

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

**Atheroprotektive Effekte der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase
in
Apolipoprotein-E-Knockout-Mäusen**

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

**vorgelegt von
Stefanie B. Hötten
aus Gelsenkirchen-Buer-Resse**

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Professor Dr. med. Georg Ertl
Koreferent: Privatdozent Dr. med. Johann Bauersachs
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Atherosklerose: Allgemeines, Ursachen, Bedeutung, Entstehung	1
1.2. Stickstoffmonoxid: Allgemeines, Reaktionen, Funktionen, Synthese	3
1.3. Expression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase in gesunden und atherosklerotischen Gefäßen	6
1.4. Ziel der Arbeit	6
2. MATERIAL	8
2.1. Chemikalien	8
2.2. Lösungen und Puffer	10
2.3. Färbelösungen	11
2.4. Antikörper/Antiseren	12
2.5. Enzyme	13
2.6. Kits	13
2.7. Größenstandards DNA	14
2.8. Nukleotide, Oligonukleotide, DNA	14
2.9. Software	14
2.10. Technische Geräte	15
2.11. Verbrauchsmaterialien	15
3. METHODEN	17
3.1. Mäuse	17
3.2. Isolierung genomischer DNA	18

3.3.	Southern Blot	18
3.3.1.	DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	18
3.3.2.	Auftrennung der DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese.....	19
3.3.3.	Vorbereitung des Agarose-Gels für den Transfer der DNA.....	19
3.3.4.	Kapillartransfer der DNA auf eine Nitrocellulose-Membran.....	19
3.3.5.	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde.....	20
3.3.6.	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	20
3.3.7.	Waschen der Nitrocellulose-Membran.....	21
3.3.8.	Autoradiographie.....	22
3.4.	Polymerasekettenreaktion	22
3.4.1.	Durchführung der Polymerasekettenreaktion.....	22
3.4.2.	Elektrophoretische Analyse der amplifizierten DNA-Sequenzen.....	23
3.5.	Probengewinnung für die morphometrische Atherosklerosebestimmung	24
3.6.	Morphometrische Atherosklerosebestimmung	24
3.7.	Probengewinnung für Immunhistochemie und Histochemie	25
3.8.	Immunhistochemie	26
3.8.1.	Nachweis von nNOS in den atherosklerotischen Plaques.....	26
3.8.2.	Maus-Makrophagen/Monozyten-Antikörper.....	27
3.8.3.	Anti- α -smooth-muscle-cell-actin-Antikörper.....	27
3.9.	Histochemie	28
3.9.1.	Hämatoxylin und Eosin Färbung.....	28
3.9.2.	Masson's Trichrom Färbung.....	28
3.9.3.	Pikro-Sirius-Rot Färbung.....	29
3.10.	Quantifizierung der kollagenen Fasern, der glatten Gefäßmuskelzellen und der Makrophagen in Gewebeschnitten	29
3.11.	Messung des Cholesterinspiegels	29
3.12.	Lipoproteinprofilbestimmung mittels Fast Phase Liquid Chromatographie	30
3.13.	Blutdruckmessung	30
3.14.	Statistische Auswertung	30
4.	ERGEBNISSE	31

4.1.	Bestimmung der Genotypen	31
4.2.	Immunhistochemie zum Nachweis der nNOS-Expression	32
4.3.	Morphometrische Atherosklerosebestimmung.....	33
4.4.	Messung physiologischer Parameter	38
4.5.	Histochemie und Immunhistochemie: Zusammensetzung der Läsionen	42
5.	DISKUSSION	46
5.1.	Atheroskleroseentwicklung in apoE-Ko und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen.....	46
5.1.1.	Reduzierter Blutdruck als mögliche Ursache der verzögerten Plaqueentwicklung zwischen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren beider Geschlechter	47
5.1.2.	Mögliche Ursachen des reduzierten Blutdruckes in weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren..	47
5.2.	Morphologie der atherosklerotischen Plaques	50
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	51
7.	LITERATURVERZEICHNIS	52

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose: Allgemeines, Ursachen, Bedeutung, Entstehung

Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung der größeren und mittleren muskulären und elastischen Arterien, die typischerweise an Gefäßstellen mit turbulenten Strömungseigenschaften, z.B. Gefäßabgängen, vorkommt. Sie zählt zu den Hauptursachen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z.B. Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt, plötzlicher Herztod, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit. In den westlichen Industrieländern stehen im mittleren Lebensalter (35–65 Jahre) Herz-Kreislaferkrankungen vor malignen Neoplasien auf Platz eins der Todesstatistik. Zwar ist die Atherosklerose eine Erkrankung des höheren Lebensalters, dennoch treten frühe atherosklerotische Veränderungen, die Lipidflecken, regelmäßig schon bei Kindern und Jugendlichen auf.¹ Durch eine Vielzahl epidemiologischer und experimenteller Untersuchungen über die letzten Jahrzehnte sind inzwischen zahlreiche Risikofaktoren bekannt, die die Atheroskleroseentwicklung begünstigen. Hierzu zählen Risikofaktoren mit einer genetischen Komponente, z.B. Hyperlipidämie, Hypertonie und Diabetes sowie Risikofaktoren aufgrund von Umwelteinflüssen, z. B. Nikotinabusus.²⁻³

Eine Schlüsselrolle in der Atheroskleroseentwicklung, von der Entstehung der Lipidflecken über die Bildung fibröser Plaques bis hin zur Plaqueruptur, spielen nach heutigem Kenntnisstand Entzündungsvorgänge. Bei diesen Entzündungsvorgängen wirken die Gefäßendothelzellen, Monozyten, Leukozyten und Thrombozyten mit.^{1,2,4} Die „response to injury hypothesis“ erklärt die in Stadien ablaufende Entwicklung der Atherosklerose, an deren Beginn ein Endothelschaden auftritt, hervorgerufen durch einen oder mehrere der oben genannten Risikofaktoren.

Das gesunde Gefäßendothel bildet normalerweise eine selektiv-permeable Membran zwischen dem Blut- und Gewebekompartiment. Die Endothelzellen bilden eine nicht-thrombogene, für Leukozyten nicht-adhärenente Oberfläche und produzieren Effektor-moleküle, die Entzündungs- und Thrombosierungsvorgänge sowie den Gefäßtonus und die Gefäßstruktur beeinflussen. Neben antithrombotischen (Heparin, Prostazyklin) und

vasoaktiven (Prostazyklin, Endothelin, Stickstoffmonoxid) Substanzen bilden und sezernieren Endothelzellen außerdem verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (Interleukin-1, TNF- α , TGF- β , M-CSF, GM-CSF, PDGF). Eine weitere, für die Entwicklung der Atherosklerose sehr wichtige Eigenschaft, stellt die Fähigkeit der Endothelzellen dar, Lipoproteine bei ihrem Durchtritt durch die Arterienwand zu modifizieren, insbesondere sie zu oxidieren.^{2,8}

Durch die Entwicklung einer gestörten Endothelfunktion kommt es zu einem Lipoproteineinstrom und einer Lipoproteinansammlung, insbesondere von LDL-Partikeln, in die subendotheliale Matrix.^{2,5} Oxidierte LDL-Partikel besitzen eine proinflammatorische Aktivität, durch welche die Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen, z. B. VCAM-1 sowie zur Sekretion von Wachstumsfaktoren, z.B. des Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden Faktors (M-CSF) und anderen Zytokinen stimuliert werden. Die Freisetzung dieser proinflammatorischen Moleküle und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle aus der Selektin- und Integrin-Klasse fördert und verstärkt das Anheften der Monozyten und T-Lymphozyten an das Endothel und deren Einwandern in die Arterienintima. Die Monozyten werden zu Makrophagen und können über Scavenger-Rezeptoren die veränderten LDL-Partikel aufnehmen. Die Expression der Scavenger-Rezeptoren wird ebenfalls über Wachstumsfaktoren (M-CSF), Zytokine (Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ)) gesteuert. Dadurch entstehen fettbeladene, vakuolisierte Schaumzellen, die sich in der Intima ansammeln und zusammen mit den T-Lymphozyten die frühen Lipidflecken (fatty streaks) darstellen.

Wirken weiterhin schädigende Faktoren auf die Zellen ein, bildet sich das zweite morphologisch fassbare Stadium aus, die fibrösen Plaques. Dieses Stadium ist durch eine Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Intima gekennzeichnet.

Neben den Endothelzellen sezernieren auch am Endothel haftende Leukozyten Zytokine und Wachstumsfaktoren, die neben einer vermehrten Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen außerdem die Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten bewirken. In der Intima vorhandene sowie aus der Media in die Intima eingewanderte glatte Gefäßmuskelzellen proliferieren, ändern ihren Phänotyp von einer kontraktilen zu einer sekretorisch aktiven Zelle und synthetisieren Kollagenfasern, Proteoglykane und

elastische Fasern. Durch diese Produktion extrazellulärer Matrix kommt es zu einer Fibrosierung der Plaques.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung entstehen komplexe Läsionen, die das Vollbild der Atherosklerose darstellen. Zunächst gehen Schaumzellen in den Plaques zu Grunde und setzen Lipide frei. Unterhalb der lumenseitigen fibrösen Kappe, aufgebaut aus glatten Gefäßmuskelzellen, extrazellulärer Matrix, Schaumzellen und T-Lymphozyten, entsteht eine atheromatöse Nekrose aus Zelldetritus, Lipiden und Cholesterinkristallen. Zusätzlich kommen in den Plaques Kalzifikationen vor.^{1, 2, 5-8}

Trotz dieser Veränderungen expandieren atherosklerotische Plaques lange relativ wenig in das betroffene Gefäßlumen hinein, weil sich das Gefäß kompensatorisch erweitert („remodelling“). Potentiell gefährliche Läsionen sind häufig nicht stenosierend und daher der Diagnose nur schwer zugänglich. Zu einer Stenose und somit zu einem akuten Koronarsyndrom, Herzinfarkt oder Schlaganfall, kommt es oft erst, wenn ein Riß oder eine Fissur in der dünnen fibrösen Kappe entsteht und sich über der Aufbruchstelle ein okklusiver Thrombus entwickelt.

Aktiviert Thrombozyten, die Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, und der Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) spielen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Gerinnungskaskade. Die sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren fördern ebenfalls das Einwandern und die Proliferation von Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen. Außerdem setzen aktivierte Thrombozyten Prostaglandine und Leukotriene frei. Zu den Prostaglandinen gehört u. a. Thromboxan A₂, ein sehr potenter Vasokonstriktor und Auslöser der irreversiblen Thrombozytenaggregation. Die Leukotriene verstärken die Entzündungsreaktion.^{1, 7}

Die Gefahr einer Plaque-Ruptur wächst, je dünner die fibröse Kappe einer Plaque wird und je mehr Lipidmasse und Makrophagen sich angesammelt haben. Die Entzündungsreaktion wiederum trägt zur Instabilität bei, so dass ein „Circulus vitiosus“ entsteht.

1.2. Stickstoffmonoxid: Allgemeines, Reaktionen, Funktionen, Synthese

Furchgott und Zawadzki untersuchten 1980 einen labilen, endothelialen Faktor, der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert und „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF)

genannt wurde.⁹ Unabhängig voneinander schlugen 1986 Furchgott und Ignarro vor, dass es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handle. Ein Jahr später wurde EDRF experimentell als NO identifiziert.^{10, 11} Die Bedeutung des NO, mit seinen diversen Funktionen auf intra- und interzellulärer Ebene, wurde 1992 durch die Bezeichnung ‚Molekül des Jahres‘ hervorgehoben.¹² Für die Entdeckung von EDRF erhielten 1998 Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad den Nobelpreis für Medizin.

NO ist das prinzipielle Produkt der überwiegend in der Plasmamembran lokalisierten Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die unter Verbrauch von NADPH ein Stickstoffatom der Guanidinogruppe der Aminosäure L-Arginin in NO und L-Citrullin umwandelt. Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthase besteht aus mindestens drei Isoformen. Die endotheliale (eNOS) und neuronale (nNOS) Stickstoffmonoxid-Synthase werden konstitutiv exprimiert, vor allem in Endothel- und Nervenzellen, und synthetisieren unter Basalbedingungen wie auch bei Stimulation durch Agonisten (z. B. Acetylcholin, ATP, Histamin, Serotonin, Thrombin, Vasopressin, Bradykinin) eine moderate Menge an NO. Für diese NO-Synthese sind hohe Konzentrationen an freiem intrazellulären Ca^{2+} erforderlich, damit das Enzym an das Protein Calmodulin binden und so vollständig aktiviert werden kann. Im Gegensatz dazu wird die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) transkriptionell reguliert. Durch entzündliche Stimuli, wie mikrobielle Endotoxine und verschiedene proinflammatorische Zytokine, kommt es zur Expression der iNOS, die dann eine große Menge an NO kalziumunabhängig freisetzt. In der Gefäßwand erfolgt die Expression vorwiegend in glatten Gefäßmuskelzellen und mononukleären Leukozyten/Makrophagen.^{13, 14-17} In atherosklerotischen Gefäßläsionen sind alle drei Isoformen der NOS nachweisbar.¹⁴ Die endotheliale Isoform wird als atheroprotektiv angesehen¹⁸⁻²¹, während die induzierbare Isoform eine proatherogene Wirkung hat.^{22, 23}

NO ist ein lipophiles, hochreaktives, freies Radikal mit pluripotenten regulatorischen Eigenschaften.¹³ Es übt eine wichtige biologische Funktion aus, sowohl innerhalb der Zelle, in der es synthetisiert wird, wie auch durch Interaktion mit benachbarten Zellen und Molekülen.²⁴ Durch seine Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Molekülen ist es an Signalübertragung, Zellprotektion und Zelltoxizität beteiligt und nimmt in

verschiedenen physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle ein. Für das kardio-vaskuläre System wichtige NO-vermittelte Reaktionen sind die Regulation des Gefäßtonus^{12, 13, 24-26}, die Inhibition der Thrombozytenaggregation²⁷, die Hemmung der Zelladhäsion an das Endothel²⁸ und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.²⁹ NO aktiviert die lösliche Guanylat Zykklase, wodurch es zur Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) kommt. Hierdurch werden cGMP-abhängige Kinasen aktiviert, die die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen und die Inhibition der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation vermitteln.^{13, 30} Weitere wichtige Funktionen hat NO in der Neurotransmission³¹ und bei Entzündungsvorgängen.³² Die Elimination von NO im Gefäßlumen erfolgt durch seine Diffusion in die Erythrozyten und die dort stattfindende Reaktion mit oxygeniertem Hämoglobin zu Nitrat.^{24, 30}

NO hat oxidierende wie auch antioxidierende Eigenschaften.³³ Die Zelltoxizität des NO beruht auf dessen oxidierenden Eigenschaften. NO reagiert in einer Diffusionslimitierten Reaktion mit Superoxid unter Bildung von Peroxynitrit, welches im weiteren Verlauf Hydroxylradikale freisetzen kann.³⁴ Die Reaktion von Superoxid mit NO läuft schneller ab, als das Superoxid durch die Superoxid-Dismutase abgebaut werden kann, daher kann die Geschwindigkeit der Superoxidbildung in der Gefäßwand den Verbleib und somit die NO-Bioverfügbarkeit wesentlich beeinflussen.³⁰ Peroxynitrit ist ein starkes Oxidanz, welches zur Oxidierung von LDL-Partikeln und zur Entstehung von Ox-LDL innerhalb der Arterienwand beiträgt. Ox-LDL wird vom Scavenger-Rezeptor A der Makrophagen erkannt. Die darauf folgende unkontrollierte Aufnahme von Ox-LDL in die Zelle führt zur Schaumzellbildung, welches ein wichtiger Schritt in der Entwicklung früher atherosklerotischer Läsionen darstellt.^{13, 30, 35, 36} In atherosklerotischen Plaques führt Peroxynitrit außerdem zu einer Nitrosylierung von Protein-Tyrosingruppen.^{30, 37} Die freigesetzten Hydroxylradikale reagieren mit ungesättigten Fettsäuren und es entstehen stark zytotoxische Lipid-Hydroperoxide.³⁷

Die antioxidierende Eigenschaft von NO beruht auf der Möglichkeit, die Lipidperoxidation durch die Unterbrechung der peroxidativen Kettenreaktion zu stoppen.³³

1.3. Expression der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase in gesunden und atherosklerotischen Gefäßen

Die nNOS war die erste der drei Isoformen, die isoliert und geklont wurde.^{38, 39} Zu den nNOS-exprimierenden Zellen zählen perivaskuläre Neurone, in denen durch nNOS-synthetisiertes NO als Neurotransmitter freigesetzt wird. Obwohl der Name „neuronal-NOS“ eine Expression in Nervengewebe impliziert, konnte die nNOS aber auch in glatten Gefäßmuskelzellen nicht-atherosklerotischer Karotiden, Koronarien, Pulmonalarterien und Aorten von Ratten nachgewiesen werden.⁴⁰⁻⁴³ Buchwalow et al. haben mit einer ultrasensitiven immunhistochemischen Amplifikationstechnik, der Elektronenmikroskopie und Western-Blot-Analyse nachgewiesen, dass nNOS nicht nur in perivaskulären Nerven, sondern auch in glatten Gefäßmuskelzellen nicht-atherosklerotischer, menschlicher Arterien exprimiert wird.⁴⁴ In frühen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques wurde nNOS-mRNA und nNOS Protein in Assoziation mit Makrophagen, Endothelzellen und mesenchym-ähnlichen Intimazellen nachgewiesen. Es wird angenommen, dass diese mesenchym-ähnlichen Intimazellen von glatten Gefäßmuskelzellen abstammen und die nNOS-Lokalisation in diesen Zellen die lokale NO-Produktion der in den Plaques vorhandenen glatten Gefäßmuskelzellen widerspiegelt.¹⁴

Obwohl die nNOS ursprünglich als konstitutiv exprimierte Isoform angesehen wurde, wird heute vermutet, dass die nNOS-Expression im Gefäßsystem induziert werden kann.⁴⁵

1.4. Ziel der Arbeit

Bis heute sind zahlreiche Studien durchgeführt worden, um die Rolle der eNOS und iNOS in der Atherosklerose zu untersuchen. Mäuse, deren eNOS-Gen inaktiviert worden ist (eNOS-Knockout [Ko]), zeigen sowohl eine dramatische Zunahme der atherosklerotischen Plaques³², eine beschleunigte Neointima-Bildung nach Gefäßverletzung³³, sowie ein abnormes Remodelling der Gefäßwand.³⁴ Im Gegensatz dazu führt eine eNOS-Überexpression in transgenen Mäusen zu einer verminderten Bildung von Gefäßläsionen.³⁵ Dieses sind Ergebnisse, die für eine atheroprotektive

Funktion der eNOS sprechen. Im Gegensatz dazu führt die iNOS Deletion zu einer verminderten Atheroskleroseentwicklung und zu einer Reduktion der Lipidperoxide im Plasma von apoE/iNOS-dKo Mäusen.³⁶ Die iNOS wird somit als proatherogen angesehen, was durch eine prooxidative Wirkung des Enzyms in diesem Modell teilweise erklärt werden kann.

Zu der Fragestellung, welche Stellung die nNOS in dem komplexen Prozess der Artheroskleroseentwicklung einnimmt, liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. In neueren Studien an Mäusen und Ratten, nach Verletzung der Arteria carotis communis, konnte eine nNOS vermittelte Hemmung der Neointima-Proliferation nachgewiesen werden.⁴⁵ Die Bedeutung der nNOS in der spontanen Atheroskleroseentstehung ist bisher nicht untersucht worden.

Aus diesem Grund wurden hypercholesterinämische, spontan atherosklerotische Apolipoprotein E-Knockout (apoE-Ko) Mäuse (Jackson Laboratories, Maine, USA) mit Mäusen gekreuzt, deren nNOS-Gen zuvor inaktiviert worden war (nNOS-Ko) (Labor von Paul Huang, M. D., Ph.D., Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Massachusetts, USA). ApoE vermittelt als Bestandteil von Chylomikronen, VLDL und HDL die zelluläre Aufnahme dieser Partikel über den LDL-Rezeptor und spielt eine zentrale Rolle im Lipoproteinmetabolismus. ApoE-Ko-Mäuse haben vier- bis fünffach über der Norm liegende Plasmacholesterinspiegel und entwickeln spontan atherosklerotische Plaques, welche die Entwicklung atherosklerotischer Plaques und deren Progression beim Menschen widerspiegeln.^{46, 47} Durch die Zufuhr einer „western type“-Diät (42% der Kalorien von Fett, 0,15% Cholesterin) kann die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen beschleunigt werden.⁴⁸

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, dass der genetische Mangel an nNOS zu einer verstärkten Atheroskleroseentwicklung führt und nNOS atheroprotektiv wirkt.

2. Material

2.1. Chemikalien

In diesem Abschnitt werden die Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien aufgeführt, welche alle von analytischem Reinheitsgrad waren.

Abbot®, Ludwigshafen

Isofluran

Ambion®, Texas, USA

Phenol

Biochrom®, Berlin

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co

Sirius-Rot

Fluka®, Hannover

Avertin

Natriumjodat

Pikrinsäure

FMC Bioproducts®, Rockland, MA

NuSieve GTG Agarose

SeaKem GTG Agarose

Fresenius®, Friedberg

Ampuwa- H₂O

Invitrogen/Gibco®, Karlsruhe

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

20x Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (SSC)

10x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

J.T. Baker, Deventer®, Niederlande

Azeton

100% Ethanol

Merck®, Darmstadt

Aqua Tex

Bromophenol Blau

Chloralhydrat

Entellan

Eosin G

Glycerol

Salzsäure (HCL)

Kaliumaluminiumsulfat

Paraformaldehyd

Zitronensäure

Sigma Chemie®, Deisenhofen

Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V

Chloroform

Ethidiumbromid

Ficoll

Formalin

Formamid

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Hämatoxylin

Mineralöl

Natriumhydroxid (NaOH)

Natriumphosphat (NaPO_4)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
Polyvinylpyrrolidon
Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)
Sudan IV
Tris

2.2. Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Ampuwa- H_2O (Fresenius) angesetzt.

Puffer zur Gewinnung genomischer DNA (tail solution)

10% SDS pH 7,2
0,5M EDTA
1M Tris pH 8

Denhardt's-Lösung

1mg/ml Ficoll
1mg/ml Polyvinylpyrrolidon
1mg/ml BSA Fraktion V

Gel-Ladepuffer

0,25% Bromophenol Blau
30% Glycerol

Depurinierung (Southern Blot)

0,25M HCL

Denaturierung (Southern Blot)

0,5M NaOH
1M NaCl

Neutralisation (Southern Blot)

1M Tris

1,5M NaCl

Waschpuffer 1 (Southern Blot)

2x SSC

0,01% SDS

Raumtemperatur

Waschpuffer 2 (Southern Blot)

0,2x SSC

0,01% SDS

68°C

Immunhistochemie-Puffer 1

10mM NaPO₄ pH 7,5

0,9% PBS

Immunhistochemie-Puffer 2

100mM Tris-HCL pH 8,4

2.3. Färbelösungen

Sudan IV

0,5% Sudan IV

35% Ethanol

50% Azeton

Vor jedem Gebrauch wurde diese Färbelösung durch einen Papierfilter gefiltert.

Hämalaun nach Mayer

Hämatoxylin

Natriumjodat

Kaliumaluminiumsulfat

Chloralhydrat

Zitronensäure

Masson's Trichrom

Sigma® Accustain Trichrome Stain Kit

- Biebrich Säurefuchsin-Lösung
- Wolframatophosphorsäure
- Molybdato-phosphorsäure
- Anilinblau-Lösung

Bouin-Lösung (Sigma®)

Weigert's Eisenhämatoxylin Set (Sigma®)

Pikro-Sirius-Rot

Gesättigte Pikrinsäure

Sirius-Rot 1%ig

Diese Färbelösung wurde mindestens 24 Stunden vor Gebrauch angesetzt.

2.4. Antikörper/Antiseren

Chemicon Int.®, Temecula, CA

Monoklonaler Maus Makrophagen/Monozyten Antikörper (MOMA-2), 0,5mg/ml

Sigma®, Missouri

Monoklonaler anti- α smooth muscle actin Antikörper (Klon 1A4), 0,5mg/ml

Transduction Laboratories®, New Hampshire

Polyklonaler anti-nNOS Antikörper, 250 μ g/ml

Vector® Laboratories, Burlingame, USA

Vectastain Elite ABC Kits

- Blocksera
- Anti-Rabbit-IgG (Ziege), 2,5µg/ml
- Anti-Rat-IgG (Kaninchen), 2,5µg/ml
- Peroxidasemarkiertes Avidin

DAB-Substrate Kit für Peroxidase

Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit

2.5. Enzyme

Sigma Chemie®, Deisenhofen

Proteinkinase K

New England Biolabs®, Frankfurt a.M.

Restriktionsendonuklease BAM H1

10x Restriktionspuffer BAM H1

BSA für Restriktionsverdau

MBI Fermentas®, St. Leon-Rot

Taq-DNA-Polymerase

2.6. Kits

Stratagene®, Heidelberg

Prime it II Random Primer Labelling Kit

- Random Primers
- 5dCTP Puffer
- Exo-Klenow-Enzym

2.7. Größenstandards DNA

New England Biolabs®, Frankfurt a.M.

100bp DNA ladder (PCR)

1kb DNA ladder (Southern Blot)

2.8. Nukleotide, Oligonukleotide, DNA

Amersham Pharmacia Biotech®, Freiburg

α -³²P dCTP

MBI Fermentas®, St. Leon-Rot

dNTPs für PCR

10x PCR-Puffer

MgCl₂ 25mM für PCR

MWG Biotech®, München

Oligonukleotid-Primer 180 (5'– gCC Tag CCg Agg gAg AgC Cg –3')

Oligonukleotid-Primer 181 (5'– TgT gAC TTg ggA gCT CTg CAg C –3')

Oligonukleotid-Primer 182 (5'– gCC gCC CCg ACT gCA TCT –3')

Roche®, Mannheim

Hering-Sperma-DNA

2.9. Software

Image Pro Plus, Version 4.1 (Media Cybernetics)

StatView, Version 4.51 (Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA)

SOFTmax, Version 2.32

2.10. Technische Geräte

- Elektrophoresekammer: BIO-RAD®, Wide Mini Sub-Cell GT
Eppendorf®, 5415 R
- ELISA Reader: Molecular Devices®, Thermo max
- Fotoapparat: Leica®, 35mm
- Inkubator: MWG Biotech®, Hybaid Maxi 14
- Kaltlichtquelle: Schott®, KL 1500 LCD 230V
- Kryostat: Leica®, Jung CM 3000
- Mikronadeln: Fine Science Tools®
- PCR-Maschine: Perkin Elmer®, GeneAmp PCR System 2400
- Präparationsbesteck: Fine Science Tools®
- Röntgenfilm-Entwickler: Kodak®, M 35 X-OMAT
- Stereomikroskop: Leica®, MZ 6
- Superose-6-Säule: Amersham Biosciences®, Tricorn 10/300 GL
- UV-Crosslinker: Stratagene®, UV Stratalinker 1800
- Videokamera: COHU
- Volt/Ampere-Meter: BIO-RAD®, Power PAC 200
- Zentrifugen: Eppendorf®, 5417 R

2.11. Verbrauchsmaterialien

- Aqua Tex: Merck®
- Filtergewebe aus Polyester: Hartenstein
- Flüssigstickstoff: Linde®
- Mikrotiterplatten: Falcon®
- Nitrocellulose-Membran: Amersham Pharmacia Biotech®, Hybond XL
- Objektträger: Menzel® GmbH, Menzel-Gläser Superfrost Plus
Braun®
- Röntgenfilme: Kodak®, BioMax XAR Film 24 x 30cm
- Tissue Tak: Sakura Finetek®

- Venofix: Braun®, G21
- Whatman-Papier: Schleicher und Schüll®

3. Methoden

3.1. Mäuse

Für die Untersuchungen wurden spontan atherosklerotische apoE-Ko Mäuse mit nNOS-Ko Mäusen gekreuzt und apoE/nNOS-Doppel-Knockout (dKo) Tiere erzeugt. Beide Stämme wurden vor der Kreuzung für 10 Generationen auf einen C57BL/6-genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. ApoE-Ko-Tiere, die für nNOS heterozygot waren, wurden verpaart und die Nachkommen auf das Vorhandensein oder Fehlen von apoE- und nNOS-Wildtyp (Wt) und -Knockout Allelen mittels PCR und Southern Blot untersucht. ApoE-Ko-Tiere, die für nNOS entweder Wild-Typ oder Ko waren, wurden mit drei Wochen von den Muttertieren entwöhnt und ab einem Alter von 6 Wochen für 14 oder 24 Wochen mit einer „western-type“-Diät (42% der Kalorien durch Fett, 0,15% durch Cholesterol) gefüttert.

Die apoE-Ko Mäuse wurden von den Jackson Laboratories (Maine, USA) bezogen. Die nNOS-Ko Mäuse wurden durch gezielte Mutagenese („gene-targeting“) im Labor von Paul Huang, M.D., Ph.D. (Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Massachusetts, USA) erzeugt.

Bei der Methode der gezielten Mutagenese wird ein DNA-Fragment mit dem gewünschten mutierten Gen in einen Vektor integriert, der das Neomycin-Resistenz-Gen trägt. In diesem Fall wurde ein Fragment, das das zweite Exon des nNOS-Gens flankiert, verwendet und in murine embryonale Stammzellen transfiziert. Die homologe Rekombination zwischen dem benutzten Targeting-Vektor und dem nNOS-Gen führt zu einem Austausch des zweiten Exons des Gens mit einem Neomycin-Resistenz-Gen und somit zu einer Inaktivierung des nNOS-Gens. Es folgt die Amplifizierung und Identifikation der Zellklone, in denen das nNOS-Gen durch homologe Rekombination ersetzt wurde, durch Southern Blotting. Einzelne Zellen der identifizierten Kolonien werden dann in einen frühen Mausembryo injiziert und in ein Muttertier reimplantiert. Heterozygote männliche und weibliche Träger der Gen-Deletion werden miteinander gekreuzt. Nach den Regeln der Vererbung sind 25% der Nachkommen hinsichtlich des inaktivierten nNOS-Gens homozygot, 25% Wild-Typ und 50% heterozygot.^{49, 50}

3.2. Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde ein 1cm langes Schwanzstück von drei Wochen alten Mäusen genommen. Der Schwanzbiopsie wurden 500µl „tail-solution“ und 30µl (0,8U/µl) Proteinkinase K hinzugegeben und das Gemisch über Nacht in einem Wasserbad mit 37°C inkubiert.

Es erfolgte dann in der angegebenen Reihenfolge eine Extraktion mit Phenol, einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch und Chloroform. Die zuerst durchgeführte Phenolextraktion diente der Entfernung von Enzymen oder zytoplasmatischen Proteinresten aus der wässrigen Phase, in welcher die DNA gelöst ist. Um den Gehalt an überschüssigem Phenol zu reduzieren, wurden die Extraktionsschritte mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform durchgeführt. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde die Emulsion 10 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Anschließend erfolgte die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 1ml 100%igen Ethanol. Das überschüssige Ethanol wurde entfernt und das Präzipitat für 20 Minuten getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 50µl HPLC-H₂O aufgelöst und bei -80°C eingefroren.

3.3. Southern Blot

Southern-Blotting ermöglicht die spezifische Gensequenz für nNOS in einem Gemisch von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten nachzuweisen.⁵¹

3.3.1. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die zu untersuchende DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten. Dazu wurden zu 10µl DNA-Lösung folgende Substanzen hinzugegeben:

- 2,50µl 10x Restriktionspuffer
- 2,50µl Restriktionsendonuklease (20U/µl)
- 0,25µl Albumin (BSA)
- 10,00µl H₂O

Die Probe wurde gemischt und zentrifugiert. Der Verdau der Probe erfolgte über Nacht bei 37°C. Als Restriktionsendonuklease wurde BAM HI verwendet.

3.3.2. Auftrennung der DNA durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Restriktionsfragmente wurden in einem horizontalen, 1%igen Agarose-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und mit dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,5µl/ml) versetzt. Um die Laufstrecken der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel beurteilen zu können, wurden jeder Probe 6µl des Farbstoffes Bromophenolblau zugesetzt. Ein 1kb DNA-Größenstandard wurde verwendet und die Elektrophorese über drei Stunden bei 50V durchgeführt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese unter UV-Licht photographiert.

3.3.3. Vorbereitung des Agarose-Gels für den Transfer der DNA

Zunächst erfolgte die Depurinierung der DNA durch Einlegen des Gels in 0,25M HCL für 15 Minuten. Danach wurde die DNA in einer Lösung aus 0,5M NaOH und 1M NaCl für 30 Minuten denaturiert, um die Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA aufzutrennen. Anschließend erfolgte die Neutralisation des Gels durch Einlegen in 1M Tris und 1,5M NaCl für 30 Minuten. Unter sanften Waschbewegungen wurden diese drei Schritte auf einem Drehschüttler durchgeführt.

3.3.4. Kapillartransfer der DNA auf eine Nitrocellulose-Membran

Wie in Abbildung 1 dargestellt, erfolgt durch die Saugkraft eines Stapels Papiertücher der Transport des Transferpuffers durch das Agarose-Gel und die Nitrocellulose-Membran. Durch diesen nach oben gerichteten Fluß werden die DNA-Fragmente von dem Agarosegel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Kreuzvernetzung auf der Membran fixiert.

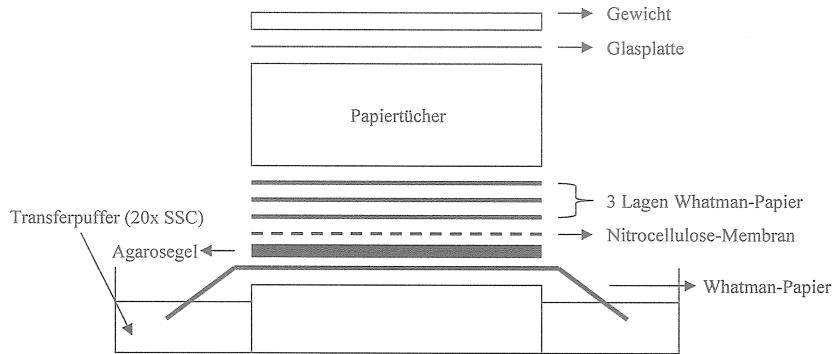


Abbildung 1:

Nach oben gerichteter Kapillarttransfer von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel auf eine Nitrocellulose-Membran.

3.3.5. Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Zu 10µl cDNA wurden 10µl random primer und 13µl HPLC-H₂O gegeben. Die Probe wurde für 5 Minuten gekocht, danach bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte die Synthese der DNA Sonde (prime it II, Random Primer Labelling Kit, Stratagene) unter Verwendung des Klenow-Enzyms und ³²P dCTP bei 37°C, für 60 Minuten. Anschließend wurde die Probe mit 500µl HPLC-H₂O verdünnt.

3.3.6. Prähybridisierung und Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wird durch komplementäre Basenpaarung der zu analysierenden (Einzelstrang-)DNA und der radioaktiv markierten nNOS-DNA-Sonde eine doppelsträngige Nukleinsäure erzeugt. Die der Sonde komplementäre genomische Nukleinsäuresequenz kann hierdurch hochspezifisch nachgewiesen werden. Eine Bindung der Einzelstrang-DNA an unspezifische Stellen der Membran wird verhindert, indem mit nicht-spezifischer Heringsperma-DNA die unspezifischen Bindungsstellen

der Membran abgesättigt werden. Die Prähybridisierungs- / Hybridisierungslösung setzt sich zusammen aus:

7,2ml	H ₂ O
28,8ml	Formamid
0,6ml	1M Tris
6,0ml	50x Denhardts-Lösung
3,0ml	20x SDS
14,4ml	20x SSC

Je 30ml werden für 30 Minuten bei 42°C inkubiert.

Prähybridisierung: Für die Prähybridisierung wurde die Membran in SSC angefeuchtet, zusammengerollt und mit der DNA-Seite nach innen in die Hybridisierungs-Glasröhre gelegt. 30ml Prähybridisierungslösung mit 300µl gekochter Hering-Sperma-DNA wurden zugegeben und die Membran für 2 Stunden unter ständiger Rotation bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Hybridisierung: Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde durch 5 minütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. In einem zweiten Ansatz wurden 300µl Hering-Sperma-DNA denaturiert. DNA-Sonde und Hering-Sperma-DNA wurden in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierungslösung wurde dekantiert und die Membran mit der Hybridisierungslösung inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte dann unter ständiger Rotation über Nacht bei 42°C.

3.3.7. Waschen der Nitrocellulose-Membran

Nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung wurde die unspezifisch gebundene DNA-Sonde durch Waschen der Membran mit Waschpuffern entfernt. Die Membran wurde in einer Kunststoffschale platziert und zweimal für 15 Minuten mit Waschpuffer 1 bei Raumtemperatur auf dem Drehschüttler inkubiert („low stringency wash“). Danach wurde die Membran mit 68°C warmen Waschpuffer 2 für 15 Minuten gewaschen („high stringency wash“). Nach dem dritten Waschschrift wurde die Radioaktivität der Membran gemessen. Bei einem lokalisierten Signal von maximal 3000cpm wurde das Waschen beendet.

3.3.8. Autoradiographie

Die Membran wurde in Kunststoffolie eingeschweißt, in eine Röntgenkassette mit Verstärkerfolie und Röntgenfilm gelegt und für 24 Stunden bei -80°C exponiert.

3.4. **Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine hoch spezifische und sensitive Methode zur Amplifizierung von bekannten DNA-Sequenzen. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt muß von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, damit die PCR-Primer an das jeweils komplementäre DNA-Molekül hybridisieren können.

Die zu untersuchende genomische DNA wird zunächst durch Erhitzen denaturiert und mit einem Überschuß an Primern und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) vermischt. Durch Abkühlen des Reaktionsgemisches erfolgt die Hybridisierung der Primer an den komplementären DNA Strang. Nachfolgend wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erhöht und die DNA-Matrize verlängert. So entsteht neue, doppelsträngige DNA mit einer zur Matrize komplementären Sequenz. Dieser Kreislauf, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Synthese, wird vielfach wiederholt und führt zu einer exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes. Somit enthält das Reaktionsgemisch am Ende von n Vermehrungszyklen ein theoretisches Maximum von 2^n Doppelstrang-DNA-Molekülen.

Als Enzym wurde die Taq-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verwendet, die bei der für die Denaturierung nötigen hohen Temperatur von 94°C nicht denaturiert. Damit die dNTPs eingebaut werden können, müssen dem Reaktionsgemisch außerdem Mg^{2+} -Ionen zugegeben werden, die mit den dNTPs einen für den Einbau ausschlaggebenden löslichen Komplex bilden. Mg^{2+} -Ionen stimulieren zusätzlich die Polymeraseaktivität.⁵²⁻⁵⁴

3.4.1. Durchführung der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde verwendet, um das apoE-Wildtyp- und apoE-knockout-Allel zu identifizieren. Für jede DNA-Probe wurden folgende Komponenten benötigt:

19,46µl	HPLC-H ₂ O
3,66µl	10x PCR-Puffer
2,88µl	25mM MgCl ₂
0,72µl	10mM dNTP
1,80µl	Primer A: 20µM oIMR 180
1,80µl	Primer B: 20µM oIMR 181
1,80µl	Primer C: 20µM oIMR 182
0,36µl	Taq-Polymerase (5U/µl)

Zu jedem PCR-Ansatz wurden 4µl genomische DNA gegeben. Um eine Verunreinigung der Probe und eine Verdunstung während der Reaktion im Thermocycler zu vermeiden, wurden 20µl Mineralöl auf das Reaktionsgemisch aufgetragen. Die eingesetzte Doppelstrang-DNA wurde im Thermocycler bei 94°C für 2 Minuten in Einzelstrang-DNA denaturiert, danach folgten 35 Zyklen, die aus folgenden Syntheseschritten bestanden:

Denaturierung:	94°C für 20 Sekunden
Hybridisierung:	68°C für 40 Sekunden
Synthese:	72°C für 2 Minuten

Nach 35 Zyklen wurden die Proben im Thermocycler auf 4°C heruntergekühlt.

3.4.2. Elektrophoretische Analyse der amplifizierten DNA-Sequenzen

Die Analyse der amplifizierten DNA-Sequenzen erfolgte durch Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Es wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (0,5µl/ml) in TAE-Puffer hergestellt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der DNA interkaliert und durch UV-Bestrahlung sichtbar macht. Als Elektrophoresepuffer diente TAE. Jede Probe wurde für 4 Minuten bei 75°C denaturiert, es wurden 6µl Ladepuffer zugegeben und 20µl jeder Probe in je eine Geltasche geladen. Zur Größenbestimmung der markierten DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein 100 bp DNA-Größenstandart geladen. Die Elektrophorese erfolgte über 1 Stunde bei einer

Spannung von 100 Volt. Die erwarteten PCR-Produkte liegen für den apoE-Wt bei 155bp und für apoE-Ko Tiere bei 245bp.

3.5. Probengewinnung für die morphometrische Atherosklerosebestimmung

Mit einer intraperitonealen Injektion von 80µg/kg Pentobarbital wurden die Mäuse betäubt und die Tiefe der Anästhesie durch Testen der Schmerzreflexe beurteilt. Waren die Schmerzreflexe erloschen, erfolgte ein Oberbauchschnitt entlang des Rippenbogens nach links und rechts. Der linke Ventrikel wurde durch das Zwerchfell punktiert und 1ml Blut entnommen. Nach Inzision des Zwerchfells wurde die Vena cava inferior durchtrennt und das Gefäßsystem durch die Punktion des linken Ventrikels mit 5ml kaltem PBS (pH 7,4) gespült. Die Aorta wurde sorgfältig von der Aortenklappe bis zur iliakalen Bifurkation freipräpariert, entnommen und über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert.

3.6. Morphometrische Atherosklerosebestimmung

Die morphometrische Bestimmung der Atherosklerose erfolgte nach einer von Palinski beschriebenen, hier leicht modifizierten Methode.⁵⁵ Zunächst wurde adventitielles Fettgewebe vollständig entfernt, um zu vermeiden, dass verbliebene Gewebe fälschlich durch die Gefäßwand als Plaque identifiziert werden. Die Aorta wurde longitudinal aufgeschnitten und mit Mikronadeln plan in einer Schale mit einer schwarzen Wachs Oberfläche ausgebreitet. Mit einer Schwarz-Weiß-Videokamera, die auf einem Stereomikroskop mit Ringlicht und Polfilter montiert worden war, wurden Serienbilder der Aorta angefertigt und in dem Programm Image Pro Plus gespeichert. Für die spätere Analyse war eine relativ konstante Grauskalierung der unveränderten Aortenwand erforderlich, die durch eine gleichmäßige Belichtung mit geringen Störfaktoren erreicht wurde. Nachdem die einzelnen Aortensegmente gefilmt und gespeichert worden waren, wurde das PBS aus der Schale entfernt, die Aorta für 3 Minuten mit einer gefilterten Lösung Sudan IV gefärbt und anschließend mit 80%igem Ethanol entfärbt. Die Mikronadeln wurden für das Färben nicht entfernt. Nun wurden mit einer 35mm

Kamera, unter Verwendung des gleichen Stereomikroskopes, Farbbilder der gefärbten Aorta angefertigt.

Da im Gegensatz zur Videokamera das menschliche Auge zwischen intimaler Färbung und einer durch die Aortenwand sichtbaren adventitiellen Färbung unterscheiden kann, wurde die Analyse der Videobilder unter zu Hilfenahme der Farbbilder durchgeführt. Durch Vergleich der Videobilder mit den Farbbildern konnten in den Videobildern atherosklerotische Läsionen von Veränderungen abgegrenzt werden, die nicht durch atherosklerotische Plaques bedingt waren. Die Gesamtoberfläche der Aorta sowie die Fläche der Plaques wurden mit Hilfe des oben genannten Programms planimetriert. Daraus konnte dann für jedes Tier die jeweilige prozentuale Läsionsfläche in Bezug auf die totale Aortenfläche berechnet werden.

3.7. Probengewinnung für Immunhistochemie und Histochemie

Die Tiere wurden wie unter 3.5 beschrieben anästhesiert und ein Oberbauchschnitt entlang des Rippenbogens nach links und rechts durchgeführt. Das Zwerchfell und die Vena cava inferior wurden durchtrennt und der linke Ventrikel mittels Butterfly-Infusionskanüle punktiert. Danach erfolgte ein zehnminütiges Durchspülen mit einer PBS-Infusion, gefolgt von einer zehnminütigen Formalin-Infusion. Hiernach wurden das Herz mit der Aortenklappe sowie die thorakale und abdominelle Aorta herauspräpariert und für 48 Stunden in Formalin eingelegt. Anschließend wurden die Gewebe in Paraffin eingebettet und Serienschnitte der Aortenwurzel und des Aortenbogens mit einer Schichtdicke von 2-4 μ m angefertigt.

Die Probenentnahme für die Herstellung von Kryoschnitten erfolgte nach der oben beschriebenen Methode, mit der Ausnahme, dass der große Kreislauf über den linken Ventrikel mit 0,9% NaCl gespült wurde. Das Herz und die Aorta wurden in Tissue-Tek® eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Durch Schneiden des in Tissue-Tek® eingebetteten Gewebes mit einem Kryostat (-21°C) konnte man eine Schichtdicke von 5 – 6 μ m erreichen. Ebenfalls wurden Serienschnitte der Aortenwurzel und des Aortenbogens angefertigt. Die Schnitte wurden auf Menzel® - Gläser aufgezogen, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei -20°C

eingefroren. Vor der Verwendung wurden die Kryoschnitte zunächst 10 Minuten lang in Azeton bei 4°C fixiert und für eine Stunde an der Luft getrocknet.

3.8. Immunhistochemie

Immunhistochemische Techniken werden angewandt, um Antigene in Zellen und Gewebeschnitten im mikroskopischen Bild nachzuweisen. Der Antigen-Nachweis erfolgt mit spezifischen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert sind.

3.8.1. Nachweis von nNOS in den atherosklerotischen Plaques

Das Vorhandensein bzw. Fehlen von nNOS in Plaques wurde an Paraffinschnitten von apoE-Ko- und apoE-Ko/nNOS-Ko-Tieren untersucht. Zunächst wurden die Gewebeschnitte entparaffinisiert. Hierzu wurden die Objektträger mit den Schnitten für jeweils 5 Minuten nacheinander in Xylol, in einem Xylol-Ethanol-Gemisch (1:1) und in 100%igen Ethanol belassen, danach für je 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe eingelegt (Ethanol: 100%, 95%, 75%, 50%) und anschließend in Aqua dest. gereinigt. Als Antikörper-gekoppeltes Enzym wurde Peroxidase verwendet. Zum Blockieren der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Objektträger für 20 Minuten in Methanol-H₂O₂ eingelegt.

Um eine unspezifische Adsorption des primären Antikörpers an Gewebebestandteile zu verhindern, wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegen Serum geblockt. Es folgte eine einstündige Inkubation des Gewebes mit dem Primärantikörper, einem im Kaninchen hergestellten polyklonalen anti-nNOS Antikörper. Der Primärantikörper wurde 1:250 verdünnt. Hiernach wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 5 Minuten in PBS (pH 7,4) gespült, gefolgt von der 30minütigen Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, ein von der Ziege gewonnener, gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper. Nach diesem Schritt wurden die Gewebeschnitte wieder dreimal mit PBS (pH 7,4) gespült. Nachfolgend wurde die ABC-Methode angewandt, welche die starke Affinität von Avidin(A) für Biotin(B) zur Kopplung(C) von enzymmarkiertem (Peroxidase) Avidin an biotinylierten Sekundär-Antikörper nutzt. Hierfür wurde das ABC-Reagenz für 30 Minuten auf den Gewebeschnitten belassen. Nach Spülen in PBS

(pH 7,4) wurde das Gewebe bei Raumtemperatur mit Diaminobenzidin (DAB) inkubiert. DAB ist das Substrat der Peroxidase und macht die Kopplung des peroxidasemarkierten Avidins an den Sekundärantikörper durch eine braune Färbung sichtbar. Abschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült, durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (Ethanol: 50%, 75%, 95%, 100%, Xylol + 100% Ethanol, Xylol), und mit Entellan eingedeckt.

3.8.2. Maus-Makrophagen/Monozyten-Antikörper

Der monoklonale Maus-Makrophagen/Monozyten-Antikörper weist Makrophagen und Monozyten im Gewebe nach.

Die in Azeton fixierten und luftgetrockneten Schnitte wurden in Immunhistochemie-Puffer 1 gespült, bevor sie für 30 Minuten in 0,3%igen H_2O_2 in Methanol eingelegt wurden. Nach weiteren 5 Minuten im Immunhistochemie-Puffer 1 erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mittels Kaninchenserum. Anschließend wurde das Gewebe 30 Minuten mit dem aus der Ratte gewonnenen Primärantikörper gegen Makrophagen und Monozyten inkubiert. Der Primärantikörper wurde 1:25 verdünnt. Nach erneutem Spülen mit Immunhistochemie-Puffer 1 folgte die 30minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der vom Kaninchen gewonnen und gegen Ratten-IgG gerichtet ist. Hiernach wurde erneut mit Immunhistochemie-Puffer 1 gespült und die unter 3.8.1 beschriebene ABC-Methode angewandt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun. Nach weiterem Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte mit Aqua Tex eingedeckt.

3.8.3. Anti- α -smooth-muscle-cell-actin-Antikörper

Mit Hilfe des monoklonalen anti- α -smooth-muscle-cell-actin-Antikörpers lassen sich glatte Gefäßmuskelzellen darstellen.

Die in Azeton fixierten und luftgetrockneten Schnitte wurden für 5 Minuten in Immunhistochemie-Puffer 2 eingelegt. Danach erfolgte das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1,5%igen Pferdeserum für 15 Minuten. Nach Abgießen des Blockserums erfolgte die 1-stündige Inkubation des Gewebes mit dem 1:60 verdünnten, Alkalische Phosphatase konjugierten Primärantikörper. Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte dreimal mit dem Immunhistochemie-Puffer 2 gespült. Anschließend

erfolgte die Zugabe des Alkalische-Phosphatase-Substrates („Vector®-Red-Substrate“) für insgesamt 60 Minuten. Nach Abspülen mit Leitungswasser wurde das Gewebe für 10 Minuten mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit Aqua Tex eingedeckt.

3.9. Histochemie

3.9.1. Hämatoxylin und Eosin Färbung

Bei der Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, welche die Zellkerne blauschwarz bis violett und zytoplasmatische Bestandteile rot färbt.

Die H&E-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die zuvor, wie unter 3.8.1 beschrieben, entparaffinisiert worden waren. Die Gewebeschnitte wurden für 3 Minuten mit Hämatoxylin gefärbt und kurz mit Aqua dest. abgewaschen. Danach erfolgte die Färbung mit Eosin für 30 Sekunden. Nach Entwässern der Gewebeschnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden diese mit Entellan eingedeckt.

3.9.2. Masson's Trichrom Färbung

Die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner färbt Zellkerne, Zytoplasma und Binde-, Stütz- und Muskelgewebe. Die drei Färbelösungen sind:

- Weigert's Hämatoxylin: Zellkerne blau-schwarz
- Biebrich Säurefuchsin-Lösung: Zytoplasma und Muskelgewebe rot
- Anilinblau: Kollagenfasern blau

Die Färbung wird nach einer Fixierung mit Bouin besonders intensiv.

Die Trichrom-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die zuvor, wie unter 3.8.1 beschrieben, entparaffinisiert worden waren. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden über Nacht in Bouin-Lösung eingelegt. Nach Abspülen der Objektträger mit Leitungswasser wurde für 5 Minuten mit Weigert's Hämatoxylin gefärbt und anschließend erneut mit Leitungswasser gespült. Es folgte eine Färbung mit

Biebrich Säurefuchsin-Lösung, die nach 5 Minuten mit Aqua dest. abgespült wurde. Um das Bindegewebe komplett zu entfärben und für die Gegenfärbung mit Anilinblau vorzubereiten, wurden die Objektträger für 10 Minuten in eine Lösung aus Molybdatphosphorsäure und Wolframatphosphorsäure eingelegt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Anilinblau. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit 1%iger Essigsäure gewaschen, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt.

3.9.3. Pikro-Sirius-Rot Färbung

Die Pikro-Sirius-Rot (PSR) Färbung ermöglicht die Darstellung der kollagenen Fasern in Gewebeschnitten.

Die PSR-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden für vier Stunden mit dem PSR-Reagenz gefärbt und anschließend kurz mit Aqua dest. abgewaschen.

3.10. Quantifizierung der kollagenen Fasern, der glatten Gefäßmuskelzellen und der Makrophagen in Gewebeschnitten

Für die Quantifizierung von kollagenen Fasern, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen in den Gewebeschnitten von Wildtyp- und Doppel-Knockout-Tieren wurden die gefärbten Schnitte photographiert, digitalisiert und in das Programm Image Pro Plus eingespeichert. Mit Hilfe dieses Programmes wurde die Gesamtfläche jedes einzelnen Plaques sowie die darin angefärbten Flächen mit kollagenen Fasern, glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen planimetriert und der prozentuale Anteil der Bestandteile berechnet.

3.11. Messung des Cholesterinspiegels

Der Gesamtcholesteringehalt der Plasma-Proben wurde spektrophotometrisch bestimmt. Hierzu wurden je 20µl Plasma in eine Mikrotiterplatte pipettiert und 200µl Cholesterolreagenz (Sigma Kit 352) dazugegeben. Als Kontrollen wurden 20µl HPLC-H₂O und Standardproben mit bekannter Cholesterinkonzentration von 100, 200 und

400mg/dl verwendet. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 490nm bis 595nm gemessen.

3.12. Lipoproteinprofilbestimmung mittels Fast Phase Liquid Chromatographie

Bei der Fast Phase Liquid Chromatographie (FPLC) dienen Superose-Partikel in einer Chromatographiesäule als stationäre Phase. Die Proben wurden vom Elutionspuffer mit konstanter Flussgeschwindigkeit über die Superose-Säule eluiert. Hierbei werden die verschiedenen Proteine aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit der stationären Phase nach ihrer Ladung, Hydrophobizität und Größe aufgetrennt.

Durchführung: Für die FPLC wurde den Tieren Blut entnommen und dieses für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Plasma wird in ein neues Eppendorf-Cup pipettiert und auf Eis gestellt. Für die Äquilibration der Superose-6-Säule wurden 10 Säulenvolumen PBS (pH 7,4) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1ml/min eluiert. Anschließend wurden 200µl der Plasmaprobe auf die Säule geladen und mit PBS (pH 7,4) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,3ml/min eluiert. 50 Fraktionen á 0,3ml wurden gesammelt.

3.13. Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung wurde im Labor von Dr. Kai Hu (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere intubiert und mit einer leichten Isofluran-Narkose anästhesiert. Nach Punktion der rechten Arteria carotis wurde ein Millar-Katheter eingeführt und der systolische und diastolische Blutdruck gemessen.

3.14. Statistische Auswertung

Statistisch ausgewertet wurden die sich wiederholenden Messungen mittels Stat View 4.51 mit Hilfe eines zweifaktoriellen ANOVA gefolgt vom Scheffe F-Test. Signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der Genotypen

Das Fehlen oder Vorhandensein von apoE-Wildtyp und -Knockout Allelen wurde mittels eines PCR-Assays von genomischer DNA untersucht. Wt und Ko Banden konnten aufgrund der vorhergesagten Größe des PCR-Produktes eindeutig identifiziert werden (Abbildung 1).

Mit Hilfe des Southern Blottings wurden die Nachkommen der verpaarten apoE-Ko/nNOS-heterozygoten Tiere auf das Fehlen oder Vorhandensein von nNOS-Wildtyp und nNOS-Knockout Allelen untersucht. Die Abgrenzung des Wt-Allels mit 8kb vom Ko Allel mit 6kb war eindeutig möglich (Abbildung 2).

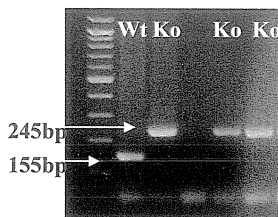


Abbildung 1:

Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von apoE-Wildtyp und apoE-Knockout Allelen

bp: Basenpaare

Wt: Wildtyp

Ko: Knockout

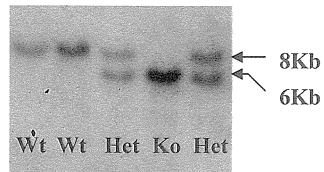


Abbildung 2:

Southern Blot zum Nachweis von nNOS-Wildtyp und nNOS-Knockout Allelen

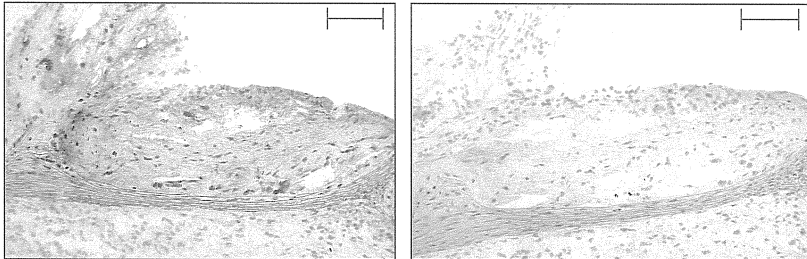
Wt: Wildtyp

Het: Heterozygot

Ko: Knockout

4.2. Immunhistochemie zum Nachweis der nNOS-Expression

Nach 14 Wochen „western-type“-Diät konnte in atherosklerotischen Plaques im Bereich der Aortenwurzel von apoE-Ko/nNOS-Wt Tieren nNOS-Expression in der Neointima nachgewiesen werden.



Primär- und
Sekundärantikörper

Nur Sekundärantikörper
(DAB-Substrat)

100µm
|-----|

Abbildung 3:

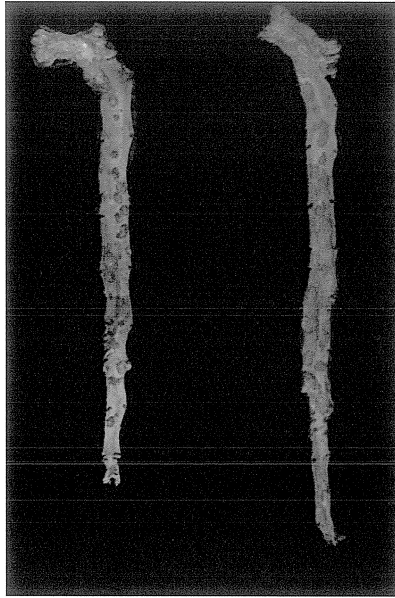
Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von nNOS in einer Aortenwurzel einer apoE-Ko/nNOS-Wt Maus nach 14 Wochen Diät. Das braune DAP Präzipitat markiert nNOS-positive Zellen in der Neointima.

Links: Primär- und Sekundärantikörper

Rechts: Nur Sekundärantikörper

4.3. Morphometrische Atherosklerosebestimmung

Tiere aller vier Gruppen entwickelten atherosklerotische Plaques an Prädilektionsstellen, wie zum Beispiel Gefäßabgängen, an denen ein gestörter laminarer Blutfluß herrscht.



apoE-Ko/nNOS-Wt apoE-Ko/nNOS-Ko

Abbildung 4:

Der Länge nach eröffnete und mit Sudan IV gefärbte Aorten von apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen nach 14 Wochen „western-type“- Diät. Dargestellt ist die luminale Seite mit rot angefärbten, lipidreichen atherosklerotischen Plaques.

Nach 14 Wochen „western-type“-Diät zeigten die männlichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere eine 66%ige Zunahme der %-Läsionsfläche ($15,56 \pm 1,14\%$, $n = 10$), verglichen mit apoE-Ko/nNOS-Wt Kontrolltieren ($9,35 \pm 1,32\%$, $n = 9$, $p = 0,002$). Weibliche apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere ($15,08 \pm 0,85\%$, $n = 11$) und apoE-Ko/nNOS-Wt Kontrolltiere ($12,63 \pm 0,7\%$, $n = 12$, $p = 0,31$) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der %-Läsionsfläche nach 14 Wochen (Abbildung 5a). Nach 24 Wochen „western-type“-Diät zeigte sich bei den weiblichen Tieren allerdings eine signifikante Zunahme der %-Läsionsfläche um 31,9% (apoE-Ko/nNOS-Ko: $31,8 \pm 2,3\%$, $n = 9$; apoE-Ko/nNOS-Wt: $24,6 \pm 1,0\%$, $n = 13$, $p = 0,0052$; Abbildung 5b).

Die Aortengesamtfläche zeigte in keiner der beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied (Tabelle 1).

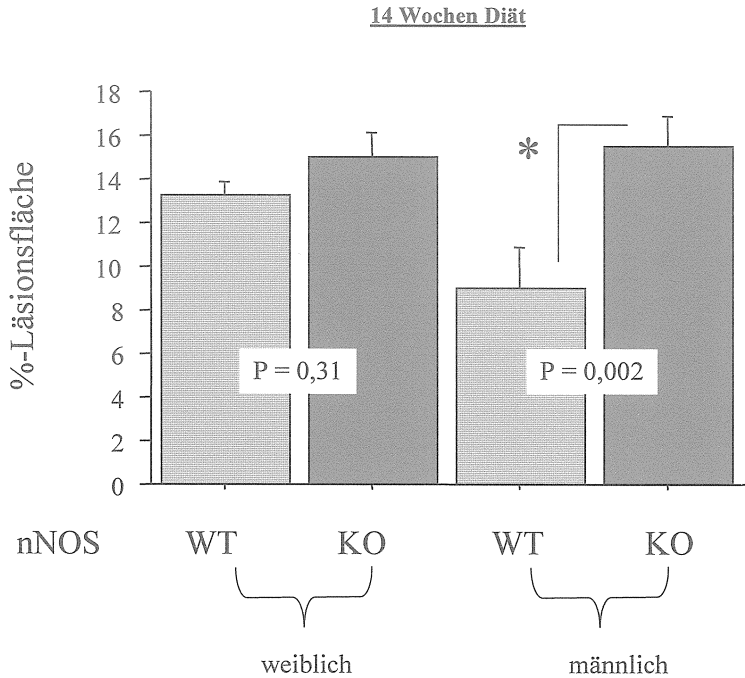


Abbildung 5a:

Mittlere Läsionsfläche dargestellt als %-Läsionsfläche der Aortengesamtfläche nach 14 Wochen „western-type“ Diät von männlichen und weiblichen apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen.

*signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

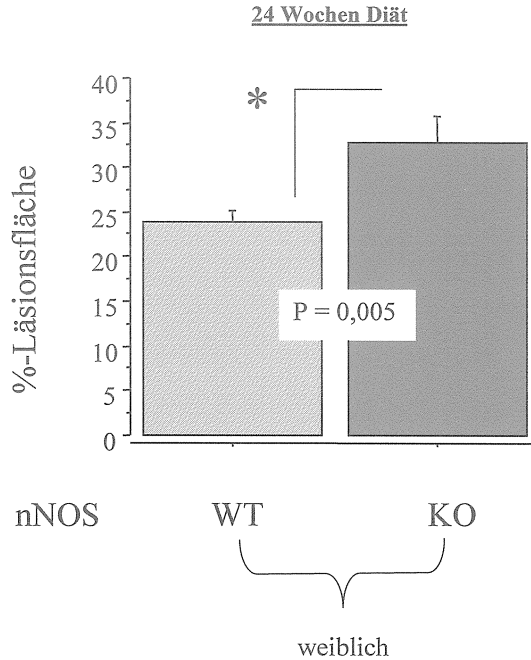


Abbildung 5b:

Mittlere Läsionsfläche dargestellt als %-Läsionsfläche der Aortengesamtläche nach 24 Wochen „western-type“ Diät von weiblichen apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen.

*signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$)

	Aortengesamtfläche	n	p-Wert
<u>Weiblich</u>			
apoE-Ko/nNOS-Wt	68,161 ± 1,753	11	0,9997
apoE-Ko/nNOS-Ko	67,753 ± 2,056	8	
<u>Männlich</u>			
apoE-Ko/nNOS-Wt	73,995 ± 3,190	5	0,9909
apoE-Ko/nNOS-Ko	75,666 ± 5,149	8	

Tabelle 1:

Gesamtfläche der Aorten von apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. n = Anzahl der Tiere. Alle Tiere wurden 14 Wochen mit der „western-type“ Diät gefüttert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren des gleichen Geschlechts.

4.4. Messung physiologischer Parameter

Zum Ausschluß systemischer Effekte der nNOS-Deletion auf die Atheroskleroseentwicklung wurden von männlichen und weiblichen Tieren beider Genotypen das Gesamtgewicht, das Gesamtcholesterin im Plasma, der mittlere arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz und die Lipoproteinprofile bestimmt.

Die Messungen für das Gesamtgewicht, das Gesamtcholesterin und die Herzfrequenz ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Der mittlere arterielle Blutdruck weiblicher apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere war signifikant niedriger im Vergleich zu den apoE-Ko/nNOS-Wt Tieren, während der mittlere arterielle Blutdruck der männlichen Tiere nicht verändert war (Tabelle 2 und 3).

	Gesamtgewicht (g)		p-Wert	Gesamtcholesterin (mg/dl)		p-Wert
		n			n	
<u>Weiblich</u>						
apoE-Ko/nNOS-Wt	26,18 ± 0,84	14	0,997	1060 ± 54,68	12	0,41
apoE-Ko/nNOS-Ko	25,81 ± 0,67	14		847 ± 102,39	8	
<u>Männlich</u>						
apoE-Ko/nNOS-Wt	34,14 ± 1,24	9	0,294	1040 ± 123,11	7	0,99
apoE-Ko/nNOS-Ko	30,74 ± 1,75	11		1080 ± 95,62	10	

Tabelle 2:

Gesamtgewicht und Gesamtcholesterin von apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. n = Anzahl der Tiere. Alle Tiere wurden 14 Wochen mit der „western-type“ Diät gefüttert. Es zeigten sich für keine der Parameter signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$).

	MAP (mmHg)		Hf / min		
		n	p-Wert	n	p-Wert
<u>Weiblich</u>					
apoE-Ko/nNOS-Wt	96,8 ± 2,07	11	0,0013	463 ± 52,4	10
apoE-Ko/nNOS-Ko	83,7 ± 2,86	9		517 ± 66,2	
<u>Männlich</u>					
apoE-Ko/nNOS-Wt	90,0 ± 5,94	8	0,86	480 ± 81,4	8
apoE-Ko/nNOS-Ko	89,4 ± 9,3	11		502 ± 64,7	

Tabelle 3:

Hämodynamische Parameter von apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. n = Anzahl der Tiere. Alle Tiere wurden 14 Wochen mit der „western-type“ Diät gefüttert. Die weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere hatten einen signifikant reduzierten mittleren arteriellen Blutdruck ($p \leq 0,05$), während die Herzfrequenz unverändert blieb.

Zum Ausschluß von Lipoproteinprofilveränderungen in den einzelnen Genotyp-Gruppen wurden die Lipoproteinprofile unter Verwendung der Größenausschlußchromatographie untersucht. In den eluierten Fraktionen wurden die Gesamtcholesterin- und die Triglycerid-Konzentration gemessen. Zwischen den beiden Genotypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die Gesamtcholesterin- und Triglyceridwerte. Die Lipoproteinprofile beider Genotypen stellten sich unverändert dar (Abbildung 6a, 6b).

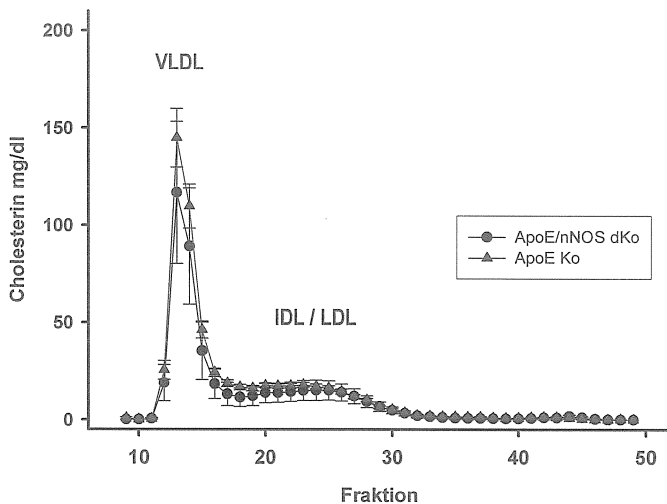


Abbildung 6a:

Messung der Cholesterinkonzentration pro eluierter Fraktion mittels Größenausschlußchromatographie. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

VLDL: very low density lipoproteins

IDL: intermediate density lipoproteins

LDL: low density lipoproteins

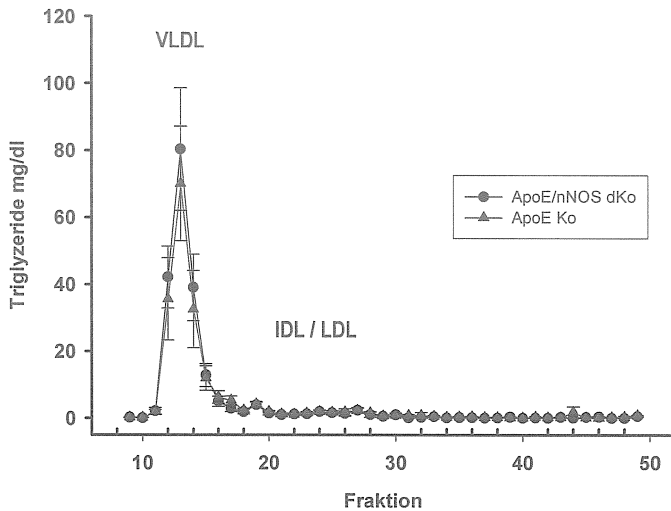


Abbildung 6b:

Messung der Triglyceridkonzentration pro eluierter Fraktion mittels Größenausschlußchromatographie. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

VLDL: very low density lipoproteins

IDL: intermediate density lipoproteins

LDL: low density lipoproteins

4.5. Histochemie und Immunhistochemie: Zusammensetzung der Läsionen

Um die Morphologie der Plaques zu beurteilen und Informationen über Unterschiede in der Zusammensetzung der Läsionen zu bekommen, wurden histochemische und immunhistochemische Färbungen an Paraffin- und Kryoschnitten vom Aortenbogen durchgeführt (Abbildung 7a/b). Alle untersuchten Tiere hatten komplexe atherosklerotische Läsionen entwickelt. Die Läsionen zeigten unterschiedlich stark ausgeprägte nekrotische Areale und Gehalt an fibrösem Material. Die Fläche der Pikrinsäure-positiven Areale der Plaques war zwischen gleichgeschlechtlichen Tieren beider Genotypen vergleichbar (Tabelle 4). In der immunhistochemischen Färbung zum Nachweis von Makrophagen fand sich eine starke Immunreaktivität in allen vier Gruppen, ohne einen Unterschied zwischen den beiden Genotypen (Tabelle 4). Die Färbung der glatten Gefäßmuskelzellen ergab eine starke Variabilität für jedes einzelne Tier, unabhängig vom Geschlecht und Genotyp (Tabelle 5). Die am stärksten α -smooth-muscle-cell-actin-positiven Plaques fanden sich in apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren (Abbildung 7b). Diese α -smooth-muscle-cell-actin positiven Läsionen waren faserreich und zeigten eine niedrige Anzahl infiltrierender Makrophagen.

	Kollagene Fasern		Makrophagen			
		n	p-Wert	n	p-Wert	
apoE-Ko/nNOS-Ko	38,2%±2,1 SE	19	0,94	46,4% ±2,6 SE	14	0,53
apoE-Ko/nNOS-Wt	38,0%±2,7 SE	19		49,7% ±3,9 SE	19	

Tabelle 4

	Glatte Gefäßmuskelzellen		
		n	p-Wert
apoE-Ko/nNOS-Ko	11,4%±3,1 SE	18	0,16
apoE-Ko/nNOS-Wt	6,16%±0,95 SE	14	

Tabelle 5

Tabellen 4 und 5:

Prozentuale Anteile der kollagenen Fasern, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen in Plaques von apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen. Werte als Mittelwert ± Standardabweichung. n = Anzahl der Plaques.

Zwischen gleichgeschlechtlichen Tieren beider Genotypgruppen fanden sich vergleichbare Anteile an kollagenen Fasern, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen.

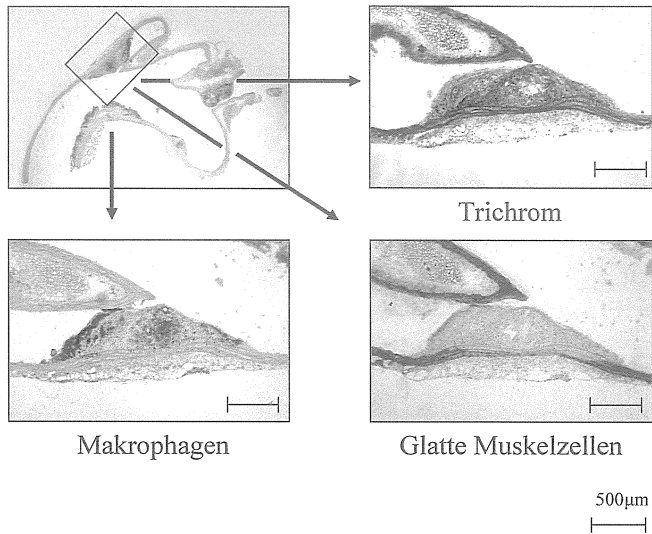


Abbildung 7a:

Immunohistochemische und histochemische Färbung von Aortenbogenschnitten der aopE-Ko/nNOS-Wt Mäusen

Oben links: Übersichtsbild

Oben rechts: Masson's Trichrom Färbung zeigt kollagenfaserreiche, komplexe Plaques mit zentraler Nekrose

Unten links: Immunohistochemische Färbung von Makrophagen (braun)

Unten rechts: Immunohistochemische Färbung glatter Gefäßmuskelzellen (rot)

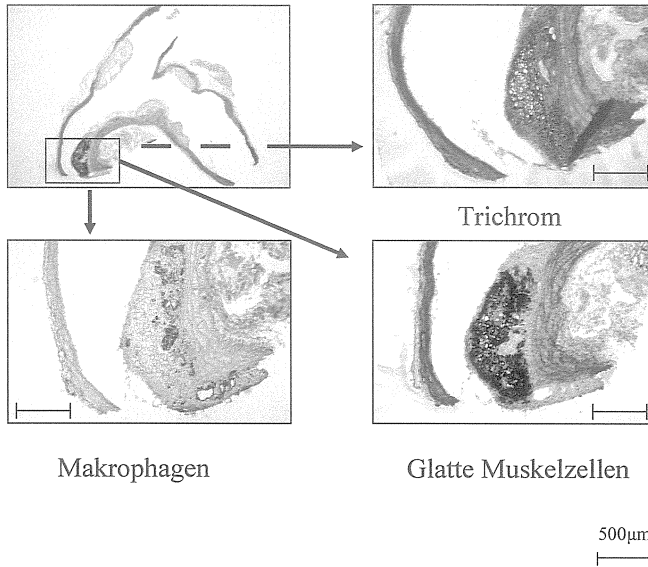


Abbildung 7b:

Immunhistochemische und histochemische Färbung von Aortenbogenschnitten der aopE-Ko/nNOS-Ko Mäusen

Oben links: Übersichtsbild

Oben rechts: Masson's Trichrom Färbung zeigt kollagenfaserreiche, komplexe Plaques mit zentraler Nekrose

Unten links: Immunhistochemische Färbung von Makrophagen (braun)

Unten rechts: Die immunhistochemische Färbung glatter Gefäßmuskelzellen (rot) zeigt eine betonte α -smooth-muscle-cell-Färbung in Plaques von dKo-Tieren

5. Diskussion

Die Familie der NOS besteht aus mindestens drei Isoformen, der endothelialen-, neuronalen- und induzierbaren NOS. Alle drei Isoformen synthetisieren NO aus dem Substrat L-Arginin unter Bildung von L-Citrullin. Trotz dieser Gemeinsamkeit unterscheiden sich die Isoformen in ihrer Lokalisation, der Menge des freigesetzten NO, sowie in ihrer Regulation und Enzymaktivität. Im Vergleich zu gesunden Gefäßen fanden Wilcox et al. in Endothelzellen atherosklerotischer Gefäße eine Abnahme der eNOS-Expression bei gleichzeitiger Zunahme der nNOS- und iNOS-Expression in Endothelzellen, Makrophagen und mesenchymähnlichen Intimazellen.²⁸

NO zeigt atheroprotektive Effekte, da es die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel, die Leukozytenadhäsion sowie die Thrombozytenaggregation hemmen kann.¹⁷⁻¹⁹

NO hat aber auch potentiell proatherogene Eigenschaften durch seine Reaktion mit Superoxid unter Bildung von Peroxynitrit. Letzteres ist ein starkes Oxidans und kann zur Freisetzung weiterer Sauerstoffradikale und Stickstoffradikale führen, die ebenfalls zelltoxisch wirken.^{13, 21, 24, 25} Hinzu kommt die Eigenschaft der einzelnen NOS, unter bestimmten Bedingungen, z.B. Substrat- oder Kofaktormangel, selber Superoxid anstelle von NO zu produzieren.⁵⁶⁻⁶¹ In Untersuchungen an apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen zeigte sich eine atheroprotektive Funktion der eNOS³²⁻³⁵ und eine proatherogene Funktion der iNOS.³⁶

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Fehlen der nNOS zu einer Zunahme der Plaqueeentwicklung führt und nNOS somit eine atheroprotektive Funktion hat.

5.1. Atheroskleroseentwicklung in apoE-Ko und apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen

Nach 14 Wochen Fütterung mit der „western-type“ Diät zeigten die männlichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere eine deutlich Zunahme der Atheroskleroseentwicklung um 66% im Vergleich zu männlichen apoE-Ko Mäusen. Die weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Zunahme der Läsionsfläche. Weil die geringere Zunahme der Läsionsfläche in weiblichen Tieren nach 14 Wochen Diät an einer unterschiedlichen Kinetik der Plaqueeentwicklung zwischen männlichen und

weiblichen Tieren liegen kann, wurden weibliche apoE-Ko/nNOS-Wt und apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere für 24 Wochen mit der „western-type“ Diät gefüttert. In der Tat zeigten apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere eine signifikante Zunahme der Läsionsfläche um 31,8% im Vergleich zu weiblichen apoE-Ko Tieren.

Die verzögerte Plaqueeentwicklung in den weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren im Vergleich zu männlichen apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen ist besonders interessant, weil sie im Gegensatz zur Plaqueeentwicklung in weiblichen apoE-Ko/nNOS-Wt Tieren steht, die schneller Plaques entwickeln als männliche apoE-Ko/nNOS-Wt Tiere (Abbildung 5a). Dieser Unterschied in der Plaquee-Progression zwischen weiblichen und männlichen apoE-Ko Tieren verschwindet mit der Zeit - eine Beobachtung, die mit früheren Untersuchungen von Kuhlencordt et al.³² und mit Ergebnissen von Caligiuri et al.⁶² übereinstimmt.

5.1.1. Reduzierter Blutdruck als mögliche Ursache der verzögerten Plaqueeentwicklung zwischen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren beider Geschlechter

Weibliche apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere zeigten einen reduzierten mittleren arteriellen Blutdruck im Vergleich zu männlichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren. Ein erhöhter Blutdruck stellt einen unabhängigen Risikofaktor der Atheroskleroseentwicklung³ dar, somit ist der reduzierte Blutdruck in diesen Tieren als Ursache der verzögerten Plaqueeentwicklung zu diskutieren.

5.1.2. Mögliche Ursachen des reduzierten Blutdruckes in weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren

Es ist bekannt, dass NO eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation spielt. Die Reduktion des Blutdruckes in weiblichen apoE-Ko/nNOS-Ko Mäusen erfolgt wahrscheinlich nicht auf Gefäßwandebene, da die nNOS vermittelte, vaskuläre NO-Produktion eine Vasodilatation bewirken sollte. In der apoE-Ko/nNOS-Ko Maus wäre in diesem Fall nach Deletion der nNOS eine Blutdrucksteigerung zu erwarten.

Möglicherweise könnte die nNOS-Deletion die zentrale Blutdruckregulation auf Barorezeptorebene oder durch endokrine Mechanismen beeinflussen. Im zentralen Nervensystem ist nNOS in den vasomotorischen Zentren exprimiert⁶³, wo ihr eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation über den Sympathikus zugeschrieben wird.

Auch andere neuronale NO-Effekte auf die Sympathikusfunktion werden durch die nNOS-abhängige NO-Produktion vermittelt.⁶⁴ Möglicherweise steigert das von nNOS synthetisierte NO im zentralen Nervensystem oder auf Barorezeptorebene die Sympathikusaktivität und führt so zu einem Blutdruckanstieg. Eine nNOS-Hemmung würde dann zum gegenteiligen Effekt führen, d. h. zu einer Blutdrucksenkung. Verschiedene Untersuchungen haben für unterschiedliche Tiermodelle inhibitorische und exzitatorische Effekte auf die Sympathikusaktivität ergeben. Das lässt vermuten, dass das von nNOS im zentralen Nervensystem freigesetzte NO Effekte hat, die von der jeweiligen Lokalisation der Freisetzung abhängig sind.^{64, 65}

nNOS wird außerdem in peripheren Nerven exprimiert⁶⁶, in denen das freigesetzte NO als Neurotransmitter fungiert und über eine Tonusminderung der glatten Gefäßmuskulatur den Blutdruck senkt.^{67, 68} In diesem Fall müsste man erwarten, dass eine nNOS-Inhibition im peripheren autonomen Nervensystem zu einem Blutdruckanstieg führt.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Rolle der nNOS in der Blutdruckregulation zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Es wird berichtet, dass eine akute Inhibition der nNOS keinen Effekt auf den Blutdruck hat.^{64, 69} Im Gegensatz dazu führte in einer Studie von Ollerstam et al. die chronische nNOS-Inhibition mittels 7-Nitroindazol zu einem Anstieg des Blutdruckes⁷⁰. Dieser Effekt wurde bei chronischem Mangel an nNOS in der nNOS-Ko Maus nicht beobachtet. Auf Grund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass von nNOS freigesetztes NO entweder keinen Effekt oder aber einen Blutdruck senkenden Effekt hat.

Allerdings konnten Kurihara et al. in eNOS-Ko Mäusen zeigen, dass die akute und chronische nNOS-Inhibition zu einer Blutdrucksenkung führt.⁶⁵ Nach diesen Ergebnissen hat die nNOS-abhängige NO-Produktion eine blutdrucksteigernde Wirkung, wenn die NOS-abhängige NO-Produktion kompromittiert ist. Da NO im Gefäßsystem -unabhängig von der synthetisierenden Isoform- eine Vasodilation hervorruft, vermuten Kurihara et al. den blutdrucksteigernden Effekt von nNOS auf der Ebene des zentralen Nervensystems oder der Barorezeptoren.

Zu den verschiedenen Möglichkeiten des Körpers, den Blutdruck zu regulieren, gehört auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Das Enzym Renin katalysiert die Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen. Das biologisch inaktive Angiotensin I wird durch eine Konvertase in das biologisch aktive Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II führt zu einer Katecholamin-, Aldosteron- und ADH-Freisetzung und konsekutiver Blutdrucksteigerung.

Es ist bekannt, dass NO an der Regulation der Reninsekretion beteiligt ist. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Änderungen in der NOS-Aktivität die Renin-Sekretion beeinflusst und es wird angenommen, dass NO eine stimulierende Rolle in diesem System spielt.⁷¹⁻⁷³ So konnte gezeigt werden, dass Macula densa Zellen, die eine wichtige Rolle in der Regulierung des präglomerulären Widerstandes spielen, nNOS exprimieren.^{74, 75} Die Vermutung liegt nahe, dass nNOS eine wichtige Mediatorrolle in der von der Macula densa abhängigen Renin-Sekretion spielt. In einer neuen Studie allerdings kommen Castrop et al. zu dem Ergebnis, dass NO die normale Funktion der Macula densa-abhängigen Renin-Sekretion aufrechterhält und diese nicht von einer NOS Isoform-spezifischen NO-Bildung abhängig ist.⁷⁶ Interessanterweise berichten diese Autoren über verminderte Plasma-Renin-Konzentrationen und eine reduzierte Basalrate der Reninsekretion in isolierten, perfundierten Nieren von nNOS-Ko Mäusen. Sollte also NO, gebildet durch alle NOS-Isoformen, für eine effiziente Funktion der Macula densa kontrollierten Reninsekretion nötig sein, könnte eine fehlende nNOS-Funktion zu einem verminderten Blutdruck beitragen.

Bereits in der Vergangenheit wurde in Untersuchungen die Tendenz zur Hypotension bei nNOS-Ko Mäusen im Vergleich zu nNOS-Wt Mäusen festgestellt. Allerdings liegen keine Informationen bezüglich des Geschlechts der verwendeten Tiere vor.^{77, 78} Ein Grund für diese Tatsache könnte in Unterschieden zwischen den oben erwähnten Studien liegen. Die von Castrop et al. verwendeten Mäuse hatten einen anderen genetischen Hintergrund als die eNOS-Ko Mäuse, die von Kurihara et al. untersucht worden waren. Kurihara verwendete SV129 Mäuse, Castrop et al. dagegen C57BL/6 Mäuse.

5.2. Morphologie der atherosklerotischen Plaques

Immunhistochemische und histochemische Färbungen wurden durchgeführt, um Informationen zur Morphologie der Plaques zu bekommen und Unterschiede in der Zusammensetzung der Plaques festzustellen. Alle untersuchten Tiere beider Geschlechter und beider Genotypen entwickelten komplexe atherosklerotische Läsionen. Diese Läsionen wiesen in unterschiedlich starkem Ausmaß nekrotische Areale mit darüber liegender fibröser Kappe auf. In beiden Geschlechtsgruppen fand sich eine starke Immunreaktivität für Makrophagen ohne einen deutlichen Unterschied zwischen den Genotypen.

Die stärkste α -Aktin-Färbung zum Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen fand sich in atherosklerotischen Plaques von apoE-Ko/nNOS-Ko Tieren. Dieser Befund erreichte jedoch wegen der großen intra- und interindividuellen Variabilität der α -Aktin-Färbung keine statistische Signifikanz. Der Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Mooradian und Morishita. Mooradian konnte zeigen, dass die kontinuierliche NO-Freisetzung die Proliferation glatter Muskelzellen unterdrückt.⁷⁹ Morishita wies in einer neueren Studie nach, dass Angiotensin II zu einer nNOS-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen führen kann und diese nNOS-Expression für eine Unterdrückung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen ausreichend ist.⁴⁵ Die stark α -Aktin positiven Plaques der apoE-Ko/nNOS-Ko Tiere waren faserreich, und es fand sich eine nur geringe Anzahl infiltrierender Makrophagen.

Wir vermuten daher, dass die Abwesenheit von nNOS keine generelle Proliferation der glatten Muskelzellen im Plaque verursacht, sondern dass nNOS der Proliferation entgegenwirkt, sobald diese durch lokale und systemische Faktoren ausgelöst wird.

6. Zusammenfassung

Thema dieser Arbeit war, die Rolle der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase in der spontanen Atheroskleroseentwicklung zu untersuchen. Die Untersuchung wurde an einem genetischen Modell, der Apolipoprotein E-Knockout und der Apolipoprotein E-Knockout/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase-Knockout Maus, durchgeführt.

Durch eine immunhistochemische Analyse konnte zunächst gezeigt werden, dass neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase in Plaques von Apolipoprotein E-Knockout Mäusen exprimiert wird.

Nach 14 Wochen Fütterung mit der ‚western-type‘-Diät zeigten männliche Apolipoprotein E-Knockout/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase-Knockout Tiere eine signifikante Zunahme der Plaquefläche, verglichen mit den Apolipoprotein E-Knockout Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu fand sich bei den weiblichen Apolipoprotein E-Knockout/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase-Knockout Tieren ein signifikanter Unterschied erst nach 24 Wochen Diät. Aortengesamtfläche, Körpergewicht und Plasmacholesterinspiegel waren zwischen gleichgeschlechtlichen Tieren der verschiedenen Genotypen unverändert. Der mittlere arterielle Blutdruck der weiblichen Apolipoprotein E-Knockout/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase-Knockout Tiere war signifikant reduziert. Dieser Befund könnte eine mögliche Erklärung für die verzögerte Plaqueentwicklung bei weiblichen Apolipoprotein E-Knockout/neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase-Knockout Tieren darstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Mangel an neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase zu einer deutlichen Zunahme der Atherosklerose führt, so dass ein atheroprotektiver Effekt der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase angenommen werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Ross R., Glomset J.A. „The Pathogenesis of Atherosclerosis.” The New England Journal of Medicine 1976; 295: 369-377, 420-425
2. Lusis A.J. “Atherosclerosis.” Nature 2000; 407: 233-241
3. Assmann G., Cullen P., Jossa F., Lewis B., Mancini M. „Coronary heart disease: reducing the risk.“ Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19:1819-1824
4. Libby P. “Changing concepts of atherogenesis.” J Int Med 2000; 247: 349-358
5. Ross R. „The Pathogenesis of Atherosclerosis – an update.” The New England Journal of Medicine 1986; 314: 488-500
6. Ross R. “Atherosclerosis: A Defense Mechanism Gone Awry.” American Journal of Pathology 1993; 143: 987-1002
7. Ross R. “Atherosclerosis – an inflammatory disease.” The New England Journal of Medicine 1999; 340: 115-126
8. Hansson G. K. “Immune mechanisms in atherosclerosis.” Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21:1876-1890
9. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.” Nature 1980; 373-376
10. Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G. “Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.” Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-9269
11. Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S. „Nitric oxide release accounts for the biological activity of the endothelium-derived relaxing factor.“ Nature 1987; 327: 524-526

12. Koshland D. E. "The Molecule of the Year" Science 1992; 258: 1861-1863
13. Lane P., Gross S. S. "Cell Signalling by Nitric Oxide." Seminars in Nephrology 1999; 19: 215-229
14. Wilcox J. N., Subramanian R. R., Sundell C. L., Pollock J. S., Harrison D. G., Marsden P.A. "Expression of Multiple Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Normal and Atherosclerotic Vessels." Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 1997; 17: 2479-2488
15. Bredt D. S., Snyder S. H. „Nitric Oxide: A Physiologic Messenger Molecule.“ Annu. Rev. Biochem. 1994; 63: 175-195
16. Michel T., Feron O. "Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How and Why?" J Clin Invest 1997; 100: 2146-2152
17. Marletta M. A. "Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis." Cell 1994; 78: 927-930
18. Kuhlencordt P. J., Gyurko R., Han F., Scherrer-Crosbie M., Aretz T. H., Hajjar R., Picard M. H., Huang P. L. "Coronary and Accelerated Aortic Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation and Ischemic Heart Disease in apoE/eNOS Double Knockout mice" Circulation 2001; 104: 448-454
19. Yogo K., Shimokawa H., Funakoshi H., Kandabashi T., Miyata K., Okamoto S., Egashira K., Huang P., Akaike T., Takeshita A. "Different vasculoprotective roles of NO synthase isoforms in vascular lesion formation in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: E96-E100
20. Rudic R. D., Shesely E. G., Maeda N., Smithies O., Segal S. S., Sessa W. C. "Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodelling." J Clin Invest 1998; 101: 731-736

21. Kawashima S., Yamashita T., Ozaki M., Ohashi Y., Azumi H., Inoue N., Hirata K., Hayashi Y., Itoh H., Yokoyama M. "Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodelling." Arterioscl Thromb Vasc Biol 2001; 21: 201-207
22. Kuhlencordt P. J., Chen J., Han F., Astern J., Huang P. L. "Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice" Circulation 2001; 103: 3099-3104
23. Chyu K. Y., Dimayuga P., Zhu J., Nilsson J., Kaul S., Shah P. K., Cercek B. "Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice" Circ Res 1999; 85: 1192-1198
24. Stamler J. S. "Redox Signaling: Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric Oxide" Cell 1994; 78: 931-936
25. Ignarro L. J., Byrns R. E., Wood K. S. "Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical." in Vanhoutte P.M. (ed) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*, New York, NY, Raven, pp 427-435, 1988
26. Furchgott R. F. "Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite." in Vanhoutte P.M. (ed) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*, New York, NY, Raven, pp 401-414, 1988
27. Radomski M. W., Palmer R. M., Moncada S. "Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway." Trends Pharmacol Sci 1991; 12: 87-88
28. Kubes P., Suzuki M., Granger D. N. "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4651-4655
29. Scott-Burden T., Vanhoutte P. M. "The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation." Circulation 1993; 87 (Suppl V): V51-V55

30. Beckman J. S., Koppenol W. H. „Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly.“ American Journal of Physiology 1996; 40: C1424-1437
31. Bredt D. S., Hwang P. M., Snyder S. H. „Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.“ Nature 1990; 347: 768-770
32. Habrecht B. G., Wang S. C., Simmons R. L., Billar T. R. “Cyclic GMP and guanylate cyclase mediate lipopolysaccharide-induced Kupffer cell tumor necrosis factor-alpha synthesis.” J Leukoc Biol 1995; 57: 297-302
33. Goss S. P., Hogg N., Kalyanaraman B. “The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein” J Biol Chem 1997; 272: 21647-21653
34. Beckman J. S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. “Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.” Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1620-1624
35. Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J. C., Smith C. D., Beckman J. S. “Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxid dismutase.” Arch Biochem Biophys 1992; 298: 431-437
36. Graham A., Hogg N., Kalyanaraman B., O’leary V., Darley-USmar V., Moncada S. “Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by macrophage scavenger receptor.” FEBS Lett 1993; 330:181-185
37. Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. “Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of nitric oxide and superoxide” Arch Biochem Biophys 1991; 288: 481-487
38. Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R., Snyder S. H. „Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.“ Nature 1991; 351: 714-718

39. Papapetropoulos A., Rudic R. D., Sessa W. C. "Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system." Cardiovascular Research 1999; 43: 509-520
40. Boulanger C. M., Heymes C., Benessiano J., Geske R. S., Lévy B. I., Vanhoutte P. M. „Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension." Circ Res 1998; 83: 1271-1278
41. Trambascia R. C., Fonseca P. M., Corat P. D. C., Moreno H., Saad M. J. A., Franchini K. G. "Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats." Hypertension 2001; 37: 1423-1428
42. Loesch A., Burnstock G. "Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in rat pulmonary artery and vein during postnatal development and ageing." Cell Tissue Res 1996; 283: 355-365
43. Schwarz P. M., Kleinert H., Förstermann U. „Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta." Arterioscl Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2584-2590
44. Buchwalow I. B., Podzuweit T., Böcker W., Samoilova V. E., Thomas S., Wellner M., Baba H. A., Robenek H., Schnekenburger J., Lerch M. M. „Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase." FASEB J 2002; 16: 500-508
45. Morishita T., Tsutsui M., Shimokawa H., Horiuchi M., Tanimoto A., Suda O., Tasaki H., Huang P. L., Sasaguri Y., Yanagihara N., Nakashima Y. "Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide." FASEB J 2002; 16: 1994-1996
46. Piedrahita J. A., Zhang S. H., Hagaman J. R., Oliver P. M., Maeda N. "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells" Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4471-4475
47. Knowles J. W., Maeda N. "Genetic modifiers of atherosclerosis in mice" Arteriosclero Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2336-2345

48. Yang R., Powell-Braxton L., Ogoawara A. K., Dybdal N., Bunting S., Ohneda O., Jin H. "Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice." Arteriosclero Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2762-2768
49. Huang P. L., Dawson T. M., Bredt D. S., Snyder H. S., Fishman M. C. „Targeted Disruption of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene“ Cell 1993; 75: 1273-1286
50. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. "Molekularbiologie der Zelle" 4. Auflage 2003 Wiley-VCH
51. Southern E. M. „Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.“ Journal of Molecular Biology 1975; 98: 503-517
52. Mullis K. B., Faloona F. A. „Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction.“ Methods Enzymol. 1987; 155: 335-350
53. Newton C. R., Graham A. „PCR“ Spektrum Akademischer Verlag 1997
54. Brown T. A. „Gentechnologie für Einsteiger“ Spektrum Akademischer Verlag 2002
55. Palinski W., Ord V. A., Plump A. S., Breslow J. L., Steinberg D., Witztum J. L. „ApoE-Deficient Mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondealdehyde-lysine in serum.“ Arteriosclerosis and Thrombosis 1994;14: 605-616
56. Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B. S. S., Karoui H., Tordo P., Pritchard K. A. "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9220-9225
57. Wang W., Wang S., Yan L., Yan L., Madara P., Cintron A. D. P., Wesley R. A., Danners R. L. „Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase.“ J Biol Chem 2000; 275; 16899-16903

58. Xia Y., Tsai A. L., Berka V., Berka V., Zweier J. L. "Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process." J Biol Chem 1998; 273: 25804-25808
59. Xia Y., Zweier J.L. "Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages." Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 6954-6958
60. Xia Y., Roman L. J., Masters B. S. S., Zweier J. L. "Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain." J Biol Chem 1998; 273: 22635-22639
61. Heinzel B., John M., Klatt P., Böhme E., Mayer B. „Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase.“ Biochem J 1992; 281: 627-630
62. Caligiuri G., Nicoletti A., Zhou X., Törnberg I., Hansson G. K. "Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice." Atherosclerosis 1999; 145: 301-308
63. Egberongbe Y. I., Gentleman S. M., Falkai P., Bogerts B., Polak J. M., Roberts G. W. „The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain.“ Neuroscience 1994; 59: 561-578
64. Zanzinger J., Czachurski J., Seller H. "Neuronal nitric oxide reduces sympathetic excitability by modulation of central glutamate effects in pigs." Circ Res 1997; 80: 565-571
65. Kurihara N., Alfie M. E., Sigmon D. H., Rhaleb N., Shesely E. G., Carretero O. A. "Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice." Hypertension 1998; 32: 856-861
66. Ceccatelli S., Lundberg J. M., Zhang X., Aman K., Hökfelt T. "Immunohistochemical demonstration of nitric oxide synthase in the peripheral autonomic nervous system." Brain Res 1994; 656: 381-395

67. Bult H., Boeckstaens G. E., Pelckmans P. A., Jordaens F. H., van Maercke Y. M., Herman A. G. "Nitric oxide is an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter." Nature 1990; 345: 346-347
68. Li C. G., Rand M. J. "Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide." Br J Pharmacol 1991; 102: 91-94
69. Pajewski T. N., DiFazio C. A., Moscicki M. S., Johns R. A. "Nitric oxide synthase inhibitors , 7-nitro Indazol and nitroG-L-arginine methyl ester, dose dependently reduce the threshold for isoflurane anesthesia." Anesthesiology 1996; 85: 1111-1119
70. Ollerstam A., Pittner J., Persson A. E. G., Thorup C. „Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of the nitric oxide synthase." J Clin Invest 1997; 99: 2212-2218
71. Chatziantoniou C., Pauti M. D., Pinet F., Dussaule J.-C., Ardaillou R. "Regulation of renin release is impaired after nitric oxide inhibition." Kidney Int 1996; 49: 626-633
72. Johnson R. A., Freeman R. H. "Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1994; 266: R1723-R1729
73. Scholz H., Kurtz A. "Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney." J Clin Invest 1993; 91: 1088-1094
74. Mundel P., Bachmann S., Bader M., Fischer A., Kummer W., Mayer B., Kriz W. „Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells." Kidney Int 1992; 42: 1017-1019
75. Wilcox C. S., Welch W. J., Murad F., Gross S. S., Taylor G., Levi R., Schmidt H. H. "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure" Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 11993-11997

76. Castrop H., Schweda F., Mizel D., Huang Y., Briggs J., Kurtz A., Schnermann J. "Permissive Role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion." Am J Physiol Renal Physiol 2004; 286: F848-F857
77. Huang Z., Huang P. L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M. C., Moskowitz M. A. "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase." Science 1994; 265: 1883-1885
78. Wang T., Inglis F. M., Kalb R. G. "Defective fluid and HCO₃⁻ absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase- knockout mice." Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: F518-F524
79. Mooradian D. L., Hutsell T. C., Keefer L. K. "Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro." J Cardiovasc Pharmacol 1995; 25: 674-678

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 14.11.1977
Geburtsort: Gelsenkirchen-Buer-Resse
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

SCHULBILDUNG

1984–1988 Katholische Grundschule in Gelsenkirchen-Resse
1988–1994 Max-Planck-Gymnasium Gelsenkirchen-Buer
1994–1996 Oakham Boarding School / England
06/1996 Schulabschluß an der Oakham Boarding School
A-Level: Biologie, Chemie, Mathematik, Deutsch
GCSE: Englisch
11/1997 Anerkennung der Allgemeinen Deutschen Hochschulreife durch die Bezirksregierung Düsseldorf

AUSBILDUNG

1996 – 1997 Universität Dortmund (Latein, Englisch, Deutsch, Geschichte)
09/1997 Latinum
09/1997 – 04/1998 Freiwilliges Soziales Jahr im Knappschaftskrankenhaus Bergmannsheil Gelsenkirchen-Buer
05/1998 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/2000 Ärztliche Vorprüfung
04/2001 Erstes Staatsexamen
09/2003 Zweites Staatsexamen
11/2004 Drittes Staatsexamen
11/2004 Approbation

PRAKTISCHES JAHR

13.10.03–31.01.04 Innere Medizin, Intermediate Care Station (Schwerpunkt Kardiologie) am Klinikum Coburg (Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg)
01.02.04–24.05.04 Chirurgie (Universitätsspital Zürich, Schweiz)
01.06.04–23.08.04 Anästhesiologie und Intensivmedizin (Kantonsspital Nidwalden, Schweiz)

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 01.04.2005 Abteilung für Innere Medizin, St. Marien Krankenhaus Ahaus

Stephanie B. + Jötten