

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

**Die Inhibition der Leukozyten – Endothelzell – Interaktionen
durch endotheliales Stickstoffmonoxid**

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

vorgelegt von
Angelika Schrötle
aus Sandberg

Würzburg, September 2009

Referent: Professor Dr. med. Georg Ertl

Koreferent: Professor Dr. med. Justus Müller

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2011

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

| | Seite | |
|-------|--|----|
| 1.0 | Einleitung | |
| 1.1 | Arteriosklerose: Bedeutung, Risikofaktoren, Pathogenese | 1 |
| 1.2 | Endotheliale Aktivierung, endotheliale Dysfunktion, oxidativer Stress | 3 |
| 1.3 | Stickstoffmonoxid (NO): Synthese und Funktion | 5 |
| 1.4 | Die Stickstoffmonoxid – Synthasen (NOS) | 7 |
| 1.5 | Die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) in kardiovaskulären Krankheiten | 8 |
| 1.6 | Ziel der Arbeit | 10 |
| 2.0 | Material und Methoden | |
| 2.1 | Material | 12 |
| 2.1.1 | Lösungen, Puffer, Chemikalien | 12 |
| 2.1.2 | Arbeits- und Verbrauchsmaterialien | 15 |
| 2.1.3 | Technische Geräte und Computer-Software | 16 |
| 2.1.4 | Mäuse, Generierung und Präparation | 17 |
| 2.2 | Methoden | 18 |
| 2.2.1 | Intravitalmikroskopie (IVM) | 18 |
| 2.2.2 | Histochemie und Immunhistochemie | 21 |
| 2.2.3 | Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation, komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese, Polymerase- kettenreaktion (PCR) | 23 |
| 2.2.4 | Real-time PCR | 26 |
| 2.2.5 | Western Blot | 28 |
| 2.2.6 | Duplex-Sonographie der Carotiden | 30 |
| 2.2.7 | Statistische Analysen | 30 |
| 3.0 | Ergebnisse | |
| 3.1 | eNOS-Deletion erhöht Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in Apolipoprotein E knockout (apoE ko)-Mäusen | 31 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.2 | Keine Beeinflussung der Thrombozyten-Adhäsion in apoE ko-Mäusen durch das Fehlen von eNOS | 31 |
| 3.3 | Der Mangel an eNOS verstärkt die endotheliale vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-Expression in Carotiden und Aorten | 33 |
| 3.4 | Beeinflussung der Makrophagen-Infiltration in die Gefäßwand durch endotheliales Stickstoffmonoxid | 36 |
| 3.5 | Unveränderter vaskulärer Gefäßwiderstands Index in eNOS defizienten apoE ko-Mäusen | 40 |
| 4.0 | Diskussion | 41 |
| 5.0 | Zusammenfassung | 49 |
| 6.0 | Literaturverzeichnis | 50 |

1.0 Einleitung

1.1 Arteriosklerose: Bedeutung, Risikofaktoren, Pathogenese

Arteriosklerose als eine entzündliche Erkrankung der größeren und mittleren Arterien stellt die Hauptursache von Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar und liegt in westlichen Ländern als Ursache der Hälfte aller Todesfälle zugrunde.^{1, 2} Während laut Angaben der WHO im Jahr 2004 weltweit rund 27 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen starben, wurden in Deutschland laut Angaben des Statistischen Bundesamtes, die sich jedoch ausschließlich auf Diagnosedaten der Krankenhäuser beziehen, im Jahr 2007 rund 159.000 Menschen mit Arteriosklerose stationär behandelt. Trotz der Tatsache, dass es sich hierbei um eine Erkrankung des höheren Lebensalters handelt, treten frühe arteriosklerotische Veränderungen, die Lipidflecken, regelmäßig bereits bei Kindern und Jugendlichen auf.^{3, 4}

In ihrer komplexen Ätiologie wird die Arteriosklerose von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, wobei das kardiovaskuläre Risiko eines Patienten mit der Zahl seiner Risikofaktoren zunimmt. Man unterscheidet dabei Faktoren mit einer genetischen Komponente, wie erhöhte LDL (Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin)- und erniedrigte HDL (High-Density-Lipoprotein-Cholesterin)-Spiegel, Hypertonie, Hyperhomocysteinämie, Diabetes, Adipositas und männliches Geschlecht und solche, die die Umwelt betreffen. Dazu zählen fettreiche Ernährung, Nikotinabusus (circa 30% aller Todesfälle im mittleren Lebensalter in entwickelten Ländern),⁵ Bewegungsmangel, oxidativer Stress sowie Infektions- bzw. chronisch entzündliche Krankheiten. Neuere Studien haben gezeigt, dass Entzündungsprozesse eine fundamentale Rolle in der Entwicklung von Arteriosklerose spielen^{6, 7} und dass Erreger wie *Chlamydia pneumoniae*⁸ und *Porphyromonas gingivalis*⁹ mit deren Entwicklung assoziiert sind.

Arteriosklerose präsentiert sich dabei als eine progressive Erkrankung charakterisiert durch die Akkumulation von Lipiden und fibrösen Elementen in den großen Arterien. Der Aufbau einer normalen Arterie besteht aus drei verschiedenen Schichten. Die innerste Schicht wird Intima genannt. Diese normalerweise sehr dünne Schicht setzt sich größtenteils aus Kollagen und Proteoglykanen zusammen und wird von einer einzelnen Endothelzellschicht bedeckt, die das Lumen der Arterie begrenzt. Die Media als mittlere Schicht, bestehend aus glatten Muskelzellen, wird gefolgt von der

Adventitia aus Bindegewebe, Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Der Ablauf der Arteriosklerosestadien, an deren Beginn ein Endothelschaden steht, wird durch den Begriff „response to injury“ beschrieben.¹ Während der frühen Arteriosklerosestadien akkumulieren LDL und andere Apolipoprotein B-enthaltende Lipoproteine in der Intima der Gefäßwand, wo sie als Ergebnis einer Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) einer oxidativen Veränderung unterliegen. Minimal-oxidiertes LDL wiederum stimuliert die Endothelzellen zur Produktion von Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Proteinen wie MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und Wachstumsfaktoren, z.B. M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) und führt damit zur Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten in die Gefäßwand. Als endotheliale Adhäsionsmoleküle für Leukozyten wirken dabei ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1), P-Selectin, E-Selectin, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), wobei der erste Schritt in der Adhäsion, das Rollen von Leukozyten entlang der endothelialen Oberfläche, vor allem über die Selectine vermittelt wird und das anschließende feste Anheften von Monozyten und T-Zellen an das Endothel über die Interaktion des Makrophagen-Integrins VLA-4 (very late antigen-4) mit endotheliale VCAM-1. Nach Bildung von hochoxidiertem LDL (Ox-LDL) durch die in Endothelzellen und Makrophagen produzierten ROS (Myeloperoxidase, Sphingomyelinase, sekretorische Phospholipase 2) wird Ox-LDL über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen aufgenommen, was in der Bildung sogenannter „foam cells“/Schaumzellen resultiert. Die Expression der Scavenger-Rezeptoren wird über Zytokine (TNF- α /tumor necrosis factor-alpha und IFN- γ /interferon-gamma) gesteuert. Obwohl diese frühen Plaques oder Schaumzellen, auch „fatty streaks“ oder frühe Lipidflecken genannt, keinerlei klinische Bedeutung besitzen, stellen sie die Vorläufer fortgeschrittener Läsionen dar. Als Prädilektionsstellen erweisen sich dabei Regionen mit veränderten Blutflusseigenschaften, wie Gabelstellen von Arterien und größere Gefäßkrümmungen.¹⁰ Im Menschen werden derartige Lipidflecken gewöhnlicherweise in der Aorta in der ersten Lebensdekade und in den Koronararterien in der zweiten Lebensdekade gefunden. Mit Fortschreiten der Krankheit sterben die lipidgefüllten Schaumzellen ab und bilden den nekrotischen Kern der Läsion. Gleichzeitig wandern glatte Gefäßmuskelzellen, stimuliert durch von Makrophagen und T-Zellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren, von der Media in die Intima ein, wo sie proliferieren und die sogenannten fortgeschrittenen Läsionen

bilden. Mit der Sekretion fibröser Elemente durch die glatten Muskelzellen entsteht eine fibröse Kappe, die den lipidreichen Kern umschließt. Initial wachsen die Läsionen in Richtung Adventitia, bis ein kritischer Punkt erreicht wird, an dem sie beginnen nach innen zu expandieren und das Gefäßlumen einzuengen. Die Degradation der Matrix durch verschiedene Proteinase und die weitere Ansammlung von extrazellulärer Matrix, Lipiden und nekrotischem Material führen schließlich zur Bildung komplizierter Läsionen. Abhängig von der Zusammensetzung unterscheidet man bei arteriosklerotischen Läsionen stabile und vulnerable Plaques. Vulnerable Plaques bestehen aus einer dünnen fibrösen Kappe und einer hohen Anzahl an Entzündungszellen und Lipiden, wohingegen stabile Plaques eine dicke fibröse Kappe, wenige Entzündungszellen und eine dichte extrazelluläre Matrix aufweisen. Die Ruptur der instabilen, vulnerablen Plaques führt zur Aktivierung der Blutplättchen mit Thrombusformation, welche durch den resultierenden Gefäßverschluss einen Herzinfarkt oder ischämischen Insult auslösen kann.²

1.2 Endotheliale Aktivierung, endotheliale Dysfunktion, oxidativer Stress

Das Endothel mit seinen interzellulären Tight Junctions fungiert normalerweise als selektiv permeable Membran zwischen Blut und Gewebe.² Hinreichend belegt ist seine außerordentliche Relevanz für die vaskuläre Homöostase¹¹ und damit für die Regulierung von Gefäßtonus, Nährstoffzufuhr, Entzündungs-, Thrombosierungs- und Gerinnungsvorgängen.¹² Neben vasoaktiven Substanzen (Prostaglandine, Endothelin, Angiotensin II, Stickstoffmonoxid) sezernieren Endothelzellen außerdem verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Unter „endothelialer Aktivierung“ versteht man die Veränderung der Genexpression auf inflammatorische oder biomechanische Reize. Physiologische Stimuli wie die Scherkräfte des vorbeifließenden Blutes, Katecholamine oder Thrombozytenprodukte stimulieren das Endothel zur Produktion vasoaktiver Substanzen, von denen NO mit seiner vasodilatierenden, den Scherkräften entgegenregulierenden Wirkung zu den wichtigsten zählt. Kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinträchtigen durch die Reduktion der NO-Synthese auf der einen Seite und durch die NO-Inaktivierung durch Sauerstoffradikale auf der anderen Seite die NO-Bioverfügbarkeit. Im Rahmen der endothelialen Aktivierung kommt es zur Bildung von Botenstoffen und

Adhäsionsmolekülen im Endothel und somit zur Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand, was den Ausgangspunkt der Arterioskleroseentstehung darstellt.¹³

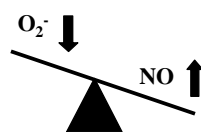
Als Folge der endothelialen Aktivierung kann die „endotheliale Dysfunktion“ entstehen, was Ku 1982 erstmalig als verminderte Thrombin-vermittelte Vasodilatation in ischämischen und reperfundierten Hundekoronararterien beschreibt.¹⁴ Diese paradoxe Antwort auf eine Acetylcholin-Gabe fand man anschließend auch in menschlichen, arteriosklerotisch veränderten Koronararterien,¹⁵ die man mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit erklärte.¹⁶ Daneben beschreibt der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ aber auch Pathomechanismen in der Arterioskleroseentwicklung, wie verstärkte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, die Thrombozytenaggregation und die erhöhte Endothelpermeabilität für Plasmabestandteile.¹⁷ Somit erweist sich die endotheliale Dysfunktion, die bereits bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren ohne strukturelle Veränderungen der Gefäßwand gefunden wird, als früher Marker der Arteriosklerose.¹⁸

Einen Beitrag zur endothelialen Dysfunktion leistet mitunter ein erhöhter oxidativer Stress. So fanden sich bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz eine erhöhte Aktivität von Xanthin-Oxidase, einem potenten radikalbildenden Enzym, und eine erniedrigte Aktivität der extrazellulären Superoxid-Dismutase, einem wichtigen antioxidativen Enzym.¹⁹ Reaktive Sauerstoffspezies werden generell als Stoffwechsel-Nebenprodukte²⁰ angesehen und oxidativer Stress als Ungleichgewicht zwischen der Produktion von Oxidantien und der antioxidativen Kapazität der Zelle.²¹ Im Zusammenhang mit der Arterioskleroseentwicklung wird eine durch Superoxidproduktion verursachte verstärkte Plättchenadhäsion und -aggregation²² und eine erhöhte Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion in hypercholesterolemischen Mäusen beobachtet.²³ Des Weiteren wird die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in Endothelzellen durch die Superoxid-Dismutase inhibiert,²⁴ was auf die Bedeutung von Superoxid in der Regulierung der Expression von Adhäsionsmolekülen schließen lässt. Zusätzlich fördert Superoxid die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand²⁵ und die LDL-Oxidation, was als chemotaktischer Faktor für Monozyten und T-Zellen wirkt und durch die Induktion der Cholesteroll-Akkumulation in Makrophagen zur Schaumzellbildung führt.²⁶

1.3 Stickstoffmonoxid (NO): Synthese und Funktion

1980 von Furchgott und Zawadzki als ein Molekül beschrieben, das von Endothelzellen freigesetzt wird und die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert,¹¹ wurde der „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) 1987 unabhängig voneinander von Louis J. Ignarro und Robert F. Furchgott mit NO gleichgesetzt.²⁷ NO als ein freies Radikal ist in vielfältiger Weise in komplexe Vorgänge der Zellen wie Proliferation, Protektion und Toxizität involviert. In Bezug auf die vaskuläre Homöostase sind seine wichtigsten Funktionen die Regulation des Gefäßtonus,²⁸ die Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen,²⁹ die Hemmung der Leukozyten-Adhäsion an das mikrovaskuläre Endothel³⁰ und die Reduktion der Thrombozyten-Aggregation.³¹ Damit übereinstimmend führt die pharmakologische Inhibition der NO-Produktion der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch L-Arginin-Analoga wie L-NAME (NG-Nitro-L-Arginin-Methylester) oder L-NMMA (NG-Monomethyl-L-Arginin) zu einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Adhäsion,³⁰ zur Expression endothelialer Oberflächen-Adhäsionsmoleküle, einschließlich VCAM-1 und E-Selektin,³² und zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität für Proteine.³³

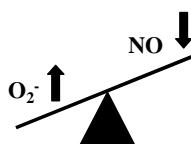
Physiologische Bedingungen:



Endotheliale Stickstoffmonoxid-Produktion verursacht:

- Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen
- Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen
- Inhibition der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen
- Inhibition der Thrombozyten-Aktivierung und –Aggregation

Arteriosklerose:



Verminderte Stickstoffmonoxid-Produktion verursacht:

- Endotheliale Dysfunktion
- Lipidoxidation
- Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit
- Verstärkte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen
- Thrombozyten-Aktivierung und –Aggregation

Abbildung 1: Die Rolle von NO und O₂ unter normalen und atherogenen Bedingungen

NO ist das Produkt der Stickstoffmonoxid-Synthasen, die L-Arginin durch Oxidation eines Stickstoffatoms der terminalen Guanidinogruppe in NO und Citrullin umwandeln. In einer komplexen Reaktion werden molekularer Sauerstoff und NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) als Kosubstrate und zahlreiche andere Redox-Kofaktoren einschließlich eisenhaltigen-(FeII)-Häms, reduzierter Thiole, FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), FMN (Flavin-Mononukleotid) und BH₄ (Tetrahydrobiopterin) benötigt.³⁴ NO vermittelt über die Stimulation der löslichen Guanylat-Zyklase einen cGMP-Anstieg (zyklisches Guanosin-Monophosphat), welches wiederum cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert, die über die Phosphorylierung verschiedener Proteine einen Abfall der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und so eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen herbeiführen. Daneben gilt NO als wichtiger Inhibitor der menschlichen Thrombozyten-Aggregation und Leukozyten-Adhäsion.³⁵ Letzteres bewirkt NO über die Induktion und Stabilisation von IκBα,³⁶ einem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor κB)³⁷, dessen Aktivierung Entzündungsvorgänge, u.a. die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, fördert. Der am besten bekannte antioxidative Effekt von Stickstoffmonoxid beruht auf der Verhinderung der Lipidoxidation und der Induktion der extrazellulären Superoxid-Dismutase, die den Superoxid-vermittelten Abbau von NO unterbindet.³⁵ Neben all den positiven existieren aber auch destruktive oxidierende und damit zelltoxische Eigenschaften von NO. Diese beruhen darauf, dass Stickstoffmonoxid in einer diffusionslimitierten Reaktion mit Superoxid zu Peroxynitrit (OONO-) reagieren kann. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ($6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)³⁸ ist schneller als Superoxid durch die Superoxid-Dismutase (SOD) abgebaut werden kann, weswegen die Geschwindigkeit der Superoxidbildung in der Gefäßwand, die unter arteriosklerotischen Bedingungen erhöht ist, die NO-Bioverfügbarkeit wesentlich beeinflussen kann. Peroxynitrit wiederum, als stärkeres Oxidans als Superoxid selbst, verändert durch Proteinnitrierung³⁹ und Lipidperoxidation⁴⁰ die Funktion von Biomolekülen und leitet durch die Oxidation von LDL und damit durch Initiierung der Schaumzellbildung einen frühen Arterioskleroseschritt ein. Obwohl Superoxid drei- bis sechsmal schneller mit NO als mit der Superoxid-Dismutase reagiert, wird die Peroxynitritbildung unter physiologischen Bedingungen durch die Tatsache, dass die Konzentration von SOD im intrazellulären Raum von Gefäßendothel- und glatten Muskelzellen bedeutend höher liegt als die von NO, gering gehalten. Im Gegensatz

dazu können sehr hohe NO-Konzentrationen, wie sie durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) Isoform produziert werden können, die Peroxynitrit-erzeugung fördern.³⁵

1.4 Die Stickstoffmonoxid – Synthasen (NOS)

Die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) werden in drei Isoformen unterteilt, wobei sich ihre Namen auf das Gewebe beziehen, in welchem sie zuerst identifiziert worden sind. Man unterscheidet die neuronale NOS (nNOS, NOS I, initial aus Nervenzellen kloniert), die induzierbare NOS (iNOS, NOS II, zuerst in einer Zelllinie immunoaktivierter Makrophagen entdeckt) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III, in vaskulärem Endothel identifiziert). Heute kennt man allerdings die weitaus größere Verbreitung der Isoformen, wie das Vorkommen von eNOS im vaskulären Endothel, in kardialen Myozyten, in Monozyten, in Makrophagen und im Gehirn (Hippocampus), das Vorhandensein von iNOS unter anderem in vaskulären glatten Muskelzellen, in Endothelzellen, in kardialen Myozyten und in inflammatorischen Zelllinien wie Leukozyten, Fibroblasten und Mastzellen³⁴ und die Expression von nNOS in Nervenzellen, in Epithelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Pankreasinseln, Skelettmuskelzellen, in menschlichen Keratinozyten und Retinagewebe.⁴¹ Die Isoformen werden in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten exprimiert und funktionieren als Dimere, zusammengesetzt aus zwei identischen Monomeren. Diese können funktionell aufgeteilt werden in eine C-terminale Reduktase-Domäne mit Bindestellen für je ein Molekül NADPH, FAD und FMN und eine N-terminale Oxygenase-Domäne mit Bindestellen für Häm, BH₄ und das Substrat L-Arginin. Zwischen diesen beiden Regionen liegt die Calmodulin-Bindedomäne, die eine wichtige Rolle in Struktur und Funktion der Enzyme spielt.⁴² Die endotheliale und neuronale NOS werden konstitutiv exprimiert und synthetisieren eine moderate Menge an NO. Für die Bindung der konstitutiven NOS-Isoformen eNOS und nNOS an das Ca²⁺-Regulatorprotein Calmodulin und damit für deren volle Aktivierung werden erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen benötigt, womit die NO-Produktion durch diese Isoformen über die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration reguliert wird.³⁴ Im Gegensatz dazu ist die iNOS-Expression unter basalen Bedingungen nicht nachweisbar, wird durch proinflammatorische Zytokine oder mikrobielles Endotoxin induziert⁴³, woraufhin sie sehr große, potentiell zytotoxische

NO-Mengen freisetzen kann, und ist nicht Ca^{2+} -abhängig. Dies liegt daran, dass iNOS Calmodulin sogar unter niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen mit sehr hoher Affinität binden kann.³⁴ In arteriosklerotischen Plaques werden alle drei NOS-Isoformen exprimiert.⁴⁴ Darüber hinaus können alle drei Isoformen bei Substrat- bzw. Kofaktorenmangel Superoxid an Stelle von NO produzieren, was man als Entkopplung der Enzyme bezeichnet.⁴⁵⁻⁴⁷ Während nNOS und eNOS als atheroprotektiv angesehen werden und die Arterioskleroseentwicklung signifikant inhibieren,^{48, 49} ist iNOS durch ihre enormen Mengen der NO-Produktion zwar von großer Relevanz in der Immunabwehr von Tumorzellen und Pathogenen⁵⁰, trägt aber zur Gewebeschädigung bei chronischen Entzündungen bei und verstärkt Arteriosklerose.^{51, 52} Aufgrund der Veränderungen in der Genexpression und der alternativen Produktion von NO und Superoxid kann die Rolle der NOS-Isoformen in der Arteriosklerose nur schwer vorhergesagt werden. So könnte entweder die NO-Produktion in Arterioskleroseplaques wegen einer ausgedehnten iNOS und nNOS-Expression erhöht sein⁴⁴ oder die NO-Bioverfügbarkeit durch verstärkten oxidativen Stress aufgrund einer gesteigerten Peroxynitritbildung durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid reduziert sein.³⁸

1.5 Die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) in kardiovaskulären Krankheiten

Die eNOS ist die Hauptquelle der endothelialen NO-Produktion im gesunden Gefäßsystem. Chronische Scherkraft⁵³ und körperliches Training⁵⁴ induzieren die eNOS-Transkription und stabilisieren ihre mRNA (messenger RNA). eNOS ist lokalisiert in sackförmigen Einbuchtungen der Plasmamembran, den sogenannten Caveolae. Unter basalen Bedingungen inaktiv an Caveolin-1 gebunden, kommt es durch Ca^{2+} -Einstrom zur eNOS-Aktivierung.⁵⁵ Dabei ist eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung alleine nicht ausreichend zur Beeinflussung der Enzymaktivität, weil die Bindung von Calmodulin und der Elektronenfluss von der Reduktase- hin zur Oxygenase-Domäne des Enzyms von Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung abhängig ist. Die Phosphorylierung zweier Aminosäuren, nämlich von Serin 1177 und von Threonin 495, scheint in der Regulation der eNOS-Aktivität von besonderer Bedeutung zu sein, wobei die Phosphorylierung von Ser1177 eNOS aktiviert und die Phosphorylierung von Thr495 die eNOS-Aktivität abschwächt.

Diese Phosphorylierung vermitteln zum einen biomechanische Stimuli, also die Scherkraftexposition des Endothels, zum anderen biochemische Reize wie Wachstumsfaktoren (VEGF/vascular endothelial growth factor) und Hormone (Östrogen, Insulin, Bradykinin).⁵⁶ Der Transformierende Wachstumsfaktor- β /TGF- β und der Tumornekrosefaktor- α /TNF- α nehmen dagegen Einfluss auf die mRNA-Level von eNOS. Während TGF- β die eNOS-mRNA und -Expression induziert,⁵⁷ vermindert TNF- α die eNOS-mRNA durch verstärkten mRNA-Abbau.⁵⁸

Wie bereits unter 1.3 erwähnt, reguliert das von eNOS gelieferte Stickstoffmonoxid Gefäßtonus und Blutdruck und verhindert durch seine anti-atherogenen Eigenschaften die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Thrombozyten-Aggregation und Leukozyten-Adhäsion. In arteriosklerotischen Läsionen findet sich eine verminderte eNOS-Expression.^{44, 59} Daneben ist eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit assoziiert mit einer Reihe kardiovaskulärer Krankheiten wie arterieller Hypertonie,⁶⁰ Diabetes mellitus⁶¹ und Hypercholesterinämie⁶² sowie mit Ischämie-Reperfusion-Bedingungen.¹⁶ Zusätzlich führt eine Deletion von eNOS in hypercholesterinämischen apoE ko-Mäusen zu einer verstärkten Ausprägung arteriosklerotischer Läsionen.⁴⁸ Ursächlich für eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit kann eine reduzierte eNOS-Expression,⁴⁴ ein Mangel an Substrat oder Kofaktoren oder ein beschleunigter NO-Abbau durch freie Sauerstoffradikale (ROS) sein.⁶³ Einer der wichtigsten Mechanismen, die in einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit resultieren, ist dabei das Entkoppeln von eNOS. Die eNOS vermittelte Superoxidproduktion scheint über die Oxygenase-Domäne zu geschehen, ist abhängig von Calcium/Calmodulin und wird eher durch Tetrahydrobiopterin-Mangel, hervorgerufen zum Beispiel durch BH₄-Oxidation,⁶⁴ als durch L-Arginin-Defizienz ausgelöst.⁴⁶

Viele Studien belegen den kardioprotektiven Effekt von eNOS. eNOS-Defizienz resultiert beispielsweise in einer Proliferation der Neointima,⁶⁵ die chronische eNOS-Überexpression im Endothel reduziert die Leukozyten-Infiltration, die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 und verhindert die Verdickung der Neointima und Media in einem Carotiden-Ligaturmodell, was auf die Relevanz von eNOS für die vaskuläre Integrität hinweist.⁶⁶ Die gezielte Überexpression von eNOS im Gefäßendothel von Mäusen verbessert drastisch das Überleben bei kongestiver Herzinsuffizienz⁶⁷ und senkt die myokardiale Infarktgröße.⁶⁸ Weitere Belege, die für die Prävention von Arteriosklerose durch eine funktionell aktive eNOS sprechen, werden durch die

Tatsache geliefert, dass Aorten-Transplantate eNOS exprimierender Spender in eNOS defiziente Empfängertiere vor der Entwicklung von Transplantat-Arteriosklerose schützen⁶⁹ und die eNOS-Deletion in apoE ko-Mäusen in einer beschleunigten Plaquebildung mündet, wobei zusätzlich vaskuläre Komplikationen (abdominale Aortenaneurysmen, Aortendissektionen, distale koronare Herzkrankheit) zu finden sind.⁴⁸ Diese apoE/eNOS double knockout (apoE/eNOS dko)-Mäuse leiden zudem an Hypertonie, kardialer Hypertrophie und einer verschlechterten linksventrikulären Funktion. Im Gegensatz zu alledem zeigt sich in einer neueren Studie, dass die chronische Überexpression von eNOS Arteriosklerose unter Hypercholesterinämie nicht inhibiert, sondern verstärkt.⁷⁰ Als potenzieller Mechanismus hierfür wird die eNOS-Entkopplung mit daraus folgender Superoxidbildung genannt, welche durch BH₄-Supplementation vermindert wird, was gleichzeitig auch die Läsionsfläche reduziert.⁷⁰

1.6 Ziel der Arbeit

Endotheliales NO gilt als wichtiger Inhibitor der L/E (Leukozyten/Endothelzell)-Interaktionen im mikrovaskulären Gewebe und repräsentiert damit einen potenziellen Mechanismus zum Schutz vor Arteriosklerose. Ergebnisse von Studien beweisen, dass die pharmakologische Hemmung der NO-Produktion eine erhöhte Leukozyten-Adhäsion an das mikrovaskuläre Endothel bewirkt³⁰ und die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle verstärkt³². In gleicher Weise zeigen eNOS ko-Mäuse einen Anstieg der L/E-Interaktionen des Mesenteriums.⁷¹ Auch apoE ko-Tiere weisen im Vergleich zu C57BL/6-Tieren am Endothel der Carotis vermehrt L/E-Interaktionen auf.⁷² Inwieweit eNOS aber die L/E-Interaktionen bei der sich spontan entwickelnden Arteriosklerose beeinflusst, wurde bis jetzt nicht direkt untersucht.

Ähnlich verhält es sich mit den P/E-Interaktionen (Plättchen/Endothelzell-Interaktionen). Es ist bekannt, dass NO die Plättchen-Aktivierung und -Aggregation reguliert und diese die Arterioskleroseentstehung fördern.⁷³ In hypercholesterinämischen Mausmodellen ereignet sich die Plättchen-Adhäsion an das Endothel noch bevor sichtbare arteriosklerotische Plaques entstehen. Die Thrombozyten heften sich dabei über Glykoproteine (GP) an den endothelialen Von-Willebrand-Faktor, weswegen es nicht verwundert, dass die Blockierung von GPIIb/IIIa die Ausbildung von Läsionsflächen in apoE ko-Mäusen reduziert.⁷² Ob allerdings

eNOS Einfluss auf die P/E-Interaktionen in der Arteriosklerose nimmt, ist bislang unbekannt.

Um diese Fragen zu klären, wurden in unserer Arbeitsgruppe eNOS ko-Mäuse (eNOS-Gen inaktiviert) mit spontan arteriosklerotischen apoE ko-Mäusen gekreuzt und so apoE/eNOS dko-Tiere erzeugt. Dies erlaubt es, den Beitrag von eNOS in der Diät induzierten Arteriosklerose zu untersuchen. Apolipoprotein E (apoE) spielt als Bestandteil von Chylomikronen, VLDL (very low density lipoprotein) und HDL eine zentrale Rolle im Lipoproteinmetabolismus und das vor allem in Hinblick auf den reversen Cholesterintransport.⁷⁴ Die Plasmacholesterinspiegel von apoE ko-Mäusen liegen vier- bis fünfmal höher als bei normalen Mäusen. Deswegen entwickeln Mäuse, eine gewöhnlich gegen Arteriosklerose resistente Spezies, mit genetischer Deletion von apoE spontan arteriosklerotische Plaques, welche denen von Menschen vergleichbar sind.⁷⁵ Durch Zufuhr einer „western-type“-Diät (42% der Kalorien von Fett, 0,15% Cholesterol) kann die Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen zusätzlich beschleunigt werden.

2.0 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen, Puffer, Chemikalien

Intravitalmikroskopie (IVM)

Midazolam 5 mg/kg KG: Ratiopharm, Ulm, Deutschland.

Medetomidin 0,5 mg/kg KG: Pfizer, Berlin, Deutschland.

Fentanyl 0,05 mg/kg KG: CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland.

Fluorochrom carboxyfluorescein diacetat succinimidyl Ester (CFSE): Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

Rhodamin 6G: Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

Immunhistochemie

Avertin (0,5 ml, i.p.): Fluka, Hannover, Deutschland.

Heparin (1000 U/ml): Ratiopharm, Ulm, Deutschland.

Azeton: J.T. Baker, Deventer, Niederlande.

PBS (Phosphate Buffered Saline/Phosphat-gepufferte Salzlösung, 9,55 g PBS wurden in einem Liter MilliQ Wasser gelöst, um die Arbeitslösung zu erhalten): Biochrom AG, Berlin, Deutschland.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂): Sigma, Steinheim, Deutschland.

Methanol: Sigma, Steinheim, Deutschland.

Blockierlösung „Antibody Diluent“: DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland.

Antikörper:

1. Makrophagen-Antikörper: Monoklonaler Ratten anti-Maus Makrophagen/Monocyten Antikörper (MOMA-2), MAB 1852, 0,5 mg/ml, Verdünnung 1:25, Chemikon Int, Temecula, USA.

1. VCAM-Antikörper: gereinigter Ratten anti-Maus Antikörper CD 106 (VCAM-1), 31,25 µg/ml, Verdünnung 1:50, BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland.

2. Makrophagen/VCAM-Antikörper: Biotinylierter anti-Ratten IgG Antikörper, hergestellt in Kaninchen, 0,5 mg/ml, Verdünnung 1:50, Vector, Burlingame, USA.

Vectastain ABC-Kit: Vector Laboratories, Burlingame, USA.

DAB Peroxidase Substrat Kit: Vector Laboratories, Burlingame, USA.

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin (6 g): Roth, Karlsruhe, Deutschland; Natriumjodid (1 g): Merck, Darmstadt, Deutschland; Aluminium Kalziumsulfat (250 g): Merck, Darmstadt, Deutschland; Chloralhydrat (250 g): Merck, Darmstadt, Deutschland; Zitronensäure (5 g): Merck, Darmstadt, Deutschland. Alle diese Reagenzien wurden in fünf Liter destilliertem Wasser gelöst.

Oil Red O

Oil Red O: Sigma, Steinheim, Deutschland.

Isopropanol: Sigma, Steinheim, Deutschland.

RNA-Isolation, cDNA-Synthese, Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Absolutely RNA Miniprep Kit (RNase-free DNase I, High-Salt Wash Buffer, Low-Salt Wash Buffer, β -Mercaptoethanol): Stratagene, La Jolla, USA.

Ethanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande.

First Strand cDNA Synthesis Kit #K1612: Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland.

dNTP Mix 10 mM: Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland.

Taq DNA Polymerase (500 U, 5u/ μ l) mit 10x PCR Puffer und $MgCl_2$ 25 mM: Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland.

HPLC- H_2O : AppliChem, Darmstadt, Deutschland.

Oligonukleotid-Primer: TIB Molbiol, Berlin, Deutschland.

VCAM-1 sense: 5'-CTT GTG TTG AGC TCT GTG GGT TT-3'

VCAM-1 antisense: 5'-CAA TCT CCA GAT GGT CAA AGG GAT A -3'

CD14 sense: 5'- TAC CGA CCA TGG AGC GTG TG-3'

CD14 antisense: 5'-GCC GGT TAC CTC GAG ATT TT-3'.

Biozym Sieve GP Agarose, Biozym LE GP Agarose: Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland.

10x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer): Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

Ethidiumbromid (10 mg/ml): Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA.

100 bp Plus DNA Ladder Gene Ruler (50 μ g, 0,5 μ g/ μ l; 4 μ l Marker + 3 μ l Ladepuffer + 13 μ l HPLC- H_2O): Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland.

Real-time PCR

Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

Primer:

Siehe PCR

HPRT sense: 5'- GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GT-3'

HPRT antisense: 5'- CCA CAG GAC TAG AAC ACC TGC-3'.

Sonden (X=TAMRA): TIB Molbiol, Berlin, Deutschland.

VCAM-1: 5'-6FAM- CTG TGC AGT TGA CAG TGA CAG GTC TCC C XT --PH

CD14: 5'-6FAM –TGT TGC TTC TGG TGC ACG CCT CT –TMR

HPRT: 5'-6FAM-CTC GTA TTT GCA GAT TCA ACT TGC GC XT –PH.

Cloned murine HPRT (10⁸ Kopien/ml): Gen Express, Berlin, Deutschland.

Aqua ad iniectabilia Delta Select 100 ml: Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland.

Western Blot

Lysis Puffer „Cell Lysis Buffer (10x)“: Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland.

Protease-Inhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid): Roth, Karlsruhe, Deutschland.

BCA Protein Assay Kit: Pierce, Perbio Science GmbH, Bonn, Deutschland.

Trenngel (7%, ges. 20 ml): Acrylamid + Bisacrylamid 30% (4,7 ml): Bio-Rad, München, Deutschland; 3 M Puffer B (pH 8,9, 2,5 ml); SDS 10% (0,2 ml): Roth, Karlsruhe, Deutschland; Aqua destillata (12,4 ml); Temed (20 µl): Sigma, Steinheim, Deutschland; APS 10% (0,2 ml): Sigma, Steinheim, Deutschland.

Puffer B: 36,3 g Tris (3 M): Roth, Karlsruhe, Deutschland; 0,8 g SDS (4 ml von 20% SDS): Roth, Karlsruhe, Deutschland; Lösung in 100 ml H₂O (pH 8,9).

Sammelgel (ges. 10 ml): Acrylamid + Bisacrylamid 30% (1 ml); 0,5 M Puffer A (pH 6,7, 1,25 ml); SDS 10% (0,1 ml); Aqua destillata (7,75 ml); Temed (10 µl); APS 10% (0,4 ml).

Puffer A: 6,05 g Tris (0,5 M); 0,4 g SDS (2ml von 20% SDS); Lösung in 100 ml H₂O (pH 6,7).

10x Elektrophorese-/Running-Puffer (500 ml, pH 8,3): 0,25 M Tris 15,15 g; 1,92 M Glycin 72 g; Sigma, Steinheim, Deutschland; SDS 1% (25 ml von 20% SDS).

Blue Loading Buffer Pack: Cell Signaling Technology/New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland.

Proteinmarker „Precision Plus Protein Standards“, Dual Color: Bio-Rad, München, Deutschland.

10x Transfer-/Blotting-Puffer (500ml, pH 8,3): 0,25 M Tris 15,15 g; 1,92 M Glycin. (Arbeits-Blotting-Puffer: 100 ml 10x Blotting-Puffer, 200 ml Methanol, H₂O bis 1 Liter).

10x TBST: Tris 12,1 g; NaCl 87,7 g: Sigma, Steinheim, Deutschland; Tween-20 5 ml: Sigma, Steinheim, Deutschland. Bis zu 1 Liter mit H₂O aufgefüllt.

TBST (pH 8): 10 mM Tris, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween-20.

Blockpuffer: TBST + 5 % Magermilchpulver: Bio-Rad, München, Deutschland.

Antikörper:

1. Antikörper VCAM-1: 0.5 µg/ml Ziege anti-Maus VCAM-1 Antikörper: R&D systems, Minneapolis, USA.

2. Antikörper VCAM-1: 400 µg/ml Esel anti-Ziege IgG-Antikörper: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA.

1. Antikörper α -Actin: 200 µg/ml Ziege anti Actin Antikörper: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA.

2. Antikörper α -Actin: 400 µg/ml Esel anti-Ziege IgG-Antikörper: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA.

2.1.2 Arbeits- und Verbrauchsmaterialien

Pinzetten: Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland.

Scheren: Akula, Lauf an der Pegnitz, Deutschland.

Omnifix-F 1ml „Einmal-Feindosierungsspritze: Braun, Melsungen, Deutschland.

Spritzen BD Discardit II 10 und 50 ml: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland.

Flüssigstickstoff: Linde, Pfungen, Schweiz.

RNAlater RNA Stabilization Reagent 50ml: Qiagen, Hilden, Deutschland.

Tissue-Tek: Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande.

Aquatex: Merck, Darmstadt, Deutschland.

Objektträger „Menzel-Gläser Superfrost Plus“: Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland.

Deckgläser: Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland.

Pipetten „pipetman“: Gilson International, Limburg-Offheim, Deutschland.
Pipettenspitzen „ultratip“: Greiner bio-one, Solingen, Deutschland.
PP-Test tubes „cellstar“, 15 und 50 ml: Greiner bio-one, Solingen, Deutschland.
Faltenfilter (240 mm): Hartenstein, Würzburg, Deutschland.
Petrischalen aus Polystyrol 55 x 15 mm: Hartenstein, Würzburg, Deutschland.
Mörser, Mikromörser: Roth, Karlsruhe, Deutschland.
PCR tubes: PCR-Softstrips 0,2 ml farblos: Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland.
Reaktionsgefäße mit anhängendem Deckel/Eppendorf tubes: Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland.
iCycler iQ PCR Plates, 96 well (0,2 ml): Bio-Rad, Hercules, USA.
iCycler iQ Optical Tape: Bio-Rad, Hercules, USA.
Whatman Papier: Schleicher&Schuell GmbH, Dassel, Deutschland.
Protein Transfer Blotting Membran, Whatman, „Westran Clear Signal“, PVDF-Membran: Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland.
ECL Plus Western Blotting Detection System: Amersham, Buckinghamshire, England.
Röntgenfilme „x-ray Retina“, 13 x 18 cm: Fotochemische Werke GmbH, Berlin, Deutschland.

2.1.3 Technische Geräte und Computer-Software

Mikroskop „Axiotech“: Zeiss, Jena, Deutschland.
Analyse-Programm Cap Image 7.1: Dr. H. Zeintl, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland.
Stereomikroskop: Leica, Wetzlar, Deutschland.
Cold plate „NOX-E.2-CP“: Noxygen, Elzach, Deutschland.
Kryostat: Leica CM 1850, Bensheim, Deutschland.
Vortexer REAX 2000: Heidolph, Schwabach, Deutschland.
Schüttelgerät Polymax 1040/Duomax 1030: Heidolph, Schwabach, Deutschland.
Leitz-Kamera, montiert auf Lichtmikroskop: Carl-Zeiss, Jena, Deutschland.
Wasserbad: Thermomix, Braun, Melsungen, Deutschland.
Magnetrührer „IKAMAG“: IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland.
Image Pro Plus: Version 4.1: Media Cybernetics, Bethesda, USA.

Sigmaplot 8.0.

Zentrifuge 5417 R: Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

PCR-Maschine „Mastercycler gradient“: Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

Gelkammer (PCR): Bio-Rad, Hercules, USA.

Stromquelle Power PAC 200: Bio-Rad, Hercules, USA.

Elektrophoresekammer Wide Mini Sub-Cell GT: Bio-Rad, Hercules, USA.

UV-Quelle „Mini-Transilluminator“: Bio-Rad, Hercules, USA.

Standard Electrophoresis Hood „Polaroid“: Bio-Rad, Hercules, USA.

Real-time PCR-Maschine „iCycler Optical Module“ (584 BR 02043): Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland.

Gene Expression Analysis for iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (v1.10-2004): Bio-Rad, München, Deutschland.

Photometer „TECAN SPECTRA“, Typ Spectra Rainbow: Tecan, Crailsheim, Deutschland.

Heizblock Techne DB-1: Techne, Cambridge, England.

Minigel-Kammer (Western Blot): Bio-Rad, München, Deutschland.

Transfer-Kammer (Western Blot): Bio-Rad, München, Deutschland.

Scan Pack: Biometra, Göttingen, Deutschland.

Duplex-Sonographiegerät mit 15 MHz Schallkopf (NICE): Toshiba Medical Systems, Breda, Niederlande.

2.1.4 Mäuse, Generierung und Präparation

Alle Mäuse wurden vor der Kreuzung für zehn Generationen auf einen C57BL/6-genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. ApoE ko-Tiere (a/a) wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen, eNOS ko-Tiere (e/e) wurden von Paul Huang (Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Massachusetts, USA) zur Verfügung gestellt.

Zur Erzeugung von apoE/eNOS dko-Tieren (a/a;e/e) wurden apoE ko-Mäuse mit eNOS ko-Mäusen gekreuzt, wodurch man Nachkommen erhält, die für beide Gene heterozygot sind (a/A;e/E). Beim Verpaaren dieser Generation erhält man nach den Mendelschen Regeln bei einem Sechzehntel der Tiere der nächsten Generation einen apoE/eNOS dko-Genotyp. Die Genotypisierung für apoE erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, zur Feststellung des eNOS-Genotyps diente der Southern Blot. Wegen

der schlechten Zuchtergebnisse mit apoE/eNOS dko-Mäusen wurden zu deren Generierung heterozygote apoE ko (a/A;e/e)-Weibchen mit apoE/eNOS dko (a/a;e/e)-Männchen verpaart.

Alle apoE ko- und apoE/eNOS dko-Tiere wurden in einem Tierstall bei einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden gehalten, 21 Tage nach der Geburt entwöhnt und anschließend für 18 Wochen (Ausnahme: IVM-Versuche mit Mäusen nach 10 Wochen Diät) mit einer „western-type“-Diät (42 % der Gesamtkalorien aus Fett, 0,15 % Cholesterin: Harlan-Teklad, USA) gefüttert.

Nach Abschluss der Diät wurden die Tiere fünf Minuten nach Injektion von 100 U Heparin mit Avertin (0,5 ml, i.p.) betäubt, das Abdomen eröffnet und der rechte Ventrikel transdiaphragmal zur Blutentnahme punktiert. Nach Abtrennen der renalen Arterien wurde das Gefäßsystem durch Punktion des linken Ventrikels mit 5 ml eiskaltem PBS (pH 7,4) gespült. Die Aorta wurde vom umgebenden Fett- und Bindegewebe mittels Feinbesteck frei präpariert, am Stück bis zur Bifurkation der Beckenarterien entnommen und für Proteinanalysen mittels Western Blot in Flüssigstickstoff tief gefroren. Die Carotiden wurden nach Präparation für die Herstellung von Kryoschnitten in Tissue-Tek eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren oder zur RNA-Isolation in RNAlater eingelegt. Durch Schneiden des in Tissue-Tek eingebetteten Gewebes mit einem Kryostat (-21°C) konnte eine Schichtdicke von 5 µm erreicht werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Intravitalmikroskopie (IVM)

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor B. Nieswandt des Rudolf Virchow Zentrums für Experimentelle Biomedizin der Universität Würzburg wurden die L/E- und P/E-Interaktionen in der Arteria carotis von Mäusen mittels Video-Fluoreszenzmikroskop *in vivo* untersucht. Zur Präparation der A. carotis für die Intravitalmikroskopie wurde den zehn Wochen mit „western-type“-Diät gefütterten Mäusen eine Kombinationsinjektionsanästhesie bestehend aus Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg) intraperitoneal appliziert, deren Wirkung über zwei bis drei Stunden und somit über die gesamte Dauer des Versuchs anhält. Die rechte Arteria carotis wurde vorsichtig über eine Distanz von 3 mm distal

bis 7 mm proximal der Carotisbifurkation freigelegt. Das freigelegte Gewebe wurde kontinuierlich zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH mit einer Bikarbonat gepufferten Kochsalzlösung, äquilibriert mit 5% CO₂ in Stickstoff, gespült. Polyethylen-Katheter zur Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe wurden in die Vena jugularis dextra eingelegt.

Für die Thrombozyten-Isolierung wurde Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus in Heparin-enhaltenden Spritzen gesammelt und bei 400 g 5 min zentrifugiert. Um Plättchen-reiches Plasma zu gewinnen, wurde der Überstand für weitere 6 min bei 250 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Thrombozyten durch Zentrifugieren des Plättchen-reichen Plasmas isoliert. Das Thrombozyten-Pellet wurde in PBS (pH 7,4) resuspendiert und für 2 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Fluorochrom carboxyfluorescein diacetat succinimidyl Ester) inkubiert. Die so markierten Thrombozyten wurden zentrifugiert, das entstehende Pellet wieder in PBS resuspendiert und bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch gelagert. Die Suspension wurde auf eine Endkonzentration von 50×10^6 Thrombozyten pro 250 µl eingestellt und intravenös infundiert.

Um die Leukozyten in vivo anzufärben, wurden 100 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G in einer Konzentration von 0,02% über einen Katheter in der rechten V. jugularis in das Gefäßsystem eingebracht. Die Carotis wurde über ein Zeiss AxioTech Mikroskop (Wasser-Immersionsobjektiv: 20x, W 20x/0,5) mit einer Quecksilberlampe zur Epi-Illumination visualisiert. Die Experimente wurden folgendermaßen durchgeführt: zwei senkrechte Linien wurden durch den Ursprung der Arteria carotis externa und interna gefällt; eine dritte Linie wurde gezogen, welche die beiden senkrechten Linien an der Stelle, an der diese die Gefäßwand kreuzten, verband; die Leukozyten- und Plättchen-Endothelzell-Interaktionen wurden bei einer hohen Vergrößerung (500-fach) in einem 200 µm x 100 µm großen Bereich 200 µm proximal der Carotisbifurkation ermittelt. Dies ist eine Prädilektionsstelle für die Plaqueentwicklung, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung keine makroskopisch sichtbaren Läsionen offenbarte.

Alle Bilder wurden auf Video aufgezeichnet und später mit einem computergestützten Bild Analyse Programm (Cap Image 7.1, Dr. H. Zeintl, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg) ausgewertet. Als „transient-adhären“ wurden solche Zellen bezeichnet, die ein imaginäres Lot durch die Gefäßwand mit einer signifikant langsameren Geschwindigkeit kreuzten als der Hauptstrom. Die Angabe erfolgte als Zellen pro mm²

endothelialer Oberfläche. „Adhärenente“ Zellen wurden definiert als solche, die sich binnen 20 Sekunden Beobachtung nicht von der Endotheloberfläche loslösten.

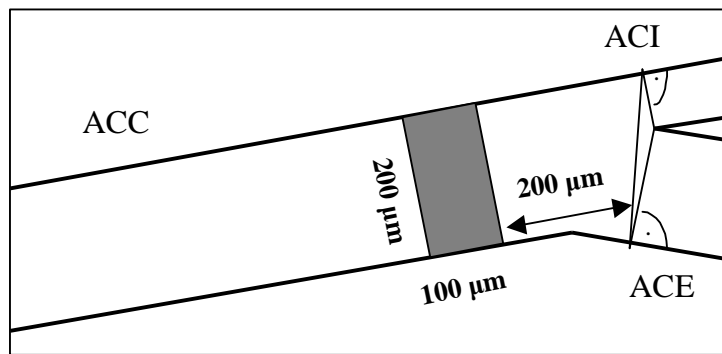


Abbildung 2: Schema zur Auswertung der Intravitalmikroskopie

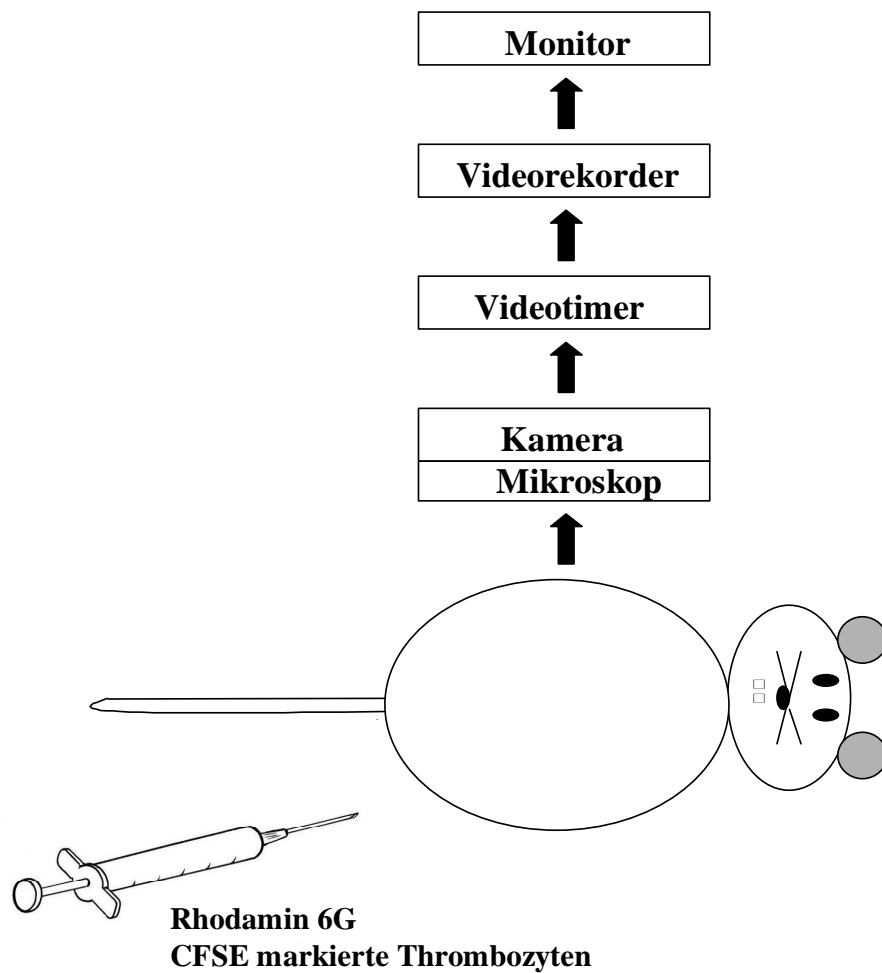


Abbildung 3: Aufbau eines Intravitalmikroskopie-Arbeitsplatzes

2.2.2 Histochemie und Immunhistochemie

Mit immunhistochemischen Techniken lassen sich Antigene in Zellen und Gewebeschnitten im mikroskopischen Bild nachweisen, indem man diese mit spezifischen Antikörpern, welche wiederum mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert sind, sichtbar macht.

Makrophagen/Monozyten-Antikörper

Der monoklonale Ratten anti-Maus Makrophagen/Monozyten Antikörper (MOMA-2) weist Makrophagen und Monozyten im Gewebe nach.

Die mit dem Kryostat auf eine Schichtdicke von 5 µm geschnittenen Carotiden wurden auf dem Objektträger über Nacht luftgetrocknet und bei -20°C eingefroren. Am Tag der Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in eiskaltem Azeton bei Raumtemperatur fixiert, bevor sie für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur trockneten und anschließend dreimal je 2 Minuten mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden sie für 30 Minuten in 0,3%iges Wasserstoffperoxid enthaltendes Methanol eingelegt und erneut dreimal für jeweils 2 Minuten mit PBS gespült. Nach Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels Blockierlösung „Antibody Diluent“ für 20 Minuten wurde das Gewebe für 1 Stunde mit dem aus der Ratte gewonnenen Primärantikörper gegen Makrophagen und Monozyten (Verdünnung 1:25 in Blockierlösung) inkubiert und daraufhin dreimal 4 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte bei Raumtemperatur die 30minütige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der im Kaninchen hergestellt und gegen Ratten-IgG gerichtet ist (Verdünnung 1:50). Nach dreimal 2 Minuten Spülen mit PBS wurde die ABC-Methode angewandt, welche die starke Affinität von Avidin (A) für Biotin (B) zur Kopplung (C) von enzymmarkiertem (Peroxidase) Avidin an biotinylierten Sekundärantikörper nutzt. Hierfür wurde das ABC-Reagenz für 30 Minuten auf den Gewebeschnitten belassen und dann mit PBS dreimal 2 Minuten abgewaschen. Nach Inkubation der Carotiden mit DAB-Reagenz (Diaminobenzidin) für 5 bis 20 Minuten wurde eine braune Färbung sichtbar. Dies liegt daran, dass DAB das Substrat der Peroxidase ist und damit die Kopplung von peroxidase markiertem Avidin an den Sekundärantikörper deutlich macht. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun für 1 Minute.

Nach weiterem Spülen in Leitungswasser wurden die Schnitte in Aquatex eingebettet.

VCAM-1-Antikörper

Neben ICAM-1 ist VCAM-1 das wichtigste Molekül zur Beeinflussung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. VCAM-1 ist verantwortlich für die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Der erste Schritt der Leukozyten-Adhäsion, die transiente Adhäsion und das Rollen entlang des Endothels, wird neben P- und E-Selektin auch durch VCAM-1 bestimmt. Die Besonderheit von VCAM-1 besteht darin, dass es als einziges der drei Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM, PECAM) sowohl am ersten Schritt der Kontaktaufnahme als auch an der festen Adhäsion beteiligt ist.⁷⁶ In der Immunhistochemie lassen sich VCAM-1 exprimierende Zellen darstellen. Die Methode entspricht der vorher für Makrophagen beschriebenen mit Ausnahme der Verwendung eines gereinigten Ratten anti-Maus Antikörpers CD 106 (VCAM-1, Verdünnung 1:50) als Primärantikörper.

Oil Red O Färbung

Um die Anhäufung von Fett innerhalb von Zellen und damit die sogenannten „fatty streaks“ der frühen Arteriosklerosestadien sichtbar machen zu können, färbt man Triglyceride mit „Oil-Red-O“ gelöst in Isopropanol. Diese Methode ist vor allem geeignet für Gewebe mit winzigen Fetttropfchen, da sich die Lipide in dieser Färbelösung weniger schnell auflösen als mit der Sudan Methode.

Die Oil Red O Stammlösung wurde hergestellt durch 30 bis 60minütiges Erwärmen von 0,5 g Oil Red O und 500 ml Isopropanol in einem Langhals-Kolben im Wasserbad bei 56°C und anschließendes Abkühlen. 30 ml Oil Red O Stammlösung und 20 ml destilliertes Wasser wurden gemischt, für 5 bis 10 min stehen gelassen und gefiltert, um die Arbeitslösung für den jeweiligen Tag zu erhalten. Die Schnitte wurden 10 Minuten in einem geschlossenen Behälter in Arbeitslösung gefärbt, gut aber behutsam gewaschen, danach für 3 Minuten mit Mayer's Hämatoxylin gefärbt, in Leitungswasser gebläut, in destilliertem Wasser abgespült und zum Schluss in Aquatex eingebettet.

Quantifizierung der Makrophagen-Infiltration, der VCAM-Expression und der lipidreichen arteriosklerotischen Plaques

Die Photographien der Carotiden wurden mit einer auf ein Lichtmikroskop montierten Leitz-Kamera angefertigt, digitalisiert und in das Programm Image Pro Plus (Version 4.1) eingespeichert. Alle Bilder wurden bei 400facher Vergrößerung analysiert. Die positiv gefärbten Flächen der A. carotis communis wurden in einem den IVM-Studien entsprechenden Bezirk ausgemessen und deren prozentualer Anteil an der Gefäßwand berechnet.

2.2.3 Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation, komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese, Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die RNA von Carotiden wurde mittels eines RNA Miniprep Kits von Stratagene isoliert (total RNA). Die in RNAlater eingelegten und bei -80°C gelagerten Carotiden wurden in 100 μl Lysis Puffer und 0,7 μl β -Mercaptoethanol in Mikromörsern homogenisiert und die RNA-Isolation anhand der Protokollmodifikationen für kleine Proben (5-20 mg Gewebe) durchgeführt. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurde der Elutionspuffer auf 60°C erwärmt.

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, konnte aus der gewonnenen RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Dazu wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet. DNA-Polymerasen benötigen zur Synthese einen Primer (kurzer komplementärer DNA-Abschnitt), welcher an die RNA bindet. Hierzu wurde konkret ein Oligo-dT-Nukleotid (18 Desoxythymidine) eingesetzt, welches komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA ist. Als Reverse Transkriptase diente eine Enzymvariante des Retrovirus „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MuLV RT). 14 μl RNA und 1 μl Oligo(dT)₁₈ Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden gemischt, für 3-5 sec zentrifugiert, anschließend für 5 min bei 70°C inkubiert, auf Eis gekühlt und die Tröpfchen durch kurzes Zentrifugieren wieder gesammelt. Auf Eis wurden folgende Komponenten hinzugefügt, gemischt und kurz zentrifugiert: 5 μl 5x Reaktionspuffer, 2 μl 10 mM dNTP Mix und 1 μl RiboLock Ribonuklease Inhibitor (20u/ μl). Nach 5minütigem Inkubieren bei 37°C und Hinzufügen von 2 μl M-MuLV Reverse Transkriptase (20u/ μl) erfolgte eine einstündige Inkubation der Mischung bei 37°C

und das Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 10 min. Die cDNA wurde nachfolgend bei -20°C gelagert.

Zur Testung der Real Time-PCR Primer wurde zunächst eine normale PCR (Polymerasekettenreaktion) durchgeführt. Die PCR als eine hoch spezifische Methode dient der Amplifizierung bekannter DNA-Sequenzen. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Sequenzen. Auf die Denaturierung der DNA durch Erhitzen folgt durch Abkühlen des Reaktionsgemisches die Hybridisierung der Primer an den komplementären DNA-Strang und schließlich die Synthese der DNA-Matrize durch Erhöhung der Temperatur auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase. Es entsteht neue, doppelsträngige DNA mit einer zur Matrize komplementären Sequenz. Durch vielfache Wiederholung kommt es zur exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes. Die zur Denaturierung notwendigen hohen Temperaturen von 94°C verlangen nach einem stabilen, hitzebeständigen Enzym, welches in der Taq-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* gefunden werden konnte. Zum Einbau der Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) sind zudem Mg^{2+} -Ionen vonnöten, die mit den dNTPs einen löslichen Komplex bilden und außerdem die Polymeraseaktivität stimulieren.⁷⁷

Für jede DNA-Probe wurden folgende Komponenten gemischt:

| | |
|---------|---|
| 25,5 µl | HPLC-H ₂ O |
| 5 µl | 10x PCR Puffer |
| 5 µl | 25 mM MgCl ₂ (Endkonzentration 2,5 mM) |
| 2 µl | 10 mM dNTPs (Endkonzentration 0,4 mM) |
| 5 µl | Primer sense (Endkonzentration 10 µM) |
| 5 µl | Primer antisense (Endkonzentration 10 µM) |
| 0,5 µl | Taq-Polymerase (5u/µl) |

Jedem PCR-Ansatz wurden 2 µl DNA zugefügt und das Gemisch anschließend folgendem PCR-Programm unterzogen:

- 1) 94°C 3 min
- 2) 35 Zyklen:
 - 94°C 30 sec
 - 61°C 40 sec für CD14/ 59°C 40 sec für VCAM-1
 - 72°C 1 min
- 3) 72°C 5 min
- 4) Herunterkühlen auf 4°C.

Um die amplifizierten DNA-Sequenzen durch Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese zu analysieren, wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid in TAE-Puffer hergestellt. Dazu wurden je 1,5 g Biozym Sieve GP Agarose und Biozym LE GP Agarose in 150 ml TAE-Puffer erhitzt und nach Abkühlen 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) beigelegt. Ethidiumbromid wird zum Anfärben von Nucleinsäuren bei der Gelelektrophorese verwendet. Indem einzelne Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der DNA interkalieren, ändert sich sein Anregungsspektrum, was die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht. Als Elektrophoresepuffer diente TAE. Nach Zufügen von 6 µl Ladepuffer in jede Probe erfolgte ein 2minütiges Erhitzen auf 74°C, gefolgt von dem Auftragen von 20 µl jeder Probe in je eine Geltasche. Zur Größenbestimmung der markierten DNA-Fragmente wurden zusätzlich 10 µl eines 100 bp DNA-Markers geladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 Volt über 1 Stunde durchgeführt. Die erwarteten PCR-Produkte lagen für VCAM-1 bei 214 bp, für CD14 bei 386 bp.

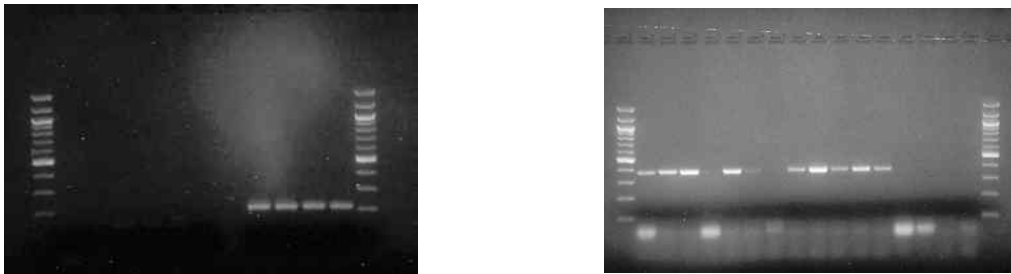


Abbildung 4: Polymerasekettenreaktion zum Nachweis des VCAM-Genes (links) und des CD14-Genes (rechts)

Unter dem CD14-Rezeptor versteht man ein Oberflächenmolekül auf Monozyten und Makrophagen. Nach Kontakt des CD14-Rezeptors mit Lipopolysacchariden kommt es durch Aktivierung der Zelle zur Ausschüttung von TNF- α und IL-1 β (Interleukin-1 β) und damit zu einer Entzündungsreaktion.

2.2.4 Real-time PCR

Die Real-time PCR, als eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, beruht auf dem gleichen Prinzip wie eine PCR, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs aus mehreren Zyklen wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der Fluorescence resonance energy transfer (FRET) ausgenutzt. Ein Donor-Fluorochrom (bei der TaqMan-Methode Reporter genannt) wird dabei durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher bei TaqMan-Sonden) ab. Bei den TaqMan-Sonden wird nun das 3'-Ende mit dem Quencher (gewöhnlich TAMRA) und das 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier FAM) markiert. Dadurch, dass die Taq-Polymerase zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wird die Sonde bei der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut, folglich Quencher und Reporter voneinander entfernt und eine erhöhte Reporter-Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Menge der DNA.⁷⁸

In unserem Fall wurde die Expression von VCAM-1 und CD14 in Relation zum Signal des Referenz-Gens Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) gemessen (relative Quantifizierung). Die unterschiedliche Expression wurde als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes angegeben. Der Ct-Wert (engl.: Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt. Der Ct-Wert des HPRT-Signals wurde vom Ct-Wert der jeweiligen VCAM/CD14-Expression des gleichen Tieres abgezogen (ΔCt), der ΔCt -Wert der apoE ko-Gruppe von dem der eNOS dko-Gruppe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$) und in die Gleichung n-fache Expression (eNOS dko zu apoE ko), nämlich $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt.

Für einen einfachen Ansatz MasterMix wurden folgende Komponenten gemischt:

- 12,5 μl SuperMix
- 0,25 μl Primer sense (Endkonzentration 20 μM)
- 0,25 μl Primer antisense (Endkonzentration 20 μM)
- 0,25 μl TaqMan-Sonde (Endkonzentration 20 μM)

6,75 μl HPLC- H_2O

In die Vertiefungen der 96 well Plate wurden anschließend je 5 μl Probe (1 μl cDNA + 4 μl HPLC- H_2O) und 20 μl MasterMix pipettiert. Auf eine Platte wurden je 3 Ansätze pro Gen und Tier (jeweils für das zu untersuchende Gen, also VCAM oder CD14 und HPRT) aufgetragen. Nach Auftragen aller Proben wurde die Platte mit einer durchsichtigen Folie verschlossen und bis zum Start der Real-time PCR in Alufolie gehüllt. Vor Beginn eines jeden Laufes wurden die 96 well Plates kurz zentrifugiert.

Das CD14-Protokoll sah folgendermaßen aus:

- 1) 50°C 2 min
- 2) 94°C 1 min
- 3) 40 Zyklen:
 - 94°C 30 sec
 - 61°C 40 sec
 - 72°C 1 min
- 4) 72°C 2 min
- 5) Herunterkühlen auf 15°C.

Für VCAM lief ein entsprechendes Programm mit einer Primerhybridisierung bei 60°C ab.

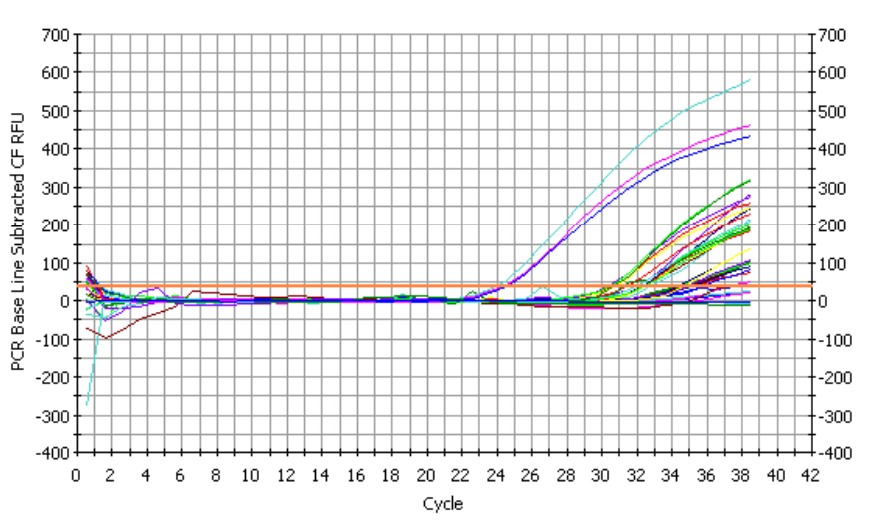


Abbildung 5: Beispiel für einen Real-time PCR-Amplifikationsgraphen

2.2.5 Western Blot

Proteinextraktion aus Aorten

Am Tag der Proteinextraktion wurden die in Flüssigstickstoff gefrorenen Aorten in einem Mikromörser mit insgesamt 100 µl Lysis Puffer, der PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM enthält, zermahlen und mittels einer Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Nach zweimaligem Spülen des Mörsers und 30minütigem Inkubieren des Lysats auf Eis folgten 10 min Zentrifugierung bei 14.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C. Der Protein enthaltende Überstand wurde vom entstandenen Pellet abgezogen und bei den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nun wurde die flüssige Phase in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gefroren.

Messung der Proteinkonzentration

Hierzu wurde der BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet. Im alkalischen Milieu werden Cu^{2+} -Kationen durch Proteine zu Cu^+ reduziert (Biuret Reaktion). Aus zwei Molekülen Bicinchonische Säure (BCA) und einem Cu^+ Molekül entsteht ein farbiger Chelatkomplex, der bei 562 nm photometrisch messbar ist.⁷⁹

Jeweils 10 µl Proteinlösung (1:5 verdünnt mit H_2O) wurden auf eine 96 well Plate pipettiert. Zum Erstellen einer Standardreihe mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,0 mg/ml und damit zur Erzeugung einer Standardkurve diente ein mitgelieferter Albumin Standard (2 mg/ml). Jeder Probe wurden 200 µl einer Mischung der Reagentien A und B des Kits im Verhältnis 5 ml zu 100 µl zugefügt, dies für 30 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Analyse erfolgte mit dem Photometer „TECAN SPECTRA“, Typ Spectra Rainbow.

Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung nachgewiesen und in einem gewissen Rahmen auch quantifiziert werden. Nach Durchwandern eines Sammelgels werden die Proteine in einem Trenngel der Größe

nach aufgetrennt. Anschließend folgt die Übertragung auf eine PVDF-Membran und die Darstellung des gesuchten Proteins mittels spezifischer Antikörper (Primärantikörper und enzymmarkierter Sekundärantikörper).

In einem siebenprozentigen Acrylamid/Bis-Acrylamidgel wird das Proteingemisch aufgetrennt. Das dem Gel beigefügte SDS (Natriumdodecylsulfat) führt zur Denaturierung und durch die negative Ladung zur Maskierung der Eigenladung der Proteine, was eine Auftrennung nach der Molekularmasse ermöglicht. Über dem Trenngel befindet sich ein Sammelgel (3% Acrylamid/Bis-Acrylamid; 0,1% SDS), welches zur Bildung einer schmalen Lauffront führt.

20 µg Protein wurden mit Lysis Puffer auf 10 µl aufgefüllt, danach 5 µl Ladepuffer beigefügt und alles für 5 min auf 95°C erhitzt. Mit diesem Gemisch wurden die Taschen des Sammelgels befüllt. Als Größenstandard diente der Proteinmarker „Precision Plus Protein Standards“ der Firma Bio-Rad. Im Anschluss an die einstündige Elektrophorese bei 150 V wurde auf das Gel eine mit Transferpuffer angefeuchtete PVDF-Membran gelegt, beidseits feuchtes Whatman Papier und eine Lage in Transferpuffer eingelegtes Fließ hinzugefügt und der Proteintransfer in einer speziellen Halterung in einer Transferkammer von Bio-Rad, gefüllt mit Blotting-Puffer, bei 400 mA und guter Kühlung für eine Stunde durchgeführt. Die Membran wurde der Transferkammer entnommen und für eine Stunde in Blockpuffer eingelegt. Letzteres soll die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran verhindern. Nach dem Blocken wurde die Membran horizontal zwischen 50 und 75 kDa durchgeschnitten. Der obere Teil, auf dem sich bei einem Molekulargewicht von 110 kDa VCAM-1 befand und der untere Teil mit α -Actin (43 kDa) wurden nun über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker mit den Primärantikörpern inkubiert. Dazu wurde der primäre VCAM-1 Antikörper 1:200 und der Aktin Antikörper 1:500 in TBST mit 5% Magermilchpulver verdünnt. Nach einem halbstündigen (dreimal 10 min) Waschvorgang in TBST-Puffer zur Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:4000) und ein erneuter Waschvorgang mit TBST (fünfmal 12 min).

Die verwendeten Sekundärantikörper waren mit der Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert, wobei Licht der Wellenlänge 430 nm emittiert wird (Chemilumineszenz-Nachweis). Die Detektion erfolgt mittels eines Röntgenfilms. Dabei entspricht der Grad

der Schwärzung des Films der Menge des entstandenen Lichts an der entsprechenden Stelle der Membran, wodurch eine Abschätzung der Menge des Zielproteins ermöglicht wird. Aktin dient dabei wegen seiner konstanten Expression im Gewebe als Standard.

Unter Lichtabschluss wurden 2 ml der Lösung A mit 50 μ l der Lösung B des ECL Plus Nachweiskits gemischt und auf die Membranen gegeben. Nach fünf Minuten wurden die Teile entnommen, in eine Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer Entwicklerkassette mit Klebeband fixiert. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme in die Kassette eingelegt und nach Exposition (1-2 Minuten) entwickelt.

Die Expressionslevel von VCAM-1 und α -Actin wurden densitrometrisch mittels Scan Pack analysiert und das VCAM-1 Signal ins Verhältnis zur Expression von α -Actin gesetzt.

2.2.6 Duplex-Sonographie der Carotiden

Die zu untersuchenden Mäuse wurden anästhesiert und die A. carotis communis mit einem Duplex-Sonographiegerät und einem hochauflösenden 15 Megahertz-Schallkopf sichtbar gemacht. Gemessen wurde der „Resistance Index“ (RI), der sich aus der Differenz der maximalen systolischen und enddiastolischen Flussgeschwindigkeit (V_{sys} und V_{dia}) dividiert durch V_{sys} zusammensetzt und zur indirekten Bestimmung des Gefäßwiderstandes dient. Bei einer Zunahme des peripheren Widerstandes nimmt die enddiastolische Strömungsgeschwindigkeit stärker als die maximale systolische Geschwindigkeit ab und folglich der RI zu.⁸⁰

2.2.7 Statistische Analysen

Alle Daten werden abgebildet als Mittelwert plus Standardfehler. Statistische Signifikanz zweier Gruppen wurde mittels Student's t test bestimmt und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant angenommen.

3.0 Ergebnisse

3.1 eNOS-Deletion erhöht Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in Apolipoprotein E knockout (apoE ko)-Mäusen

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen 200 μm vor der Carotisbifurkation von 10 Wochen mit „western-type“-Diät gefütterten Mäusen wurden mit Video Fluoreszenzmikroskopie in vivo untersucht. Die Histochemie ergab bei beiden Genotypen keine makroskopisch sichtbaren Läsionen in diesem Areal.

Verglichen mit den apoE ko-Mäusen (125 ± 17 Zellen/ mm^2 , n=23) erwies sich die Zahl der rollenden Leukozyten bei den apoE/eNOS dko-Mäusen (206 ± 24 Zellen/ mm^2 , n=16, $p < 0,01$, *Abbildung 6a*) als signifikant höher. Zusätzlich zeigten eNOS dko-Tiere signifikant angehobene Werte sowohl an transient adhärenenten Leukozyten (442 ± 50 Zellen/ mm^2 , n=16) als auch an fest adhärenenten Leukozyten (94 ± 15 Zellen/ mm^2 , n=16) im Vergleich zu den apoE ko-Mäusen (transient adhärenent: 155 ± 18 Zellen/ mm^2 , n=23, $p < 0,0001$, *Abbildung 6b*; fest adhärenent: 28 ± 8 Zellen/ mm^2 , n=23, $p = 0,0002$, *Abbildung 6c*).

3.2 Keine Beeinflussung der Thrombozyten-Adhäsion in apoE ko-Mäusen durch das Fehlen von eNOS

IVM-Analysen der A. carotis communis ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen zwischen beiden Genotypen. Das Rollen der Thrombozyten zwischen apoE ko-Tieren (53 ± 12 Zellen/ mm^2 , n=19) und apoE/eNOS dko-Tieren (41 ± 10 Zellen/ mm^2 , n=16, $p = 0,48$), die vorübergehende Adhäsion (apoE ko: 505 ± 57 Zellen/ mm^2 , n=9 vs. apoE/eNOS dko: 417 ± 65 Zellen/ mm^2 , n=9, $p = 0,33$) und auch die feste Adhäsion (apoE ko: 42 ± 10 Zellen/ mm^2 , n=19 vs. apoE/eNOS dko: 20 ± 13 Zellen/ mm^2 , n=16, $p = 0,2$) waren ähnlich.

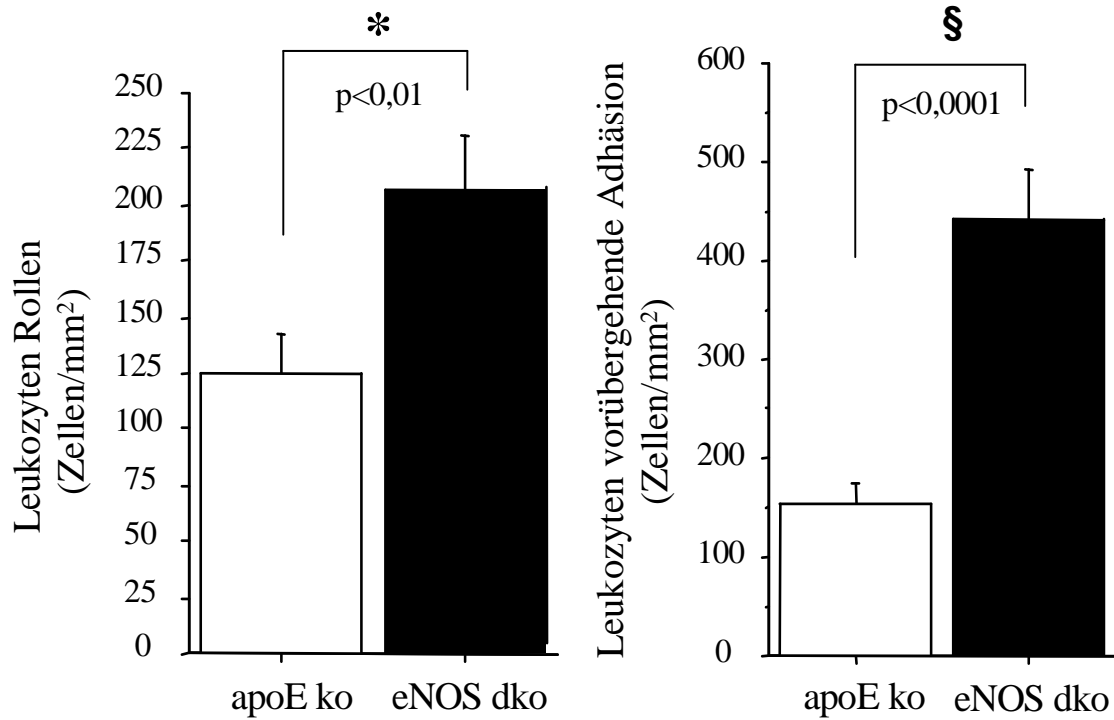


Abbildung 6a

Abbildung 6b

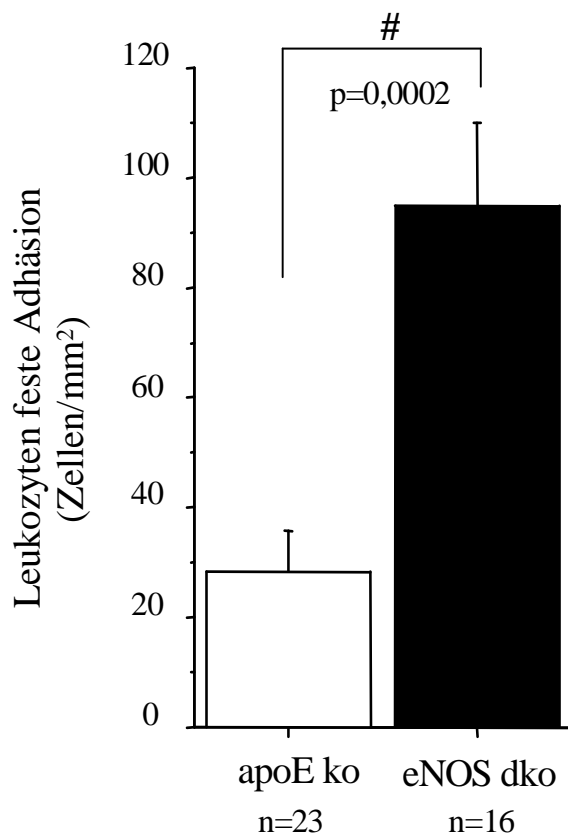


Abbildung 6c

Abbildung 6:

Die Zahl der rollenden, transient adhärennten und fest adhärennten Leukozyten war signifikant erhöht in der A. carotis communis von apoE/eNOS dko-Mäusen im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen.

3.3 Der Mangel an eNOS verstärkt die endotheliale vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-Expression in Carotiden und Aorten

Um den Einfluss der eNOS-Deletion auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 zu eruieren, wurden Real-time PCR Experimente unter Verwendung der Carotis-RNA von 18 Wochen mit „western-type“-Diät gefütterten Mäusen durchgeführt. Die mRNA Expression von VCAM-1 lag signifikant höher bei apoE/eNOS dko-Tieren verglichen mit apoE ko-Kontrollen ($4,39 \pm 1,11$, $n=9$ vs. $1,0 \pm 0,46$, $n=20$, $p<0,002$, *Abbildung 7a*).

Western Blot Analysen von Aorten bestätigten die Unterschiede in der VCAM-1-Expression zwischen beiden Genotypen (apoE/eNOS dko: $2,3 \pm 0,27$, $n=10$; apoE ko: $1,3 \pm 0,26$, $n=10$, $p\leq 0,01$, *Abbildung 7b*).

Auch die immunhistochemische Untersuchung der A. carotis ergab eine verstärkte endotheliale Expression von VCAM-1 in apoE/eNOS dko-Mäusen ($3,66 \pm 1,78$, $n=11$, apoE ko: $1,12 \pm 0,49$, $n=10$, $p=0,2$, *Abbildung 7c*).

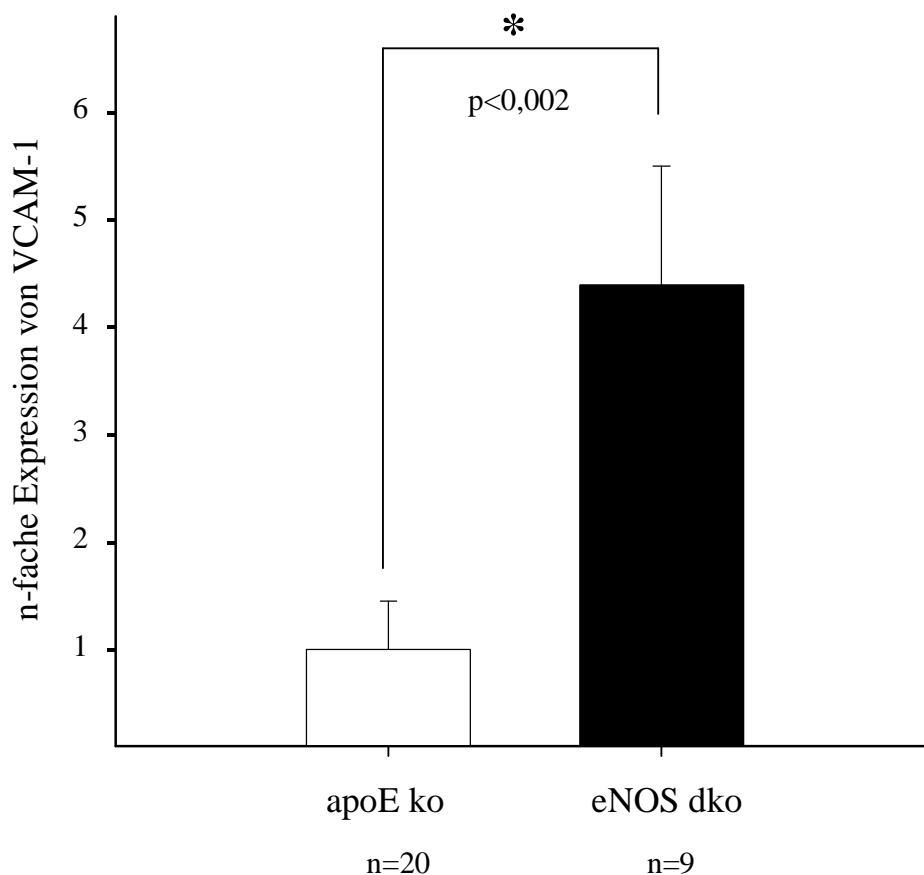


Abbildung 7a: Vierfach erhöhte Expression von VCAM-1 mRNA bei apoE/eNOS dko-Mäusen im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen in der Real-time PCR.

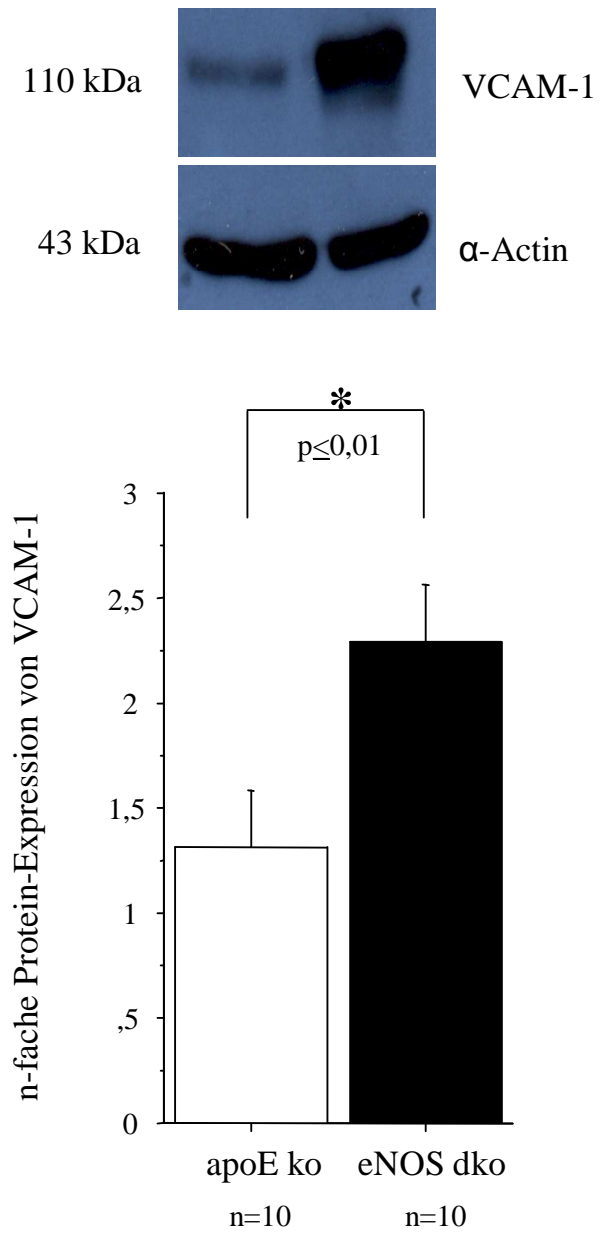
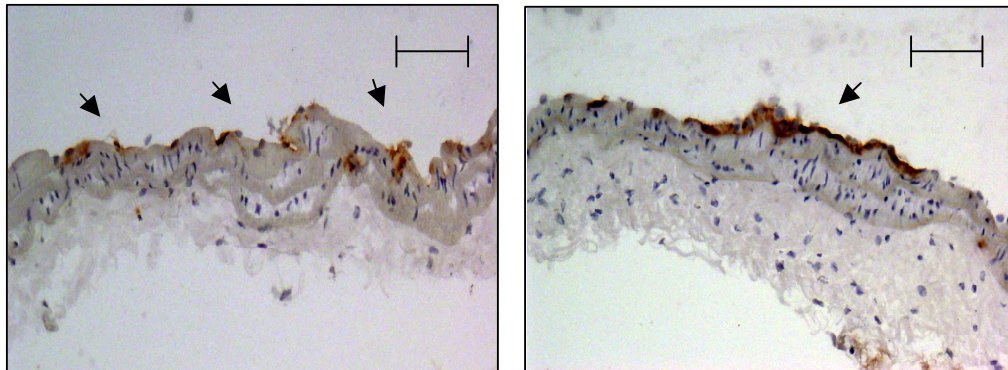


Abbildung 7b: Western Blot aus aortalen Lysaten von apoE ko- und apoE/eNOS dko-Mäusen (oben). Densitometrische Auswertung der Proteinbande für VCAM-1 und der entsprechenden α-Actin-Bande desselben Blots zur Quantifizierung der Proteinexpression (unten).



apoE ko VCAM-1

25 μ m

eNOS dko VCAM-1

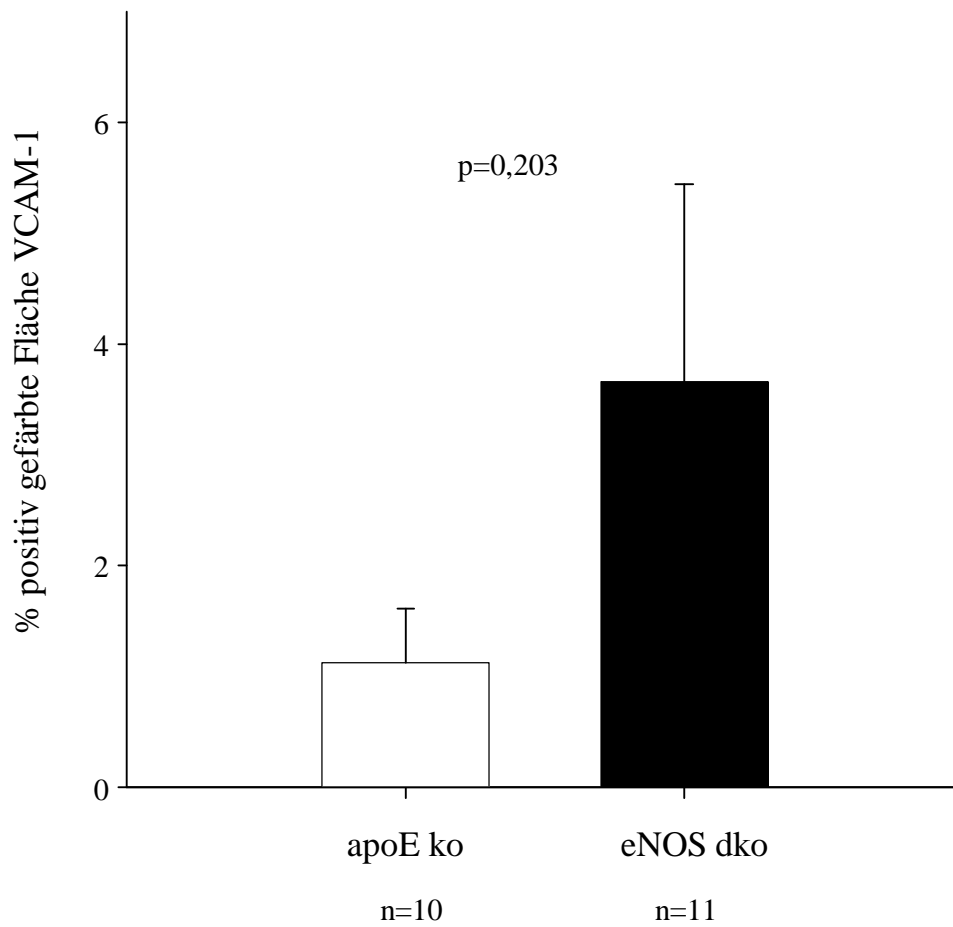


Abbildung 7c: Immunhistochemie der A. carotis beider Genotypen für VCAM-1.

3.4 Beeinflussung der Makrophagen-Infiltration in die Gefäßwand durch endotheliales Stickstoffmonoxid

Zur Beurteilung der Frage, ob die erhöhte VCAM-1-Expression der endothelialen Carotis auch in einer verstärkten Infiltration von Makrophagen in die Gefäßwand resultiert, wurde eine Real-time PCR zur Quantifizierung der vaskulären CD14-Expression durchgeführt. Dabei ergab sich ein eklatanter Unterschied in der CD14-Expression zwischen beiden Genotypen (apoE/eNOS dko: $4,21 \pm 3,34$, n=12; apoE ko: $1,0 \pm 0,43$, n=17, $p < 0,00002$, *Abbildung 8a*).

Dieser Befund wurde bekräftigt durch eine Zunahme der für Makrophagen positiv gefärbten Flächen in der A. carotis von eNOS dko-Tieren (apoE/eNOS dko: $5,60 \pm 0,98$ % positiv gefärbte Plaquefläche, n=9; apoE ko: $2,26 \pm 0,49$ % positiv gefärbte Plaquefläche, n=9, $p = 0,008$, *Abbildung 8b*).

Die Planimetrie der Oil Red O positiv gefärbten Areale in der Gefäßwand zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen apoE ko- ($6,82 \pm 4,0$ positiv gefärbte Plaquefläche, n=9) und apoE/eNOS dko-Mäusen ($5,87 \pm 3,44$, n=7, $p = 0,87$, *Abbildung 8c*). Letzteres lässt auf eine vergleichbare Menge an „fatty streaks“ bei beiden Genotypen im untersuchten Bereich zum gewählten Untersuchungszeitpunkt schließen.

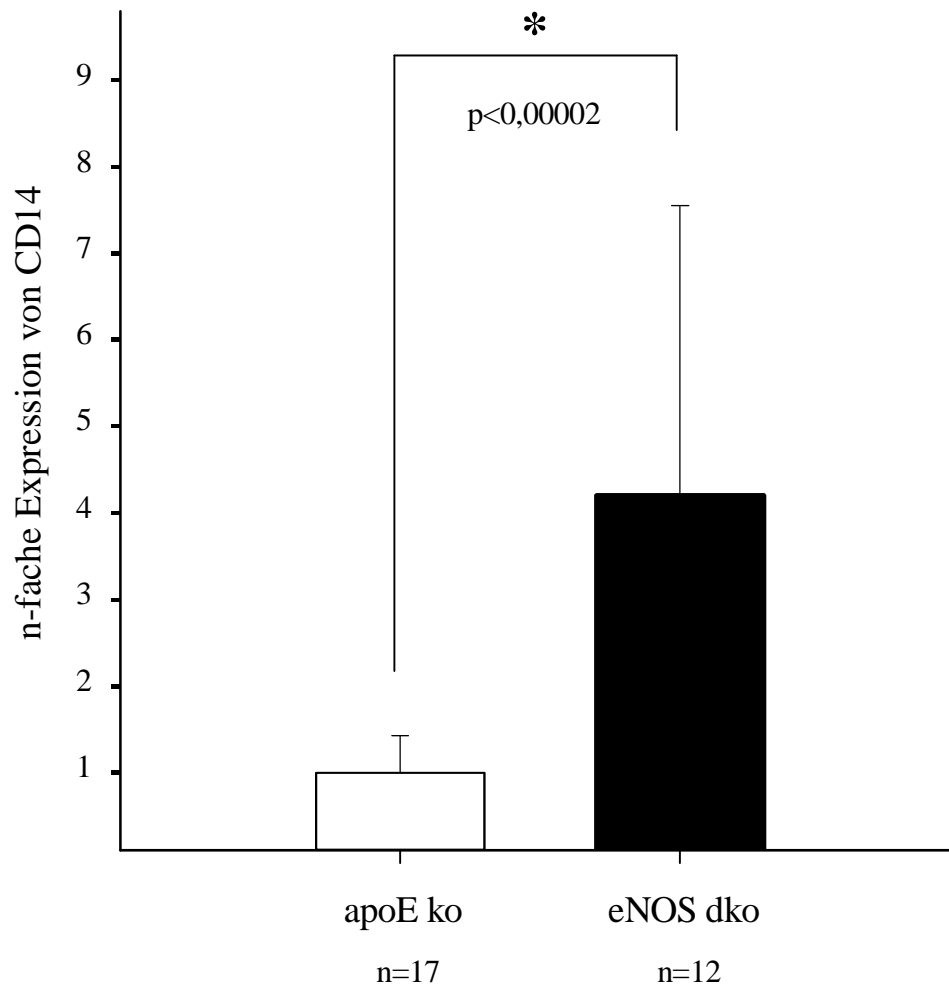
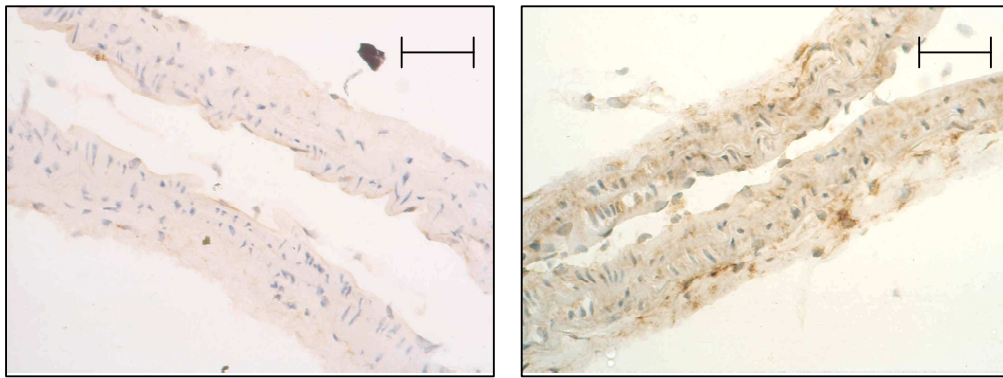


Abbildung 8a: Vierfach erhöhte Expression von CD14 mRNA bei apoE/eNOS dko-Mäusen im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen in der Real-time PCR.



apoE ko Makrophagen

25µm

eNOS dko Makrophagen

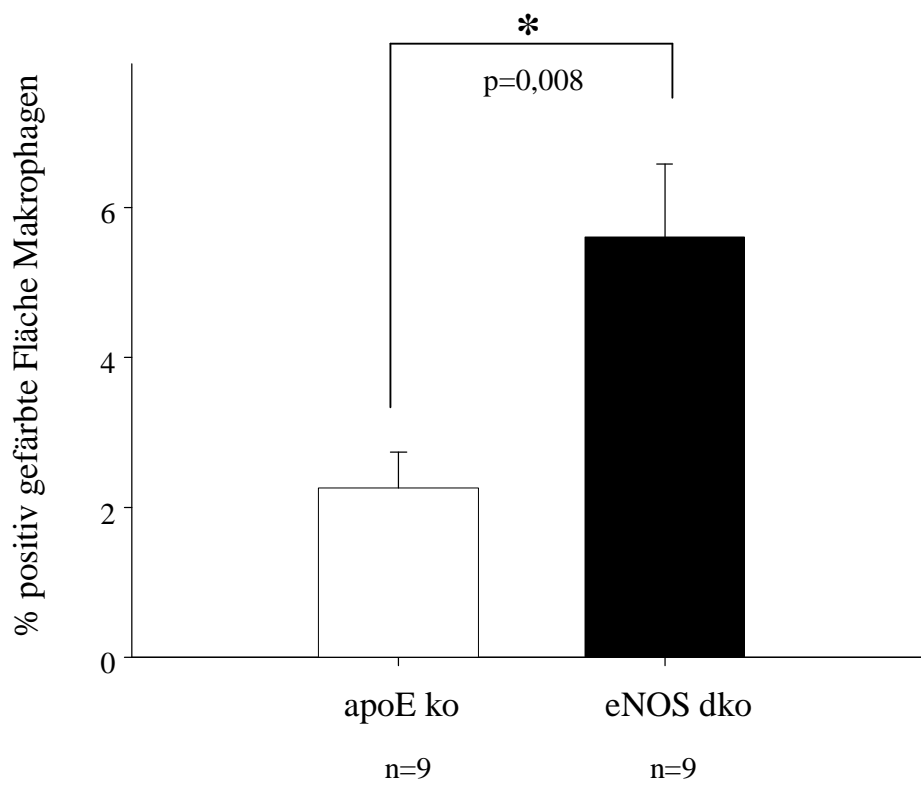
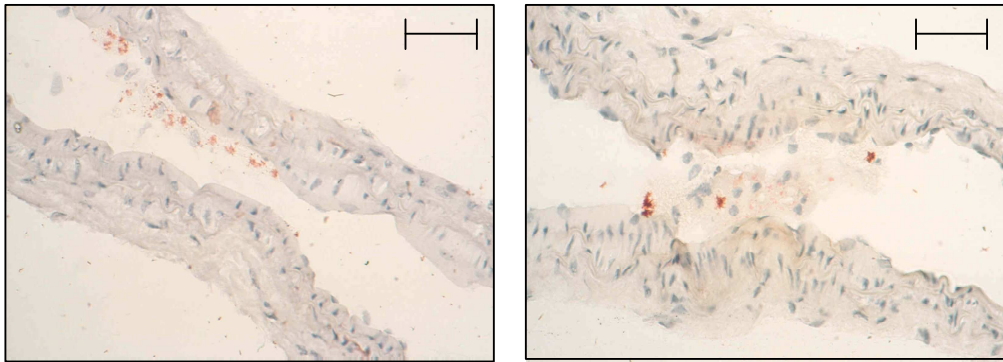


Abbildung 8b: Die Planimetrie der positiv gefärbten Plaueflächen ergab eine erhöhte Makrophagen-Infiltration in die Gefäßwand der A. carotis bei eNOS dko-Mäusen.



apoE ko Oil Red O

25µm

eNOS dko Oil Red O

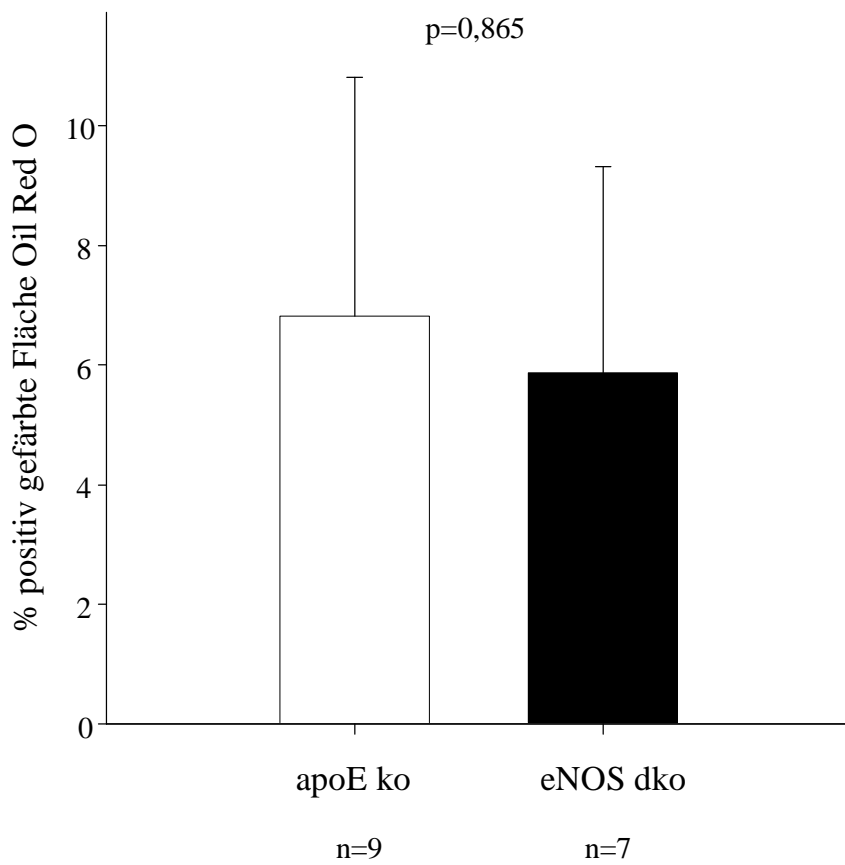


Abbildung 8c: Vergleichbare Mengen an „fatty streaks“ in den Carotiden bei beiden Genotypen.

3.5 Unveränderter vaskulärer Gefäßwiderstands Index in eNOS defizienten apoE ko-Mäusen

Die Duplex-Sonographie der A. carotis communis führte zu dem Ergebnis, dass kein Unterschied im Resistance Index zwischen apoE ko-Mäusen ($0,758 \pm 0,015$, n=17) und apoE/eNOS dko-Mäusen ($0,754 \pm 0,014$, n=10, $p=0,89$, *Abbildung 9*) existiert. Dies lässt den Schluss zu, dass zum Zeitpunkt der Studien die genetische Deletion von eNOS keine Veränderungen der Hämodynamik in der Carotis-Strombahn hervorruft.

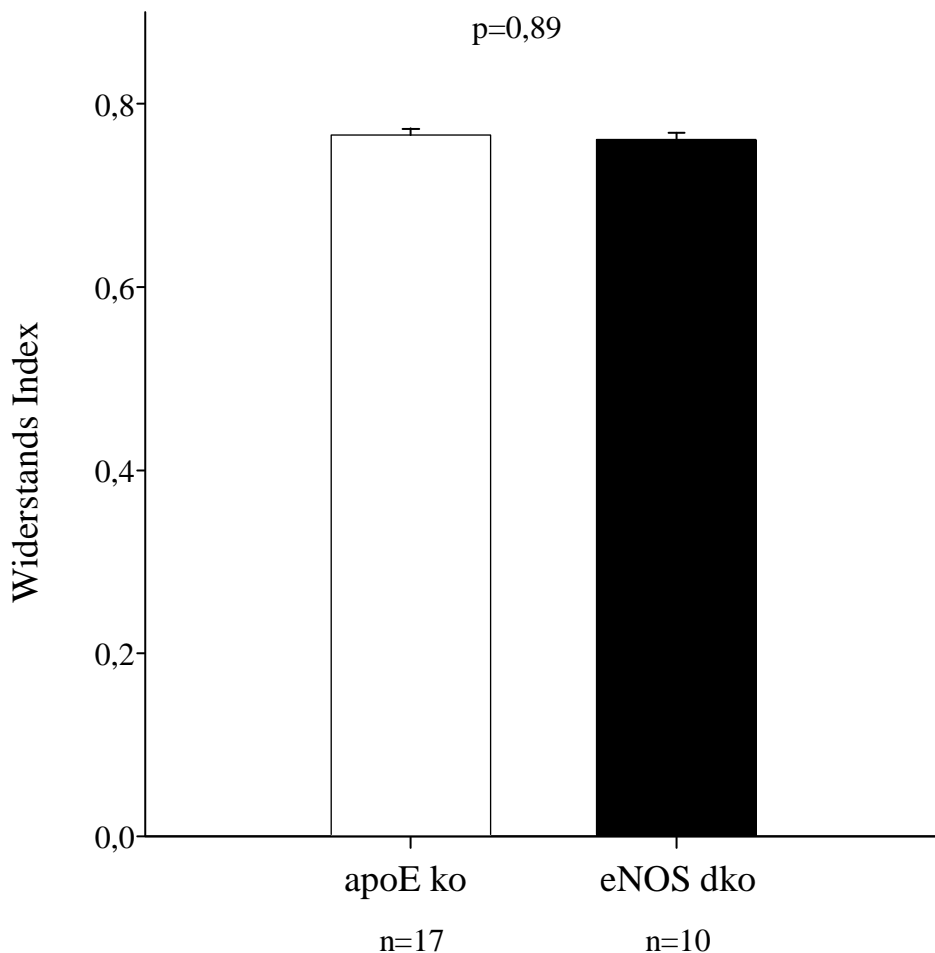


Abbildung 9: Kein Unterschied im Resistance Index der A. carotis communis zwischen apoE ko- und eNOS dko-Tieren.

4.0 Diskussion

Die NOS-Proteinfamilie schließt drei Isoformen ein, die endotheliale, die induzierbare und die neuronale NOS. Während eNOS und nNOS atheroprotektiv sind,^{48, 49} wird der induzierbaren NO-Synthase eine proatherogene Funktion zugeschrieben.⁵² In Endothelzellen fortgeschrittener arteriosklerotischer Läsionen fand man eine Abnahme der eNOS-Expression im Vergleich zu gesunden Gefäßen bei gleichzeitig ausgedehnter iNOS und nNOS-Expression, verbunden mit Makrophagen, Endothelzellen und mesenchymal-erscheinenden Intimazellen.⁴⁴

Mit Untersuchungen zu den L/E- und P/E-Interaktionen in Carotiden von apoE ko- und apoE/eNOS dko-Mäusen haben wir die Rolle von eNOS in den frühen Stadien der spontanen Arterioskleroseentwicklung untersucht. Das eNOS ko-Modell ist dabei der pharmakologischen NOS-Inhibition durch L-NAME oder L-NMMA überlegen.⁸¹ Dies liegt daran, dass die pharmakologische Inhibition der NOS nicht spezifisch für eNOS ist und aufgrund von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik keine Garantie zur vollständigen Inhibition gewährleistet ist.

Durch die zahlreichen Auswirkungen der eNOS-Deletion auf das Gefäßsystem, welche neben einer verstärkten Intimaproliferation als Antwort auf eine Gefäßverletzung bei eNOS ko-Mäusen⁶⁵ auch die arterielle Hypertonie und eine beschleunigte Arterioskleroseentstehung bei apoE/eNOS dko-Mäusen einschließen,⁴⁸ spielt das eNOS ko-Modell eine wichtige Rolle in der Erforschung vaskulärer Erkrankungen. Gleichzeitig steht mit den apoE ko-Mäusen ein dem Menschen vergleichbares, durch Hyperlipidämie provoziertes Modell der Arterioskleroseentwicklung zur Verfügung.

Die vorliegende Arbeit zeigt bei apoE/eNOS dko-Mäusen im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen eine signifikante Zunahme an rollenden, transient adhärenenten sowie fest an das Endothel adhärenenten Leukozyten. Die Zunahme der L/E-Interaktionen wurde dabei in der A. carotis communis in einem Bereich ohne makroskopisch sichtbare Läsionen beobachtet. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) in den Carotiden von apoE/eNOS dko-Mäusen nachgewiesen, welche letztendlich auch in einer gesteigerten Makrophagen-Infiltration in die Gefäßwand mündete. Die Methode der Duplex-Sonographie belegte eine ähnliche Hämodynamik in der Carotis-Strombahn beider Genotypen und weist

darauf hin, dass die erhöhten L/E-Interaktionen nicht als Folge von veränderten Flussbedingungen zu erklären sind.

Auf welche Weise beeinflusst NO die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen?

Von mehreren Autoren wird beschrieben, dass NO die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Induktion und Stabilisierung des inhibitorischen κ B-Proteins (I κ B α) verhindert. Die Inhibition der endogenen konstitutiven NO-Produktion durch L-N-Monomethylarginin führte zur Aktivierung von NF- κ B, was auf eine tonische Inhibition von NF- κ B unter basalen Bedingungen hinweist. Inaktiv als NF- κ B/I κ B α -Komplex im Zytosol vorliegend kommt es durch verschiedene Reize (Zytokine wie TNF- α , oxidativen Stress) zur Phosphorylierung, damit zum Abbau des zytoplasmatischen Inhibitors I κ B α und zur Aktivierung von NF- κ B. NO reduziert L/E-Interaktionen durch Herabsetzen der Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ELAM-1 (endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1) oder E-Selektin und ICAM-1. All diese Gene besitzen Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF- κ B in ihren Promotorregionen.³⁶ Es wurde gezeigt, dass NO Proteinphosphatasen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes aktiviert,⁸² so die Dephosphorylierung von I κ B α bewirkt und dessen Abspaltung von NF- κ B inhibiert. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass Oxidantien wie Wasserstoffperoxid die Aktivität der Proteinkinase stimulieren und NF- κ B aktivieren.⁸³ Als Reaktionspartner von Superoxid kann NO diese Aktivierung verhindern. Insgesamt ergibt sich allerdings die Frage, in wie weit diese überwiegend aus *in vitro* Versuchen gewonnenen Daten auf die physiologische Situation übertragbar sind.

Dass die antiadhäsiven Eigenschaften von NO in Bezug auf Leukozyten die Fähigkeit zur Inaktivierung von Superoxid betreffen, wurde auch von Garboursy et al. bestätigt, indem diese zeigten, dass die Leukozyten-Adhäsion durch die Superoxid-Dismutase bzw. einen NO-Donor nur unter Konditionen der Superoxidbildung (nach Hypoxanthin- und Xanthin-Oxidase-Infusion, nicht aber nach Leukotrien B₄-Infusion) inhibiert wird.

Welche Rolle spielt eNOS bei der endothelialen Aktivierung?

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine eNOS-Deletion zu einer deutlichen Hochregulierung der endothelialen VCAM-1-Expression führt. VCAM-1 interagiert mit dem monozytären Integrin VLA-4 und vermittelt die feste Monozyten-Adhäsion an die endotheliale Oberfläche.²

Bei De Caterina et al. hatte die Hemmung der endogenen NO-Produktion mit L-N-Monomethylarginin in Endothelzellen der menschlichen V. saphena einen Anstieg der VCAM-1-Expression zur Folge, aber keine Verstärkung der Zytokin-induzierten VCAM-1-Expression, was eine tonische Inhibierung der VCAM-1-Expression in Endothelzellen durch endogenes endotheliales NO vermuten lässt.³² Dahingegen ergaben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass das alleinige Fehlen der endothelialen NO-Produktion bei mikrovaskulären Endothelzellen, die aus Lungen von eNOS knockout-Mäusen isoliert wurden, nicht in einer endothelialen Aktivierung oder in einer Zunahme der L/E-Interaktionen resultiert. Bei eNOS ko- und Wildtyp-Endothelzellen fand sich eine vergleichbare Oberflächenexpression von E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1. Dazu kam, dass nach Zytokinstimulation mit TNF- α /IL-1 α ein ähnlicher Expressionsanstieg der Adhäsionsmoleküle bei beiden Genotypen beobachtet werden konnte.⁸⁴ Aus diesen Versuchen geht somit hervor, dass das Fehlen von eNOS bei eNOS ko-Zellen nicht automatisch zu einer Oberflächenaktivierung führt.

Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit zeigen hingegen, dass eNOS die endotheliale Aktivierung im Rahmen der Hyperlipidämie vermittelten, spontanen Arteriosklerose unterdrückt. Neben einer intensivierten vaskulären VCAM-1-Expression kommt es in apoE/eNOS dko-Mäusen im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen zu einer Zunahme der Makrophageninfiltration in die Gefäßwand.

Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Beobachtungen der beiden Studien lassen sich nur erklären, wenn man die unterschiedlichen Zellpopulationen und Bedingungen der Experimente in Bezug auf oxidativen Stress berücksichtigt. So wurde unter anderem nachgewiesen, dass die NOS-Inhibierung in Endothelzellen der menschlichen Umbilikalvene durch L-NAME erhöhten intrazellulären oxidativen Stress bedingt, der folglich die Neutrophilen-Endothelzell-Interaktion induziert.⁸⁵ In den genannten früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde zum einen größter Wert auf Endotoxinfreiheit gelegt, zum anderen wurde keine pharmakologische eNOS-Inhibition benötigt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die chronische eNOS-Deletion nicht automatisch zu einer Endothelzellaktivierung führt und damit das von der eNOS produzierte NO nicht erforderlich ist, um die endotheliale Aktivierung kontinuierlich zu unterdrücken. Nichtsdestotrotz hat eNOS Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der Endothelzellen gegenüber oxidativem Stress. NO als Gegenspieler reaktiver Sauerstoffspezies kann somit Signale, die zur endothelialen Aktivierung führen, kompensieren. Unter Arteriosklerosebedingungen, wie im vorliegenden Modell an apoE/eNOS dko-Tieren gezeigt, führt die Abwesenheit von eNOS und die damit verbundene verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu einem vermehrten, auf die Endothelzellen einwirkenden oxidativen Stress, welcher in einer endothelialen Aktivierung resultiert.

Wie wirkt sich die eNOS-Deletion auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen aus?

Neuere Studien weisen auf die Bedeutung der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen als Trigger zur Initiierung und Akzeleration der arteriosklerotischen Plaquebildung hin.^{72, 86, 87} Freedman et al. beobachteten in einer in vitro-Untersuchung, dass mit ADP stimulierte Thrombozyten gesunder Erwachsener NO produzieren, welches die Plättchen-Rekrutierung viel deutlicher als die Plättchen-Aktivierung unterbindet.⁸⁸ In einer anderen Studie dieser Arbeitsgruppe wurde eine erhöhte Plättchen-Rekrutierung in eNOS knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen festgestellt und eine antiaggregatorische Rolle der Thrombozyten vermittelten NO-Produktion beschrieben.⁸⁹ Im Gegensatz dazu demonstrierten Ozuyaman et al., dass Kollagen eNOS^{-/-}- und WT-Plättchen in gleichem Maße aggregierte, dass die Thrombin-induzierte P-Selektin-Oberflächen-Expression in eNOS^{-/-}-Plättchen unverändert war und das Fehlen von eNOS in vivo keine signifikante Beschleunigung der arteriellen Thrombosierung verursacht.⁹⁰ Freedman et al. und Ozuyaman et al. stimmen aber darin überein, dass die eNOS-Deletion keine Plättchenaktivierung verursacht. In einer unserer aktuellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass sowohl menschliche als auch murine Thrombozyten keine eNOS/iNOS-Proteine enthalten.⁹¹ Bezüglich des Einflusses von eNOS auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen konnte festgestellt werden, dass kein Unterschied im Rollen, in der transienten und festen Adhäsion der Thrombozyten ans Endothel zwischen apoE ko- und apoE/eNOS dko-Mäusen existiert. C57BL/6-

Mäusen gegenübergestellt zeigten apoE ko-Tiere bei Massberg et al. deutlich erhöhte Plättchen-Endothelzell-Interaktionen, welche zur Atherogenese beitragen.⁷² Unsere Ergebnisse legen dar, dass das Fehlen von eNOS trotz erhöhter arteriosklerotischer Läsionsfläche bei apoE/eNOS dko-Mäusen^{48, 92} die Plättchen-Endothelzell-Interaktionen nicht weiter verstärkt. Obwohl also gesteigerte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen die Plaquebildung bei apoE ko-Mäusen beschleunigen, tragen sie nicht zum zusätzlichen Wachstum der Läsionsfläche nach eNOS-Deletion bei.

Bestätigen auch andere Autoren unsere Beobachtungen?

Unsere Daten stehen im Einklang mit Studien von Lefer et al., welche eine signifikante Erhöhung des basalen Rollens und der Adhäsion von Leukozyten in mesenterialen Venolen bei eNOS-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen bestätigten und damit die NO-Produktion von eNOS als entscheidend für die Regulation von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen erachteten.⁷¹ Im Gegensatz dazu fanden Sanz et al. mittels intravitraler Mikroskopie im mikrovaskulären Strombett des intestinalen und Cremaster-Bereichs bei WT- und eNOS ko-Mäusen heraus, dass das basale Leukozyten-Rollen und die Adhäsion bei beiden Genotypen keine Unterschiede ergaben. Diese Autoren zeigten, dass die eNOS ein wichtiger Regulator der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in postkapillären Venolen normaler Mäuse ist, wohingegen nNOS den Verlust von eNOS in eNOS ko-Mäusen kompensiert.⁹³ Dass NO modulierend auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Zirkulation einwirkt und dies vor allem auf seine Fähigkeiten zur Inaktivierung von Superoxid bezogen ist, wurde bereits in früheren Studien erkannt.^{30, 94} Ebenso wurde dargelegt, dass die Inhibition der NO-Produktion die Leukozyten-Adhäsion in der Mikrozirkulation fördert^{30, 95} und dass eine Therapie mit NO-Donoren oder L-Arginin das Ausmaß der Neutrophilen-vermittelten Gefäßschädigung in Tiermodellen reduzieren kann.^{17, 96} Als Mechanismus, durch welchen NO vor der schädlichen Wirkung zirkulierender Neutrophiler schützt, wird die Herunterregulation einer Zahl endothelialer Zelladhäsionsmoleküle angesehen.⁹⁷ De Caterina et al. beobachteten durch Behandlung von menschlichen Endothelzellen der V. saphena mit NO-Donoren eine Verringerung der IL-1 α -stimulierten VCAM-1-Expression um 35-55 %.³²

Dabei muss angemerkt werden, dass die genannten Studien aufgrund von Unterschieden im untersuchten Gefäßbett und aufgrund des Fehlens der Hyperlipidämie als Trigger der spontanen Plaquebildung nicht die Situation der spontanen Arterioskleroseentstehung widerspiegeln. Unsere Untersuchungen legen dar, dass das Fehlen der endogenen eNOS vermittelten NO-Produktion die L/E-Interaktionen in einem arteriosklerotisch veränderten Gefäßbett beschleunigt. 2001 wurde von Chen und Kuhlencordt nachgewiesen, dass die beschleunigte Arterioskleroseentwicklung in apoE/eNOS dko-Tieren keine Folge des erhöhten Blutdrucks dieses Genotyps ist.⁹⁸ Deshalb ist die Zunahme arteriosklerotischer Läsionen wahrscheinlich auf lokale Veränderungen der Gefäßwand, wie eine verstärkte endotheliale Aktivierung, die sich in einem Anstieg der VCAM-1-Expression ausdrückt, zurückzuführen.

Trotz allem muss die eNOS Funktion im mehrdimensionalen Zusammenhang betrachtet werden. So wurde über Ozaki et al. nachgewiesen, dass eine chronische eNOS-Überexpression in eNOS transgenen apoE ko-Mäusen die Arteriosklerose durch eine im Verhältnis zur Proteinexpression verminderte NO-Produktion und eine über die eNOS-Entkopplung erhöhte Superoxid-Synthese verschlimmern kann.⁷⁰ Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte über HPLC-Messungen eine Reduktion der totalen Superoxid-Bildung bei apoE/eNOS dko- im Vergleich zu apoE ko-Mäusen festgestellt werden ($6,9 \pm 0,9$ AU/ μ g Protein, n=13 vs. $9,4 \pm 0,5$ AU/ μ g Protein, n=14, p=0,02: bisher nicht veröffentlichte Daten), was auf einen Beitrag zum oxidativen Stress durch eine eNOS-Entkopplung bei apoE ko-Tieren schließen lässt. Da apoE/eNOS dko-Mäuse aber trotz einer verminderten vaskulären Superoxid-Produktion vermehrt arteriosklerotische Läsionen entwickeln, kann abgeleitet werden, dass die reduzierte Superoxid-Bildung nicht die proatherogene Wirkung eines NO-Mangels ausgleichen kann und die anti-atherogenen Eigenschaften von eNOS überwiegen.

Welches therapeutische Potential steckt in der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in Bezug auf Restenose, Transplantat- und Bypass-Arteriosklerose?

Zuallererst sei gesagt, dass für eine mögliche Anwendung einer NOS-Gentherapie oder für eine pharmakologische Beeinflussung der NOS-Expression eine Reihe von Faktoren (u.a. technische Limitationen, Redoxstatus des Gefäßsystems, Verfügbarkeit von Substrat und Kofaktoren) berücksichtigt werden muss, um

vorhersehbare Therapieerfolge zu erreichen. In Tiermodellen konnten allerdings bereits gute Forschungsergebnisse erzielt werden, sodass die NOS-Gentherapie eine vielversprechende zukünftige Therapieoption darstellen könnte.

Bei koronarer Herzkrankheit ist die Restenose auf lange Sicht die bedeutendste Komplikation nach einer Stent-Implantation, da sie bei 15 bis 60 % der Patienten den Therapieerfolg limitiert. Wachstum und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen resultieren in neointimaler Proliferation nach einer Gefäßwandverletzung und sind Schlüsselmechanismen der In-Stent-Restenose.⁹⁹ Lafont et al. demonstrierten, dass der Schweregrad der Restenose nach Angioplastie mit endothelialer Dysfunktion und Kollagen-Akkumulation korrelierte.¹⁰⁰ Als eines von zahlreichen positiven Beispielen sei das Ergebnis einer aktuellen Studie von Cooney et al. aufgeführt, in der es nach einem adenoviralen Gentransfer von eNOS nach Endothelschädigung der A. carotis von Kaninchen zu einer signifikanten Reduktion des Neointima/Media-Verhältnisses und zusätzlich zu einer verbesserten Endothelregeneration kam.¹⁰¹

Ein zweites Feld in der Behandlung der KHK bildet die koronare Bypassoperation. Während im ersten postoperativen Monat thrombotische Bypassverschlüsse das Hauptproblem darstellen, ist die späte postoperative Phase von Bypassarteriosklerose und Neointimahyperplasie bestimmt. So verschließen sich im ersten postoperativen Jahr bis zu 15 % der Venentransplantate, gefolgt von Verschlussraten von 1-2 % pro Jahr in den Jahren 1 bis 6 und von 4 % in den Jahren 6-10.¹⁰² Dass der eNOS-Gentransfer auch in diesem Bereich von großem Nutzen sein könnte, zeigten Cable et al. anhand eines ex vivo Gentransfers von eNOS mittels adenoviraler Vektoren. Sowohl im Endothel als auch in der Adventitia der menschlichen V. saphena konnte die Transgenexpression nachgewiesen werden, die eine Reduktion der Intimahyperplasie zur Folge hatte.¹⁰³ In Schweine-Koronararterien konnten mit dieser Methode erhöhte Nitritspiegel und eine verbesserte Relaxation erreicht werden.¹⁰⁴ Im Vergleich zu aortokoronaren Venenbypässen weisen Arterien-Transplantate der A. mammaria und A. radialis eine höhere Resistenz gegenüber der Entwicklung einer Bypassarteriosklerose auf. Die Problematik von A. radialis-Bypässen liegt aber in der Neigung zu Vasospasmen in mindestens 5 bis 10 % der Fälle. Auch hier konnte ein ex vivo adenoviraler eNOS-Gentransfer in humane Radialisarterien eine KCl oder Prostaglandin F₂α-induzierte Vasokonstriktion um knapp 50 % reduzieren.¹⁰⁵

Nach menschlicher Herztransplantation wurde ein Verlust der eNOS-Immunreaktivität beobachtet und diese für die oftmals nach Herztransplantation festgestellte

endotheliale Dysfunktion verantwortlich gemacht.¹⁰⁶ Während des kardialen Ischämie-Reperfusionsschadens wird die Neutrophileninfiltration ins Myokard über Adhäsionsmolekülexpression auf aktiviertem koronarem Endothel vermittelt. Iwata et al. gelang es durch eine intraoperative Liposomen vermittelte eNOS-Überexpression in einem Transplantationsmodell von Kaninchen-Herzen eine frühe eNOS-Expression zu erzeugen, welche die Aktivierung des nukleären Faktor- κ B inhibierte und damit die Adhäsionsmolekülexpression und die Leukozyteninfiltration verminderte.¹⁰⁷

5.0 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in Hinblick auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen bei der spontanen Arterioskleroseentwicklung zu untersuchen. Apolipoprotein E knockout-Mäuse und Apolipoprotein E knockout/endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase knockout-Mäuse dienten dabei als genetisches Modell.

Durch IVM-, Real-time PCR-, Western Blot und immunhistochemische Versuche konnte gezeigt werden, dass apoE/eNOS dko-Tiere im Vergleich zu apoE ko-Kontrollen signifikant erhöhte L/E-Interaktionen, eine verstärkte endotheliale Adhäsionsmolekülexpression und eine gesteigerte Makrophagen-Infiltration in die Gefäßwand aufweisen. Duplexsonographisch vergleichbare Widerstands-Indices bei beiden Genotypen belegen eine ähnliche Hämodynamik und schließen veränderte Flussbedingungen als Ursache der erhöhten L/E-Interaktionen aus.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verminderte NO-Produktion in apoE/eNOS dko-Mäusen die gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in diesem Modell bedingt und andere Quellen vaskulären Stickstoffmonoxids, genauer gesagt nNOS und iNOS, dies nicht zu kompensieren vermögen. Überraschenderweise nahm die eNOS-Deletion keinen Einfluss auf die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen, was gegen eine bedeutende Rolle von Blutplättchen bei der beschleunigten Arterioskleroseentwicklung von apoE/eNOS dko-Mäusen spricht.

6.0 Literaturverzeichnis

1. Goldschmidt-Clermont PJ, Creager MA, Losordo DW, Lam GK, Wassef M, Dzau VJ. Atherosclerosis 2005: recent discoveries and novel hypotheses. *Circulation*. Nov 22 2005;112(21):3348-3353.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. Sep 14 2000;407(6801):233-241.
3. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England journal of medicine*. Aug 19 1976;295(8):420-425.
4. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *The New England journal of medicine*. Aug 12 1976;295(7):369-377.
5. Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Jr. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet*. May 23 1992;339(8804):1268-1278.
6. Becker AE, de Boer OJ, van Der Wal AC. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annual review of medicine*. 2001;52:289-297.
7. Leinonen M, Saikku P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *The Lancet infectious diseases*. Jan 2002;2(1):11-17.
8. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of clinical investigation*. Mar 1999;103(5):747-753.
9. Gibson FC, 3rd, Yumoto H, Takahashi Y, Chou HH, Genco CA. Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *Journal of dental research*. Feb 2006;85(2):106-121.
10. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *The American journal of pathology*. Jul 1999;155(1):1-5.
11. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. Nov 27 1980;288(5789):373-376.
12. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM,

- Loscalzo J. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. Jun 1 2004;109(21):2617-2625.
13. Britten MB, Zeiher AM, Schachinger V. Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options. *Journal of internal medicine*. Apr 1999;245(4):315-327.
14. Ku DD. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science (New York, N.Y.)*. Nov 5 1982;218(4572):576-578.
15. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. Oct 23 1986;315(17):1046-1051.
16. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *Faseb J*. Apr 1991;5(7):2029-2034.
17. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circulation research*. Mar 1994;74(3):376-382.
18. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. Jun 15 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
19. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. Dec 10 2002;106(24):3073-3078.
20. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Nov 1982;47(5):412-426.
21. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology*. Dec 2000;279(6):L1005-1028.
22. Salvemini D, de Nucci G, Sneddon JM, Vane JR. Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation. *British journal of pharmacology*. Aug 1989;97(4):1145-1150.
23. Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, Ross CR, Granger DN. NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced

- leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circulation research*. Mar 16 2001;88(5):499-505.
24. Lin SJ, Shyue SK, Hung YY, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB, Chen YL. Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Feb 2005;25(2):334-340.
25. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. Dec 2003;42(6):1075-1081.
26. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*. Nov 1998;141(1):1-15.
27. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 1987;84(24):9265-9269.
28. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J*. Jan 1989;3(1):31-36.
29. Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *Journal of cardiovascular pharmacology*. Apr 1995;25(4):674-678.
30. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jun 1 1991;88(11):4651-4655.
31. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. Nov 7 1987;2(8567):1057-1058.
32. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces

- endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of clinical investigation*. Jul 1995;96(1):60-68.
33. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *The American journal of physiology*. Feb 1992;262(2 Pt 2):H611-615.
34. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *The Journal of clinical investigation*. Nov 1 1997;100(9):2146-2152.
35. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular research*. Aug 1 2002;55(2):250-260.
36. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. Jun 9 1995;270(23):14214-14219.
37. Lee SK, Kim JH, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS. Exogenous nitric oxide inhibits VCAM-1 expression in human peritoneal mesothelial cells. Role of cyclic GMP and NF-kappaB. *Nephron*. Apr 2002;90(4):447-454.
38. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Archives of biochemistry and biophysics*. Jun 1 1995;319(2):491-497.
39. Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. Feb 1994;375(2):81-88.
40. Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS letters*. Sep 13 1993;330(2):181-185.
41. Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG, McIntire LV. Nitric oxide production by cultured human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. *The American journal of physiology*. Feb 1998;274(2 Pt 2):H616-626.
42. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. Aug 15 1999;43(3):521-531.
43. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide

- synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 1 1991;88(17):7773-7777.
44. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 1997;17(11):2479-2488.
 45. Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *The Journal of biological chemistry*. Aug 28 1998;273(35):22635-22639.
 46. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *The Journal of biological chemistry*. Oct 2 1998;273(40):25804-25808.
 47. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. Dec 5 1992;267(34):24173-24176.
 48. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. Jul 24 2001;104(4):448-454.
 49. Kuhlencordt PJ, Hotten S, Schodel J, Rutzel S, Hu K, Widder J, Marx A, Huang PL, Ertl G. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Jul 2006;26(7):1539-1544.
 50. Chan ED, Chan J, Schluger NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. Nov 2001;25(5):606-612.
 51. Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J, Hassing H, Burton C, Mundt S, Chun S, Fletcher D, Card DJ, Lisnock J, Weikel R, Bergstrom JD, Shevell DE, Hermanowski-Vosatka A, Sparrow CP, Chao YS, Rader DJ, Wright SD, Pure E. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results

- in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol*. Sep 15 2000;165(6):3430-3435.
52. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. Jun 26 2001;103(25):3099-3104.
53. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circulation research*. Nov 23 2001;89(11):1073-1080.
54. Indolfi C, Torella D, Coppola C, Curcio A, Rodriguez F, Bilancio A, Leccia A, Arcucci O, Falco M, Leosco D, Chiariello M. Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. *Circulation research*. Dec 13 2002;91(12):1190-1197.
55. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*. Sep 2003;285(3):C499-508.
56. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Jan 2003;284(1):R1-12.
57. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, Harrison DG. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Aug 1995;15(8):1255-1261.
58. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation research*. Jul 1993;73(1):205-209.
59. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Luscher TF. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation*. Jun 30 1998;97(25):2494-2498.
60. Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*. Feb 2001;37(2 Part 2):529-534.

61. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation research*. Feb 2 2001;88(2):E14-22.
62. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of clinical investigation*. Mar 1999;103(6):897-905.
63. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clinical cardiology*. Nov 1997;20(11 Suppl 2):II-11-17.
64. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2003;111(8):1201-1209.
65. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *The Journal of clinical investigation*. Mar 15 1998;101(6):1225-1232.
66. 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 remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Feb 2001;21(2):201-207.
67. Jones SP, Greer JJ, van Haperen R, Duncker DJ, de Crom R, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 15 2003;100(8):4891-4896.
68. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, van Haperen R, de Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefer DJ. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2004;286(1):H276-282.

69. Lee PC, Wang ZL, Qian S, Watkins SC, Lizonova A, Kovesdi I, Tzeng E, Simmons RL, Billiar TR, Shears LL, 2nd. Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. Mar 27 2000;69(6):1186-1192.
70. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, Hirata K, Yasui H, Sakurai H, Yoshida Y, Masada M, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. Aug 2002;110(3):331-340.
71. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, Baines A, Grisham MB, Cockrell AS, Huang PL, Scalia R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *The American journal of physiology*. Jun 1999;276(6 Pt 2):H1943-1950.
72. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *The Journal of experimental medicine*. Oct 7 2002;196(7):887-896.
73. Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Mar 2002;282(3):H1111-1117.
74. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *The Journal of clinical investigation*. May 2006;116(5):1226-1229.
75. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*. May 3 1996;272(5262):685-688.
76. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. May 1998;18(5):842-851.
77. Newton CR, Graham A. *PCR*: Spektrum Akademischer Verlag; 1997.

78. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.; 2001.
79. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. Oct 1985;150(1):76-85.
80. Huck K. *Kursbuch Doppler- und Duplexsonographie. Nach den Richtlinien der DEGUM und der KBV*: Thieme; 2005.
81. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. Sep 21 1995;377(6546):239-242.
82. Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol*. Feb 15 1993;150(4):1509-1516.
83. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *The Journal of biological chemistry*. Aug 15 1993;268(23):17131-17137.
84. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, Han F, Preffer F, Rosenzweig A, Sessa WC, Gimbrone MA, Jr., Ertl G, Huang PL. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. May 2004;286(5):C1195-1202.
85. Niu XF, Smith CW, Kubes P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circulation research*. Jun 1994;74(6):1133-1140.
86. Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, Gawaz M. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation*. Aug 23 2005;112(8):1180-1188.

87. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nature medicine*. Jan 2003;9(1):61-67.
88. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *The Journal of clinical investigation*. Jul 15 1997;100(2):350-356.
89. Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circulation research*. Jun 25 1999;84(12):1416-1421.
90. Ozuyaman B, Godecke A, Kusters S, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J. Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Thrombosis and haemostasis*. Jun 2005;93(6):1161-1167.
91. Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, Birschmann I, Kuhlencordt PJ, Muller-Esterl W, Lohmann SM, Walter U. NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost*. Aug 2008;6(8):1376-1384.
92. Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *The Journal of clinical investigation*. Feb 2000;105(4):451-458.
93. Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, Kubes P. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *British journal of pharmacology*. Sep 2001;134(2):305-312.
94. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *The American journal of physiology*. Sep 1993;265(3 Pt 2):H862-867.
95. Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology*. Oct 1994;107(4):1050-1058.

96. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation*. Jul 1992;86(1):279-288.
97. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *The American journal of physiology*. Oct 1994;267(4 Pt 1):G562-568.
98. Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, Gyurko R, Huang PL. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation*. Nov 13 2001;104(20):2391-2394.
99. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet*. Jan 18 2003;361(9353):247-249.
100. Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Levy BI, Desnos M, Guerot C, Boulanger CM. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation*. Sep 7 1999;100(10):1109-1115.
101. Cooney R, Hynes SO, Sharif F, Howard L, O'Brien T. Effect of gene delivery of NOS isoforms on intimal hyperplasia and endothelial regeneration after balloon injury. *Gene therapy*. Mar 2007;14(5):396-404.
102. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*. Mar 10 1998;97(9):916-931.
103. Cable DG, Caccitolo JA, Caplice N, O'Brien T, Simari RD, Daly RC, Dearani JA, Mullany CJ, Orszulak TA, Schaff HV. The role of gene therapy for intimal hyperplasia of bypass grafts. *Circulation*. Nov 9 1999;100(19 Suppl):II392-396.
104. Cable DG, O'Brien T, Kullo IJ, Schwartz RS, Schaff HV, Pompili VJ. Expression and function of a recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in porcine coronary arteries. *Cardiovascular research*. Sep 1997;35(3):553-559.

105. Cable DG, Caccitolo JA, Pearson PJ, O'Brien T, Mullany CJ, Daly RC, Orszulak TA, Schaff HV. New approaches to prevention and treatment of radial artery graft vasospasm. *Circulation*. Nov 10 1998;98(19 Suppl):II15-21; discussion II21-12.
106. Vejlstrup NG, Andersen CB, Boesgaard S, Mortensen SA, Aldershvile J. Temporal changes in myocardial endothelial nitric oxide synthase expression following human heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. Feb 2002;21(2):211-216.
107. Iwata A, Sai S, Nitta Y, Chen M, de Fries-Hallstrand R, Dalesandro J, Thomas R, Allen MD. Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts. *Circulation*. Jun 5 2001;103(22):2753-2759.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Peter J. Kuhlencordt für das Überlassen des Themas, für seine ständige Betreuung und konstruktive Kritik.

Insbesondere möchte ich Frau Alla Ganscher, Frau Gabriele Riehl und Frau Padmapriya Ponnuswamy Dank aussprechen, die mich mit viel Engagement und Geduld bei meiner experimentellen Arbeit unterstützt haben.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mir während meines gesamten Medizinstudiums immer aufmunternd zur Seite standen.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Angelika Schröttle
Geburtsdatum: 06.04.1983
Geburtsort: Bad Kissingen
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Josef Schröttle, Rektor a.D.
Monika Schröttle, geb. Bühner
Geschwister: Bianca Englisch, Lehrerin
Michael Schröttle, Industriemechaniker

Schulbildung

09/1989-07/1993: Grundschule Sandberg
09/1993-07/2002: Rhön-Gymnasium Bad Neustadt/Saale

Ausbildung

10/2002-11/2008: Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2004: Ärztliche Vorprüfung
11/2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

08/2007-12/2007: Innere Medizin, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt
12/2007-03/2008: Gynäkologie und Geburtshilfe, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt
03/2008-07/2008: Chirurgie, Leopoldina-Krankenhaus Schweinfurt

Beruflicher Werdegang

Seit 15/04/2009: Assistenzärztin für Innere Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München