. Dagegen aktivieren die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF die eNOS und führen dosisabhängig zu einer Vasodilatation an Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen. Nach chemischer Endothelentfernung kann die beobachtete Vasodilatation nicht mehr erzeugt werden, so dass diese Vasodilatation endothelvermittelt verläuft. An Aortenringpräparaten von eNOS defizienten Mäusen und an Aortenringpräparaten von C57BL/6-Mäusen, an denen die eNOS mittels L-NAME irreversibel inhibiert wurde, konnte ebenfalls keine Lysophospholipid induzierte

Vasodilatation beobachtet werden, so dass diese endothelvermittelte Vasodilatation über die Aktivierung der endothelialen NOS verläuft. Die Effekte von HDL und der HDL assoziierten Lysophospholipide auf die eNOS Aktivierung und NO Freisetzung konnten ebenfalls in Fluoreszenzmikroskopischen Versuchen an humanen umbilikalen Venenendothelzellen reproduziert werden.

Diese Arbeit zeigt somit, dass die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch HDL und speziell durch seine bioaktiven Moleküle wie die Lysophospholipide S1P, SPC und LSF vermittelt wird, wobei sich S1P als der potenteste Vasodilatator der Lysophospholipide herausstellt. Diese Moleküle vermitteln eine Vielzahl an physiologischen Prozessen durch Aktivierung verschiedener G-Protein gekoppelter Lysophospholipidrezeptoren [250-252]. Sowohl S1P, als auch SPC aktivieren den S1P<sub>1</sub>-, S1P<sub>3</sub>- als auch den S1P<sub>5</sub>-Rezeptor, welche alle auf Endothelzellen exprimiert werden [176, 177, 186, 253-255]. Diese Rezeptoren sind an trimere G-Proteine gekoppelt, darunter auch ein Gi Protein [252, 256, 257]. Durch die Testung von SEW2871 und FTY720 konnte auch durch Agonisten gezeigt werden, dass die durch HDL und S1P induzierte Vasodilatation mit einer hohen Wahrscheinlichkeit über die Aktivierung des S1P<sub>3</sub> Rezeptors erfolgt. Der Agonist SEW2871 ist ein selektiver S1P<sub>1</sub>-Rezeptor Agonist, der keine signifikante Vasodilatation induziert. FTY720 aktiviert den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor und führt direkt zu einer Internalisierung, wodurch dieser Rezeptor abgeschaltet wird. Der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor wird durch FTY720 nicht aktiviert. Der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor wird aktiviert, aber nicht desensibilisiert. Der S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>4</sub> Rezeptor wird aktiviert aber im Gefäßsystem nicht exprimiert. Insgesamt übt FTY720 seine Wirkung auf das vaskuläre System über die Aktivierung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors aus und induziert eine dosisabhängige Vasodilatation. Da sowohl pFTY720, die phosphorylierte biologisch aktive Form des FTY, als auch FTY720 in der nicht phosphorylierten Form zu einer dosisabhängigen Vasodilatation führen ist anzunehmen, dass eine schnelle biologische Phosphorylierung der nicht phosphorylierten Vorstufe von pFTY stattfindet.

Um die Bedeutung des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors in der HDL- bzw. Lysophospholipid vermittelten Vasodilatation zu untersuchen, wurden Versuche am Kleingefäßmyographen an Aortenringpräparaten von S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt. Alle 3 Lysophospholipide konnten keine Vasodilatation an diesen Aortenstücken bewirken, sodass die vasodilatierenden Effekte dieser Lysophospholipide vollständig über diesen Rezeptor vermittelt zu sein scheinen. HDL konnte jedoch auch bei S1P<sub>3</sub>-Rezeptor defizienten Mäusen noch eine geringe vasodilatierende Wirkung erzielen, was Grund zur Annahme lässt, dass HDL seine vasodilatierende Wirkung zwar über die Aktivierung der eNOS erzielt, die Aktivierung der eNOS durch HDL jedoch nicht ausschließlich über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor geschieht.

In dieser Arbeit wurde somit zum einen die HDL vermittelte eNOS-Aktivierung nachgewiesen. Hierbei wurden die HDL-assoziierten Lysophospholipide S1P, SPC und LSF als bioaktive antiatherogen wirkende HDL-Bestandteile herausgearbeitet, S1P wurde dabei als potentester Vasodilatator identifiziert. Desweiteren wurde in dieser Arbeit der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor als ein funktioneller HDL-Rezeptor identifiziert, über den die endothelabhängige eNOS-vermittelte NO-Freisetzung induziert wird. S1P ist ein potentester Agonist des S1P<sub>3</sub>-Rezeptors.



## **5. Zusammenfassung**

Die Verletzung des Gefäßendothels ist ein kritisches Moment in der Entstehung von Atherosklerose. Das Endothel hat viele physiologische Funktionen, die direkt oder indirekt an der Atheroprotektion beteiligt sind. Desweiteren besteht eine starke inverse Beziehung zwischen Plasma HDL Konzentrationen und der Inzidenz von koronarer Herzkrankheit (KHK), die unabhängig von anderen bekannten Risikofaktoren ist [261]. Eine erniedrigte HDL-Plasmakonzentration ist somit ein eigenständiger proatherogener Risikofaktor.

HDL Moleküle sind eine komplexe Zusammensetzung aus Proteinen (Apo-AI) und Lipiden (Cholesterin, Sphingomyelin, Lysophospholipide). Bekannte antiatherogene Wirkungen von HDL-Molekülen sind der reverse Cholesterintransport [262], sowie pleiotrope Effekte wie die Blockade der Monozytenadhäsion, Blockade der oxLDL induzierten Endothelfunktionsstörung, Stimulation der Endothelzellproliferation, Blockade der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Stimulation der endothelialen NO-Synthase.

In der Lipidfraktion des HDL ist eine biochemische Gruppe von biologisch aktiven Lipiden, dessen Hauptvertreter Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC) sind. Es handelt sich dabei um intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle, die potente Agonisten an spezifischen transmembranösen Rezeptoren (S1P-Rezeptoren) sind. Bisher sind 5 unterschiedliche S1P-Rezeptoren bekannt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HDL vermittelte Vasodilatation über die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erfolgt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch S1P am S1P3-Rezeptor vermittelt wird.

**6. Literaturverzeichnis**

1. Moncada, S., et al., *An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation*. Nature, 1976. **263**(5579): p. 663-5.
2. Furchgott, R.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived relaxing and contracting factors*. FASEB J, 1989. **3**(9): p. 2007-18.
3. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
4. Chen, G., H. Suzuki, and A.H. Weston, *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1165-74.
5. Griffith, T.M., et al., *Enhanced inhibition of the EDHF phenomenon by a phenyl methoxyalaninyl phosphoramidate derivative of dideoxyadenosine*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(1): p. 27-30.
6. Ahluwalia, A. and A.J. Hobbs, *Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(3): p. 162-7.
7. Coleman, R.A., et al., *A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein*. Prostaglandins, 1994. **47**(2): p. 151-68.
8. Shimizu, H., et al., *Effects of vanadate on prostacyclin and endothelin-1 production and protein-tyrosine phosphorylation in human endothelial cells*. Thromb Haemost, 1994. **72**(6): p. 973-8.
9. Knowles, R.G. and S. Moncada, *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J, 1994. **298** ( Pt 2): p. 249-58.
10. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
11. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator*. Hypertension, 1988. **12**(4): p. 365-72.
12. Moncada, S., M.W. Radomski, and R.M. Palmer, *Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(13): p. 2495-501.
13. Moncada, S., *Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity*. J Lab Clin Med, 1992. **120**(2): p. 187-91.
14. Moncada, S., E.A. Higgs, and R.M. Palmer, *Characterization and biological significance of endothelium-derived relaxing factor*. Biochem Soc Trans, 1988. **16**(4): p. 484-6.
15. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets*. Br J Pharmacol, 1990. **101**(2): p. 325-8.
16. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(3): p. 1482-9.
17. Bolotina, V.M., et al., *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 850-3.
18. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
19. Scott-Burden, T., et al., *Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation*. Circ Res, 1992. **71**(5): p. 1088-100.

20. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
21. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
22. Armour, K.J., et al., *Activation of the inducible nitric oxide synthase pathway contributes to inflammation-induced osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2790-6.
23. Laycock, S.K., et al., *Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney*. Circ Res, 1998. **82**(12): p. 1263-71.
24. Ziche, M. and L. Morbidelli, *Nitric oxide and angiogenesis*. J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 139-48.
25. Lee, P.C., et al., *Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 2): p. H1600-8.
26. Charles, I.G., et al., *Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(3): p. 1481-9.
27. MacNaul, K.L. and N.I. Hutchinson, *Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(3): p. 1330-4.
28. Cannon, R.O., 3rd, *Potential mechanisms for the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on endothelial dysfunction: the role of nitric oxide*. Am J Cardiol, 1998. **82**(10A): p. 8S-10S.
29. Marletta, M.A., *Nitric oxide synthase structure and mechanism*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12231-4.
30. Marletta, M.A., *Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated?* Trends Biochem Sci, 2001. **26**(9): p. 519-21.
31. Andrew, P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 521-31.
32. Hecker, M., M. Cattaruzza, and A.H. Wagner, *Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells*. Gen Pharmacol, 1999. **32**(1): p. 9-16.
33. Ignarro, L.J., *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Biosci Rep, 1999. **19**(2): p. 51-71.
34. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(6): p. 879-86.
35. Moncada, S., *Nitric oxide*. J Hypertens Suppl, 1994. **12**(10): p. S35-9.
36. Heeringa, P., E. Steenbergen, and H. van Goor, *A protective role for endothelial nitric oxide synthase in glomerulonephritis*. Kidney Int, 2002. **61**(3): p. 822-5.
37. Hernandez-Pando, R., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis*. Exp Toxicol Pathol, 2001. **53**(4): p. 257-65.
38. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193-7.
39. Balligand, J.L., et al., *Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14582-6.

40. Armour, K.E., et al., *Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase*. *Endocrinology*, 2001. **142**(2): p. 760-6.
41. Fox, S.W. and J.W. Chow, *Nitric oxide synthase expression in bone cells*. *Bone*, 1998. **23**(1): p. 1-6.
42. Bredt, D.S., P.M. Hwang, and S.H. Snyder, *Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide*. *Nature*, 1990. **347**(6295): p. 768-70.
43. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
44. Schmidt, H.H., S.M. Lohmann, and U. Walter, *The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1178**(2): p. 153-75.
45. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases*. *Methods Mol Biol*, 1998. **100**: p. 1-32.
46. Klatt, P., et al., *Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(13): p. 7336-42.
47. List, B.M., et al., *Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization*. *Biochem J*, 1997. **323 ( Pt 1)**: p. 159-65.
48. Venema, R.C., et al., *Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 1276-82.
49. Venema, V.J., et al., *Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(45): p. 28187-90.
50. Venema, V.J., et al., *Caveolin-1 detergent solubility and association with endothelial nitric oxide synthase is modulated by tyrosine phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(1): p. 155-61.
51. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center*. *Cell*, 1998. **95**(7): p. 939-50.
52. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
53. Ghosh, D.K., H.M. Abu-Soud, and D.J. Stuehr, *Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase*. *Biochemistry*, 1995. **34**(36): p. 11316-20.
54. Stuehr, D.J., et al., *N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(10): p. 6259-63.
55. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization*. *J Physiol Pharmacol*, 1999. **50**(4): p. 525-34.
56. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *The alternative: EDHF*. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. **31**(1): p. 15-22.
57. Stangl, K., et al., *High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease*. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(2): p. 133-40.
58. Zanchi, A., et al., *Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism*. *Kidney Int*, 2000. **57**(2): p. 405-13.

59. Morita, T., et al., *Effect of a polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in Japanese patients with IgA nephropathy*. Clin Nephrol, 1999. **52**(4): p. 203-9.
60. Nakayama, M., et al., *T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm*. Circulation, 1999. **99**(22): p. 2864-70.
61. Nakayama, M., et al., *T(-786)--> C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis*. Am J Cardiol, 2000. **86**(6): p. 628-34.
62. Wattanapitayakul, S.K., et al., *Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(7): p. 361-8.
63. Jachymova, M., et al., *Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(2): p. 426-30.
64. Miyamoto, Y., et al., *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. Hypertension, 1998. **32**(1): p. 3-8.
65. Nassar, B.A., et al., *Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease*. Am Heart J, 2001. **142**(4): p. 586-9.
66. Yoshimura, M., et al., *A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese*. Hum Genet, 1998. **103**(1): p. 65-9.
67. Cai, H., D.E. Wilcken, and X.L. Wang, *The Glu-298-->Asp (894G-->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease*. J Mol Med, 1999. **77**(6): p. 511-4.
68. Kato, N., et al., *Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension*. Hypertension, 1999. **33**(4): p. 933-6.
69. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
70. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
71. Cotran, R.S., et al., *Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo*. J Exp Med, 1986. **164**(2): p. 661-6.
72. Manduteanu, I., et al., *Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992. **24**(4): p. 539-47.
73. Hoffmann, A., T. Gloe, and U. Pohl, *Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 33-44.
74. Uematsu, M., et al., *Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 1): p. C1371-8.
75. Ruehlmann, D.O. and G.E. Mann, *Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids*. Curr Med Chem, 2000. **7**(5): p. 533-41.
76. Ramasamy, S., S. Parthasarathy, and D.G. Harrison, *Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid*. J Lipid Res, 1998. **39**(2): p. 268-76.
77. Ziegler, T., et al., *Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces*. Hypertension, 1998. **32**(2): p. 351-5.
78. Drexler, H., *Endothelial dysfunction: clinical implications*. Prog Cardiovasc Dis, 1997. **39**(4): p. 287-324.

79. Blair, A., et al., *Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32512-9.
80. Kuhlencordt, P.J., et al., *Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice*. Circulation, 2001. **103**(25): p. 3099-104.
81. Kuhlencordt, P.J., et al., *Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice*. Circulation, 2001. **104**(4): p. 448-54.
82. Oyadomari, S., et al., *Coinduction of endothelial nitric oxide synthase and arginine recycling enzymes in aorta of diabetic rats*. Nitric Oxide, 2001. **5**(3): p. 252-60.
83. Tomiyama, H., et al., *Reduction of oxidative stress augments natriuretic effect of furosemide in moderate heart failure*. Am Heart J, 2003. **145**(1): p. E2.
84. Vaughan, C.J., M.B. Murphy, and B.M. Buckley, *Statins do more than just lower cholesterol*. Lancet, 1996. **348**(9034): p. 1079-82.
85. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
86. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
87. Libby, P., et al., *Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization*. Am J Med, 1998. **104**(2A): p. 14S-18S.
88. Libby, P., *The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms*. Vasc Med, 1998. **3**(3): p. 225-9.
89. Cornhill, J.F., et al., *Topographic study of sudanophilic lesions in cholesterol-fed minipigs by image analysis*. Arteriosclerosis, 1985. **5**(5): p. 415-26.
90. Wissler, R.W. and D. Vesselinovitch, *Atherosclerosis--relationship to coronary blood flow*. Am J Cardiol, 1983. **52**(2): p. 2A-7A.
91. Goldbourt, U., L. Cohen, and H.N. Neufeld, *High density lipoprotein cholesterol: prognosis after myocardial infarction. The Israeli Ischemic Heart Disease Study*. Int J Epidemiol, 1986. **15**(1): p. 51-5.
92. Goldbourt, U. and H.N. Neufeld, *Genetic aspects of arteriosclerosis*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(4): p. 357-77.
93. Nichaman, M.Z., et al., *Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: distribution of biochemical risk factors*. Am J Epidemiol, 1975. **102**(6): p. 491-501.
94. Shih, D.M., C. Welch, and A.J. Lusis, *New insights into atherosclerosis from studies with mouse models*. Mol Med Today, 1995. **1**(8): p. 364-72.
95. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
96. Lusis, A.J., R. Mar, and P. Pajukanta, *Genetics of atherosclerosis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2004. **5**: p. 189-218.
97. Cullen, P. and G. Assmann, *High risk strategies for atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 1999. **286**(1-2): p. 31-45.
98. Gordon, D.J., et al., *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies*. Circulation, 1989. **79**(1): p. 8-15.
99. Kronenberg, F., et al., *Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study*. Circulation, 1999. **100**(11): p. 1154-60.

100. Luft, F.C., *Microalbuminuria and essential hypertension: renal and cardiovascular implications*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1997. **6**(6): p. 553-7.
101. Gerhard, G.T. and P.B. Duell, *Homocysteine and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol*, 1999. **10**(5): p. 417-28.
102. Cullen, P. and G. Assmann, [*Primary and secondary prevention of coronary heart disease. A position paper of the International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2000. **125**(28-29): p. 881-7.
103. Cullen, P., A. von Eckardstein, and G. Assmann, *Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors*. *Eur Heart J*, 1998. **19 Suppl O**: p. O13-9.
104. Cullen, P., et al., *Dyslipidaemia and cardiovascular risk in diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 1999. **1**(4): p. 189-98.
105. Glassman, A.H. and P.A. Shapiro, *Depression and the course of coronary artery disease*. *Am J Psychiatry*, 1998. **155**(1): p. 4-11.
106. Nathan, L. and G. Chaudhuri, *Estrogens and atherosclerosis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. **37**: p. 477-515.
107. Lubas, W. and K. Gutkowski, [*C-reactive protein in cardiovascular diseases*]. *Przegl Lek*, 2006. **63**(7): p. 562-6.
108. Ridker, P.M. and J.D. Silvertown, *Inflammation, C-reactive protein, and atherothrombosis*. *J Periodontol*, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1544-51.
109. Onat, A., G. Can, and G. Hergenc, *Serum C-reactive protein is an independent risk factor predicting cardiometabolic risk*. *Metabolism*, 2008. **57**(2): p. 207-14.
110. Barry-Lane, P.A., et al., *p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(10): p. 1513-22.
111. Brown, D.J. and J. Goodman, *A review of vitamins A, C, and E and their relationship to cardiovascular disease*. *Clin Excell Nurse Pract*, 1998. **2**(1): p. 10-22.
112. Pryor, W.A., *Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(1): p. 141-64.
113. Assmann, G., et al., *Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease*. *Circulation*, 1999. **100**(18): p. 1930-8.
114. Assmann, G., et al., *Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1819-24.
115. Hu, H., G.N. Pierce, and G. Zhong, *The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(5): p. 747-53.
116. Gordon, D.J. and B.M. Rifkind, *High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(19): p. 1311-6.
117. Genest, J., Jr., *Familial combined hyperlipoproteinemia*. *Can J Cardiol*, 1991. **7**(2): p. X-XI.
118. Genest, J., Jr., et al., *Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(12): p. 1728-37.
119. Genest, J., Jr., et al., *Prevalence of lipoprotein (a) [Lp(a)] excess in coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 1991. **67**(13): p. 1039-145.
120. Genest, J.J., Jr., et al., *Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 1991. **90**(2-3): p. 149-57.
121. Genest, J.J., et al., *Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 1991. **67**(15): p. 1185-9.

122. Genest, J.J., Jr., et al., *Prevalence of familial hyperhomocyst(e)inemia in men with premature coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(5): p. 1129-36.
123. Bolibar, I., et al., *Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities*. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(6): p. 955-60.
124. Genest, J.J., Jr., et al., *Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease*. *Circulation*, 1992. **85**(6): p. 2025-33.
125. Frick, M.H., et al., *Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(20): p. 1237-45.
126. Robins, S.J., et al., *Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2001. **285**(12): p. 1585-91.
127. Manninen, V., et al., *Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment*. *Circulation*, 1992. **85**(1): p. 37-45.
128. Rubins, H.B., et al., *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**(6): p. 410-8.
129. von Eckardstein, A., Y. Huang, and G. Assmann, *Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses*. *Curr Opin Lipidol*, 1994. **5**(6): p. 404-16.
130. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(2): p. 211-28.
131. Barrans, A., et al., *Pre-beta HDL: structure and metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1300**(2): p. 73-85.
132. Castle, C.K., et al., *Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture*. *J Lipid Res*, 1991. **32**(3): p. 439-47.
133. Danielsen, E.M., G.H. Hansen, and M.D. Poulsen, *Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(6): p. 1347-56.
134. Musliner, T.A., et al., *Size transformations of intermediate and low density lipoproteins induced by unesterified fatty acids*. *J Lipid Res*, 1991. **32**(6): p. 903-15.
135. Musliner, T.A., 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**(6): p. 917-33.
136. Liang, H.Q., K.A. Rye, and P.J. Barter, *Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins*. *J Lipid Res*, 1994. **35**(7): p. 1187-99.
137. Francone, O.L., L. Royer, and M. Haghpassand, *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**(6): p. 1268-77.
138. von Eckardstein, A., et al., *Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1301**(3): p. 255-62.
139. Barrans, A., et al., *Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(15): p. 11572-7.
140. Oram, J.F. and S. Yokoyama, *Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids*. *J Lipid Res*, 1996. **37**(12): p. 2473-91.



141. Forte, T.M., et al., *Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles*. J Lipid Res, 1993. **34**(2): p. 317-24.
142. Asztalos, B., et al., *Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(9): p. 1630-6.
143. Heeren, J., W. Weber, and U. Beisiegel, *Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 3)**: p. 349-59.
144. Takahashi, Y. and J.D. Smith, *Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11358-63.
145. von Eckardstein, A., et al., *Lipid-free apolipoprotein (apo) A-I is converted into alpha-migrating high density lipoproteins by lipoprotein-depleted plasma of normolipidemic donors and apo A-I-deficient patients but not of Tangier disease patients*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 25-34.
146. Miida, T., et al., *Regulation of the concentration of pre beta high-density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity*. Biochemistry, 1992. **31**(45): p. 11112-7.
147. Jiang, X.C., et al., *Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 907-14.
148. Krieger, M. and K. Kozarsky, *Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1999. **10**(6): p. 491-7.
149. Krieger, M., *Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 523-58.
150. Gallis, B., et al., *Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30101-8.
151. von Eckardstein, A. and G. Assmann, *Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol?* Curr Opin Lipidol, 2000. **11**(6): p. 627-37.
152. Dietschy, J.M., S.D. Turley, and D.K. Spady, *Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans*. J Lipid Res, 1993. **34**(10): p. 1637-59.
153. Hannun, Y.A., C. Luberto, and K.M. Argraves, *Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling*. Biochemistry, 2001. **40**(16): p. 4893-903.
154. Kolesnick, R., *The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway*. J Clin Invest, 2002. **110**(1): p. 3-8.
155. Spiegel, S. and R. Kolesnick, *Sphingosine 1-phosphate as a therapeutic agent*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1596-602.
156. Hla, T., *Sphingosine 1-phosphate receptors*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **64**(1-4): p. 135-42.
157. Hla, T., et al., *Lysophospholipids--receptor revelations*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1875-8.
158. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release*. Prostaglandins, 2001. **64**(1-4): p. 107-122.
159. Onan, D., et al., *Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2344-54.

160. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3431-8.
161. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum*. J Biochem, 1997. **121**(5): p. 969-73.
162. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5291-7.
163. Yatomi, Y., et al., *N,N-dimethylsphingosine 1-phosphate activates human platelets*. FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 341-4.
164. Okajima, F., *Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator?* Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 132-7.
165. Okajima, F., *[Distribution of sphingosine 1-phosphate in plasma lipoproteins and its role in the regulation of the vascular cell functions]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2002. **47**(4 Suppl): p. 480-7.
166. Watterson, K., et al., *Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(4): p. 344-57.
167. Spiegel, S. and S. Milstien, *Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1216-9.
168. Pyne, S. and N. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(2): p. 115-31.
169. Payne, S.G., S. Milstien, and S. Spiegel, *Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions*. FEBS Lett, 2002. **531**(1): p. 54-7.
170. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 397-407.
171. Igarashi, J., S.G. Bernier, and T. Michel, *Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12420-6.
172. Igarashi, J. and T. Michel, *Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36281-8.
173. Igarashi, Y., *Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways*. J Biochem, 1997. **122**(6): p. 1080-7.
174. Igarashi, Y., *[Physiology of sphingosine 1-phosphate: regulation of cell motility and platelet function]*. Seikagaku, 1997. **69**(10): p. 1166-85.
175. Postma, F.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor*. EMBO J, 1996. **15**(10): p. 2388-92.
176. Lee, M.J., et al., *Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG-1 as a low affinity agonist*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22105-12.
177. Lee, M.J., et al., *Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1552-5.
178. Hla, T., *Sphingosine 1-phosphate receptors*. Prostaglandins, 2001. **64**(1-4): p. 135-142.

179. Hla, T. and T. Maciag, *An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9308-13.
180. Zondag, G.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1*. Biochem J, 1998. **330 ( Pt 2)**: p. 605-9.
181. Okamoto, H., et al., *EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca<sup>2+</sup> mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition*. J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27104-10.
182. Chun, J., et al., *International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 265-9.
183. Kluk, M.J. and T. Hla, *Signaling of sphingosine-1-phosphate via the SIP/EDG-family of G-protein-coupled receptors*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 72-80.
184. Windh, R.T., et al., *Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27351-8.
185. Panetti, T.S., et al., *Extracellular matrix molecules regulate endothelial cell migration stimulated by lysophosphatidic acid*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(9): p. 1645-56.
186. Lee, O.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and chemotactic motility of endothelial cells via the G(i) protein-linked phospholipase C pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(1): p. 47-53.
187. An, S., E.J. Goetzl, and H. Lee, *Signaling mechanisms and molecular characteristics of G protein-coupled receptors for lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. J Cell Biochem Suppl, 1998. **30-31**: p. 147-57.
188. Mohle, R., et al., *Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 663-8.
189. Paik, J.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 11830-7.
190. Garcia, J.G., H.W. Davis, and C.E. Patterson, *Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation*. J Cell Physiol, 1995. **163**(3): p. 510-22.
191. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA*. Circ Res, 1998. **83**(11): p. 1115-23.
192. Liu, L.X., J.C. Tsai, and W.C. Aird, *Egr-1 gene is induced by the systemic administration of the vascular endothelial growth factor and the epidermal growth factor*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1772-1781.
193. Liu, Y.Q. and A.R. Zhou, *[Vascular endothelial growth factor and nitric oxide]*. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 2000. **31**(1): p. 69-71.
194. Sanchez, T. and T. Hla, *Structural and functional characteristics of SIP receptors*. J Cell Biochem, 2004. **92**(5): p. 913-22.
195. Panetti, T.S., et al., *Modulation of cell interactions with extracellular matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **64**(1-4): p. 93-106.
196. Moolenaar, W.H., *Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 230-8.
197. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.

198. Sadahira, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9686-90.
199. Bornfeldt, K.E., et al., *Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 193-206.
200. Bornfeldt, K.E., et al., *Platelet-derived growth factor. Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 416-30.
201. Meacci, E., et al., *Down-regulation of EDG5/SIP2 during myogenic differentiation results in the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1633**(3): p. 133-42.
202. Ryu, Y., et al., *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**(3): p. 325-32.
203. Arikawa, K., et al., *Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous SIP2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32841-51.
204. Yamaguchi, H., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor subtype-specific positive and negative regulation of Rac and haematogenous metastasis of melanoma cells*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 3): p. 715-22.
205. Kimura, A., et al., *Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells Toward an Area of Brain Infarction*. Stroke, 2008.
206. Sugimoto, N., et al., *Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(5): p. 1534-45.
207. Sugimoto, N., N. Takuwa, and Y. Takuwa, [*Molecular mechanisms of sphingosine-1-phosphate receptor SIP2/Edg5-mediated inhibition of Rac and cell migration*]. Seikagaku, 2003. **75**(7): p. 597-600.
208. Ishii, H., et al., *Differential gene expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors in the development of the rat masseter muscle*. Arch Oral Biol, 2002. **47**(7): p. 505-10.
209. Ishii, I., et al., *Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (SIP) receptors, SIP(2)/LP(B2)/EDG-5 and SIP(3)/LP(B3)/EDG-3*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25152-9.
210. Van Brocklyn, J.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2624-2629.
211. Yamazaki, Y., et al., *Edg-6 as a putative sphingosine 1-phosphate receptor coupling to Ca(2+) signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **268**(2): p. 583-9.
212. Graler, M.H., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor SIP4 regulates cell shape and motility via coupling to Gi and G12/13*. J Cell Biochem, 2003. **89**(3): p. 507-19.
213. Kohno, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate promotes cell migration through the activation of Cdc42 in Edg-6/SIP4-expressing cells*. Genes Cells, 2003. **8**(8): p. 685-97.
214. Im, D.S., A.R. Ungar, and K.R. Lynch, *Characterization of a zebrafish (Danio rerio) sphingosine 1-phosphate receptor expressed in the embryonic brain*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(1): p. 139-43.
215. Malek, R.L., et al., *Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5692-9.

216. Morales-Ruiz, M., et al., *Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19672-7.
217. Tosaka, M., et al., *Sphingosine 1-phosphate contracts canine basilar arteries in vitro and in vivo: possible role in pathogenesis of cerebral vasospasm*. Stroke, 2001. **32**(12): p. 2913-9.
218. Ohmori, T., et al., *G(i)-mediated Cas tyrosine phosphorylation in vascular endothelial cells stimulated with sphingosine 1-phosphate: possible involvement in cell motility enhancement in cooperation with Rho-mediated pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5274-80.
219. Coussin, F., et al., *Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction*. Circ Res, 2002. **91**(2): p. 151-7.
220. Yamamura, S., et al., *Sphingosine 1-phosphate regulates melanoma cell motility through a receptor-coupled extracellular action and in a pertussis toxin-insensitive manner*. Biochemistry, 1997. **36**(35): p. 10751-9.
221. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3431-3438.
222. Lee, M.J., et al., *Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 693-704.
223. Kluk, M.J. and T. Hla, *Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Circ Res, 2001. **89**(6): p. 496-502.
224. Candelore, M.R., et al., *Phytosphingosine 1-phosphate: a high affinity ligand for the SIP(4)/Edg-6 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(3): p. 600-6.
225. Van Brocklyn, J.R. and S. Spiegel, *Binding of sphingosine 1-phosphate to cell surface receptors*. Methods Enzymol, 2000. **312**: p. 401-6.
226. Okamoto, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates G(i)- and Rho-mediated vascular endothelial cell spreading and migration*. Thromb Res, 2000. **99**(3): p. 259-65.
227. Brinkmann, V. and K.R. Lynch, *FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(5): p. 569-75.
228. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-9.
229. Clemens, J.J., et al., *Synthesis of para-alkyl aryl amide analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent SIP receptor agonists*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(20): p. 3401-4.
230. Mulvany, M.J. and W. Halpern, *Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ*. Nature, 1976. **260**(5552): p. 617-9.
231. Saiag, B., et al., *Free radical involvement in endothelium-dependent responses of the rat thoracic aorta in moderate hypoxic conditions*. Eur J Pharmacol, 1999. **372**(1): p. 57-63.
232. Saiag, B., et al., *Study of the mechanisms involved in adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) induced relaxation of rat thoracic aorta and pancreatic vascular bed*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(3): p. 804-10.
233. Sugimoto, K., et al., *Detection of intracellular nitric oxide using a combination of aldehyde fixatives with 4,5-diaminofluorescein diacetate*. Histochem Cell Biol, 2000. **113**(5): p. 341-7.
234. Kojima, H., et al., *Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1998. **46**(2): p. 373-5.

235. Wilson, P.W., et al., *Prediction of coronary heart disease using risk factor categories*. Circulation, 1998. **97**(18): p. 1837-47.
236. Toborek, M. and S. Kaiser, *Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis*. Basic Res Cardiol, 1999. **94**(5): p. 295-314.
237. O'Connell, B.J. and J. Genest, Jr., *High-density lipoproteins and endothelial function*. Circulation, 2001. **104**(16): p. 1978-83.
238. Spieker, L.E., et al., *High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men*. Circulation, 2002. **105**(12): p. 1399-402.
239. Fleisher, L.N., et al., *Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins*. J Biol Chem, 1982. **257**(12): p. 6653-5.
240. Yuhanna, I.S., et al., *High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 853-7.
241. Boo, Y.C., *Shear stress stimulates phosphorylation of protein kinase A substrate proteins including endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells*. Exp Mol Med, 2006. **38**(4): p. 453.
242. Boo, Y.C. and H. Jo, *Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **285**(3): p. C499-508.
243. Boo, Y.C., et al., *Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3388-96.
244. Zachary, I. and G. Glick, *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 568-81.
245. Haynes, M.P., et al., *Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen*. J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2118-23.
246. Michell, B.J., et al., *The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase*. Curr Biol, 1999. **9**(15): p. 845-8.
247. Nofer, J.R., et al., *High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway*. Thromb Haemost, 2001. **85**(4): p. 730-5.
248. Nofer, J.R., et al., *Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34480-5.
249. Mineo, C., et al., *High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9142-9.
250. Levade, T., et al., *Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology*. Circ Res, 2001. **89**(11): p. 957-68.
251. Hong, S.H., et al., *Association between HaeIII polymorphism of scavenger receptor class B type I gene and plasma HDL-cholesterol concentration*. Ann Clin Biochem, 2002. **39**(Pt 5): p. 478-81.
252. Yang, A.H., I. Ishii, and J. Chun, *In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 197-203.
253. Ishii, I., et al., *Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33697-704.
254. McGiffert, C., et al., *Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis*. FEBS Lett, 2002. **531**(1): p. 103-8.
255. Zhang, G., et al., *Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate*. Gene, 1999. **227**(1): p. 89-99.

256. Fukushima, N., et al., *Dual regulation of actin rearrangement through lysophosphatidic acid receptor in neuroblast cell lines: actin depolymerization by Ca(2+)-alpha-actinin and polymerization by rho.* *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(8): p. 2692-705.
257. Meyer zu Heringdorf, D., H.M. Himmel, and K.H. Jakobs, *Sphingosylphosphorylcholine-biological functions and mechanisms of action.* *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1582**(1-3): p. 178-89.
258. Sanchez, T., T. Estrada-Hernandez, et al. (2003), *"Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability."* *J Biol Chem* **278**(47): 47281-47290.
259. Brinkmann, V., M. D. Davis, et al. (2002). *"The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors."* *J Biol Chem* **277**(24): 21453-21457.
260. Keller, C. D., P. Rivera Gil, et al. (2007). *"Immunomodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor SIP3 and Smad3 signaling."* *Am J Pathol* **170**(1): 281-292.
261. Gordon, D. J. and B. M. Rifkind (1989). *"High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies."* *N Engl J Med* **321**(19): 1311-1316.
262. Glomset, J. A. and D. M. Kaplan (1965). *"The Distribution of Plasma Fatty Acid Transferase-Like Activity in Rat Tissues."* *Biochim Biophys Acta* **98**: 41-46.
263. Kimura, T., K. Sato, et al. (2003). *"High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors."* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(7): 1283-1288.
264. Rubins, H. B., S. J. Robins, et al. (1999). *"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* **341**(6): 410-418.
265. Brown, B. G., X. Q. Zhao, et al. (2001). *"Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease."* *New England Journal of Medicine* **345**(22): 1583-1592.

**7. Danksagung*****Ich danke***

Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet, der mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat,

meinem Betreuer Dr. med. Markus Tölle für die Betreuung meiner Doktorarbeit und seine Geduld, v.a. aber für seinen grenzenlosen Optimismus ohne den ich so manches Mal schon vor Verzweiflung aufgegeben hätte und diese Arbeit wahrscheinlich nie bis zum Schluss durchgezogen hätte,

Herrn Prof. Dr. Walter Zidek für die Bereitstellung der nötigen Räumlichkeiten und Materialien in seinen Laboratorien in Berlin,

Herrn Prof. Dr. med. Werner Reutter, der stets an mich geglaubt hat und mich immer unterstützt hat,

Herrn Falko Hoffmann für seine große Hilfsbereitschaft bei der Formatierung der Arbeit und seine Geduld,

Meinem Mann Jamal, der mir v.a in den letzten Zügen der Arbeit immer zur Seite stand und mir viele Tränen erspart hat,

Ganz besonders möchte ich mich jedoch bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium erst ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben und natürlich bei meinen Geschwistern Nora und Karim, die auch immer an mich geglaubt haben.



**8. Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Anissa Habib-El Chafchak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-3 in der HDL assoziierten Aktivierung der endothelialen NO-Synthase“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 14.06.2011

Unterschrift