

1 Einleitung

1.1 Die Arteriosklerose

Die Arteriosklerose erlangt als pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl von angiologischen, kardiologischen und neurologischen Krankheitsbildern eine immer wichtigere medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden eine Vielzahl von Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, die Hyperlipoproteinämie ², der Diabetes mellitus, der Nikotinkonsum, die Hyperfibrinogenämie, die Hyperhomozysteinämie ³, genetische Faktoren, systemische Entzündungsreaktionen, das metabolische Syndrom, männliches Geschlecht, Bewegungsmangel, Stress, Alter, virale oder bakterielle Infektionen beschrieben ⁴.

Während die Arteriosklerose noch vor einigen Jahren als degenerative Alterserkrankung mit führender Verfettung der Gefäße und daraus resultierender Gefäßverkalkung verstanden wurde, definiert man nunmehr die Arteriosklerose auch als eine chronisch entzündliche degenerative Erkrankung der Gefäße ^{5,6}, deren pathologische Morphe aus endothelialer Dysfunktion resultiert ⁷.

Die klinische Erscheinung ist das Resultat einer Mannigfaltigkeit pathophysiologischer Einflüsse und daraus resultierender Alterierung von zellulären Stoffwechselprozessen, gestörter interzellulärer Kommunikation und endothelialer Dysfunktion.⁶

Der klinische Therapieansatz umfasst bis zum heutigen Tag vor allem die medikamentöse, interventionelle und chirurgische Therapie und Sekundärprophylaxe von Folgeerscheinungen der Arteriosklerose wie pektanginöse Beschwerden bei Koronarsklerose, Herz- und Organinfarkten, peripherer arteriovenöser Krankheit und neurologischer Krankheitsbilder im Zusammenhang mit cerebrovaskulärer Insuffizienz.

Eine definitive Therapie und eine restitutio ad integrum bleibt dem Kliniker aber bis dato unmöglich. Eine fortschreitende Optimierung und eine verbesserte Primärprophylaxe der Arteriosklerose kann durch das Verständnis pathophysiologischer und pathobiochemischer molekularer Mechanismen und Stoffwechselprozesse als Antwort der beteiligten Zellen und Organe auf proarteriosklerotische Stimuli erreicht werden.

In der frühen Phase der Arteriosklerose-Entwicklung beobachtet man das Einwandern von Makrophagen in die subendotheliale Schichten der Gefäße und eine zunehmende Akkumulation von Lipiden mit daraus resultierendem morphologischem Wandel zu Schaumzellen. Histologisch ergibt sich das Bild des fatty streak (streifenförmige

Fetteinlagerung in der Gefäßwand), der sich in unterschiedlichen Gefäßabschnitten in unterschiedlichen Lebensdekaden manifestiert ⁴. Während der fatty streak als morphologisches Substrat der frühen Arteriosklerose klinisch nicht in Erscheinung tritt, wird durch die Rekrutierung von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen über die Anreicherung eines Debridements aus Stoffwechselprodukten, nekrotischen Materialien und Verkalkungen das Bild der intraluminar wachsenden, später stenosierenden, arteriosklerotischen Plaque erreicht.

Als medizinischer Notfall und schwerwiegendste Komplikation stellt sich die Ruptur der mit einer fibrösen Kappe bedeckten entzündlichen arteriosklerotischen Plaque in der Spätphase dar. Aus ihr resultiert eine akute Okklusion des Gefäßes durch Bildung eines Thrombus und eine Infarzierung des gefäßabhängigen Versorgungsgebietes.

Besondere Bedeutung für die Prozesse der arteriosklerotischen Frühentstehung haben neben anderen Mechanismen in den letzten Jahren das Endothelinsystem, das Angiotensinsystem und der Lipidstoffwechsel gewonnen.

1.2 Das Endothelinsystem

1.2.1 Endothelin

Endothelin wurde erstmals aus dem Überstand porciner Endothelzellen isoliert. Die Endotheline sind eine Familie von 21 Aminosäuren umfassenden Peptiden mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken. Im humanen Organismus sind bis zum jetzigen Zeitpunkt vier Isoformen bekannt (ET-1, ET-2, ET-3 und VIC – vasoactive intestinal constrictor / ET-4). Jede Isoform wird durch spezifische Gene kodiert ⁸. Zusätzlich werden in der Literatur seit kurzem 31 Aminosäuren umfassende Isoformen mit reduzierter biologischer Aktivität beschrieben, die aus alternativen katalytischen Wegen resultieren.

ET-1 ist die dominierende Isoform im Endothel und vermittelt im humanen Organismus die meisten Aktivitäten. ET-1 gilt als der wahrscheinlich potenteste bekannte Vasokonstriktor und hat zusätzlich mitogene und positiv inotrope Eigenschaften ¹. Endothelin reguliert die Salz- und Wasserhomeostase des Körpers, beeinflusst das RAAS und das Vegetativum ⁹.

Hauptsächlich wird ET-1 im Endothel der Gefäße gebildet. Weitere Organe mit nachgewiesener, meist niedrigerer ET-Expression sind der Hypophysenvorderlappen, die Niere, glatte Muskelzellen, der Herz- und der Skelettmuskel ^{1,10}. Die Bildung von ET-2 erfolgt in Endothelzellen, Kardiomyozyten und den Epithelzellen der Niere ^{11,12}. ET-3 wurde

im endokrinen System, im ZNS und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. Ein weiteres im Gastrointestinaltrakt gebildetes Peptid aus der Familie der Endotheline ist ET-4 (vasoactive intestinal constrictor) ¹³. Im humanem Organismus ist Endothelin-1 das vorherrschende Isopeptid, während die anderen ET-Isoformen vergleichsweise spezialisierte physiologische Rollen spielen und meist deutlich niedriger exprimiert werden. Die Synthese der Endotheline beinhaltet eine Reihe proteolytischer Schritte. Das Primärtranskript ist Preproendothelin, ein Protein mit mehr als 200 Aminosäuren für alle Isoformen. Durch die Prohormonkonvertase (wahrscheinlich Furin) werden die Preprohormone in die Prohormone gespalten. Diese sind Vorstufen niedriger biologischer Aktivität und umfassen isoformenspezifische Aminosäuresequenzen. Die resultierenden BigET-1 (38 Aminosäuren), BigET-2 (37 Aminosäuren) und BigET-3 (41 Aminosäuren) unterliegen einer weiteren Proteolyse durch substratspezifische Endothelin-Konversions-Enzyme (Endothelin-converting enzyme, ECE), die die Abspaltung eines C-terminalen Peptids (CTP) generieren und das Endothelin-Peptid letztlich somit in die aktive biologische Form überführen. Die höchste Affinität aller ECE besteht hierbei für Big-ET-1.

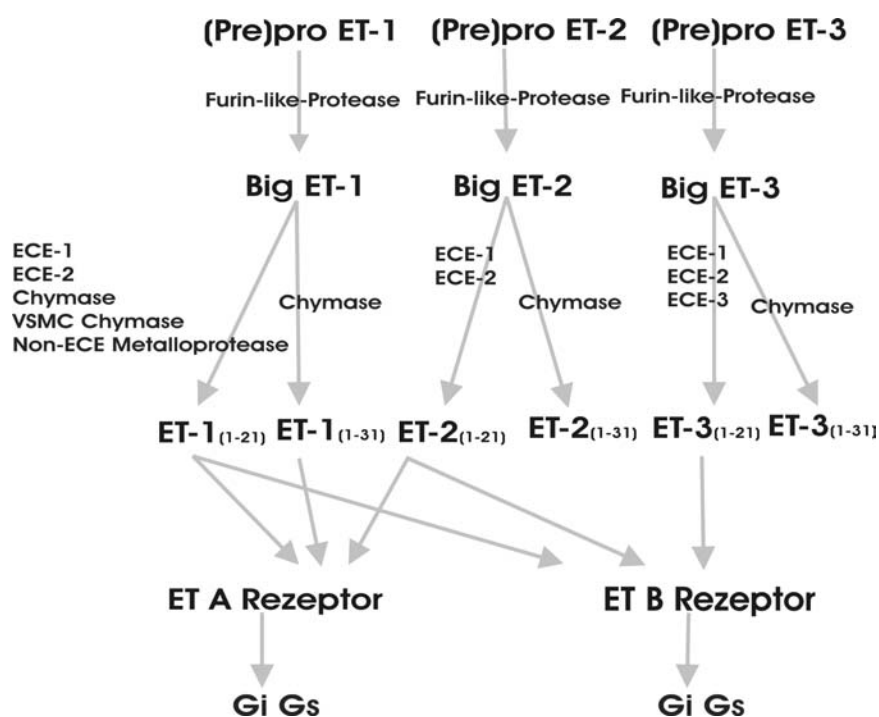


Abb. 1: Das Endothelinsystem. Die Synthese und die proteolytischen Prozesse zur Bildung von Endothelin-1, -2 und -3, sowie die Spezifität der Endothelinrezeptoren ist dargestellt. Modifiziert nach Lüscher & Barton ¹.

1.2.2 Endothelin-converting enzyme

Die Umsetzung von Big-ET durch Endothelin-Converting-Enzyme (ECE) stellt den geschwindigkeits- und aktivitätsbestimmenden Schritt der Endothelinsynthese dar. Seit der Erstbeschreibung des ECE wurden Isoenzyme in unterschiedlichen Spezies beschrieben und klassifiziert^{1,14-21}. Die ECEs gehören zur Familie der Zinkfinger-Metalloproteinasen (Matrix-Metalloproteinasen). Bisher sind drei ECE-Familien (ECE-1 bis ECE-3) bekannt, in denen spezifische Isoenzyme nachgewiesen werden konnten. In humanen Geweben ist die häufigste und am weitesten verbreitete Isoform ECE-1. Von diesem sind 4 Unterformen (ECE-1a bis -1d) bekannt, die ECE-1-Dimere formen können²².

Die Substrate werden durch die Proteinasen am C-terminalen Ende der Big-Endotheline erkannt. Die Spaltung der Prohormone erfolgt enzymespezifisch. So wird z.B. Big-ET₃ von ECE-3 spezifisch gespalten, von ECE-1 jedoch kaum erkannt^{20,23}. Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der ECEs (ECE-1-Isoformen: pH 6,8 - 7,0; ECE-2: pH 5,5; ECE-3: pH 6,6) geht man auch von einer unterschiedlichen intra- und extrazellulären Verteilung aus. Die Unterschiede der einzelnen Isoenzyme von ECE-1 beziehen sich auf die zytoplasmatische, N-terminale Aminosäuresequenz, während die transmembranären und katalytischen Domänen identisch sind. Die Bildung der einzelnen ECE-1-Isoformen erfolgt durch alternatives Splicing¹⁹.

Für die extra- oder intrazellulären Lokalisation der einzelnen ECE-1-Dimere sind die zytosolischen Anteile verantwortlich²². Durch die unterschiedliche Lokalisation der ECE-Isoformen ist eine extra- oder intrazelluläre Prozessierung von Big-Endothelin zu Endothelin möglich. Diese ist zell- und spezies-abhängig^{19 24}. In humanen Zellen findet man ECE-1a in der Plasmamembran, ECE-1b vornehmlich intrazellulär und ECE-1c kann intra- und extrazellulär lokalisiert werden²².

Das ECE-1 wird auch in Kardiomyozyten gefunden. Die ECE-1-mRNA-Expression ist bei Post-Infarkt-Patienten erhöht²⁵. In kultivierten Rattenkardiomyozyten ist eine erhöhte ECE-1-Expression mit erhöhter ET-1-Bildung und Hypertrophie verbunden²⁶. Eine erhöhte ECE-Aktivität wird zunehmend auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert²⁷. In Ratten-Modellen konnten unter ECE-Blockade eine Normalisierung der erhöhten arterielle Kontraktilität und der gestörten Endothelfunktion gezeigt werden²⁸. Durch welche Signalmechanismen ECE reguliert wird, ist momentan noch weitgehend unbekannt. Die ECEs werden alle durch Phosphoramidon, jedoch im Gegensatz zu neutraler Endopeptidase nicht

durch Thiorphan gehemmt. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre die spezifische Hemmung von ECE-Isoenzymen, z.B. um gezielt eine intra- oder extrazelluläre Endothelinsynthese zu beeinflussen. Der Ansatz einer ECE-Blockade ist prinzipiell viel versprechend, da beispielsweise eine Ang II-induzierte Schädigung des Myokards unter ECE-Blockade reduziert werden kann²⁹.

1.2.3 Endothelinrezeptoren

Die Endotheline vermitteln eine auto- und parakrine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Endothelinrezeptor-A und -B). Diese werden kardiovaskulär in Endothelzellen (vorrangig ET_B), Monozyten, mesangialen Zellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Herzmuskelzellen exprimiert³⁰. Die Rezeptoren besitzen 7 transmembranäre Domänen und sind über G_q- und G_i-Proteine an die intrazellulären Signalkaskaden gekoppelt. ET_A hat eine selektiv höhere Affinität für ET-1, während ET_B eine vergleichbare Affinität für alle Endotheline aufweist¹³.

Über das G_q-Protein wird via PLC Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol freigesetzt. Hierdurch werden intrazelluläre Ca²⁺-Speicher entleert und die PKC aktiviert. Dies führt z.B. zur Kontraktion von Muskelzellen. Das G_i-Protein hemmt dagegen die Adenylatcyclase und damit die Bildung von cAMP.

Endotheline können die Transkription von Zielgenen und extrazellulären Signalkaskaden über MAP-Kinasen, z.B. ERK, steuern. Dabei werden Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, Egr-1) aktiviert. Diese Mechanismen können die erhöhte Proteinsynthese und mitogene Potenz von Endothelin vermitteln^{31,32}.

1.3 Pathophysiologie des Endothelinsystems bei kardiovaskulärer Erkrankungen

Das ET-1 wurde initial als stärkster bekannter Vasokonstriktor beschrieben⁸. Das Endothelinsystem hat Einfluss auf die kardiovaskuläre Homöostase, die Embryogenese, pulmonale Hypertonie und Bronchokonstriktion, Karzinogenese, Prostatawachstum, gastrointestinale und endokrinologische Funktion, Nierenfunktion sowie die Homöostase des Ionengleichgewichts und des Säure-Basenhaushalts des Körpers¹. Endothelin-1 bewirkt in einer transienten ersten Phase durch Bindung an die endothelialen ET_B-Rezeptoren und Freisetzung von EDRF (NO) und Prostazyklinen im Gefäß eine Dilatation. Kurz darauf setzt

eine lang anhaltende Vasokonstriktion ein, die durch eine stabile Bindung an den ET_A – Rezeptor der glatten Muskelzellen vermittelt wird³³⁻³⁶. Die spezie- und organspezifische Verteilung der Rezeptoren ist dabei für die spezifische Endothelin-Wirkung verantwortlich. In dieser Arbeit wurden vorrangig humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) untersucht. Diese exprimieren fast ausschließlich ET_B³⁷. Die Endothelin-Clearance der Endotheline erfolgt durch Internalisierung mit Hilfe des endothelialen ET_B-Rezeptors, z.B. in der Lunge und in der Niere, oder durch hydrolytische Spaltung mittels neutraler Endopeptidase (NEP).

Zahlreiche kardiovaskuläre Krankheitsbilder sind mit erhöhter lokaler und systemischer ET-Bildung assoziiert^{1,38,39,40}. Erhöhte ET-1-Bildung ist bei Myokardinfarkt⁴¹, Herzinsuffizienz^{42,43,44}, renaler Insuffizienz⁴⁵, pulmonaler Hypertonie⁴⁶, manifester Arteriosklerose³⁹, Hyperlipoproteinämie⁴⁷, nach Ballonkatheterintervention⁴⁸, bei arterieller Hypertonie⁴⁹ und nach länger anhaltender Ischämie⁵⁰ beschrieben worden. Auch bei Patienten mit Angina pectoris und in infarziertem Myokard zeigen sich erhöhte ET-1-Spiegel^{51,41,39}. In arteriosklerotischen Läsionen finden sich erhöhte Level von ET-1 und ECE^{39,52-54}. ET-1 kann als proinflammatorischer Mediator die Freisetzung von IL-6 aktivieren und so zu einer entzündlichen Genese der Arteriosklerose beitragen⁵⁵.

Endothelin kann an zahlreichen Stellen die Pathogenese der Arteriosklerose fördern¹³. Das detaillierte Verständnis der Regulation der ET-Bildung und ET-Rezeptorbindung liefert dabei Ansätze für therapeutische Strategien¹³. Bosentan, ein nichtselektiver ET-Rezeptorantagonist, zeigt bei essentieller Hypertonie therapeutische Effekte, die einer ACE-Hemmer-Therapie vergleichbar sind⁵⁶. Dies wird auch durch dem protektiven Effekt von ET-Rezeptorblockade bei Ang-II-induzierter arterieller Hypertonie im Rattenmodell deutlich^{57,58}. Ob eine selektive, z.B. ET_A-spezifische, oder eine nichtselektive ET-Rezeptorblockade von Vorteil ist, kann nach derzeitigen Wissenstand noch nicht abschließend beurteilt werden. Während einige Arbeitsgruppen einen positiven Einfluss einer nichtselektiven Endothelinrezeptorblockade auf Gefäßhypertrophie und lokale Expression von ET-1 beschreiben^{58,59}, scheint dies nicht in allen Hypertoniemodellen zuzutreffen⁶⁰.

In Bezug auf ET_B wird eine Rolle in der Endothelin-Clearance⁶¹ und ein Einfluss auf das NO-System diskutiert. Die Studienlage ist derzeit noch nicht gesichert. Einerseits konnte eine ET_B-vermittelte Synthese von NO in endothelialen Zellen⁶², andererseits aber auch eine Blockade dieses Mechanismus gezeigt werden^{63,64}. Das NO-System soll auch über den ET_A-Rezeptor beeinflussbar sein. Die selektive Blockade von ET_A verbessert spezifisch die

Endothelfunktion über einen endothelialen L-Arginin- / NO-Mechanismus, der durch ET_B-Blockade verhindert wird ⁶⁴.

Endothelin stimuliert durch vielfältige Mechanismen die Pathogenese der Arteriosklerose. Es induziert die Synthese interzellulärer Signal- und Adhäsionsmoleküle wie TGF β-1, basic fibroblast growth factor, ICAM-1, VCAM-1, Selectin-1, IL-6, Epiregulin, MCP-1 oder PDGF. Es fördert so die Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen an das Endothel und ermöglicht die Invasion von Monozyten in die Gefäßwand. Insgesamt werden dabei wachstumsfördernde Prozesse in arteriosklerotischen Läsionen beschleunigt und die Umbauprozesse der Gefäßwand in Bezug auf Bindegewebszusammensetzung und Sklerosierung vermittelt. So fördert Endothelin auch die Produktion von Kollagen Typ I und III durch die in arteriosklerotischen Läsionen angereicherten glatten Gefäßmuskelzellen.

1.4 Hyperlipoproteinämie und Apolipoproteine

Zahlreiche Befunde unterstützen eine Wechselwirkung von Endothelinsystem, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), NO und erhöhten Lipoproteinplasmaspiegeln. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden Interaktion von Hyperlipoproteinämie, Endothelinsystem, NO ⁶⁵ und RAAS ⁶⁶⁻⁶⁹ analysiert. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde ein protektiver Effekt von Endothelinrezeptorblockade auf die Atheroskleroseentstehung in apolipoproteindefizienten Mäusen nachgewiesen ⁷⁰. Darüber hinaus führt Hypercholesterolämie zu erhöhten ET-1-Plasma- und Gewebespiegeln ¹. Oxidierte Lipoproteine (oxLDL) können auch die PPET-1-Genexpression in Endothelzellen ⁷¹ sowie die ET_A-abhängige Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen induzieren.

Die Hyperlipoproteinämie ist ein bekannter Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion und damit ein pathophysiologisch – morphologisches Korrelat der arteriosklerotischen Frühentstehung ⁷². In Abhängigkeit von der Serumkonzentration diffundieren Lipoproteine passiv in die Gefäßwand ⁷³. Dieser Prozess ist bei erhöhten Lipoproteinspiegeln im Plasma von Patienten mit Hypercholesterinämie potenziert. In der Gefäßwand interagieren Lipoproteine über Apolipoprotein B mit Matrix-Proteoglykanen ⁷⁴. Zusätzlich wird natives LDL neben einer zunehmenden Proteolyse und Lipolyse auch oxidiert ⁵. Diese oxidative Modifikation beschleunigt die Aufnahme der Lipoproteine in die Makrophagen und potenziert so deren Umwandlung in Schaumzellen ⁷⁵. Die oxLDL stellen dabei das primär pathologische Substrat dar. In den Prozess der Oxidation involvierte Enzyme sind unter anderem die 12/15-

Lipoxygenase⁷⁶, die Myeloperoxidase, die sekretorische Phospholipase A2 (sPLA2)⁷⁷ und die Sphingomyelinase⁷⁸. Auch die NAD(P)H-Oxidase wird als eine der vaskulären Hauptquellen für reaktive Sauerstoffspezies und damit die oxidative Modifikation von LDL in der Gefäßwand diskutiert⁷⁹.

In der Entstehung der Arteriosklerose wird eine Akkumulation von Lymphozyten und Monozyten in der Gefäßwand durch die Anreicherung von oxidierten Lipiden potenziert^{5,78}. Durch oxLDL wird in Endothelzellen eine Reihe von proarteriosklerotischen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen (P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1) induziert. Gleichzeitig wird die endotheliale NO-Synthase durch oxLDL in arteriosklerotischen Läsionen herabreguliert.

Oxidierte Lipoproteine können in hohen Konzentrationen bei lang anhaltender Stimulation zytotoxisch wirken sowie den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Endothel- und glatten Muskelzellen auslösen^{80,81}. Die bisherigen Studien differieren allerdings, wahrscheinlich in Abhängigkeit von Konzentration und Oxidationsgrad der verwendeten Lipoproteine. Oxidierte Lipide werden klassischerweise durch scavenger-Rezeptoren oder CD 36 aufgenommen^{6,82}. Auch für SR-A wurde eine oxLDL-Aufnahme beschrieben⁸³. In den letzten Jahren gewinnt der 1997 erstmals von T. Sawamura in Endothelzellen beschriebene Lectin-like oxLDL-Rezeptor LOX-1⁸⁴ an Bedeutung, der inzwischen auch in Makrophagen, Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen wurde⁸⁵.

Die Endothelfunktion ist in Gefäßen mit experimenteller Hypercholesterolemie verschlechtert, kann jedoch durch ET_A-Blockade verbessert werden⁸⁶. Durch kombinierte Blockade der Endothelinrezeptoren beobachtet man in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen einen deutlichen Rückgang der Arteriosklerose, vorrangig durch Beeinflussung der Schaumzellbildung⁷⁰. Die Pathogenese der Hypercholesterinämie ist im Tiermodell und im Patienten nur bedingt vergleichbar^{7,87,88}. Dennoch erhöhen Endothelin und oxLDL auch in humanen Zellen synergistisch die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen⁸⁹. Die Endothelinsynthese wird durch oxLDL in Makrophagen und humanen glatten Muskelzellen stimuliert⁴⁷. Diese Daten stützen Untersuchungen zur Induktion der ET-1-Sekretion in Endothelzellen⁹⁰. Dabei wurde allerdings der zugrunde liegende Signalmechanismus nur unzureichend analysiert. Die Rolle des Endothelin-Converting-Enzymes und des endothelialen ET_B-Rezeptors wurde bisher in diesem Zusammenhang noch nicht analysiert. In vivo wurden verstärkte Endothelin-1-abhängige Vasokonstriktionen nach oxLDL-Gabe nachgewiesen⁹¹. Außerdem konnte bei Hypercholesterinämie die Koronarfunktion unter der experimentellen Gabe von Endothelin-

Rezeptorantagonisten verbessert werden^{92,93}. Diese Daten deuten auf eine Wechselwirkung von Endothelinsystem und Lipoproteinen in der Pathogenese der Arteriosklerose hin.

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von nativem und oxidiertem Low-Density-Lipoprotein (nLDL, oxLDL) auf die Expression von Genen des Endothelinsystems und die Induktion von Apoptose, sowie die Endothelin- und Angiotensin-vermittelte oxLDL-Aufnahme in Primärkulturen von humanen Endothelzellen untersucht werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben nLDL und oxLDL auf die Expression des Endothelin-Converting Enzyme in humanen Endothelzellen?
2. Wird der endotheliale ETB-Rezeptor durch natives oder oxidativ modifiziertes LDL reguliert?
3. Welche Signaltransduktionsmechanismen sind in die Induktion von Komponenten des Endothelinsystems und die Endothelin-Synthese involviert?
4. Induziert oxLDL in Endothelzellen Apoptose?
5. Kann Endothelin und Angiotensin die Aufnahme von oxLDL in humane Endothelzellen steigern und damit eine Wechselwirkung von Low-Density-Lipoprotein, Endothelin-1 und Angiotensin II im Rahmen eines proarteriosklerotischen Circulus vitiosus potenzieren?