

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

Pleiotrope Effekte der Therapie mit Simvastatin und Ezetimib auf die
Endothelfunktion in LDL-Rezeptor-Knockout Mäusen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Nadja Katrin Miller
aus Frankfurt am Main

Würzburg, Juli 2011

Referent : Prof. Dr. med. G. Ertl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Kellersmann

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 20. März 2012

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das LDL-Rezeptor-Knockout Modell	1
1.2	Pathogenese der Atherosklerose	1
1.3	Endotheliale Dysfunktion	3
1.4	Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.5	Die NO-Synthasen (NOS)	5
1.6	Simvastatin	7
1.7	Ezetimib	8
1.8	Die Kombinationstherapie	8
1.9	Fragestellung und Ziel der Arbeit	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Chemikalien und Reagenzien	10
2.2	Lösungen und Puffer	13
2.3	Verbrauchsmaterialien	14
2.4	Technische Geräte	15
2.5	Software	15
2.6	Mäuse	16
2.7	Electron Spin Resonance (ESR) Spektroskopie	16
2.7.1	Prinzip der ESR Spektroskopie	16
2.7.2	Durchführung der ESR Spektroskopie zum Nachweis freien NOs	17
2.7.3	Auswertung der ESR Spektroskopie	18
2.8	Nitrosyl-Hämoglobin Messung mittels ESR Spektroskopie	18
2.9	Western Blot	18
2.9.1	Prinzip des Western Blots	18
2.9.2	Proteinextraktion	18
2.9.3	Proteinkonzentrationsanalyse	19
2.9.4	Durchführung des Western Blots	19
2.10	Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	20
2.10.1	Prinzip der RT-PCR	20
2.10.2	Durchführung der RT-PCR	20
2.11	Immunhistochemie	21
2.12	Gefäßreaktivität	22
2.13	Statistische Analysen	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Nachweis vaskulärer NO-Produktion mittels ESR Spektroskopie	23
3.2	Ermittlung der NO-Bioverfügbarkeit durch Nitrosyl-Hämoglobin mittels ESR Spektroskopie	24
3.3	Expression der endothelialen NO-Synthase	24
3.3.1	eNOS im Western Blot	24
3.3.2	eNOS in RT-PCR	26
3.3.3	eNOS in Immunhistochemie	27
3.4	Gefäßreaktivität	28

4	Diskussion	30
4.1	Effekt der therapeutischen Intervention auf die vaskuläre NO-Produktion	31
4.2	Effekt der therapeutischen Intervention auf die NO-Bioverfügbarkeit	33
4.3	Effekt der therapeutischen Intervention auf die Expression der eNOS.....	34
4.4	Effekt der therapeutischen Intervention auf die Gefäßreaktivität	35
4.5	Pleiotrope Effekte und Beeinflussung der Endothelfunktion durch therapeutische Intervention	35
5	Zusammenfassung	37
6	Literaturverzeichnis	39
7	Anhang.....	43

1 Einleitung

Koronare Herzkrankheit (KHK) und ischämischer Hirninfarkt gehören zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Industrienationen. Einen wesentlichen Anteil der Pathogenese stellt die Bildung von atherosklerotischen Plaques in den versorgenden Gefäßen dar. Ein entscheidender Risikofaktor der Atheroskleroseentstehung und -entwicklung ist u.a. eine Hypercholesterinämie [1, 2].

1.1 Das LDL-Rezeptor-Knockout Modell

Die Lipidbestandteile des Plasmas werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Neben den Triglyceriden macht das Cholesterin den Hauptbestandteil aus. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Cholesterins aus Lipiden und Apolipoproteinen erfolgt die Einteilung in HDL (high density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins), und VLDL (very low density lipoproteins). HDL und LDL haben besonders hohe Cholesterinanteile, doch während HDL durch den reversen Cholesterintransport protektive Bedeutung zukommt, ist LDL für den Transport in die Peripherie verantwortlich und kann eine Hypercholesterinämie verursachen. LDL kann verschieden modifiziert werden (z.B. durch Oxidation) und dadurch noch zusätzliche schädigende Wirkungen erhalten [3]. Die Aufnahme des LDL in peripheren Geweben erfolgt über den LDL-Rezeptor, der eine spezifische extrazelluläre Bindungsstelle für Apolipoprotein B100, das Transportprotein des LDL, besitzt.

Ein Defekt des Rezeptors, wie es auch bei der Familiären Hypercholesterinämie der Fall ist, führt zu erhöhten LDL-Cholesterin-Konzentrationen im Blut mit der Folge einer frühzeitigen Atheroskleroseentstehung und assoziierten kardiovaskulären Komplikationen wie z.B. Apoplex und Myokardinfarkt. Durch Deletion des LDL-Rezeptors (LDL-R) mittels gezielter Mutagenese ist es gelungen LDL-R-Knockout (KO) Mäuse zu generieren und als Standardmodell der Atheroskleroseforschung zu etablieren [4].

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

Die Entstehung der Atherosklerose wird heute als komplexes Geschehen im Rahmen einer chronisch inflammatorischen Reaktion angesehen, an der unterschiedliche Triggermechanismen, Zelltypen, Gene und Umweltfaktoren beteiligt sein können [1, 5]. Als Risikofaktoren gelten Hypercholesterinämie, das Vorhandensein freier Radikale – beispielsweise durch Nikotinabusus oder auch endogene Produktion –, Hypertonie und

hämodynamische Veränderungen, genetische Alterationen, Diabetes mellitus, erhöhtes Plasma-Homocystein sowie einige Mikroorganismen bzw. ihre Toxine [1, 2, 5]. Diese Faktoren sind durch ihre Effekte auf die lokale Entzündungsreaktion über verschiedene Signalwege an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. So können sie die Funktion und Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) beeinflussen und damit Veränderungen der Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit, der Generation von Superoxid, der Produktion weiterer Mediatoren sowie der Verfügbarkeit wichtiger Substrate und Kofaktoren bewirken. Ross beschrieb 1999 die pathogenetischen Entwicklungsschritte der Atherosklerose. Die bereits genannten Risikofaktoren sind dabei selbst entzündliche Stimuli oder führen über diverse schädliche Einflüsse zu einem veränderten homöostatischen Milieu in den Gefäßen. Darauf reagiert zunächst das Endothel mit vermehrter Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten, einer veränderten Permeabilität und Sezernierung vasoaktiver Moleküle, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren. Im Verlauf kommt es zu einer chronisch inflammatorischen Reaktion. Diese ist die Grundlage der Entstehung von Atherosklerose [1, 6]. Frühe Läsionen, sogenannte *fatty streaks*, zeichnen sich durch Lipidablagerungen und die Ansammlung von Makrophagen und T-Lymphozyten aus. Lipidablagerungen werden vor allem durch eine Hypercholesterinämie begünstigt, die Aufnahme von modifiziertem LDL in Makrophagen führt zur Bildung von sogenannten Schaumzellen. Die Entzündungszellen unterhalten das inflammatorische Geschehen durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wodurch es zur Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und der Produktion einer extrazellulären, kollagenhaltigen Matrix kommt. Außerdem findet eine weitere extrazelluläre Ablagerung von Lipiden und glatten Gefäßmuskelzellen statt. Es entstehen fortgeschrittene Läsionen, sogenannte *intermediate lesions*, die erste fibröse Plaques darstellen. Die anhaltende Inflammation und eine Verdickung der Gefäßwand führen zur maximalen Dilatation des Gefäßes. Weitere Schädigung hat die Vergrößerung der Läsionen durch Zellakkumulation, Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Produktion fibrösen Gewebes und die Entstehung einer zentralen Nekrose zur Folge. So entstehen komplizierte Läsionen, *complicated lesions*, die von einer fibrösen Kappe bedeckt sind und ein lipidreiches Inneres mit nekrotischem Zentrum enthalten [1]. Klinische Konsequenzen ergeben sich aus der Lumenverlegung, Thrombusanlagerung oder einer Plaqueruptur, es kann aber auch zur Kalzifizierung oder Neovaskularisation kommen.

1.3 Endotheliale Dysfunktion

Dem Endothel kommt eine wichtige Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität zu. Seine Funktion beinhaltet Vasotonusregulation, Kontrolle der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, der Plättchenaggregation und der Monozyten-Leukozyten-Interaktion [7, 8].

Wie schon oben beschrieben kommt es im Rahmen von entzündlichen Prozessen zu einer endothelialen Aktivierung. Dies drückt sich in einer erhöhten Oberflächenadhäsivität und Sekretion vasoaktiver Substanzen aus [1, 2] und führt zur endothelialen Dysfunktion.

Wesentliches Merkmal dieses Zustandes ist vor allem die reduzierte Endothel-vermittelte Vasorelaxation, bzw. die von Ku erstmalig beschriebene paradoxe Vasokonstriktion [9].

Dieses Phänomen wurde auch vielfach in Ischämie-Reperusionsversuchen beobachtet [10-12] und es zeigte sich, dass die Reperusionsphase das entscheidende Ereignis ist, das zur Auslösung der endothelialen Dysfunktion führt [12]. Während der Reperusionsphase entstehen reaktive Sauerstoffspezies (freie Radikale). Ihr Vorhandensein im vaskulären Milieu bezeichnet man als oxidativen Stress. Es besteht ein Zusammenhang zwischen herrschendem oxidativen Stress und gestörter endothelialer Relaxation. [13]. Dies führte zu der Annahme, dass eine Superoxidproduktion von reperfundiertem Endothel der gestörten Relaxation unmittelbar vorausgeht und diese triggert. Pathologisches Korrelat der gestörten endothelialen Relaxation ist die reduzierte Freisetzung und verminderte Aktivierung des EDRF (endothelium derived relaxing factor) [14], bei dem es sich um Stickstoffmonoxid (NO) handelt [15]. Es herrscht also eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit durch verminderte endotheliale NO-Produktion als Ausdruck einer gestörten Endothelfunktion im Rahmen des Entzündungsprozesses. Gleichzeitig kann NO extrazellulär durch Reaktion mit Superoxid (O_2^-) inaktiviert werden. Des Weiteren vermittelt O_2^- selbst vasokonstriktorische Effekte [15]. Die endotheliale Aktivierung und Dysfunktion ist die Grundlage der Entstehung atherosklerotischer Läsionen [1, 6]. Durch Veränderung der Endothelpermeabilität, pathologische Endothel-Leukozyten-Interaktion, Beeinflussung der Thrombozytenaggregation und Beeinträchtigung der Regulation von Gefäßwachstum und Remodeling trägt sie außerdem zu deren Progression bei [16, 17]. Neben der Progression der Atherosklerose korreliert die endotheliale Dysfunktion auch per se mit kardiovaskulären Komplikationen [18]. Der Zustand der Endothelfunktion spiegelt den im Gefäß herrschenden Gesamtstress durch alle beteiligten Risikofaktoren wider und hat daher wichtige diagnostische und prognostische Bedeutung [19, 20].

1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) wird im Endothel durch NO-Synthasen (NOS) produziert, als Substrat dient L-Arginin [21]. NO vermittelt die vasodilatorische Funktion des Endothels [15]. Darüber hinaus ist NO an einer Vielzahl weiterer Funktionen des Endothels, wie Kontrolle der Gefäßmuskelzellproliferation, Reduktion der Thrombozytenaktivierung und -aggregation und Verhinderung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion, beteiligt [20, 22, 23]. Eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit geht mit einer beeinträchtigten Endothelfunktion einher – also gestörter Vasodilatation, einem veränderten Adhäsionsmolekülprofil des Endothels, gesteigerter Monozyteninteraktion [24] – und führt letztlich zu endothelialer Dysfunktion und der Entstehung von Atherosklerose. NO kommen also wichtige atheroprotektive Eigenschaften zu. Dies wurde durch Untersuchungen belegt, bei denen eine therapeutische Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit zu einer verbesserten Vasorelaxation und einem verbesserten „outcome“ für die Patienten führte [25-27]. Umgekehrt kann eine Inhibition der NO-Synthasen zu gegenteiligen Effekten führen [28-30]. Ursächlich für die verminderte NO-Bioverfügbarkeit kann eine reduzierte Freisetzung durch ein geschädigtes Endothel sein. Möglich ist auch die Reduktion der NO-Aktivität durch extrazelluläre Reaktion mit anderen Molekülen, wie z.B. Superoxid (O_2^-), dessen Produktion ebenfalls pathologisches Korrelat der Endothelschädigung bzw. atherosklerotischer Läsionen ist [13, 31]. NO hat antioxidierende und gleichzeitig oxidierende Eigenschaften. Für seinen Funktionszustand entscheidend ist das jeweilig vorliegende Verhältnis von NO zu reaktiven Molekülen und die Milieubedingungen. So ist NO im physiologischen Milieu ein Radikalfänger. NO kann aber auch reaktive Metaboliten erzeugen, wie z.B. Peroxynitrit bei der Reaktion mit O_2^- . Diese Reaktion läuft schneller ab als O_2^- von der Superoxiddismutase abgefangen werden kann, zu hohe Konzentrationen von NO begünstigen also die Entstehung von Peroxynitrit. O_2^- und Peroxynitrit tragen zur Oxidation von LDL und der Entstehung von Lipidperoxiden bei, welche ihrerseits die weitere endotheliale Dysfunktion und Atheroskleroseentstehung fördern. Desweiteren kann in saurem Milieu, wie es z.B. bei einer Inflammation der Fall ist, NO selbst zur Oxidation von LDL führen bzw. diese beschleunigen und somit oxidativen Stress mitverursachen [31-34].

Die NO-vermittelte Signaltransduktion erfolgt über die Aktivitätssteigerung der Guanylatcyclase. Daraus resultiert eine Erhöhung cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP). cGMP vermittelt eine Abnahme des intrazellulären Calciums und führt so zu einer Abnahme des Gefäßtonus [35, 36]. Korrelierend dazu konnte eine Blutdruckerhöhung durch

pharmakologische Inhibition der NO-Produktion bzw. in Tieren mit einem Knockout der endothelialen NOS beobachtet werden. Die genetische Deletion der eNOS führte bei Messungen der Gefäßreaktivität zu einer verminderten Fähigkeit der Vasodilatation [21, 37]. NO erfüllt vielseitige gefäßprotektive Funktionen und ist maßgeblich an der Endothelfunktion beteiligt. Daraus lässt sich schließen, dass eine kontinuierliche NO-Produktion nötig ist, um einer endothelialen Aktivierung entgegenzuwirken [38]. Dabei kommt es bei Fehlen der NO-Produktion aber nicht automatisch zur Endothelzellaktivierung. Eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit hat eher einen permissiven Charakter und erlaubt die Entwicklung einer Endothelzellaktivierung durch aktivierende inflammatorische Mediatoren [39].

1.5 Die NO-Synthasen (NOS)

NO wird durch NO-Synthasen (NOS) produziert, von denen drei Isoformen existieren. nNOS, die neuronale NOS, ursprünglich in neuronalem Gewebe entdeckt, iNOS, die induzierbare NOS, die zuerst in immunaktivierten Zellen gefunden wurde, und eNOS, die endotheliale NOS, die man zunächst im Endothel lokalisiert fand. Diese Einordnung und Benennung der Enzyme geht auf ihre primäre Entdeckung zurück, mittlerweile wurden alle Isoformen aber auch in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen. nNOS und eNOS werden konstitutiv exprimiert, können aber durch bestimmte Stimuli, z.B. hämodynamischen Stress oder Nervenläsionen, induziert werden. iNOS dagegen gilt als durch Immunaktivierung induzierte NOS, wurde in manchen Zellen jedoch auch konstitutiv exprimiert nachgewiesen. Die NO-Synthasen katalysieren die Oxidation der Guanidino-Gruppe von L-Arginin zu NO und L-Citrullin mithilfe der Kosubstrate O_2 (molekularer Sauerstoff) und NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat). Als Redoxfaktoren sind Eisen-II-haltiges Häm, reduzierte Thiole, FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), FMN (Flavin-Mononukleotid) und BH_4 (Tetrahydrobiopterin) an der Reaktion beteiligt. Die Regulation der Enzyme erfolgt über die Calcium(Ca^{2+})-abhängige Bindung an Calmodulin (CaM). Die Bindung bewirkt eine Konformationsänderung und damit Aktivierung der Enzyme. Für nNOS und eNOS sind dafür hohe Ca^{2+} -Konzentrationen notwendig, ihre Enzymaktivität lässt sich also über den Calcium-In- und Efflux der Zelle steuern. iNOS dagegen besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu CaM, auch bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen und ist somit Ca^{2+} -unabhängig. Die Aktivität der iNOS wird durch Stimuli immunaktivierter Zellen, beispielsweise Zytokine, getriggert [40, 41].

Die Bedeutung der NOS erklärt sich durch die vasoprotektiven Eigenschaften ihres Syntheseproduktes NO und die (patho-)physiologischen Konsequenzen einer veränderten NO-Bioverfügbarkeit.

Bei der Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion und Integrität kommt der eNOS eine besondere Bedeutung zu. Eine hohe konstitutive Expression von eNOS wurde vor allem in vaskulären Endothelzellen nachgewiesen [40]. Kommt es zu vaskulärem Stress für das Endothel kann eNOS induziert werden durch biochemische und biomechanische Stimuli, wie inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, bakterielle Toxine, strömungsbedingte Scherkräfte und Hormone (Östrogen). Eine akute Regulierung der Enzymaktivität wird dann über Phosphorylierungsvorgänge erreicht [42, 43].

Während eNOS konstitutiv in gesunden Gefäßen exprimiert wird, sind iNOS und nNOS hier nicht nachweisbar. In atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen allerdings lassen sich alle NOS-Isoformen nachweisen [44]. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen scheint die eNOS Expression vermindert zu sein, die NO-Bioverfügbarkeit ist reduziert [44].

Die Deletion von eNOS führt in hypercholesterinämischen ApoE-KO-Mäusen zu einer Zunahme atherosklerotischer Läsionen, eNOS wirkt also atheroprotektiv [45]. Die Rolle von nNOS und iNOS im komplexen Geschehen der Atheroskleroseentstehung ist bislang nicht eindeutig geklärt. nNOS scheint durch die Inhibierung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen atheroprotektiv zu wirken. Durch neuronale Expression der nNOS liegt möglicherweise eine indirekte atheroprotektive Wirkung über die Steuerung von Hormonkreisläufen vor [46]. iNOS wurde in atherosklerotischen Läsionen v. a. in Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. iNOS ist wesentlich am oxidativen Stress von Gefäßen beteiligt und wirkt somit atherogen [47]. Eine Deletion von iNOS führte zur Reduktion atherosklerotischer Läsionen. iNOS ist durch seine starke, Ca^{2+} -unabhängige CaM-Bindung ein sehr potentes Enzym, welches hohe NO-Konzentrationen produzieren kann [44, 48]. Angesichts der möglichen prooxidativen Eigenschaften hoher Konzentrationen von NO und durch Bildung weiterer reaktiver Metaboliten kann die iNOS-vermittelte NO-Produktion proatherogene Effekte vermitteln.

Die Menge des verfügbaren NO ist zum einen direkt von Expression und Aktivitätszustand der NO-Synthasen abhängig, zum anderen spielen aber auch die Verfügbarkeit der Substrate und Kofaktoren und die weitere Verstoffwechslung des NO eine Rolle. Für alle NOS-Isoformen wurde eine sogenannte „Entkopplung“ beschrieben, bei der die Enzyme Superoxid (O_2^-) produzieren. Für eNOS ist das v.a. bei einem Mangel des Kofaktors BH_4 der Fall [41].

O_2^- wirkt atherogen: per se als Radikal, als Reaktionspartner bei der Bildung anderer reaktiver Verbindungen wie Peroxynitrit und durch die Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit.

Bei der Entstehung der Atherosklerose liegt ein komplexes Geschehen aus verschiedenen Expressions- und Funktionszuständen der Isoformen der NO-Synthasen, der Bioverfügbarkeit des NO und seinen gleichzeitig oxidativen und antioxidativen Eigenschaften vor.

1.6 Simvastatin

Simvastatin gehört zur Gruppe der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) - Reduktase-Hemmer, auch Statine genannt. Die Hemmung der HMG-CoA Reduktase, dem zentralen Enzym der Cholesterinsynthese, bewirkt eine Reduktion v.a. der hepatischen Cholesterinproduktion. Statine senken effektiv den Cholesterinplasmaspiegel und führen zu einer reduzierten Morbidität und Mortalität von KHK-Patienten [27]. Neben der Lipidsenkung besitzen Statine sogenannte pleiotrope Effekte, die unabhängig von einer Cholesterinsenkung vasoprotektive Effekte vermitteln. Zu diesen pleiotropen Effekten gehören unter anderem Wiederherstellung der Endothelfunktion, Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Plaquestabilisierung und Reduktion vaskulärer Inflammation [49-51]. Eine entscheidende Rolle in der Statin-vermittelten Wiederherstellung und Erhaltung der Endothelfunktion spielt die eNOS und die davon abhängige NO Produktion. Statine führen zu einer Expressions- und Aktivitätssteigerung der eNOS. Diese erfolgt indirekt über eine verminderte Synthese von Isoprenoiden [49, 52]. Des Weiteren besitzen Statine antioxidative Eigenschaften und schützen somit das Endothel vor freien Radikalen [49, 53]. Statine beeinflussen auch zusätzlich die zelluläre Plaquekomposition indem sie die Zellproliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Zellakkumulation inhibieren [51, 52]. Auch eine direkt antiinflammatorische Wirkung der Statine konnte nachgewiesen werden [54].

Die Pleiotropie von Statinen lässt sich zusammenfassend als Regulation bzw. Induktion potentiell antiatherogener Signaltransduktionswege beschreiben und kann die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion verhindern.

An dieser Stelle sei noch eine Besonderheit der Verwendung von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern im LDL-R-KO Modell erwähnt. HMG-CoA-Reduktase-Hemmer bewirken eine Cholesterinsenkung über die hepatische Synthesehemmung sowie eine vermehrte hepatische Cholesterinaufnahme durch Erhöhung der Expression von LDL-Rezeptoren. Da dies im Falle eines LDL-R-Genknockouts nicht möglich ist, kommt es paradoxerweise zu keiner Senkung

des Plasmacholesterins. Hierdurch lässt sich der Benefit von pleiotropen Effekten der Statine in diesem Modell besonders gut untersuchen [49, 51].

1.7 Ezetimib

Ezetimib gehört zu einer relativ neuen Klasse cholesterinsenkender Medikamente. Sein Wirkprinzip besteht in der Hemmung der enteralen Aufnahme am Cholesterintransporter NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) [55]. Dies führt zu einer drastischen Reduktion des Plasmacholesterins, dabei wurde vor allem eine Senkung der Chylomikronen sowie des LDL- und VLDL-Cholesterins beobachtet, während das HDL-Cholesterin erhöht wurde. Außerdem konnte unter der Therapie mit Ezetimib eine signifikante Reduktion atherosklerotischer Läsionen erzielt werden [56]. Nakagami et al. fanden neben einer Reduktion des Plasmacholesterins durch Ezetimib auch eine Verringerung der endothelialen Dysfunktion und des oxidativen Stresses. In mit Ezetimib behandelten Versuchsgruppen wurden daneben auch eine erhöhte eNOS-mRNA Expression sowie eine reduzierte mRNA Expression von Interleukin 6, einem inflammatorischen Zytokin, gefunden. Die Endothelsituation scheint also insgesamt verbessert zu sein. Darüber hinaus wurde in der Leber eine kompensatorisch erhöhte HMG-CoA-Synthase Expression beobachtet [57]. Kuhlencordt et al. gingen der Frage nach eNOS-vermittelten pleiotropen Effekten von Ezetimib weiter nach, indem sie ein eNOS-KO-Modell benutzten. Hier konnte die Reduktion von Atherosklerose und vaskulärer Inflammation durch Ezetimib definitiv unabhängig von eNOS belegt werden. Bei intaktem eNOS-Gen veränderte Ezetimib weder die Expression noch die Enzymaktivität von eNOS, dennoch stellte sich hier ein zusätzlicher atheroprotektiver Effekt dar, der eine mögliche antiatherosklerotische „pleiotrope“ Wirkung über den eNOS-Signalweg vermuten lässt [58].

1.8 Die Kombinationstherapie

Kombinationstherapien werden vielfach eingesetzt, da man sich von verschiedenen therapeutischen Ansatzpunkten eine additive Wirkung erhofft. Außerdem besteht oft die Möglichkeit einer Dosis-Einsparung, wodurch meist auch die Nebenwirkungen reduziert werden können. Die Kombination von Ezetimib mit Statinen wurde klinisch schon mehrfach erfolgreich eingesetzt, alle Studien beschreiben eine deutliche Reduktion der Cholesterinspiegel – insbesondere des LDL-Cholesterins – unter der Kombinationstherapie verglichen mit einer Monotherapie [59-61].

Unter Therapie mit Ezetimib wird die hepatische Cholesterinsynthese kompensatorisch herauf reguliert. Dieser Kompensationseffekt wird durch Statine angegriffen, was die zusätzliche Cholesterinsenkung der Kombinationstherapie erklärt. Von einer pharmakologischen Interaktion ist nicht auszugehen [61, 62].

In einer klinischen Studie an Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie berichten Kastelein et al. ebenfalls von einer signifikanten Reduktion des LDL-Cholesterins sowie des CRPs (C-reaktives Protein, ein Entzündungsparameter) in der Patientengruppe die eine Kombinationstherapie erhielt, verglichen mit der Kontrollgruppe, welche nur mit Simvastatin behandelt wurde. Die Intima-Media Dicke (IMT = intima media thickness), die ein Marker für das kardiovaskuläre Risiko ist, zeigte zwischen den beiden Patientengruppen allerdings keinen signifikanten Unterschied. Die Studie ist dabei dadurch limitiert, dass Patienten mit primär normaler IMT in die Studie eingeschlossen wurden und nur eine relativ kurze Behandlungsdauer erfolgte. Möglicherweise ist auch der Benefit von niedrigen Cholesterinplasmaspiegeln limitiert, d.h. die Cholesteinsenkung unter Simvastatin alleine reicht bereits aus, um die maximal atheroprotektive Wirkung zu erzielen. Eine zusätzliche Cholesterinsenkung durch die Kombinationstherapie würde also keine weitere messbare Verbesserung erbringen. Allerdings könnten dagegen andere Parameter, die in dieser Studie nicht untersucht wurden oder auch gar nicht fassbar sind, positiv verändert sein [59]. Die bislang erwiesenen Vorteile einer Kombinationstherapie von Ezetimib mit Statinen gegenüber einer Monotherapie mit nur einer der beiden Substanzen liegen also in einer zusätzlichen Senkung des LDL-Cholesterins und einer Dosisreduktion der Statine bei erhaltenen pleiotropen Effekten, bei einem vergleichbaren Verträglichkeits- und Nebenwirkungsprofil [59, 60].

1.9 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In bislang nicht publizierten Arbeiten unseres Labors wurde bereits der Einfluss von Simvastatin, Ezetimib bzw. einer Kombination aus beiden Medikamenten auf die Plasmacholesterinspiegel und Atheroskleroseentwicklung im LDL-R-KO Modell untersucht. Ziel der Arbeit war es, anhand von Untersuchungen der NO-Bioverfügbarkeit und der eNOS-Expression, Aussagen über pleiotrope Effekte auf die Endothelfunktion durch die therapeutische Intervention zu treffen. Diese sollen Aufschluss über zusätzliche Mechanismen der atheroprotektiven Wirkung – neben der Reduktion des Plasmacholesterins – geben.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Avertin	Fluka®
PBS (Phosphate buffered saline)	Biochrom AG®
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma®
Flüssig-Stickstoff	Linde®

Reagenzien für Krebs Hepes Buffer (KHB)

Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma®
Natriumchlorid	Sigma®
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	Sigma®
Kaliumchlorid	Sigma®
Natriumbikarbonat	Sigma®
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma®
D(+)-Glucose	Sigma®
Hepes	Sigma®

Reagenzien für Electron Spin Resonance (ESR)

Eisen-II-Sulfat Heptahydrat (FeSO ₄)	Sigma®
Diethyldithiocarbamic Säure Natriumsalz-Trihydrat (DETC)	Alexis®
BCA Protein Assay Kit	Pierce®

Reagenzien für Western Blot

Für Sample-Buffer, Sammelgel, Trenngel, Running-Buffer (Elektrophorese-Puffer), Blotting-Buffer (Transfer-Puffer), TBST-Buffer (Block-Puffer):

Aqua destillata	
SDS	Sigma®
Tris-HCL	Merck®
Glycerol	Merck®
2-Mercaptoethanol	Sigma®
Bromphenol blau	Sigma®

Trisma Base (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck®
Glycin	Appli Chem®
Methanol	Sigma®
NatriumChlorid	Sigma®
Tween-20	Sigma®
5% Magermilchpulver	Biorad®
Acrylamid + Bis-Acrylamid	Biorad®
Temed	Sigma®
APS (Amoniumpersulfat)10%	Sigma®
ECL-Lösung	Amersham®
Precisio Plus Protein Standards	Biorad® Art-Nr.: 161-0374

Proteingewinnung

Lysispuffer aus:

- RIPA Puffer

PBS	Biochrom AG®
Na-Deoxycholat	Sigma®
SDS	Sigma®
Nonidet P40	Roche®
- und 10% Complete Proteaseinhibitor (Tabletten)	Roche®

Proteinkonzentrationsanalyse

BCA Protein Assay Kit	Pierce®
-----------------------	---------

Antikörper

Anti-eNOS (Maus), monoklonal	BD-Pharmingen® Art-Nr.: 610297
Cardiacactin-Antikörper (Maus), monokl.	Acris® Art-Nr.: BM 5079
Anti-Maus IG	Cell Signaling® Art-Nr.: 7076
Anti-Goat IG	Santa Kruz® Art-Nr.: 2020

Reagenzien für Real Time PCR

Platinum Quantitative PCR-Supermix	Invitogen® Art.-Nr.: 11730-017
Primer für Kontrolle und eNOS	Tib Molbiol®
Kontroll (HPRT)-Sequenz:	1) 5'-CCACAGGACTAGAACACCTGC 2) 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGT
eNOS-Sequenz:	1) 5'-CTGGCAGCCCCAAGACCTA 2) 5'-CGATGACGTCACCGGCTT
Sonde für Kontrolle und eNOS	Tib Molbiol®
Kontroll(HPRT)-Sequenz:	5'-6FAM-CTGGTATTTGCAGATTCAACTTGCGC XT-P
eNOS-Sequenz:	5'-6FAM-TCCTGAGGACAGAGCTAGCCGCGGA XT-P

Kits

Absolutely RNA Miniprep Kit	Stratagene® (Art.-Nr.: 400800)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas® (Art.-Nr.: K 1612)

Reagenzien für Immunhistochemie

Aceton	J.T.Baker®
Hydrogen Peroxid (H ₂ O ₂)	Sigma®
Blockinglösung	Dako®
ABC-Reagent	Vector Laboratories®
DAB-Reagent	Vector Laboratories®
Aquatex	Merck®

Antikörper

Anti-eNOS	Abcam® Art.-Nr.: ab15280
Anti Rabbit IG (biotinyliert)	Vector Laboratories® Art.-Nr.: BA1000

Hämalaun-Färbung nach Mayer

Hämatotoxylin	Roth®
Natriumjodat	Merck®
Aluminiumkaliumsulfat	Merck®
Chloralhydrat	Merck®
Zitronensäure	Merck®

2.2 Lösungen und Puffer

Phosphat Buffered Saline (PBS)

Arbeitslösung aus 9,55 g PBS in 1 Liter destilliertem Wasser.

Krebs Hepes Buffer (KHB = KH-Puffer)

Natriumchlorid 99 mM, Kaliumchlorid 4,69 mM, Calciumchlorid 2,5 mM, Magnesiumsulfat 1,2 mM, Natriumbikarbonat 25 mM, Kaliumdihydrogenphosphat 1,03 mM, D(+)Glucose 5,6 mM, Natrium Hepes 20 mM

Die oben gelisteten Reagenzien wurden in 500 ml Milli Q Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Vor jeweiligem Gebrauch erfolgte eine Überprüfung des pH-Wertes und der Puffer wurde durch einen 0,22 µm-Filter (Schleicher&Schuell) gefiltert.

RIPA-Puffer

1 M PBS 955 mg, Na-Desoxycholat 500 mg, SDS 100 mg, Nonidet P40 10 ml

PBS, Na-Desoxycholat, SDS in 70 ml HPLC-Wasser lösen und Nonidet P40 zugeben.

Probenpuffer

0,5 M Tris-HCL 2,5 ml (125 mM), 10% SDS 4 ml (4%), Glycerol 2 ml (20%), 2-Mercaptoethanol 1 ml (10%), Bromphenol blau 0,4 mg
pH=6,8.

Elektrophorese-Puffer (Running-Buffer)

Trizma Base 15,15 g (0,25 M), Glycin 72 g (1,92 M), SDS 20% 25 ml (1%)

Arbeits-Running-Buffer zehnfach verdünnen, pH=8,3.

Transfer-Puffer (Blotting-Buffer)

Trizma Base 15,15 g (0,25 M), Glycin 72 g (1,92 M)

Arbeits-Blotting-Buffer zubereiten aus 100 ml Blotting-Buffer, 200 ml Methanol und 700 ml destilliertem Wasser, pH=8,3.

Block-Puffer (TBST-Buffer)

Tris-HCL 12,1 g (10 mM), NaCl 87,7 g (0,15 M), Tween-20 5 ml (0,05%), 5% Magermilchpulver 5 g

Tris-HCL, NaCl und Tween-20 auf 1 Liter mit destilliertem Wasser auffüllen, ergibt 10xTBST-Lösung. Arbeits-Block-Puffer aus 5 g Magermilchpulver in 100 ml 1xTBST.

Western-Blot Sammelgel

Acrylamid + Bis-Acrylamid 2 ml, Puffer A 2,5 ml (0,5 M; pH=6,7 aus 6,05 g Trisma Base und 4 g 20%-SDS in 100 ml H₂O), SDS 10% 0,2 ml, Aqua dest. 15,1 ml, Temed 10 µl, APS 10% 0,8 ml

Western-Blot Trenngel

Acrylamid + Bis-Acrylamid 9,38 ml, Puffer B 5 ml (3 M; pH=8,9 aus 36,3 g Trisma Base und 0,8 g 20%-SDS in 200 ml H₂O), SDS 10% 0,4 ml, Aqua dest. 24,8 ml, Temed 20 µl, APS 10% 0,4 ml

Hämalaun-Färbelösung (nach Mayer)

Hämatotoxylin 6 g, Natriumjodat 1 g, Aluminiumkaliumsulfat 250 g, Chloralhydrat 250 g, Zitronensäure 5 g

Auflösung der Reagenzien in 5 Liter destilliertem Wasser.

Krebs-Henseleit Puffer (KHB)

Natriumchlorid 118 mmol/L, Kaliumchlorid 4,7 mmol/L, Magnesiumsulfat 1,2 mmol/L, Calciumchlorid 1,6 mmol/L, Kaliumdihydrogenphosphat 1,2 mmol/L, Natriumbikarbonat 25 mmol/L, Glucose 12 mmol/L

Lösung der Reagenzien in Milli Q Wasser bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37°C.

2.3 Verbrauchsmaterialien

12- und 96- well Platten	Falcon®
0,22 µm-Filter	Schleicher&Schuell®
Tissue Tek	Sakura Finetek®
PVFD Transfer-Membran	Whatman®
Röntgenfilm	Agfa®
Objektträger (Superfrost Plus)	Thermo Scientific®
Deckgläser	Marienfeld®

2.4 Technische Geräte

Stereosom Mikroskop	Leica®
Präparationsbesteck	Braun®
Kühlplatte	Noxygen®
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf®
Heizblock (Oriblock DB1)	Techne®
Vortexer	Heidolph®
Schüttler/Bewegungsplatte	Heidolph®
pH-Meter	InoLab®
e-scan ESR Spektroskop, Finger dewar	Bruker BioSpin GmbH®
Elisa Reader	Molecular Devices®
Tissue-Tearor (Ultrathorex-Mixer)	Dremel® (Model: 985370)
Elektrophorese-Kammer	Biorad®
Transfer-Kammer	Biorad®
Röntgenkassette	Dr. Goos® (Suprema)
Röntgenfilm-Entwicklermaschine	Protec®
Mikromörser	Carl Roth GmbH®, Art.-Nr: 0297.1
Thermocycler	Biorad®
Mikroskop (Axioskop 2 plus) mit Kamera (Spot insight)	Zeiss® Diagnostic instruments®

2.5 Software

Microsoft Word
 Microsoft Excel
 Sigma Plot
 Bruker e-scan
 Scan Pack
 Cyclor IQ
 Spot Basic

2.6 Mäuse

Die LDL-R-KO Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Die Mäuse sind „kongen“ in Bezug auf den C57BL6-genetischen-Hintergrund.

eNOS-KO Mäuse wurden von Professor P. Huang, Harvard Medical School, Boston, USA zur Verfügung gestellt und sind ebenfalls für mehr als zehn Generationen auf den C57BL6-genetischen-Hintergrund rückgekreuzt. Durch Kreuzung und Genotypisierung von LDL-R-KO Mäusen und eNOS-KO Mäusen wurden LDL-R-/eNOS-Double Knockout (dKO) Mäuse im eigenen Labor gezüchtet.

Nach 3 Wochen erfolgte die Entwöhnung von den Muttertieren und die Tiere wurden auf 4 Gruppen zum Zweck des Studiendesigns aufgeteilt: 1. Kontrollgruppe, 2. Tiere, die Simvastatin erhalten haben, 3. Tiere, die Ezetimib erhalten haben, 4. Tiere, die Ezetimib und Simvastatin erhalten haben. Alle Tiere wurden mit einer fettreichen, normocholesterinämien Diät („western diet“: 21% Milchfett, 0,15% Cholesterol, 19,5% Casein; Harlan Teklad No: 8137, Madison, WI, USA) gefüttert. Simvastatin (im Trinkwasser) und Ezetimib (im Futter) wurden in bereits erprobter Menge zugesetzt, um effektive Wirkspiegel zu erreichen. Die Fütterung der Western Diet mit/ohne Medikamente erfolgte für 18 Wochen, bevor die Tiere zur Analyse der entsprechenden Experimente herangezogen wurden. Die Untersuchungen wurden an männlichen Tieren durchgeführt.

2.7 Electron Spin Resonance (ESR) Spektroskopie

2.7.1 Prinzip der ESR Spektroskopie

Electron Spin Resonance (ESR, auch Elektron-Paramagnetische-Resonanz) Spektroskopie ist eine hochsensitive und spezifische Methode zum direkten quantitativen Nachweis freier Radikale. Die Messung vaskulärer Produktion freier Radikale ist äußerst schwierig, da die Radikale in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen und eine kurze Halbwertszeit (Sekunden) besitzen. Die Methode der ESR macht sich die magnetischen Eigenschaften ungepaarter Elektronen zunutze. Ihnen zueigen ist ein sogenannter „Spin“, der in zwei unterschiedlichen Formen – parallel oder antiparallel – vorliegen kann. In antiparallelem Zustand besitzen die Elektronen eine höhere Energie als in parallelem Zustand. Die Differenz zwischen den beiden energetisch verschiedenen Spins wird als Resonanz bezeichnet, die in dieser Methode spektroskopisch gemessen werden kann. Für die Detektion des Signals wird ein magnetisches Feld angelegt, in dem die Elektronen durch die Bestrahlung mit einer

bestimmten Frequenz von Mikrowellen aus dem Zustand niedriger Energie in den Zustand höherer Energie befördert werden. Durch die Absorption dieser Energie wird ein eindeutiges Spektrum erzeugt. Da freie Radikale ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen, können sie ein ESR-Signal erzeugen und so ESR-spektrometrisch detektiert werden. Jedoch liegen Radikale in biologischen Systemen in einer so niedrigen Konzentration vor und sind durch die kurze Halbwertszeit so kurzlebig, dass dieses Signal durch die ESR Spektroskopie direkt schwer zu erfassen ist. Deshalb müssen für die Messung exogene „Spintraps“ zugeführt werden, die durch Reaktion mit den Radikalen sekundäre Radikale mit einer höheren Stabilität formen, die dann durch die ESR-Spektroskopie messbar sind. In unseren Versuchen wurde zum Nachweis von freiem NO eine kolloidale Lösung aus FeSO₄ und DETC als Spintrap verwendet.

2.7.2 Durchführung der ESR Spektroskopie zum Nachweis freien NOs

Nach Heparinisierung (100 U) wurden die Mäuse durch CO₂-Inhalation euthanasiert und anschließend präpariert. Zunächst wurde die Aorta möglichst zügig herausgenommen und auf einer Kühlplatte bei 4°C in KHB (Krebs-Henseleit Puffer) von perivaskulärem Gewebe befreit. Die Aorta wurden in 2 mm dicke Ringe geschnitten, welche in ein Well einer 12-well-Platte mit 1,5 ml KHB gebracht wurden. Für die Herstellung des Fe-(DETC)₂ Spintrap wurden zunächst separat 4,5 mg FeSO₄ (1,6 mM) und 7,2 mg DETC (3,2 mM) in je 10 ml 0,9% gefiltertem NaCl gelöst und die Lösungen für 30 Minuten durch eingeführtes N₂-Gas desoxygeniert. Direkt vor Gebrauch wurden je 500 µl der FeSO₄ und DETC Lösung in einem vorher mit N₂-Gas gefüllten Eppendorf-Cup miteinander vermischt. 500 µl dieses 0,8 mM Fe-(DETC)₂ Spintrap-Kolloid wurde dem Well mit den Aortenringen zugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Gefäßringe mit einer Plastikpinzette auf eine gefrorene 300 µl hohe Säule KHB Puffer am aufgeschnittenen Ende einer 1ml-Spritze aufgebracht und ebenfalls schockgefroren. Die Signalmessung der Probe im mit Flüssig-Stickstoff gefülltem „finger dewar“ (Vakuumbehälter) erfolgte im e-scan ESR Spektroskop mit folgenden Einstellungen: Magnetfeld (Centre field): 3308 G, Durchlauf Querschnitt (sweep width): 80 G, Mikrowellenfrequenz: 9,495 GHz, Mikrowellenstärke: 50 mW, Modulationsamplitude: 4,6 G, Modulationsfrequenz: 86 kHz, Messzeit: 81,92 ms, Konversionszeit: 20,48 ms, Anzahl der Scans: 100. Der Spektrometerkammer wurde konstant Pressluft zugeführt um eine Kondensation zu vermeiden. Die Methode wurde von einem

bereits publizierten Protokoll übernommen [63]. Die Probe wurde anschließend bei -80°C aufbewahrt bis zur Messung der Proteinkonzentration.

2.7.3 Auswertung der ESR Spektroskopie

Gemessen wurde die Gesamtproteinkonzentration der Gefäßringe. Die Gefäßringe wurden mit 1N NaOH bei 50°C für 2-3 Stunden inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit bei 562 nm bestimmt. Die Intensität des ESR-Signals wurde in Relation zum Proteingehalt der Probe gesetzt. Daraus ergibt sich die Einheit AU/ μg für die gemessene NO Produktion.

2.8 Nitrosyl-Hämoglobin Messung mittels ESR Spektroskopie

Die Nitrosyl-Hämoglobin (NO-Hb) Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie [64]. Hierbei wird NO-Hb, als Reaktionsprodukt aus desoxygeniertem Hämoglobin und zirkulierendem NO, gemessen, welches als Parameter für die totale NO-Bioverfügbarkeit gilt. Die Messung erfolgte aus Vollblutproben der Versuchstiere.

2.9 Western Blot

2.9.1 Prinzip des Western Blots

Der Western Blot ist eine standardisierte Methode für den Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen. Die Proteine werden zunächst durch Gel-Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran aufgebracht. Auf dieser erfolgt dann der Nachweis, z.B. durch Immundetektion.

Western Blots wurden von Herzmuskelgewebe durchgeführt, um die eNOS-Expression zu untersuchen.

2.9.2 Proteinextraktion

Herzmuskelgewebe wurde zunächst mit einem Ultrathorex-Mixer homogenisiert. Dem Homogenisat wurde 200 μl eisgekühlter Lysepuffer (RIPA Puffer und Protease Inhibitor Cocktail) zugegeben. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (rounds per minute) und 4°C , wurde der wässrige Überstand vom Pellet getrennt und für die spätere Proteinkonzentrationsanalyse aliquotiert.

2.9.3 Proteinkonzentrationsanalyse

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit. Zum Erstellen der Standardkurve dienten BCA Proben in aufsteigender Konzentration (0,1 / 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 / 1,0µg/µl). Die Messung erfolgte per Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm. Nach Ermittlung der Werte wurden die Proben mit Lysispuffer auf eine einheitliche Konzentration von 1µg/µl verdünnt und bei -20°C eingefroren (Dieser Schritt ist notwendig für die spätere einfache Entnahme einer definierten Menge der Proben für den Western Blot).

2.9.4 Durchführung des Western Blots

20 µg Protein, also 20 µl der Proben (1µg/µl), wurden 20 µl Probenpuffer zugesetzt und zwecks Denaturierung der Proteine bei 100°C für 10 Minuten gekocht. Danach wurde die Probe für 1 Minute bei 14000 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Das Sammelgel wurde mit je 20 µl Probe pro Tasche befüllt, sowie mit einem Proteinstandardmarker versehen (Markerproteine von 10 bis 250 kD). Die elektrophoretische Auftrennung im Trenngel wurde in der mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 150-200 Volt für 60 Minuten durchgeführt. Für den Proteintransfer auf die Membran wurde die Transferkammer mit Transferpuffer gefüllt und bei 400 mA für 60 Minuten angeschlossen. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde in Blockpuffer (5% Magermilch in TBST) inkubiert. Die Membranen wurden dann in der Mitte durchgeschnitten um das Kontrollprotein Cardiacactin (40 kD) von eNOS-Protein (140 kD) zu trennen und die Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-Cardiacactin Verdünnung 1:500, Anti-eNOS Verdünnung 1:1000) über Nacht bei 4°C durchzuführen. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Goat-IG Verdünnung 1:4000, Anti-Maus IG Verdünnung 1:1000) für eine Stunde. Danach wurden die Membranen sechsmal 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen und anschließend für 5 Minuten in ECL-Lösung inkubiert. Die Membranen wurden in eine Röntgenkassette eingelegt, die Röntgenfilme belichtet und entwickelt. Die relative Quantifizierung in Bezug zum Kontrollprotein und die densitometrische Analyse erfolgte mittels Scan Pack-Software.

2.10 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

2.10.1 Prinzip der RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifizierung bekannter DNA-Sequenzen. Zunächst wird die zu untersuchende DNA durch Erhitzen denaturiert und für die nachzuweisende Sequenz spezifische Primer sowie Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt und die Primer können an komplementäre DNA-Moleküle hybridisieren. Durch Zusatz von DNA-Polymerase kann nun die Elongation des Stranges durch die Anlage der dNTPs erfolgen und es entsteht eine neue doppelsträngige DNA. Dieser Zyklus kann nun vielfach wiederholt werden, um eine exponentielle Zunahme des gewünschten DNA-Produkts zu erreichen. Nach n Zyklen erhält man also 2^n Doppelstrang DNA-Moleküle.

Die Real-Time PCR ermöglicht nicht nur den Nachweis einer DNA-Sequenz, sondern auch die quantitative Bestimmung der Genexpression. Die Genexpression äußert sich in der Menge an synthetisierten RNA-Produkten. Zum Nachweis können diese in cyclische DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche dann durch PCR vervielfacht wird. Die Menge an synthetisierter cDNA wird fluoreszenz-photometrisch detektiert und die für eine definierte Menge benötigten Zyklen angegeben. Anhand dieser Anzahl der benötigten Zyklen lässt sich die anfangs vorhandene Menge an cDNA (nach Umschreibung) ermitteln und damit Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene RNA als Korrelation zur Genexpression gezogen werden. Das heißt, je weniger Zyklen zum Erreichen der definierten cDNA-Produktmenge nötig sind, desto mehr cDNA und letztlich RNA lag vor und desto stärker ist die Genexpression. Die RT-PCR wurde zur Analyse der Genexpression der eNOS in Karotidengewebe der Versuchstiere durchgeführt.

2.10.2 Durchführung der RT-PCR

Zunächst wurde aus dem Gewebe RNA isoliert (Absolutely RNA Miniprep Kit) und cDNA transkribiert (First Strand cDNA Synthesis Kit). Für den Ansatz wurden eine Kontrolle und je 5 μ l Probe (Verdünnung 1:5) in die Wells einer 96-„well“ Platte pipettiert und mit je 20 μ l „Mastermix“ (aus 6,75 μ l H₂O, 12,5 μ l Supermix und je 0,25 μ l der Primer 1 und 2 und der Sonde) vermischt. Die Reaktion erfolgt im Thermocycler: Es erfolgt die Aktivierung der Taq-Polymerase bei 50°C für 2 Minuten, gefolgt von einer einmaligen Denaturierung der Probe bei 94°C, für 1 Minute.

Danach wurden 45 Zyklen, bestehend aus den Phasen Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten, Bindung der PCR-Primer an die cDNA (Annealing) bei 65°C für 40 Sekunden und Elongation bei 72°C für 40 Sekunden durchgeführt. Das Gemisch wird dann für 2 Minuten bei 72°C gehalten und anschließend auf 15°C abgekühlt. Es resultiert ein Diagramm aus Zyklusanzahl zu jeweiliger cDNA-Menge (Abb. 1) und die anschließende Ermittlung der Genexpression.

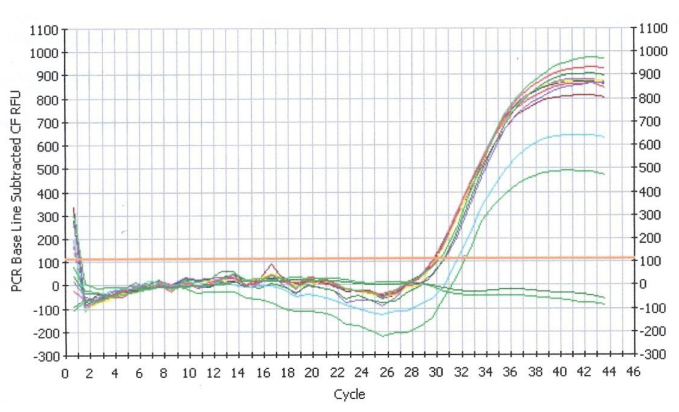


Abb. 1: Diagramm einer RT-PCR, fluoreszenz-spektrometrische cDNA-Menge und entsprechende Zykluszahl

2.11 Immunhistochemie

Immunhistochemie wurde an Gewebe von Aortenwurzeln und Aortenbögen durchgeführt um eNOS-Protein nachzuweisen. Die Gewebeproben wurden in Tissue Tek eingebettet und in Flüssig-Stickstoff schockgefroren. Serienschnitte von 5 µm wurden bei -20°C angefertigt, auf Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Aceton fixiert. Vor der Färbung wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen, danach 30 Minuten mit 0,3% Hydrogenperoxid in Methanol inkubiert und wieder mit PBS gewaschen. Nach 30minütiger Inkubation mit Blockinglösung wurde der erste Antikörper (Anti-eNOS) zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper abgewaschen, bevor die Schnitte mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit IG Verdünnung 1:200) bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert wurden. Danach wurden die Schnitte wiederum dreimal mit PBS gewaschen und mit ABC Reagent für 30 Minuten gefärbt. Nach Waschung mit PBS folgte die Inkubation mit DAB Reagent für 5-20 Minuten. Zuletzt wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser abgewaschen, für 1 Minute mit Mayer's

Hämalaun angefärbt, 3 mal 2 Minuten mit Leitungswasser gebläut und in Aquatex eingebettet. eNOS Protein erscheint in Immunhistochemie braun angefärbt. Die Schnitte wurden digital fotografiert (Spot Basic) und visuell ausgewertet.

2.12 Gefäßreaktivität

Untersuchungen zur endothelabhängigen Vasodilatation waren nicht Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Die Messmethode soll hier nur kurz beschrieben werden, da die Ergebnisse in die Diskussion einfließen. Die Messergebnisse reflektieren die Intaktheit der Endothelfunktion, die als Maß für die NO-Bioverfügbarkeit in der Gefäßwand gilt. Dabei wird zunächst die Aorta möglichst zügig herausgenommen, auf einer Kühlplatte von perivaskulärem Gewebe befreit und in 3 mm dicke Ringe geschnitten. Diese werden zur Messung isometrischer Kräfte in ein Organbad (FMI, Seeheim, Germany) gebracht. Nach 30-minütiger Äquilibration bei konstant bleibender Wandspannung des Aortenrings von 1,25 g (in oxygeniertem Krebs-Henseleit Puffer (95% O₂, 5% CO₂) versetzt mit Diclofenac (1 µmol/L)) werden die Gefäßringe wiederholt mit KCl (maximal 100 mmol/L) kontrahiert, bis reproduzierbare Kontraktionsergebnisse beobachtet werden. Es erfolgt die Stimulation mit Phenylephrin (1 µmol/L), einem Sympathomimetikum, zur maximalen Präkonstriktion, anschließend wird die vaskuläre Relaxation auf kumulative Dosen von Acetylcholin ermittelt [58].

2.13 Statistische Analysen

Die Daten sind in Mittelwerten ± Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde per Student's t-Test ermittelt, ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde ab einem P-value < 0.05 angenommen.

3 Ergebnisse

Die Rohdaten aller Messungen zu den Versuchen befinden sich im Anhang.

3.1 Nachweis vaskulärer NO-Produktion mittels ESR Spektroskopie

Die direkte vaskuläre NO-Produktion wurde mittels ESR-Spektroskopie an Aortengewebe ermittelt.

Dabei zeigen sich signifikant erhöhte NO-Konzentrationen der WD-Kontrollgruppe sowie der Simvastatin-Monotherapiegruppe gegenüber der Ezetimib-Monotherapiegruppe (Abb. 2).

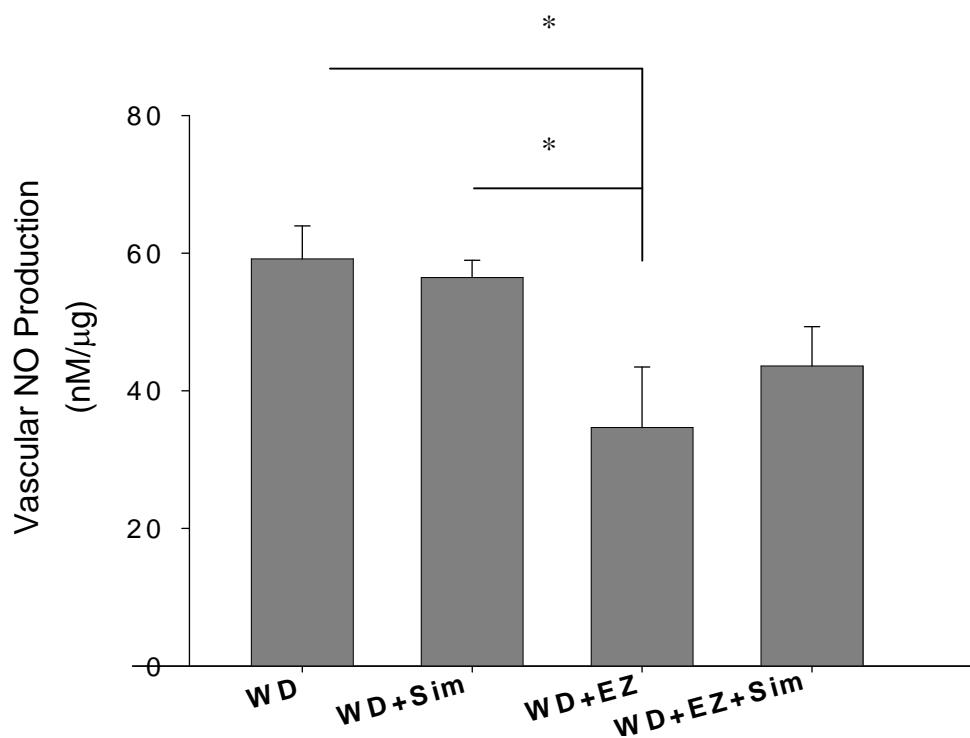


Abb. 2: Messung der vaskulären NO-Produktion mittels ESR, $n=25$. * Signifikanz ($p<0,05$); signifikant erhöhte NO-Produktion der WD-Gruppe sowie der WD+Sim-Gruppe gegenüber der WD+EZ-Gruppe. WD vs WD+EZ $p=0,027$; WD+Sim vs WD+EZ $p=0,027$.

3.2 Ermittlung der NO-Bioverfügbarkeit durch Nitrosyl-Hämoglobin mittels ESR Spektroskopie

Die Menge von Nitrosyl-Hämoglobin (NO-Hb) im Vollblut, als Parameter für die NO-Bioverfügbarkeit, wurde ESR-spektroskopisch gemessen.

In der Analyse zeigen die mit Simvastatin behandelten Tiere, sowohl in der Gruppe der Mono- als auch der Kombinationstherapie, eine signifikant erhöhte Menge von NO-Hb. Dabei sind die NO-Hb-Werte der Simvastatin-Monotherapiegruppe nochmals signifikant gegenüber der Ezetimib-Simvastatin-Kombinationstherapiegruppe erhöht (Abb. 3).

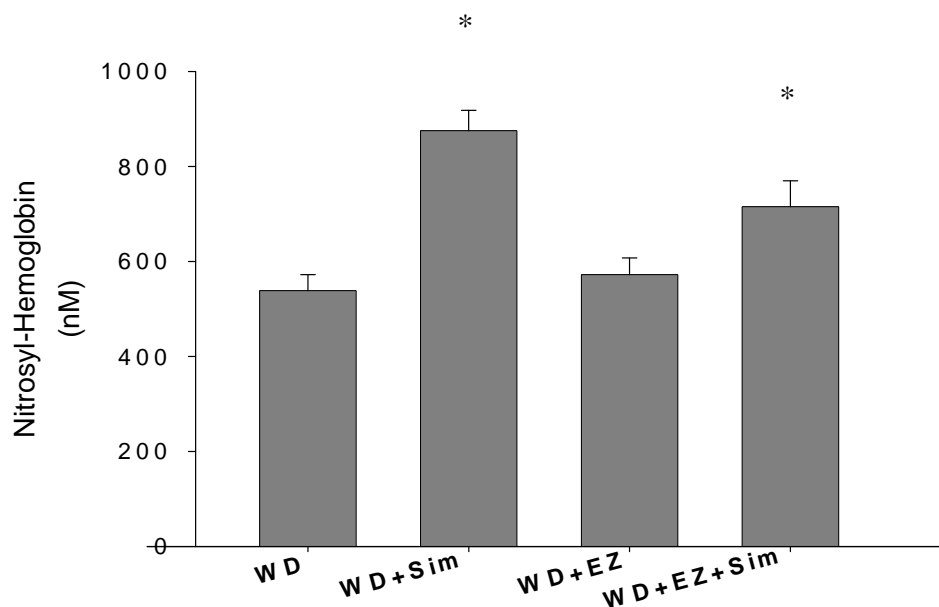


Abb. 3: Messung des NO-Hb im Vollblut mittels ESR, $n=34$. * Signifikanz ($p<0,05$); signifikant erhöhtes NO-Hb in der WD+Sim-Gruppe sowie der WD+EZ+Sim-Gruppe. WD+Sim vs WD $p<0,001$; WD+Sim vs WD+EZ $p<0,001$; WD+Sim vs WD+EZ+Sim $p=0,045$; WD+EZ+Sim vs WD $p=0,014$; WD+EZ+Sim vs WD+EZ $p=0,043$.

3.3 Expression der endothelialen NO-Synthase

Die eNOS-Expression wurde mittels Western Blot und RT-PCR untersucht.

3.3.1 eNOS im Western Blot

Western Blots wurden von Herzmuskelgewebe durchgeführt.

In Herzmuskelgewebe können zwischen allen Versuchsgruppen keine differierenden Werte der eNOS Expression ermittelt werden. Dies zeigt bereits die Bandendarstellung des eNOS-Proteins auf dem Röntgenfilm (Abb. 4) und wird von der densitometrischen Auswertung bestätigt (Abb. 5).



Abb. 4: Western Blot Röntgenfilme mit eNOS Protein in Herzmuskelgewebe. Keine sichtbaren Unterschiede der eNOS-Expression.

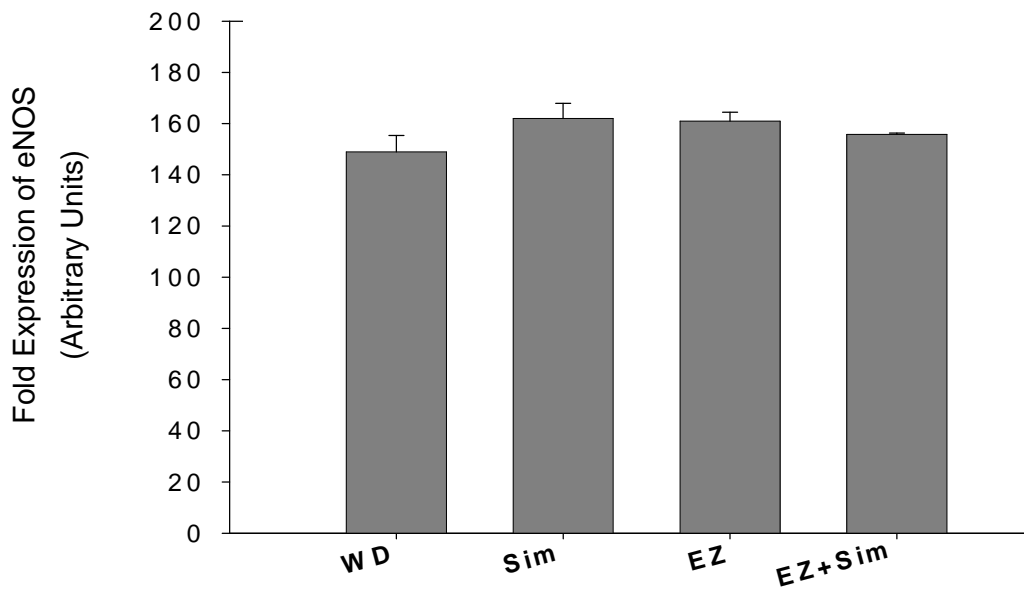


Abb. 5: Densitometrische Analyse des Western-Blot eNOS-Expression in Herzmuskelgewebe, $n=30$. Keine signifikanten Unterschiede der eNOS-Expression ($p>0,05$).

3.3.2 eNOS in RT-PCR

RT-PCR wurde von Karotidengewebe durchgeführt.

In der Messung zeigen sich keine Unterschiede der eNOS Expression zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 6).

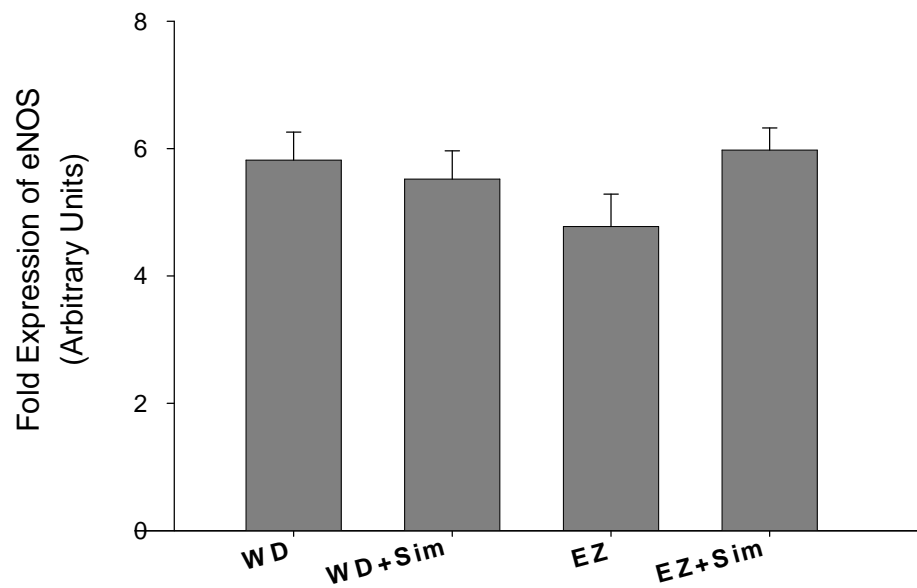


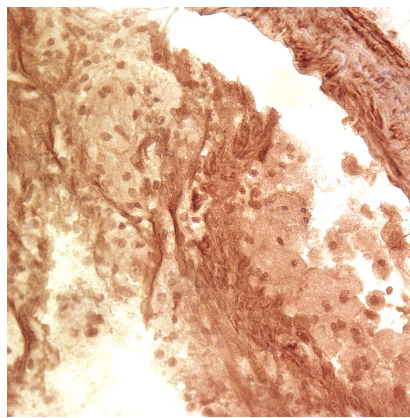
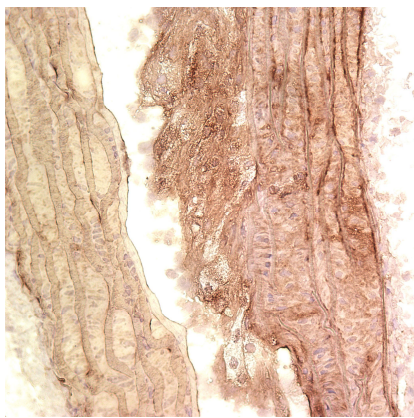
Abb. 6: RT- PCR eNOS-Expression in Carotidengewebe, $n=35$. Keine signifikanten Unterschiede der eNOS-Expression ($p>0,05$).

3.3.3 eNOS in Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen zum eNOS-Nachweis wurden an Gewebe von Aortenbögen und Aortenwurzeln angefertigt. Ein eNOS Nachweis erscheint als braune Anfärbung in der endothelialen Schicht. Die Auswertung erfolgte rein visuell.

Im Vergleich sind zwischen den Gruppen keine Unterschiede der Anfärbung erkennbar (Abb. 7 und 8).

Diesem Versuchsansatz wurde nicht weiter nachgegangen und keine planimetrische Auswertung vorgenommen.



↑ WD

↑ WD+Sim

↓ WD+EZ

↓ WD+EZ+Sim

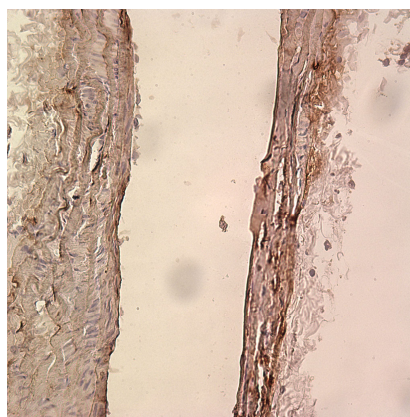
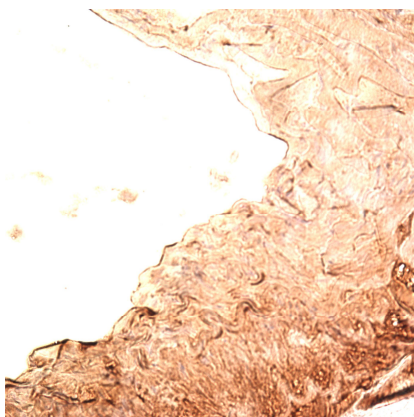
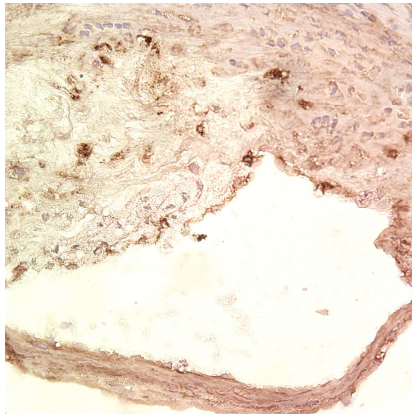
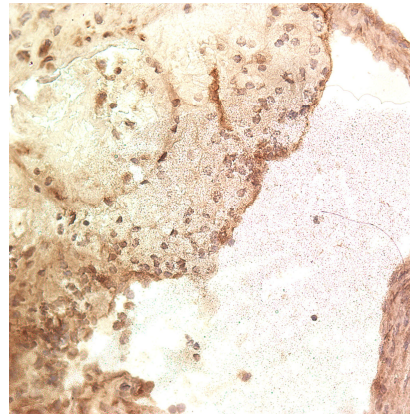


Abb. 7: Immunhistochemische Anfärbung von eNOS in Aortenbogengewebe, (40-fache Vergrößerung)



↑ WD

↓ WD+EZ



↑ WD+Sim

↓ WD+EZ+Sim

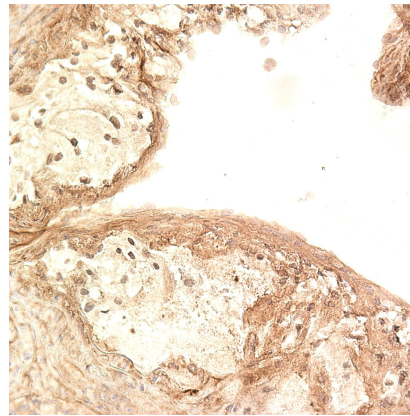
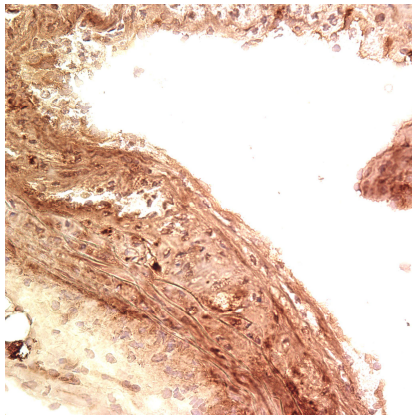


Abb. 8: Immunhistochemische Anfärbung von eNOS in Aortenwurzelgewebe, (40-fache Vergrößerung)

3.4 Gefäßreaktivität

Die Experimente zur endothelabhängigen Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur der Aorta waren nicht Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit, sollen aber im Kontext der eNOS-Expressionsanalysen funktionell diskutiert werden. Bislang unpublizierte Daten unseres Labors zeigten in den LDL-R-KO Mäusen eine adäquate Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation in allen Versuchsgruppen. Wir gehen also davon aus, dass zum Zeitpunkt unserer Analysen in der LDL-R-KO Versuchsreihe noch keine Endotheldysfunktion vorliegt. Im Gegensatz dazu ist in den Versuchsgruppen der LDL-R/eNOS-dKO Tiere eine fehlende Endothelfunktion anzunehmen, nachdem wir in unserem Labor sowie auch andere

Arbeitsgruppen einen Verlust der Fähigkeit zur NO-vermittelten Vasodilatation im ApoE/eNOS-dKO- bzw. eNOS-KO-Modell nachweisen konnten [37,58].

4 Diskussion

Für die Experimente wurden LDL-R-Knockout (KO) Mäuse gewählt, da sie ein physiologisches Modell der Atheroskleroseforschung darstellen [4]. Mit dem Versuchsaufbau der vier verschiedenen Gruppen (einer WD (western diet)-Kontrollgruppe, einer WD-Simvastatin-Monotherapie- sowie einer WD-Ezetimib-Monotherapiegruppe und einer WD-Ezetimib-Simvastatin-Kombinationstherapiegruppe) sollten die Effekte der Medikamente einzeln und in Kombination untersucht werden um weitere Erkenntnisse über additive und pleiotrope Wirkweisen zu erlangen.

In bislang nicht publizierten Untersuchungen unseres Labors konnte bereits eine additive Wirkung der beiden Substanzen bei der Reduktion des Plasmacholesterins sowie der Atherosklerose nachgewiesen werden. Dabei war das Plasmacholesterin gegenüber der WD-Kontrollgruppe signifikant reduziert: um 20,2% in der Simvastatin-Monotherapiegruppe ($p < 0,049$), um 61,1% in der Ezetimib-Monotherapiegruppe ($p < 0,00001$) und um 80,3% in der Ezetimib-Simvastatin-Kombinationstherapiegruppe ($p < 0,00001$). Nachweisbar war auch eine Reduktion der planimetrisch gemessenen atherosklerotischen Plaques gegenüber der WD-Kontrollgruppe ($17,1 \pm 3,6$ % lesion area, $n=12$): um 14,0% in der Simvastatin-Monotherapiegruppe ($14,7 \pm 3,1$ % lesion area, $n=13$, $p < 0,094$), um 71,9% in der Ezetimib-Monotherapiegruppe ($4,8 \pm 1,0$ % lesion area, $n=13$, $p < 0,00001$) und um 83,0% in der Ezetimib-Simvastatin-Kombinationstherapiegruppe ($2,9 \pm 0,7$ % lesion area, $n=13$, $p < 0,00001$). (Bisher nicht publizierte Daten, jeweils gepoolte Analysen).

Die geringgradigere Senkung des Plasmacholesterins durch Simvastatin im Vergleich zu Ezetimib lässt sich unter anderem auch durch unser gewähltes Modell erklären. Simvastatin hemmt nicht nur die HMG-CoA-Reduktase und somit die Cholesterinsynthese, sondern es erhöht auch die Expression der LDL-Rezeptoren in der Leber, was zu einer erhöhten Cholesterinaufnahme führt. Dies ist im LDL-R-KO Modell nicht möglich, wodurch es zu einer möglichen Wirkungsminderung von Simvastatin kommen kann (siehe auch S.7).

Darüber hinaus kann es sogar zu einer paradoxen Wirkweise von Statinen im LDL-R-KO Modell – keine signifikante Reduktion des Gesamtcholesterins bei erhaltener pleiotroper Wirkung – kommen [49, 51]. Des Weiteren ist die additive Cholesterinsenkung unter einer Kombinationstherapie von Ezetimib und Statinen mehrfach erwiesen [59-61].

Die effektive Senkung des Plasmacholesterins sowie die Reduktion atherosklerotischer Läsionen unter Kombinationstherapie von Ezetimib und Simvastatin im LDL-R-KO Modell

legen pleiotrope Wirkmechanismen nahe. Um diesen weiter nachzugehen wurden Messungen der NO-Produktion und der eNOS-Expression durchgeführt.

NO und eNOS, als eine Quelle des NO, sind wesentlich an der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts bzw. der Endothelfunktion beteiligt [40]. Beachtet man jedoch ihre ganzheitliche Funktion, unter physiologischen wie unter pathologischen Konditionen, sind sowohl NO als auch eNOS auch an den pathologischen Prozessen der endothelialen Dysfunktion sowie der konsekutiven Atheroskleroseentstehung beteiligt. Kommt eNOS im physiologischen Sinne eine gefäßprotective Bedeutung zu, indem es NO produziert und so zur endothelialen Integrität beiträgt, kann das Enzym unter pathologischen Bedingungen „entkoppelt“ vorliegen und reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxid (O_2^-), produzieren [41]. Darüber hinaus wird eNOS in atherosklerotischen Läsionen vermindert exprimiert und kann hier seine atheroprotective Rolle nicht mehr ausüben [44]. Ähnliches gilt für NO, das klassischerweise als EDRF fungiert, im pathologischen Milieu jedoch Produkt der atherogen wirkenden iNOS sein kann. Durch Reaktion mit anderen Molekülen und durch seine oxidativen Eigenschaften kann NO selbst zum schädigenden Radikal werden [32-34, 44, 48]. Angesichts dieser mehrdimensionalen Funktionen von NO und eNOS im atherosklerotischen Geschehen und da eNOS/NO als ein entscheidendes Korrelat pleiotroper Effekte von Statinen identifiziert werden konnten [49, 52], können durch die Betrachtung dieser Parameter im LDL-R-KO Modell weitere Schlüsse über ihre Präsenz und Funktion und den Zusammenhang mit einer medikamentösen Intervention gezogen werden.

4.1 Effekt der therapeutischen Intervention auf die vaskuläre NO-Produktion

Die Messung des vaskulären NOs mittels ESR-Spektroskopie an Aortengewebe zeigt signifikant erhöhte NO-Konzentrationen der WD-Kontrollgruppe sowie der Simvastatin-Monotherapiegruppe gegenüber der Ezetimib-Monotherapiegruppe. Diese beiden Gruppen, die WD-Kontrollgruppe und Simvastatin-Monotherapiegruppe, sind auch diejenigen mit den größten atherosklerotischen Plaquearealen und den höchsten Plasmacholesterinspiegeln. Da NO als EDRF und in diversen anderen Funktionen, wie Kontrolle der Gefäßmuskelzellproliferation, Reduktion der Thrombozytenaktivierung und –aggregation und Verhinderung der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion, eigentlich eine atheroprotective Bedeutung zukommt, stellt sich die Frage, warum gerade bei den Tieren mit der höchsten atherosklerotischen Plaquefläche hohe vaskuläre NO-Mengen vorliegen. Da die Messungen

direkt im Gefäß, also auch in unmittelbarer Nähe zu den atherosklerotischen Läsionen erfolgten, lässt sich vermuten, dass atherosklerotische Läsionen die erhöhten NO-Mengen produzieren. Schon 1990 machten Minor et al. die Entdeckung, dass in atherosklerotisch veränderten Gefäßen NO entgegen ihrer Erwartungen erhöht ist [65]. Verschiedene Autoren berichten von einer erhöhten Aktivität der iNOS in entzündlich bzw. atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen [44, 48]. Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass atherosklerotische Läsionen erhöhte NO-Konzentrationen aufweisen, die durch eine erhöhte katalytische Aktivität der iNOS in den Läsionen erklärt werden konnten [47]. Die Funktion des NO wird als paradox bzw. bedingungsabhängig diskutiert, es hat sowohl antioxidative als auch oxidierende Eigenschaften [32-34]. Das heißt die Funktion des NO ist nicht unbedingt durch seine Quelle determiniert, sondern sein Funktionszustand bzw. die Ausprägung seiner anti-/oxidativen Eigenschaften wird durch die äußeren Bedingungen des vaskulären Milieus mitbeeinflusst. So ist die atheroprotektive Funktion des von eNOS produzierten NOs – Gefäßrelaxation, Unterstützung der Endothelfunktion, Radikalfänger – durch die Bedingungen im atherosklerotischen Milieu fraglich: in atherosklerotisch veränderten Gefäßen ist die Fähigkeit zur Relaxation erwiesenermaßen reduziert, NO kann also weniger wirken [31]. Man geht davon aus, dass das NO in atherosklerotisch veränderten Gefäßen nicht mehr seine atheroprotektive Wirkung ausübt, sondern das erhöhte NO pathologisches Korrelat der Atherosklerose ist und den atherogenen Prozess in oxidierender Funktion, als ein Mediator des iNOS-vermittelten oxidativen Stresses, unterhält. Aus diesen Überlegungen lässt sich die Erniedrigung des NO in der Ezetimib-Monotherapiegruppe durch eine reduzierte Atherosklerose-Plauefläche und damit geringere iNOS-Aktivität erklären. Demgegenüber steht aber keine signifikante NO-Erniedrigung in der Ezetimib-Simvastatin-Kombinationstherapiegruppe trotz der nochmals wesentlich reduzierten Plauefläche. Allerdings lassen sich in dem gewählten Versuchsaufbau Funktionszustand und Quelle des gemessenen NOs nicht nachweisen. Möglicherweise ist ein Teil des gemessenen NO auch Produkt der kompensatorischen atheroprotektiven Mechanismen, also der eNOS und/oder nNOS. Dieser ist in stark atherosklerotisch veränderten Gefäßen wahrscheinlich relativ klein, da hier kaum gesundes Endothel mit intakter eNOS vorhanden ist. In gesunden Gefäßarealen dagegen könnte der Anteil des von eNOS produzierten NO dementsprechend erhöht sein. Wahrscheinlich ist also, dass zu der Gesamtmenge von NO verschiedene Quellen, insbesondere iNOS und eNOS beitragen. Die Höhe ihres Beitrags wird durch ihre Expression und Funktion, also endotheliale Integrität bzw. atherosklerotische Plauefläche, bestimmt. Betrachtet man zudem die Messungen der Gefäßreaktivität, welche eine zum Zeitpunkt der

Analyse in allen Gruppen gleichwertig intakte Funktion des Endothels zeigen, legt dies die Vermutung nahe, dass weniger eine variierende eNOS-Expression, sondern wahrscheinlicher eine Veränderung von Expression und Aktivität der iNOS in atherosklerotischen Plaueflächen wesentlich für die hohen vaskulären NO-Spiegel in der WD-Kontrollgruppe und Simvastatin-Monotherapiegruppe verantwortlich ist.

4.2 Effekt der therapeutischen Intervention auf die NO-Bioverfügbarkeit

Neben der Messung der NO-Produktion der aortalen Gefäßwand wurde durch die Messung von an Hämoglobin gebundenes, im Blut zirkulierendes NO (Nitroso-Hämoglobin, NO-Hb) die NO-Bioverfügbarkeit in den Versuchsgruppen untersucht. Dabei zeigt sich ein signifikanter Anstieg des NO-Hb in den mit Simvastatin behandelten Gruppen sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie. Die Tatsache, dass die mit Ezetimib allein behandelte Gruppe keinen Anstieg des NO-Hb zeigt, spricht für einen allein durch Simvastatin vermittelten Mechanismus. Dies deckt sich mit dem schon mehrfach beschriebenen Phänomen der überwiegend eNOS-vermittelten Pleiotropie von Statinen, deren Korrelat unter anderem ein erhöhtes NO ist [49, 52]. Dabei ist dann von einer atheroprotektiven Wirkung des NO auszugehen, wie auch die signifikante Reduktion der atherosklerotischen Plaueflächen belegt. Im Gegensatz zur vaskulären NO-Messung spiegelt die Messung von an Hämoglobin gebundenem NO die ubiquitäre NO-Gesamtproduktion wider [64]. Da Statine systemisch wirken, können sie ubiquitär pleiotrope Effekte haben, d.h. die Expression und Aktivität der NO-Synthasen sind nicht nur im Gefäßendothel, sondern auch in verschiedenen anderen Zielgeweben verändert, die allesamt zur NO-Produktion beitragen [40, 49]. So kommt es zu einer Erhöhung der NO-Gesamtverfügbarkeit, die einen wesentlichen Anteil des Statin-vermittelten atheroprotektiven Benefits verursacht. Diese erhöhte NO-Menge ist jedoch von den erhöhten vaskulären NO-Werten am Ort der atherosklerotischen Läsionen zu unterscheiden, da hier die Zusammensetzung der potentiellen NO-Quellen nicht vergleichbar ist.

Dabei muss auch hier beachtet werden, dass die Messung des NO-Hb nur seine Gesamtmenge angibt, nicht aber deren Ursprung reflektiert. Zu den Ergebnissen korrelierende Unterschiede der eNOS-Expression bzw. der endothelialen Integrität konnten wir nicht nachweisen, daher wären weitere NO-Hb Messungen unter verschiedenen „NOS-Bedingungen“, beispielsweise durch Genknockout oder pharmakologische Inhibition, sinnvoll.

Aus unseren Untersuchungen wird klar, dass die alleinige Betrachtung der NO-Bioverfügbarkeit die Verhältnisse des NO-Gleichgewichts nicht ausreichend erfasst. In diesem Sinne ist die Pleiotropie der Statine nicht allein an einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit festzumachen [49, 52].

4.3 Effekt der therapeutischen Intervention auf die Expression der eNOS

Die Messungen der eNOS-Expression in Herzmuskel- und Karotidengewebe zeigen keine Veränderung zwischen den vier Versuchsgruppen. Zum Zeitpunkt unserer Analysen (nach 18 Wochen) zeigen die Messungen der Gefäßreaktivität eine gleichwertig intakte Endothelfunktion in allen Gruppen. Unter diesen Umständen sind also noch keine Veränderungen der eNOS-Expression als Korrelat der endothelialen Funktion zu erwarten. Die trotz dieser Tatsache signifikanten Unterschiede bei den NO Messungen lassen sich – wie schon oben diskutiert – dadurch erklären, dass die NO-Konzentration von der Genexpression und der katalytischen Aktivität der NOS-Enzyme sowie auch von dem Grad der „Entkopplung“ und somit der Superoxidproduktion, anstelle von NO, abhängt. In den hier untersuchten vaskulären Proben ist im Bereich der Plaques mit der Expression mehrerer NOS-Isoformen zu rechnen, insofern sind auch iNOS und nNOS an der NO-Bioverfügbarkeit in den Versuchsgruppen beteiligt [44].

Allerdings deuten die signifikant erhöhten NO-Hb Werte in den mit Simvastatin behandelten Versuchsgruppen, die auf die Pleiotropie der Statine zurückgeführt werden können, auf eine Steigerung der katalytischen Aktivität der eNOS in diesen Versuchsgruppen hin. Dabei ist auch zu beachten, dass sich die hier durchgeführten Untersuchungen auf bestimmte Gewebe (koronare Gefäße im Herzmuskelgewebe, Karotidengewebe) beschränken. Eine Steigerung der eNOS-Expression in anderen, mikrovaskulären Kompartimenten (z.B.

Lungenendothelien) können wir auf der Basis unserer aktuellen Daten nicht ausschließen. eNOS bleibt wichtiger Bestandteil der Analysen pleiotroper Effekte. Ihre Bedeutung für die Wirkweise von Statinen ist bereits erwiesen, darüber hinaus lassen die Ergebnisse einer zuvor publizierten Arbeit über die eNOS abhängigen und unabhängigen Effekte von Ezetimib auf die Atheroskleroseentwicklung zusätzliche, eNOS-vermittelte atheroprotektive Effekte von Ezetimib vermuten [49, 51, 52, 58]. Dass die eNOS bzw. die endotheliale Funktion wesentlich am komplexen Geschehen der Atheroskleroseentstehung beteiligt sein müssen, legen auch neuste bislang nicht publizierte Versuche unseres Labors nahe. Hierbei wurden die planimetrisch ermittelten atherosklerotischen Plaqueflächen im LDL-R-KO Modell mit denen

des LDL-R/eNOS-dKO Modells verglichen und es zeigte sich eine dramatisch geringere Plaquebildung bei intakter eNOS. Des Weiteren konnte die Effektivität der therapeutischen Intervention trotz eNOS-Defizienz erwiesen werden: innerhalb des LDL-R/eNOS-dKO Versuchskollektivs zeigte sich eine Reduktion der atherosklerotischen Plaqueflächen in den mit Simvastatin und Ezetimib behandelten Versuchsgruppen gegenüber der WD-Kontrollgruppe. Das LDL-R/eNOS-dKO Modell bietet eine wichtige Ergänzung zu den bisherigen Untersuchungen der Effekte von Simvastatin, Ezetimib und ihrer Pleiotropie. Zur definitiven Klärung möglicher eNOS-vermittelter, pleiotroper Effekte müssen die Ergebnisse der aktuell laufenden vergleichenden Untersuchungen an LDL-R/eNOS Doppel Knockout (dKO) Tieren abgewartet werden, die nicht Teil der hier dargestellten Doktorarbeit sind.

4.4 Effekt der therapeutischen Intervention auf die Gefäßreaktivität

Daten unserer Arbeitsgruppe zur Gefäßreaktivität als Korrelat der endothelialen Funktion zeigen in allen Versuchsgruppen eine gleichwertige dilatative Reaktion auf Stimulation mit Acetylcholin. Dies belegt eine intakte Endothelfunktion in allen Gruppen, zumindest nach 18 Wochen, dem Zeitpunkt aller durchgeführten Versuche. Wie auch schon oben zu den jeweiligen Ergebnissen diskutiert, sind die Messungen der NO/eNOS vor diesem Hintergrund nicht nur als Korrelat pathologischer Vorgänge und therapeutischer Intervention zu betrachten. Auch der Zeitpunkt der Untersuchungen scheint eine wichtige Rolle zu spielen und es stellt sich die Frage, ob Ergebnisse und zu beobachtende Trends zu einem späteren Studienzeitpunkt anders aussehen würden. Darüber hinaus wird die Möglichkeit weiterer an pleiotropen Effekten beteiligter Faktoren ersichtlich, in unserem Fall ist dabei vor allem wie schon erwähnt eine Betrachtung der NOS-Isoformen von Interesse.

4.5 Pleiotrope Effekte und Beeinflussung der Endothelfunktion durch therapeutische Intervention

Die Untersuchungen der Plasmacholesterinspiegel und der Läsionsfläche von atherosklerotischen Plaques haben eindeutig eine Wirkung beider Medikamente, Simvastatin und Ezetimib, sowie eine zusätzlich gesteigerte Wirkung durch ihre Kombination gezeigt. Die Effektivität ihrer Kombination bei der Reduktion des Plasmacholesterins und der atherosklerotischen Läsionen lässt vermuten, dass neben der additiven Wirkung durch die

zwei verschiedenen Angriffspunkte der Substanzen auch pleiotrope Effekte vorhanden sind. Durch die in dieser Arbeit dargestellten weiteren Experimente konnten aus den verschiedenen NO-Messungen Erkenntnisse über das Vorkommen von NO direkt am atherosklerotischen Läsionsort und die NO-Gesamtverfügbarkeit gewonnen werden. Dadurch sind Rückschlüsse auf den jeweiligen Funktionszustand des NO und Spekulationen über seine verschiedenen Produktionsquellen möglich. Über die Wirkweise und mögliche pleiotrope Effekte der getesteten Substanzen ergeben sich folgende Erkenntnisse: Bei der vaskulären NO-Menge hat eine medikamentöse Therapie möglicherweise Einfluss auf die Zusammensetzung der NO-Quellen. Die in der NO-Hb Messung erwiesene erhöhte Gesamtverfügbarkeit von NO unter der Behandlung mit Simvastatin belegt die pleiotropen atheroprotektiven Effekte von Statinen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Cholesterinspiegel und Atheroskleroseflächen ist hierbei jedoch kein zusätzlicher Effekt durch die Kombinationstherapie ersichtlich. Ein NO-vermittelter Wirkmechanismus von Ezetimib kann, in den aktuell diesbezüglich noch präliminären Untersuchungsergebnissen, nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Expression der eNOS zeigten keine Veränderungen unter therapeutischer Intervention. Des Weiteren haben Ergebnisse der Gefäßreaktivitätsmessungen eine intakte endotheliale Funktion gezeigt, das heißt die Endothelfunktion scheint durch die therapeutische Intervention nicht bzw. noch nicht beeinflusst zu sein. Dadurch kann trotz signifikanter Unterschiede der NO-Profile unter den Versuchsgruppen über eNOS-vermittelte Effekte bislang nur spekuliert werden. Dennoch scheint die eNOS – wie schon mehrfach erwähnt – maßgeblichen Anteil an den pleiotropen Effekten zu haben. Dies haben erste Ergebnisse der aktuell laufenden vergleichenden Untersuchungen an LDL-R/eNOS Doppel Knockout Tieren gezeigt und wir erwarten weitere Aufschlüsse durch noch folgende Vergleichsanalysen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit pleiotropen Effekten auf die Endothelfunktion unter der medikamentösen Therapie mit Simvastatin und Ezetimib in LDL-Rezeptor Knockout (LDL-R KO) Mäusen. Im Studiendesign wurden alle Versuche jeweils an männlichen Versuchstieren durchgeführt, welche die Medikamente in Mono- oder Kombinationstherapie erhielten, und gegen eine unbehandelte Kontrollgruppe verglichen. Als korrelative Parameter der Endothelfunktion wurden die aortale sowie ubiquitär-endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion, die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die Gefäßreaktivität ermittelt. NO und eNOS sind wesentlich an der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichts und damit der intakten Endothelfunktion beteiligt. Eine Störung dieses Gleichgewichts führt zur endothelialen Dysfunktion, welche die Entstehung von Atherosklerose begünstigt.

In Aortengewebe der Kontrollgruppe sowie unter Monotherapie mit Simvastatin – den beiden Gruppen mit den größten atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen – fanden sich vergleichsweise hohe vaskuläre NO-Mengen. Wir gehen davon aus, dass diese aortalen NO-Mengen als Korrelat einer erhöhten iNOS (induzierbare NO-Synthase)-Aktivität in atherosklerotischen Läsionen anzusehen sind und proatherogen wirken. Dies spricht für eine unter pathologischen Bedingungen unterschiedliche Zusammensetzung der NO-Produktion aus den NOS-Isoformen und bestätigt die mögliche Abhängigkeit der Funktion des NO vom jeweiligen vaskulären Milieu. Die Reduktion der atherosklerotischen Plaueflächen durch medikamentöse Intervention beeinflusst somit auch das vaskuläre NO-Vorkommen. Die signifikant erhöhte NO-Bioverfügbarkeit in zirkulierendem Blut von mit Simvastatin in Mono- oder Kombinationstherapie behandelten Tieren spricht für die in der Literatur beschriebene eNOS-vermittelte endotheliale Steigerung der NO-Produktion durch Statine, die eine atheroprotektive Wirkung vermitteln kann. Die Messungen der eNOS-Expression und der Gefäßreaktivität zeigen eine in allen Gruppen gleichermaßen intakte Endothelfunktion zum Zeitpunkt der Analysen.

Daten unserer Arbeitsgruppe haben erwiesen, dass eine Kombinationstherapie von Simvastatin und Ezetimib zu einer additiven Plasmacholesterinsenkung und Atherosklerosereduktion führen, im Gegensatz zu einer Behandlung mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass dabei v.a. die Produktionsquelle und der Funktionszustand des NOs sowie der Aktivitätszustand der eNOS und anderer NOS-Isoformen entscheidend zu sein scheinen.

Um diesen Ansätzen weiter nachzugehen sind weitere Analysen zu anderen Studienzeitpunkten und unter Differenzierung der NOS-Isoformen sowie vergleichende Studien im LDL-R/eNOS-dKO Modell von großer Bedeutung und werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

6 Literaturverzeichnis

1. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
2. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
3. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
4. Knowles, J.W. and N. Maeda, *Genetic modifiers of atherosclerosis in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(11): p. 2336-45.
5. Lusis, A.J., A.M. Fogelman, and G.C. Fonarow, *Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1868-73.
6. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
7. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
8. 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.
9. Ku, D.D., *Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia*. Science, 1982. **218**(4572): p. 576-8.
10. Aoki, N., et al., *Cardioprotective actions of human superoxide dismutase in two reperfusion models of myocardial ischaemia in the rat*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(3): p. 735-40.
11. Johnson, G., 3rd, et al., *Endothelium and myocardial protecting actions of taprostene, a stable prostacyclin analogue, after acute myocardial ischemia and reperfusion in cats*. Circ Res, 1990. **66**(5): p. 1362-70.
12. Tsao, P.S., et al., *Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat*. Circulation, 1990. **82**(4): p. 1402-12.
13. Mehta, J.L., D.L. Lawson, and W.W. Nichols, *Attenuated coronary relaxation after reperfusion: effects of superoxide dismutase and TxA2 inhibitor U 63557A*. Am J Physiol, 1989. **257**(4 Pt 2): p. H1240-6.
14. Lefer, A.M., et al., *Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia*. FASEB J, 1991. **5**(7): p. 2029-34.
15. Ignarro, L.J., et al., *Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **244**(1): p. 181-9.
16. Kurose, I., et al., *Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide*. Circ Res, 1994. **74**(3): p. 376-82.
17. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis*. Am J Cardiol, 1995. **75**(6): p. 67B-70B.
18. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
19. Vogel, R.A. and M.C. Corretti, *Estrogens, progestins, and heart disease: can endothelial function divine the benefit?* Circulation, 1998. **97**(13): p. 1223-6.

20. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2000. **101**(9): p. 948-54.
21. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
22. Bath, P.M., *The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993. **45**(1): p. 53-8.
23. Mooradian, D.L., T.C. Hutsell, and L.K. Keefer, *Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995. **25**(4): p. 674-8.
24. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(1): p. 60-8.
25. Lerman, A., et al., *Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans*. *Circulation*, 1998. **97**(21): p. 2123-8.
26. Shepherd, J., et al., *Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia*. *West of Scotland Coronary Prevention Study Group*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(20): p. 1301-7.
27. *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. *Lancet*, 1994. **344**(8934): p. 1383-9.
28. Niu, X.F., C.W. Smith, and P. Kubes, *Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils*. *Circ Res*, 1994. **74**(6): p. 1133-40.
29. Kubes, P. and D.N. Granger, *Nitric oxide modulates microvascular permeability*. *Am J Physiol*, 1992. **262**(2 Pt 2): p. H611-5.
30. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
31. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
32. Radi, R., et al., *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **288**(2): p. 481-7.
33. Chang, G.J., et al., *Oxidation of LDL to a biologically active form by derivatives of nitric oxide and nitrite in the absence of superoxide. Dependence on pH and oxygen*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(11): p. 1808-14.
34. Berliner, J.A. and J.W. Heinecke, *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 1996. **20**(5): p. 707-27.
35. Stamler, J.S., D.J. Singel, and J. Loscalzo, *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms*. *Science*, 1992. **258**(5090): p. 1898-902.
36. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(8): p. 3203-7.
37. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. *Nature*, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
38. Lefer, D.J., et al., *Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(6 Pt 2): p. H1943-50.
39. Kuhlencordt, P.J., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(5): p. C1195-202.

40. Michel, T. and O. Feron, *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2146-52.
41. Xia, Y., et al., *Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process.* J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25804-8.
42. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(1): p. R1-12.
43. Shaul, P.W., *Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location.* Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 749-74.
44. Wilcox, J.N., et al., *Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2479-88.
45. Kuhlencordt, P.J., et al., *Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice.* Circulation, 2001. **104**(4): p. 448-54.
46. Kuhlencordt, P.J., et al., *Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1539-44.
47. Ponnuswamy, P., et al., *Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase.* Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2400-10.
48. Kuhlencordt, P.J., et al., *Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice.* Circulation, 2001. **103**(25): p. 3099-104.
49. Liao, J.K. and U. Laufs, *Pleiotropic effects of statins.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 89-118.
50. Bea, F., et al., *Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation.* Atherosclerosis, 2003. **167**(2): p. 187-94.
51. Chen, Z., et al., *Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids.* Circulation, 2002. **106**(1): p. 20-3.
52. Laufs, U. and J.K. Liao, *Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors.* Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(4): p. 143-8.
53. Wassmann, S., et al., *HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species.* Hypertension, 2001. **37**(6): p. 1450-7.
54. Kleemann, R., et al., *Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro.* Blood, 2004. **103**(11): p. 4188-94.
55. Garcia-Calvo, M., et al., *The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8132-7.
56. Davis, H.R., Jr., et al., *Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(12): p. 2032-8.
57. Nakagami, H., et al., *Vascular protective effects of ezetimibe in ApoE-deficient mice.* Atherosclerosis, 2009. **203**(1): p. 51-8.

58. Kuhlencordt, P.J., et al., *Ezetimibe potently reduces vascular inflammation and arteriosclerosis in eNOS-deficient ApoE ko mice*. *Atherosclerosis*, 2009. **202**(1): p. 48-57.
59. Kastelein, J.J., et al., *Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(14): p. 1431-43.
60. Davidson, M.H., et al., *Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with statins: randomised, placebo-controlled, blinded experience in 2382 patients with primary hypercholesterolemia*. *Int J Clin Pract*, 2004. **58**(8): p. 746-55.
61. Davis, H.R., Jr., et al., *The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs*. *Metabolism*, 2001. **50**(10): p. 1234-41.
62. Kosoglou T, M.I., Musiol B, et al, *Pharmacodynamic interaction between the new selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe and simvastatin*. *Atherosclerosis*, 2000 (abstr). **151:135**.
63. Kleschyov, A.L., et al., *Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(2): p. 672-7.
64. Yonetani, T., et al., *Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 20323-33.
65. Minor, R.L., Jr., et al., *Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(6): p. 2109-16.

7 Anhang

Vaskuläre NO-Produktion [nM/ μ g] (zu 3.1.)

WD	WD+Sim	WD+EZ	WD+EZ+Sim
2,08E+04 \pm 4460,532 n=7	1,99E+04 \pm 2331,880 n=7	1,22E+04 \pm 7589,131 n=6	1,66E+04 \pm 5469,909 n=5

NO-Hb im Vollblut [nM] (zu 3.2.)

WD	WD+Sim	WD+EZ	WD+EZ+Sim
538,58 \pm 101,122 n=9	875,458 \pm 113,094 n=7	572,386 \pm 105,34 n=9	715,24 \pm 164,057 n=9

eNOS-Expression im Western Blot, Herzmuskel [AU] (zu 3.3.1.)

WD	WD+Sim	WD+EZ	WD+EZ+Sim
137,206 \pm 20,947 n=8	148,581 \pm 18,395 n=8	146,602 \pm 16,585 n=8	138,315 \pm 15,987 n=6

eNOS-Expression in RT-PCR, Carotiden [AU] (zu 3.3.2.)

WD	WD+Sim	WD+EZ	WD+EZ+Sim
5,818 \pm 1,394 n=10	5,52 \pm 1,333 n=9	4,776 \pm 1,525 n=9	5,967 \pm 0,922 n=7