

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Arterioskleroseforschung
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann

**HDL und HDL-assoziierte Lysosphingolipide als Regulatoren der Expression
von Zelladhäsionsmolekülen in humanen vaskulären Endothelzellen.**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Geigenmüller, Sven
aus Castrop-Rauxel

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Schmidt
2. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. E. Buddecke

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Arterioskleroseforschung
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann

Referent: Priv.- Doz. Dr. rer. nat. A. Schmidt
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. E. Buddecke

ZUSAMMENFASSUNG

HDL und HDL-assoziierte Lysosphingolipide als Regulatoren der Expression von Zelladhäsionsmolekülen in humanen Endothelzellen

Sven Geigenmüller

Die Bindung mononukleärer Zellen des Blutes an das vaskuläre Endothel und ihre nachfolgende transendotheliale Migration in die Gefäßwand sind wesentliche Merkmale inflammatorischer Phasen in der Pathogenese der Arteriosklerose. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) und die HDL-assoziierten Lysosphingolipide Sphingosinphosphorylcholin (SPC) und Lysosulfatid (LSF) die Fähigkeit besitzen, die Cytokin (TNF- α)-induzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen zu unterdrücken und dabei spezifische Signalkaskaden zu initiieren. HDL und HDL-assoziierte Sphingolipide agieren als Liganden des G-Protein gekoppelten endothelialen EDG-Rezeptors, über den die PI-3 Kinase und die Serin/Threonin Proteinkinase Akt phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von Akt ist assoziiert mit einer reduzierten Translokation des TNF- α -aktivierten NF- κ B in den Zellkern. Die resultierende Reduktion der Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 wird auf Protein- und mRNA Ebene nachgewiesen. Der Suppressionseffekt des HDL auf die Expression der Zelladhäsionsmoleküle und die nukleäre Translokation des NF- κ B lassen sich vollständig durch Inhibitoren des EDG-Rezeptor gekoppelten G-Proteins und der PI-3 Kinase aufheben. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der antiinflammatorische Effekt der HDL über eine EDG-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade via PI-3 Kinase \rightarrow Akt \rightarrow NF- κ B verläuft und dass der antiinflammatorische Effekt von einer Kompetition der EDG-Rezeptor-induzierten Hemmung und der TNF- α -induzierten Stimulation der Translokation von NF- κ B in den Zellkern abhängt und damit eine Promotion oder Stimulation inflammatorischer Prozesse gesteuert wird.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2005

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	Arteriosklerose	1
1.1.1	Pathogenese	1
1.1.2	Inflammatorische Phasen der Atherogenese	2
1.2	Atheroprotektive Effekte der Lipoproteine hoher Dichte (HDL)	6
1.3	Die Klasse der HDL	6
1.4	HDL und reverse Cholesteroltransport	7
1.5	HDL als autonomer protektiver Faktor des vaskulären Endothels	11
1.5.1	HDL-Endothel-Rezeptoren	12
1.5.2	Endotheliale Dysfunktion und Lysosphingolipide	16
1.5.3	Sphingosinphosphorylcholin (SPC) – Funktionen des HDL-assozierten Lysophospholipids	16
1.6	Expression von Zelladhäsionsmolekülen	18
2.0	Fragestellung	21
3.0	Material und Methoden	22
3.1	Materialien	22
3.2	Untersuchungsgut	22
3.2.1	HUVECs (human vascula endothelial cell) aus humanen Vv. umbilicales	22
3.2.2	HUVECs in Zellkultur	23
3.2.2.1	Anlegen von Primärkulturen	23
3.2.2.2	Zellzahlbestimmung	25
3.2.2.3	Proteinbestimmung	25
3.2.2.4	Subkultivierung	26
3.2.2.5	Standardversuch	26
3.3	Bestimmung von humanem sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 durch Immunassay (ELISA)	27
3.4	RNA-Gewinnung	30
3.4.1	QUIAGEN RNA-Aufarbeitung	30
3.4.2	DNA-Verdauungsvorgang	31
3.4.3	RNA-Isolierung	31
3.4.4	RNA-Quantifizierung	32
3.4.5	Transkription der RNA in cDNA und RT-PCR (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU, SuperScript™-Ansatz)	32
3.4.6	Herstellung der Agarose-Gele für die Gel-Elektrophorese	32
3.4.7	Gel-Elektrophorese	33
3.5	Bestimmung zelloberflächen-exponierter E-Selektin bzw. ICAM-1-Moleküle in HUVECs durch Immuncytometrie	33
3.6	FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Messung	34
3.7	NF-κB ELISA	35
3.7.1	Aufarbeitung der Zellen für den NF-κB ELISA	36
3.7.2	Durchführung des NF-κB ELISA	36

4.0	Ergebnisse	38
4.1	TNF- α stimulierte Expression von Zelladhäsionsmoleküle	38
4.2	HDL und HDL-assoziierte Sphingolipide supprimieren Cytokin-induzierte spezifische Genaktivierung und Proteinexpression von E-Selektin und ICAM-1	41
4.3	Suppression der zelloberflächen-exponierten Zelladhäsionsmoleküle durch HDL und Lysosphingolipide	45
4.4	Reduktion der Transkription und der E-Selektin-spezifischen mRNA durch HDL, SPC und LSF	49
4.5	Suramin und Pertussis Toxin heben die inhibitorische Wirkung von HDL, SPC und LSF auf	50
4.6	Inhibition EDG-Rezeptor-initiiertes Signalwege	55
4.7	Vernetzung der EDG- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege	62
5.0	Diskussion	64
5.1	Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Abhängigkeit von Konzentration, Apolipoprotein- und Lipidgehalt des Serum- HDL	65
5.2	Rezeptorabhängige Signalkaskade nach Interaktion des Rezeptors mit HDL bzw. Lysosphingolipiden	67
5.3	TNF- α -induziertes NF- κ B Signaling	71
5.4	Vernetzung des EDG-Rezeptor- und TNF- α -initiierten Signalwege	72
5.5	Schlussfolgerung	77
6.0	Abkürzungsverzeichnis	78
7.0	Literaturverzeichnis	81
	Danksagung	90
	Curriculum Vitae	91

1.0 Einleitung

1.1 Arteriosklerose

1.1.1 Pathogenese

Die Arteriosklerose ist primär eine fokale Hyperplasie von aus der Tunica Media arterieller Gefäße in die Intima eingewanderten glatten Muskelzellen bei gleichzeitiger transendothelialer Einwanderung mononukleärer Zellen des Blutplasmas und Akkumulation von Blutplasma-Lipoproteinen und Lipiden in der arteriellen Gefäßwand. Die akkumulierten Lipide, die zum Teil von Makrophagen aufgenommen werden (Schaumzellbildung), zum Teil extrazellulär als Fetttröpfchen erscheinen, bilden einen „Lipidkern“ (Lipid-Core), der von einer fibrösen Deckschicht (fibrous cap) gegen das Blut abgegrenzt ist. Lipid-Core und extrazelluläre Matrix, die von glatten Muskelzellen produziert wird, bilden eine stenosierende Neointima (arteriosklerotische Plaque). Sekundär-Ereignisse bzw. Komplikationen sind inflammatorische Phasen, apoptotische Prozesse, Calcifizierung und Plaqueruptur.

Die Arteriosklerose kann alle Gefäßprovinzen betreffen und befällt in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit folgende Arterien:

- Aorta abdominalis,
- Coronararterien (koronare Herzkrankheit),
- Aorta thoracica und Arterien der unteren Extremität,
- Arteria carotis interna und vertebral-basilare Cerebralarterien (cerebrale Ischämie, Apoplex).

Lipoprotein-Stoffwechsel

In zahlreichen Longitudinal-Studien ist belegt, dass LDL-Cholesterol direkt und HDL-Cholesterol invers mit einer koronaren Herzkrankheit assoziiert ist. Die Identifizierung von genetisch bedingten Dyslipoproteinämien und die Aufklärung

der Stoffwechselwege des Cholesterols und der Triglyceride haben das Verständnis für die Pathogenese arteriosklerotischer Prozesse entscheidend gefördert. Die Kenntnis der spezifischen Funktionen im Stoffwechsel der Lipoprotein-Rezeptoren, der Enzyme, der Transferproteine und der Apolipoproteine haben die Methoden für die Stratifizierung der individuellen Risikofaktoren und die Möglichkeit eines selektiven und spezifischen Behandlungsprogramms entscheidend verbessert.

Die Vielzahl der epidemiologisch nachgewiesenen Risikofaktoren und die unterschiedlichen Manifestationsformen der Arteriosklerose charakterisieren die Arteriosklerose als eine multi-ätiologische und durch eine Kombination von Umweltfaktoren und spezifischen Genprofilen determinierte Erkrankung. Unter die genetischen Risikofaktoren werden Gene für folgende Stoffwechselbereiche gerechnet:

- Lipid-Cholesterol-Metabolismus
- Thrombozytenfunktion, Koagulation und Fibrinolyse
- Glucose-Metabolismus (Diabetes mellitus)
- Regulation des Blutdrucks (Hypertonie)
- Stoffwechsel der Gefäßwandzellen

In nur wenigen Fällen ließ sich jedoch über eine vermehrte Expression von Genprodukten bzw. genetischen Defekten oder Polymorphismen der Gene eine direkte Beziehung zur Arteriosklerose herstellen.

1.1.2 Inflammatorische Phasen der Atherogenese

Die Arteriosklerose mit Bildung lipidreicher Plaques manifestiert sich in der arteriellen Gefäßwand. An der Genese arteriosklerotischer Läsionen sind neben den Zellen der Gefäßwand auch aus der Blutzirkulation eingewanderte Zellen beteiligt.

Bei der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen kommt es primär unter dem Einfluss atherogener Stimuli zu einer Schädigung des Endothels (endotheliale Dysfunktion), die von einer Diapedese mononukleärer Zellen aus dem Blutplasma und dem Eindringen von Lipoproteinen (LDL) in die Gefäßwand gefolgt ist. Bei den mononukleären Zellen des Blutplasmas, die in die Gefäßwand transmigrieren, handelt es sich zu 90 % um Monozyten. Die restlichen 10 % stellen Lymphozyten und Granulozyten. Die transendotheliale Migration mononukleärer Zellen in die Gefäßwand wird durch Schädigung bzw. Aktivierung des Endothels begünstigt, das auf atherogene Stimuli hin vermehrt die Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 exprimiert, die zu einer labilen ("rolling") und stabilen (Adhäsion) Fixierung der Monozyten mit anschließender transendothelialer Migration in die Gefäßwand führen. Die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel ist ein mehrstufiger Prozess, der sich formal in verschiedene Phasen unterteilen lässt. Der initiale Kontakt zwischen Entzündungszellen und Endothel ist eine lockere Bindung, die von einer Rollbewegung gefolgt wird (Abb. 1). Bei den E-Selektinen der Endothelzellen ist ein Sialinsäure-, Galaktose-, N-Acetylglucosamin- und Fucose-enhaltendes Tetrasaccharid (Sialyl-LewisX-Tetrasaccharid) als spezifische Bindungsdomäne nachgewiesen worden.

Die gleichzeitige Expression leukozytenbindender Zelladhäsionsmoleküle vom Typ ICAM und VCAM (nicht dargestellt) auf der Endothelzelloberfläche ist die Voraussetzung für eine stabile Anheftung der Leukozyten. Dieser Schritt wird eingeleitet durch die Abgabe von Chemokinen bzw. chemotaktischen Substanzen (z.B. MIP1, MCP1), die von einem transmembranösen Proteoglykanmolekül der Endothelzelle gebunden und den Leukozyten präsentiert werden. Die Cytokine werden von spezifischen Rezeptoren der Leukozyten erkannt und gebunden. Über ein rezeptorgekoppeltes G-Protein werden leukozytäre Zelladhäsionsmoleküle aktiviert, die der Klasse der Integrine angehören. Die dadurch induzierte Adhäsion der Leukozyten an die entsprechenden Partnermoleküle (ICAM, VCAM) der Endothelzelloberfläche führen zu einem Stop der Rollbewegung und einer festen Bindung.

Die nachfolgende Einwanderung der Leukozyten durch die interendothelialen Kontaktflächen erfolgt innerhalb weniger Minuten, wobei die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM beteiligt sind. Die von den Leukozyten abgegebenen Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9 erleichtern die Migration der Leukozyten durch die extrazelluläre Matrix.

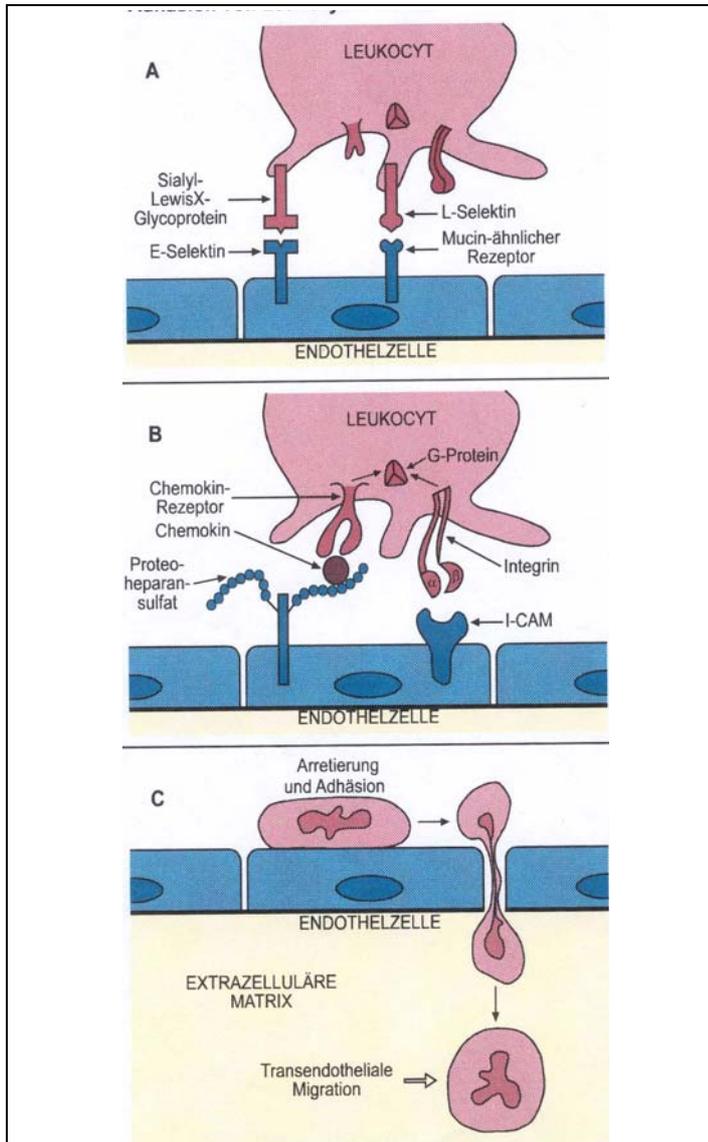


Abb.1 Adhäsion und transendotheliale Migration von mononukleären Blutzellen am vaskulären Endothel (nähere Erklärungen s. Text).¹

¹ aus Buddecke E.; Molekulare Medizin, eco-med-Verlag Landsberg, 2002

1.2 Atheroprotektive Effekte der Lipoproteine hoher Dichte (HDL)

Unter den Lipoproteinen des humanen Blutplasmas nimmt die Klasse der Lipide hoher Dichte (HDL, High Density Lipoproteins) eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den Lipoproteinen geringer Dichte (LDL, IDL, VLDL, LP(a)) weisen die Lipoproteine hoher Dichte eine durch zahlreiche Populationsstudien belegte anti-atherogene Wirkung auf (Gordon et al., 1989; Assmann et al., 1992; Oram et al., 1996; Tall, 1998; von Eckardstein et al., 2001; Shad et al., part I and II 2001). Prospektive- und Querschnittsstudien haben ebenso wie tierexperimentelle Untersuchungen eine eindeutige inverse Korrelation zwischen der Höhe des HDL-Cholesterolspiegels im Serum und dem Risiko einer koronaren Herzkrankheit bzw. arteriosklerotischer Veränderungen der Arterien erwiesen (Gordon et al., 1989; Assmann et al., 1992 und 1996). Die negative Beziehung zwischen HDL-Cholesterolkonzentration und der koronaren Herzkrankheit wurde vorzugsweise der Fähigkeit des HDL zugeschrieben, unverestertes Cholesterol durch Kontakt mit Makrophagen und/oder peripheren Zellen aufzunehmen und auf diese Weise den Transport von Cholesterolüberschüssen zur Leber zu vermitteln. Neuere Studien (Marcil et al., 2003) legen jedoch die Annahme nahe, dass neben dem reversen Cholesteroltransport weitere Effekte an der anti-atherogenen Wirkung des HDL beteiligt sind.

1.3 Die Klasse der HDL

Die Klasse der Lipoproteine hoher Dichte (HDL) ist durch eine heterogene Struktur und Zusammensetzung gekennzeichnet (Übersicht bei Nofer et al., 2002). Ihre gemeinsamen Merkmale sind die hohe Dichte ($> 1.063 \text{ g/mL}$) und eine geringe Größe (Stoke-Durchmesser 5-17 nm). Die meisten HDL-Partikel enthalten Apolipoprotein A-1. Unterschiede im Gehalt der Lipoproteine der Apolipoproteine, der Enzyme und Lipidtransferproteine haben zu einer Unterteilung in verschiedene

Subklassen der HDL geführt, von denen in der klinisch chemischen Analytik der HDL-Cholesterolgehalt zur quantitativen Bestimmung eingesetzt wird. Die lipidreichen sphärischen HDL-Partikel HDL 2 und HDL 3 sind die zwei Hauptfraktionen der HDL, die sich durch ihre nach isopyknischer Zentrifugation bestimmte Dichte (HDL 2, $d = 1.063 - 1.0125$ und HDL 3, $d = 1.0125 - 1.250$) unterscheiden. 5-15 % der HDL im menschlichen Blutplasma werden in einer durch elektrophoretische Wanderung gekennzeichneten prä- β HDL-Fraktion nachgewiesen. Diese Fraktion unterscheidet sich deutlich von den lipidreichen HDL-Fraktionen HDL 2 und HDL 3. Prä- β HDL sind kleine diskoidale Partikel, die Apolipoprotein A-1 entweder als lipidfreies Apolipoprotein oder in Assoziation mit Sphingomyelin und Phosphatidylcholin enthalten. Ähnliche lipidarme Partikel enthalten Apolipoprotein E (Apo-LP-E) oder Apolipoprotein A-IV (LP A-IV) als einzige Apolipoproteinkomponenten.

Die lipidreichen HDL-Fraktionen HDL 3 und HDL 2 werden aus dem lipidfreien Apo-A-1 oder dem lipidarmen prä- β HDL, auch lipidarmes Apo-A-1 genannt, gebildet. Diese Vorläufer-HDL-Fraktionen (*in statu nascendi*) werden von der Leber oder dem Intestinaltrakt gebildet oder durch Lipolyse aus VLDL und Chylomikronen abgegeben. Mehrere Untersucher haben nachgewiesen, dass HDL als Carrier bioaktiver Lysosphingolipide fungiert. Dazu gehören Sphingosin-1-phosphat (S-1-P), Sphingosinphosphorycholin (SPC) und Lysophosphatide (LSF) (Kimura et al., 2001; Nofer et al., 2000). Die Lysosphingolipide sind wesentliche Elemente der HDL-initiierten Signalkaskade in Endothelzellen (s. 1.5).

1.4 HDL und reverser Cholesteroltransport

Der reverse Cholesteroltransport (RCT) vollzieht sich in mehreren Schritten (von Eckardstein et al., 2000 und 2001). Der in peripheren Zellen und Makrophagen lokalisierte ABC-A1 Transporter, der für den RCT eine zentrale Rolle spielt

(Assmann und Nofer, 2003), ist ein Vertreter der Familie der ATP-Binding-Cassette Moleküle, die für die Ausschleusung lipophiler Stoffwechselprodukte aus der Zelle zuständig sind. In Makrophagen (Schaumzellen) vermitteln die zu einer lipophilen Pore geformten helikalen Strukturen des ABC-A1 Transporters den Efflux von nicht verestertem Cholesterol (reverser Cholesteroltransport) und von Phospholipiden, die von dem Apolipoprotein-A1 aufgenommen werden. Das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) katalysiert diesen Prozess, wodurch das Apolipoprotein A1 zum prä- β HDL umgeformt wird. Das aus den peripheren Zellen bzw. Schaumzellen stammende nicht veresterte Cholesterol wird mit Hilfe der Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) verestert, wodurch die diskoiden prä- β HDL-Partikel zu sphärischen HDL 3 Partikeln werden. Durch weitere Veresterung von unverestertem Cholesterol durch LCAT, durch Phospholipid-Transferprotein (PLTP), was einen Transfer von Phospholipiden von apo-B-enthaltenden Lipoproteinen (LDL, VLDL) verursacht, und durch Remnanttransfer entstehen die größeren HDL 2 Partikel. Diese können jedoch durch Export von Cholesterolestern in apo-B enthaltende Lipoproteine (LDL und VLDL) im Austausch mit Triglyceriden, wobei das CETP (Cholesterolester Transfer Protein) katalysatorisch beteiligt ist (Rader, 2002), und unter Mitwirkung der hepatischen Triglyceridlipase (Connelly, 1999) ebenso wie der endothelialen Lipase (McCoy et al., 2002), die die Triglyceride und möglicherweise auch die Phospholipide des HDLs hydrolysieren, in die kleineren HDL 3 Partikel zurück verwandelt werden. Die HDL-Partikel können über den Scavenger Rezeptor-B1 - für diesen Reaktionsschritt ist eine Bindung des Apo-A1 an den Scavenger Rezeptor-B1 notwendig (Rader, 2002) - oder über den Apo-E-Rezeptor Kontakt mit der Leber aufnehmen, wobei eine selektive Aufnahme der Cholesterolester des HDLs in die Hepatocyten stattfindet.

Bei diesen Reaktionen, an der CETP und HTGL katalytisch beteiligt sind, wird das lipidfreie Apoprotein bzw. das lipidarme prä- β HDL zurück gebildet. Auf diese Weise wird der Akzeptor des zellulären Cholesterols fortlaufend regeneriert, um

seine Funktion, den Cholesterolefflux aus Makrophagen oder peripheren Zellen zu erfüllen und den Transport zur Leber durchzuführen (Abb. 2).

Von der Leber wird dem Organismus das benötigte Cholesterol zur Verfügung gestellt. Das restliche Cholesterol wird zu Gallensäuren umgebaut und in den Darm abgegeben. Hier nimmt es am enterohepatischen Kreislauf teil oder wird mit dem Fäzes ausgeschieden.

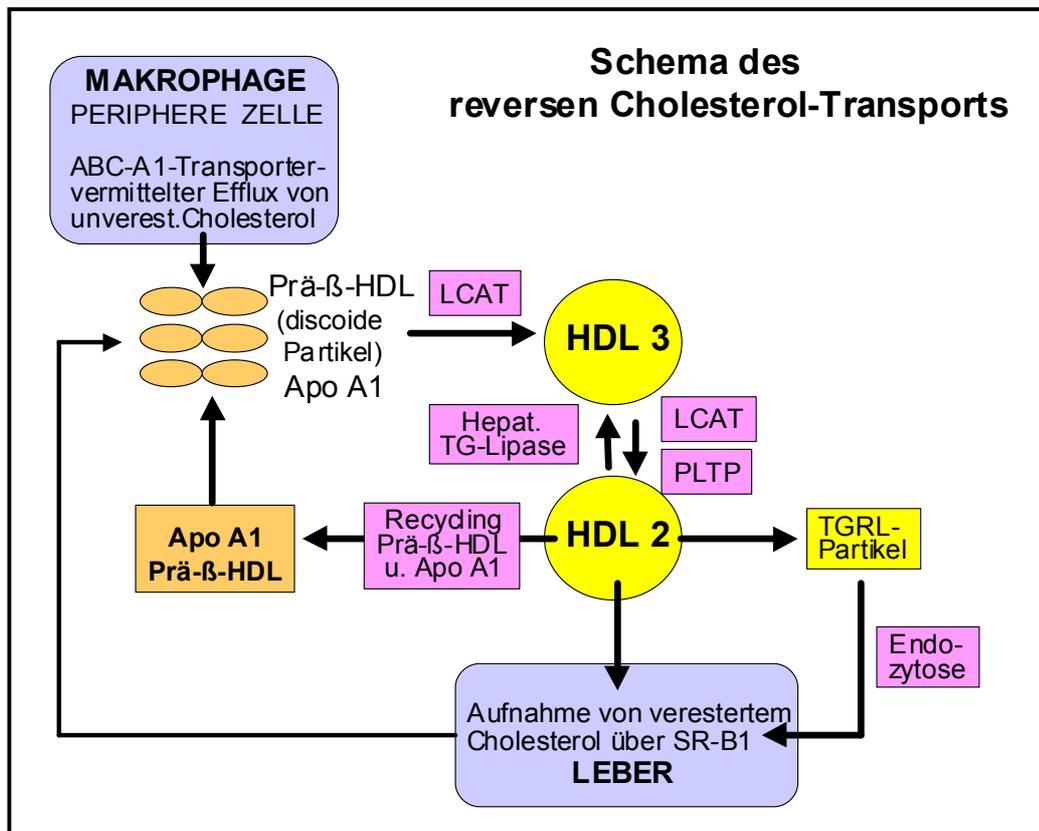


Abb. 2 Schema des reversen Cholesteroltransports. Die HDL Fraktionen HDL 3 und HDL 2 werden aus lipidfreiem Apolipoprotein A-1 oder lipidarmem prä-β1 HDL gebildet. Die Vorstufen werden als naszierendes HDL Molekül durch die Leber oder den Intestinaltrakt synthetisiert und dann durch die einer Lipolyse unterworfenen VLDL und Chylomikronen freigesetzt. Aus Makrophagen bzw. peripheren Zellen können die prä-β HDL-Partikel, die morphologisch als diskoide Partikel erscheinen, unverestertes Cholesterol aufnehmen, wobei die Ausschleusung aus Makrophagen oder peripheren Zellen durch den ABC-A1-Transporter vermittelt wird. Die Lecithin Cholesterol Acyltransferase (LCAT) katalysiert die Veresterung des Cholesterols, wodurch die diskoiden Partikel zu sphärischen HDL 3 Partikeln transformiert werden. Durch fortschreitende

Veresterung des Cholesterols durch LCAT und durch das Phospholipid-Transferprotein (PLTP), das die Aufnahme von Phospholipiden in die HDL-Partikel katalysiert, entsteht das HDL 2. Die größeren HDL 2 Partikel können wiederum zu den kleineren HDL 3 Partikeln umgewandelt werden, wobei das Cholesterolestertransferprotein den Export der Cholesterolester aus HDL in die Apo-B enthaltenden Lipoproteine (VLDL, LDL) vermittelt. Die Leber und steroidsynthetisierende Organe können über den Scavenger Rezeptor/B 1 selektiv Cholesterolester aufnehmen, die unter der Wirkung der hepatischen Triglyceridlipase entstehenden triglyceridreichen Partikel können von der Leber endozytiert werden. Die Leber gibt die delipidierten HDL als diskoidale prä- β HDL wieder in die Zirkulation ab (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis).

1.5 HDL als autonomer protektiver Faktor des vaskulären Endothels

Neben der klassischen anti-atherogenen Funktion des HDL, die durch das Konzept des reversen Cholesteroltransports charakterisiert ist, hat das HDL-Makromolekül eine Reihe weiterer biologischer, potentiell anti-atherogener Eigenschaften, die zum Teil durch eine Hemmung (Fischer-Dzoga et al., 1976; Fischer-Dzoga und Wissler, 1976; Björkerud und Björkerud, 1995), zum Teil durch eine Stimulierung von Stoffwechselprozessen des Endothels (Ross und Glomset, 1973; Libby et al., 1985; Chen et al., 1986; Cuthbert und Lipsky, 1989B) charakterisiert sind. Im vaskulären Endothel **inhibiert** HDL

- die Chemotaxis von Monozyten,
- die Bindung und transendotheliale Migration von mononukleären Blutzellen,
- die Entwicklung endothelialer Dysfunktionen und Apoptose,
- die Oxidation des LDL zum oxLDL,
- die Komplementaktivierung sowie
- die Aktivierung von Thrombozyten und des Faktor X der Blutgerinnungskaskade.

Die **stimulierenden** Eigenschaften des HDL betreffen

- die Proliferation der Endothelzellen der Gefäßwand,
- die Synthese von Prostazyklin und dem natriuretischen Peptid C in Endothelzellen,
- die Aktivierung der Proteine C und S
- die Induzierung der Ca^{2+} -Mobilisation in humanen Endothelzellen
- die Aktivierung der endothelialen Nitritoxidsynthase (eNOS) und von Nitritoxidationsprodukten, die eine Vasodilation bewirken.

Diese antiinflammatorischen, antioxidativen und antiaggregatorischen Eigenschaften werden durch unterschiedliche Komponenten des HDL, vor allen Dingen durch die HDL-assoziierten Phospho- und Sphingolipide, die Apolipoproteine und der Enzyme ausgelöst (Übersicht bei Nofer et al., 2002; Rader et al., 2002; Nofer et al., 2004).

Die inhibitorischen und stimulierenden Effekte des HDL werden durch Interaktion des HDL mit endothelialen Rezeptoren ausgelöst.

1.5.1 HDL-Endothel-Rezeptoren

Untersuchungen von Yuhanna et al. (Yuhanna et al., 2001) haben gezeigt, dass die Bindung von HDL an den endothelialen Scavenger-Rezeptor-B1 (SR-B1) zu einer Aktivierung der endothelialen Stickstoffoxidsynthase (eNOS) führt, dass jedoch diejenige HDL-Komponente, die für ihre Bindungsfähigkeit gegenüber SR-B1 bekannt ist, nämlich das Apolipoprotein A1, diesen Effekt nicht auslöst. Weitere Untersuchungen (Nofer et al., 2004) konnten zeigen, dass HDL-assoziierte Lysophospholipide, SPC und LSF, die mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor EDG (Endothelial Differentiation Gen) reagieren, für diesen Effekt verantwortlich sind, und dass offensichtlich die gleichzeitige Bindung des HDL-Partikels an SR-B1 eine effektive Stimulation des EDG-Rezeptors durch Lysosphingolipide auslöst. Die Strukturformeln von SPC und LSF zeigt Abb. 3. Die HDL-assoziierten Sphingolipide SPC (Sphingosinphosphorylcholin), LSF (Lysosulfatid, Lyso-Gal-3-sulfat-ceramid) und auch S-1-P (Sphingosin-1-phosphat) (Kimura et al., 2001;

Nofer et al., 2000) reagieren mit dem EDG-Rezeptor, der von Endothelzellen in reichem Maße an der Oberfläche exprimiert wird (Fukushima et al., 2001). Die Lysophospholipid-spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurden als eine Familie von acht Rezeptoren mit der Bezeichnung EDG-Cluster identifiziert (Lynch und Im, 1999), die einer gewebsspezifischen Verteilung unterliegen. EDG-1, -3, -5, -6 und -8 zeigen eine hohe Affinität zum S-1-P, während EDG-2, -4 und -7 eine höhere Affinität zur LPA zeigen (Lynch und Im, 1999; Retzer-Lidl, 2002). Obwohl alle EDG-Rezeptoren zu einem Rezeptor-Typ gehören, laufen die vermittelten Reaktionen über unterschiedliche Signalkaskaden ab. EDG-1 z.B. bindet an G_i (Lee et al., 1996), nicht aber an G_q -Protein; währenddessen ist EDG-3 ein potentieller Aktivator der G_q und G_{13} Polypeptide (Ancellin and Hla, 1999; Windh et al., 1999). EDG-5 bindet auch an G_q , obgleich weniger effektiv als EDG-3, ebenso ist es fähig zur Aktivierung von G_{13} (Ancellin and Hla, 1999; Windh et al., 1999).

Wegen ihrer Spezifität gegenüber Sphingosin-1-phosphat werden die Rezeptoren EDG-1, -3, -5, -6, -8 auch als S-1-P_{1,3,2,4,5} bezeichnet. Die physiologische Bedeutung des Sphingosin-1-phosphats und der Lysophosphatidsäure (LPA) für die Regulation des Endothelzellstoffwechsels wird durch ihre spezifische Reaktion mit den Rezeptoren EDG-1 und EDG-3 belegt. Nach Interaktion mit diesen endothelialen Rezeptoren ruft das Sphingosin-1-phosphat durch Verschiebung des intrazellulären Calcium-Depots eine Aktivierung der MAP-Kinase und Änderungen des Zytoskeletts in menschlichen Umbilical Venen Endothelzellen (HUVEC) hervor. Eine Hemmung des EDG-1 und EDG-3 Rezeptors durch Antisenseoligonucleotide blockiert die Sphingosin-1-phosphat-induzierten Stoffwechselprozesse in HUVECs (Lee et al., 1999).

Ein weiterer Effekt, der über die EDG-1 und -3 Rezeptoren vermittelt wird, ergibt sich aus Studien von Kimura et al.(2002), in denen gezeigt wird, dass über diese Rezeptoren die Endothelzell-Migration durch HDL stimuliert wird, ebenso wie die Stimulierung des Überlebens der Endothelzellen, welches mit dem S-1-P-Gehalt des HDL-Partikels korreliert. Die Migration und das Überleben der Zellen kann

ebenfalls mit Hilfe der Antisenseoligonucleotide, die gegen die beiden Rezeptoren gerichtet sind, inhibiert werden (Kimura et al., 2002).

Auch Studien von Nofer et al. (2004) machen auf einen weiteren Gesichtspunkt des EDG-3 (S1P₃) aufmerksam. Er beschreibt eine NO-vermittelte Vasodilatation, die durch Bindung von HDL, aber auch von HDL-assoziierten Lysosphingolipiden (SPC, S-1-P und LSF) ausgelöst wird. Die NO-induzierte Vasodilatation resultiert aus einer Aktivierung der Akt-Phosphorylierung und der eNOS (Nofer et al., 2004).

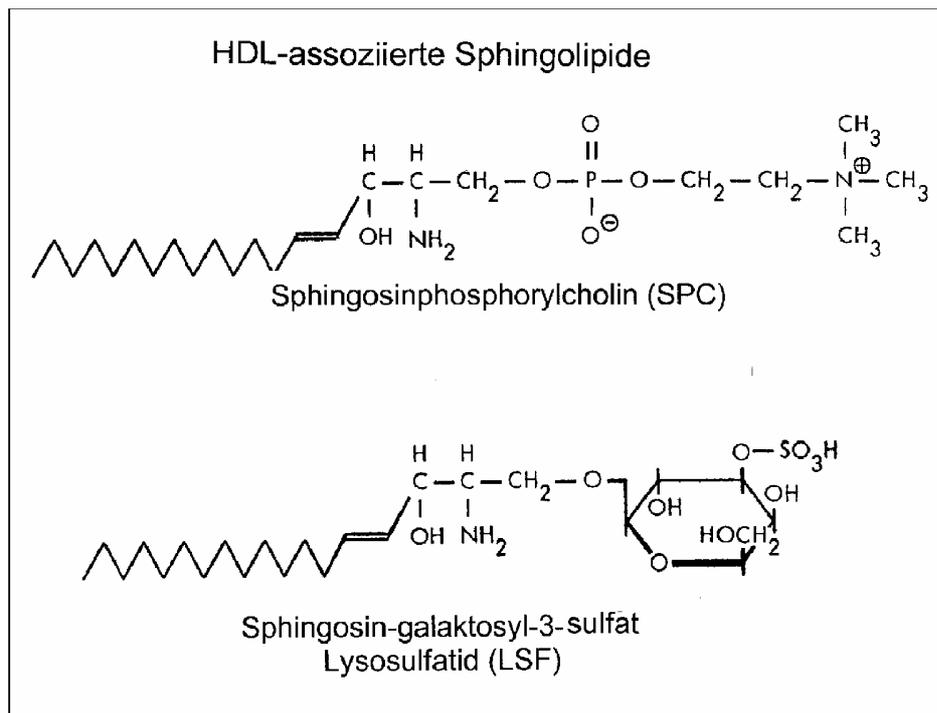


Abb. 3 HDL-assozierte Lysosphingolipide. Die bioaktiven Lysosphingolipide SPC (Sphingosinphosphorylcholin) und Lysosulfatid (LSF, Sphingosin-galaktosyl-3-sulfat) sind Intermediärprodukte des Sphingomyelin- bzw. Sphingoglycolipidstoffwechsels. Das ebenfalls zur Gruppe der HDL-assozierten Sphingolipide gehörende Sphingosin-1-phosphat ist ein intrazelluläres Syntheseprodukt, das durch die sequentielle Wirkung der Sphingomyelinase, der Ceramidase und Sphingosinkinase gebildet wird.

1.5.2 Endotheliale Dysfunktion und Lysosphingolipide

Eine Schädigung des Endothels führt zu einer herabgesetzten Aktivität der NO-Synthaseaktivität und verminderter Bioverfügbarkeit von endotheliale NO, zu einer veränderten Permeabilität der Gefäßwände für Lipide und Entzündungszellen sowie zu einer vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Endothelzellen. Sie sind frühe Merkmale einer Arteriosklerose, während in den ausgeprägten arteriosklerotischen Plaques eine Ablösung des Endothels als Folge einer zunehmenden Apoptose beobachtet wird. HDL kann die Symptome einer endothelialen Dysfunktion supprimieren oder verhindern. So zeigte sich eine umgekehrte Korrelation zwischen der NO-abhängigen Vasodilatation und den Blutplasma HDL-Spiegeln. Ebenso wurde über eine aktuelle Restaurierung der endothelialen Funktion bei Hyperlipoproteinämien nach Infusion von rekonstituierten HDL-Partikeln (Spieker et al., 2002) berichtet, eine Erhöhung der Blutplasma HDL-Konzentration reduzierte die zytokin-induzierte Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin (Cockerill et al., 2001). Eine Hemmung der Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls (VCAM-1) und der Bildung von Neointima ließ sich in tierexperimentellen Studien nach Ballondilatation der Carotisarterien nachweisen (Dimayuga et al., 1999). Dies entspricht weiterhin der Beobachtung, dass eine Überexpression von Apo-A1 in Apo-E defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}) zu einer signifikanten Reduktion der Monozytenrekrutierung in die arterielle Gefäßwand führt (Theilmeyer et al., 2000).

1.5.3 Sphingosinphosphorylcholin (SPC) – Funktionen des HDL-assoziierten Lysophospholipids

Sphingosinphosphorylcholin (SPC) gehört zur Gruppe der strukturell verwandten Lysosphingolipide, so wie Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P), Lysophosphatidsäure (LPA) und Lysosulfatid (LSF). Physiologisch findet man es im Plasma (50 nM), Serum (130 nM), HDL (4 µmol/mg Protein) und LDL (in einer geringeren Konzentration als im HDL). Pathophysiologische Vorkommen findet man

beispielsweise im Aszites, wobei die Konzentration des SPC im Aszites eines malignen Geschehens z.B. eines Ovarialkarzinoms höher ist als die eines nicht-malignen Geschehens (70 nM im Vgl. zu 18 nM), in Meningeomen und bei atopischer Dermatitis.

In den letzten 10 Jahren wurde herausgefunden, dass SPC eine Art „Vermittlerfunktion“ inne hat, obwohl bis heute die genauen Funktionen, die genauen Wirkmechanismen und Zielorte dieses Lysosphingosinlipids nicht vollständig geklärt oder sogar widersprüchlich sind.

Einige Funktionen laufen über die S-1-P-assoziierten EDG-Rezeptoren, wobei die Affinität meist niedriger ist als die des S-1-P. SPC bewirkt hier:

- einen raschen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg in vielen Zelltypen,
- eine Induktion von Stressfieber,
- eine Aktivierung des KaliumEinstroms in Vorhofmyozyten,
- eine Förderung der Zellmigration und Differenzierung,
- eine Stimulierung der NO-Produktion,
- eine Suppression der Apoptose von Endothelzellen sowie
- eine Induzierung der Diurese und Natriurese an Rattennieren.

Auf der anderen Seite hat SPC auch Einfluss auf Funktionen, die nicht mit S-1-P oder dem EDG-Rezeptor assoziiert sind:

- Inhibition des Ca^{2+} -Einstroms in kultivierte Zellen
- Induktion der Bildung von Superoxid- Anion in HI-60-Granulozyten
- Stimulierung der Inositol-Phosphat-Produktion in Epithelzellen der Atemwege
- Mitogene Wirkung auf eine Reihe von Zelltypen z.B. Endothelzellen
- Inhibition des Wachstums durch Aktivierung des ORG1 (ovarian cancer G-protein coupled receptor), ein Abkömmling der GPCR (G-protein coupled receptor), der von der Plazenta, der Lunge, der Leber, der Niere, dem Gehirn, dem Herz und von verschiedenen Teilen des Immunsystems exprimiert wird

- Förderung des Wundverschlusses, des Granulationsgewebes und Verbesserung des Gewebe-Remodellings

Diese Funktionen lassen den Schluss zu, dass auch noch andere Rezeptoren, evtl. SPC-spezifische Rezeptoren vorhanden sind, die eine höhere Affinität zum SPC besitzen (Übersicht bei Meyer zu Heringsdorf et al., 2002).

Betrachtet man einige Eigenschaften des SPC, so findet man Parallelen zu denen des HDLs (s. 2.4). Da SPC und andere Sphingophospholipide (S-1-P und LSF) als Bestandteil des HDL-Partikels identifiziert werden konnte (Nofer et al., 2001), ergibt sich die Hypothese, dass die HDL-assoziierten Sphingophospholipide einen wichtigen Faktor der arterioskleroseprotektiven Eigenschaften des HDLs darstellen.

1.6 Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Eine zur Dysfunktion des vaskulären Endothels führende Aktivierung durch Stress, Entzündung oder Cytokine (TNF- α , IL-1) führt im Endothel zu einer Expression von Zelladhäsionsmolekülen mit Fähigkeit zur Bindung und Erleichterung der transendothelialen Migration mononukleärer Blutzellen. Diese Transmigration von mononukleären Blutzellen einschließlich Monozyten und T-Lymphozyten in die Arterienwand ist ein kritischer Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose (Ross, 1999). So lässt sich durch TNF- α eine Induktion von E-Selektin herbeiführen, das eine initiale Bindung mononukleärer Zellen und Monozyten an das Endothel vermittelt. Die synchrone Expression des interzellulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 (VCAM-1) verstärken die zunächst nur gering ausgeprägte Bindung mononukleärer Blutzellen an das E-Selektin („Rolling“) und führen zu einer festen Bindung der Blutzellen an das Endothel mit nachfolgender transendothelialer Migration (Ross, 1999; Bevilacqua, 1993; Miva et al., 1997; Blann und McCollum, 1994). Die Adhäsion mononukleärer Blutzellen an das Endothel ist demnach ein mehrstufiger

Prozess, der sich formal in verschiedene Phasen unterscheiden lässt. Der initiale Kontakt zwischen Entzündungszellen und Endothel ist eine lockere Bindung, die von einer Rollbewegung gefolgt wird. Bei den E-Selektinen der vaskulären Endothelzellen wird diese Bindung durch eine spezifische Bindungsdomäne des E-Selektin (Sialyl-LewisX-Tetrasaccharid) vermittelt. Die gleichzeitige Expression von Zelladhäsionsmolekülen vom Typ ICAM-1 und VCAM-1 auf der Endotheloberfläche ist die Voraussetzung für eine stabile Anheftung der Zellen und wird durch Abgabe von Chemokinen bzw. chemotaktischen Substanzen (MIP-1, MCP-1) unterstützt. Die Chemokine MIP-1 und MCP-1 werden den mononukleären Blutzellen durch die Heparansulfat-Proteine der Syndecanfamilie präsentiert. Die nachfolgende Einwanderung der mononukleären Blutzellen durch die interendothelialen Kontaktflächen wird durch die von den mononukleären Blutzellen abgegebenen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) erleichtert (s. auch Abb. 1).

Verschiedene experimentelle Studien haben zu der Erkenntnis geführt, dass das HDL des Blutplasmas die Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in kultivierten Endothelzellen teilweise unterdrücken kann (O'Connell und Genest, 2001; Cockerill et al., 2001), doch bleibt der exakte Mechanismus, der diesem protektiven Effekt des HDL auf das Endothel zugrunde liegt, unklar. Li et al. (2002) haben vorgeschlagen, dass die HDL-induzierte NO-Produktion und die Hemmung der Leukozytenadhäsionsmolekülexpression durch die Zunahme einer intrazellulären Ceramidbildung erfolgt, doch hat diese These wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Im Hinblick auf die Tatsache, dass Ceramid ein intrazellulärer Stressfaktor ist, der eine Einschaltung des Apoptoseprogramms begünstigt, und auch die schädigenden Effekte des oxLDL auf das Endothel mit einer erhöhten Ceramidkonzentration der Endothelzellen gekoppelt sind, sprechen gegen die Annahme einer Beteiligung des Ceramids an der Suppression der cytokinaktivierten CAM-Expression. Die derzeitigen Modelle der Endothelaktivierung durch Cytokine (TNF- α , IL-1) nehmen an, dass die Bildung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine der spezifischen

Voraussetzungen für eine Regulation der Genexpression von Zelladhäsionsmolekülen und die Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten für das arterielle Gefäßsystem sind (Collins et al., 1995). Die zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen führende Signalkaskade setzt weiterhin voraus, dass das durch Phosphorylierung des NF- κ B/I- κ B Komplexes freigesetzte NF- κ B in den Zellkern transloziert wird und den Transkriptionsfaktor c-myc und den Promotor des E-Selektin-Gens aktiviert (Collins et al., 1995; Read et al., 1995 und 1997; Whitley et al., 1994). Das komplexe Netzwerk und die Wechselbeziehungen der HDL-initiierten Signalkaskade einerseits und des TNF- α -Signalweges sind noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Daher lassen sich auch keine exakten Aussagen über den Mechanismus machen, über den HDL die Expression von Zelladhäsionsmolekülen zu supprimieren in der Lage ist. Einen neuen Aspekt geben Studien, die gezeigt haben, dass die Lipidkomponente des HDL auch verschiedene Lysosphingolipide mit potentiell anti-atherogenen Eigenschaften enthält (Nofer et al., 2000 und 2001; Tamama und Okajima, 2002), die an der Suppressionswirkung des HDL beteiligt sind.

2.0 Fragestellung

Eine Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) in vaskulären Endothelzellen durch HDL ist bereits bekannt. Es soll geprüft werden, ob die HDL-assoziierten Lysosphingolipide Sphingosinphosphorylcholin (SPC) und Lysosulfatid (LSF, Lyso-Galaktose-3-Sulfat-Ceramid) den für HDL beschriebenen Hemmeffekt auf die Expression der Zelladhäsionsmoleküle auslösen kann, ob solche HDL-Mimicking Effekte konzentrationsabhängig sind und über welche Signaltransduktionswege die Modulation der Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 erfolgt. Eine Expression von E-Selektin und ICAM-1 sollte nicht nur durch den Nachweis einer Zunahme des E-Selektin- und ICAM-spezifischen Proteins, sondern auch Genaktivierung und Anstieg der CAM-spezifischen cDNA sowie durch vermehrte Exposition der CAMs an der Endothelzelloberfläche geführt werden.

Die HDL-assoziierten Sphingolipide (SPC und LSF) wurden für die Versuche ausgewählt, da für diese Verbindungen bereits der Nachweis als Lipidkomponenten der HDL-Partikel erbracht war (Kimura et al., 2001; Xia et al., 1999; Nofer et al., 2001). Zur Untersuchung der Signaltransduktionswege wurden Inhibitoren der G-Proteinaktivierung (Pertussis-Toxin, Suramin), der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (LY 294002) und der Phosphatidyl-Inositol Phospholipase C (U 73122) eingesetzt.

3.0 Material und Methoden

3.1 Materialien

Der Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Determination von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, der FITC-konjugierte anti-E-Selektin Antikörper und der E-Selektin-spezifische Oligonukleotidprimer stammten von R&D Systems, Minneapolis, USA; der ELISA zur Bestimmung des NF- κ B von IMGENEX, San Diego, USA. Der spezifische Antikörper gegen phosphoryliertes Akt war von New England Biolabs, Schwalbach, EU. Den R-Phycoerythrin (R-PE)-konjugierten monoklonalen Antikörper lieferte PharMingen, Heidelberg, EU. Das RNeasy RNA Isolierungskit wurde von Qiagen, Hilden, EU bezogen. Die Superscript II Polymerase und der Inhibitor Pertussis Toxin stammten von Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU. Die Substanzen SPC, LSF und der Inhibitor Suramin wurden von Sigma, Taufkirchen, EU geliefert, die Inhibitoren LY 294002 und U 73122 von Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, EU, TNF- α von Roche Applied Science, Mannheim, EU. Alle Materialien waren von höchster verfügbarer Reinheit.

Das eingesetzte HDL wurde aus humanem Plasma durch isopyknische Ultrazentrifugation isoliert (beschrieben in Nofer et al., 2000).

3.2 Untersuchungsgut

3.2.1 HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) aus humanen Vv. umbilicales

Als Untersuchungsgut dienten Endothelzellen, die aus humanen Nabelschnurvenen gewonnen wurden (s. 3.1.2.1 Isolierung von HUVECs). Die Nabelschnüre wurden 2 bis max. 36 h nach Geburt verarbeitet. Die Zellen konnten bis zur 6. Passage in Versuchen ohne Verlust der Zellteilungsrate und ohne die Fähigkeit zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen einzubüßen, eingesetzt werden.

Nicht unmittelbar für Versuche eingesetzte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor der Lagerung wurden die Zellen auf DMSO-haltiges Medium umgesetzt und über 6 h stufenweise bis auf die Endtemperatur (-196°C) reduziert.

3.2.2 HUVECs in Zellkultur

3.2.2.1 Anlegen von Primärkulturen

Herstellung von Kulturmedien

Das Kulturmedium I bestand aus RPMI 1640-Medium (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU), das durch folgende Substanzen ergänzt wurde:

- 15% Fötale Kälber-Serum (FKS, Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU)
- Bovine pituitary gland extract (50 µg/mL, Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU)
- Fungizone[®] (250 ng/mL, Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU)
- Ciprobay[®] (10 µg/mL, Bayer, Leverkusen, EU)
- Heparin (50 µg/mL, Sigma, Taufkirchen, EU)

Das Kulturmedium II setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

- SFM Medium (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU) plus
- Hum. recombinantes bFGF (20 ng/mL; R&D, Minneapolis, USA)
- Hum. recombinantes EGF (10 ng/mL; R&D, Minneapolis, USA)
- L-Glutamin (2 mM, Biochrom AG, Berlin, EU)
- HEPES (20 mM, Seromed, Berlin, EU)
- Ciprobay[®] (10 µg/mL, Bayer, Leverkusen, EU)

Die Substanzen beider Medien wurden jeweils unter sterilen Bedingungen zusammengeführt.

Gelatinebeschichtung der Kulturgefäße

1g Gelatine (Gelatine weiß, gepulvert; Merck AG Darmstadt, EU) löste man in 100 mL Aqua dest. in einer sterilen Glasflasche und autoklavierte anschließend für 1 h bei 120°C. Alle Kulturgefäße wurden mit einer ausreichenden Menge Gelatinelösung versetzt, so dass der Boden des Kulturgefäßes komplett benetzt wurde. Nach einer Einwirkzeit von ca. 5 min. wurde die überschüssige Gelatinelösung abgesaugt und das Kulturgefäß zweimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen.

Isolierung von HUVECs

Die Primärkulturen humaner Endothelzellen wurden aus Nabelschnurvenen Neugeborener nach Schmidt et al. (2002a) gewonnen. Die Nabelschnur wurde an beiden Enden abgeklemmt und in einem sterilen Gefäß, gefüllt mit PBS (Buffer Substance Dulbecco's Powder; SERVA, Heidelberg, EU) bei 4°C bis zur Präparation zwischengelagert. Die Aufarbeitung der Nabelschnur erfolgte 2 bis max. 36 h nach der Geburt.

Die Präparation der Nabelschnur sowie die Isolierung der Endothelzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Abtrennung beider Enden der Nabelschnur wurden die beiden Arterien und die Vene sichtbar. In das eine Ende der Vene wurde eine Metallkanüle eingeführt und mit einem sterilen Kabelbinder fixiert. Nachdem eine mit PBS gefüllte 50 mL-Perfuserspritze auf die Kanüle gesteckt wurde, spülte man das restliche Blut aus der Nabelschnurvene bis nur noch klare Flüssigkeit am anderen Ende ausströmte. Anschließend kanülierte man auf gleiche Weise das freie Ende der Nabelschnurvene, befestigte eine mit 0,05% Trypsin/EDTA 0,02% (Roche Applied Science, Mannheim, EU) gefüllte 20 mL-Spritze und tauschte eine leere 20 mL-Spritze gegen die Perfuserspritze. Nach Füllen der Vene mit der Trypsinlösung wurde das Präparat in eine sterile Petrischale gelegt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die trypsinhaltige Spritze wurde durch eine mit FKS-haltigem RPMI-Medium gefüllte Spritze ersetzt. Der Inhalt der Vene wurde mit der leeren Spritze aspiriert, in ein steriles 50 mL-

Röhrchen mit ebenfalls FKS-haltigem RPMI-Medium (das FKS inaktiviert das Trypsin) transferiert und die Vene mit Medium gefüllt. Daraufhin wurde die Flüssigkeitssäule mit Hilfe der beiden Spritzen hin und her bewegt, wobei die Nabelschnur von Zeit zur Zeit mit den Händen massiert wurde, um die Endothelzellablösung zu unterstützen. Durch Aspirieren leerte man die Vene vollständig und überführte die Zellsuspension in das sterile 50 mL-Röhrchen. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 x g wurde der Überstand abgesaugt, das Zellsediment in Kulturmedium I aufgenommen und die Zellen in gelatinebeschichtete Kulturflaschen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h, dann alle 72 h.

3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Feststellung der Zellzahl bei der Aussaat wurden 200 µL der homogenisierten Zellsuspension mit 9,8 mL isotonischer Elektrolyt-Lösung (BLR 174 Waldeck, Münster, EU) in ein Messgefäß gegeben und im Zellzählgerät (CASY 1, Schärfe System, Reutlingen, EU) bestimmt.

3.2.2.3 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der HUVECs wurde durch das Standardverfahren nach Lowry bestimmt. Zuerst löste man die am Boden des Kulturgefäßes adhärenen Zellen mit 1:4 mit PBS verdünntem Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% ab, transferierte die Zellsuspension in ein Reagenzglas und zentrifugierte für 3 Minuten bei 800 x g. Nach Absaugen der Überstandes wurde das Zellpellet in Anwesenheit von 200 µL 10%iger Natronlauge 10 Minuten in einem Wasserbad gekocht. Anschließend wurde die Lösung mit 50 µL 12,5 N Essigsäure neutralisiert. 100 µL der neutralisierten Lösung pipettierte man in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, fügte 1 mL des Gemisches aus Lowry 1 und 2 (im Verhältnis 50:1) hinzu und inkubierte für 10 Minuten. Nach Zugabe von 100 µL 1:3 verdünntem Folinreagenz (Merck AG Darmstadt, EU) durchmischte man die Lösung und inkubierte für 30 Minuten. Mit Hilfe eines Photometers (Spectronic Genesys 2) wurde die Extinktion

des Farbgemisches bestimmt. Der Proteingehalt der Probe konnte durch eine in gleicher Weise erstellte Standardkurve und der ermittelten Extinktion berechnet werden.

3.2.2.4 Subkultivierung

Die Kultivierung der HUVECs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aus 95% Luft und 5% CO₂ unter Verwendung von komplettiertem RPMI-Medium. Der Mediumwechsel erfolgte in der Regel in 72 h-Intervallen. Die Endothelzellkultur wurde morphologisch anhand ihres typischen „Kopfsteinpflasterreliefs“ mikroskopisch kontrolliert und identifiziert. Zur Subkultivierung wurden die konfluenten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1:4 mit PBS verdünntem Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% (Inkubationszeit: 3-5 min. bei 37°C) behandelt. Die hinzugegebene Enzymlösung verteilte man gleichmäßig auf den Zellrasen und kontrollierte die Abkugelung und beginnende Ablösung der Endothelzellen vom Boden des Kulturgefäßes unter dem Lichtmikroskop. Durch leichte mechanische Manipulation in Form von leichtem Schütteln konnte der Ablöseprozess vom Kulturboden unterstützt werden. Die Trypsinisierung wurde mit Hilfe serumhaltigen Mediums gestoppt, aus der gewonnenen Zellsuspension die Zellzahl bestimmt (s. 3.2.2.2) und die Zellen in mit Gelatine beschichtete 35 mm Ø Kulturschalen mit einer Zelldichte von 100 000 Zellen/Kulturschale bzw. 1 Mio./75 cm²-Kulturgefäß (ebenfalls mit Gelatine beschichtet) ausgesät. Die HUVECs konnten maximal bis zur 6. Passage subkultiviert werden (s. 3.2.2.1).

3.2.2.5 Standardversuch

HUVECs der 2. bis 6. Passage wurden in 35 mm Ø Kulturschalen bzw. in 75 cm² Kulturflaschen mit 100 000 Zellen/Kulturschale bzw. 1 Mio. Zellen/75 cm² Kulturflasche ausgesät. Nach 4 bis 5 Tagen waren die Kulturen konfluent und wurden für die Versuche eingesetzt. Während des Zellwachstums wurden die Kulturen täglich mikroskopisch kontrolliert. 16 h vor Versuchsbeginn erhielten die

Kulturen nach zweimaligem Waschen mit PBS serumfreies Medium (Kulturmedium II). Vor jeder Aufarbeitung stimulierte man die Endothelzellen für 6 h mit TNF- α . Der Inhibitor Pertussis Toxin (PTX, 100 ng/mL) wurde den Zellen 16 h, die Inhibitoren Suramin (100 μ g/mL), LY 294002 (20 μ M) und U 73122 (20 μ M) 30 Minuten, HDL in einer Konzentration von 1 mg/mL und die Lysosphingolipide SPC und LSF in den Konzentrationen von 10 μ M bzw. 20 μ M 15 Minuten vor TNF- α -Stimulation (10 ng/mL) zugesetzt. Anschließend folgten die unter 3.3 bis 3.6 beschriebenen Aufarbeitungen.

Bei jedem Versuch wurden in einer Parallelkultur die Zellzahl (s. 3.2.2.2) und der Proteingehalt nach Lowry (s. 3.2.2.3) ermittelt und für die Auswertung als Bezugsgrößen herangezogen.

3.3 Bestimmung von humanem sE-Selektin, sICAM-1 und sVCAM-1 durch Immunassay (ELISA)

Zur quantitativen Erfassung der E-Selektin-, ICAM-1- und VCAM-1-Konzentrationen im Lysat TNF- α stimulierter Zellen kamen die ELISA-Kits „Parameter®“ für humanes sE-Selektin, humanes sICAM-1, humanes sVCAM-1 von R&D Systems ,Minneapolis, USA, zur Anwendung.

Diese ELISA-Systeme arbeiten nach dem Prinzip der „Sandwich-Methode“, d.h. die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen Antikörpern spezifisch gegen E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 vorbehandelt und bilden mit dem korrespondierenden Antigen der Probe einen Immunkomplex, der mit Hilfe eines zweiten, enzymgekoppelten spezifischen monoklonalen Antikörpers und einem geeigneten Substrat eine Farbentwicklung zeigt, die direkt proportional der gebundenen Antigenmenge ist und über eine mitgeführte Standardkurve quantifiziert werden kann.

Durchführung am Beispiel von sE-Selektin

Für die quantitative Bestimmung des sE-Selektins werden vom Hersteller folgende Lösungen zur Verfügung gestellt:

- sE-Selektin Mikrotiterplatte
- sE-Selektin-Standards
- Sample Diluent
- sE-Selektin Conjugate Concentrate
- Conjugate Diluent
- Wash Buffer Concentrate
- Substrate
- Stop Solution

Die komplette Aufarbeitung des Versuchs fand bei 4°C und in Gegenwart von Proteaseinhibitoren statt, da nur unter diesen Bedingungen der Analyt stabil blieb. Dazu wurden die Zellen auf einem in Eiswasser gekühlten Aluminiumblech bearbeitet. Der Lysepuffer selbst wurde kurz vor Versuchsbeginn aus folgenden Komponenten (pro mL) hergestellt:

- 890 µL PBS/ Brij® 0,5% (v/w)
- 100 µL Proteaseinhibitorcocktail 10-fach nach Oegema TR et al. (J Biol Chem 1975;250:6151-6159)
- 10 µL PMSF (Phenylmethylsulfonylflourid; Sigma, Taufkirchen, EU) 100-fach

Nach der wie unter 3.2.2.5 beschriebenen Stimulation der Zellen wurden diese nach kurzer Akklimatisierung auf Raumtemperatur auf das gekühlte Blech übertragen und das Kulturmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 bis 2 mL PBS gewaschen. Danach wurden 300 µL Lysepuffer so über die 35 mm Ø Kulturschalen verteilt, dass alle Zellen bedeckt waren. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten löste man die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers ab und transferierte den Gesamtpool aus Lysat und Zellen mit einer Pipette quantitativ in vorgekühlte (Eisbad) 1,5 mL Eppendorf-

3.0 Material und Methoden

Reaktionsgefäße. Durch anschließende Zentrifugation in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Beckmann G15R Centrifuge) bei 10 000 x g für 10 Minuten wurden die extrahierten Zellmembranreste entfernt, der klare Überstand in frische vorgekühlte 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und unmittelbar zur Analyse im o. g. ELISA eingesetzt.

Nach Vorbereitung der Reagenzien, Standards und Proben wurden 100 µL Standard oder 100 µL der 1:20 bzw. 1:40 (je nach Zellzahl und/oder erwartetem E-Selektin Gehalt) mit Sample Diluent verdünnten Proben in die 96er Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 100 µL Conjugate Diluent dazugegeben. Die Platte wurden 1,5 h bei Raumtemperatur unter ständigem Durchmischen mit Hilfe eines Minishakers (MS1; IKA) inkubiert, wobei E-Selektin durch den an die Mikroplatte fixierten Antikörper gebunden wurde. Nach 6-maligen Waschen mit je 300 µL Waschpuffer zur Entfernung ungebundener Komponenten wurden 100 µL Tetramethylbenzidin (Peroxidasesubstrat) in die Vertiefungen pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der zweiten Inkubationszeit beendete man mit 100 µL Stop Solution die Farbreaktion. Die Stop Solution stabilisiert den Farbkomplex für 30 Minuten. Die Extinktion der Proben wurde in einem ELISA-Photometer (Dynatech MR5000) bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 Minuten gegen einen Leerwert bestimmt.

Die Aufarbeitungen der Zellen zur Quantifizierung von ICAM-1 bzw. VCAM-1 verliefen analog der für E-Selektin beschriebenen Durchführung. Sie unterschieden sich nur hinsichtlich der Inkubationszeiten. Alle Aufarbeitungen wurden streng nach Vorschrift des Herstellers R&D Systems durchgeführt.

3.4 RNA-Gewinnung

3.4.1 QIAGEN RNA-Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der RNA erfolgte nach einer Vorschrift der Fa. QIAGEN unter Verwendung der hierfür gelieferten Materialien und Reagenzien (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, EU):

- RLT-Puffer
- RW-1 Puffer
- RPE Waschpuffer
- QIA Shredder Säule
- RNeasy Säule
- DEPC-Wasser (RNase frei)

Die RNA-Gewinnung wurde nach Schmidt et al. (2002b) strikt unter RNase-freien Bedingungen, d.h. Tragen von Handschuhen, Benutzen von RNase-freien gestopften Pipetten und Desinfizieren der Arbeitsfläche durchgeführt.

Für die Gewinnung der RNA wurde das Kulturmedium quantitativ abgesaugt und die Zellen mit 600 μL pro 75 cm^2 Kulturflasche in RLT-Puffer, dem β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ hinzugegeben worden war, lysiert. Der Puffer wurde so in der Kulturflasche verteilt, dass alle Zellen Kontakt mit dem Puffer hatten. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Siliconschabers in eine Ecke der Kulturflasche geschoben, mit einer Pipette in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, homogenisiert, kurz anzentrifugiert, um den Schaum zu entfernen, und anschließend wurde das Lysat auf die QIA-Shredder-Säule transferiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 14000 x g verwarf man den QIA-Shredder und gab 600 μL Ethanol (70%ig) zum Eluat. Eluat und Ethanol wurden bis zum Verschwinden der Schlieren durchmischt. Das homogenisierte Gemisch pipettierte man in zwei Fraktionen (jede Fraktion sollte max. 700 μL betragen) auf die RNeasy-Säule, zentrifugierte für 15 sec. bei 8000 x g und verwarf den Durchlauf. In diesem Schritt wurden die RNA und DNA auf der Säule gebunden.

Danach wurden auf die Säule 700 µL RW1-Puffer gegeben, für 15 sec. bei 8000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Danach wurden 500 µL RPE-Waschpuffer (1:5 mit 96-100% Ethanol verdünnt) auf die Säule gegeben, für 15 sec. bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, jedoch für 2 min. bei 14000 x g trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann auf ein 1,5 mL Sammelröhrchen gesetzt. Am Ende gab man 30 µL DEPC-Wasser (RNase frei) auf die Membran der Säule und zentrifugierte 1 min. bei 8000 x g. Die Lösung enthielt RNA und DNA. Die so gewonnene RNA und DNA konnte bis zur Analyse bei -80°C zwischengelagert werden.

3.4.2 DNA-Verdauungsvorgang

Nachdem DNase auf Eis aufgetaut worden war, wurden 10 µL DNase (RNase-free DNase-Set, QIAGEN, Hilden, EU) und 3 µL DNase-Puffer zu dem mit dem QIAGEN RNeasy Mini Kit gewonnenen Eluat pipettiert. Die Proben und die DNase wurden auf Eis bearbeitet, um die empfindliche DNase vor thermischer Inaktivierung zu schützen. Anschließend wurden die Proben in einem Blockthermostat für 30 min. inkubiert.

3.4.3 RNA-Isolierung

Zu dem DNA-verdauten Eluat wurden 66 µL DEPC-Wasser und dann 350 µL RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (10 µL/mL) pipettiert und das Gemisch homogenisiert. Danach gab man 250 µL Ethanol (100%ig) zum Eluat. Eluat und Ethanol wurden bis zum Verschwinden der Schlieren durchmischt. Das Gemisch wurde auf die RNeasy-Säule pipettiert, zentrifugiert (15 sec. bei 8000 x g) und der Durchlauf verworfen. In diesem Schritt wurde ausschließlich RNA auf der Säule gebunden (die DNA wurde im vorherigen Schritt verdaut).

Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesetzt. Danach wurden 500 µL RPE-Waschpuffer (1:5 mit 96-100% Ethanol verdünnt) auf die Säule gegeben, 15 sec. bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde

wiederholt, jedoch für 2 min. bei 14000 x g trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann auf ein 1,5 mL Sammelröhrchen gesetzt, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Flüssigkeit an der Säule befand. Danach gab man 30 µL DEPC-Wasser (RNase frei) auf die Membran der Säule und zentrifugierte 1 min. bei 8000 x g. Das Eluat enthält reine RNA und kann bei -80°C gelagert werden.

3.4.4 RNA-Quantifizierung

Die RNA wurde in einem Bio-Photometer quantifiziert. Man nahm 2 µL der Probe und verdünnte sie mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 (in DEPC-Wasser) im Verhältnis 1:10 in einer Küvette. Die RNA wurde in einem GeneQuant[®]-Photometer, Pharmacia, Freiburg, quantifiziert.

3.4.5 Transkription der RNA in cDNA und RT-PCR (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, EU, SuperScript[™]-Ansatz)

Fünf Mikrogramm der RNA wurden mit Hilfe der Superscript II Polymerase in cDNA überschrieben und konnten dann in der RT-PCR eingesetzt werden.

Nach Herstellung des Master-Mix (49 µL) in einem 100µL Eppendorfgefäß streng nach Protokoll von Gibco wurde 1µL (µg) cDNA der Probe hinzugegeben und die cDNA im PCR-Gerät nach Gibco-Vorschrift vervielfältigt.

Der Master-Mix bestand aus folgenden Komponenten:

- 1,5 µL Primer (10 µM)
- 1 µL dNTP-Mix (10 mM)
- 5 µL 10x PCR-Puffer
- 41,2 µL Aqua ad injectabilia
- 0,3 µL Hot Star (5 U/µL)

3.4.6 Herstellung der Agarose-Gele für die Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung der Gele wurden 1,5 g Agarose mit 150 mL TAE-Puffer (bestehend aus Tris-HCl 40 mM, Eisessig 0,1%, EDTA 1mM) in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und anschließend unter fließendem Wasser auf ca. 50°C

abgekühlt. Die Lösung wurde dann in die Wanne der Elektrophoreseapparatur gegossen, mit 6 µL Ethidiumbromid versetzt, durchmischt und mit einem passenden Taschenformer versehen. Das Gel benötigte 20 bis 30 min. zur Aushärtung.

3.4.7 Gel-Elektrophorese

Nach Beendigung der RT-PCR wurden 10 µL jeder Probe entnommen und 1,1 µL Gel-Loading-Buffer 10-fach (Fermentas, St. Leon Roth) zugegeben und durchmischt. Das ausgehärtete Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer geflutet und die Probenfächer mit 10 µL der Proben aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 80 Volt für 20 min. durchgeführt und das Ergebnis unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

3.5 Bestimmung zelloberflächen-exponierter E-Selektin- bzw. ICAM-1-Moleküle in HUVECs durch Immuncytometrie

Nach Aussaat und Stimulierung der Zellen wie unter 3.2.2.5 beschrieben, wurde das Medium entfernt und die Kultur einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL Glutaraldehyd (25%; Merck AG, Darmstadt, EU), welches zuvor mit PBS auf eine 1%ige Lösung verdünnt wurde, für 5 min. bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (3 x mit PBS) und dann mit 1 mL des gelösten Antikörpers (1 µg/mL PBS/0,1% BSA), der gegen E-Selektin bzw. ICAM-1 gerichtet war (R&D Systems, Minneapolis, USA) benetzt. Die Kulturen inkubierte man bei 37°C für 1 h, wobei der primäre Antikörper mit den entsprechenden Oberflächenmolekülen reagiert. Danach gab man nach 3-maliger PBS-Waschung den sekundären AK (HRP-konjugiert, Anti-Mouse-Serum, in der Verdünnung 1:50 000; PERBIO, Bonn, EU) hinzu und inkubierte die Kulturen bei 37°C für 1 h. Der sekundäre AK wurde für den Versuch jedesmal frisch verdünnt mit PBS und nach

Gebrauch verworfen, während der primäre AK zurückgewonnen und bis zu dreimal in Versuchen eingesetzt werden konnte.

Der dritte und letzte Schritt diente der Farbentwicklung. Dazu wurde jede Kultur mit 500 μL ABTS-Substratlösung versetzt. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt. ABTS-Substratlösung bestand aus 0,15 M Citratpuffer (pH 4,0), 30%igem Wasserstoffperoxid (Merck AG, Darmstadt, EU) und ABTS. Pro mL Citratpuffer wurden 30 μL Wasserstoffperoxid und 1 mg ABTS (Roche Applied Science, Mannheim, EU) dazugegeben. Die optische Dichte wurde in einem Photometer bei 405 nm gemessen.

3.6 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Messung

Nach Aussaat und Stimulierung der Zellen (s. 3.2.2.5) wurde das Medium entfernt, die Kultur zweimal mit PBS gewaschen und mit 1:4 mit PBS verdünntem Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% (37 °C) behandelt. Die Enzymlösung verteilte man gleichmäßig auf dem Zellrasen und die Abkuglung und beginnende Ablösung der Endothelzellen vom Boden des Kulturgefäßes verfolgte man unter dem Lichtmikroskop. Durch leichte mechanische Manipulation in Form von leichtem Schütteln konnte der Ablöseprozess vom Kulturboden unterstützt werden. Die Trypsinisierung wurde mit Hilfe von serumhaltigem Medium gestoppt. Das Zell-Medium-Gemisch wurde in FACS-Probenröhrchen transferiert, bei 800 x g für 3 min. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in 1 mL FACS-Puffer (PBS mit BSA in der Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aufgenommen. Die Temperatur des Puffers sollte 4°C betragen, da der AK nur bei dieser Temperatur stabil ist und somit optimal wirken kann. Jede Probe wurde dann mit 10 μL AK Monoclonal Antibody (FITC-conjugated anti-Human E-Selektin, R&D Systems bzw. R-Phycoerythrin (R-PE)-conjugated mouse anti-Human Monoclonal Antibody gegen ICAM-1, PharMingen International, EU) versetzt und dann für 30 min. bei 4°C lichtgeschützt inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal gewaschen, um überschüssigen AK zu entfernen.

Die Zelloberflächen-Expression wurde über ein FACS-System (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit dem Coulter EPICS XL Zytofluorimeter (Coulter Electronics, Hialeah, FL) in einer Standardkonfiguration mit einem 530 nm Filter nach Stimulierung durch einen Argonlaser (488 nm) gemessen. Die Zellen wurden erfasst und die Daten von Fluoreszenz-Kanälen in logarithmischer Form ermittelt. Insgesamt wurden pro Probe 5 000 Einzelmessungen analysiert. Die spezifische Bindung der monoklonalen AK wurde durch Subtraktion nicht-spezifischer Bindungen, wie die des FITC-gebundenen isotyp-spezifischen, nicht-relevanten IgG-Ak, errechnet.

3.7 NF- κ B ELISA

Für die Bestimmung des NF- κ B werden vom Hersteller (NF- κ B/p65 ActiveELISA-Kit IMGENEX, San Diego, USA) folgende Reagenzien zur Verfügung gestellt:

- Waschpuffer
- BSA
- Hypotoner Lysispuffer
- 10%iges NP-40
- Nuclear Extraction-Puffer
- Capture Antibody
- Detecting Antibody
- AKP-conjugated secondary Antibody
- PNPP Substrat Buffer Solution

3.7.1 Aufarbeitung der Zellen für den NF- κ B ELISA

Nach Aussaat, Vorbehandlung und Stimulierung der Zellen für 30 min. mit TNF- α wurde das Medium entfernt, die Kultur zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1:4 mit PBS verdünntem Trypsin 0,05%/EDTA 0,02% (Inkubationszeit: 3-5 min. bei 37°C) abgelöst. Durch leichte mechanische Manipulation in Form von leichtem Schütteln konnte der Ablöseprozess vom Kulturboden unterstützt werden. Die Trypsinisierung wurde mit Hilfe von serumhaltigem Medium gestoppt. Das Zell-Medium-Gemisch wurde in 12 mL Falcon-Probenröhrchen transferiert und homogenisiert. Vom Homogenat wurden 200 μ L zur Zellzahlbestimmung (s. 4.2.2.2) entnommen. Nach Zentrifugation des restlichen Homogenats wurde das gewonnene Zellpellet zweimal mit 3 mL PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 mL 4°C-kaltem PBS aufgenommen und in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, bei 4°C mit 800 x g für 1 min. zentrifugiert und der Überstand anschließend abgesaugt. Dem Pellet wurden 200 μ L hypotoner Lysispuffer zugegeben und das Gemisch homogenisiert. Nach 15 min. Inkubationspause bei 4°C gab man 15 μ L 10%iges NP-40 zum Gemisch und vortexte für 10 sec. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (1 min. mit 14 000 rpm bei 4°C) und der Überstand abgezogen. Dann pipettierte man 110 μ L Nuclear Extraction-Puffer zum Zellpellet und inkubierte für 30 min. bei 4°C, wobei das Gemisch alle 2-5 min. durchmischt wurde. Abschließend wurde für 1 min. bei 14 000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der gewonnene Überstand konnte für eine ELISA-Quantifizierung eingesetzt werden.

3.7.2 Durchführung des NF- κ B ELISA

Die 96er ELISA-Platte wurde mit 100 μ L Capture Antibody (1:100 mit dem Coating-Buffer verdünnt) über Nacht bei 4°C vorinkubiert und anschließend für 1 h mit 150 μ L Blocking-Buffer, der aus mit BSA versetztem (10 mg/mL) Waschpuffer-einfach besteht, geblockt. Nach Entfernung des Blocking-Buffer wurden 100 μ L der Proben in die ELISA-Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.0 Material und Methoden

Nach Entfernung der Proben wurde die Platte 4 x mit 300 μ L Waschpuffer gewaschen und 1 h bei RT mit 100 μ L Detecting Antibody (1:100 mit Blocking-Buffer verdünnt) inkubiert. Nach 4-maligem Waschen wurde mit 100 μ L sekundärem Antikörper (alk. Phosphatase-conjugated secondary Antibody, 1:100 mit Blocking-Buffer verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert.

Vor der Farbentwicklung wurde die Platte zunächst mit Waschpuffer behandelt, wobei man zwischen jedem der 5 Waschschritte den Puffer für ca. 1 min einwirken ließ. Abschließend wurden 100 μ L frisch hergestellter Substratlösung, bestehend aus 10 mg pNPP und 10 mL Substrate Buffer Solution, zu den Proben pipettiert und die Extinktion nach 60-90 min. im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

4.0 Ergebnisse

4.1 TNF- α stimulierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Kultivierte menschliche Endothelzellen exprimieren unter Standardbedingungen (RPMI Medium plus 15% hitzeinaktiviertes Kalbserum) E-Selektin und Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) in einer Konzentration, die unter der Nachweisgrenze liegt. Eine Stimulation mit 10 ng TNF- α /mL Medium führt jedoch innerhalb weniger Stunden zu einer Hochregulation der Zelladhäsionsmoleküle und zu einer Expression des E-Selektins und einer permanenten Expression (> 24 h) des ICAM-1 an der Endothelzelloberfläche (Abb. 4.1). Die TNF- α -induzierte Expression wird durch ein hoch-spezifisches Enzymimmunsystem (ELISA) nachgewiesen. Die Expression des E-Selektin erreicht ein Maximum nach 4–8 h mit Werten von 10 – 17 ng/10⁵ Zellen und fällt dann in Gegenwart von TNF- α kontinuierlich auf nicht messbare Basalwerte innerhalb von 24 h ab, während die ICAM-1 Expression nach primärem Anstieg mit Maximalwerten von 11-14 ng/10⁵ Zellen nach 6-8 h über 24 h nachweisbar bleibt. Unter den gleichen Bedingungen zeigt VCAM-1 ein dem ICAM-1 ähnliches Expressionszeitprofil mit vergleichbarer Kinetik, ist aber weniger ausgeprägt (ohne Abb.).

In einem weiteren Versuch wird die selbe Messreihe, TNF- α -Stimulation für 24, 16, 8, 6, 4 und 2 h, unter Einfluss von Sphingosinphosphorylcholin (SPC) wiederholt, um der Frage nachzugehen, ob sich die Expressionskinetik mit ihrem Maximum bei 4-8 h unter SPC verändert. Abb. 4.2 zeigt, dass sich auch unter Einfluß von SPC das Maximum der E-Selektin-Expression bei 4-8 h befindet. Der einzige Unterschied liegt in den Absolutwerten für E-Selektin: 6-9 ng/10⁵ Zellen. Somit kann am Beispiel des SPCs gezeigt werden, dass die standardmäßige Stimulationszeit von 6 h auch in Gegenwart der Suppressoren (HDL und den Lysosphingolipiden SPC und LSF) im Maximum der E-Selektin-Expression liegt. Die Expressionskinetik der Adhäsionsmoleküle wird also nicht durch die Anwesenheit der Suppressoren beeinflusst.

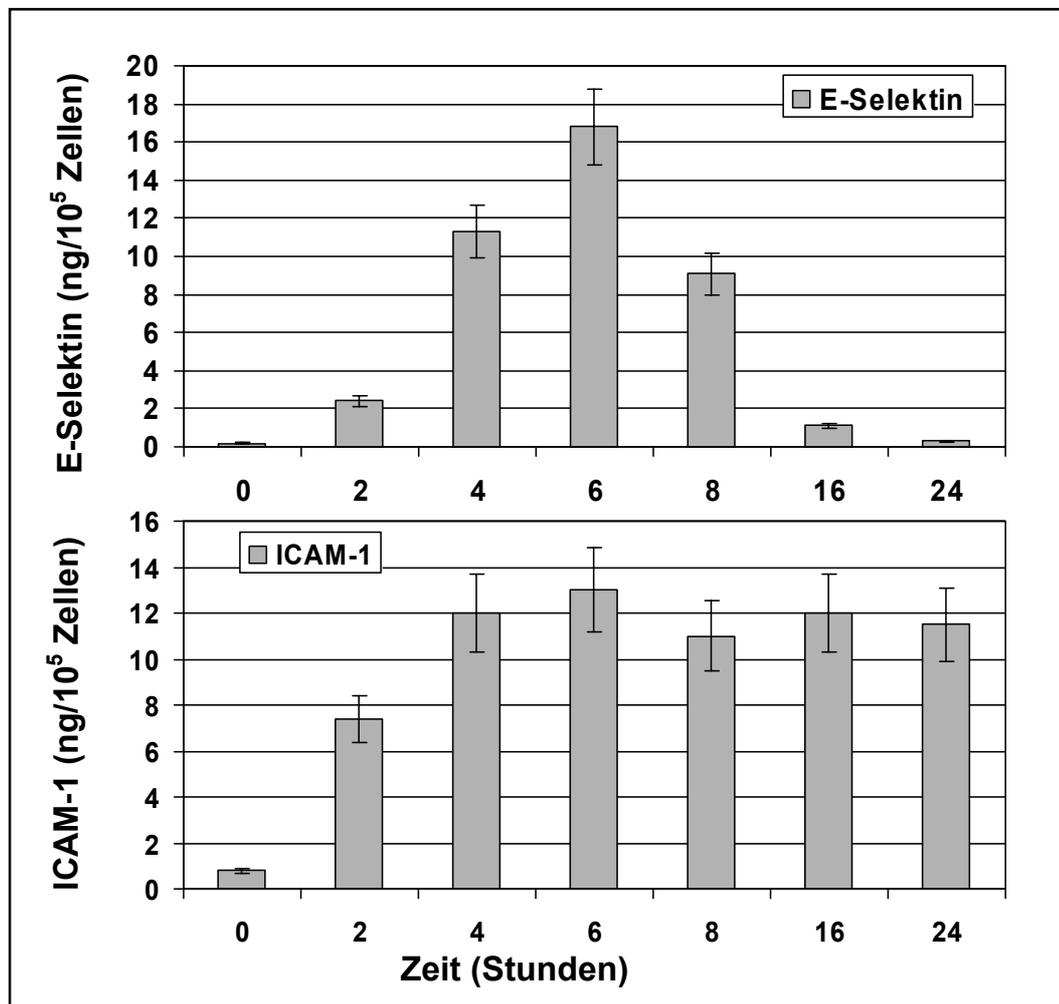


Abb. 4.1 Kinetik der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen nach Stimulation durch 10 ng/mL Kulturmedium TNF- α . 1×10^5 humane Endothelzellen (Vena umbilica) wurden in 35 mm \varnothing Petrischalen in RPMI-Medium (s. Methoden) zur Kultivierung angesetzt und nach Zugabe von TNF- α (Zeitpunkt 0) für 24 Stunden kultiviert. Die quantitative Bestimmung von E-Selektin und ICAM-1 durch ein hoch-spezifisches Immunsystem wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Hierfür wurden die nach Abziehen des Kulturmediums gewaschenen Zellen lysiert und nach Zentrifugation des Zellysats der klare Überstand für die Analyse eingesetzt.

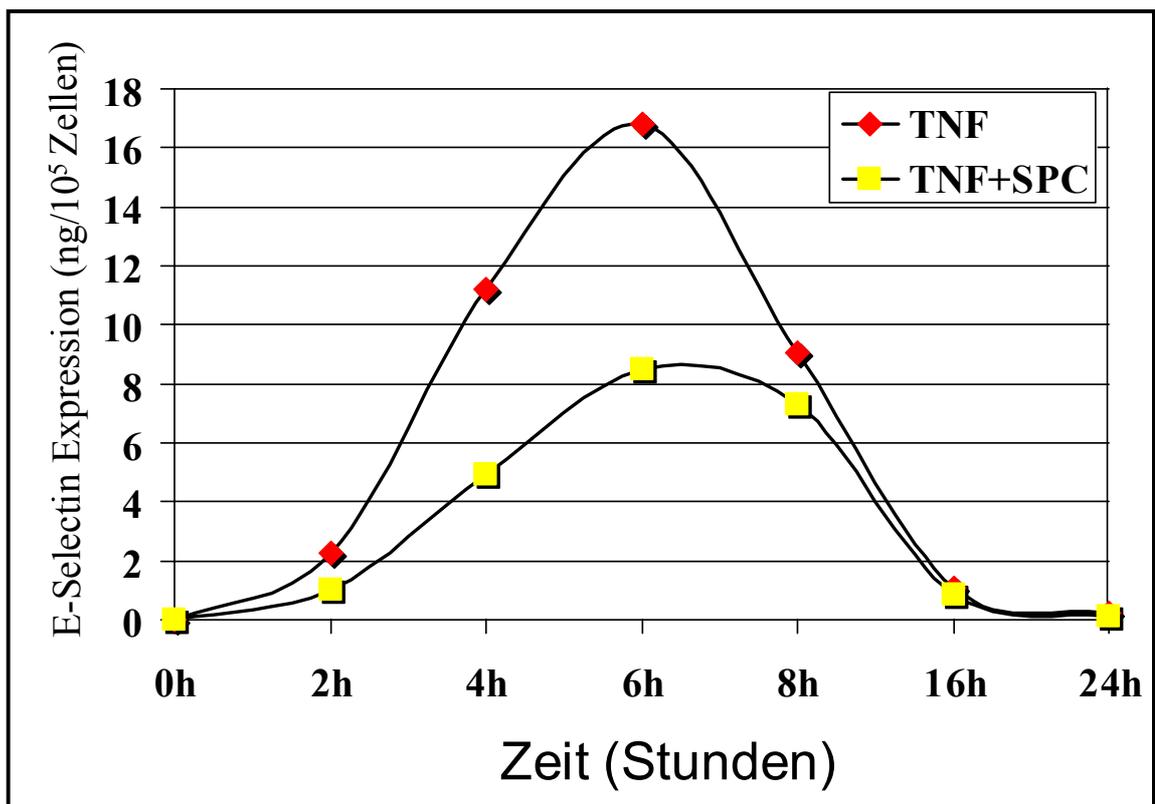


Abb. 4.2 Kinetik der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen am Beispiel von E-Selektin nach Stimulation der in Kultur befindlichen humanen venösen Endothelzellen durch TNF- α mit und ohne Einfluss von SPC, welches jeweils 15 min. vor TNF- α -Stimulation zugegeben wurde. Die quantitative Bestimmung von E-Selektin wurde mit dem hoch-spezifischen ELISA-System durchgeführt.

4.2 HDL und HDL-assoziierte Sphingolipide supprimieren Cytokin-induzierte spezifische Genaktivierung und Proteinexpression von E-Selektin und ICAM1

Die durch TNF- α stimulierte und nach 6 h maximale Expression der Zelladhäsionsmoleküle wird durch HDL und HDL-assoziierte Lysosphingolipide SPC und LSF gehemmt. Hierfür wurden konfluente humane Endothelzellkulturen für 15 min. in Gegenwart oder Abwesenheit von HDL (1 mg/mL), SPC (10 μ M) und LSF (20 μ M) inkubiert und dann einer Stimulation durch TNF- α (10 ng/mL) ausgesetzt. Abb. 5 zeigt, dass nach 6 h der TNF- α -induzierte Anstieg des E-Selektin- ($22.4 \pm 2,2$ ng/ 10^5 Zellen), des ICAM-Proteins ($40,1 \pm 3$ ng/ 10^5 Zellen) durch HDL, SPC und LSF deutlich gehemmt wird. Dies zeigt sich für HDL in einer Absenkung des E-Selektin-Proteins auf $13,04 \pm 0.66$ ng/ 10^5 Zellen, für SPC auf $13,44 \pm 0.52$ und für LSF auf $14,76 \pm 0.94$ ng/ 10^5 Zellen. Die Suppression der ICAM-Proteinexpression (unter TNF- α -Induktion $40,1 \pm 3$ ng/ 10^5 Zellen) zeigt Werte von $29,29 \pm 2,04$ ng/ 10^5 Zellen für HDL, von $29,69 \pm 2,96$ für SPC und von $27,63 \pm 2,76$ für LSF.

Eine analoge Suppression der Proteinexpressionen findet man in Abb.6: E-Selektin zeigt Werte (in % der selektiven TNF- α Stimulation) von 58 ± 5.1 % für HDL, 60 ± 3.9 % für SPC und 65 ± 6.4 % für LSF. Die Prozentzahlen für ICAM lagen mit 72% für HDL, 74% für SPC und 68% für LSF leicht über denen des E-Selektins. Die durch HDL (68%) und SPC (67%) induzierte Hemmung der Expression von VCAM-1 wurden für das LSF nicht untersucht.

Die beobachtete Hemmung ist konzentrationsabhängig (Abb. 7) und erreicht für HDL bei 2.0 g/L für E-Selektin nach Inkubation in Gegenwart von TNF- α Werte von 40 %, für SPC und LSF, bei Konzentrationen von 20 μ M Werte von 51 bzw. 54 % der Kontrolle.

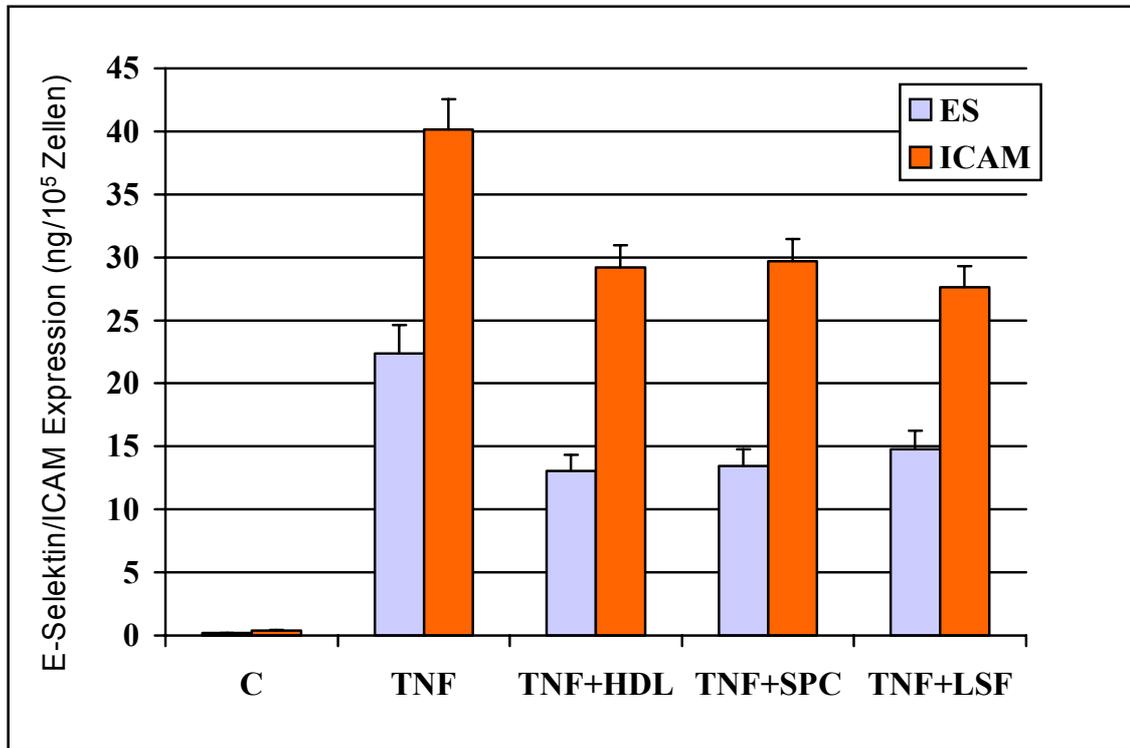


Abb. 5 Kultivierte humane venöse Endothelzellen (HUVECs) wurden für 15 min. mit HDL (1 g/L), SPC (10 μ M) oder LSF (20 μ M) inkubiert und anschließend durch TNF- α (10 ng/mL) stimuliert. Bei Versuchsende nach 6 h wurden die Zellen in 0.5 % Brij³⁵ in PBS in Gegenwart von Proteaseinhibitoren solubilisiert und E-Selektin bzw. ICAM-1 in den Zelllysaten durch ein E-Selektin/ICAM-1-spezifisches Immunassaysystem quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3-5 unabhängigen Versuchen. Die Differenz der E-Selektin-Expression zwischen TNF- α (Kontrolle) und der zusätzlich mit HDL, SPC oder LSF vorinkubierten Zellen ist statistisch signifikant ($p < 0.01$).

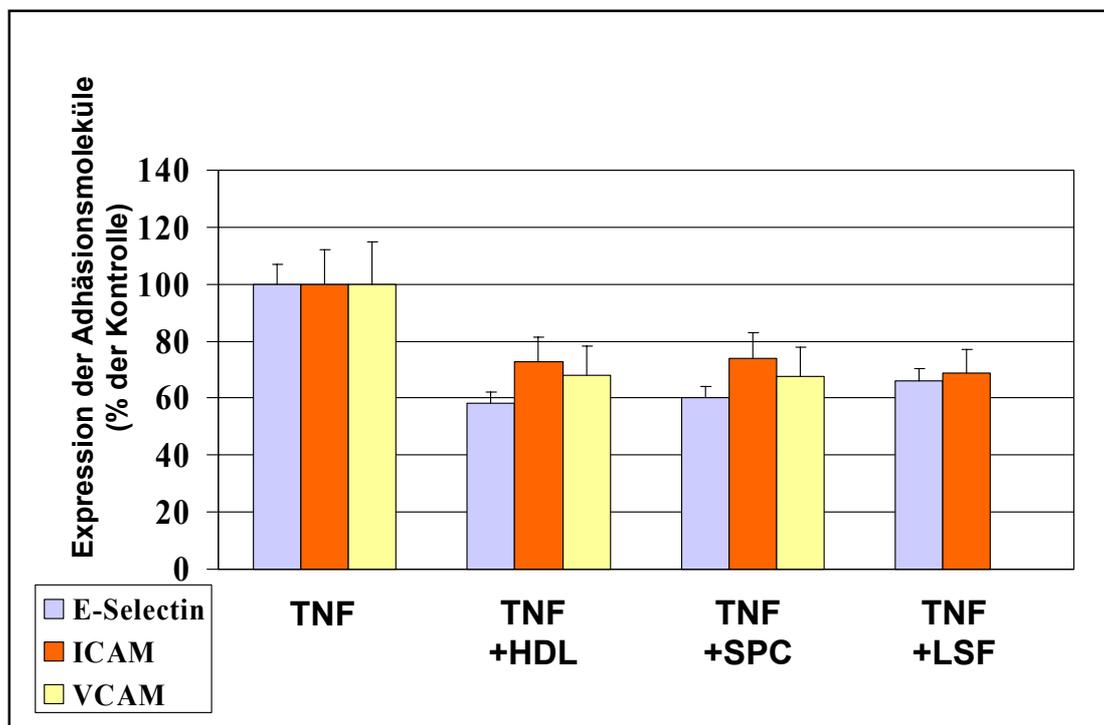


Abb. 6 Suppression der durch TNF- α -Stimulation induzierten Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in % der Kontrolle (100 % entsprechend einer selektiven TNF- α Stimulation). Übrige Versuchsbedingungen wie in Abb. 5. Die potentielle Suppression von VCAM-1 unter der Einwirkung von mit LSF vorinkubierten Zellen wurde nicht untersucht. (n = 5-10, p<0,017)

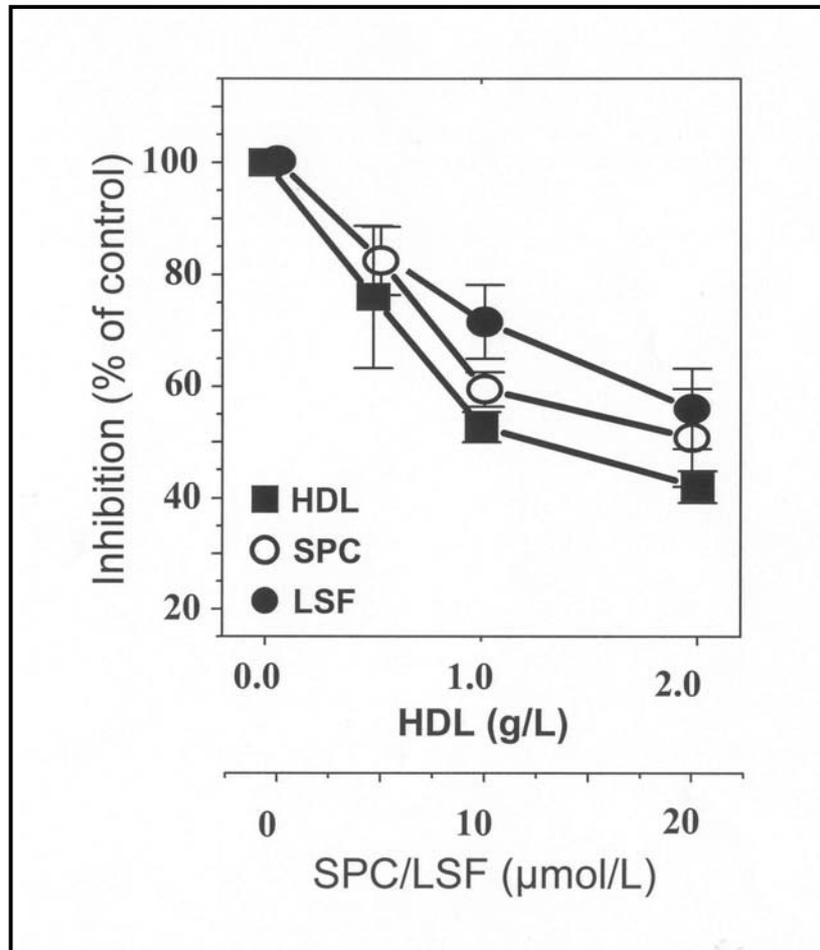


Abb. 7 Dosis-Wirkungskurve des suppressiven Effekts von HDL, SPC und LSF auf die Expression von E-Selektin. Übrige Versuchsbedingungen wie in Abb.5. Angegeben sind die Werte für die Hemmung in % der Kontrolle und die aus drei unabhängigen Versuchen ermittelte Standardabweichung.²

² aus der Publikation Nofer et al., BBRC 310 (2003) 98-103

4.3 Suppression der zelloberflächen-exponierten Zelladhäsionsmoleküle durch HDL und Lysosphingolipide

Zur Untersuchung der Frage, ob eine Hemmung der E-Selektin- und ICAM-Expression unter Einfluss der eingesetzten Wirkstoffe auch die Exposition der Zelladhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche betrifft, wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt: (a) Nach TNF- α Induktion der Zelladhäsionsmoleküle in Gegenwart oder Abwesenheit der Inhibitoren wurden die kultivierten Zellen mit PBS gewaschen und der Einwirkung spezifischer gegen E-Selektin bzw. ICAM-1 gerichtete Antikörper ausgesetzt. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Antikörper, die mit den an der Zelloberfläche exponierten Zelladhäsionsmolekülen reagiert hatten, mit einem zweiten Peroxidase-konjugierten Antikörper gekoppelt und die Farbentwicklung gemessen. Abb. 8 zeigt, dass auch das an der Zelloberfläche nach TNF- α Stimulation exponierte Zelladhäsionsmolekül E-Selektin in gleichem Ausmaß supprimiert wird, nicht aber die ICAM-spezifischen Zellproteine (vgl. Abb. 5 und 6).

(b) In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden die Endothelzellen nach TNF- α Stimulation unter gleichen Bedingungen durch Proteolyse mit Trypsin von der in der Kultur gebildeten Matrix abgelöst und durch Enzym(Peroxidase)-gekoppelte Immuncytometrie quantifiziert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen nach Exposition mit HDL/Lysosphingolipiden der Reaktion mit CAM-spezifischen mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelten Antikörper ausgesetzt und einer Analyse durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) unterzogen. Auch bei diesem Verfahren wurde eine entsprechende Reduktion des an der Zelloberfläche aktivierten E-Selektin gemessen. Das an der Zelloberfläche exponierte E-Selektin wurde durch Fluoreszenzmessung detektiert und quantifiziert. Wie Abb. 9 zeigt, reduzierten sowohl HDL als auch die Lysosphingolipide die Menge des an der Endothelzelloberfläche exponierten E-Selektin. Dies zeigte sich darin, dass im Kontrollexperiment nach selektiver TNF- α Stimulation 44.9 ± 11.5 % ($n=3$) der Zellen eine positive E-Selektin Exposition an der Zelloberfläche aufwiesen. Dieser

Wert wurde durch Vorbehandlung mit HDL, SPC oder LSF um 60.1 ± 4.2 % bzw. 31.6 ± 2.7 % und 44.7 ± 11.1 % (n=3) abgesenkt. Auch in diesem Experiment konnte die Expression des ICAM nach TNF- α Stimulation an der Oberfläche nachgewiesen werden, die Suppression durch HDL, SPC und LSF jedoch blieb aus (Daten nicht gezeigt).

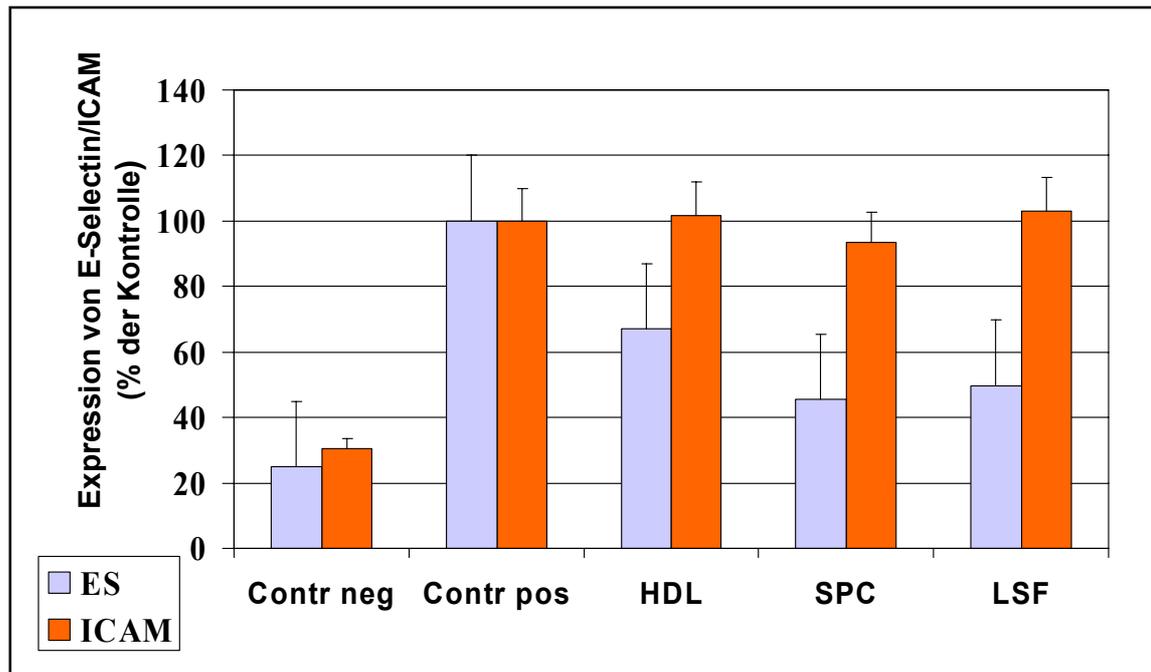


Abb. 8 Expression von E-Selektin und ICAM-1 an der Zelloberfläche von HUVECs. Die Zellen wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von HDL, SPC und LSF vorinkubiert und 6 h nach Stimulation mit TNF- α immunocytoologisch untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit E-Selektin- bzw. ICAM-1-spezifischen Antikörpern inkubiert (primäre Antikörper) und nach Entfernung des Antikörperüberschusses der Reaktion mit einem zweiten peroxidase-konjugierten Antikörper unterworfen. In Parallelkulturen wurde die Zellzahl bestimmt. Angegeben sind die Durchschnittswerte und Standardabweichung von drei Versuchen in % der Kontrolle (selektive TNF- α Stimulation) auf gleiche Zellzahlen normalisiert. (n = 3, p<0,036)

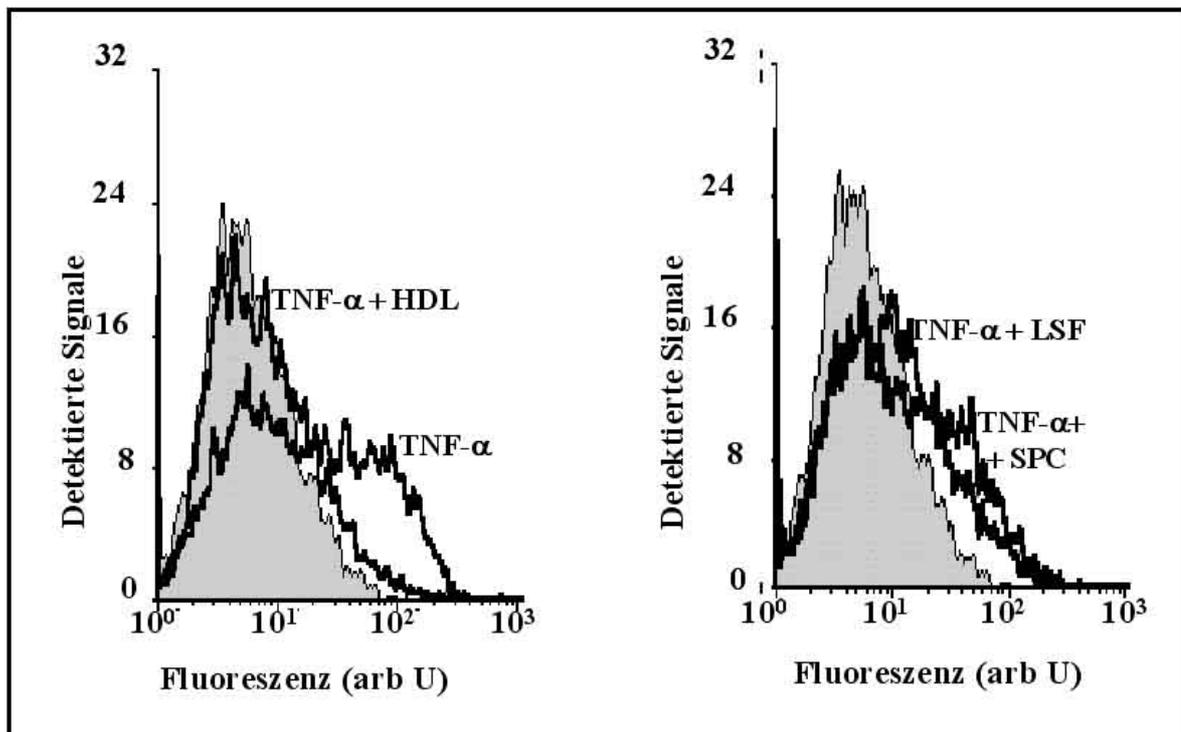


Abb. 9 Zur Bestimmung des oberflächen exponierten E-Selektins wurden die Zellen nach Vorbehandlung mit HDL bzw. LSF oder SPC und TNF- α Stimulation durch Trypsinisierung gesammelt, fixiert und durch nach Exposition gegen mit Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Antikörpern durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung analysiert. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis (n = 3).³

³ aus der Publikation Nofer et al., BBRC 310 (2003) 98-103

4.4 Reduktion der Transkription und der E-Selektin-spezifischen mRNA durch HDL, SPC und LSF

Die TNF- α Stimulation der Endothelzellen ist mit einer vermehrten Transkription der CAM-spezifischen Gene und einer Erhöhung der CAM-spezifischen mRNA assoziiert, die nach Translation zu der beobachteten Mehrsynthese des E-Selektin- und ICAM-1-Proteins führt. Dies ließ sich durch Isolierung der mRNA aus Endothelzellkulturen und nachfolgender Agarosegelelektrophorese der durch RT/PCR in Gegenwart von E-Selektin-spezifischen DNA-Primern dargestellten cDNA nachweisen. In Abb. 10 ist dies durch Abschwächung der TNF- α cDNA Bande (Kontrolle) unter Einwirkung der geprüften Inhibitoren erkennbar.

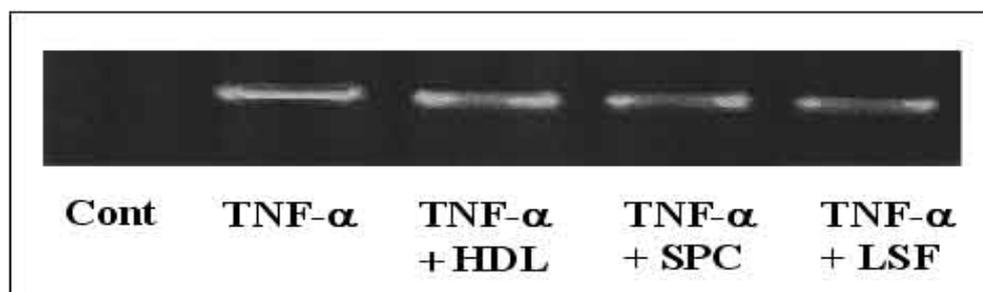


Abb. 10 Agarosegelelektrophorese E-Selektin-spezifischer mRNA. Die Gesamt-RNA wurde aus konfluenten Kulturen, die in Gegenwart oder Abwesenheit von HDL, SPC und LSF vorinkubiert und anschließend mit TNF- α stimuliert wurden, isoliert. 2 μ g der RNA wurde durch reverse Transkription in die cDNA umgeschrieben und einer Polymerasekettenreaktion in Gegenwart E-Selektin-spezifischer Oligonucleotidprimer unterworfen. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese dargestellt. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis (n = 3).

4.5 Suramin und Pertussis-Toxin heben die inhibitorische Wirkung von HDL, SPC und LSF auf

Für eine Untersuchung der intrazellulären Signalwege, über die das HDL bzw. die HDL-assoziierten Sphingolipide zu einer Hemmung der Zytokin-induzierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen verlaufen, wurden signaltransduktionsspezifische Inhibitoren eingesetzt. Nachdem bereits eine Hemmung der SPC-initiierten Signalkaskade über den EDG-3 Rezeptor durch Suramin und das Pertussis-Toxin bekannt war (Ancellin und Hla, 1999; Okamoto et al., 1999), wurden beide Inhibitoren auf die durch HDL und Sphingolipide vermittelte Hemmung der CAM Expression geprüft unter der bekannten Voraussetzung, dass Suramin (100 µg/mL) zu einer Entkopplung des EDG-Rezeptor assoziierten G-Proteins führt und dass Pertussis-Toxin (100 ng/ml) durch ADP Ribosylierung in die Regulation der G-Proteinaktivität eingreift. Durch Kontrollexperimente konnte ausgeschlossen werden, dass weder Suramin noch Pertussis-Toxin selbst die Zytokin-vermittelte Expression von Zelladhäsionsmolekülen beeinflussen. Dagegen konnte der supprimierende Effekt von HDL, SPC und LSF auf die CAM-Expression der Zelladhäsionsmoleküle durch Suramin bzw. Pertussis-Toxin aufgehoben werden. Die Abb. 11, 12 und 13 machen deutlich, dass durch die Inhibitoren Suramin und Pertussis-Toxin die durch HDL, SPC und LSF bedingte Suppression der CAM-Expression in unterschiedlicher Weise beeinflusst wird, dass jedoch der Effekt der Reversibilität der HDL-, SPC- und LSF-Hemmung in allen Fällen eindeutig ist. Das Ergebnis der CAM-spezifischen Proteinexpression unter Einwirkung von Suramin und Pertussis-Toxin ließ sich auch durch Nachweis der CAM-spezifischen mRNA sichern. Die Abb. 14 belegt dies durch die Intensität der durch entsprechende Primer auf cDNA umgeschriebenen mRNA, deren cDNA-Banden die Reversibilität der durch HDL, SPC und LSF bewirkten Hemmung durch Suramin und Pertussis-Toxin veranschaulichen.

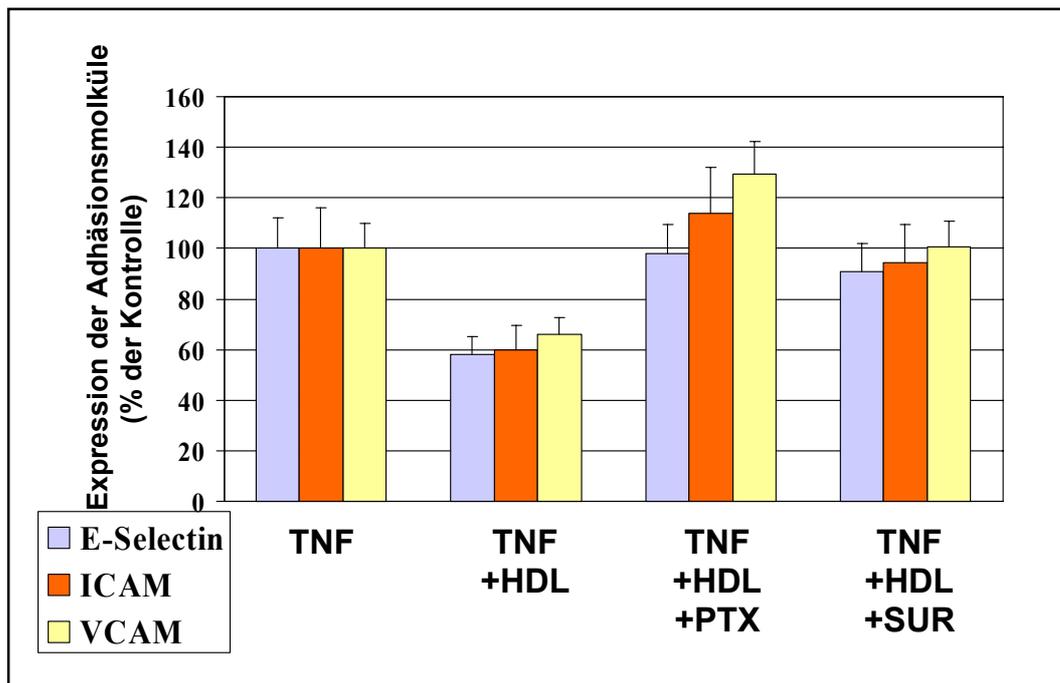


Abb. 11 Aufhebung der durch HDL gehemmten TNF- α -induzierten Stimulation der Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 durch Pertussis-Toxin (PTX) und Suramin (SUR). Versuchsbedingungen sind die gleichen wie in Abb. 5 beschrieben, jedoch wurde zusätzlich eine Vorinkubation der Zellen vor TNF- α Stimulation mit Pertussis-Toxin (100 ng/ml) für 16 h bzw. Suramin (100 μ g/ml) für 30 min. durchgeführt. Die Abb. 11 zeigt die Ergebnisse als Mittelwert und Standardabweichung von 3-5 unabhängigen Versuchen ($p < 0,036$).

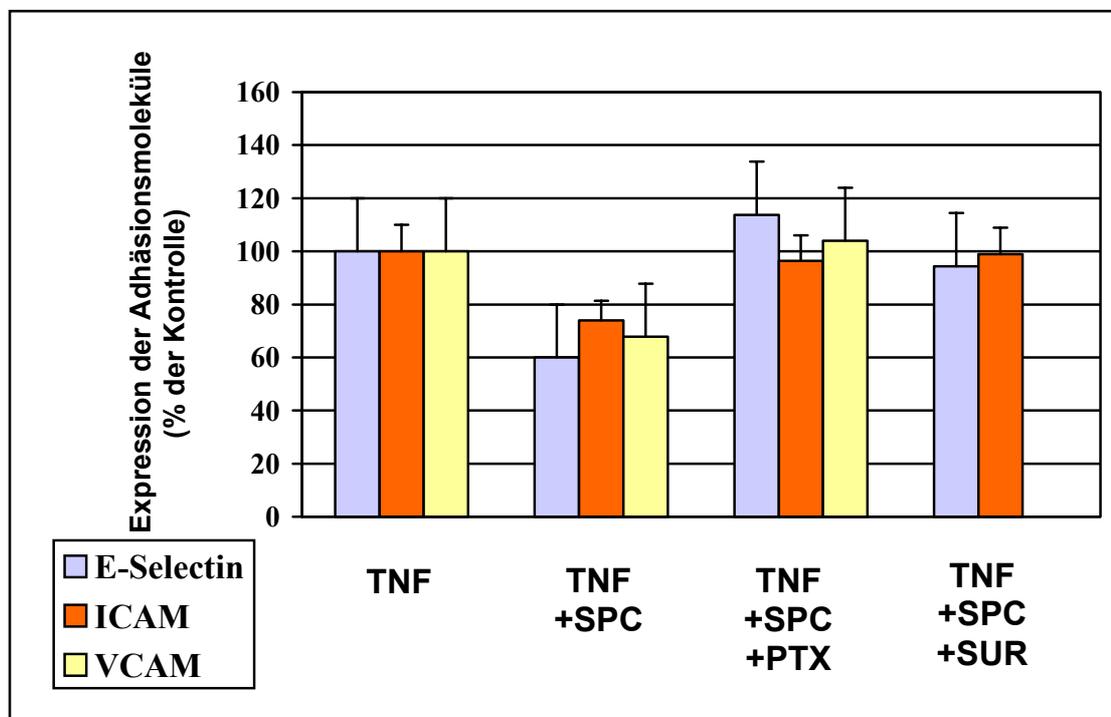


Abb. 12 Gleiche Versuchsanordnung wie in Abb. 11, jedoch Vorinkubation der Zellen mit SPC. Die potentielle Aufhebung der Suppression von VCAM-1 unter der Einwirkung von mit SPC vorinkubierten Zellen durch SUR wurde nicht untersucht. (n = 3-5, p<0,024)

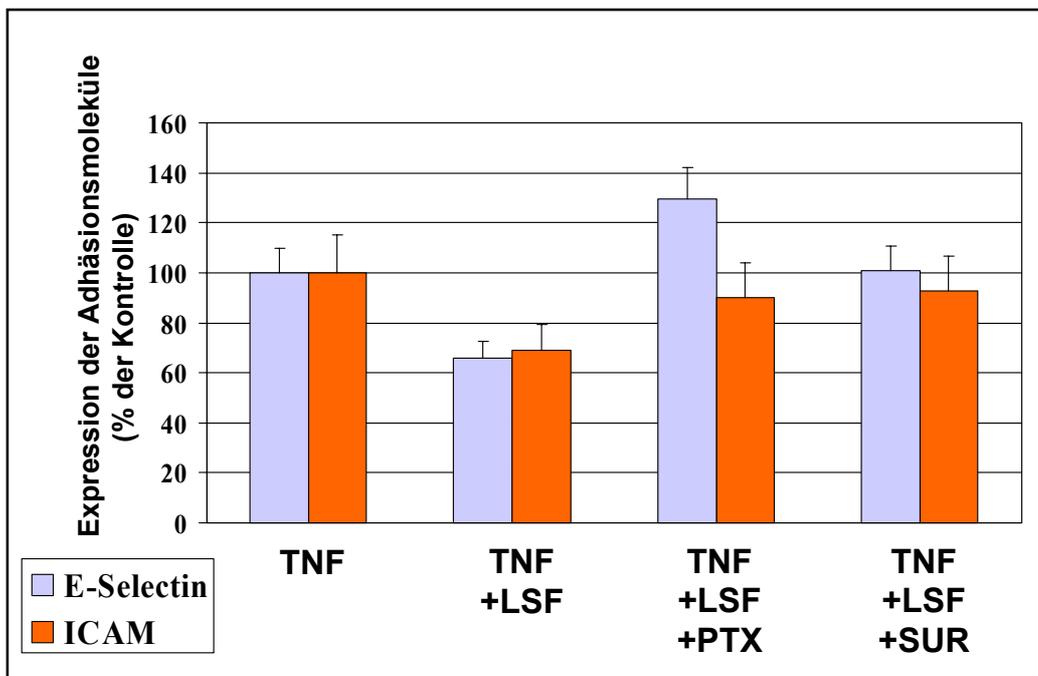


Abb. 13 Gleiche Versuchsanordnung wie Abb. 11, jedoch Vorinkubation der Zellen mit LSF. Die potentielle Suppression und ihre Aufhebung durch PTX und SUR von VCAM-1 unter der Einwirkung von mit LSF vorinkubierten Zellen wurde nicht untersucht. (n = 3-5, p < 0,03)

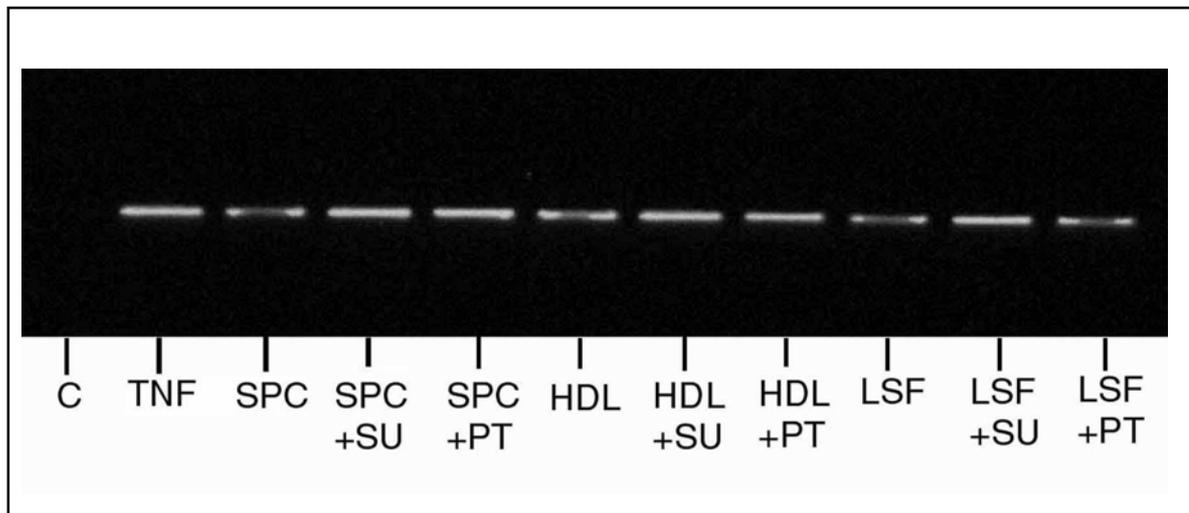


Abb. 14 Agarosegelelektrophorese der E-Selektin-spezifischen mRNA nach Umschreibung in cDNA (s. Material und Methoden bzw. Abb.10). Die in den Abb. 11-13 dargestellte Suppression des CAM-Proteins lässt sich auch für die korrespondierende mRNA durch Abschwächung bzw. Rekonstitution der Banden im Vergleich zur Positivkontrolle (TNF- α) nachweisen. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Ergebnis (n = 3).

4.6 Inhibition EDG-Rezeptor-initiiertes Signalwege

Die Ankopplung eines Liganden (HDL, SPC, LSF) an den EDG-3 Rezeptor führt einerseits zur Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol- spezifischen Phospholipase C mit Bildung von Inositol-Trisphosphat und Freisetzung von intrazellulärem ionisiertem Calcium, andererseits auch zu einer Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase, die wiederum die Proteinkinase Akt durch Phosphorylierung des Serinrestes in Position 473 aktiviert.

Signalwege der HDL/Sphingolipid-induzierten Hemmung der CAM-Expression

Die von dem G-Protein gekoppelten EDG-Rezeptor initiierte Signaltransduktion kann einerseits zu einem Anstieg der Phosphatidyl-Inositol-spezifischen Phospholipase C führen, deren Substrat das Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) zu Diacylglycerol und Inositol-3,4,5-Trisphosphat (IP3) umsetzt. Diacylglycerol setzt wiederum Ca^{2+} aus intrazellulären Calciumspeichern frei. Andererseits kann das EDG-G-Protein Rezeptorsignal die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase aktivieren, die als Substrat den Serinrest 473 der Proteinkinase Akt ATP-abhängig phosphoryliert (Abb. 15). Ein weiterer Effekt des EDG-Rezeptor-Signals ist die Hemmung der Sphingosinkinase, die intrazelluläres, aus Sphingomyelin freigesetztes oder aus einer de novo-Synthese stammendes Sphingosin in Sphingosin-1-phosphat (S-1-P) überführt (Abb. 21). S-1-P übt einen aktivierenden Einfluss auf NF- κ B aus, das direkt über den TNF- α -Signalweg die Expression der CAMs auslöst. Zur Entscheidung, welcher der genannten Signalwege zu einer Hemmung der Expression der Zelladhäsionsmoleküle führt, wurden spezifische Inhibitoren eingesetzt. U 73122 - ein 3-Methoxyestratrienderivat - hemmt die Phosphatidyl-Inositol Phospholipase C (und A), beschränkt also den enzymatischen Abbau des Phosphatidyl-Inositol Trisphosphat und die Freisetzung von Calcium Ionen. Aus Abb. 16 ist erkennbar, dass die durch HDL und die HDL-assoziierten Sphingolipide getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung, die in

Kontrollexperimenten Werte von 217 ± 21 (HDL), 233 ± 28 (SPC) und 178 ± 15 (LSF) nM erreicht, fast vollständig durch die Wirkung von U 73122 ($10 \mu\text{M}$) unterdrückt wird, die durch HDL und HDL-assoziierte Sphingolipide vermittelte Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen jedoch unbeeinflusst bleibt (Abb. 17). Daraus ist zu schließen, dass die Phosphatidyl-Inositol-spezifische Phospholipase C nicht an der Regulation der CAM-Expression beteiligt ist. Werden dagegen die Endothelzellen für 30 min. mit dem Phosphatidylinositol-3 Kinase-Inhibitor LY 294002 – ein Phenyl-Benzopyranol-Morpholiniumderivat – vorbehandelt, lässt sich die durch HDL und durch HDL Sphingolipide bedingte Hemmung der Expression von E-Selektin und ICAM vollständig aufheben (Abb. 17). Dies gilt in gleicher Weise für die durch HDL, SPC und LSF bewirkte Hemmung, die durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY 294002 nicht nur vollständig aufgehoben wird, sondern die Expressionswerte für E-Selektin über den Kontrollwert (selektive TNF- α -Stimulation) im Falle der HDL- und LSF-Hemmung sogar hinausgeht. Die Hemmung der Phosphatidylinositol-3 Kinase durch LY 294002 lässt sich auch durch die Reduktion der Akt-Phosphorylierung zeigen. Bei Polyacrylamidgelelektrophorese der durch Detergentien solubilisierten Endothelzellproteine mit nachfolgendem Western Blot und Detektion mit gegen phosphoryliertes (p-)Akt gerichteten Antikörpern findet sich bei LY 294002 vorbehandelten Zellen eine deutliche Abschwächung der p-Akt-Bande für HDL, SPC und LSF gegenüber den unter Einwirkung dieser Verbindung gefundenen Banden ohne vorherige Vorbehandlung durch LY 294002 (Abb. 18).

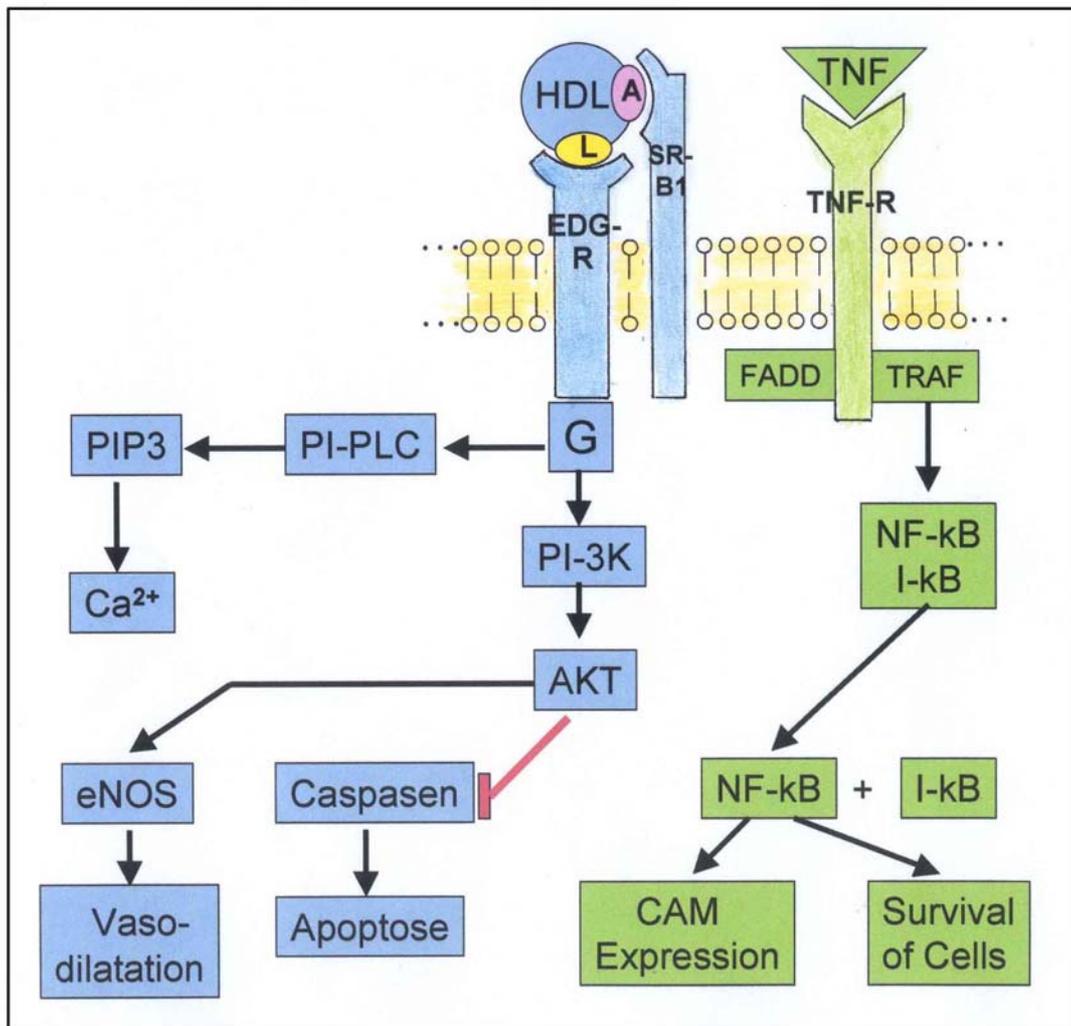


Abb. 15 Rezeptor-induzierte Signalwege vaskulärer Endothelzellen, die an der Regulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 beteiligt sind. Das endotheliale Differenzierungsgen (EDG-1, EDG-3) kodiert für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit hoher Affinität für die HDL-assoziierten Sphingolipide SPC, LSF und S-1-P. Unter den rezeptor-initiierten Signalkaskaden wurden einerseits der zur Aktivierung der Phosphatidyl Inositol-3-kinase führende Reaktionsweg zur Proteinkinase Akt und andererseits der über die Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C führende Reaktionsweg untersucht,

der über das Phosphoinositol-Trisphosphat und das daraus freigesetzte Inositol-Trisphosphat zur intrazellulären Calciummobilisierung führt. Die zweite für die Zelladhäsionsmoleküle spezifische Signalkaskade wird durch den Tumor Necrosis Factor- α initiiert, der im vaskulären Endothel die Sekretion verschiedener Cytokine in Gang setzt und an der Induktion oder Verstärkung der Expression der Zelladhäsionsmoleküle mitwirkt. Die regulierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 ist essentiell für die Rekrutierung zirkulierender Blutzellen durch das Endothel bei inflammatorischen und immunologischen Reaktionen des Gefäßgewebes. Voraussetzung für die Expression der Zelladhäsionsmoleküle ist die Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B), der aus dem NF- κ B/I- κ B Komplex durch Phosphorylierung des I- κ B an den Serinresten 32 und 36 als primäres Reaktionsprodukt freigesetzt wird und nach Translokation in den Zellkern die Expression der Zelladhäsionsmoleküle steuert. Die Frage wie bzw. über welche molekularen Mechanismen die durch den EDG-Rezeptor und den TNF-Rezeptor ausgelösten Signalwege miteinander vernetzt sind, ist bisher nicht geklärt.

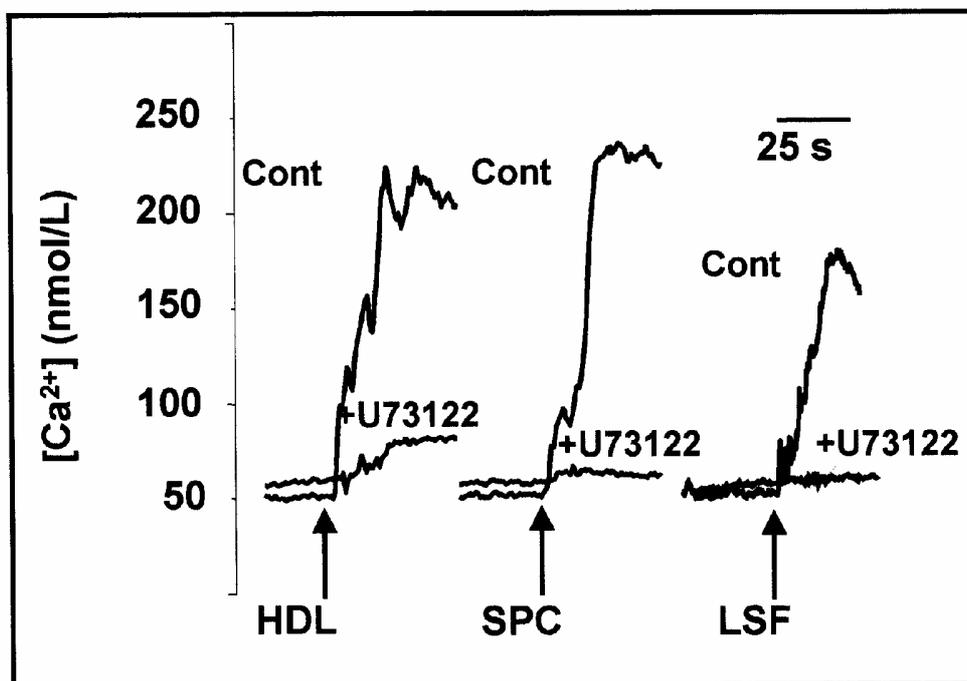


Abb. 16 Freisetzung von ionisiertem Calcium aus intrazellulären Depots durch HDL, SPC und LSF. Die Zellen wurden zunächst mit Fura-2-AM aufgeladen und für 30 min. in Gegenwart oder Abwesenheit des Inhibitors U 73122 (10 μ M) behandelt. Nach Exposition mit HDL (1 g/L), SPC (10 μ M) oder LSF (20 μ M) wurde die Fluoreszenz gemessen. Die Abb. zeigt ein repräsentatives Experiment (n = 4).⁴

⁴ aus der Publikation Nofer et al., BBRC 310 (2003) 98-103

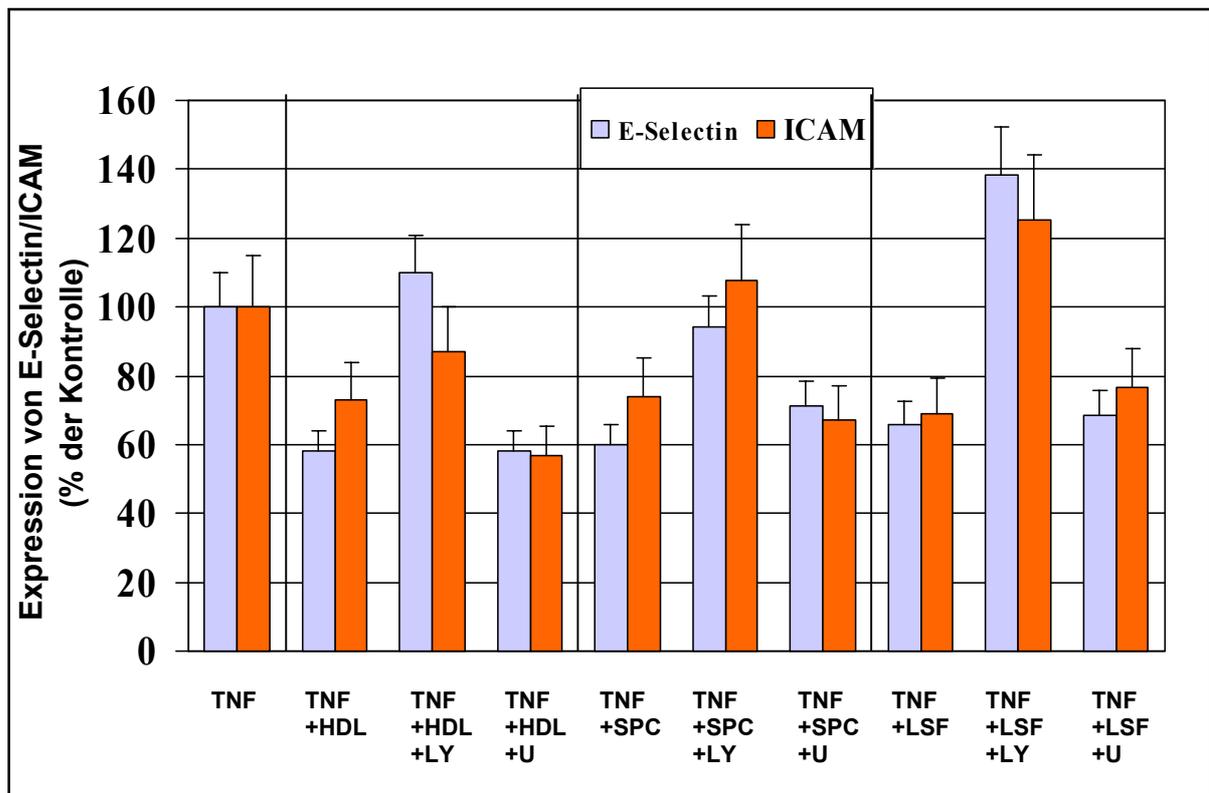


Abb. 17 Einfluss der Enzyminhibitoren U 73122 (10 μ M) und LY 294002 (20 μ M) auf die Cytokin-induzierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1. Die Versuchsbedingungen entsprechen den Angaben für die Abb. 11, 12 und 13. Die Messwerte sind in % der Kontrolle ausgedrückt, da die Stimulation durch TNF- α (Kontrolle) für E-Selektin und ICAM-1 unterschiedliche Maximalwerte ergibt. (n = 3, p < 0,027)

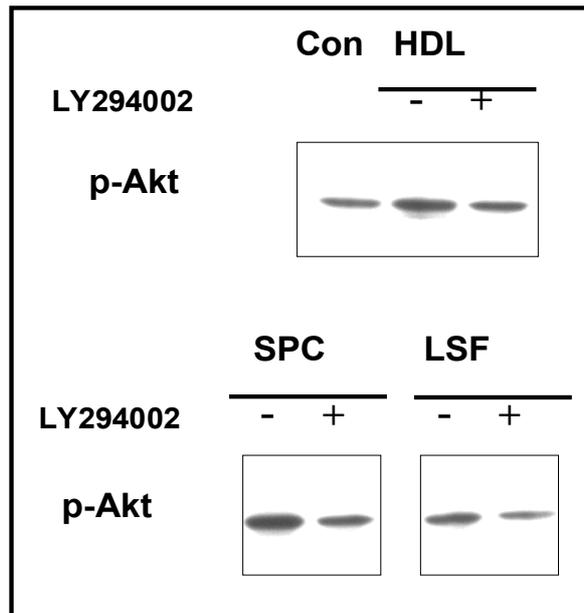


Abb. 18 Nachweis und Ausprägung des durch die Phosphatidylinositol-3-kinase phosphorylierten Akt durch Western Blot Analyse. Die Zellen wurden für 20 min. in Gegenwart oder Abwesenheit des Inhibitors LY 294002 vorbehandelt und dann der Wirkung von HDL, SPC und LSF ausgesetzt. Die danach gewonnenen Zelllysate wurden einer SDS Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und die Western Blot Analyse wurde unter Einsatz von Antikörpern durchgeführt, die gegen den Phosphoserinrest 437 der Protinkinase Akt (p-Akt) gerichtet waren. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für die Aussage, dass der Proteaseinhibitor LY 294002 die Phosphorylierung von Akt supprimiert.⁵

⁵ aus der Publikation Nofer et al., BBRC 310 (2003) 98-103

4.7 Vernetzung der EDG- und TNF- α -Rezeptor-abhängigen Signalwege

Da die Expression von Zelladhäsionsmolekülen eine Translokation des aktivierten NF- κ B in den Zellkern voraussetzt, wurde in einer weiteren experimentellen Serie geprüft, ob der EDG-Rezeptor-induzierte Signalweg die Translokation des NF- κ B in den Zellkern beeinflusst. Dazu wurden die Endothelzellen nach Vorbehandlung mit SPC bzw. LSF durch TNF- α stimuliert und die Veränderungen des NF- κ B-Gehaltes im Kern der Endothelzellen gemessen. Die Endothelzellen wurden hierfür durch einen hypoosmotischen Schock lysiert und die durch differentielle Zentrifugation gewonnenen Zellkerne nach sorgfältigem Waschen extrahiert und der gewonnene Zellkernextrakt durch ein gegen die p65 Komponente des NF- κ B gerichtetes spezifisches Immundetektionsystems untersucht. Dabei zeigte sich, dass SPC und LSF zu einer Reduktion des NF- κ B-Gehaltes im Zellkern führen und diese Reduktion sich vollständig nach zusätzlicher Vorbehandlung der Zellen durch den Inhibitor LY 294002 aufheben lässt (Abb. 19). In Kontrollexperimenten zeigte sich, dass auch in nicht TNF- α stimulierten Endothelzellen NF- κ B im Zellkern nachweisbar ist und dieser Basiswert bei Berechnung der Reduktionsraten des Zellkern-NF- κ B-Gehaltes zu berücksichtigen ist.

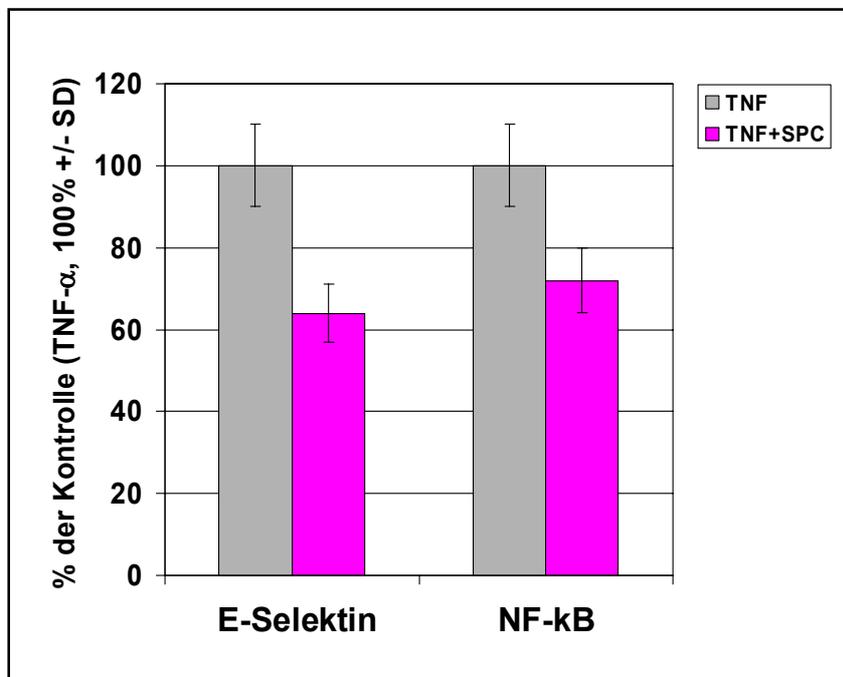


Abb. 19 Suppression des E-Selektin und der nukleären Fraktion des NF-κB durch Sphingosinphosphorylcholin (SPC) nach TNF- α -Stimulation von vaskulären Endothelzellen. Die Kontrollwerte (100%) für E-Selektin betragen $16,8 \pm 1,72$ ng/ 10^5 Zellen, für NF-κB wurden relative Werte angegeben, die sich auf das aus den isolierten Zellkernen extrahierte NF-κB beziehen. (n = 3, p<0,02)

5.0 Diskussion

Die Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der endothelialen Oberfläche des arteriellen Gefäßsystems ist ein wesentliches Merkmal inflammatorischer Phasen in der Pathogenese der Arteriosklerose. Die proinflammatorischen Zytokine wie der Tumor Necrosis Faktor α (TNF- α) und das Interleukin-1 (IL-1), die von den glatten Muskelzellen der Arterie oder von residenten, in die Zonen arteriosklerotischer Plaques einwandernden Monocyten/Makrophagen stammen, erreichen die vaskulären Endothelzellen als primäres Zielorgan und führen zu einer Rekrutierung und Akkumulierung mononukleärer Zellen des Blutstroms im Bereich arteriosklerotischer Läsionen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse zeigen an kultivierten humanen Endothelzellen, dass die durch den Tumor Necrosis Faktor- α induzierte Expression von den Zelladhäsionsmolekülen E-Selektin, ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule) und VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) durch Lipoproteine hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL) bzw. durch HDL-assoziierte Lysosphingolipide supprimiert werden kann. Die erhobenen Daten zeigen weiterhin, dass diese Suppression über eine durch Interaktion des HDL bzw. der HDL-assoziierten Lysosphingolipide mit dem G-gekoppelten EDG-Rezeptor (Endothelial Differentiation Gen-Rezeptor) initiierte Signalkaskade zustande kommt, an der die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die S/T-Proteinkinase Akt beteiligt sind. Grundlage und Voraussetzung der vorliegenden experimentellen Arbeiten war die Identifizierung der Sphingolipide Sphingosinphosphorylcholin (SPC), Sphingosinalaktosyl-3-sulfat (Lysosulfatid, LSF) und Sphingosin-1-phosphat (S-1-P) als regelmäßige Lipidbestandteile der Lipoproteine hoher Dichte. Die genannten Lysosphingolipide waren bereits als Liganden des EDG-Rezeptors bekannt.

5.1 Expression von Zelladhäsionsmolekülen in Abhängigkeit von Konzentration, Apolipoprotein- und Lipidgehalt des Serum-HDL

Die hier vorgelegten Ergebnisse führen zu einem besseren Verständnis des positiven Einflusses von HDL auf die endotheliale Funktion und da arterioskleroseprotektive Wirkung des HDL. Dies wird durch Untersuchungen belegt, die zeigen, dass niedrige HDL-Spiegel des Serums zu einer Zunahme der Konzentration der löslichen VCAM-1 und ICAM-1 Sheddingprodukte führen und ebenso ein höherer Gehalt an oxidiertem HDL auch zu einem höheren Gehalt von löslichem VCAM-1 führt (Lupatelli et al., 2003). Auch eine Hyperglykämie als Ausdruck einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels führt zu einem Anstieg des löslichen E-Selektin und VCAM-1 im Plasma und reflektiert damit die Tendenz zur Bildung arteriosklerotischer Plaques bei gestörter Regulation des Glucosestoffwechsels (Kowalska et al., 2002). Ebenso war das Risiko normolipidämischer Kinder aus Familien mit einem hohen Arterioskleroserisiko auf Grund einer Erhöhung des löslichen ICAM-1-Spiegels im Serum signifikant höher als bei Kontrollkollektiven (Wojakowski und Giminski, 2001). Weitere Studien, in denen eine signifikant höhere Konzentration des löslichen ICAM-1 und des E-Selektins bei Individuen mit geringen HDL-Spiegeln (Calabresi et al., 2002) bzw. eine Reduktion der cytokin-aktivierten VCAM-1 Expression durch HDL im Tiermodell gefunden wurde, belegen die Bedeutung der Zelladhäsionsmoleküle für die Atherogenese und akute atherothrombotische Effekte (Dimayuga et al., 1999).

Einige Studien über die Suppressionswirkung des HDL auf die Cytokin-induzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen kommen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Studie an humanen Endothelzellen der Aorta zeigte sich, dass natives HDL oder HDL, das durch Zusatz mit Apo-A1 und PLPC (1-Palmitoyl-2-Oleyl-sn-glycero-3-phosphocholin oder 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) für 16 h inkubiert war, keine signifikante Hemmung der TNF- α -induzierten CAM-spezifischen mRNA und des Proteins aller 3

Zelladhäsionsmoleküle (E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1) bewirkte. Lediglich das mit dem mehrfach ungesättigten PLPC rekonstituierte HDL zeigte eine geringfügige Hemmung der VCAM-1 Expression ($29.9 \pm 9.1\%$) (Zhang et al., 2002). In einer vorangehenden Studie war auch für humane koronare Endothelzellen durch FACS-Analyse gezeigt worden, dass durch eine Aktivierung mit dem proinflammatorischen Tumor Necrosis Faktor- α kein Hemmeffekt des HDL auf die Expression von VCAM-1 oder E-Selektin beobachtet werden konnte. Zudem konnte auch der Befund, dass HDL eine Suppression der CAM-Induktion an HUVECs (Humane umbilicale Venenendothelzellen) auslöst, nicht bestätigt werden (Stannard et al., 2001). Andere Untersuchungen mit rekonstituiertem HDL, bei denen verschiedene Phosphatidylcholinspezies eingesetzt wurden, die als Fettsäure Palmitinsäure (ADPPC), Arachidonsäure (PAPC), Linolsäure (PLPC) oder Ölsäure (POPC) enthielten, führten zu dem Ergebnis, dass rekonstituiertes HDL, das PLPC und PAPC enthielt, die VCAM- Expression Zytokin-aktivierter umbilicaler Venenendothelzellen zu 95 bzw. 70% hemmte (Baker et al., 2000). Auch eine mögliche Bedeutung des Apolipoprotein-A-1 für die HDL Suppression der Cytokin-induzierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder das lipidfreie Apolipoprotein-A-1 noch die ausschließlich Phospholipid enthaltenden Vesikel einen Hemmeffekt ausüben, jedoch die diskoidalen Prä- α -Komplexe, die mit Phospholipid und Apo-A-1 vorinkubiert waren, auch zu einer Suppression der Cytokin-induzierten Expression fähig waren (Baker et al., 1999). Weitere Untersuchungen stellten nicht nur fest, dass die HDL-Fraktionen, die von verschiedenen menschlichen Individuen isoliert wurden, nicht nur außerordentlich unterschiedliche Suppressionseffekte auf HUVECs ausübten, sondern dass auch die Aktivität der HDL Fraktion-2 und HDL-3 Differenzen aufwiesen, wobei stets die inhibitorische Aktivität der HDL-3 Fraktion derjenigen von HDL-2 überlegen war (Ashby et al., 1998). Bei Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der Hemmung von VCAM-1 Expression durch HDL ergab sich, dass das Ausmaß der Hemmung mit zunehmender Präinkubation der Endothelzellen (HUVECs) bis zu 16 h progressiv zunahm und für die Hemmung

durch das mit Apo-A-1 und Dimyristoylphosphatidylcholin rekonstituierte HDL auch nicht während der Aktivierungsphase durch TNF- α anwesend sein musste. Die Hemmung war auch dann noch vorhanden, wenn das rekonstituierte HDL nach 16 h Vorinkubation 8 h vor Zugabe des TNF- α aus dem Medium entfernt wurde (Clay et al., 2001).

5.2 Rezeptorabhängige Signalkaskade nach Interaktion des Rezeptors mit HDL bzw. Lysosphingolipiden

Die in Abb. 15 dargestellten EDG-Rezeptor-abhängigen Signalwege wurden durch Einsatz spezifischer Inhibitoren partiell blockiert (Abb. 11-13 und Abb. 17), um weitere Einblicke in die Vernetzung der EDG-Rezeptor- und TNF- α -Rezeptor-initiierten Signalwege zu erhalten und Rückschlüsse auf die Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen durch HDL und die HDL-assoziierten Sphingolipide zu erhalten. Die Auswertung der Inhibitionsversuche ist in Abb. 20 dargestellt. Das aus *Bordetella pertussis* isolierte Pertussis-Toxin katalysiert die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten von Heterotrimeren durch Guanidinnukleotide regulierten G-Proteinen. Dies verhindert eine Interaktion der G-Proteinheterotrimeren mit dem EDG-Rezeptor und blockiert dadurch die Kopplung und Aktivierung des EDG-Rezeptors. Da die G- α -Untereinheiten dabei an GDP gebunden bleiben, ergibt sich ein inaktiver Status des EDG-Rezeptors und eine Blockierung der EDG-Rezeptor-initiierten Signalwege. Die durch HDL bzw. die HDL-assoziierten Lysosphingolipide ausgelöste Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen bleibt daher unter der Wirkung des Pertussis-Toxins aus, ebenso wie unter Suramin. Das 2 Sulfatgruppen enthaltende anionische Suramin entkoppelt die Rezeptor-assoziierten G-Proteine und hat weitere inhibitorische Wirkungen durch Hemmung der Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), des PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und des Tumor Necrosis Faktor- α an die spezifischen Rezeptoren. Das Suramin hat damit eine duale

Wirkung auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, da es einerseits die Wirkung des HDL bzw. der HDL-assoziierten Sphingolipide durch Entkopplung des G-Proteins und andererseits die Bindung des TNF- α an den TNF- α -Rezeptor verhindert und dadurch zu einer zusätzlichen Blockierung der TNF- α -abhängigen Expression von Zelladhäsionsmolekülen führt. Die für die weiteren Inhibitionsversuche eingesetzten synthetischen Verbindungen U 73122 und LY 294002 sind Enzyminhibitoren. Während das U 73122 die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) hemmt, richtet sich die inhibitorische Wirkung des LY 294002 gegen die Phosphatidylinositol-3-kinase. Die unterschiedlichen Effekte dieser beiden Inhibitoren auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen lässt keinen eindeutigen Rückschluss auf den Mechanismus der durch HDL bzw. die HDL-assoziierten Lysosphingolipide induzierten Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen zu. Während der Inhibitor U 73122 keinen Einfluss auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen zeigt, wird die HDL- bzw. SPC-, LSF-induzierte Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen durch LY 294002 aufgehoben (Abb. 17). Da LY 294002 die Phosphatidylinositol-3-kinase, die die Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase Akt phosphoryliert, inhibiert, lässt sich folgern, dass dieser Reaktionsschritt (Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473) eine der notwendigen Voraussetzungen für eine teilweise Unterdrückung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen darstellt (Abb. 20). Es ist weiterhin aus unseren experimentellen Ergebnissen zu folgern, dass zwischen den EDG-Rezeptor- und TNF- α -Rezeptor-initiierten Signalwegen Wechselbeziehungen bestehen müssen. Da die Expression der Zelladhäsionsmoleküle von einer Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B) abhängt, muss weiterhin vermutet werden, dass Akt eine Aktivierung des NF- κ B inhibiert (s. 5.4).

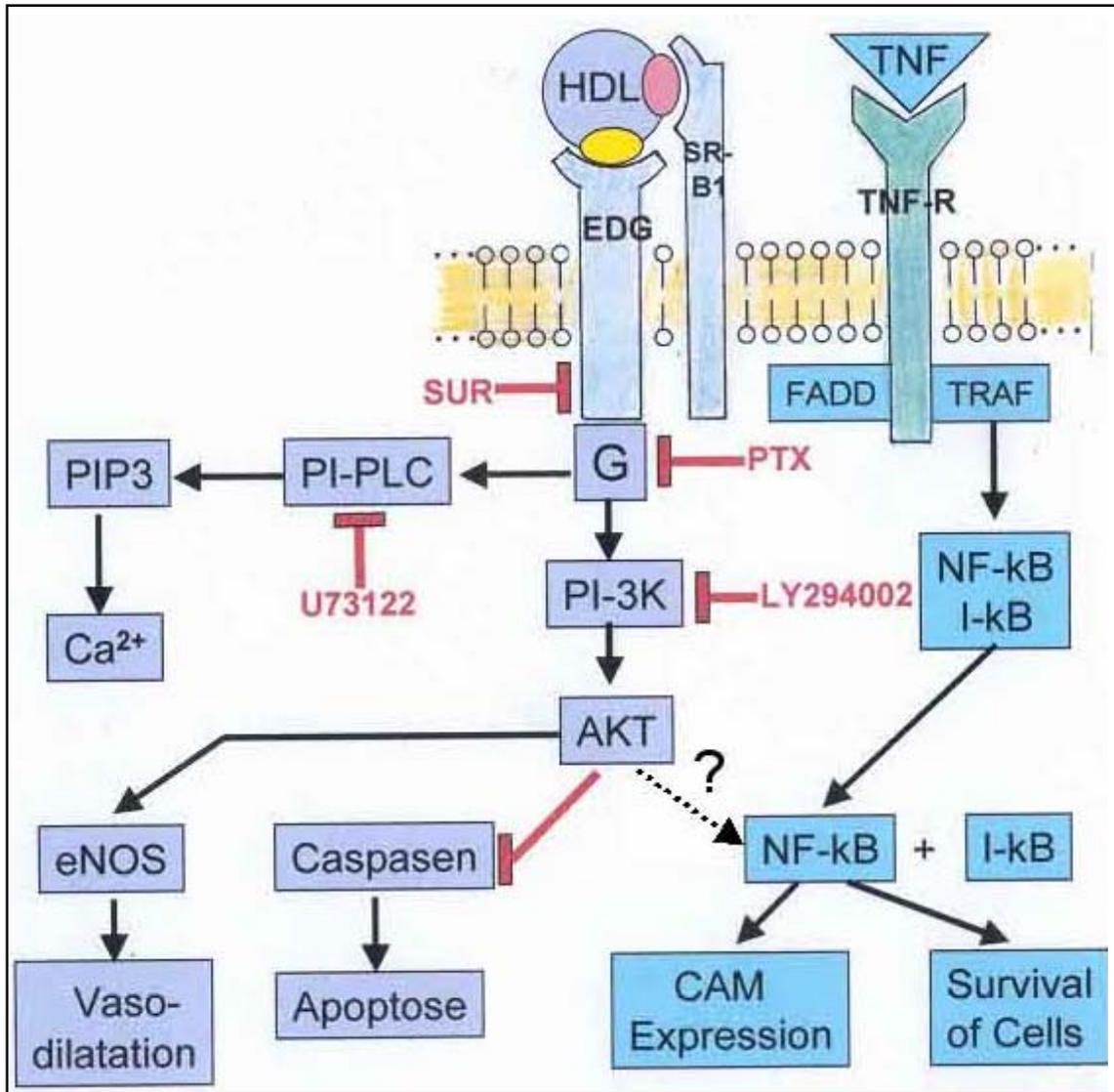


Abb. 20 Rezeptor-induzierte Signalwege vaskulärer Endothelzellen, die an der Regulation der Expression von Zelladhäsionsmolekülen E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 beteiligt sind. Ausführliche Erklärungen stehen in der Legende von Abb. 15. Ergänzend sind in dieser Abbildung die Angriffspunkte der einzelnen Inhibitoren, die im Laufe der Versuchsreihen eingesetzt worden sind,

eingezeichnet. Suramin (SUR) führt zu einer Entkopplung des EDG-Rezeptor-assoziierten G-Proteins, das Pertussis-Toxin (PTX) greift durch Ribosylierung in die Regulation der G-Proteinaktivität ein, U73122 - ein 3-Methoxy-estratrienderivat - hemmt die Phosphatidylinositol Phospholipase C, indem es den enzymatischen Abbau des Phosphatidylinositol-Trisphosphat und die Freisetzung von Calcium Ionen beschränkt und LY 294002 – ein Phenyl-Benzopyranol-Morpholiniumderivat – hemmt die Phosphatidylinositol-3 Kinase (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis).

HDL und die HDL-assoziierten Lysosphingolipide entfalten ihre Wirkung über Pertussis-Toxin-sensitive trimere G-Proteine. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen verläuft nach dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen über eine G-Protein-induzierte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die wiederum eine Aktivierung der Proteinkinase Akt durch Phosphorylierung auslöst. Diese Signalsequenz kann durch den Inhibitor LY 294002 unterbrochen werden. Vorangehende Studien haben bereits gezeigt, dass über den Phosphorylinositol-3-Kinase/Akt Signalweg es zu einer Hemmung von Caspasen und antiapoptotischer Wirkung kommt (Fukushima et al., 2001; Nofer et al., 2001), und dass über den gleichen Stoffwechselweg die endotheliale konstitutionelle NO-Synthase durch Phosphorylierung aktiviert wird und die durch HDL ausgelöste Vasodilatation erklärt. Ein weiterer vom trimeren G-Protein ausgehender Signalweg verläuft über die Phosphorylinositol-spezifische Phospholipase C, die durch Freisetzung von Phosphatidylinositol-trisphosphat intrazelluläres Calcium mobilisiert (Kimura et al., 2001). Dieser durch U 73122 hemmbare Signalweg führt jedoch nicht zu einer Veränderung des PI-3-K/Akt Signalweges (Abb. 20).

5.3 TNF- α -induziertes NF- κ B Signaling

Der transmembranöse TNF- α -Rezeptor ist in seiner cytosolischen Domäne mit verschiedenen Proteindomänen assoziiert. Dazu gehören die intrazellulären Signalproteine wie das Receptor-Interacting Protein (RIP) und die Adapterproteine, das TNF- α -Receptor-associated Death Domain Protein (TRADD), das FAS-associated Death Domain Protein (FADD) und der TNF- α -Receptor-associated Factor-2 (TRAF-2). Nach Bindung des Cytokins TNF- α an den Rezeptor wird zunächst eine NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) aktiviert, die wiederum die I κ B-Kinase (IKK ist ein Heterotrimeres mit den Kinaseuntereinheiten alpha, beta und der regulatorisch wirkenden Adapteruntereinheit gamma) phosphoryliert. Die IKK phosphoryliert dann die α -Untereinheit des I κ B (Inhibitor des κ B), das mit den Untereinheiten p50 und p65 des NF- κ B einen Komplex bildet. Durch die Phosphorylierung der I κ B α -Untereinheit löst sich der Komplex und das NF- κ B liegt in freier aktiver Form im Cytosol vor. Für die biologische Wirkung muss die p65-Untereinheit des NF- κ B am Serin 276 phosphoryliert werden (Okazaki et al., 2003). Das NF- κ B kann jedoch seine Wirkung erst dann entfalten, wenn es durch Translokation in den Zellkern gelangt, wo es durch Bindung an Promotoren verschiedener Gene, zu denen auch die der Zelladhäsionsmoleküle gehören, effektiv wird.

5.4 Vernetzung der EDG-Rezeptor- und TNF- α -Rezeptor-initiierten Signalwege

Die Expression der Zelladhäsionsmoleküle an der Endotheloberfläche wird durch TNF- α und den dadurch aktivierten NF- κ B Signalweg gesteuert. Da dieser Signalweg durch den HDL-aktivierten PI-3K/Akt Signalweg abgeschwächt werden kann, muss auf eine Vernetzung beider Signalwege geschlossen werden. Eine solche Wechselbeziehung zwischen NF- κ B und dem phosphoryliertem Akt ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, bei denen jedoch einerseits eine Downregulation des NF- κ B durch Akt, andererseits jedoch wieder eine Regulation der Akt-Aktivität durch NF- κ B beschrieben wird. So ließ sich nachweisen, dass eine Inaktivierung des NF- κ B durch Genistein durch den Akt-Signalweg vermittelt wird (Gong et al., 2003). In einer anderen Studie konnte zwar gezeigt werden, dass Plasma-HDL die Bindung von NF- κ B an das Aktivatorprotein-1 (AP-1) verhindert, jedoch wurde die Beziehung zum PI-3-Kinase/Akt-Weg nicht untersucht (Park et al., 2003). Einen Einfluss des HDL auf die Translokation oder DNA-Bindung von NF- κ B oder eine Änderung in der Kinetik des Abbaus und der Resynthese des Inhibitors I- κ B konnte in einer anderen Studie jedoch nicht bestätigt werden (Cockerill et al., 1999). Eine NF- κ B-Aktivierung ist auch durch oxLDL möglich, wobei gleichzeitig reaktiver Sauerstoff gebildet wird und das I- κ B abbauende Proteasom aktiviert wird. Beide Prozesse ließen sich durch HDL hemmen (Robbesyn et al., 2003).

Eine Reihe weiterer Untersuchungen kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass umgekehrt das aktivierte NF- κ B wiederum die Akt-Phosphorylierung stimuliert und dass auch eine Hemmung der PI-3-Kinase nicht die Fähigkeit des NF- κ B, die Akt-Expression zu stimulieren, verhinderte (Meng und D`Mello, 2003). Weiterhin konnte durch Versuche mit dem spezifischen β 1-Antagonisten Celiprolol gezeigt werden, dass NF- κ B die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase über PI-3-

Kinase und phosphoryliertes Akt steuert (Kobayashi et al., 2003). Ebenso wurde demonstriert, dass NF- κ B seine proapoptotische Rolle in TNF- α -stimulierten Hepatocyten über eine Blockierung des PI-3-Kinase/Akt Signalweges entfaltet (Osawa et al., 2003). NF- κ B war auch verantwortlich für Überlebenssignale und Hemmung der Apoptose in Mesangiumzellen, indem es den PI-3-Kinase/Akt Signalweg aktivierte (Shimamura et al., 2003).

Keine Beziehung zwischen dem PI-3-Kinase/Akt Signalweg und dem TNF- α aktivierten NF- κ B wurde dagegen an TNF- α oder IL-1 aktivierten humanen Endothelzellen festgestellt, bei denen zwar eine Aktivierung des PI-3-K/Akt-Signalweges und eine Hemmung der Apoptose, jedoch keine Aktivierung des NF- κ B nachgewiesen werden konnte (Madge und Pober, 2000). Es wurde der Schluss gezogen, dass der antiapoptotische Effekt, den Akt entfaltet, unabhängig von NF- κ B erfolgt und dass der PI-3-Kinase/Akt Stoffwechselweg keine bedeutende Rolle in den durch TNF- α ausgelösten proinflammatorischen Reaktionen von Endothelzellen spielt (Madge und Pober, 2000).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass zwischen der durch HDL und SPC ausgelösten Suppression der Expression und Exposition von CAMs einerseits und der Reduktion des nukleären NF- κ B eindeutige Beziehungen bestehen. Dies geht aus den Daten der Abb. 19 klar hervor, die einen analogen Reduktionseffekt für E-Selektin und nukleäres NF- κ B zeigen. Dies Ergebnis ist mit der Schlussfolgerung vereinbar, dass die durch SPC initiierte Signalkaskade über eine Aktivierung der PI-3-K und Proteinkinase Akt die Translokation des NF- κ B in den Zellkern steuert und so eine Suppression der NF- κ B-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen bewirkt, wobei der Angriffspunkt der Proteinkinase weiterhin ungeklärt bleibt.

Die Freisetzung des NF- κ B und dessen Lokalisation in den Zellkern unterliegen zweifellos weiteren Regulationsmechanismen durch exogene und endogene Faktoren. Dazu gehört u.a. das Sphingosin-1-phosphat (S-1-P), das als exogener,

aus den Thrombozyten freigesetzter Wirkstoff, als Ligand des EDG-Rezeptors erkannt wurde, aber auch innerhalb der Endothelzellen im Rahmen des Sphingosinstoffwechsels entstehen kann. S-1-P wird durch Phosphorylierung des Sphingosins unter katalysatorischer Wirkung des Sphingosin-Kinase (Sph-Kinase) gebildet. Dies geschieht über Aktivierung des TNF- α -Rezeptors und dessen Interaktion mit den Adapterproteinen TRADD mit TRAF2, wodurch die Sphingosin-Kinase aktiviert wird und so Sphingosin zu S-1-P phosphoryliert wird. S-1-P bewirkt als Second Messenger über eine NF- κ B-Aktivierung die Expression der Adhäsionsmoleküle. Die Wirkung des S-1-P kann durch Hemmung der Sph-Kinase mit Hilfe des DMS (N,N-Dimethylsphingosin) aufgehoben werden (Xia et al., 1998).

Aber auch die Sphingomyelinase wird über den TNF- α -Rezeptor, diesmal interagiert TRADD mit FADD, aktiviert, was die Metabolisierung des Ceramids fördert. Ceramid selbst induziert die Apoptose und hat eine Rolle in der Apoptosesignalisierung inne (Hannun und Obeid, 1995; Testi, 1996; Obeid et al., 1993; Jarvis et al., 1994; Jayadev et al., 1994; Sweeney et al., 1996), dient aber nicht als Second Messenger auf Stimulation des NF- κ B. Es wird aber ein indirekter Einfluss diskutiert. Ceramid kann weiter per Ceramidase zu Sphingosin und Sphingosin per Sph-Kinase zu S-1-P metabolisiert werden. Dies resultiert in einem zusätzlichen Anstieg der S-1-P-Spiegel (Spiegel und Merrill, 1996) und damit nach NF- κ B Aktivierung und Translokation in der Expression der Adhäsionsmoleküle.

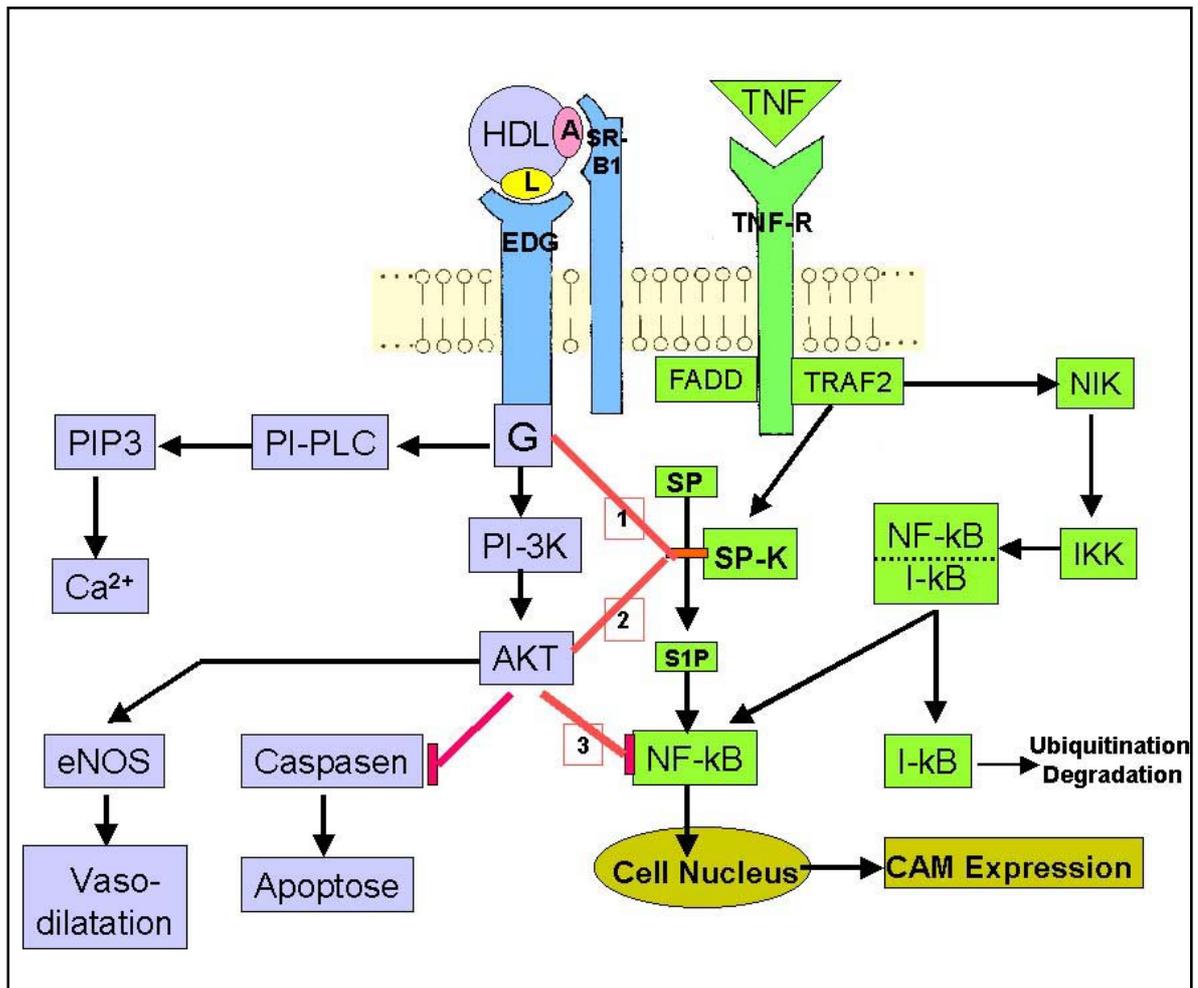


Abb. 21 Synergismus und Antagonismus der vom EDG-Rezeptor und TNF- α Rezeptor initiierten Signalwege (SP= Sphingosin, die übrigen Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis 6.0).

Das NF- κ B kann auch über I- κ B aktiviert werden. Nach Bindung des Cytokins TNF- α an den Rezeptor wird nach Ankettung von intrazellulären Signalproteinen, wie RIP und die Adapterproteine (TRADD und TRAF2), zunächst eine NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) aktiviert, die wiederum die I κ B-Kinase (IKK ist ein Heterotrimeres mit den Kinaseuntereinheiten alpha, beta und der regulatorischen Adapteruntereinheit gamma) phosphoryliert. Die IKK phosphoryliert dann die α -Untereinheit des I κ B (Inhibitor des κ B), der mit den Untereinheiten p50 und p65 des NF- κ B einen Komplex bildet. Durch die Phosphorylierung der I κ B α -Untereinheit löst sich der Komplex und das NF- κ B liegt in freier aktiver Form im Cytosol vor. Für die biologische Wirkung muss die p65-Untereinheit des NF- κ B an Serin 276 phosphoryliert werden. All dies Wege führen letztendlich zu einer Translokation des NF- κ B in den Zellkern, wo es durch Bindung an Promotoren verschiedener Gene effektiv wird und so seine Wirkungen ausüben kann.

Die Abbildung 21 zeigt theoretische Angriffspunkte (1, 2 und 3), die durch den EDG-Rezeptor und dessen an der Signalkaskade beteiligten Kinasen inhibiert werden könnten. Die Inhibition der Sph-Kinase (1) durch HDL wurde in der Literatur von Xia (1999) beschrieben. Nach Erkenntnissen dieser Arbeit läuft die Inhibition der Translokation aber erst über den NF- κ B/Akt-Signalweg. Ob diese Hemmung durch inhibitorische Effekte des Akt direkt auf das NF- κ B (3) oder auf die Sph-Kinase und damit auf den Sphingosinstoffwechsel (2) – dies würde den eigenen und den von Xia beschriebenen Ergebnissen entsprechen – ausübt, muss aber bis zum jetzigen Zeitpunkt unbeantwortet bleiben.

5.5 Schlussfolgerungen

Die vorgelegten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der antiinflammatorische und antiatherosklerotische Effekt der antagonistisch wirkenden HDL und HDL-assoziierten Lysosphingolipide durch eine Konkurrenz der Cytokin (TNF- α)-induzierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen und der HDL/Lysosphingolipid-induzierten Signalkaskade zustande kommt. Die Konkurrenzsituation beider Signalwege drückt sich darin aus, dass die von HDL/HDL-Lysosphingolipid gesteuerte, über den endothelialen Differenzierungsrezeptor (EDG-Rezeptor) ausgelöste Signalkaskade über Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase und Phosphorylierung der Protease Akt die Translokation des NF- κ B in den Zellkern und damit die Expression von Zelladhäsionsmolekülen supprimiert, während der TNF- α -initiierte Signalweg durch Freisetzung des NF- κ B aus dem NF- κ B-I- κ B Komplex die Translokation in den Zellkern fördert und damit zu einer verstärkten Expression von Zelladhäsionsmolekülen und einer vermehrten Rekrutierung von mononukleären Blutzellen in die arterielle Gefäßwand/die arterielle Plaque führt. Der Nettoeffekt der konkurrierenden EDG- und TNF- α Signalkaskaden wird mithin dadurch bestimmt, in welchem Ausmaß der HDL-initiierte EDG-Signalweg die Translokation des NF- κ B in den Zellkern verhindert. Dies erklärt auch die in klinischen Studien ermittelte Beobachtung, dass hohe HDL Plasmaspiegel einen signifikant höheren antiinflammatorischen und antiatherogenen Effekt ausüben, während niedere HDL Plasmakonzentrationen die Progression atherosklerotischer Plaques begünstigen.

6.0 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC-A1	ATP-Binding-Cassette Transporter A1
ABTS	2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
ADP	Adenosindiphosphat
ADPPC	Palmitinsäure
AK	Antikörper
Akt	S/T-Proteinkinase (zelluläres Homolog des v-akt-Onkogens)
AP-1	Aktivatorprotein-1
Apo A-1	Apolipoprotein A1
A-SMase	Saure-Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Cell Adhesion Molecule
cDNA	complementäre Desoxyribonucleinsäure
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
DEPC-Wasser	Diethyl/pyrocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDG-1	Endothel- Differenzierungsgen-1
EDG-R	Endothel- Differenzierungsgen-Rezeptor
EDTA	Ethylenediaminetetra-Acetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffoxidsynthase
E-Selektin	Endotheliale Selectin
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FADD	Fas-assoziiertes Protein mit „Death-Domänen“
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	G-Protein
HDL	High Density Lipoproteins
HTGL	hepatische Triglyceridlipase
HRP	Horse Reddish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
I- κ B	Inhibitor des NF- κ B
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1

Abkürzung	Bedeutung
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
IKK	I- κ B $_{\alpha}$ -Kinase
IL-1	Interleukin-1
IP3	Inositol tris-Phosphat
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoproteins
LP(a)	Lipoprotein a
LPA	Lysophosphatid-Säure
LSF	Lysosulfatid, Lyso-Gal-3-sulfat-ceramid
LY 294002	Specific Cell Permeable Phosphatidylinositol-3-Kinase Inhibitor
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NF- κ B	Nucleärer Faktor Kappa B (κ B)
NIK	NF- κ B induzierte Kinase
NO	Stickstoffmonoxid
PAPC	Arachidonsäure
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-trisphosphat
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PLPC	1-Palmitoyl-2-Oleyl-sn-glycero-3-phosphocholin oder 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
POPC	Ölsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylflouride
PTX	Pertussis-Toxin
RCT	Reverse Cholesteroltransport
Rezeptor EDG	Rezeptor Endothelial Differentiation Gene
RIP	Receptor-Interacting Protein
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
S-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
SFM	Serum freies Medium

Abkürzung	Bedeutung
SPC	Sphingosinphosphorylcholin
Sph	Sphingosin
S-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
Sph-kinase	Sphingosinkinase
Sph-myelin	Sphingomyelin
Sph-myelinase	Sphingomyelinase
SR-B1	Scavenger-Rezeptor B1
Sur	Suramin/Acid
TAE-Puffer	Tris-Acetic-EDTA-Puffer
TG	Triglycerid
TGRL	Triglyceridreiches Lipoprotein
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Death-Domänen Protein
TRAF2	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 2
U 73122	Inhibitor der Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC)
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Vv	Venae

7.0 Literaturverzeichnis

1. Ancellin N, Hla T. Differential pharmacological properties and signal transduction of the Sphingosin 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3 and EDG-5. *J Biol Chem* 1999;274:18997-19002
2. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(9):1450-5
3. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein E, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease. The PROCAM experience and pathophysiological implication for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124:11-20
4. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster Study. *Am J Cardiol* 1992;70:733-7
5. Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003;54:321-41
6. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Ability of reconstituted high-density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J Lipid Res* 1999;40(2):345-53
7. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high-density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res* 2000;41(8):1261-7
8. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993 ;36 :767-80
9. Björkerud S, Björkerud B. Growth-stimulating effect of lipoproteins on human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts is due to apo B-containing lipoproteins, type LDL and VLDL, and requires LDL receptors. *Biochim Biophys Acta* 1995;1268:237-47

10. Blann AD, McCollum CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemostas* 1994;72:151-54
11. Calabresi L, Gomaraschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(4):656-61
12. Chen JK, Hoshi H, McClure DB, McKeegan WL. Role of lipoproteins in growth of human adult arterial endothelial and smooth muscle cells in lipoprotein-deficient serum. *J Cell Physiol* 1986;129:207-14
13. Clay MA, Pyle DH, Rye KA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Time sequence of the inhibition of endothelial adhesion molecule expression by reconstituted high-density lipoproteins. *Atherosclerosis* 2001;157(1):23-9
14. Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 2001;103:108-12
15. Cockerill GW, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Miller NE, Thiemermann C. High-density lipoproteins reduce organ injury and organ dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock. *FASEB J* 2001;15:1941-52
16. Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, Nithyanathan S, Taylor G, Haskard DO. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(4):910-17
17. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909
18. Connelly PW. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta* 1999;286:243-255
19. Cuthbert LA, Lipsky PE. Lipoproteins may provide fatty acids necessary for human lymphocyte proliferation by both low-density receptor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 1989;264:13468-74
20. Dimayuga P, Zhu J, Oguchi S, Chyu KY, Xu XO, Yano J, Shah PK, Nilsson J, Cercek B. Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periadventitial cuff-

- induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(2):465-8
21. Fischer-Dzoga K, Fraser R, Wissler RW. Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey and rabbit aortic smooth muscle cells.I. Effects of lipoprotein fractions of hyperlipemic serum and lymph. *Exp Mol Pathol* 1976;24(3):346-59
 22. Fischer-Dzoga K, Wissler RW. Stimulation of proliferation in stationary primary cultures of monkey aortic smooth muscle cells.II. Effect of varying concentrations of hyperlipemic serum and low density lipoproteins of varying dietary fat origins. *Atherosclerosis* 1976;24(3):515-25
 23. Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J. Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:507-34
 24. Gille J, Paxton LL, Lawley tj, Caughman SW, Swerlick RA. Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1997;99:492-500
 25. Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22(30):4702-9
 26. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-6
 27. Hannun YA, Obeid LM. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *TIBS* 1995;20:73-7
 28. Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *PNAS* 1994;91:73-7
 29. Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, Lee JY, Nazaire F, Pushkareva MY, Obeid LM, hannun YA. Role for Ceramide in cell cycle arrest *J Biol Chem* 1995;270:2047-2052
 30. Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwara M, Kobayashi I, Ui M, Okajima F. Sphingosin 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:31780-5
 31. Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, Tomura H, Tamama K, Murakami M, Okajima F. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and

- survival through Sphingosin 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1283-8
32. Kobayashi N, Mita SI, Yoshida K, Honda T, Kobayashi T, Hara K, Nakano S, Tsubokou Y, Matsuoka H. Celiprolol activates eNOS through the PI3K-Akt pathway and inhibits VCAM-1 via NF-kappaB induced by oxidative stress. *Hypertension* 2003;42:1004-13
33. Kowalska I, Strackowski M, Szelachowska M, Kinalska I, Prokop J, Bachorzewska-Gajewska H, Stepień A. Circulating E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 in men with coronary artery disease assessed by angiography and disturbances of carbohydrate metabolism. *Metabolism* 2002;51(6):733-6
34. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by Sphingosin-1-phosphate. *Cell* 1999 ;99:301-12
35. Li XA, Titlow WB, Jackson BA, Giltiay N, Nikolova-Karakashian M, Uittenbogaard A, Smart EJ. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor, Class B, type I activates endothelial nitric-oxide synthase in a ceramide-dependent manner. *J Biol Chem* 2002;277:11058-63
36. Libby P, miao P, Ordovas JM, Schaeffer EJ. Lipoprotein increase growth of mitogen-stimulated arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1985;124:1-8
37. Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, Siepi D, Bagaglia F, Pirro M, Ciuffetti G, Schillaci G, Mannarino E. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. *Metabolism* 2003;52(9):1191-5
38. Lynch KR, Im DS. Life on the edge. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:473-5
39. Madge LA, Pober JS. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NF-kappaB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275(20):15458-65
40. Marcil M, Bissonnette R, Vincent J, Krimbou L, Genest J Jr. Cellular phospholipid and cholesterol efflux in high-density lipoprotein deficiency. *Circulation* 2003;107:1366-71
41. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* 2002;43:921-929

42. Meng F, D'Mello SR. NF-kappaB stimulates Akt phosphorylation and gene expression by distinct signaling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2003;1630(1):35-40
43. Miva K, Igawa A, Inoue H. Soluble E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 levels in systemic and coronary circulation in patients with variant angina. *Cardiovasc Res* 1997;36:37-44
44. Nofer JR, Fobker M, Höbbel G, Voss R, Wolinska I, Tepel M, Zidek W, Junker R, Seedorf U, von Eckardstein A, Assmann G, Walter M. Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux. *Biochemistry* 2000;39:15199-207
45. Nofer JR, Geigenmüller S, Goepfert C, Assmann G, Buddecke E, Schmidt A. High density lipoprotein-associated lysosphingolipids reduce E-selectin expression in human endothelial cells. *BBRC* 2003;310:98-103
46. Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002;161:1-16
47. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 2001;276:34480-85
48. Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Gödecke A, Ishii I, Kleuser B, Schäfers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3: role of HDL-associated lysophospholipids. *J Clin Invest* 2004;113:569-581
49. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA. Programmed cell death induced by Ceramid. *Science* 1993; 259:1769-1771
50. O'Connell BJ, Genest J Jr. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001;104:1978-83
51. Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Gonda K, Shigematsu H, Takuwa Y. EDG-3 is a functional receptor for Sphingosin 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG-1 and AGR-16. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;269:203-08

52. Okazaki T, Sakon S, Sasazuki T, Sakurai H, Doi T, Yagita H, Okumura K, Nakano H. Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF-kappaB subunit-dependent cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(4):807-12
53. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996;37:2473-91
54. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S. Expression of the NF-kappaB target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation. *J Immunol* 2003;170(8):4053-60
55. Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(2):168-82
56. Rader DJ. High-Density Lipoproteins and Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2002;90:62-70
57. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995;2:493-506
58. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, Collins T. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997;272:2753-61
59. Retzer-Lidl M. Lysophospholipide als Modulatoren proinflammatorischer und thrombogener Signalwege in humanen Endothelzellen und Thrombozyten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München 2002
60. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 2003;17(6):743-5
61. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-9

62. Ross R. Mechanism of disease: atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26
63. Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol* 2000;165:2712-8
64. Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF- alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002a;164 (1):57-64
65. Schmidt A, Vlodavsky I, Völker W, Buddecke E. Induction of a hypertrophic growth status of coronary smooth muscle cells is associated with an overexpression of TGF-beta. *Eur J Cell Biol* 2002b;81:138-144
66. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part I. *Circulation* 2001;104:2376-83
67. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation* 2001;104:2498-502
68. Shimamura H, Terada Y, Okado T, Tanaka H, Inoshita S, Sasaki S. The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF-kappaB and Bad. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(6):1427-34
69. Spiegel S, Merrill AH. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB* 1996;10:1388-97
70. Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002;105:1399-402
71. Stannard AK, Khan S, Graham A, Owen JS, Allen SP. Inability of plasma high-density lipoproteins to inhibit cell adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001;154(1):31-8
72. Sweeney EA, Sakakura C, Shirahama T, Masamune A, Ohta H, Hkumori S, Igarashi Y. Sphingosin and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosin (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1996;66:358-366
73. Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998;19 (Suppl A):A31-A35

74. Tamama K, Okajima F. Sphingosin 1-phosphate signaling in atherosclerosis and vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:489-95
75. Testi R. Sphingomyelin breakdown and cell fate. *TIBS* 1996;21:468-471
76. Theilmeyer G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, Landeloos M, Chapman MJ, Ninio E, Collen D, Himpens B, Holvoet P. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *FASEB J* 2000;14(13):2032-9
77. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. Acceleration of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 2000;15:348-54
78. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27
79. Windh RT, Lee MJ, Hla T, An S, Barr AJ, Manning DR. Differential coupling of the Sphingosin 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3 and H218/Edg-5 to the G_z, G_q and G₁₂ families of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 1999;274:27351-57
80. Whitley MZ, Thanos D, Read MA, Maniatis T, Collins T. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol* 1994;14:6464-75
81. Wojakowski W, Gminski J. Soluble ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in children from families with high risk of atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2001;7(2):181-5
82. Xia P, Gamble JR, Rye KA, Wang L, Hii CST, Cockerill P, Khew-Goodall Y, Bert AG, Barter PJ, Vadas MA. Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the Sphingosin kinase pathway. *PNAS* 1998;95:14196-201
83. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High-density lipoproteins (HDL) interrupt the Sphingosin kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999;274:33143-7
84. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7:853-7

85. Zhang WJ, Stocker R, McCall MR, Forte TM, Frei B. Lack of inhibitory effect of HDL on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002;165(2):241-9

Danksagung

Folgenden Personen gilt mein ganz besonderer Dank:

- Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. A. Schmidt und Herrn Prof. Dr. med. E. Buddecke für ihr persönliches Engagement und die ausgezeichnete Betreuung bei der Planung der Versuche und der Fertigstellung dieser Arbeit.
- Dr. med. J.-R. Nofer für die Unterstützung bei den FACS-Messungen und Hilfestellungen bei offenen Fragen.
- Marc Lewejohan für die Einführungen in die Materie der Laborarbeit und für die Hilfen bei unerwarteten Versuchsproblemen.
- Meinem Bruder Björn für die Hilfestellungen bei offenen Computerfragen.
- Meiner Freundin Corinna für Verzicht auf manch gemeinsame Stunden, Tage oder Wochenenden.
- Und natürlich meine Eltern, auf deren Hilfe und Unterstützung ich jederzeit bauen konnte. Ohne deren „Großherzigkeit“ und Vertrauen wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Curriculum Vitae

