

**Experimentelle Untersuchungen zu Wirkmechanismen der Statin-bedingten
Modulation der Angiogenese**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Antonios Kiliass
aus Thessaloniki

Gießen 2010

Aus dem Angiologischen Labor der Medizinischen Klinik,
Zentrum für Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. R. Voss

Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. S. Bellusci

Tag der Disputation: 23.04.2012

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1. EINLEITUNG	7
1.1 ATHEROSKLEROSE	7
1.2 DIE ENDOTHELIALE DYSFUNKTION IN DER PATHOLOGIE DER ARTERIOSKLEROSE.....	7
1.3 DIE ANGIOGENESE	10
1.3.1 GEFÄßWACHSTUM	12
1.3.2 DIE REGULIERUNG DER ANGIOGENESE	14
1.3.3. IN VITRO-MODELLE DER ANGIOGENESE	15
1.4. DIE ROLLE DER LIPOPROTEINE IN DER ATHEROGENESE	17
1.4.1 BEDEUTUNG DER OXIDIERTEN LOW DENSITY-LIPOPROTEINE	17
1.4.2 PATHOPHYSIOLOGIE DER ATHEROGENESE	19
1.4.3 ROLLE VON LPC BEI DER ATHEROGENESE	20
1.5 DIE PHARMAKOTHERAPIE MIT STATINEN.....	21
1.5.1 PLEIOTROPE EFFEKTE VON STATINEN	23
1.5.1.1 ENDOTHELIALE FUNKTION: NO-BIOVERFÜGBARKEIT UND ENDOTHELIN-1-SYNTHESE ..	23
1.5.1.2 ANTIOXIDATIVE EFFEKTE.....	23
1.5.1.3 ANTIINFLAMMATORISCHE EFFEKTE	24
1.5.1.4 PLAQUESTABILITÄT	24
1.5.1.5 THROMBOZYTEN UND DAS PLASMATISCHE GERINNINGSSYSTEM.....	24
1.5.1.6 NEOVASKULARISATION	25
1.6 LIPID RAFTS.....	25
1.6.1 ZUSAMMENSETZUNG DER LIPID RAFTS	26
1.6.2 ANALYSE DER LIPID RAFTS	28
1.6.3 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER LIPID RAFTS	29
1.7 FRAGESTELLUNG	30
2. MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1. CHEMIKALIEN UND BIOLOGISCHE STOFFE	31
2.1.1 GERÄTE	32
2.2 ZELLKULTUR	32
2.2.1 ZELLISOLIERUNG	32
2.2.2 ZELLIDENTIFIKATION	33
2.2.3 KULTIVIERUNG	33
2.3 PROLIFERATIONSASSAY.....	34
2.3.1 DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS.....	34
2.3.2 AUSWERTUNG	35

2.4 PLANARER MIGRATIONSASSAY	35
2.4.1 BENÖTIGTE MATERIALIEN:.....	35
2.4.2 VORBEREITUNG DES ASSAYS	36
2.4.3 DURCHFÜHRUNG DES ASSAYS.....	36
2.4.4 AUSWERTUNG.....	37
2.5 DREI-DIMENSIONALER IN VITRO-ANGIOGENESE-ASSAY	37
2.5.1 MATERIAL.....	38
2.5.1.1 METHYLZELLULOSE-LÖSUNG	38
2.5.1.2 KOLLAGEN-LÖSUNG	38
2.5.1.3 KOLLAGENLÖSUNG-ÄQUILIBRIERUNG	38
2.5.1.4 SPHÄROIDE	38
2.5.2 DURCHFÜHRUNG DES ANGIOGENESE-ASSAYS.....	39
2.5.3 QUANTITATIVE ANALYSE DES ENDOTHELIALEN SPROUTING	39
2.6 STATISTIK	39

3. ERGEBNISSE DER DREIDIMENSIONALEN IN VITRO-ANGIOGENESE- ASSAYS**41**

3.1 EINFLUSS VON LPC AUF DAS ENDOTHELIALE SPROUTING	41
3.2 EINFLUSS VON STATINEN AUF DAS LPC-INDUZIERTES ENDOTHELIALES SPROUTING	43
3.3 BEDEUTUNG DER HEMMUNG DER HMG-CoA- REDUKTASE FÜR DAS ENDOTHELIALE SPROUTING	43
3.4 DIE WIRKUNG DER MODULATION DES MEMBRANÖSEN CHOLESTERINS MITTELS METHYL-β-CYCLODEXTRIN AUF DAS LPC-INDUZIERTES ENDOTHELIALES SPROUTING	45
3.5 DIE ROLLE DER PRENYLIERUNG, UNTERSUCHT MITTELS FARNESYLPYROPHOSPHAT UND GERANYLGERANYLPYROPHOSPHAT BEIM ENDOTHELIALEM SPROUTING	46
3.6 BEEINFLUSSUNG DER ENDOTHELIALEN PROLIFERATION DURCH STATINE	47
3.6.1 EINFLUSS VON LPC AUF DIE ENDOTHELIALE PROLIFERATION	47
3.6.2 EINFLUSS VON STATINEN AUF DIE LPC-INDUZIERTES ENDOTHELIALES PROLIFERATION.....	47
3.6.3 BEDEUTUNG DER HEMMUNG DER HMG-CoA-REDUKTASE FÜR DIE ENDOTHELIALE PROLIFERATION	48
3.6.4 DIE WIRKUNG DER MODULATION DES MEMBRANÖSEN CHOLESTERINS MITTELS METHYL- β -CYCLODEXTRIN AUF DIE LPC-INDUZIERTES ENDOTHELIALES PROLIFERATION	49
3.6.5 DIE ROLLE DER PRENYLIERUNG, UNTERSUCHT MITTELS FARNESYLPYROPHOSPHAT UND GERANYLGERANYLPYROPHOSPHAT BEI DER ENDOTHELIALEM PROLIFERATION.....	50
3.7 MODULATION DER ENDOTHELIALEM MIGRATION DURCH STATINE	51

4. DISKUSSION

52

4.1. DIE ROLLE DES LPC-INDUZIERTEN ENDOTHELIALEM SPROUTING IN DER ATHEROSKLEROSE UND ANGIOGENESE	52
4.1.1 MODULATION DER ANGIOGENESE DURCH DIE STATINE FLUVASTATIN, SIMVASTATIN UND CERIVASTATIN.....	52
4.1.2 ANALYSE DER URSACHEN DER STATIN-BEDINGTEN STEIGERUNG DES LPC-INDUZIERTEN SPROUTING	53
4.2. BEDEUTUNG DER LPC-INDUZIERTEN ENDOTHELIALEM PROLIFERATION UND DEREN MODULATION DURCH STATINE FÜR DIE ATHEROSKLEROSE UND ANGIOGENESE	55
4.2.1 ANALYSE DER HEMMUNG DER LPC-INDUZIERTEN ENDOTHELIALEM PROLIFERATION DURCH STATINE.....	56

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	59
5. SUMMARY.....	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	61
7. DANKSAGUNG	72

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb.1 Arteriosklerotische Plaque</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 2 Plaqueruptur</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 3 Vaskulogenese und Angiogenese</i>	<i>12</i>
<i>Abb. 4 Die angiogene Kaskade</i>	<i>14</i>
<i>Abb. 5 Die Rolle von LDL in der Arteriosklerose</i>	<i>18</i>
<i>Abb. 6 Entstehung von LPC.....</i>	<i>21</i>
<i>Abb. 7 Die Rolle von Statinen in der Cholesterol- und Isoprenoidsynthese</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 8 Lipid rafts.....</i>	<i>27</i>
<i>Abb. 9 Lipid Rafts.....</i>	<i>27</i>
<i>Abb. 10 Drei-dimensionaler in vitro-Angiogenese-Assay ohne Stimulation</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 11 Der proangiogenetische Effekt von LPC.....</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 12 Hochsignifikante Steigerung der endothelialen Sprouts unter Fluvastatin</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 13 Einfluß von Statinen auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting.....</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 14 Einfluß von Mevalonat auf das endotheliale Sprouting.</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 15 Einfluß von MCD auf das endotheliale Sprouting.</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 16 Einfluß von GGPP(Gera) auf das endotheliale Sprouting.....</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 17 Einfluß von Statinen auf die LPC-induzierte Proliferation.</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 18 Einfluß von Mevalonat auf die endotheliale Proliferation.</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 19 Einfluß von MCD auf die endotheliale Proliferation.</i>	<i>50</i>
<i>Abb. 20 Einfluß von GGPP auf die LPC-induzierte Proliferation.....</i>	<i>51</i>

Abkürzungsverzeichnis

oxLDL	Oxidiertes Low Density-Lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholin
PDGF	Platelet-derived growth factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MCP 1	Monocyte-chemoattractant-protein 1
M-CSF	Monocyte-colony-stimulating-factor
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
LPL	Lysophospholipide
GPCP	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
iPLA2	Calcium-unabhängige Phospholipase A2
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
MCD	Methyl- β -Cyclodextrin
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
FPP	Farnesylpyrophosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
FCS	Fetal Calf Serum
EC	Endothelzellen

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den Haupttodesursachen in den USA, Europa und Asien. Die Atherosklerose ist nach der WHO definiert als "variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia" [1] .

1.2 Die endotheliale Dysfunktion in der Pathologie der Arteriosklerose

Das Endothel wurde ursprünglich für eine funktionslose Zellreihe gehalten, welche die Grenze zwischen dem Lumen der Blutgefäße und der vaskulären Media bildet. Die intensive Erforschung dieser Zellen hat neue Aufschlüsse über deren Funktion erbracht und damit unser Verständnis über die Bedeutung dieser Zellen im Gefäßsystem vertieft.

Das vaskuläre Endothel kleidet als einschichtige Zellschicht luminal das gesamte Blutgefäßsystem aus und gehört zusammen mit der Basalmembran zur Tunica intima der Blutgefäße.

Während Kapillaren nur aus Endothelzellen und der Basalmembran sowie meist den außen anliegenden Perizyten bestehen, weisen Arteriolen und Venolen sowie Arterien und Venen zwei weitere Schichten auf, nämlich die Tunica media, die aus glatten Muskelzellen besteht und unterschiedliche Mengen elastische sowie kollagene Fasern enthält, und die Tunica adventitia (externa) aus überwiegend lockerem Bindegewebe, die als Verschiebeschicht mit dem angrenzenden Gewebe in Verbindung steht [2-3].

Endothelzellen regulieren den Stoff- und Gasaustausch und bilden die Grundbausteine für die subendothelialen Schichten: u.a Kollagen, Elastin, Proteoglykane sowie Stoffe, die bei der Blutgerinnung (z. B. von Willebrand –

Faktor, Prostazykline, Plättchen- aktivierender Faktor, Plasminogenaktivator), bei der Weitenregulierung der Gefäße (z.B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin, Endothelin) und bei der Angiogenese (Wachstumsfaktoren, z. B. bFGF, PDGF) eine Rolle spielen [3-5].

In der Pathogenese der Arteriosklerose nimmt das Gefäßendothel eine Schlüsselrolle ein.

Nach der von Ross et al. [6] definierten „response to injury“-Hypothese steht am Anfang des Prozesses der Atherogenese die endotheliale Dysfunktion. Die klassische Definition der endothelialen Dysfunktion nach Furchgott et al. [7] beschreibt die Vasokonstriktion von Gefäßen bei Gabe von Acetylcholin [8]. Auch Drexler et al. [9] bezeichnen als endotheliale Dysfunktion einen Zustand, in welchem Gefäße nicht mehr adäquat bzw. paradox auf vasodilatierende Reize reagieren. Bei der endothelialen Dysfunktion handelt es sich jedoch nicht nur um eine gestörte Balance zwischen Vasodilatation zu Vasokonstriktion, als essentielle Aufgabe des Endothels geht vor allem der hemmende Effekt auf die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen verloren [6].

Die endotheliale Dysfunktion wird durch das chronische Einwirken von schädigenden Faktoren ausgelöst: Rauchen, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hypertonie, Virusinfektion, bakteriellen Toxinen, oxidiertem LDL (oxLDL) und seinem Hauptbestandteil Lysophosphatidylcholin (LPC), Inflammation und anderen immunologischen Prozessen. So führt zum Beispiel die chronische Exposition von oxLDL am Endothel dazu, dass auf der Zelloberfläche vermehrt Monozyten, Makrophagen und T- Lymphozyten anhaften können. Diese Phagozyten können zwischen den Endothelzellen hindurch migrieren und in den subendothelialen Raum abwandern. Dort inkorporieren diese Zellen Cholesterin, welches im Rahmen der endothelialen Dysfunktion überschießend eingeschwemmt wird, und wandeln sich in Schaumzellen um. Diese Schaumzellen bilden zusammen mit glatten Muskelzellen die sog. „fatty-streaks“, aus denen sich die endgültigen arteriosklerotischen Plaques entwickeln [6] (Abb. 1). Durch Vermehrung der Schaumzellen wachsen diese Plaques weiter an, wodurch das Endothel zusätzlich geschädigt wird. An den so geschädigten

Endothelzellen können sich Thrombozyten anlagern und Wachstumsfaktoren wie PDGF sezernieren. Dieses PDGF, sowie Wachstumsfaktoren aus Makrophagen regen ihrerseits glatte Gefäßmuskelzellen dazu an, zu proliferieren und in die Intima einzuwandern, was zu einem weiteren Anwachsen der Plaque und einem Fortschreiten der Arteriosklerose führt. Am Ende dieser Kette steht die stenosierende, evtl. instabile fibröse Plaque, die bei Ruptur zum akuten Gefäßverschluss führen kann [6, 10-11](Abb. 2).

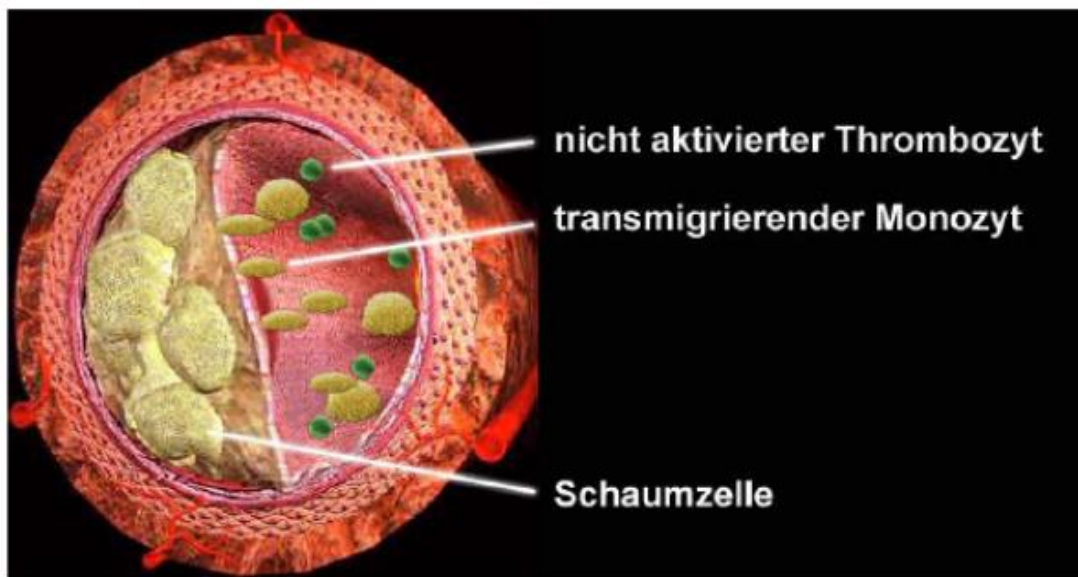


Abb.1 Arteriosklerotische Plaque

Transmigrierende Monozyten haben als Makrophagen modifizierte Lipoproteine aufgenommen und sich zu Schaumzellen entwickelt

[stark modifiziert nach der Homepage „The Internet Stroke Center
(<http://www.strokecenter.org>)].

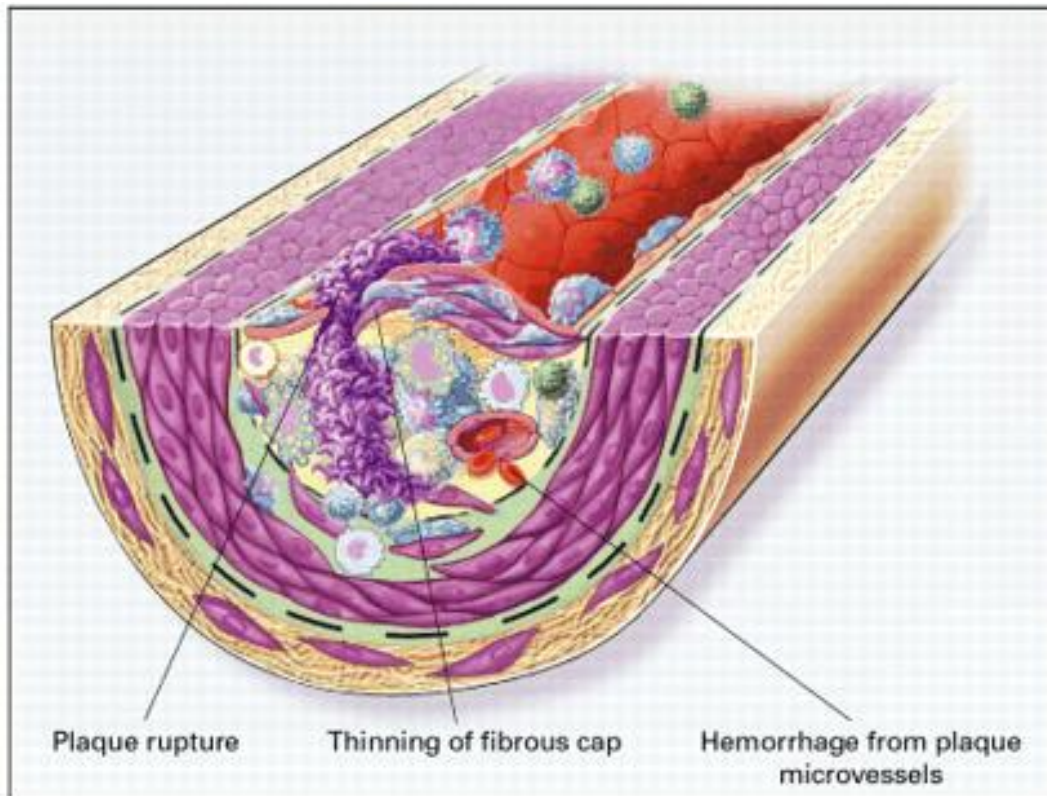


Abb. 2 Plaqueruptur

Rupturen der fibrösen Kappe oder Ulzerationen einer fibrösen Plaque können schnell zu Thrombosen führen und treten bevorzugt an dünnen Stellen der fibrotischen Kappe auf. Das Ausdünnen der fibrotischen Kappe, sowie Blutungen aus den Vasa vasorum der Arterie sind insbesondere durch Metalloproteinasen der Makrophagen verursacht (modifiziert nach der Homepage www.medscape.com/viewarticle).

1.3 Die Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), überwiegend durch Sprossung, aus einem vorgebildeten Kapillarsystem [12-13]. Hiervon zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen, welche als Vaskulogenese bezeichnet wird [12].

Man unterscheidet heute im Wesentlichen drei Formen der Neubildung von Blutgefäßen:

1. Die Vaskulogenese. Als Vaskulogenese wird die Neubildung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende Stammzellen (Angioblasten), die sich zu de-novo-Endothelzellen ausbilden, bezeichnet. Diese Form der Angiogenese spielt insbesondere bei der Entwicklung des Gefäßsystems während der Embryonalzeit eine Rolle (Abb. 3).
2. Die Angiogenese. Die Angiogenese ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von neuen Gefäßstrukturen, die eine Endothelzell-Auskleidung sowie auch glatte Muskelzellen und Perizyten aufweisen. Die Angiogenese spielt im adulten Leben eine wichtige Rolle, etwa als Reparatur-Prozess bei der Wundheilung (Abb. 3).
3. Die Arteriogenese. Bei der Arteriogenese kommt es zur Ausbildung von kleineren Arteriolen und Arterien, die sämtliche drei Wandschichten (Endothel, Tunica media, Tunica adventitia) besitzen.

Angiogenese kommt neben der Embryonalentwicklung auch physiologisch im adulten Organismus in den weiblichen Reproduktionsorganen vor [14], zum Beispiel während der Follikelreifung, der Bildung des Corpus luteum, der Entwicklung der Plazenta sowie in der Milchdrüse im Verlaufe der Gravidität [15]. Außerdem ist die Angiogenese entscheidend bei regenerativen Vorgängen wie der Wundheilung beteiligt [16-17]. Bei diesen Prozessen ist die Angiogenese streng reguliert, sie wird für kurze Zeit initiiert und anschließend komplett inhibiert. Dagegen spielt eine unkontrollierte Blutgefäßbildung bei verschiedenen Erkrankungen, wie der diabetischen Retinopathie, der rheumatoiden Arthritis und vor allem bei Tumorwachstum und Metastasierung eine maßgebliche Rolle [18]. Weiterhin ist die Angiogenese ein charakteristisches Merkmal im atherosklerotischen Prozess [19-20] und korreliert mit dem Schweregrad der Arteriosklerose [21]. Die Angiogenese beeinflusst den Prozess der Arteriosklerose auf zwei verschiedenen Ebenen. Auf der einen Seite fördert sie die Bildung von Kollateralgefäßen als Kompensationsmechanismus zur Durchblutungsbesserung [22], auf der anderen Seite führt sie zu einer Progression der Arteriosklerose durch Plaquestabilisierung auf dem Boden der Angiogenese in der atherosklerotischen Plaque. Die neu

gebildeten Kapillaren verursachen Intraplaque-Hämorrhagien und erhöhen das Plaquerupturrisiko [23-24].

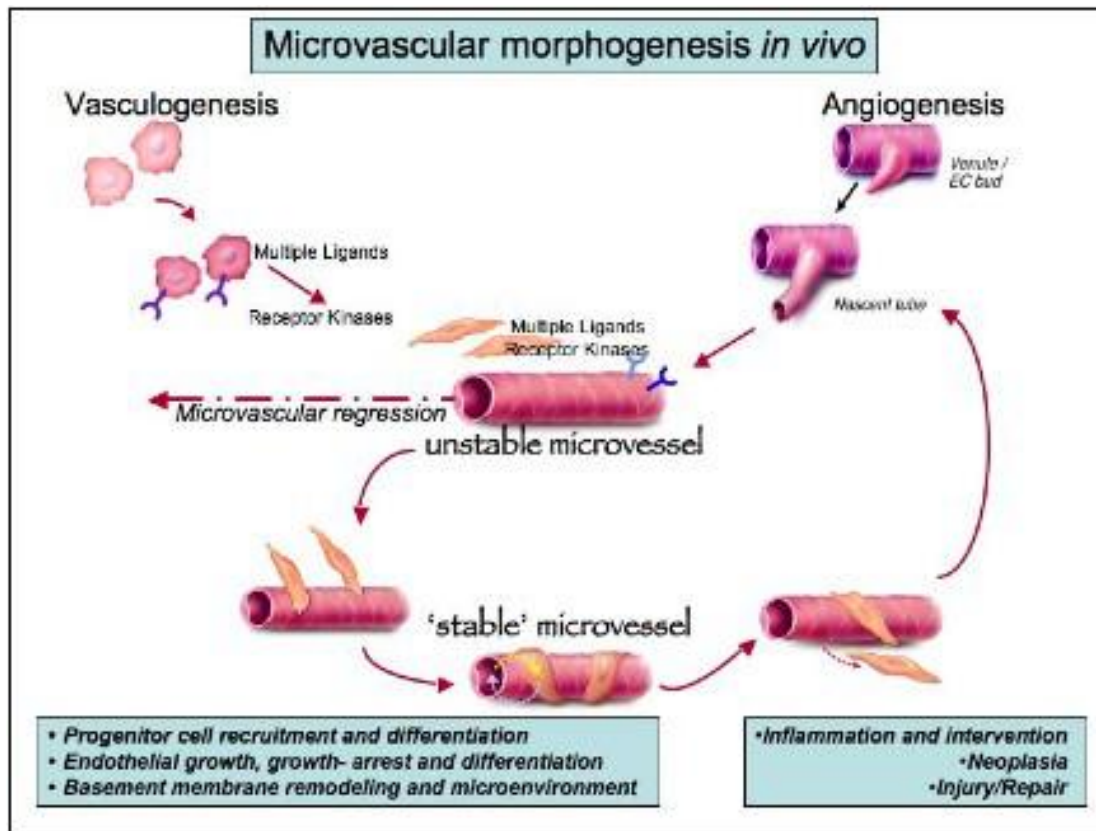


Abb. 3 Vaskulogenese und Angiogenese

a) Vaskulogenese: Neubildung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende Stammzellen

b) Angiogenese: Sprossung von neuen Kapillaren aus einem vorgebildeten

Kapillarsystem (modifiziert nach der Homepage www.tufts.edu)

1.3.1 Gefäßwachstum

Die Angiogenese stellt einen komplexen, kaskadenartig ablaufenden Vorgang dar, welcher aus dem intensiven Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten resultiert. Die angiogene Kaskade beinhaltet Wachstum und Stabilisierung des neuen Gefäßes [25]. Endothelzellen, aktiviert durch einen angiogenen Stimulus, müssen sich zur Initiierung der angiogenen Kaskade von

ihren Nachbarzellen lösen, bevor sie in das umgebende Gewebe migrieren können. Maßgeblich beteiligt sind hierbei Zelladhäsionsmoleküle [26].

Lokal werden die Basalmembran und die umgebende interstitielle Matrix aufgelöst [27]. Die hierfür notwendigen proteolytischen Enzyme, die zum Plasminogen-Aktivator (PA)- und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-System gehören [27], werden unter anderem von Endothelzellen und Perizyten gebildet [28]. Im Anschluss an die lokale Degradation der extrazellulären Matrix beginnen die ersten Endothelzellen an dieser Stelle in Richtung des angiogenen Stimulus zu migrieren. Hinter der Front der migrierenden Zellen erfolgt eine Proliferation von Endothelzellen, die zur Verlängerung des endothelialen Stranges führt. Die Stimulation der Zellen erfolgt durch eine Reihe von pro-angiogenen Faktoren, welche zum Teil aus der degradierten Matrix freigesetzt werden [29].

Ist ein Kapillarspross aus mehreren Endothelzellen gebildet, erfolgt an der Spitze des Sprosses erneut eine Degradation der extrazellulären Matrix, welches eine weitere Invasion der Zellen erlaubt. Die offenen Enden der gebildeten kapillären Sprosse fusionieren durch eine Anastomose und es kommt zur Schlingenbildung („loops“). Ausgehend von den neu gebildeten Schlingen entsteht durch weitere Migration und Proliferation von Endothelzellen schließlich ein Netzwerk kapillarähnlicher Strukturen [30]. Zur Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßes müssen zunächst Migration und Proliferation der Endothelzellen sowie die extrazelluläre Proteolyse eingestellt werden. Dann erfolgt die Rekonstruktion der Basalmembran und der interstitiellen Matrix [31] sowie bei den meisten Gefäßen zusätzlich die Anlagerung von Perizyten [32-33](Abb. 4). Die Stabilisierungsphase ist entscheidend für das Fortbestehen der neu gebildeten Gefäße, da unreife Gefäße bei Wegfall des angiogenen Stimulus schnell der Apoptose und Regression unterliegen können [34].

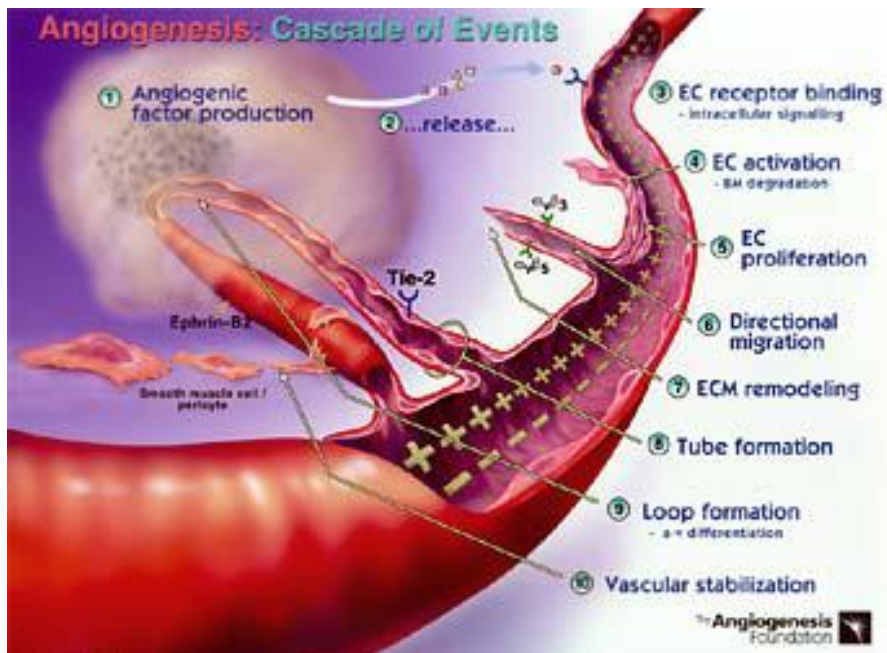


Abb. 4 Die angiogene Kaskade

(Modifiziert nach der Homepage <http://www.angio.org/>)

1.3.2 Die Regulierung der Angiogenese

Die Aufrechterhaltung des endothelialen Ruhezustandes erfolgt wahrscheinlich durch die Anwesenheit von endogenen anti-angiogenen Faktoren. Darüber hinaus kommen in Geweben mit physiologischer Angiogenese oft pro- und anti-angiogene Faktoren nebeneinander vor. Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass die Aktivierung des Endothels von der Balance zwischen den gegensätzlichen Regulatoren abhängt [35]. Die Dominanz pro-angiogener Faktoren führt zur Aktivierung des Endothels, während der endotheliale Ruhezustand Resultat des Vorherrschens von endogenen Inhibitoren bzw. der Erschöpfung pro-angiogener Faktoren ist. Diesbezüglich unterscheidet man zwei Formen der therapeutischen Anwendung des Prinzips Angiogenese: die anti-angiogenetische Therapie und die pro-angiogenetische Therapie. Sie spielen eine Rolle in der Therapie der koronaren Herzerkrankung, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der Tumorerkrankungen [36-37]. In den vergangenen Jahren wurden viele pro- und anti-

angiogene Faktoren identifiziert und in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen der Angiogenese auf ihre Wirkung und Wirkungsweise untersucht.

1.3.3. In vitro-Modelle der Angiogenese

Vaskuläre Explantate, d.h. kleine Stücke oder Ringe von Gefäßen, können in Kulturschalen, beschichtet mit Matrigel (lamininreicher Extrakt, gewonnen aus einem murinen Sarkom), Fibrin- oder Kollagengelen, eingebettet und kultiviert werden. Eingesetzt werden beispielsweise Explantate der Aorta [38-40] oder der Nabelschnur [41]. Explantate können zur Beobachtung aussprossender Gefäße über einen Zeitraum von 2-3 Wochen in Kultur gehalten werden. Sie erfüllen optimale Bedingungen für ein *in vitro*-Modell, da die Gefäßarchitektur erhalten bleibt und somit beispielsweise das Studium heterotypischer zellulärer Interaktionen möglich ist. Nachteilig ist jedoch, dass die individuellen Rollen der einzelnen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) in den verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade nicht voneinander zu unterscheiden sind [25].

Die erste Studie zur *in vitro*-Angiogenese wurde 1980 von Folkman und Haudenschild [42] in *Nature* publiziert, die nach einer Langzeitkultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen deren Organisation in kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen beobachteten. Inzwischen wurden viele *in vitro*-Modelle mit Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben, Organen und Gefäßen entwickelt, welche zum genauen Verständnis der Molekular- und Zellbiologie der Angiogenese beigetragen haben [25, 43-44]. In diesen *in vitro*-Assays können die meisten Stadien der angiogenen Kaskade, einschließlich Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen, auch unabhängig voneinander, analysiert werden [45].

Die Migration von Endothelzellen kann beispielsweise mithilfe der Boyden-Kammer untersucht werden. Diese Kammer besteht aus zwei übereinander liegenden Teilen, die durch einen Membranfilter getrennt sind. Chemotaktische Lösungen werden im unteren Teil der Kammer platziert, während die Zellen in die obere Hälfte eingesät werden. Nach Inkubation kann dann eine Migration der Endothelzellen durch den Filter in den unteren Teil der Kammer beobachtet werden, wo diese ausgezählt

werden können [46-48]. Die endotheliale Migration kann auch durch „Scratching“ (Verletzen, Ankratzen) eines konfluenten Zelllayers und anschließende Kalkulation der Zellen, die in den nun freien Bereich migrieren, studiert werden [49-50].

Proliferationsstudien basieren auf Zellzählung [51-54], Thymidin-Inkorporation [53-56] oder immunhistochemischer Färbung proliferierender Zellen mit Antikörpern gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und anschließender Zählung immunopositiver Zellen [57-58]. Grundsätzlich unterscheidet man zweidimensionale und dreidimensionale Modelle [25]. Eine andere Form zum Studieren der Bildung kapillarähnlicher Strukturen sind Kokulturmodelle von Endothelzellen mit Stromalenzellen.

Dreidimensionale Modelle basieren auf der Invasion aktivierter Endothelzellen in ein dreidimensionales Substrat aus extrazellulären Matrixkomponenten, wie Kollagen oder Fibrin. Die Endothelzellen können dabei von einem Gel überschichtet werden [59-60] bzw. auf einem Gel [61-62] oder zwischen zwei Gelschichten („Sandwich“) kultiviert werden [63-64]. Das Kulturmedium wird entweder vor der Polymerisation des Gels oder im Anschluss hinzugefügt. Entscheidend bei der Verwendung von Polymeren ist die genaue Bestimmung der Konzentration und biochemischen Parameter der Matrix, da diese die Dichte und mechanischen Eigenschaften des Substrates beeinflussen [65] und zu unterschiedlichen endothelialen Phänotypen führen können [66].

Darüber hinaus ist auch die Proteolyse der Matrix ein kritischer Faktor [61], der unter Umständen den Einsatz exogener Antiproteasen zur Limitierung der Geldegradation erforderlich macht [40].

Dreidimensionale Modelle der *in vitro*-Angiogenese berücksichtigen die dritte Dimension und stellen daher realitätsnahe *in vitro*-Systeme dar. Sie sind u.a. geeignet zur Untersuchung der Wirkung von pro-angiogenen [67-69] und anti-angiogenen Substanzen [70], der Rolle von Metalloproteinasen [52] und Zelladhäsionsmolekülen [71-73], sowie der Fibrinolyse während der Bildung kapillarähnlicher Strukturen [74-76].

Darüber hinaus eignen sie sich auch für Untersuchungen von Apoptose [77-79]. Auch die Bioverfügbarkeit pro-angiogener Faktoren durch Erzeugung eines Gradienten

kann in diesen dreidimensionalen Modellen nachgeahmt werden. Dies ist möglich, wenn die Zellen in ein Gel oder zwischen zwei Gelschichten eingesät werden und das Kulturmedium erst nach der Polymerisation der Gele hinzugegeben wird [80].

1.4. Die Rolle der Lipoproteine in der Atherogenese

1.4.1 Bedeutung der oxidierten Low Density-Lipoproteine

Zahlreiche klinische, epidemiologische und experimentelle Studien belegen, dass vor allem ein erhöhter Plasma-LDL (low density lipoprotein)-Spiegel einen entscheidenden Risikofaktor für die Atherogenese darstellt [81-82].

Die Funktion dieser Stoffgruppe besteht im Transport von Triglyceriden und Cholesterin durch das Plasmakompartiment zu ihren verschiedenen Bestimmungsorten. Sie sind strukturell kugelförmige Lipid-Protein-Komplexe mit einem lipophilen Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern und einer hydrophilen Schale aus Phospholipiden und freiem Cholesterin. Als weitere Komponente der Lipoproteinoberfläche enthalten sie spezielle Proteine, sogenannte Apoproteine, die maßgeblich die funktionelle Eigenschaft der Lipoproteine bestimmen. 1979 machten Goldstein et al.[83] die Entdeckung, dass chemisch modifizierte LDL, wie acetylierte und malondialdehyd-konjugierte LDL, über einen bestimmten Rezeptor in Makrophagen und Monozyten aufgenommen werden und deren Umwandlung in Schaumzellen fördern. Dieser sogenannte Scavenger-Rezeptor ist spezifisch für modifizierte LDL; er nimmt keine nativen LDL auf. In den folgenden Jahren fanden Henriksen et al. [84] heraus, dass oxidativ modifizierte LDL vom Scavenger-Rezeptor erkannt werden und Endothel- und glatte Muskelzellen die LDL-Oxidation in vitro fördern [85]. 1989 konnten Ylä-Herttuala et al. [86] zeigen, dass sich in atherosklerotischen Läsionen hauptsächlich oxidativ modifizierte LDL befinden.

Heute wird die oxidative Modifizierung der LDL als der atherogene Effekt der Lipoproteine angesehen [81, 87](Abb. 5). Man geht davon aus, dass die oxidative Schädigung von Makromolekülen im Allgemeinen einen wichtigen

Beitrag zu degenerativen Alterungsprozessen liefert [88]. Bei Patienten mit KHK und peripherer AVK finden sich im Plasma erhöhte Spiegel an Lipidperoxiden[89].

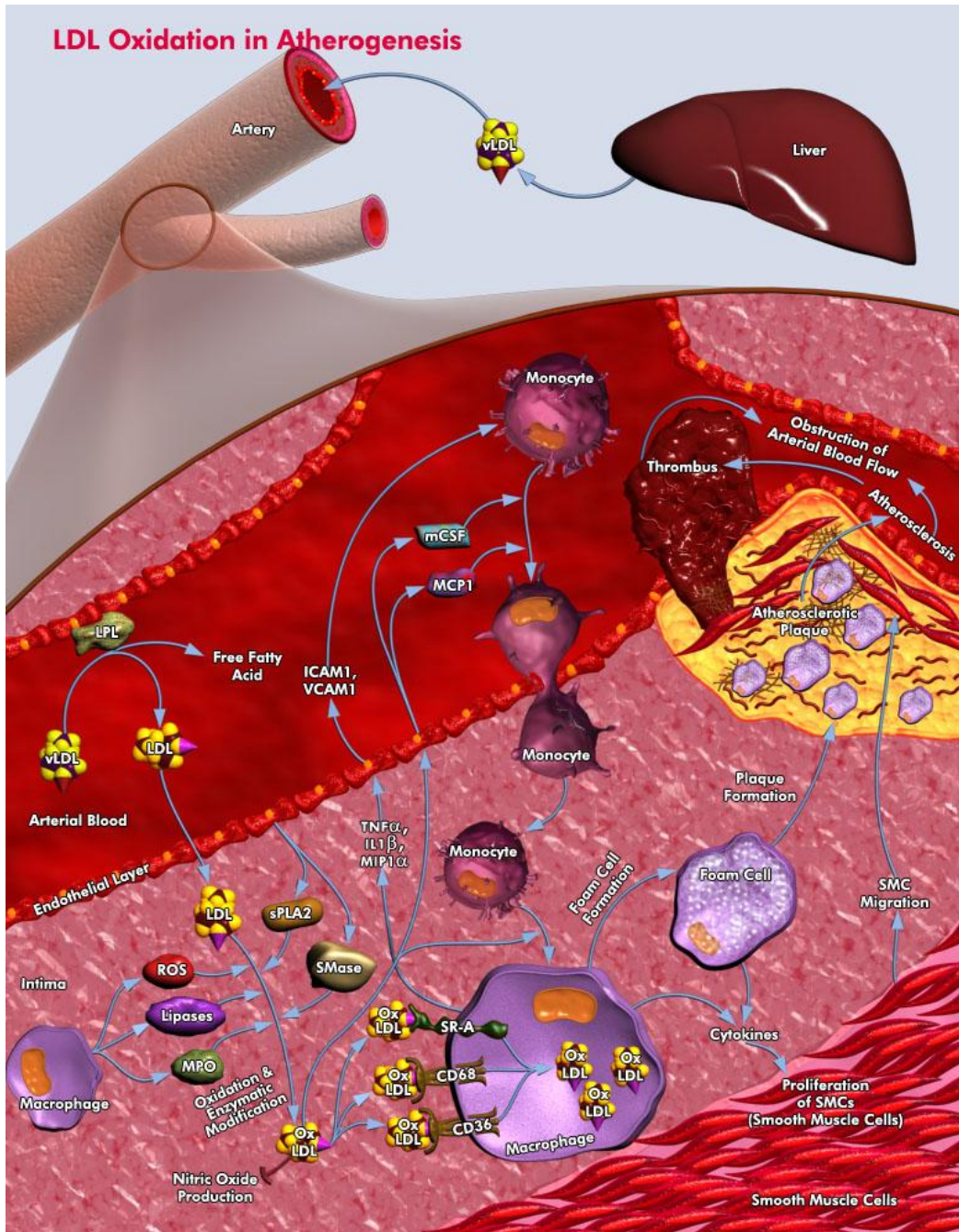


Abb. 5 Die Rolle von LDL in der Arteriosklerose

(modifiziert nach der Homepage www1.qiagen.com/Geneglobe/Pathways)

1.4.2 Pathophysiologie der Atherogenese

Die im Blut zirkulierenden LDL akkumulieren subendothelial in der Gefäßwand der Arterien und werden dort oxidativ modifiziert. Die sogenannten minimal modifizierten LDL induzieren die Produktion von Chemotaktinen und Wachstumsfaktoren durch ortsständige Zellen, wie z. B. P-Selektin [90-91], Monocyte-chemoattractant-protein 1 (MCP-1) [92], Monocyte-colony-stimulating-factor (M-CSF) [93-94]. Dadurch werden Monozyten angelockt, stimuliert und in Makrophagen umgewandelt [95]. Durch die Umwandlung von Monozyten zu Makrophagen mit hoher oxidativer Kapazität wird die weitere Oxidation der LDL gefördert [84]. Außerdem produzieren die Makrophagen chemotaktisch wirksamen platelet-derived growth factor (PDGF) und Wachstumsfaktoren, die auf glatte Muskelzellen wirken [11].

Das Apoprotein B-100 der vollständig oxidierten LDL (ox. LDL) ist so stark verändert, dass die LDL nicht mehr vom LDL-Rezeptor, sondern vom Scavenger-Rezeptor auf den Makrophagen erkannt und aufgenommen werden. Der Scavenger-Rezeptor unterliegt keinem negativen Feedbackmechanismus [96-97]. So kommt es zur massiven Aufnahme von oxLDL in die Makrophagen und zu deren Umwandlung in Schaumzellen.

Zusätzlich zur Förderung der Schaumzellbildung haben oxidierte LDL bzw. Produkte der Lipidoxidation folgende Effekte.

Ox.LDL stimulieren die Sekretion von Interleukin-1, einem Wachstumsfaktor für glatte Muskelzellen [98], und verstärken die adhäsiven Eigenschaften der Endothelzellen [99]. Weiterhin aktivieren vollständig oxidierte Lipide einen NF κ B-ähnlichen Transkriptionsfaktor und induzieren die Expression von Genen, die NF κ B-Bindungsstellen enthalten [100]. Die Proteinprodukte dieser Gene initiieren die entzündliche Antwort, die zur Bildung von fatty streaks führt [101].

Lysophosphatidylcholin, ein biologisches Lipid und Produkt der LDL-Oxidation, ist ein Chemotaktin für Monozyten [102] und T-Lymphozyten [103]. Es induziert die Bildung der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 [104] und verstärkt die Expression von PDGF und heparin-binding epidermal growth factor in Endothelzellen und glatten Muskelzellen [105]. Außerdem wirken vollständig oxidierte LDL in vitro toxisch auf

Makrophagen und könnten so an der Ausdehnung des entzündlichen Prozesses beteiligt sein [106].

Minimal modifizierte LDL induzieren in Endothelzellen [107] und Monozyten [108] die Produktion von Gewebethromboplastin, welche normalerweise nur in der Adventitia erfolgt. Dadurch kommt es bei Arterienverletzungen mit Freilegung der Adventitia zur Aktivierung der Gerinnung. Endothelzellen, die oxLDL ausgesetzt sind, bilden verstärkt einen Inhibitor des Plasminogenaktivators [109]. Das strömende Blut wird bei Plaqueruptur hohen Gewebethromboplastinspiegeln ausgesetzt, und die Thrombusbildung mit den entsprechenden klinischen Erscheinungen wird initiiert. Die reaktive Vasodilation durch NO und die daraus resultierende mechanische Entfernung des Thrombus wird durch eine ebenfalls oxLDL-vermittelte lokale Reduktion des NO verhindert [110].

1.4.3 Rolle von LPC bei der Atherogenese

LPC gehört zu der Familie der Lysophospholipide (LPL). LPL sind Metabolite aus der Biosynthese von Phospholipiden der Plasmamembranen. Lysophospholipide (LPL) gewannen als Botenstoffe in den letzten Jahren zunehmend an Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), an welche sie mit hoher Affinität binden.

Lysophosphatidylcholin (LPC) entsteht durch die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylcholin mittels der Calcium-unabhängigen Phospholipase A2 (iPLA2) während der LDL-Oxidation [111] (Abb. 6).

LPC ist bereits seit langem als Hauptbestandteil von oxidierten LDL-Partikeln bekannt [102, 112].

Im Speziellen ist LPC verantwortlich für viele Effekte von ox-LDL [113-114]. Zahlreiche Studien beweisen seine atherogene Wirkung durch Inhibierung der endothelabhängigen Relaxation, Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Stimulation der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen [115] sowie Endothelzellen [116-117].

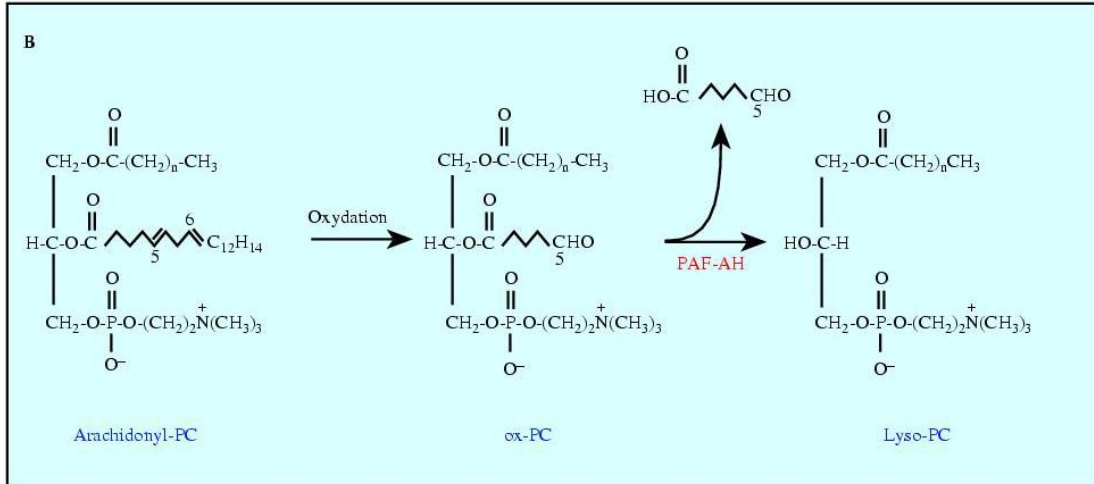


Abb. 6 Entstehung von LPC

Die Hydrolyse von ox-PC durch iPLA2 oder anders genannt Plasminogen-Aktivator-Faktor-Acetylhydrolase (PAF-AH) und die Entstehung von LPC

1.5 Die Pharmakotherapie mit Statinen

Da die Hyperlipidämie eine der Hauptursachen der Atherosklerose ist, wurde die Senkung des erhöhten Serum-Cholesterins zum zentralen Bestandteil der medikamentösen Therapie. Die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) hemmen in der Leberzelle die endogene Cholesterinbiosynthese. Dadurch werden in der Leberzelle LDL-Rezeptoren verstärkt exprimiert, was eine Abnahme des plasmatischen LDL-Spiegels zur Folge hat (Richter WO et al. 1995).

Günstige Effekte auf Morbidität und Mortalität wurden durch mehrere große Studien eindeutig belegt. Die Reduktion ischämischer Ereignisse (Erst- als auch Folgeereignisse) und die Senkung der Mortalität sind für Statine in der Sekundärprävention [118-120] als auch in der Primärprävention [121] belegt. Der Erfolg der Statintherapie ist nicht nur in der Senkung des Plasmalipidspiegels, sondern auch in der günstigen Beeinflussung weiterer, an der Atherogenese beteiligter Prozesse begründet. Diese pleiotrop genannten Effekte sind größtenteils eine Folge der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. Auf dem Syntheseweg des Cholesterins entstehen im Mevalonat-Stoffwechsel

die Intermediärprodukte Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat, sogenannte Isoprenoide. Diese lipophilen Moleküle werden im Rahmen von posttranslationalen Modifikationen an verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle gebunden. Insbesondere GTP-bindende Proteine wie Rac, Rho oder Ras benötigen für ihre korrekte Lokalisation und Funktion die Isoprenylierung durch Geranylgeranylpyrophosphat bzw. Farnesylpyrophosphat. Ras und Rho regulieren den Zellzyklus. Rho spielt eine wichtige Rolle in der Funktion des Zytoskeletts, der Aktivierung von glatten Muskelzellen und des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI) und der Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie des Gewebs-Plasminogen-Aktivators (tPA) [122](Abb. 7).

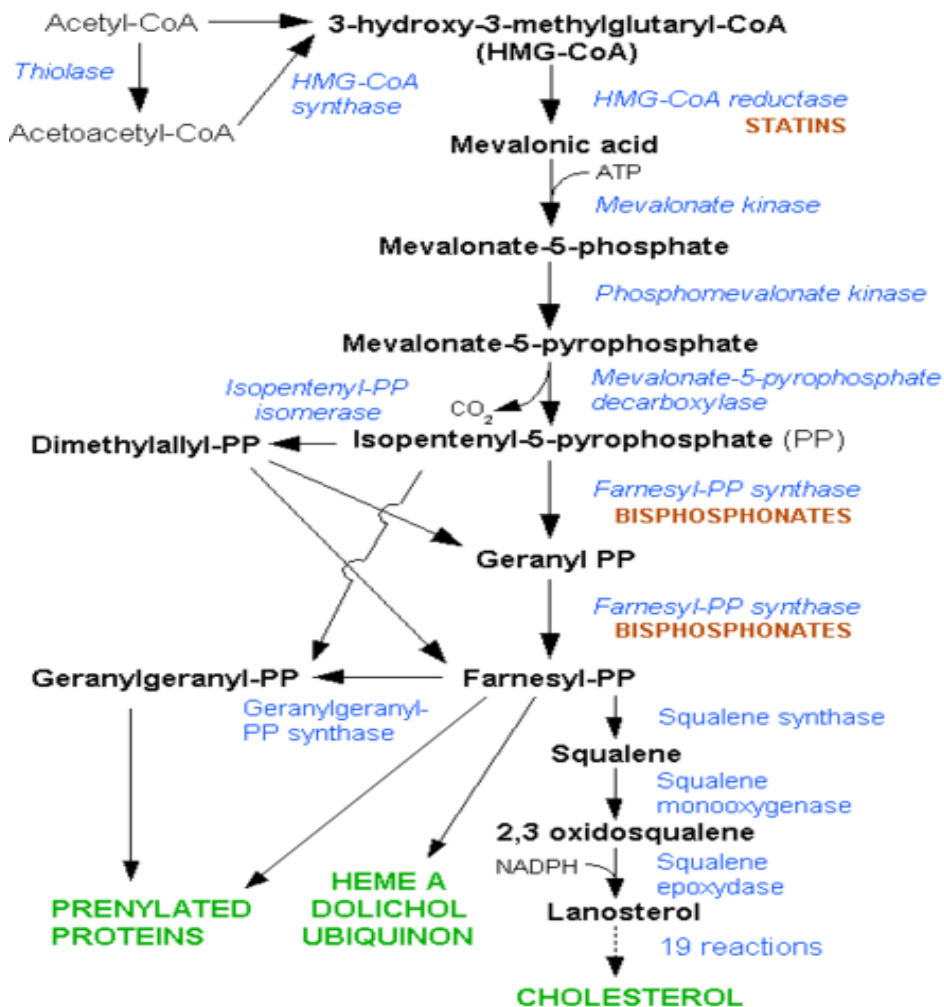


Abb. 7 Die Rolle von Statinen in der Cholesterol- und Isoprenoidsynthese

1.5.1 Pleiotrope Effekte von Statinen

1.5.1.1 Endotheliale Funktion: NO-Bioverfügbarkeit und Endothelin-1-Synthese

Eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch eine Statintherapie konnte bereits vor Senkung des LDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Eine Therapie mit Statinen führt zu verstärkter endothelialer NO-Freisetzung durch verstärkte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Ursache hierfür ist die Stabilisierung der mRNA. Ferner erfährt die eNOS eine Aktivitätssteigerung durch Aktivierung der Akt-Kinase und durch verminderte Expression des eNOS-Inhibitors Caveolin-1.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass Statine die Synthese des vasokonstriktiv wirkenden Endothelin-1 (ET-1) hemmen. Physiologisch wird die ET-1-Synthese durch NO inhibiert. So kann die verstärkte NO-Freisetzung auch indirekt die ET-1-Produktion hemmen [123-124].

1.5.1.2 Antioxidative Effekte

Oxidativer Stress spielt eine Hauptrolle in der Atherogenese. Sauerstoffradikale bauen NO ab, modifizieren oxidativ LDL-Partikel und verstärken die endotheliale Dysfunktion. Statine hemmen die NADPH-abhängige-Oxidase in Endothelzellen und verstärken die Katalase-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen. So werden weniger Sauerstoffradikale gebildet und verstärkt abgebaut. Durch eine verminderte Oxidationsfähigkeit aktivierter Makrophagen wird ebenfalls die oxidative Modifikation von LDL-Partikeln unter einer Therapie mit Statinen vermindert. Eine verstärkte NO-Freisetzung ist ebenfalls mit einem verstärkten Abbau von freien Sauerstoffradikalen verbunden[124-125].

1.5.1.3 Antiinflammatorische Effekte

Die Interaktion zwischen Blutleukozyten und Gefäßendothelzellen stellt einen wichtigen Schritt in der Entzündungsreaktion an der atherosklerotischen Plaque dar. Eine Verminderung der Interaktion ist bedeutsam für die Progression der Erkrankung [126]. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Statintherapie die Expression von Adhäsionsmolekülen, aber auch die direkte Interaktion zwischen Endothelzellen (P-Selectin) und Leukozyten (ICAM-1, LFA-1, CD11a, CD11b, CD18, CD40) verringert. Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, MCP-1) wird ebenfalls durch Statine reduziert. Zusätzlich konnte auch eine Statin-vermittelte Reduktion des Plasma-CRP-Spiegels erreicht werden [123-124, 127-128].

1.5.1.4 Plaquestabilität

Die Stabilität einer atherosklerotischen Plaque wird durch die Dicke der fibrösen Kappe, den Fettanteil, sowie den Anteil von glatten Muskelzellen und Makrophagen bestimmt. Statine senken nicht nur den extrazellulären Cholesterolgehalt. Sie inhibieren auch die Migration von Monozyten, deren Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen, und sie verhindern Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen. Damit wird durch eine Statintherapie der progressiven Destruktion der Gefäßwandstrukturen entgegengewirkt und die Plaque stabilisiert. Weiterhin konnten neben antiproliferativen auch pro-apoptotische Eigenschaften von Statinen an glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden [129-130].

1.5.1.5 Thrombozyten und das plasmatische Gerinnungssystem

Hyperreaktive Thrombozyten und Gefäßwandverletzungen führen zu plötzlichen thrombotischen Ereignissen. Die Behandlung mit Statinen zeigt sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien günstige Auswirkungen. Verschiedene Mechanismen tragen zu einer Hemmung der Thrombozytenreaktivität unter einer Therapie mit Statinen bei [131-132].

Eine Hemmung der Thrombozytenreaktivität trat nach mehrwöchiger Statintherapie auf. Zusätzlich konnte mittels in-vitro-Experimenten eine direkte antithrombozytäre Wirkung von lipophilen Statinen nach 30-minütiger Inkubation mit Thrombozyten nachgewiesen werden[133].

1.5.1.6 Neovaskularisation

Exzessive Neovaskularisation wurde unter anderem bei verschiedenen Krebserkrankungen, aber auch bei der Atherosklerose nachgewiesen. Ergebnisse früherer Studien zeigen eine Diskrepanz bezüglich der Wirkung der Statine auf die in vitro-Angiogenese. Während einige Studien einen antiangiogenetischen Effekt der Statine beschreiben [134], weisen andere eine proangiogenetische Wirkung nach [135].

1.6 Lipid Rafts

Biologische Membranen sind keine starren Strukturen, denn die Lipide und viele Membranproteine sind permanent in vorwiegend lateraler Bewegung. Ausgehend von dieser Beobachtung entwarfen Singer und Nicolson im Jahr 1972 [136] ein Modell für die Organisation biologischer Membranen, das flüssige Mosaik (*fluid mosaic*). Dieses Modell beschreibt die Membran als zweidimensionale Lösung, bestehend aus gerichteten globulären Proteinen und Lipiden. Dabei können die Membranproteine lateral ungehindert in der flüssigen Lipidmatrix diffundieren und sind homogen über diese verteilt.

Mit dem heutigen Wissen müssen biologische Membranen jedoch eher als ein „Mosaik von Lipid-Domänen“ beschrieben werden. So haben Simons und Kollegen [137] beobachtet, dass die Assoziation zwischen Cholesterin und Sphingolipiden zur Ausbildung von Mikrodomänen führt, die wie Flöße in einer Umgebung aus Glyzerophospholipiden schwimmen. Diese Einheiten auf der Plasmamembran werden deshalb auch als Lipid Rafts bezeichnet [138-139].

1.6.1 Zusammensetzung der Lipid Rafts

Die Bildung von Mikrodomänen kann durch die strukturellen Eigenschaften der Membranlipide erklärt werden. Sphingolipide unterscheiden sich von anderen Phospholipiden durch ihre langen, meist gesättigten Fettsäureketten, die ein dichtes Aneinanderpacken der Sphingolipide erlauben. Es entsteht eine gelartige, geordnete Phase. Durch die Interkalation von Cholesterinmolekülen wird die laterale Mobilität erhöht.

Dieser Membranzustand wird als *liquid-ordered* bezeichnet. Im Gegensatz dazu verhindern die geknickten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Glycerophospholipide eine starke Interaktion zwischen diesen Phospholipiden. Die Membranbereiche bleiben flüssiger oder *liquid-disordered* (Abb. 8,9).

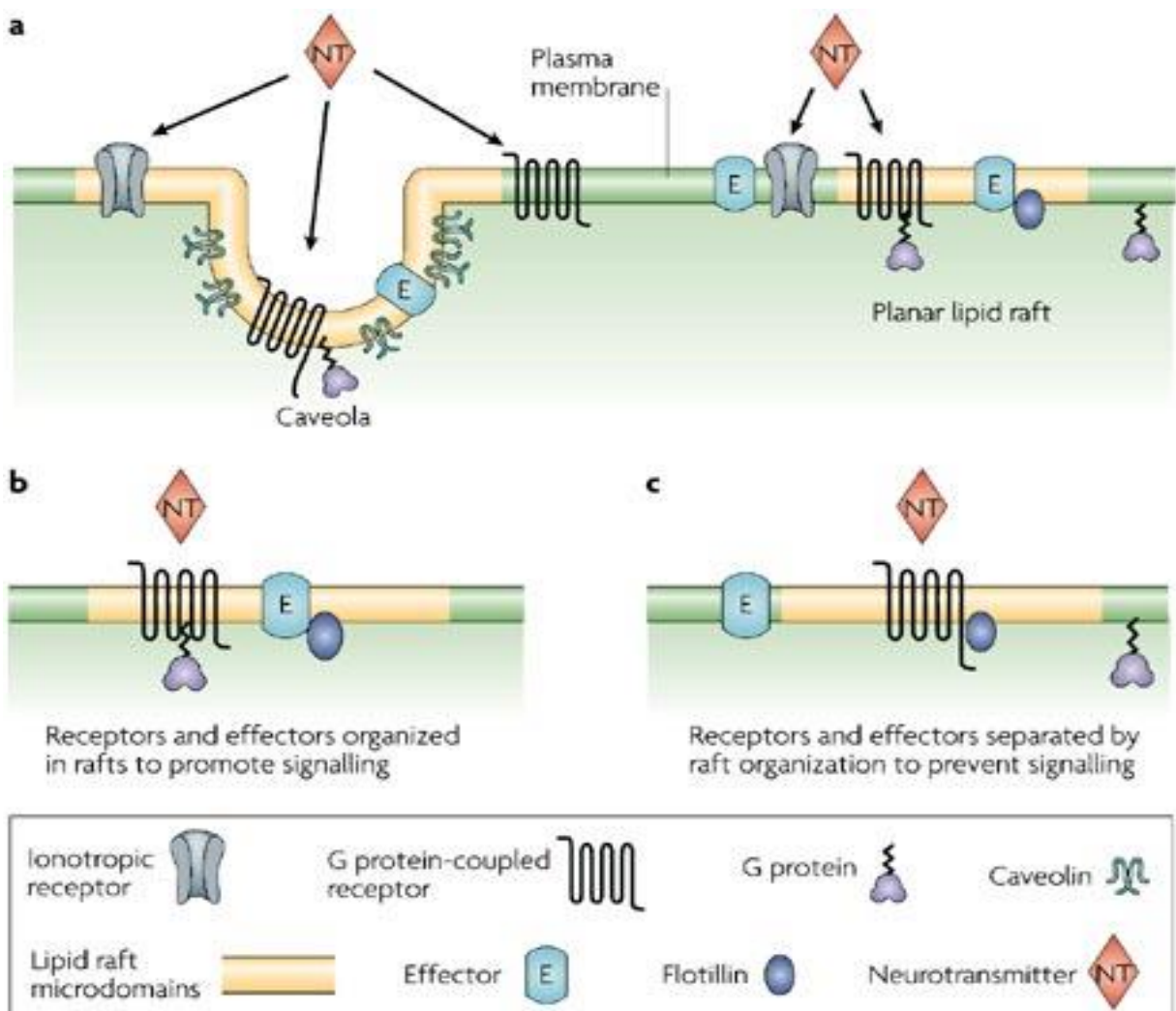


Abb. 8 Lipid rafts

Lipid rafts sind Cholesterin- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen. Es gibt zwei bekannte Raftdomänen in den Zellmembranen: die planaren lipid rafts und die caveolae. Durch Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle spielen sie eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion (modifiziert nach der Homepage www.nature.com).

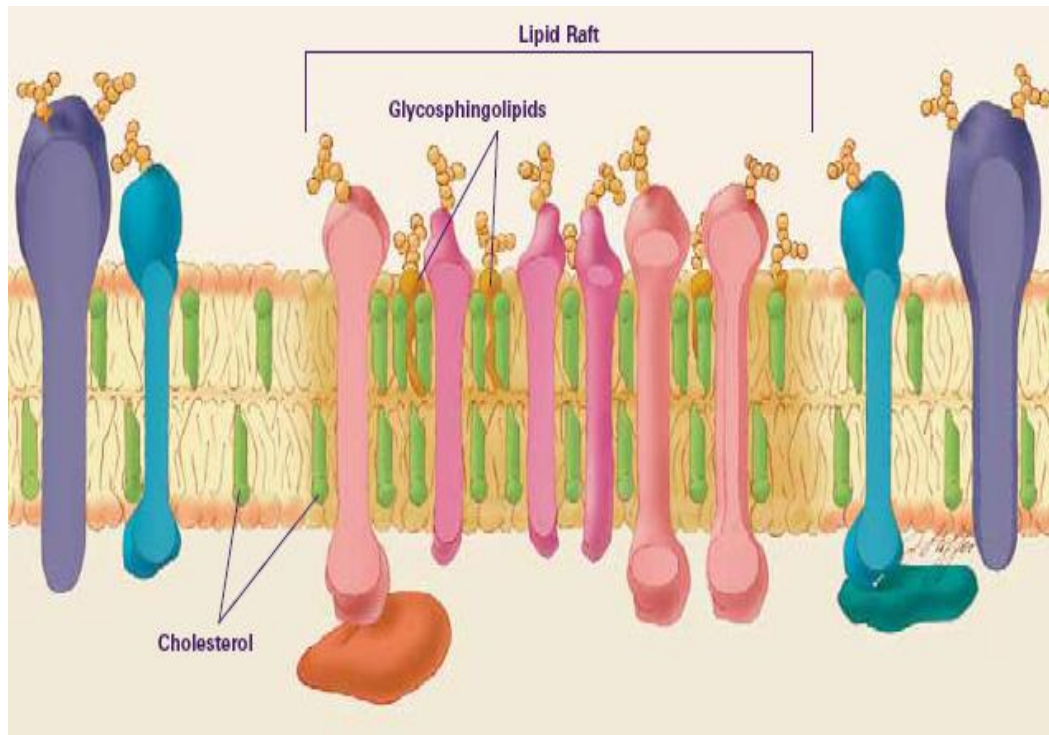


Abb. 9 Lipid Rafts

Mikrodomäne reichhaltig an Cholesterin und Spingolipiden (modifiziert nach der Homepage publications.nigms.nih.gov)

Neben Cholesterin und Sphingolipiden sind Lipid Rafts hoch angereichert mit Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerten Molekülen, signaltransduzierenden Molekülen sowie einigen transmembranen Proteinen [140-141]. Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-verankerte Proteine assoziieren aufgrund der langen, gesättigten Fettsäurekette des C-terminalen GPI-Ankers präferentiell mit Lipid Rafts [139]. Über die Mechanismen der Assoziation von transmembranen Proteinen mit diesen Mikrodomänen ist wenig bekannt. Eine Möglichkeit zur Rekrutierung in Lipid Rafts ist die Palmitylierung der Proteine, obwohl nicht alle palmitylierten Proteine in Rafts lokalisieren und nicht alle

transmembranen Raftproteine palmitoyliert sind [142]. Auch die Sequenz der transmembranen Domäne kann eine Assoziation mit Lipid Rafts vermitteln [143]. Weiterhin sind Lipid Rafts angereichert mit zweifach acylierten Proteinkinasen der Src-Familie, wie Lck [144], G-Proteinen [145] und anderen signaltransduzierenden Molekülen, die den Rafts auf der zytoplasmatischen Seite anheften.

1.6.2 Analyse der Lipid Rafts

Durch die als liquid-ordered bezeichnete Anordnung sind die Sphingolipid-Cholesterin-Komplexe bei niedrigen Temperaturen relativ unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien wie z.B. Triton X-100 [141]. Aufgrund ihrer geringen Dichte floaten Lipid Rafts nach kalter Extraktion in Triton X-100 bei der Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradienten nach oben [146]. Lipid Rafts werden deshalb auch als Detergent-insoluble Glycolipid-rich Domains (DIGs), Glycosphingolipid-enriched Membranes (GEMs), Low-density Triton-insoluble (LDTI) oder Detergent-resistant Microdomains (DRM) bezeichnet.

Rietveld und Simons (1998) [147] haben gezeigt, dass Cholesterin essentiell für die Integrität der Lipid Rafts ist. Die Manipulation des Cholesteringehalts bietet demnach eine Möglichkeit, die Funktion dieser Mikrodomänen zu untersuchen. Der Entzug von Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) ist dabei die am häufigsten angewandte Methode [148]. Es sollte aber beachtet werden, dass die Depletion von Cholesterin nicht nur die Funktionalität der Lipid Rafts beeinflusst, sondern darüber hinaus zelluläre Prozesse verändert und sogar intrazelluläre Organellen betrifft [149]. Neben der Behandlung mit MCD kann der Gehalt an zellulärem Cholesterin durch Inhibition der Biosynthese reduziert werden. Hierbei finden Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, sog. Statine, eine breite Anwendung [150].

Je nach untersuchtem Zelltyp schwankt die Größe der Lipid Rafts zwischen 25 und mehreren 100 nm.

1.6.3 Funktionelle Bedeutung der Lipid Rafts

Erste Untersuchungen zur Funktion von Mikrodomänen basierten auf der Beobachtung, dass die apikale Membran in polarisierten epithelialen Zellen im Vergleich zur basolateralen Membran stark mit Glykosphingolipiden angereichert ist [151]. Van Meer und Simons postulierten im Jahr 1988 [152], dass diese unterschiedliche Komposition durch das Sortieren von Lipiden und Proteinen in spezialisierte Mikrodomänen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und anschließenden apikalen Transport zur Zelloberfläche reguliert wird. Neben der Bedeutung der Lipid Rafts als Sortierstationen für Proteine [138, 153] wurde eine Beteiligung dieser Mikrodomänen im endozytotischen Transport beschrieben [154]. Darüber hinaus spielen Lipid Rafts eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in T- und B-Zellen [155] sowie der allergischen Reaktion [156]. Es wird postuliert, dass das Clustern von Rezeptoren den Zusammenschluss von Lipid Rafts in größere Komplexe zur Folge hat. Proteine des Signaltransduktionskomplexes, die zuvor in voneinander isolierten Mikrodomänen lokalisierten, werden so in engen Kontakt gebracht und dadurch die Signalkaskade gestartet [137] [157].

Viele Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten, „missbrauchen“ Lipid Rafts als Eintrittspforte in die Wirtszelle. So kann das von dem Bakterium *Vibrio cholerae* produzierte Cholera-Toxin an das Gangliosid GM1 binden, welches auch als Raftmarker bekannt ist [158]. HIV-1 nutzt Lipid Rafts, um sich an die Oberfläche von T-Zellen anzuheften [159]. Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen Lipid Rafts und *Morbus Alzheimer* zu bestehen. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch die Bildung von senilen Plaques, die durch Ablagerung des β -amyloiden Peptids (A β) entstehen. Ehehalt et al. [160] konnten zeigen, dass die Spaltung des Alzheimer-Vorläufer-Proteins (APP) zu A β von der Integrität der Lipid Rafts abhängt. Dieser Prozess wird offensichtlich durch Cholesterin reguliert, da der Entzug von Cholesterin die β -Spaltung *in vitro* und im Tiermodell verhindert [138, 161]. Zudem kann durch Blockade der Cholesterinsynthese mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Prävalenz von *Morbus Alzheimer* in Patienten reduziert werden [162-163]. Schließlich sind Lipid Rafts essentiell für die Migration von Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Lipid Rafts an der Spitze von Adenokarzinomzellen akkumulieren, die in einem chemotaktischen Gradienten

migrieren. Durch Depletion des zellulären Cholesterins wird die gerichtete Migration gestört [164-165].

1.7 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Zusammenhänge wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Beeinflusst LPC das endotheliale Sprouting, und wie wird der LPC-Effekt durch die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin moduliert?
2. Wenn die Statine Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin das endotheliale Sprouting modulieren, tun sie das
 - über einen spezifischen HMG-CoA-Reduktase-Weg, wenn ja
 - durch Modulation des membranären Cholesterin, oder
 - durch Beeinflussung der Prenylierung?
3. Wenn die Statine Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin durch Modulation der Prenylierung das endotheliale Sprouting beeinflussen, greifen sie in die Farnesylierung oder in die Geranylierung ein?
4. Wie wird die LPC-induzierte endotheliale Proliferation durch die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin moduliert?
5. Basieren die Statin-Effekte beim Sprouting und bei der Proliferation auf den gleichen Mechanismen?
6. Gibt es einen vergleichbaren Einfluss auf die endotheliale Migration?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und biologische Stoffe

- HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
- Aqua ad iniectabilia Fa, Pharmacia & Upjohn (Erlangen, Deutschland)
- Lysophosphatidylcholin (LPC, L- α -Lysophosphatidylcholine- γ -O-acyl), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Fluvastatin (C₂₄H₂₅FNNaO₄), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Simvastatin (C₂₅H₃₉O₆Na), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Cerivastatin (C₂₆H₃₄FNO₅), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Methyl- β -Cyclodextrin (MCD), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Mevalonat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Geranylgeranylpyrophosphat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Farnesylpyrophosphat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ethanol reinst., Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Fibronectin, Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Trypsin, PAA Laboratories (Linz, Österreich)
- Hank's balanced salt solution (HBSS), Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
- Waymouth Waschmedium, Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
- Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
 - ECGS/H
 - Fetal Calf Serum
 - Epidermal Growth Factor
 - Hydrocortison
 - Basic Fibroblast Factor
- Methylzellulosepulver, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Essigsäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Collagen, BD Biosciences (San Jose, USA)
- Collagenaselösung, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.1.1 Geräte

- Mikroskop Olympus IX 51, Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
- Mikroskop Axiovert 135, Zeiss AG (Jena, Deutschland)
- Mikroplatten, Greiner-bio-one GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten (1ml), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Bluemax/Zellkulturflaschen, BD Falcon (Franklin Lakes, NJ. USA)
- Pipetten (5/10/25ml), Greiner-bio-one GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
- Flow (Sterilbank), NUNC (Wiesbaden, Deutschland)
- Brutschrank, Hera Cell Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.2 Zellkultur

Die Endothelzellen wurden aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) nach der Methode von Jaffe et al. isoliert, identifiziert und kultiviert [166].

2.2.1 Zellisolierung

Die Nabelschnüre wurden nach der Abnabelung in einen sterilen Becher gegeben. Mit einer sterilen Kompresse wurde die Nabelschnur gesäubert und anschließend auf Verletzungen untersucht. Mit einer Knopfkanüle wurde die Nabelschnurvene aufgesucht und zweimal mit 50 ml HBSS durchgespült.

Wenn sich die Vene bei diesem Spülvorgang als dicht erwies, konnte sie am anderen Ende abgeklemmt werden. Danach wurde die Vene mit 0.025% Collagenaselösung gefüllt und im Brutschrank bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, um die humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) aus ihrem Zellverband zu lösen. Inzwischen wurde in ein 50 ml-Röhrchen 1 ml fetales Kälberserum (FCS) vorgelegt. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnurvene mit 30ml HBSS gespült. Die HUVEC enthaltende Spüllösung wurde in dem vorbereiteten Röhrchen aufgefangen und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Zellpellet in 5 ml Endothelial Basal Medium resuspendiert. Die Zellen wurden abschließend auf ein mit Fibronectin vorbeschichtetes 25cm²-Plastikkulturschälchen ausgesät.

2.2.2 Zellidentifikation

Die Identifikation der Zellen als Endothelzellen geschah durch lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie.

Im Lichtmikroskop hilft zur Identifikation das sog. „Cobblestone“- Phänomen: Endothelzellen bildeten einen kopfsteinpflasterartig angeordneten Monolayer. Fibroblasten oder glatte Muskelzellen hingegen imponieren als spindelförmige Zellen, die sich im Zellverband nicht als Monolayer, sondern als sich gegenseitig überlappende Zellgruppierung darstellen.

2.2.3 Kultivierung

Die Kultivierung der HUVEC wurde in einem Brutschrank bei 37°C mit einem CO₂-Anteil von 5% durchgeführt. Die Zellen wurden aus der Primärkultur in mit Fibronectin vorbeschichtete 25 cm²-Plastikkulturflaschen überführt, sobald diese zu einem „Zellrasen“ zugewachsen waren.

Als Nährmedium wurde das Endothelial Cell Growth Medium verwendet. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Eine Passagierung der Zellen wurde immer dann durchgeführt, wenn sie ihre Kulturflasche konfluent bewachsen hatten. Um die Zellen zu passagieren, wurden sie kurzzeitig mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop konnte beobachtet werden, wie die Zellen sich abkugeln und von dem Boden der Kulturflaschen ablösen. Dieser Vorgang wurde durch die Gabe von FCS abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und in mit Fibronectin vorbeschichtete Kulturflaschen in einer Dichte von ca. 3000 Zellen/cm² erneut ausgesät.

Die Wachstumsdichte und die Zellmorphologie wurden täglich unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Eventuelle Kontaminationen mit Bakterien konnten

so ebenfalls erkannt werden. Kulturgefäße, die sich als mikrobiell kontaminiert herausstellten, wurden verworfen.

2.3 Proliferationsassay

Die Proliferation der Endothelzellen ist ein wichtiger Teilschritt der Angiogenese. Während migrierende Zellen an der Front den Weg für das neue Gefäß „bahnen“, proliferieren die nachfolgenden Endothelzellen. In jüngster Zeit wird darüber hinaus diskutiert, welche Rolle die Rekrutierung und der Einbau zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen bei der Angiogenese spielen.

Nach der Definition ist mit Proliferation die Vermehrung von Zellen durch Zellteilung gemeint. Idealerweise sät man also einfach eine definierte Anzahl von Zellen aus und zählt an verschiedenen Tagen die Anzahl der Zellen in 5 mikroskopischen Gesichtsfeldern. Mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen kann dann die Anzahl der Zellkerne bestimmt werden. Bei dieser Methodik sind Fehlinterpretationen nahezu ausgeschlossen, da man visuell die tatsächliche Teilung der Zellen bestimmt und sich nicht nur auf einzelne Phasen der Mitose konzentriert. Eine ähnliche Methode wurde zur Bestimmung der Endothelzellproliferation benutzt.

Bei dieser Methode wurde die Eigenschaft von Kristallviolett verwendet, an die DNA der Zellen zu binden. (nach Gillies et al. 1986). Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der fehlenden visuellen Kontrolle nicht direkt bestimmt werden konnte, ob sich die Zellen tatsächlich geteilt haben oder sich nur der DNA-Gehalt der Zellen in der Synthesephase vermehrt hat.

2.3.1 Durchführung des Assays

Konfluente (80-90%) Endothelzellen werden von Umbilicalvenen abgelöst und per Zentrifugation sedimentiert.

Das Sediment wird in 10 ml Wachstumsmedium (Promocell NM) gut suspendiert. Nach Zählung der Zellen wird die Zellsuspension auf etwa 1000 Endothelzellen pro 100µl eingestellt. Jeweils 100µl dieser Suspension werden in 6 wells der 48-well-Platte gegeben.

Die Platte wird dann 24 Stunden im Brutschrank inkubiert (Adhäsion der Zellen). Das Wachstumsmedium wird nachfolgend sorgfältig abgesaugt und sofort durch 100µl der vorbereiteten, vorgewärmten Stimulationslösung ersetzt. Die Platte wird zum Abschluss 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.3.2 Auswertung

Nach 48 Stunden wurden die 48-well-Platten aus dem Inkubator genommen. Es wurden sofort 48ml 5,5% Glutaraldehyd pro well eingegeben. Die Platten wurden 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium verworfen, und die Platten wurden 3mal vorsichtig durch Untertauchen mit Milliporwasser gewaschen. Nachdem sie vorsichtig abgetropft waren, wurden sie unter Abzug luftgetrocknet. Nachfolgend wurden pro well 250µl Kristallviolettlösung eingegeben. Erneut wurden die Platten 3mal vorsichtig gewaschen und abgetropft und unter Abzug luftgetrocknet. Anschließend wurden pro well 100µl 10% Essigsäure eingegeben. Die Zahl der Zellkerne wurde durch Extinktion bei 595nm gemessen.

2.4 Planarer Migrationsassay

Mit Hilfe dieser Methode konnte sehr einfach die Migration (Chemokinese, keine Chemotaxis) von Endothelzellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli untersucht werden. Mit Hilfe dieses Assays wurde der Abstand zweier aufeinander zu gerichteter Migrationsfronten bestimmt.

2.4.1 Benötigte Materialien:

- 12-well-Platten
- HBSS
- Wachstumsmedium (Promocell NM)
- Medium (20% FCS in Basalmedium + 50µg/ml Gentamycin + 50ng/ml Amphotericin B)
- FCS (Fetal calf serum)

2.4.2 Vorbereitung des Assays

Voraussetzung für den Assay ist die Verwendung von Silikoneinsätzen (Flexi PERM). Die Silikoneinsätze werden zunächst in möglichst breiten Mauern mit geraden Kanten geschnitten und gemäß Herstellerangaben gereinigt und sterilisiert. Üblicherweise werden die „Mäuerchen“ in aqua destillata gespült und dann für ein paar Stunden in 70%igem Äthanol gerührt. Anschließend werden diese zur Trocknung bei eingeschaltetem UV-Licht unter eine sterile Werkbank gelegt.

In jedem well einer 12-well-Platte wird jeweils ein Mäuerchen eingesetzt. Dabei wird das Mäuerchen mit Hilfe einer Pinzette genommen und plan und mittig unter leichtem Druck auf die Plastikoberfläche aufgesetzt. Anschließend wird die Kulturplatte herumgedreht und kontrolliert, ob die Mäuerchen fest und ohne Lufteinschlüsse auf der Oberfläche haften.

Konfluente (80-90%) Endothelzellen werden gemäß etablierter Laborprotokolle von dem Kulturgefäß abgelöst und per Zentrifugation sedimentiert.

Das Sediment wird in 10ml Endothelzellwachstumsmedium (Promocell NM) suspendiert.

Nach Zählung der Zellen wird eine Zelldichte von 200.000 Zellen/ml Wachstumsmedium eingestellt.

1 ml der Zellsuspension wird in die vorbereiteten wells ausgesät und in der Platte über Nacht inkubiert (normalerweise werden etwa 25.000 Endothelzellen (EC) pro cm² Wachstumsfläche in die wells gegeben).

2.4.3 Durchführung des Assays

Beim Start des Assays sollen die Endothelzellen einen Monolayer geformt haben, der dem Silikonmäuerchen homogen und dicht anliegt. Mit einer sterilen Pinzette werden die Mäuerchen rasch gezogen und in aqua destillata gespült.

Nach Entfernung der Mauern entsteht ein sauberer Zellrand, von dem aus die Zellen in die von den Mäuerchen freigehaltene Fläche hinein migrieren. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen einmal mit Waschmedium gewaschen.

Das entsprechende Stimulationsmedium wird zugesetzt, der Startwert ermittelt (siehe Auswertung) und die Platte für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.4.4 Auswertung

Für die Auswertung werden ein Mikroskop (Olympus 1x51) und ein Computergestütztes Analyseverfahren verwendet.

Zur Bestimmung der Migration wird der Abstand der beiden Migrationsfronten an drei Stellen gemessen. Der Ausgangswert (A) wird kurz vor Zugabe der Stimulationsmedien gemessen. Dazu wird der Abstand zwischen den Migrationsfronten mittig, oberhalb und unterhalb der Mitte bestimmt (A1, A2, A3). Selbiges wird am Ende der Inkubationszeit durchgeführt (E1, E2, E3). Es werden jeweils drei Werte bestimmt und gemittelt. Die tatsächliche „Migrationsleistung“ wird folgendermaßen berechnet:

$$[(A1+A2+A3)/3] - [(E1+E2+E3)/3] / 2$$

2.5 Drei-Dimensionaler in vitro-Angiogenese-Assay

Der Prozess der Angiogenese umfasst die Sprossung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Kapillaren und deren Regression [167]. Die Angiogenese erfolgt in einer charakteristischen Kaskade aus Migration, Proliferation, Differenzierung und Lumenbildung durch vaskuläre Endothelzellen. Die Regulation der Angiogenese und Antiangiogenese erfolgt im Organismus durch verschiedene lösliche Faktoren. Der Einfluss dieser stimulierenden oder hemmenden Faktoren kann auf den verschiedenen Ebenen der angiogenen Kaskade, wie beispielsweise beim Abbau der Basalmembran, bei der Endothelmigration bzw. -proliferation oder bei der dreidimensionalen Organisation der Endothelzellen erfolgen. Viele zweidimensionale in vitro-Assays sowie planare Migrations- und Proliferationsassays wurden durchgeführt, um die Eigenschaften der Endothelzellen während der Angiogenese zu untersuchen [168]. Zur besseren Imitation der Prozesse der Angiogenese werden die 3-dimensionalen Assays mit Endothelzellen in Kollagen oder Fibrinmatrix entwickelt [62, 169]. Korff und Augustin [79] haben im Jahr 1999 festgestellt, dass eine kugelige Anordnung der Endothelzellen in einer Matrix zu deren Stabilität und Differenzierung führt. Mit der Verwendung von endothelzellbewachsenen Sphäroiden, die in eine Kollagenmatrix inkorporiert werden, etablierten Korff und Augustin einen neuen 3-dimensionalen Angiogenese-Assay.

2.5.1 Material

2.5.1.1 Methylzellulose-Lösung

Das Methylzellulosepulver (6g, Sigma Cat. No. m-0512, 40000cpi) wird in einer magnetrührerhaltigen 500ml-Flasche autoklaviert. Die autoklavierte Methylzellulose wird in 250ml Basalmedium (60°C) für 20 Min. aufgelöst. Zusätzlich werden 250ml Basalmedium hinzugefügt. Die Lösung (500ml) wird dann für 1-2 min(4°C) angerührt und anschließend zentrifugiert (5xg, 2h, RT).

2.5.1.2 Kollagen-Lösung

Zwei Rattenschwänze werden für 20 Min. in 70%iges Äthanol gelegt. Nach Entfernung der Haut werden die Schwänze in Äthanol gewaschen. Anschließend werden die Sehnen vorsichtig entnommen und erneut für 20 Min. in Äthanol gewaschen. Die Sehnen werden luftgetrocknet (unter Air-Flow für 20 Min.) und dann in 250ml 0,1 %ige Essigsäure für 48h im Kühlschrank gelagert. Die Lösung wird portioniert und zentrifugiert (17xg, 1h, 4°C).

2.5.1.3 Kollagenlösung-Äquilibrierung

Zur Kollagen-Äquilibrierung werden 4 ml von der Stocklösung mit 0,5ml eines 10 fach konzentrierten Mediums (M199) so lange gemischt, bis eine flüssige Lösung entstanden ist. Diese Mischung wird für 15 Minuten auf Eis gestellt. Um eine Verfestigung der Mischlösung zu verhindern, wird die Kollagenstocklösung mit 0,1%iger Essigsäure verdünnt (1:2 oder 1:3). Die Lösung wird vor Gebrauch mit sterilem, gekühltem 1N NaOH neutralisiert.

2.5.1.4 Sphäroide

In 40ml Methocel-haltiger Lösung (20% Methylzellulose 8ml, 80% FCS 32ml) werden 160000 ECs aufgelöst. In 4 Platten (96well-Platte, nicht-adhären) werden 100µl der Zellsuspension pro Well pipettiert. Nachfolgend werden die Platten für 24h im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach 24 Stunden werden die

Sphäroide mit einer normalen Pipette aus den 96well-Platten geerntet und in 50ml Bluemax-Röhrchen übertragen.

2.5.2 Durchführung des Angiogenese-Assays

Die 24well-Platten werden außen mit Waschmedium umrandet und in einem Brutschrank vorgewärmt (37°C). Die in den Bluemax-Röhrchen (siehe oben) geernteten Sphäroide werden zentrifugiert (3 Min. 500xg). Der Überstand der Zentrifugation wird vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Pellet (Sphäroide) mit 5ml Methocel-FCS-Lösung (40% FCS, 60% Methylzellulose) überschichtet. Die neutralisierte Kollagen-Mediumlösung (siehe oben) wird sofort auf die überschichteten Sphäroide pipettiert. Nachfolgend wird die sphäroidhaltige Kollagen/Methocel-Lösung vorsichtig gemischt und in die 24-well-Platten (1ml pro well) pipettiert. Die Platten werden im Brutschrank (37°C) für 45 Minuten inkubiert. Anschließend kann mit der Stimulation begonnen werden (100µl/well). Die stimulierten Platten werden für 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation folgt die Fixation (siehe unten) des Sphäroidgels zur quantitativen Analyse der Angiogenese.

2.5.3 Quantitative Analyse des endothelialen Sprouting

Die pro- oder antiangiogene Wirkung von verschiedenen Substanzen wird durch ihre Fähigkeit bestimmt, die Anzahl und die Länge der Sphäroidsprouts zu erhöhen oder zu erniedrigen. Aus diesem Grund ist die kumulative Länge von allen Sprouts eines Sphäroids (CSL, cumulative sprout length) ein sensibler Parameter. Die fixierten 24-well-Platten werden unter das Mikroskop gestellt. Pro well wird die CSL von mindestens 10 verschiedenen Sphäroiden durch eine digitale Bildanalyse gemessen.

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten repräsentieren grundsätzlich Mittelwerte aus mehreren

Messreihen, die immer mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Zusätzlich ist noch der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben.

Zum statistischen Vergleich der Sprouting- und Proliferationsmessungen wurde eine multivariante Datenanalyse (ANOVA) durchgeführt. Ein Niveau von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet.

Die Berechnungen erfolgten unter Zuhilfenahme des Computerprogramms SPSS für Windows (Release 10.0).

3. Ergebnisse der dreidimensionalen in vitro-Angiogenese- Assays

3.1 Einfluss von LPC auf das endotheliale Sprouting

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wird die Wirkung von LPC auf das endotheliale Sprouting untersucht. LPC wird während der LDL-Oxidation gebildet und hat ähnliche Wirkung wie oxLDL [113-114]. Diesbezüglich werden die Sphäroide mit LPC (20 $\mu\text{mol/l}$) stimuliert. Die LPC-Konzentration wurde nach den Ergebnissen von Schäfer et al. (2004) [170] ausgewählt. Die Stimulation mit LPC führt zu einer Steigerung des endothelialen Sprouting. Die mittlere kumulative Länge der Sprouts steigt von 212 μm auf 470 μm nach Stimulation mit LPC.

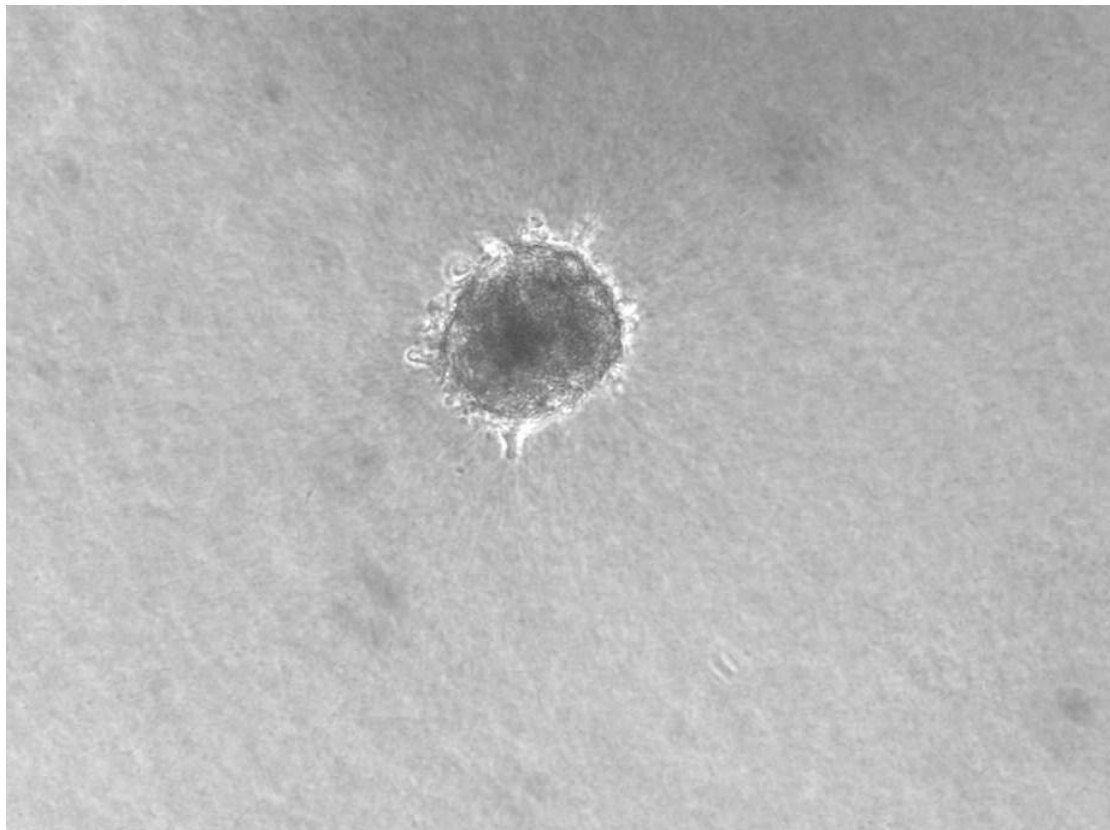


Abb. 10 Drei-dimensionaler in vitro-Angiogenese-Assay ohne Stimulation

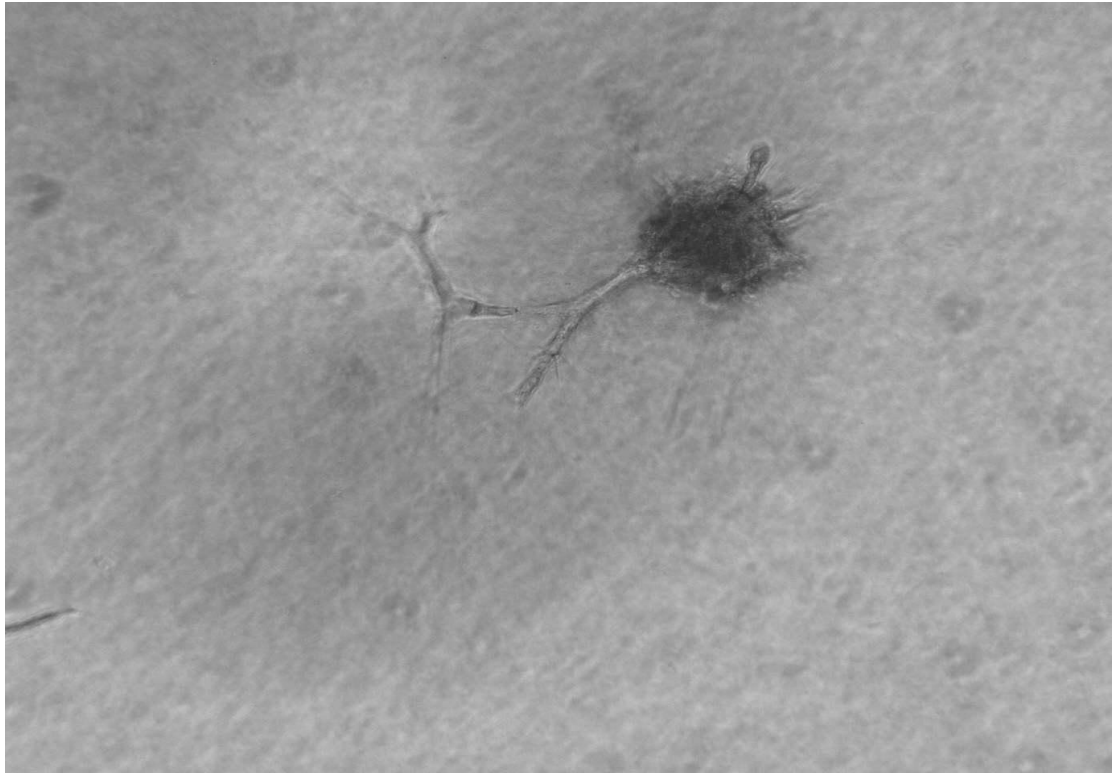


Abb. 11 Der proangiogenetische Effekt von LPC.

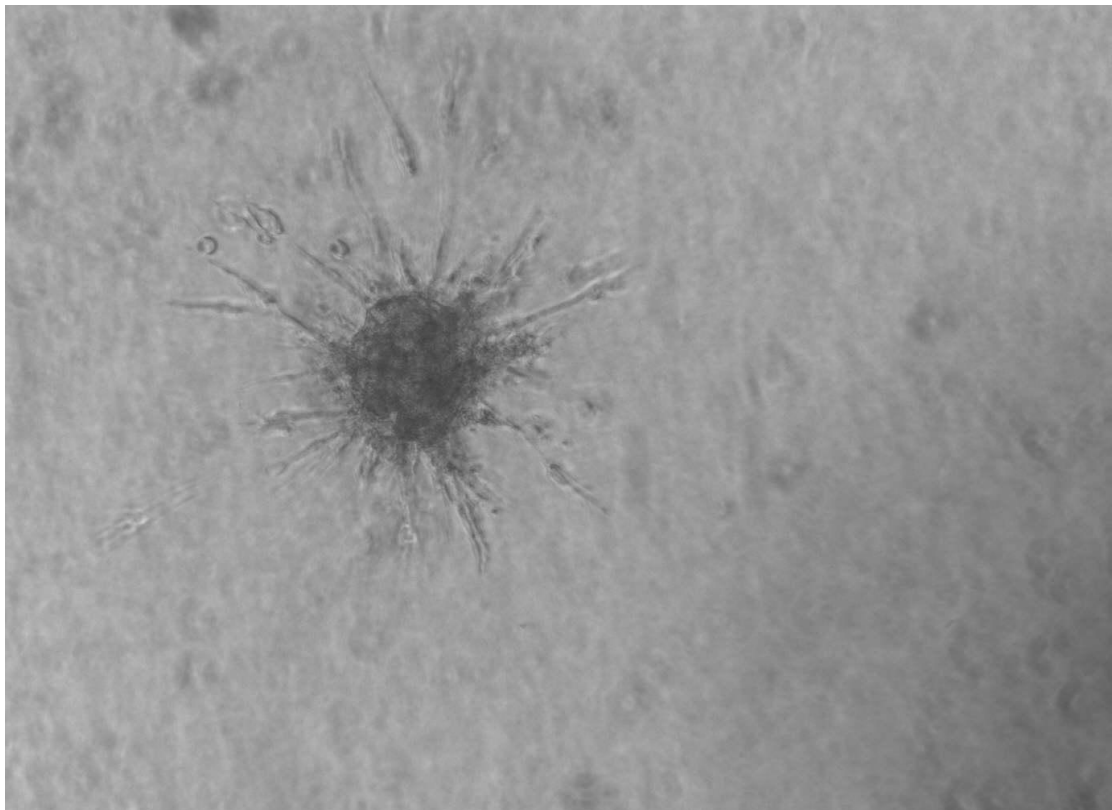


Abb. 12 Hochsignifikante Steigerung der endothelialen Sprouts unter Fluvastatin

3.2 Einfluss von Statinen auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting

Nachdem der proangiogenetische Effekt von LPC gezeigt wurde, wurde die Wirkung von Simvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin auf das endotheliale Sprouting untersucht. Die Sphäroide werden je nach Ansatz mit LPC und Simvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) oder Fluvastatin (1 $\mu\text{mol/l}$) oder Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Die Stimulation der Sphäroide mit den Statinen führt zu einer hochsignifikanten Steigerung des LPC-induzierten endothelialen Sprouting. Die mittlere kumulative Länge steigt bei Fluvastatin auf 2105 μm , bei Cerivastatin auf 1806 μm und bei Simvastatin auf 1848 μm .

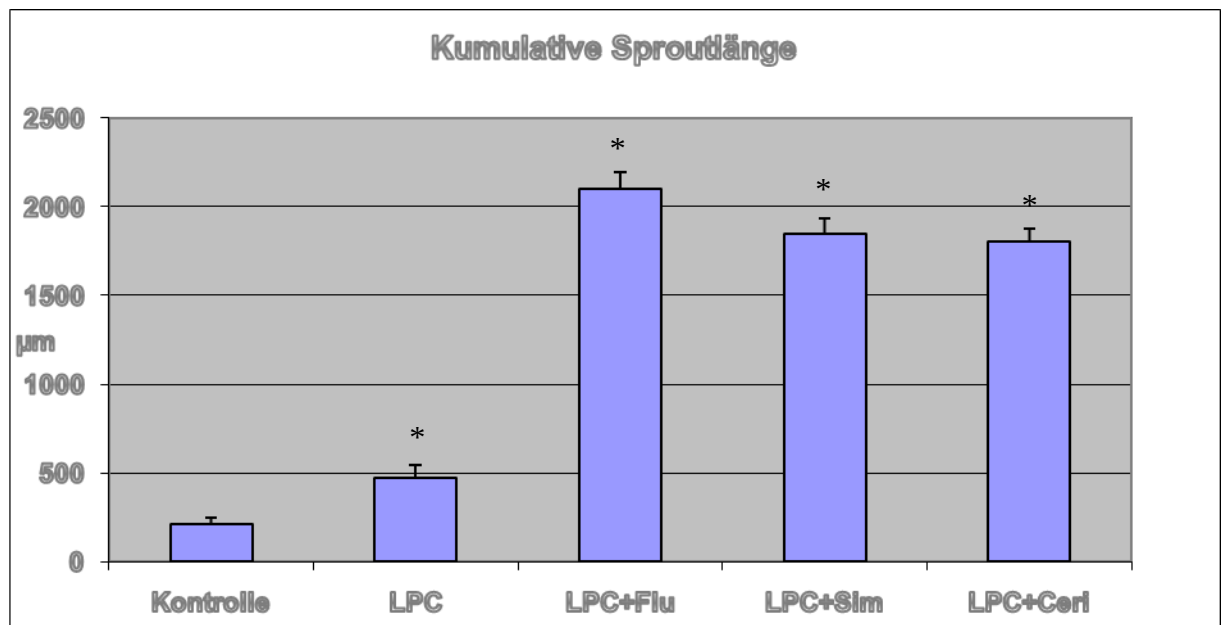


Abb. 13 Einfluß von Statinen auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting.

Bei einer Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC und einem Statin (1 $\mu\text{mol/l}$ Fluvastatin, 2,5 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin, 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Cerivastatin) werden signifikant mehr Sprouts gebildet (+/- SEM, n=5-22, p<0,05).

3.3 Bedeutung der Hemmung der HMG-CoA- Reduktase für das endotheliale Sprouting

Um die Bedeutung der HMG-CoA-Reduktase-Hemmung auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting zu untersuchen, wird eine Versuchsreihe mit

Mevalonat durchgeführt. Die Bildung von Mevalonat aus HMG-CoA unter der Katalyse der HMG-CoA-Reduktase ist eine Schlüsselreaktion der Synthese des Cholesterins. Es erfolgt eine Stimulation der Sphäroide mit LPC (20 $\mu\text{mol/l}$), den drei Statinen in der vorherigen Konzentration und Mevalonat (10 $\mu\text{mol/l}$). Nach der Inkubation der Sphäroide mit Mevalonat verursachen die Statine keine signifikante Steigerung des endothelialen Sprouting. Die mittlere kumulative Länge der Sphäroide unter LPC, Mevalonat und Fluvastatin beträgt 483 μm , unter Simvastatin 387 μm und unter Cerivastatin 467 μm . Der proangiogenetische Effekt der Statine wird durch Mevalonat aufgehoben. Es wird also bestätigt, dass die Statin-bedingte Steigerung des LPC-induzierten Sprouting ein spezifischer HMG-CoA-Reduktase-Effekt ist, da eine Antagonisierung durch Zugabe von Mevalonat möglich ist.

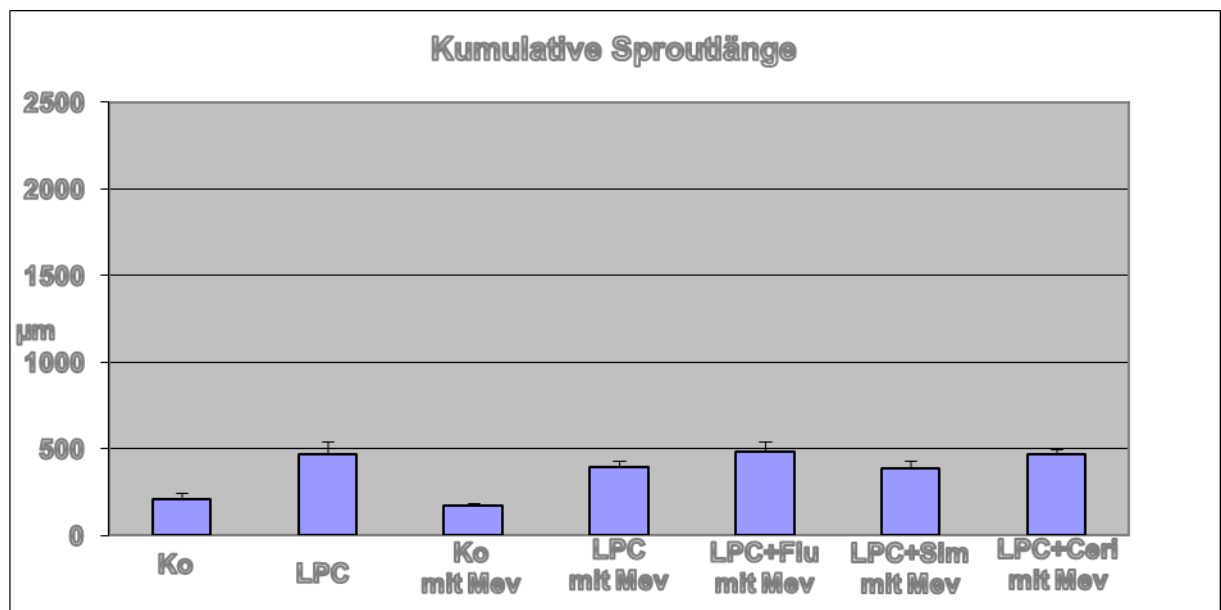


Abb. 14 Einfluß von Mevalonat auf das endotheliale Sprouting.

Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen LPC und LPC mit Statinen nach einer Koinkubation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Mevalonat. Mevalonat hebt den Effekt der Statine auf (+/- SEM, n=5-19).

3.4 Die Wirkung der Modulation des membranösen Cholesterins mittels Methyl- β -Cyclodextrin auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting

In dieser Versuchsreihe wird die Wirkung von Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting untersucht. MCD gehört zu der Familie der Oligosaccharide. Es besitzt die Fähigkeit, Cholesterin aus der Zellmembran zu entfernen und dadurch die Funktion von Lipid Rafts zu beeinflussen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe untersuchen wir, ob die Statine Simvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin das endotheliale Sprouting durch Modulation des membranösen Cholesterins beeinflussen. Dafür werden die Sphäroide erst nur mit MCD, dann mit MCD und LPC stimuliert. Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass MCD im Gegensatz zu den Statinen zwar zu einer tendenziellen, aber nicht signifikanten Steigerung des LPC-induzierten Sprouting führt. Die mittlere kumulative Länge der Sphäroide unter MCD und LPC beträgt 944 μ m. Daraus kann gefolgert werden, dass Statine nicht über die Senkung des Cholesteringehalts in der Zellmembran wirken .

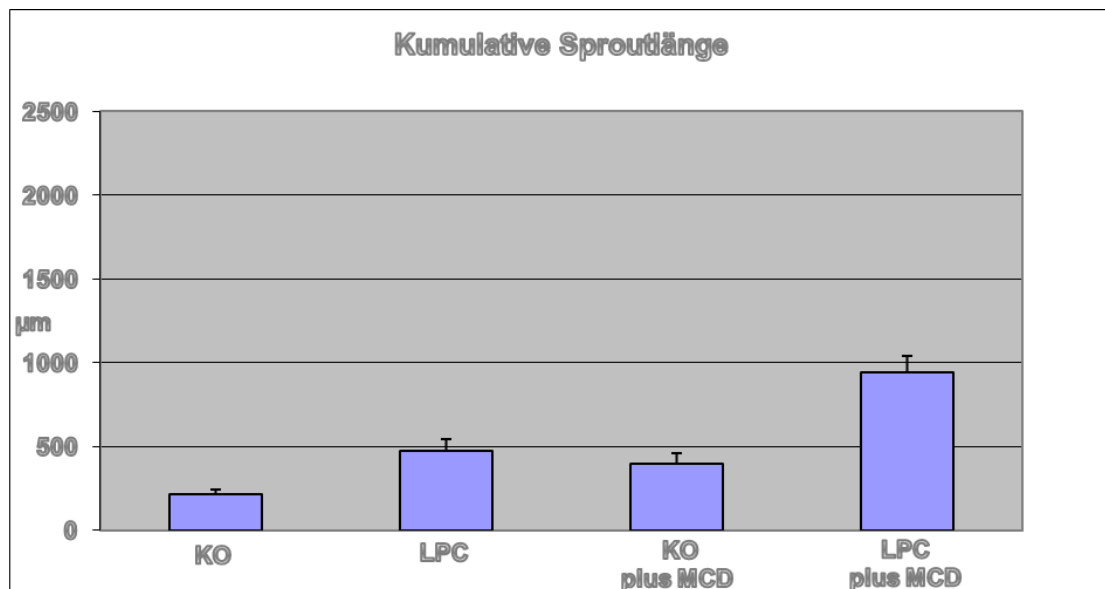


Abb. 15 Einfluß von MCD auf das endotheliale Sprouting.

Nach einer Koinkubation mit 10 μ mol/l MCD zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen LPC und LPC plus MCD. MCD hat nicht die gleiche Wirkung wie Statine auf das endotheliale Sprouting (+/- SEM, n=5-17).

3.5 Die Rolle der Prenylierung, untersucht mittels Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat beim endothelialen Sprouting

Mevalonat ist auch das Ausgangssubstrat für die Isoprenoide Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat. Diese wiederum sind wichtig für die Modifikation und Funktion zahlreicher zellulärer Faktoren durch den Prozess der Isoprenylierung (Takemoto und Liao 2001). Um den Wirkungsmechanismus der Statin-bedingten Modulation des LPC-induzierten endothelialen Sprouting weiter zu untersuchen, stimulieren wir die Sphäroide mit LPC, den drei Statinen und Farnesylpyrophosphat (FPP) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Die Inkubation der Sphäroide mit LPC, Simvastatin oder Fluvastatin und GGPP zeigt eine signifikante Hemmung des endothelialen Sprouting. Bei Cerivastatin ist die Hemmung nicht signifikant, zeigt aber den gleichen Trend. Die mittlere kumulative Länge bei LPC, GGPP und Fluvastatin war 1112µm, bei Simvastatin 1154µm und bei Cerivastatin 1139µm. Die Prenylierung durch GGPP wird also durch die Statine gehemmt, da die Zugabe von GGPP den Statin-Effekt aufhebt. Zusätzlich ändert die Zugabe von GGPP alleine (ohne Statine) das LPC-induzierte Sprouting nicht signifikant.

Dieselben Versuche werden auch mit FPP durchgeführt. Dabei kommt es zu keinen signifikanten Ergebnissen, so dass der Statin- Effekt auf das endotheliale Sprouting am ehesten in Zusammenhang mit der Prenylierung durch GGPP steht.

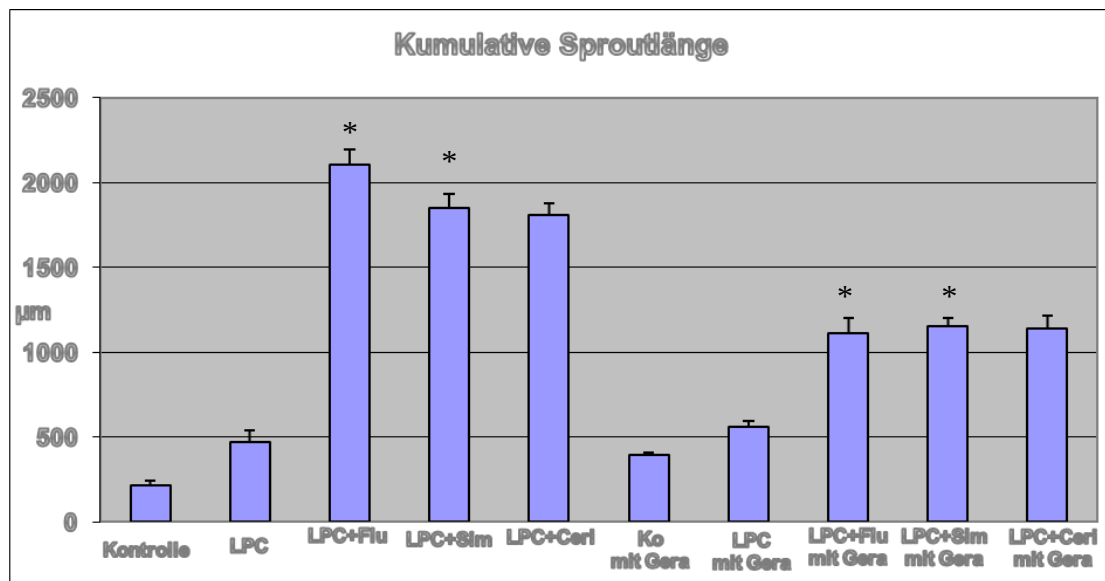


Abb. 16 Einfluß von GGPP(Gera) auf das endotheliale Sprouting.

Bei einer Stimulation mit LPC, Statinen und GGPP werden signifikant weniger Sprouts gebildet, als ohne GGPP (+/- SEM, n=5-18, $p < 0,05$, bei Cerivastatin nicht signifikant, aber mit gleichem Trend).

3.6 Beeinflussung der endothelialen Proliferation durch Statine

3.6.1 Einfluss von LPC auf die endotheliale Proliferation

Nachdem wir die Wirkung und den Wirkungsmechanismus von LPC und Statinen beobachtet haben, untersuchen wir die Effekte von LPC und Statinen auf die endotheliale Proliferation. Zuerst werden die Endothelzellen (HUVEC) mit LPC (20 µmol/l) stimuliert. Die LPC-Konzentration wurde nach den Ergebnissen von Schäffer et al. (2004) ausgewählt. Die durchgeführte Untersuchung zeigt eine Steigerung der HUVEC-Proliferation von 42% nach Stimulation mit LPC im Vergleich zur Kontrolle.

3.6.2 Einfluss von Statinen auf die LPC-induzierte endotheliale Proliferation.

In dieser Versuchsreihe wird die Wirkung von Statinen auf die LPC-induzierte Proliferation überprüft. Die Zellen werden je nach Ansatz mit LPC (20 µmol/l)

und Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Fluvastatin (1 $\mu\text{mol/l}$) oder Simvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) kostimuliert.

Nach der Kostimulation mit Statinen ergab sich eine signifikante Reduktion der LPC-induzierten Proliferation. Die Reduktion bei Simvastatin war 34% im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bei Fluvastatin 37%, und die stärkste Reduktion wurde durch Cerivastatin mit 52% induziert.

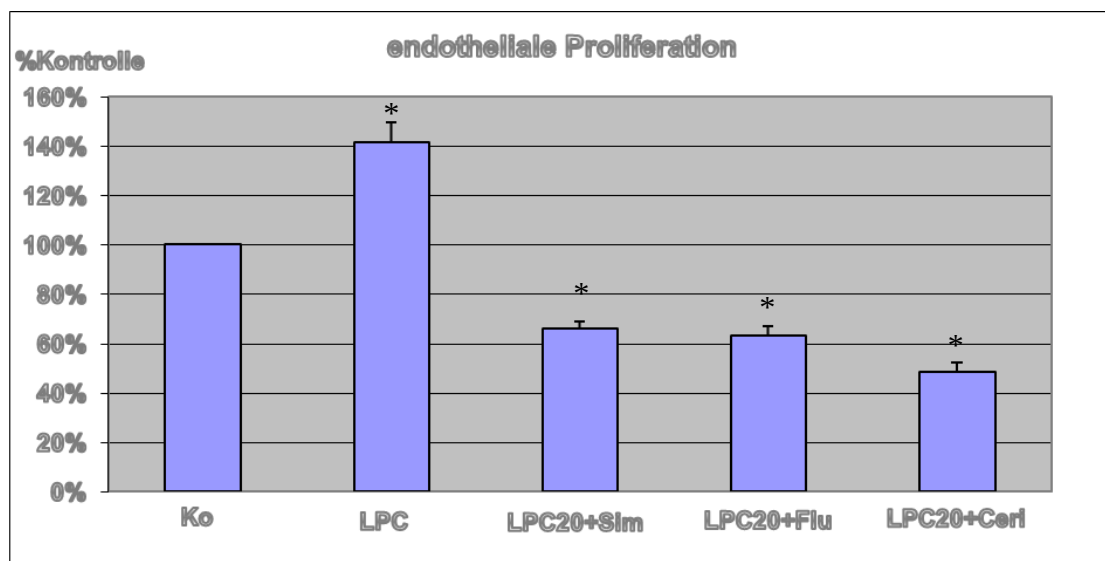


Abb. 17 Einfluß von Statinen auf die LPC-induzierte Proliferation.

Bei einer Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ LPC und einem Statin (1 $\mu\text{mol/l}$ Fluvastatin, 2,5 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin, 0,1 $\mu\text{mol/l}$ Cerivastatin) wird die endotheliale Proliferation signifikant reduziert (+/- SEM, n=4-13, p<0,05).

3.6.3 Bedeutung der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase für die endotheliale Proliferation

Um die Bedeutung der HMG-CoA-Reduktase-Hemmung auf die LPC-induzierte Proliferation zu untersuchen, wird eine weitere Versuchsreihe mit Mevalonat durchgeführt. Hierbei erfolgt eine Koinkubation der HUVEC mit LPC, Statinen und Mevalonat in denselben Konzentrationen wie oben. Durch die Koinkubation mit 10 μM Mevalonat kann die Wirkung der Statine auf die LPC-induzierte Proliferation aufgehoben werden. Die Statine können keine

signifikante Reduktion der Proliferation induzieren. Es handelt sich also um einen spezifischen HMG-CoA-Reduktase Effekt.

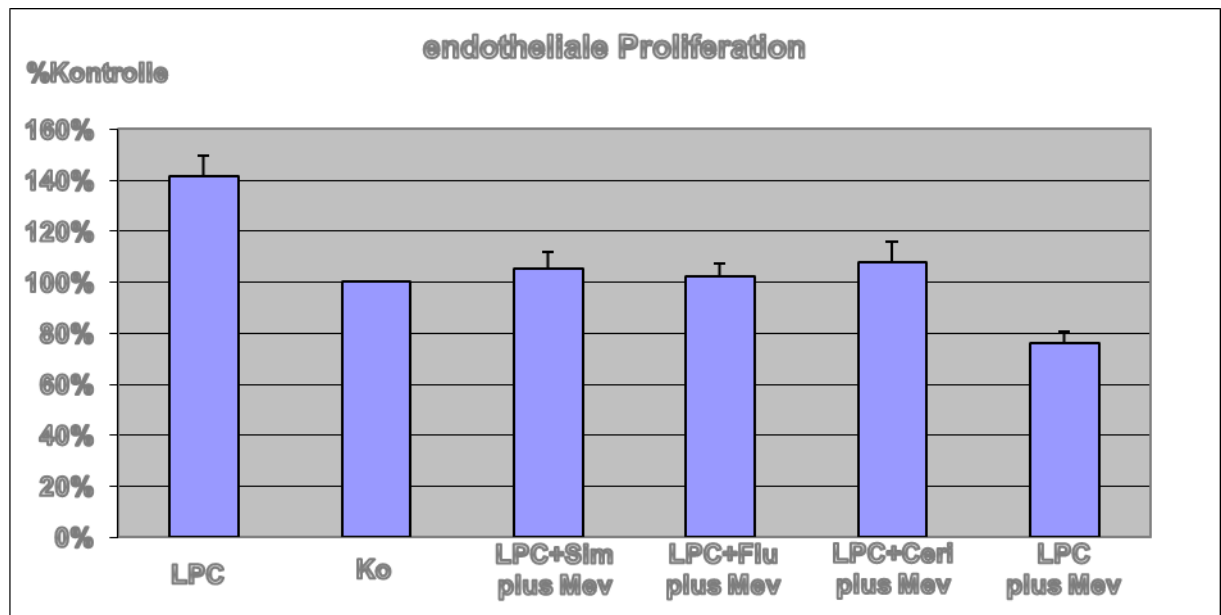


Abb. 18 Einfluß von Mevalonat auf die endotheliale Proliferation.

Bei einer Koinkubation mit Mevalonat 10µmol/l wird die signifikant hemmende Wirkung der Statine auf die LPC-induzierte endotheliale Proliferation aufgehoben (+/-SEM, n=3-5).

3.6.4 Die Wirkung der Modulation des membranösen Cholesterins mittels Methyl-β-Cyclodextrin auf die LPC-induzierte endotheliale Proliferation

In dieser Versuchsreihe wird die Wirkung von Methyl- β-Cyclodextrin auf die LPC-induzierte Proliferaion von HUVEC getestet. Es folgt eine Koinkubation der HUVEC mit LPC und MCD. Methyl- β-Cyclodextrin hat, wie schon beschrieben, die Fähigkeit, Cholesterin aus der Zellmembran zu entfernen und dadurch die Funktion von lipid rafts zu beeinflussen.

Bei der Koinkubation der HUVEC mit LPC und MCD zeigt sich eine Reduktion der Proliferation um 35% im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die hemmende Wirkung von MCD unterscheidet sich also nicht signifikant von der hemmenden Wirkung von Simvastatin und Fluvastatin auf die endotheliale

Proliferation. Der ähnliche Effekt von MCD und Fluvastatin und Simvastatin zeigt, dass der antiproliferative Effekt von Statinen auf die Reduktion des membranösen Cholesterins zurückzuführen ist.

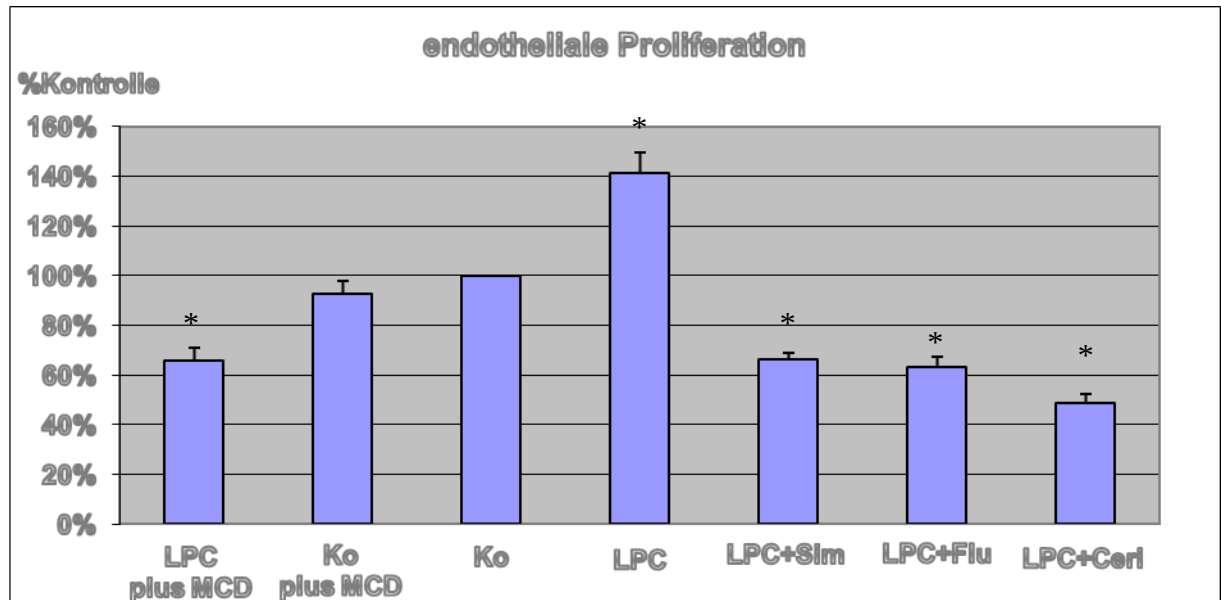


Abb. 19 Einfluß von MCD auf die endotheliale Proliferation.

Der Effekt von MCD auf die LPC-induzierte endotheliale Proliferation unterscheidet sich nicht signifikant vom Effekt der Statine. Nach einer Stimulation mit MCD 10 $\mu\text{mol/l}$ und LPC kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (+/- SEM, n=4-13, $p<0,05$).

3.6.5 Die Rolle der Prenylierung, untersucht mittels Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat bei der endothelialen Proliferation

Zum Schluss wird eine Versuchsreihe mit Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat durchgeführt. FPP und GGPP spielen, wie schon beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Prenylierung von Proteinen. Die Prenylierung ist eine posttranslationale Modifikation eines Proteins. Durch sie wird das Protein mit einem hydrophoben Terpen-Rest (z. B. Farnesol, Geranylgeraniol) verbunden, um eine Verankerung des Proteins in eine Zellmembran zu ermöglichen. In dieser Versuchsreihe erfolgte eine Koinkubation der HUVEC mit LPC, Statinen und FFP oder GGPP. Bei der

Proliferation zeigten FPP und GGPP keine signifikante Wirkung. Im Gegensatz zum Sprouting wirken Statine hier nicht über die Isoprenylierung.

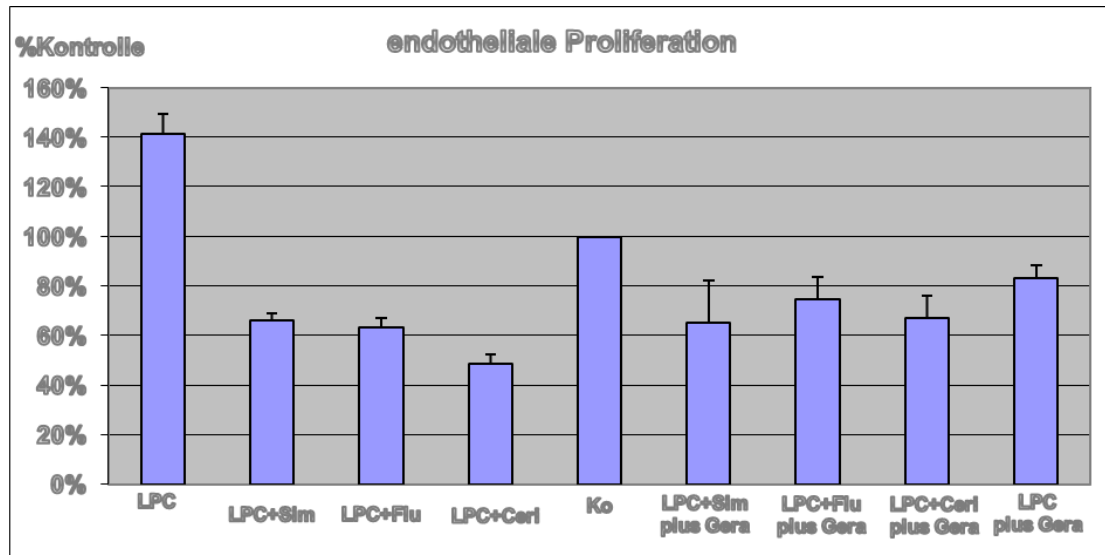


Abb. 20 Einfluß von GGPP auf die LPC-induzierte Proliferation.

Nach einer Koinkubation mit LPC und Statinen zeigt GGPP keine signifikante Wirkung auf die Proliferation (+/-SEM, n=3-14).

Die Ergebnisse von FPP werden bei fehlender Signifikanz nicht gezeigt.

3.7 Modulation der endothelialen Migration durch Statine

Als nächster Schritt wurde die Wirkung von LPC und Statinen auf die endotheliale Migration untersucht. Die durchgeführten Versuche ergaben keinen signifikanten Einfluß der Statine auf die LPC-induzierte endotheliale Migration.

4.Diskussion

4.1. Die Rolle des LPC-induzierten endothelialen Sprouting in der Atherosklerose und Angiogenese

Oxidiertes low-density-Lipoprotein (oxLDL) spielt die Hauptrolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Im Speziellen ist die Phospholipid-Komponente, Lysophosphatidylcholin (LPC), verantwortlich für viele Effekte von oxLDL [113-114]. Zahlreiche Studien beweisen seine atherogene Wirkung durch Inhibierung der endothelabhängigen Relaxation [171], Aktivierung von Adhäsionsmolekülen sowie Stimulation der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen [115] sowie Endothelzellen [116-117].

Die Angiogenese beeinflusst den Prozess der Arteriosklerose auf zwei verschiedenen Ebenen. Auf der einen Seite fördert sie die Bildung von Kollateralgefäßen als Kompensationsmechanismus zur Verbesserung der Durchblutung [22], auf der anderen Seite führt sie zu einer Progression der Arteriosklerose durch Plaquestabilisierung auf dem Boden der Angiogenese in der atherosklerotischen Plaque. Die neu gebildeten Kapillaren verursachen Intraplaque-Hämorrhagien und erhöhen das Plaquerupturrisiko [23-24, 172].

Die Wirkung von LPC auf die Angiogenese wurde in einem dreidimensionalen in vitro-Angiogenesemodell untersucht. Die Inkubation der Endothelzellen mit LPC hat eine Steigerung des endothelialen Sprouting verursacht. Der Prozess der Angiogenese wird also durch LPC aktiviert. Da die Angiogenese ein charakteristisches Merkmal im atherosklerotischen Prozess ist und mit dem Schweregrad der Arteriosklerose korreliert [21], kann man demzufolge behaupten, dass LPC durch Aktivierung der Intraplaque-Angiogenese zu einem Progress der Arteriosklerose führt.

4.1.1 Modulation der Angiogenese durch die Statine Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin.

Statine haben einen hohen Stellenwert in der Therapie der Arteriosklerose. Der Erfolg der Statintherapie liegt nicht nur an der Senkung des Cholesterin-

Plasmaspiegels, sondern auch an der günstigen Beeinflussung weiterer bei der Arteriosklerose beteiligter Prozesse, den sogenannten pleiotropen Effekten. Ergebnisse früherer Studien zeigen eine Diskrepanz bezüglich der Wirkung der Statine auf die in vitro-Angiogenese. Während einige Studien einen antiangiogenetischen Effekt der Statine beschreiben [134], weisen andere eine proangiogenetische Wirkung nach [135, 173].

Nach der Darstellung der angiogenetischen Effekte des LPC, wurde die Wirkung von Statinen auf das LPC-induzierte endotheliale Sprouting erforscht. In demselben in vitro-Angiogenesemodell wurden die Endothelzellen zusammen mit LPC und den Statinen Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin inkubiert. Dabei ist es zu einer hochsignifikanten Steigerung des endothelialen Sprouting, vor allem unter Fluvastatin, gekommen. Es wird gezeigt, dass Statine eine Stimulation der Angiogenese induzieren. Die Bedeutung der Steigerung des LPC-induzierten endothelialen Sprouting durch die Statine kann durch folgenden Aspekt erklärt werden: Es wird beschrieben, dass die neu gebildeten Kapillaren in atherosklerotischen Plaques eine dünne und schwache Wand besitzen [174-176] und dadurch zur Ruptur prädisponiert sind. Diese intramurale Einblutung führt nachfolgend zur Plaque-Destabilisierung und zur Plaqueruptur. Zu den pleiotropen Effekten der Statine gehören die Plaquestabilisierung [177-178] und die Reduktion der Rupturgefahr der Plaques [179]. Durch unsere Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Statine zur Bildung von neuen stabilen Kapillaren führen, die nicht rupturgefährdet sind. Die Bildung von dünnwandigen Kapillaren wird auch bei Tumoren beschrieben [180-181], so dass man diesen Aspekt auch in der Therapie der Tumorangio-genese berücksichtigen kann.

4.1.2 Analyse der Ursachen der Statin-bedingten Steigerung des LPC-induzierten Sprouting

Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese von Cholesterin, indem diese Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA zu Mevalonat reduziert. Die Statine hemmen kompetitiv dieses Enzym. Um den Wirkungsmechanismus der Statin-bedingten Steigerung des LPC-induzierten Sprouting zu untersuchen, wurde in einem dreidimensionalen

Angiogenesemodell eine Inkubation der Endothelzellen mit LPC, Statinen und Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase durchgeführt. Dabei ist es zu keiner signifikanten Statin-bedingten Steigerung gekommen. Der proangiogenetische Effekt von Statinen wird aufgehoben. Damit wird bestätigt, dass die Statin-bedingte Steigerung des LPC-induzierten Sprouting ein spezifischer HMG-CoA-Reduktase-Effekt ist, da er durch Mevalonat antagonisierbar ist.

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran. Spezielle, reichlich an Cholesterin-Mikrodomänen (lipid rafts) sowie an der Zellmembran verankerte Signalmoleküle spielen eine zentrale Rolle bei Signaltransduktion, Zellwachstum und Zellmigration [138, 182]. Nach dem Beweis, dass es sich bei der angiogenetischen Wirkung der Statine um einen spezifischen HMG-CoA-Reduktase-Weg handelt, haben wir weiterhin untersucht, ob dieser Effekt in Zusammenhang mit der Modulation des in der Zellmembran vorhandenen Cholesterins steht. Diesbezüglich inkubierten wir die Endothelzellen zunächst mit MCD und danach mit MCD und LPC. MCD hat die Fähigkeit, Cholesterin aus der Zellmembran zu entfernen. Das Ergebnis unserer Untersuchung zeigt, dass MCD im Gegensatz zu den Statinen keinen signifikanten Effekt auf die Angiogenese hat. Dies bedeutet, dass der proangiogenetische Effekt der Statine nicht durch Modulation des membranären Cholesterins hervorgerufen wird.

Cholesterin ist nur eines der Folgeprodukte von Mevalonat. Mevalonat ist auch Ausgangssubstrat für die Synthese der Isoprenoide Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat. Diese wiederum sind wichtig für die Modifikation und Funktion zahlreicher zellulärer Faktoren [122]. Die Isoprenylierung von bestimmten Proteinen (G-Proteinen, GTP-bindenden Proteinen wie Rac, Ras und Rho) ist die Voraussetzung für ihren gezielten Einbau in die Membrankompartimente der Zelle [183-184]. Die Isoprenylierung dieser Proteine besitzt auch eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion und Regulation zahlreicher Zellfunktionen [185].

Zur weiteren Analyse der Ursachen der Statin-bedingten Steigerung des LPC-induzierten Sprouting wurde die Rolle der Isoprenoide und der Isoprenylierung in diesem Prozess untersucht. Diesbezüglich wurden die Endothelzellen mit LPC, Statinen und Farnesyl- oder

Geranylgeranylpyrophosphat (FPP, GGPP) inkubiert. GGPP hat zu einer signifikanten Hemmung des Sprouting durch die Statine geführt. Die Prenylierung durch GGPP wird also durch Statine gehemmt, da die Zugabe von GGPP den Statin-Effekt aufhebt. Demgegenüber scheint die Prenylierung des FPP durch Statine nicht moduliert zu werden. Weiterhin haben wir die Endothelzellen mit LPC und GGPP ohne Statine inkubiert. Die Zugabe von GGPP alleine ohne Statine änderte das LPC-induzierte Sprouting nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse wäre, dass die Prenylierung (Geranylisierung) des LPC-Rezeptors durch Statine gehemmt wird. Weitere Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen des LPC-Rezeptors sind erforderlich.

Im Rahmen der Angiogeneseversuche wurde gezeigt, dass die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch eine verminderte Bildung von Mevalonat und dem Isoprenoid GGPP, unabhängig vom cholesterinsenkenden Effekt, beim Prozess des LPC-induzierten Sprouting und nachfolgend der Arteriosklerose involviert ist. Die Rolle der Prenylierung durch GGPP und der Statine bei der Angiogenese wird auch in den Studien von Park HJ et al. 2002 [186] und Katsumoto M. et al. 2005 [187] beschrieben.

Weitere Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen der Statin-bedingten Modulation der LPC-induzierten Angiogenese sind erforderlich. Die Ergebnisse der Beeinflussung des Prozesses der Prenylierung durch Statine können neue interessante Aspekte für die Therapie der Arteriosklerose sowie von Tumoren mit sich bringen.

4.2. Bedeutung der LPC-induzierten endothelialen Proliferation und deren Modulation durch Statine für die Atherosklerose und Angiogenese

Die Proliferation von Endothelzellen ist ein wichtiger Schritt im Prozess der Angiogenese. In atherosklerotischen Läsionen ist die Proliferation von Endothelzellen von großer Bedeutung, da sie zu einer Intima-Angiogenese führt [188].

Die durchgeführte Untersuchung der Wirkung von LPC auf die Endothelzellen in einem in vitro-Proliferationsassay hat gezeigt, dass LPC zu einer

Steigerung der Endothelzellproliferation führen kann. Es kann somit bestätigt werden, dass LPC die Proliferation von Endothelzellen induziert und damit eine Progression der Arteriosklerose bewirken kann.

Wie schon beschrieben, spielen Statine mit ihren pleiotropen Effekten eine Hauptrolle in der Therapie der Arteriosklerose.

Nachdem wir gezeigt haben, dass LPC zu einer Proliferation der Endothelzellen führt, haben wir die Wirkung von Statinen auf die LPC-induzierte Endothelproliferation untersucht.

Diesbezüglich haben wir Endothelzellen zusammen mit LPC und Fluvastatin, Simvastatin und Cerivastatin inkubiert. Diese Koinkubation mit den HMG-CoA-Reduktase-Hemmern hat eine Hemmung der LPC-induzierten Endothelproliferation gezeigt. Das Ergebnis zeigt, dass Statine durch einen antiproliferativen Effekt protektiv in den Prozess der Arteriosklerose eingreifen. Die intakte endotheliale Integrität ist eine Voraussetzung für gesunde Gefäße. Stabilisierung der endothelialen Zellaktivierung wirkt als ein schützender Faktor gegen Arteriosklerose.

4.2.1 Analyse der Hemmung der LPC-induzierten endothelialen Proliferation durch Statine

Um den Wirkungsmechanismus von Statinen auf die LPC-induzierte Proliferation von Endothelzellen zu analysieren, wurde eine Inkubation der Endothelzellen mit LPC, Statinen und Mevalonat durchgeführt. Dabei werden die hemmenden Effekte von Statinen aufgehoben. Das Ergebnis zeigt, dass genau wie bei der Angiogenese ein HMG-CoA-spezifischer Effekt vorliegt.

Um die Interaktion von Statinen und Isoprenoiden auf die LPC-induzierte Endothelproliferation zu untersuchen, wurde eine Koinkubation der Endothelzellen mit LPC, Statinen und FPP sowie GGPP durchgeführt. Dabei kommt es zu keinen signifikanten Effekten. Im Gegensatz zu der Angiogenese zeigen diese Ergebnisse, dass die Isoprenylierung keine Rolle für die Modulation der LPC-induzierten Endothelzellproliferation durch Statine spielt. Auf der anderen Seite ergibt eine Cholesterindepletion mit MCD den gleichen Effekt wie die Inkubation mit den Statinen. Der Statineffekt ist

dennoch auf die Reduktion des in der Zellmembran lokalisierten Cholesterins zurückzuführen. Man könnte spekulieren, dass der veränderte Cholesteringehalt der Zellmembran durch Veränderung der Membran-Fluidität eine Funktionsänderung der endothelialen Lipid rafts zur Folge hat, die zu dem beschriebenen Effekt führt.

Da die Migration der Endothelzellen zusammen mit der Proliferation wichtige Bestandteile der Angiogenese sind, haben wir als nächsten Schritt die Wirkung von LPC und Statinen auf diesen Prozess erforscht. Hierbei ergab die Inkubation mit Statinen keinen signifikanten Effekt.

Zusammenfassend beeinflussen die Statine die Angiogenese, indem sie Proliferation und Sprouting von Endothelzellen modulieren. Hierbei kommen unterschiedliche Wirkmechanismen mit sowohl pro- als auch antiangiogenetischen Effekten zum Tragen. Durch die Kombination dieser Effekte können Statine zum Wachstum stabiler, funktionsfähiger Gefäße beitragen und so eine Stabilisierung der atherosklerotischen Plaques herbeiführen. Auf der anderen Seite können die neu gebildeten Gefäße zum Wachstum von stabilen Kollateralen führen, welche die Versorgung ischämischer Areale gewährleisten.

Dies ist besonders für Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil (z.B. Diabetes mellitus) von Vorteil, weil bei ihnen eine pathologische Angiogenese stattfinden kann.

Die therapeutische Anwendung von Statinen ist von zentraler Bedeutung für die Behandlung myokardialer und peripherer vaskulärer Erkrankungen. Der protektive Effekt der Statine ist sowohl auf die LDL-Senkung als auch auf pleiotrope Prozesse zurückzuführen.

Grundlage und Voraussetzung der vorliegenden experimentellen Arbeit war die Annahme, dass die LPC-induzierte Angiogenese ein charakteristisches Merkmal im atherosklerotischen Prozess ist und die protektiven Effekte der Statine auf die Inhibition dieses Prozesses zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen den Schluss nahe, dass der pleiotrope Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf die Modulation der endothelialen Proliferation und des endothelialen Sprouting zurückzuführen ist. In Zukunft werden weitere Statinstudien zu einem besseren Verständnis der exakten pathophysiologischen Mechanismen der Angiogenese führen und

die therapeutischen Möglichkeiten bei der Arteriosklerose sowie anderen Erkrankungen verbessern.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Wirkungsmechanismen der Statin-bedingten Modulation der Angiogenese untersucht. In einem dreidimensionalen in vitro-Angiogenesemodell konnte gezeigt werden, dass Statine eine hochsignifikante Steigerung des LPC-induzierten endothelialen Sprouting verursachen und auf diese Weise eine proangiogenetische Wirkung hervorrufen. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase wird der Prozess der Isoprenylierung, eine Schlüsselreaktion bei der Signaltransduktion und Regulation zahlreicher Zellfunktionen, beeinflusst. Die durchgeführten Angiogeneseversuche zeigten, dass die Statine durch Modulation der Prenylierung das LPC-induzierte Sprouting beeinflussen. Das geschieht durch Hemmung der Bildung des Isoprenoids GGPP.

Andererseits ergeben die durchgeführten Proliferationsassays einen inhibierenden Effekt der Statine. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen spezifischen Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Im Gegensatz zu den proangiogenetischen Effekten bezüglich des Sproutings ist der antiproliferative Effekt der Statine auf die Reduktion des in der Zellmembran befindlichen Cholesterins zurückzuführen. Der Prozess der Isoprenylierung spielt dabei keine Rolle.

Alle Teilaspekte berücksichtigend, beeinflussen die Statine den Prozess der Angiogenese, indem sie Proliferation und Sprouting von Endothelzellen modulieren. Durch sowohl pro- als auch antiangiogenetische Effekte können die Statine zum Wachstum stabiler, funktionsfähiger Gefäße beitragen.

In der Zukunft werden weitere Statinstudien zu einem besseren Verständnis der exakten pathophysiologischen Mechanismen der Angiogenese führen und die therapeutischen Möglichkeiten bei der Atherogenese sowie anderen Erkrankungen verbessern.

5. Summary

The aim of this work was to investigate statin-induced modulation of angiogenesis. Using a three-dimensional in-vitro angiogenesis model it was shown that statins increase LPC-induced endothelial sprouting significantly and thus have a pro-angiogenic effect. This effect turned out to be a specific effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor. Inhibition of HMG-CoA-reductase modulates the process of isoprenylation, a key reaction in signal transduction and in regulation of numerous cell functions. The angiogenesis experiments indicated that statins regulate the LPC-induced sprouting through modulation of prenylation. This is caused by inhibiting the formation of the isoprenoid GGPP.

In contrast, proliferation assays elucidated an inhibitory effect of statins. This proved to be also a specific effect of HMG-CoA-reductase inhibitors. In contrast to the pro-angiogenic effects seen in the sprouting experiments, the antiproliferative effect of statins seen in the proliferation assays is dependent on the reduction of cholesterol located in the cell membrane. Here, isoprenylation seems to be of minor importance. Considering all results, statins affect the process of angiogenesis by modulating proliferation and sprouting of endothelial cells. Both pro- and anti-angiogenic effects of statins may contribute to the growth of stable and functional vessels.

In future, further studies investigating statins will lead to a better understanding of the exact pathophysiological mechanisms of angiogenesis and improve the therapeutic options in atherosclerosis and other diseases.

6. Literaturverzeichnis

1. Kozisek, P., *Arteriosclerotic Heart Disease*. Five Minute Clinical Consult 2005.
2. H. Hees, F.S., *Histologie* Deutscher Ärzte-Verlag, Köln, 2000: p. 191-204.
3. Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Basic Histology: Text and Atlas*. 10 edn, McGraw-Hill Medical: New York-Burr Ridge-San Francisco, 2005: p. 215.
4. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
5. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
6. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N Engl J Med, 1986. **314**(8): p. 488-500.
7. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
8. De Meyer, G.R. and A.G. Herman, *Vascular endothelial dysfunction*. Prog Cardiovasc Dis, 1997. **39**(4): p. 325-42.
9. Drexler, H. and B. Hornig, *Endothelial dysfunction in human disease*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 51-60.
10. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., *Pathologie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1997: p. 425-429.
11. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
12. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 73-91.
13. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
14. Modlich, U., F.J. Kaup, and H.G. Augustin, *Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion*. Lab Invest, 1996. **74**(4): p. 771-80.
15. Matsumoto, M., et al., *Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice*. J Vet Med Sci, 1992. **54**(5): p. 937-43.
16. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
17. Knighton, D.R., et al., *Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis*. Ann Surg, 1982. **196**(4): p. 379-88.
18. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
19. Barger, A.C., et al., *Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis*. N Engl J Med, 1984. **310**(3): p. 175-7.
20. Williams, A.E., et al., *Angiographic morphology in unstable angina pectoris*. Am J Cardiol, 1988. **62**(16): p. 1024-7.
21. Eisenstein, R., *Angiogenesis in arteries: review*. Pharmacol Ther, 1991. **49**(1-2): p. 1-19.

22. Sasayama, S. and M. Fujita, *Recent insights into coronary collateral circulation*. Circulation, 1992. **85**(3): p. 1197-204.
23. Bergeron, G.A. and V.O. Bjork, *Progression of coronary artery disease*. Am Heart J, 1984. **108**(6): p. 1585.
24. Mofidi, R., et al., *Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease*. Br J Surg, 2001. **88**(7): p. 945-50.
25. Vailhe, B., D. Vittet, and J.J. Feige, *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. Lab Invest, 2001. **81**(4): p. 439-52.
26. Bischoff, J., *Cell adhesion and angiogenesis*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S37-9.
27. Mignatti, P. and D.B. Rifkin, *Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis*. Enzyme Protein, 1996. **49**(1-3): p. 117-37.
28. Nicosia, R.F. and S. Villaschi, *Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall*. Int Rev Cytol, 1999. **185**: p. 1-43.
29. Slevin, M., et al., *Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation*. Lab Invest, 1998. **78**(8): p. 987-1003.
30. Gimbrone, M.A., Jr., R.S. Cotran, and J. Folkman, *Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis*. J Cell Biol, 1974. **60**(3): p. 673-84.
31. Ausprunk, D.H. and J. Folkman, *Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis*. Microvasc Res, 1977. **14**(1): p. 53-65.
32. Hirschi, K.K. and P.A. D'Amore, *Pericytes in the microvasculature*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 687-98.
33. Hirschi, K.K. and P.A. D'Amore, *Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance*. EXS, 1997. **79**: p. 419-28.
34. Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet, *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. Development, 1998. **125**(9): p. 1591-8.
35. Iruela-Arispe, M.L. and H.F. Dvorak, *Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 672-7.
36. Freedman, S.B. and J.M. Isner, *Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(3): p. 379-93.
37. Beecken, W.D., et al., *Efficacy of antiangiogenic therapy with TNP-470 in superficial and invasive bladder cancer models in mice*. Urology, 2000. **56**(3): p. 521-6.
38. Nissanov, J., et al., *Automatic vessel segmentation and quantification of the rat aortic ring assay of angiogenesis*. Lab Invest, 1995. **73**(5): p. 734-9.
39. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, *Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro*. Lab Invest, 1990. **63**(1): p. 115-22.
40. Zhu, W.H., et al., *Regulation of vascular growth and regression by matrix metalloproteinases in the rat aorta model of angiogenesis*. Lab Invest, 2000. **80**(4): p. 545-55.
41. Brown, K.J., et al., *A novel in vitro assay for human angiogenesis*. Lab Invest, 1996. **75**(4): p. 539-55.

42. Folkman, J. and C. Haudenschild, *Angiogenesis in vitro*. Nature, 1980. **288**(5791): p. 551-6.
43. Auerbach, R., et al., *Angiogenesis assays: problems and pitfalls*. Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 167-72.
44. Jain, R.K., et al., *Quantitative angiogenesis assays: progress and problems*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1203-8.
45. Montesano, R., et al., *Modulation of angiogenesis in vitro*. EXS, 1992. **61**: p. 129-36.
46. Goligorsky, M.S., et al., *Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(3): p. 269-71.
47. Malinda, K.M., et al., *Gp38k, a protein synthesized by vascular smooth muscle cells, stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells*. Exp Cell Res, 1999. **250**(1): p. 168-73.
48. Sala, R., et al., *The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo*. Eur J Cell Biol, 2002. **81**(11): p. 599-607.
49. Imaizumi, T., et al., *Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 410-5.
50. Bussolino, F., et al., *Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 629-41.
51. Amann, A., et al., *The influence of atracurium, cisatracurium, and mivacurium on the proliferation of two human cell lines in vitro*. Anesth Analg, 2001. **93**(3): p. 690-6.
52. Trochon, V., et al., *Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro*. Angiogenesis, 1998. **2**(3): p. 277-85.
53. Ulrich-Merzenich, G., et al., *Vitamin C and vitamin E antagonistically modulate human vascular endothelial and smooth muscle cell DNA synthesis and proliferation*. Eur J Nutr, 2002. **41**(1): p. 27-34.
54. Rymaszewski, Z., R.M. Cohen, and P. Chomczynski, *Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 617-21.
55. Zhang, C. and D.R. Harder, *Cerebral capillary endothelial cell mitogenesis and morphogenesis induced by astrocytic epoxyeicosatrienoic Acid*. Stroke, 2002. **33**(12): p. 2957-64.
56. Pedram, A., et al., *Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 17097-103.
57. Stoeltzing, O., et al., *Angiopoietin-1 inhibits tumour growth and ascites formation in a murine model of peritoneal carcinomatosis*. Br J Cancer, 2002. **87**(10): p. 1182-7.
58. Ahmad, S.A., et al., *The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1255-9.
59. Peters, K., et al., *Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro*. Microvasc Res, 2002. **64**(2): p. 334-8.
60. Schor, A.M., S.L. Schor, and T.D. Allen, *Effects of culture conditions on the proliferation, morphology and migration of bovine aortic endothelial cells*. J Cell Sci, 1983. **62**: p. 267-85.

61. Montesano, R., et al., *Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7297-301.
62. Montesano, R. and L. Orci, *Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro*. Cell, 1985. **42**(2): p. 469-77.
63. Montesano, R., L. Orci, and P. Vassalli, *In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices*. J Cell Biol, 1983. **97**(5 Pt 1): p. 1648-52.
64. Chalupowicz, D.G., et al., *Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 207-15.
65. Ferrenq, I., et al., *Modelling biological gel contraction by cells: mechanocellular formulation and cell traction force quantification*. Acta Biotheor, 1997. **45**(3-4): p. 267-93.
66. Nehls, V. and R. Herrmann, *The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration*. Microvasc Res, 1996. **51**(3): p. 347-64.
67. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ Res, 1998. **83**(10): p. 1059-66.
68. Koblizek, T.I., et al., *Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 529-32.
69. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
70. Clapp, C., et al., *The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis*. Endocrinology, 1993. **133**(3): p. 1292-9.
71. Bayless, K.J., R. Salazar, and G.E. Davis, *RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1673-83.
72. Yang, S., et al., *Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels*. Am J Pathol, 1999. **155**(3): p. 887-95.
73. Bach, T.L., et al., *VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels*. Exp Cell Res, 1998. **238**(2): p. 324-34.
74. Dubois-Stringfellow, N., A. Jonczyk, and V.L. Bautch, *Perturbations in the fibrinolytic pathway abolish cyst formation but not capillary-like organization of cultured murine endothelial cells*. Blood, 1994. **83**(11): p. 3206-17.
75. Kroon, M.E., et al., *Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices*. Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1731-42.
76. van Hinsbergh, V.W., P. Koolwijk, and R. Hanemaaijer, *Role of fibrin and plasminogen activators in repair-associated angiogenesis: in vitro studies with human endothelial cells*. EXS, 1997. **79**: p. 391-411.
77. Schonherr, E., et al., *Paracrine or virus-mediated induction of decorin expression by endothelial cells contributes to tube formation and prevention of apoptosis in collagen lattices*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(1): p. 44-55.
78. Kuzuya, M., et al., *Induction of apoptotic cell death in vascular endothelial cells cultured in three-dimensional collagen lattice*. Exp Cell Res, 1999. **248**(2): p. 498-508.

79. Korff, T. and H.G. Augustin, *Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation*. J Cell Biol, 1998. **143**(5): p. 1341-52.
80. Helmlinger, G., et al., *Formation of endothelial cell networks*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 139-41.
81. Steinberg, D., et al., *Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis*. Circulation, 1989. **80**(3): p. 719-23.
82. Parthasarathy, S., et al., *Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation*. Arteriosclerosis, 1989. **9**(3): p. 398-404.
83. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
84. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg, *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6499-503.
85. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg, *Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein*. Arteriosclerosis, 1983. **3**(2): p. 149-59.
86. Yla-Herttuala, S., et al., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1086-95.
87. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 1785-92.
88. Stadtman, E.R., *Protein oxidation and aging*. Science, 1992. **257**(5074): p. 1220-4.
89. Liu, K.Z., T.E. Cuddy, and G.N. Pierce, *Oxidative status of lipoproteins in coronary disease patients*. Am Heart J, 1992. **123**(2): p. 285-90.
90. Lehr, H.A., et al., *Oxidatively modified human low-density lipoprotein stimulates leukocyte adherence to the microvascular endothelium in vivo*. Res Exp Med (Berl), 1991. **191**(2): p. 85-90.
91. Vora, D.K., et al., *Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression*. Circ Res, 1997. **80**(6): p. 810-8.
92. Cushing, S.D., et al., *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5134-8.
93. Rajavashisth, T.B., et al., *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins*. Nature, 1990. **344**(6263): p. 254-7.
94. Schwartz, D., et al., *Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1968-73.
95. Parhami, F., et al., *Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 471-8.
96. Sparrow, C.P., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2599-604.

97. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Atherosclerosis. Scavenging for receptors.* Nature, 1990. **343**(6258): p. 508-9.
98. Ku, G., et al., *Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid.* J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14183-8.
99. Frostegard, J., et al., *Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells.* Atherosclerosis, 1991. **90**(2-3): p. 119-26.
100. Liao, F., et al., *Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice.* J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2572-9.
101. Berliner, J.A., et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.* Circulation, 1995. **91**(9): p. 2488-96.
102. Quinn, M.T., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(8): p. 2805-9.
103. McMurray, H.F., S. Parthasarathy, and D. Steinberg, *Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes.* J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 1004-8.
104. Kume, N., M.I. Cybulsky, and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells.* J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1138-44.
105. Kume, N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells.* J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 907-11.
106. Reid, V.C. and M.J. Mitchinson, *Toxicity of oxidised low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro.* Atherosclerosis, 1993. **98**(1): p. 17-24.
107. Fei, H., et al., *Regulation of endothelial cell tissue factor expression by minimally oxidized LDL and lipopolysaccharide.* Arterioscler Thromb, 1993. **13**(11): p. 1711-7.
108. Brand, K., et al., *Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 790-7.
109. Latron, Y., et al., *Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells.* Arterioscler Thromb, 1991. **11**(6): p. 1821-9.
110. Yang, X., et al., *Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins.* Circ Res, 1994. **74**(2): p. 318-28.
111. Lauber, K., et al., *Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal.* Cell, 2003. **113**(6): p. 717-30.
112. Quinn, M.T., et al., *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 2995-8.
113. Wu, R., et al., *Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(4): p. 626-30.
114. Heinloth, A., et al., *Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(10): p. 1819-25.

115. Chai, Y.C., et al., *Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17791-7.
116. Matsumoto, T., et al., *Specific impairment of endothelium-derived hyperpolarizing factor-type relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic mice*. Vascu Pharmacol, 2006. **44**(6): p. 450-60.
117. Rikitake, Y., et al., *Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration and proliferation via inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1006-12.
118. Group, H.P.S.C., *Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial*. Lancet 2002. **2002**: p. 360:7-22.
119. (LIPID) Study Group . , *Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels*. New England Journal of Medicine, 1998. **339**: p. 1349–1357.
120. Group, S.S.S.S., *Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 participants with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. Lancet, 1994. **344**: p. 1383-9.
121. Group, W.o.S.C.P.S., *Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS)*. Circulation, 1998. **97**: p. 1440–1445.
122. Liao, J.K., *Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 285-8.
123. Laufs, U., et al., *Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men*. Am J Cardiol, 2001. **88**(11): p. 1306-7.
124. Bonetti, P.O., et al., *Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant?* Eur Heart J, 2003. **24**(3): p. 225-48.
125. Werner, N., G. Nickenig, and U. Laufs, *Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(2): p. 105-16.
126. Gawaz, M., *Das Blutplättchen*. Georg Thieme Verlag, 1999. **29**.
127. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators*. Circulation, 1998. **98**(9): p. 839-44.
128. Ridker, P.M., et al., *Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events*. N Engl J Med, 2001. **344**(26): p. 1959-65.
129. Libby, P. and M. Aikawa, *Mechanisms of plaque stabilization with statins*. Am J Cardiol, 2003. **91**(4A): p. 4B-8B.
130. Reilly, S.D., et al., *Statins improve human coronary atherosclerotic plaque morphology*. Tex Heart Inst J, 2008. **35**(2): p. 99-103.
131. Osamah, H., et al., *Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **44**(1): p. 77-83.
132. Essler, M., et al., *Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatidic acid receptors*

- and the Rho/Rho-kinase pathway. Inhibition by lovastatin. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **905**: p. 282-6.
133. van Willigen, G., G. Gorter, and J.W. Akkerman, *LDLs increase the exposure of fibrinogen binding sites on platelets and secretion of dense granules*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): p. 41-6.
 134. Park, H.J., et al., *Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis*. *Stem Cell Rev*, 2006. **2**(2): p. 93-102.
 135. Sun, W., et al., *Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo*. *Circulation*, 2006. **114**(24): p. 2655-62.
 136. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science*, 1972. **175**(23): p. 720-31.
 137. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000. **1**(1): p. 31-9.
 138. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
 139. Harder, T. and K. Simons, *Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(4): p. 534-42.
 140. Varma, R. and S. Mayor, *GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface*. *Nature*, 1998. **394**(6695): p. 798-801.
 141. London, E. and D.A. Brown, *Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1508**(1-2): p. 182-95.
 142. Melkonian, K.A., et al., *Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(6): p. 3910-7.
 143. Scheiffele, P., M.G. Roth, and K. Simons, *Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain*. *EMBO J*, 1997. **16**(18): p. 5501-8.
 144. Kabouridis, P.S., A.I. Magee, and S.C. Ley, *S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes*. *EMBO J*, 1997. **16**(16): p. 4983-98.
 145. Shaul, P.W. and R.G. Anderson, *Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5 Pt 1): p. L843-51.
 146. Kurzchalia, T.V., E. Hartmann, and P. Dupree, *Guilty by insolubility--does a protein's detergent insolubility reflect a caveolar location?* *Trends Cell Biol*, 1995. **5**(5): p. 187-9.
 147. Rietveld, A. and K. Simons, *The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1376**(3): p. 467-79.
 148. Ilangumaran, S. and D.C. Hoessli, *Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane*. *Biochem J*, 1998. **335** (Pt 2): p. 433-40.
 149. Keller, P. and K. Simons, *Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin*. *J Cell Biol*, 1998. **140**(6): p. 1357-67.
 150. Schmitz, G. and W. Drobnik, *Pharmacogenomics and pharmacogenetics of cholesterol-lowering therapy*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. **41**(4): p. 581-9.

151. Rodriguez Boulan, E., et al., *Spatial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough microsomes. II. Transmembrane disposition and characterization of glycoproteins*. J Cell Biol, 1978. **78**(3): p. 894-909.
152. van Meer, G. and K. Simons, *Lipid polarity and sorting in epithelial cells*. J Cell Biochem, 1988. **36**(1): p. 51-8.
153. Rodriguez-Boulan, E. and A. Gonzalez, *Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props?* Trends Cell Biol, 1999. **9**(8): p. 291-4.
154. Mukherjee, S., T.T. Soe, and F.R. Maxfield, *Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails*. J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1271-84.
155. Janes, P.W., et al., *The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling*. Semin Immunol, 2000. **12**(1): p. 23-34.
156. Baird, B., E.D. Sheets, and D. Holowka, *How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E?* Biophys Chem, 1999. **82**(2-3): p. 109-19.
157. Subczynski, W.K. and A. Kusumi, *Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1610**(2): p. 231-43.
158. Mancini, P. and P.A. Santi, *Localization of the GM1 ganglioside in the vestibular system using cholera toxin*. Hear Res, 1993. **64**(2): p. 151-65.
159. Liao, Z., et al., *Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(11): p. 1009-19.
160. Ehehalt, R., et al., *Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 113-23.
161. Fassbender, K., et al., *Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5856-61.
162. Wolozin, B., et al., *Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors*. Arch Neurol, 2000. **57**(10): p. 1439-43.
163. Jick, H., et al., *Statins and the risk of dementia*. Lancet, 2000. **356**(9242): p. 1627-31.
164. Manes, S., et al., *From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 320-6.
165. Manes, S., et al., *Membrane raft microdomains in chemokine receptor function*. Semin Immunol, 2001. **13**(2): p. 147-57.
166. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
167. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med, 2003. **3**(7): p. 643-51.
168. Pepper, M.S., et al., *Junctional communication is induced in migrating capillary endothelial cells*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3027-38.
169. Madri, J.A., B.M. Pratt, and J. Yannariello-Brown, *Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration*. Am J Pathol, 1988. **132**(1): p. 18-27.

170. Schaefer, C.A., et al., *Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells*. *Vascul Pharmacol*, 2004. **41**(2): p. 67-73.
171. Takayama, M., K. Yao, and M. Wada, *The dihydropyridine calcium channel blocker benidipine prevents lysophosphatidylcholine-induced endothelial dysfunction in rat aorta*. *J Biomed Sci*, 2009. **16**(1): p. 57.
172. Moreno, P.R., et al., *Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability*. *Circulation*, 2004. **110**(14): p. 2032-8.
173. Kureishi, Y., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals*. *Nat Med*, 2000. **6**(9): p. 1004-10.
174. Dunmore, B.J., et al., *Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques*. *J Vasc Surg*, 2007. **45**(1): p. 155-9.
175. Sluimer, J.C., et al., *Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **53**(17): p. 1517-27.
176. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. *J Pathol*, 2009. **218**(1): p. 7-29.
177. Kunte, H., et al., *Markers of instability in high-risk carotid plaques are reduced by statins*. *J Vasc Surg*, 2008. **47**(3): p. 513-22.
178. de Lorenzo, F., et al., *Statin therapy-evidence beyond lipid lowering contributing to plaque stability*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(28): p. 3385-93.
179. Vaughan, C.J., A.M. Gotto, Jr., and C.T. Basson, *The evolving role of statins in the management of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(1): p. 1-10.
180. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 685-93.
181. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
182. Hancock, J.F., *Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(6): p. 456-62.
183. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(37): p. 24266-71.
184. Massy, Z.A., W.F. Keane, and B.L. Kasiske, *Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction?* *Lancet*, 1996. **347**(8994): p. 102-3.
185. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. *Dev Biol*, 2004. **265**(1): p. 23-32.
186. Park, H.J., et al., *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA*. *Circ Res*, 2002. **91**(2): p. 143-50.
187. Katsumoto, M., et al., *Biphasic effect of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin, on vascular endothelial cells and angiogenesis*. *Circ J*, 2005. **69**(12): p. 1547-55.

188. Kuzuya, M., et al., *Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque*. J Cell Physiol, 1995. **164**(3): p. 658-67.

7. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Arbeit unterstützten, möchte ich mich hiermit sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Tillmanns, Prof. Dr. R. Voss, Herrn Dr. M. Grebe, Frau Dr. M. Schäfer und Herrn Dr. C. Schäfer dafür, dass sie diese Dissertationsarbeit ermöglicht haben. Herrn Dr. C. Schäfer danke ich darüber hinaus für seine engagierte Betreuung.

Die fortwährende wissenschaftliche Diskussion, seine Ideen und Hinweise förderten stets den Fortgang dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen des angiologischen Labors Frau D. Reitz und Frau H. Thomas für die freundschaftliche und unterstützende Zusammenarbeit danken, mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes leisteten.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, welche durch konsequente finanzielle Unterstützung das Fertigstellen meiner Arbeit während des Studiums ermöglicht haben.

Danke.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“