

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

**Ezetimib reduziert Arteriosklerose  
in  
eNOS defizienten Apolipoprotein-E-Knockout Mäusen**

**Inaugural - Dissertation**

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

**vorgelegt von**

**Sebastian Rützel**

**aus Würzburg**

**Würzburg, November 2009**

**Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl**

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

**Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2010**

**Der Promovend ist Arzt**

**Meiner Familie**



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Arteriosklerose - Häufigkeit und Pathogenese.....	1
1.2	Cholesterin und Lipoproteine .....	2
1.3	Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid .....	4
1.4	Dyslipoproteinämie und ihre Therapie.....	5
1.5	Fragestellung.....	7
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>8</b>
2.1	Chemikalien .....	8
2.2	Lösungen und Puffer.....	9
2.3	Antikörper.....	12
2.4	Enzyme .....	12
2.5	Kits.....	12
2.6	Größenstandards für DNS.....	13
2.7	Größenstandard für Proteine.....	13
2.8	Nukleotide, Oligonukleotide, DNS .....	13
2.9	Software.....	14
2.10	Geräte .....	14
2.11	Verbrauchsmaterialien .....	14
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>16</b>
3.1	Versuchstiere .....	16
3.2	Isolation genomischer DNS.....	16
3.3	<b>Polymerasekettenreaktion .....</b>	<b>17</b>
3.3.1	Durchführung der Polymerasekettenreaktion.....	17
3.3.2	Elektrophoretische Analyse der amplifizierten DNS-Sequenzen.....	18
3.4	<b>Southern Blot.....</b>	<b>18</b>
3.4.1	DNS-Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	19
3.4.2	Auftrennung der DNS durch Agarosegelelektrophorese.....	19
3.4.3	Vorbereitung des Agarosegels für den Transfer der DNS.....	19
3.4.4	Kapillartransfer der DNS auf eine Nitrozellulosemembran .....	20
3.4.5	Radioaktive Markierung der DNS-Sonde .....	20
3.4.6	Prähybridisierung und Hybridisierung .....	20

3.4.7	Waschen der Nirozellulosemembran.....	21
3.4.8	Autoradiografie .....	22
<b>3.5</b>	<b>Diät .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6</b>	<b>Entnahme der Aorta .....</b>	<b>22</b>
<b>3.7</b>	<b>Lipide und Lipoproteinprofile.....</b>	<b>23</b>
3.7.1	Darstellung der Lipoproteinprofile mittels FPLC .....	23
3.7.2	Messung der Plasma-Cholesterinkonzentrationen .....	23
3.7.3	Bestimmung der Triglyceridkonzentrationen im Plasma .....	24
<b>3.8</b>	<b>Planimetrie der aortalen Läsionsflächen.....</b>	<b>25</b>
<b>3.9</b>	<b>Proteinextraktion aus Aorten.....</b>	<b>27</b>
<b>3.10</b>	<b>Messung der Proteinkonzentration.....</b>	<b>27</b>
<b>3.11</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>28</b>
3.11.1	Auftrennung der Proteine durch Acrylamidgelelektrophorese .....	28
3.11.2	Durchführung des Nasstransfers mit anschließendem Blocken der Membran .....	28
3.11.3	Proteinidentifikation mittels Antikörpern.....	29
3.11.4	Chemiluminiszenznachweis der Sekundärantikörper .....	29
<b>3.12</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Bestimmung des Genotyps für apoE (PCR).....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung des Genotyps für eNOS (Southern Blot) .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>Lipide und Lipoproteinprofile.....</b>	<b>32</b>
4.3.1	Die Behandlung mit Ezetimib nicht aber der eNOS-Genotyp verringert die Konzentration von Cholesterin und Triglyceriden in den VLDL- und LDL-Fractionen der FPLC .....	32
4.3.2	Ezetimib verringert im Gegensatz zum eNOS-Genotyp die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma .....	33
<b>4.4</b>	<b>Messung der Plaquemasse in den Aorten.....</b>	<b>34</b>
4.4.1	Bei eNOS-Defizienz nimmt die Plaquemasse von ApoE-Ko Tieren zu .....	35
4.4.2	Behandlung mit Ezetimib reduziert die Plaquemasse bei jedem Genotyp, bei männlichen apoE/eNOS-Doppelknockout Tieren jedoch weniger als in den entsprechenden apoE-Knockout Mäusen .....	35
4.4.3	Auch unter Ezetimibbehandlung haben apoE/eNOS-Doppelknockouttiere eine größere Plaquelast als apoE-Knockoutmäuse.....	36
<b>4.5</b>	<b>Weder Geschlecht noch Behandlung mit Ezetimib beeinflussen die Menge an eNOS-Protein in der Gefäßwand von apoE-Ko Mäusen.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Veränderungen der Lipide und Lipoproteine.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Veränderungen der Gesamtläsionsfläche.....</b>	<b>38</b>

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>47</b>

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Arteriosklerose - Häufigkeit und Pathogenese

Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachten im Jahr 2002 weltweit 16,7 Millionen Todesfälle. Das waren 29,2 % aller Todesfälle und die WHO befürchtet eine Zunahme der Inzidenz: 2010 werden sie die Haupttodesursache in den Entwicklungsländern sein<sup>1</sup>. Die in den meisten Fällen zu Grunde liegende Störung, Arteriosklerose, ist ein komplexes Erkrankungsbild, bei dem es zu einer entzündlichen Veränderung der Wände vor allem der großen und mittelgroßen Arterien kommt. Sie kann sich als koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Arteriosklerose, viszerale Arteriosklerose oder auch als periphere arterielle Verschlusskrankung manifestieren. Ursächlich liegen der Erkrankung verschiedene Risikofaktoren zu Grunde, die sich in Umweltfaktoren wie geringe körperliche Betätigung, Nikotinmissbrauch und fettreiche Ernährung einerseits und genetische Faktoren wie Dyslipoproteinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperhomozysteinämie und männliches Geschlecht andererseits unterteilen lassen.

Nach der „response to injury“ Hypothese führen diese Faktoren zu einem Entzündungsreiz in der Gefäßwand, worauf das Endothel proinflammatorische Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Substanzen bildet. Diese Substanzen und die erhöhte Permeabilität des Endothels führen zu einem verstärkten Einwandern von im Blutstrom zirkulierenden Monozyten und T-Lymphozyten in die Gefäßwand. Darüber hinaus vermitteln diese Faktoren die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der mononukleären Zellen zu gewebständigen Makrophagen. Die Folge ist die Ausbildung eines „fatty streaks“, der Vorstufe einer arteriosklerotischen Plaque.

Entzündliche Prozesse führen zu einem erhöhten oxidativen Stress. Darunter versteht man ein verstärktes Anfallen von freien Radikalen wie beispielsweise des Superoxidanions ( $O_2^-$ ) oder des Hydroxylradikals ( $OH^\bullet$ ). Diese oxidieren unter anderem in die Gefäßwand eingelagerte „low density lipoprotein“ (LDL)-Partikel. Oxidativ modifiziertes LDL (Ox-LDL) wird von den Makrophagen aufgenommen, welche sich daraufhin in fettreiche Schaumzellen umwandeln und aktiviert werden. Darüber hinaus



ist Ox-LDL ein chemotaktischer Reiz für Makrophagen, verstärkt die endotheliale Produktion von Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (M-CSF) und Monozyten chemotaktischen Protein (MCP-1) und kann selbst wieder freie Radikale bilden<sup>2</sup>.

Bei anhaltender LDL-Ablagerung im Entzündungsherd werden von den aktivierten Makrophagen und T-Zellen Zytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert, die zu einem Einwandern von glatten Muskelzellen führen. Diese Muskelzellen wandeln sich vom kontraktile in den sekretorischen Phänotyp um, proliferieren und bilden die extrazelluläre Matrix und die fibröse Kappe der Plaque. Absterbende Schaumzellen geben ihren Inhalt an die Umgebung ab, wodurch sich ein fetthaltiger nekrotischer Kern im Inneren des Herdes bildet. Zu Beginn erfolgt das Wachstum der Läsion nach peripher, im späteren Verlauf kommt es jedoch auch zu einer Einengung des Gefäßlumens. Dieser Prozess wird als „remodeling“ der Plaque bezeichnet. Die zunehmende Anzahl an Makrophagen führt zu einem Anstieg der Konzentration von C-reaktiven Protein und Fibrinogen im Plasma. Diese Faktoren gelten als frühe Marker für Arterioskleroseentwicklung, scheinen aber auch an der Plaquebildung beteiligt zu sein<sup>3</sup>. Bei fortbestehender Entzündungsaktivität entsteht eine fortgeschrittene, komplizierte Läsion. Die Makrophagen geben verschiedene Metalloproteinasen (unter anderen Kollagenase und Elastase) an die Umgebung ab, welche die extrazelluläre Matrix und die Plaque nach luminal abgrenzende fibröse Kappe andauen. In diesem Stadium kommt es zusätzlich zum Einsprossen von Blutgefäßen in die Plaque und zur Verkalkung der extrazellulären Matrix. Diese Prozesse führen vor allem im Bereich der Schulterregion der fibrösen Kappe zu einer Destabilisierung der Plaque. In diesem Stadium wird die Läsion auch als vulnerable Plaque bezeichnet. Kommt es zu einem Aufbrechen der Kappe, so kann die Freisetzung von prokoagulatorischem Kollagen und tissue factor (TF) zum plötzlichen Verschluss des Gefäßes durch eine Aktivierung der Blutgerinnung und Thrombusbildung führen<sup>2, 4</sup>. Komplikationen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall und akute Extremitätenischämien können die Folge sein.

## **1.2 Cholesterin und Lipoproteine**

Die Cholesterinverteilung im Körper ist in der Pathogenese der Arteriosklerose von entscheidender Bedeutung. Als essentieller Membranbestandteil muss Cholesterin von

den Orten der Bildung (vor allem der Leber) beziehungsweise der Resorption (Duodenum) in alle Gewebe transportiert werden. Da es sich um ein lipophiles, schwer wasserlösliches Molekül handelt, muss es wie andere Fette an Apolipoproteine gebunden in Form so genannter Lipoproteine im Blut transportiert werden. Die Namensgebung erfolgt hier nach der Dichte der Lipoproteine, da sie eine Auftrennung durch Ultrazentrifugation ermöglicht. Einen Überblick über die verschiedenen Lipoproteine verschafft Tabelle 1.1.

	Chylo- mikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte in g/ml	0,93	0,93-1,006	1,019-1,063	1,063-1,21
Durchmesser in nm	75-1200	30-80	18-25	5-12
Cholesteringehalt in %	5	19	50	19
Enthaltene Apolipoproteine in absteigender Häufigkeit	Apo A-I Apo C Apo E Apo B <sub>48</sub>	Apo C Apo B <sub>100</sub> Apo E	Apo B <sub>100</sub> Apo E Apo C	Apo A-I Apo A-II Apo C Apo B Apo D und E

**Tabelle 1.1: Zusammenstellung der Eigenschaften der verschiedenen Lipoproteine (nach <sup>5</sup>)**

Nach der Aufnahme des Cholesterins aus der Nahrung durch einen speziellen Transportmechanismus bilden die Enterozyten wenig Cholesterin enthaltende Chylomikronen und geben sie an die Lymphe ab. Nach der Abgabe der hauptsächlich enthaltenen Neutralfette an die Peripherie bezeichnet man diese als Remnants. Sie werden von der Leber aufgenommen und die enthaltenen Stoffe metabolisiert.

Die Leber gibt „very low density lipoproteins“ (VLDLs) ans Blut ab, welche in der Leber synthetisierte Triglyceride und Cholesterin zu extrahepatischen Geweben transportieren. Dann kehren sie als „intermediate density lipoproteins“ (IDLs) zur Leber zurück um in „low density lipoproteins“ (LDLs) umgewandelt zu werden. LDL-Partikel sind sehr cholesterinreich und werden von den Zielzellen mittels des LDL-Rezeptors

phagozytiert. Für den reversen Cholesterintransport von der Peripherie zur Leber sind die „high density lipoproteins“ (HDLs) zuständig. In der Leber werden Gallensäuren aus Cholesterin gebildet, die in den Darm abgegeben werden. Diese unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf. Die Leber stellt somit den einzigen Ort der Cholesterinausscheidung dar<sup>5</sup>.

Den Apolipoproteinen kommt beim Transport nicht nur die „Verpackungsfunktion“ zu, sie sind darüber hinaus auch von entscheidender Bedeutung bei der Identifizierung und Aufnahme der Lipoproteine durch die verschiedenen Gewebe. Bei einer gestörten Proteinstruktur oder einem Mangel des jeweiligen Apolipoproteins bzw. des mit ihm interagierenden Rezeptors kann das Lipoprotein nicht aus dem Blut entfernt werden, kumuliert und lagert sich schließlich extrazellulär ab<sup>6</sup>. Normale Mäuse entwickeln keine Arteriosklerose, fehlt ihnen jedoch das Apolipoprotein E (ApoE-Ko), so kommt es bereits nach wenigen Lebenswochen zur Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques<sup>7</sup>. Das Füttern einer fettreichen „western type“ Diät beschleunigt diesen Prozess noch. Dieses Tiermodell der Arteriosklerose ermöglicht es die Pathomechanismen der Erkrankung eingehend zu untersuchen.

### **1.3 Endotheliale Dysfunktion und Stickstoffmonoxid**

Patienten mit arterieller Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Diabetes mellitus und Raucher zeigen häufig eine gestörte Endothelfunktion. Abschnitte ihre Koronararterien reagieren auf den Relaxationsfaktor Acetylcholin mit einer paradoxen Vasokonstriktion sowie einer verminderten flussmedierten Vasodilatation<sup>8, 9</sup>. Die endotheliale Dysfunktion wird auf eine verminderte endotheliale Produktion des Radikals Stickstoffmonoxid zurückgeführt, welches als „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) identifiziert werden konnte<sup>10, 11</sup>. Im gesunden Gefäß wird Stickstoffmonoxid von der endothelialen NO-Synthase (eNOS, NOS III) gebildet. Die endotheliale NO-Bildung wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. So wird die Expression des eNOS-Gens durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Es enthält Erkennungssequenzen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren. Die Regulierung erfolgt durch Insulin, den Fibroblastenwachstumsfaktor und auch Scherkräfte, welche die Bildung von eNOS fördern, wohingegen die Proteinkinase C die eNOS-Expression verringert. „Vascular

endothelial growth factor“ (VEGF) steigert die Stabilität der eNOS mRNA und konsekutiv die Proteinkonzentration. Das fertige eNOS-Protein wiederum besitzt eine Basalaktivität die durch zellwandständige Komplexbildung der eNOS mit anderen Proteinen aufrechterhalten wird und durch Scherkräfte gesteigert werden kann. Zusätzlich kommt es durch Acetylcholin und Scherkräfte zu einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und hierdurch zur calmodulinabhängigen Aktivierung des Enzyms<sup>12</sup>.

Bei der NO-Synthese kommt es unter Verbrauch von NADPH zum Einbau von reduziertem Sauerstoff in die Guanidinogruppe von L-Arginin, wodurch NO und L-Citrulin entstehen. Als Kofaktoren werden Tetrahydrobiopterin, Flavin-Adenin-Dinukleotid und Flavinmononukleotid benötigt<sup>13</sup>. Als Ursache für eine unzureichende NO-Produktion kommen neben regulatorischen Effekten auf Genebene ein Substratmangel (L-Arginin) oder ein Kofaktormangel (Tetrahydrobiopterin), ein erhöhter NO-Abbau oder eine Veränderung in Signalprozessen über die Zellmembran hinweg, in Frage<sup>14, 15</sup>.

Um seine Wirkung zu entfalten diffundiert NO vom Ort der Bildung, dem Endothel in die glatten Gefäßmuskelzellen, wo es die zytosolische Guanylatzyklase aktiviert. Der folgende Anstieg der cGMP-Konzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase G, welche durch Phosphorylierung einer Reihe von Proteinen eine Relaxation der Muskelzellen vermittelt<sup>16</sup>. Mäuse in denen eNOS deletiert wurde, zeigen eine fehlende endotheliale Relaxation und eine arterielle Hypertonie<sup>17</sup>.

#### **1.4 Dyslipoproteinämie und ihre Therapie**

Dyslipoproteinämie, also die Störung der Lipoproteinzusammensetzung des Blutes, ist einer der häufigsten und wichtigsten Risikofaktoren für die Arterioskleroseentwicklung. Am bedeutendsten ist dabei die LDL-Cholesterin Konzentration, die in Abhängigkeit von weiteren Risikofaktoren möglichst unter 160 bis 100 mg/dl liegen sollte. Dem HDL-Cholesterin kommt bei kardiovaskulären Erkrankungen eine protektive Rolle zu. Sein Spiegel sollte über 35 mg/dl liegen<sup>18</sup>. Sollten supportive Maßnahmen, wie eine Verbesserung der Ernährungsgewohnheiten und des Lebensstils nicht ausreichen um den Cholesterinspiegel zu normalisieren kommen verschiedene Medikamente zum

Einsatz. Die größte Rolle in den vergangenen Jahren spielten dabei die HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren (so genannte Statine), die das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese blockieren. Sie bewirken eine Abnahme des LDL-Cholesterins und eine Zunahme des HDL-Cholesterinspiegels. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Medikamentengruppe die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen zu senken vermag<sup>19-21</sup>. In Zellkulturexperimenten konnten für diese Präparategruppe eine Reihe zusätzlicher positiver Effekte auf die Pathomechanismen der Arteriosklerose nachgewiesen werden, die nicht direkt mit der Cholesterinsenkung zusammenhängen. Zu diesen sogenannten pleiotropen Effekten zählt eine verbesserte Endothelfunktion, eine Verringerung des oxidativen Stresses, eine Förderung der Neovaskularisierung, eine entzündungshemmende Wirkung, eine Hemmung des Zellwachstums und schließlich noch eine Plaquestabilisierung<sup>22-24</sup>. Eine erhöhte endotheliale NO-Verfügbarkeit spielt bei vielen dieser Effekte eine entscheidende Rolle. So wird die eNOS-mRNA-Stabilität erhöht und die eNOS-Aktivität über Phosphorylierung des Enzyms im Zuge der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K)/Proteinkinase AKT Signalkaskade gesteigert<sup>25, 26</sup>. Da auch eine Senkung des Plasmacholesterinspiegels durch Diät oder LDL-Apharese den oxidativen Stress und damit die Endothelfunktion zu verbessern vermag, ist es schwierig zwischen cholesterinabhängigen und cholesterinunabhängigen Effekten der Statine zu unterscheiden<sup>27-31</sup>.

Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten kann mit diesen Präparaten jedoch nicht bei allen Patienten eine ausreichende Senkung des Cholesterinspiegels erzielt werden. Bei diesen Patienten kann ein neues Präparat namens Ezetimib alleine oder in Kombination mit einem Statin eingesetzt werden. Ezetimib und vor allem sein glucuronidierter Metabolit hemmen selektiv die Cholesterinresorption im Darm<sup>32, 33</sup>. Dabei wird nicht nur in der Nahrung enthaltenes Cholesterin an der Aufnahme gehindert, sondern auch der enterohepatische Kreislauf für Cholesterin durchbrochen. Dies führt zu einer Senkung des Cholesterinspiegels im Blut um bis zu 20 %<sup>34</sup>. Als Wirkungsziel des neuen Wirkstoffes konnte das Niemann-Pick C1-Like 1-Protein identifiziert werden<sup>35</sup>. In verschiedenen Säugetierspezies senkt Ezetimib den Cholesterinspiegel in Abhängigkeit von der Affinität zum Zielprotein und es verringert die Plaquemasse in der apoE-Ko Maus<sup>32, 36-39</sup>. Die bei den Statinen

bekanntes und zu einem wichtigen Teil über die endotheliale NO-Produktion vermittelten pleiotrope Effekte sind bei diesem Medikament nicht bekannt.

Will man den Einfluss oder das Vorhandensein solcher Effekte auf das Krankheitsbild der Arteriosklerose erforschen, so hilft die Betrachtung von Tiermodellen. Durch die Inaktivierung der eNOS in apoE-Ko Mäusen mittels Generierung einer apoE/eNOS-Doppelknockoutmaus (apoE/eNOS-Dko Maus) erhält man die Möglichkeit, den Einfluss der endothelialen NO-Produktion auf die Pathogenese der Arteriosklerose zu ergründen. Diese Tiere weisen neben der Arteriosklerose keine endotheliale NO-Produktion auf und leiden folglich unter einer schweren endothelialen Dysfunktion. Die Plaquebildung ist in diesen Tieren beschleunigt und kardiovaskuläre Komplikationen wie Gefäßverschlüsse, Aneurysmata, Myokardischämien und eine gestörte linksventrikuläre Funktion treten auf, die in apoE-Ko Kontrolltieren nicht beobachtet werden<sup>40, 41</sup>. Ein arterieller Hypertonus, den eNOS-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen auch aufweisen, gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Arterioskleroseentwicklung. Man weiß inzwischen jedoch, dass die Blutdruckerhöhung in apoE/eNOS-Dko Mäusen nicht die Zunahme der Plaquelast und die beobachteten kardiovaskulären Komplikationen erklärt, da eine Blutdrucknormalisierung mittels Hydralazin die Plaqueentwicklung in apoE/eNOS-Dko Tieren nicht beeinflusst<sup>42</sup>.

### **1.5 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu überprüfen ob Ezetimib die Plaqueprogression vorbestehender arteriosklerotischer Läsionen in apoE-Ko Mäusen vermindern kann. Aus diesem Grund wurde die Behandlung mit Ezetimib nach Ablauf einer zehn Wochen dauernden fettreichen Diät eingeleitet. Zu diesem Zeitpunkt zeigen apoE-Ko Mäuse bereits eine deutliche Plaquebildung in der Aorta<sup>43</sup>. Des weitern untersuchten wir, ob die Wirkung von Ezetimib unabhängig von der Funktion der eNOS vermittelt wird, indem wir die messbaren Effekte in apoE-Ko Tieren mit denen in apoE/eNOS-Dko Tieren verglichen. eNOS-Defizienz führt in der apoE-Ko Maus im Vergleich zu apoE-Ko Kontrolltieren zu einer dramatischen Zunahme der Arteriosklerose<sup>41</sup>. Schließlich untersuchten wir, inwieweit Ezetimib das Lipoproteinprofil und die in Blutgefäßen gebildete eNOS-Expression beeinflusst.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien von den nachgestellten Herstellern kamen zur Verwendung:

2,2,2-Tribromethanol	Sigma Chemie, Deisenhofen
2-Methyl-2-Butanol	Sigma Chemie, Deisenhofen
20x Natriumchlorid-Natriumzitrat-Puffer (SSC)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Acrylamid/Bis-Acrylamid 29:1	Bio-Rad, München
Ampuwa-H <sub>2</sub> O	Fresenius, Friedberg
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Sigma Chemie, Deisenhofen
Bromophenol Blau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ethanol, 100 %	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Ficoll	Sigma Chemie, Deisenhofen
Formamid	Sigma Chemie, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
Mineralöl	Sigma Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Sigma Chemie, Deisenhofen
Natriumdodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Roche, Mannheim
NuSieve GTG Agarose	Cambrex, Rockland, MA, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt

Phenol	Ambion, Austin, TX, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma Chemie, Deisenhofen
Phosphat gepuffertes Kochsalz (PBS)	Biochrom, Berlin
Polyvinylpyrrolidon	Sigma Chemie, Deisenhofen
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SeaKem GTG Agarose	Cambrex, Rockland, MA, USA
Sudan IV	Sigma Chemie, Deisenhofen
TAE	Invitrogen, Paisley, UK
Tris	Sigma Chemie, Deisenhofen
Tris-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma Chemie, Deisenhofen
Wasser für die HPLC (HPLC-H <sub>2</sub> O)	AppliChem, Darmstadt

## **2.2 Lösungen und Puffer**

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Ampuwa-H<sub>2</sub>O (Fresenius) angesetzt.

### Puffer zur Gewinnung genomischer DNA (tail solution):

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

### Gel-Ladepuffer (PCR):

0,25 % Bromophenol Blau  
30 % Glycerin

### Depurinierung (Southern Blot)

0,25M HCl



Denaturierung (Southern Blot)

0,5M NaOH

1M NaCl

Neutralisation (Southern Blot)

1M Tris

1,5M NaCl

Denhardt's-Lösung

1 mg/ml Ficoll

1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon

1 mg/ml BSA Fraktion V

Waschpuffer 1 (Southern Blot, "low stringency wash")

2x SSC

0,01 % SDS

Raumtemperatur

Waschpuffer 2 (Southern Blot, "high stringency wash")

0,2x SSC

0,01 % SDS

68° C

Avertin (Narkoselösung für Mäuse):

375 mg 2,2,2-Tribromethanol

375 µl 2-Methyl-2-Butanol

14,625 ml NaCl-Lösung 0,9 %

Sudan IV Färbelösung:

0,5 % Sudan IV

35 % Ethanol

50 % Aceton



## 2.3 Antikörper

Actin (I-19) (200 µg/ml, Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
eNOS/NOS Type III (250 µg/ml, Maus)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
anti mouse IgG HRP linked F(ab') <sub>2</sub> fragment (Schaf)	Amersham, Little Chalfont, UK
anti-goat IgG-HRP (400 µg/ml, Esel)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

## 2.4 Enzyme

10x Restriktionspuffer BAM H1	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
BSA für Restriktionsverdau	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Proteinaseinhibitor (cOmplete)	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma Chemie, Deisenhofen
Restriktionsendonuklease BAM H1	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Taq-DNS-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.5 Kits

### Erstellung einer radioaktiv markierten Sonde:

Prime it II Random Primer Labelling Kit (Stratagene, Heidelberg)
Random Primers
5dCTP Puffer
Exo-Klenow-Enzym

### Cholesterin Standard

Cholesterin-Kalibratorset (Sigma Chemie, Deisenhofen)
100, 200, 400 mg/dl

### Bestimmung der Cholesterin Konzentration:

Infinity Cholesterol (Thermo Electron, Melbourne, Australien)
Liquid Stable Reagent

Bestimmung der Triglycerid-Konzentration:

TRIGLYCERIDE GPO-PAP (Randox, Krefeld)

Puffer

Enzym-Reagenz

Standard 200 mg/dl

Messung der Proteinkonzentration:

BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)

Chemiluminiszenznachweis von peroxidasemarkierten Antikörpern:

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham, Little Chalfont, UK)

**2.6 Größenstandards für DNS**

100bp DNA Ladder (PCR) New England BioLabs, Frankfurt am Main

1kb DNA ladder (Southern Blot) New England BioLabs, Frankfurt am Main

**2.7 Größenstandard für Proteine**

Full Range Rainbow™ Leiter (10 kDa-250 kDa) Amersham, Little Chalfont, UK

**2.8 Nukleotide, Oligonukleotide, DNS**

10x PCR Puffer Fermentas, St. Leon-Rot

$\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP Amersham, Freiburg

dNTPs für PCR Fermentas, St. Leon-Rot

Heringsperma-DNS Roche, Mannheim

MgCl<sub>2</sub>, 25mM für PCR Fermentas, St. Leon-Rot

Primer MWG, München

Oligonukleotid-Primer 180 (5' – GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG –3')

Oligonukleotid-Primer 181 (5' – TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C –3')

Oligonukleotid-Primer 182 (5' – GCC GCC CCG ACT GCA TCT –3')

## 2.9 Software

Image-Pro Plus Version 4.5.0.19	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
Stat View 4.51	Abacus Concepts, Piscataway, NJ, USA
Sigma Plot 2002 für Windows Version 8.0	SPSS, Chicago, IL, USA

## 2.10 Geräte

35-mm Kamera	WILD MPS 52
CCD Kamera	COHU, High Performance CCD Camera
Elektrophoresekammer (PCR)	Bio-Rad, Wide Mini Sub-Cell GT
Elektrophoresekammer (Western)	Bio-Rad, MINI PROTEAN II™
ELISA Reader	Molecular Devices, Thermo max
FPLC-Anlage	Amersham Biosciences, Äkta-BASIC
Mikronadeln	Fine Science Tools, Etched Tungsten Micro Needles
PCR-Maschine	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak, M 35 X-OMAT
Schwenker	Heidolph, Duomax 1030
Stereomikroskop	LEICA MZ6
Superose 6 Säulen	Amersham Biosciences, Superose 6 10/300 GL (Säulenvolumen 24 ml; Partikelgröße 13 ± 2 µm)
Transferhalterung (Western)	Bio-Rad, MINI TRANS BLOT
Volt/Ampere-Meter	BIO-RAD, Power PAC 200
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415C

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

96-well Platten	Falcon, MICROTTEST Zellkulturplatte
Farbdias	Fujifilm, Fujichrome 64T Type II Tungsten

Nitrozellulosemembran (southern)	Amersham, Hybond-XL
Nitrozellulosemembran (Western)	Amersham, Hybond-ECL
Röntgenfilm (Western)	Noras, x-ray RETINA, medizinischer Röntgenfilm
Röntgenfilm (southern)	Kodak, BioMax XAR Film 24 x 30 cm
Spritzenfilter	Pall Corporation, Acrodisc® Syringe Filters mit 0,45 µm Supor Membran
Whatmanpapier	Schleicher und Schüll

## 3 Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden mindestens zehn Generationen auf einem C57BL/6J-genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. ApoE-Ko Tiere (a/a) wurden von den Jackson Laboratories (Bar Harbour, Me, USA) bezogen, eNOS-Ko Tiere (e/e) wurden von Paul Huang (Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt.

Zum Erzeugen von apoE/eNOS-Doppelknockouttieren (a/a;e/e), wurden apoE-Kos mit eNOS-Kos gekreuzt, um in beiden Genen heterozygote Tiere zu erhalten (a/A;e/E). Beim Verpaaren dieser Generation erhält man nach den mendelschen Regeln (uneingeschränktes Überleben der Nachkommen vorausgesetzt) bei einem sechzehntel der Tiere der nächsten Generation, einen apoE/eNOS-Doppelknockoutgenotyp. Die Genotypisierung für apoE erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion, der eNOS-Genotyp wurde mittels Southern Blot nachgewiesen.

### 3.2 Isolation genomischer DNS

Genomische DNS wurde aus einer Schwanzspitzenbiopsie isoliert. Ein Schwanzstück von einem Zentimeter Länge wurde in einem Eppendorf Cup mit 500 µl Tailsolution und 30 µl Proteinase K vermischt und über Nacht bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

Die DNS-Extraktion erfolgte in drei Schritten. Der Ansatz wurde nacheinander mit jeweils 500 µl Phenol (dient der Entfernung von Enzymen oder zytoplasmatischen Proteinresten), Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und schließlich mit Chloroform versetzt. Zwischen den Schritten wurde gevortext und zehn Minuten bei 13000 rcf zentrifugiert um die wässrige von der organischen Phase zu trennen. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Cup übergeführt und mit 500 µl des folgenden Reagenz gemischt. Die Präzipitation der DNS erfolgte durch Zugabe von 1 ml 100 prozentigem Ethanol. Das überschüssige Ethanol wurde entfernt und das Präzipitat für 20 Minuten getrocknet. Die gereinigte DNS wurde in 50 µl Wasser für die HPLC aufgelöst und bei -80° C eingefroren.

### **3.3 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine hoch spezifische und sensitive Methode zur Vervielfältigung von DNS Abschnitten, deren Basensequenzen am 5' und am 3' Ende bekannt sind. An diesen Enden binden die PCR-Primer (komplementäre Oligonukleotidsequenz) im Hybridisierungsschritt und ermöglichen dann einer DNS-Polymerase die Synthese eines komplementären Stranges.

Die Ausgangs-DNS wird zunächst durch Erhitzen denaturiert. Es wird ein Überschuss an Primern und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) zugefügt. Durch Abkühlen des Reaktionsgemisches erfolgt die Hybridisierung der Primer mit der DNS-Vorlage. Im Anschluss wird die Temperatur auf das Optimum der DNS-Polymerase erhöht welche die DNS-Matrize verlängert. Man verwendet eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase), die bei den für die Denaturierung der DNS nötigen Temperaturen von 94° C nicht denaturiert, so dass eine einmalige Zugabe des Enzyms zum Reaktionsgemisch zu Beginn der PCR genügt. Zur Verlängerung eines DNS-Strangs werden neben den dNTPs auch noch  $Mg^{2+}$ -Ionen benötigt, die mit diesen einen löslichen Komplex bilden. Auf diese Weise entsteht neue, doppelsträngige DNS mit einer zur Matrize komplementären Sequenz. Dieser Kreislauf, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Synthese wird vielfach wiederholt und führt zu einer exponentiellen Zunahme des PCR-Produkts. Somit erreicht der Vervielfältigungsfaktor für die doppelsträngigen DNS-Moleküle am Ende von n Vermehrungszyklen ein theoretisches Maximum von  $2^n$ .

#### **3.3.1 Durchführung der Polymerasekettenreaktion**

Die Genotypisierung der Mäuse hinsichtlich des apoE-Gens wurde mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

19,46  $\mu$ l HPLC- H<sub>2</sub>O  
3,66  $\mu$ l 10x PCR-Puffer  
2,88  $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>  
0,72  $\mu$ l 10mM dNTP  
1,80  $\mu$ l Primer A: oIMR 180



- 1,80 µl Primer B: oIMR 181
- 1,80 µl Primer C: oIMR 182
- 0,36 µl Taq-Polymerase
- 4 µl DNS aus einer Schwanzbiopsie

Um eine Verunreinigung und Verdunstungen der Probe während der Reaktion im Thermocycler zu vermeiden, wurden 20 µl Mineralöl auf das Reaktionsgemisch überschichtet. Die eingesetzte Doppelstrang-DNS wurde im Thermocycler bei 94° C für zwei Minuten in Einzelstrang-DNS denaturiert, danach folgten 35 Zyklen, die aus folgenden Schritten bestanden:

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

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

### **3.3.2 Elektrophoretische Analyse der amplifizierten DNS-Sequenzen**

Die Analyse der amplifizierten DNS-Sequenzen erfolgte durch Auftrennung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Es wurde ein zwei Prozentiges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml) in TAE-Puffer hergestellt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in DNS interkaliert und bei UV-Bestrahlung sichtbar macht. Als Elektrophoresepuffer diente TAE. Die Proben wurden für vier Minuten bei 75° C denaturiert, mit 6 µl Ladepuffer versetzt und je 20 µl in eine Geltasche geladen. Zur Größenbestimmung der markierten DNS-Fragmente wurde parallel ein 100 bp-Größenstandard geladen. Die Elektrophorese erfolgte über eine Stunde bei einer Spannung von 100 V.

### **3.4 Southern Blot**

Southern Blotting ermöglicht den Nachweis der spezifischen Gensequenz für eNOS in einem Gemisch von elektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmenten.

### 3.4.1 DNS-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung der DNS erfolgte mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Bam H1. Dazu wurden zu 10 µl DNS-Lösung folgende Substanzen hinzugegeben:

- 2,50 µl 10x Restriktionspuffer
- 2,50 µl Restriktionsendonuklease Bam H1
- 0,25 µl Albumin (BSA)
- 10,00 µl Ampuwa-H<sub>2</sub>O

Die Probe wurde gemischt und zentrifugiert. Der Verdau der Probe erfolgte über Nacht bei 37° C.

### 3.4.2 Auftrennung der DNS durch Agarosegelelektrophorese

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

### 3.4.3 Vorbereitung des Agarosegels für den Transfer der DNS

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

### 3.4.4 Kapillartransfer der DNS auf eine Nitrozellulosemembran

Der Transport des Transferpuffers erfolgt, wie in Abb. 3.1 dargestellt, durch das Agarosegel und die Nitrozellulosemembran durch die Kapillarkraft eines Stapels Papiertücher. Durch diesen nach oben gerichteten Fluss werden die DNS-Fragmente von dem Agarosegel auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die DNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der Membran fixiert.

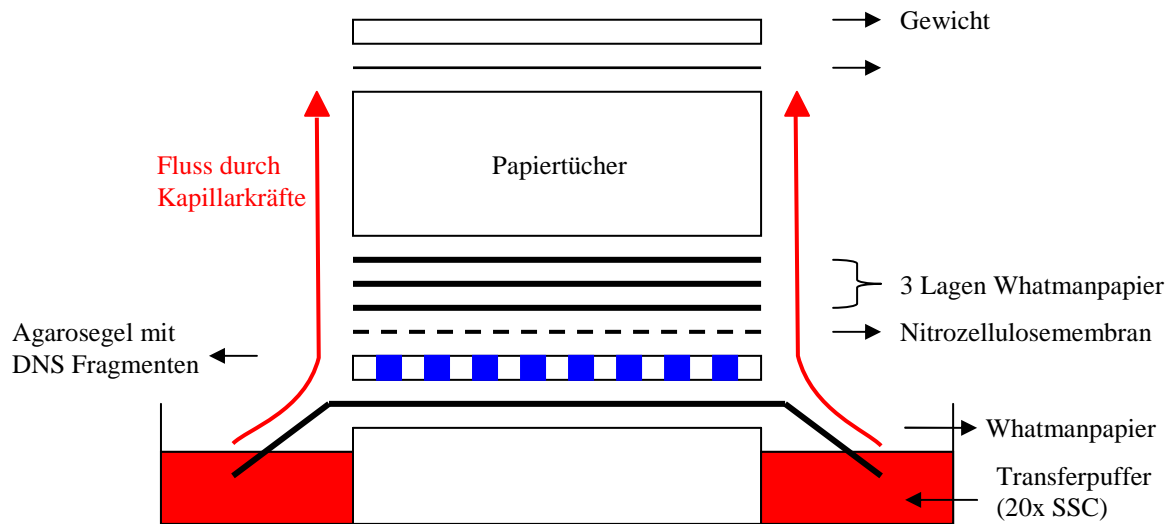


Abb. 3.1: Nach oben gerichteter Kapillartransfer von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel auf eine Nitrozellulosemembran.

### 3.4.5 Radioaktive Markierung der DNS-Sonde

Zu 10  $\mu\text{l}$  eNOS-cDNS wurden 10  $\mu\text{l}$  random primer und 13  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  gegeben. Die Probe wurde für fünf Minuten gekocht, danach bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte die Synthese der DNS Sonde (prime it II, Random Primer Labeling Kit, Stratagene) unter Verwendung des Klenow-Enzyms und  $^{32}\text{P}$  dCTP. Die Reaktion lief über eine Stunde bei 37° C. Anschließend wurde die Probe mit 500  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt.

### 3.4.6 Prähybridisierung und Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wird durch komplementäre Basenpaarung der zu analysierenden (Einzelstrang-)DNS und der radioaktiv markierten eNOS-DNS-Sonde eine

doppelsträngige Nukleinsäure erzeugt. Die der Sonde komplementäre genomische Nukleinsäuresequenz kann hierdurch hochspezifisch nachgewiesen werden. Eine Bindung der radioaktiv markierten Sonde an unspezifische Stellen der Membran wird verhindert, indem mit Heringsperma-DNS die unspezifischen Bindungsstellen der Membran abgesättigt werden.

Die Prähybridisierungs-/Hybridisierungslösung setzt sich zusammen aus:

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

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

Prähybridisierung: Für die Prähybridisierung wurde die Membran in SSC angefeuchtet, zusammengerollt und mit der DNS-Seite nach innen in die Hybridisierungsglasröhre gelegt. 30 ml Prähybridisierungslösung mit 300 µl gekochter Heringsperma-DNS wurden zugegeben und die Membran für zwei Stunden unter ständigem Rollen bei 42° C im Hybridisierungsofen inkubiert.

Hybridisierung: Die radioaktiv markierte DNS-Sonde wurde durch fünfminütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einem zweiten Ansatz wurden 300 µl Heringsperma-DNS denaturiert. DNS-Sonde und Heringsperma-DNS wurden in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Prähybridisierungslösung wurde gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte unter ständigem Rollen über Nacht bei 42° C.

### **3.4.7 Waschen der Nirozellulosemembran**

Unspezifisch gebundene DNS-Sonde wurde durch Waschen der Membran mit Waschpuffern entfernt. Die Membran wurde in einer Kunststoffschale zwei Mal bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit Waschpuffer 1 („low stringency wash“) und bei 68° C für 15 Minuten mit Waschpuffer 2 („high stringency wash“) auf dem Drehschüttler gewaschen. Anschließend wurde die Radioaktivität der Membran

gemessen und bei einem lokalisierten Signal von maximal 3000 cpm das Waschen beendet.

### **3.4.8 Autoradiografie**

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

### **3.5 Diät**

21 Tage nach der Geburt wurden die Tiere entwöhnt und für 10 Wochen auf eine „western type“ Diät (42 % der Gesamtkalorien aus Fett, 0,15 % Cholesterin; Harlan-Teklad: TD 88137) gesetzt. Im Anschluss wurden die Mäuse für weitere 8 Wochen mit einer „western type“ Diät gefüttert, der zusätzlich 50 ppm Ezetimib (Shering Plough Research Institute, Kenilworth, NJ) beigemischt wurden (Harlan Teklad: TD 04145), beziehungsweise als Kontrolltiere auf der „western type“ Diät belassen.

### **3.6 Entnahme der Aorta**

Nach Abschluss der Diät wurden die Tiere mit etwa 500 µl Avertin (2,5 %) betäubt und gewogen, das Abdomen eröffnet und der rechte Ventrikel transdiaphragmal zur Blutentnahme punktiert. Nach Eröffnung des Thorax wurde die untere Hohlvene durchtrennt und das Tier mit 5 ml eiskaltem und autoklaviertem PBS mit pH 7,4 über den linken Ventrikel perfundiert. Die Aorta und die proximalen Anteile der aus ihr entspringenden Gefäße wurden vom umgebenden Fett und Bindegewebe unter einem Stereomikroskop frei präpariert. Die abgehenden Gefäße wurden durchtrennt und die Schlagader samt Aortenklappe vom Herz abgesetzt. Das Gefäß wurde am Stück bis zur Bifurkation in die Beckenarterien entnommen. Zum Erfassen der Läsionsfläche wurde es über Nacht in vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert oder alternativ für spätere Proteinanalysen in PBS tiefgefroren.

### **3.7 Lipide und Lipoproteinprofile**

Blut wurde mit einer mit EDTA benetzten Spritze wie in Kapitel 3.6 beschrieben abgenommen. Die zellulären Bestandteile wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4° C und 10500 rcf entfernt.

#### **3.7.1 Darstellung der Lipoproteinprofile mittels FPLC**

Die Erhebung der Lipoproteinprofile erfolgte mit der „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC). Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Partikel von verschiedener Größe, die in einer mobilen Phase gelöst sind, werden durch unterschiedliche Interaktion mit einer festen Phase getrennt. In diesem Fall besteht die feste Phase aus einer Agarose-Matrix, die Poren einer gewissen Größe enthält und sich im inneren einer Säule befindet. Entgastes PBS (pH 7,4) als mobile Phase mitsamt den darin gelösten Bestandteilen durchfließt diese Säule, wobei große Partikel ein kleineres Volumen durchlaufen müssen und daher früher aus der Säule austreten. Kleine Teilchen verteilen sich zusätzlich noch auf das Volumen der Poren, weshalb ein größeres Volumen der mobilen Phase benötigt wird, um sie von der Säule zu waschen. Da sich die Lipoproteine nicht nur in ihrer Dichte, sondern auch in ihrer Größe unterscheiden ist eine Auftrennung mit diesem Verfahren möglich (vgl. Tabelle 1.1).

Pro Tier wurden 200 µl, durch einen Spritzenfilter vorfiltriertes Plasma über zwei in Serie geschaltete Superose 6 Säulen aufgetrennt und in Fraktionen à 0,5 ml aufgefangen (Flussrate 0,3 ml/min, resultierender Druck 1,5 bis 1,6 MPa, Start der Fraktionierung nach Durchlauf von 0,15 Säulenvolumen, Gesamtgröße der Fraktionen 0,73 Säulenvolumen). Die großen VLDLs treten somit als erste wieder aus der Säule aus, gefolgt von den IDL/LDLs und den HDLs. In den Fraktionen neun bis 52 wurden die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen mit den nachfolgend beschriebenen Methoden bestimmt.

#### **3.7.2 Messung der Plasma-Cholesterinkonzentrationen**

Gesamtcholesterin wurde im gewonnenen Plasma fotometrisch bestimmt. Dazu wurden die Proben mit HPLC-Wasser 1:1 verdünnt und Triplets à 2 µl in eine 96-well Platte

pipettiert. Zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration in den durch FPLC-Auftrennung gewonnenen Fraktionen wurden wegen der stärkeren Verdünnung dieser Proben 20 µl eingesetzt. Zur Ableitung einer Standardkurve wurden 2 µl Cholesterinstandard der Konzentrationen 100, 200 und 400 mg/dl in die Messung eingeschlossen. Zu allen Proben wurden anschließend je 200 µl Reagenz aus dem Infinity Cholesterol Kit hinzugefügt, der Ansatz für zehn Minuten bei 37° C inkubiert und die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen. Der Nachweis von Cholesterin beruht auf der Oxidation von Cholesterin und Cholesterinestern, wodurch es zur Bildung des roten Farbstoffs Quinoneimin kommt (Abb. 3.2).

Der Farbstoff absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 490 nm. Je mehr Quinoneimin entsteht, desto stärker fällt diese Absorption aus. Dies ermöglicht eine indirekte Quantifizierung des Cholesterins und seiner Ester. Die Werte der Standardreihe wurden benutzt um eine Standardkurve zu bilden, aus der dann grafisch die Werte für die einzelnen Ansätze ermittelt wurden.

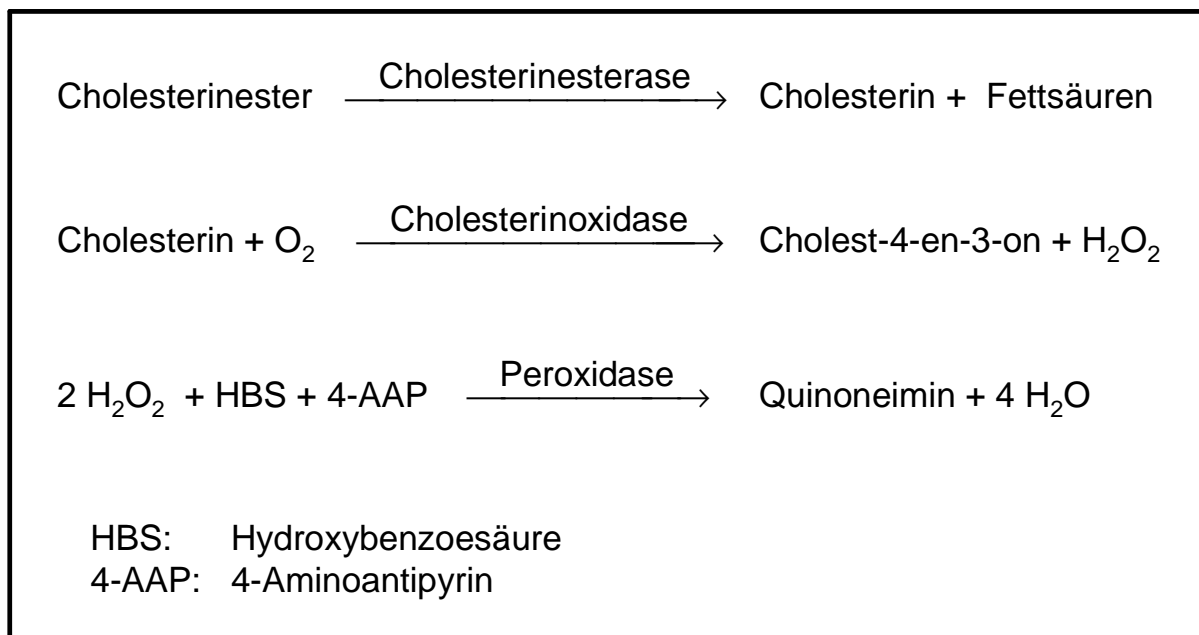


Abb. 3.2: Reaktionsgleichung der Cholesterinbestimmung

### 3.7.3 Bestimmung der Triglyceridkonzentrationen im Plasma

Auch die Bestimmung der Triglyceridkonzentrationen in den FPLC-Fractionen erfolgte fotometrisch. Das verwendete Kit bedient sich hier der GPO-PAP Methode:

Triglyceride führen nach dem unten gezeigten Schema (Abb. 3.3) zur Bildung des Farbstoffs Chinonemin.

100 µl Eluat wurden aus den oben genannten Fraktionen in die Wells gegeben. Mit Hilfe des mitgelieferten Standards wurde eine Verdünnungsreihe (200 mg/dl, 100 mg/dl, 50 mg/dl) erstellt. Puffer und Enzym-Reagenz aus dem Kit wurden gemischt und je 100 µl dieser Mischung den Proben hinzugefügt. Zur Bestimmung der Triglyceridkonzentrationen wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen und die Konzentration in den Proben mit Hilfe der Standardkurve grafisch ermittelt.

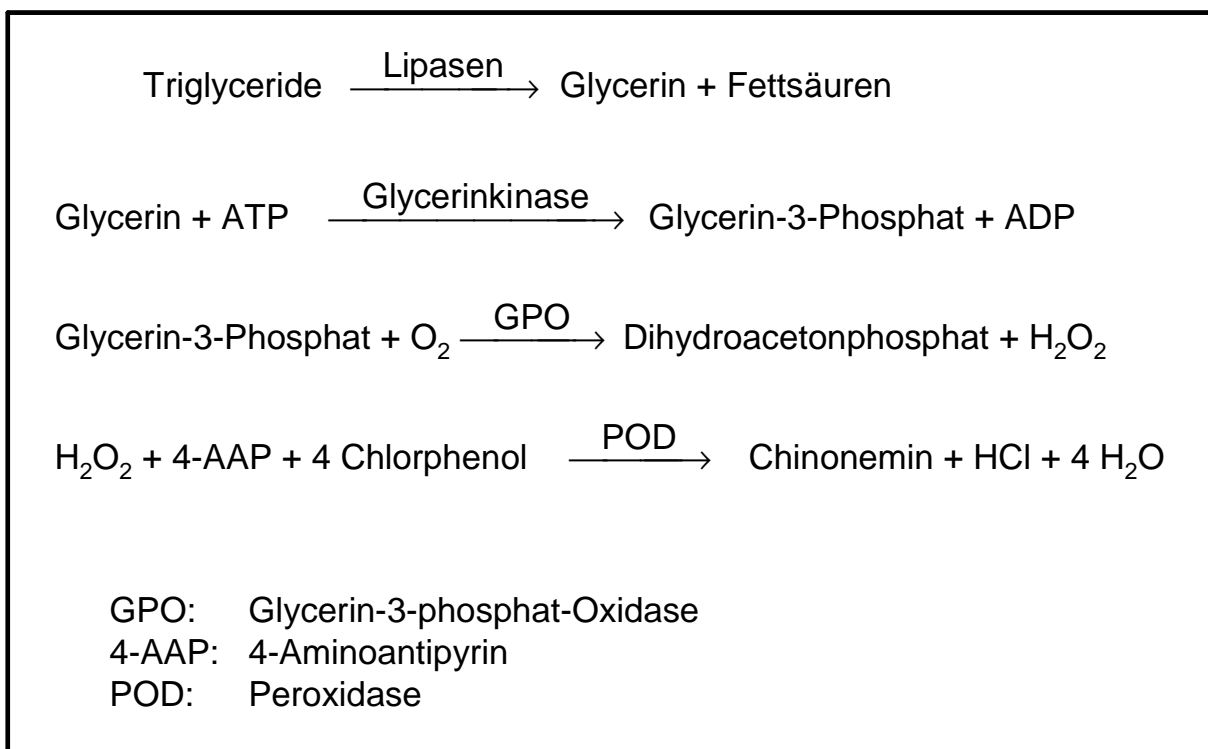


Abb. 3.3: Reaktionsgleichung der Triglyceridbestimmung

### 3.8 Planimetrie der aortalen Läsionsflächen

Die Aorten wurden in eine mit schwarzem Wachs ausgegossene Wanne, gefüllt mit PBS, unter dem Stereomikroskop mit Pinzette und Mikroschere von Fett- und Bindegewebe befreit, longitudinal auf der Ventralseite eröffnet und „en-face“ mit 125 µm starken Mikronadeln festgepinnt. Im Bereich des Aortenbogens musste wegen der starken Krümmung zur planen Darstellung des Endothels die vordere Hälfte des Gefäßes segmentförmig ausgeschnitten und separat gepinnt werden. Die hier



entspringenden supraaortalen Arterienabgänge wurden dabei längs eröffnet. Schwarz-weiß Bilder wurden mit Hilfe einer auf das Stereomikroskop montierten CCD Kamera von der gesamten Gefäßoberfläche aufgenommen (Abb. 3.4).

Zur besseren Darstellung der lipidreichen Plaques wurden die Gefäße mit Sudan IV-Lösung gefärbt: Die Präparate wurden hierfür kurz mit 70-%igem Ethanol gewaschen und mit 500 µl gefilterter Färbelösung überdeckt. Nach sechs Minuten Einwirkzeit wurde unspezifisch gebundene Färbelösung mit 70-%igem Ethanol ausgewaschen. Nachdem die Gefäße wieder unter PBS gesetzt wurden, erfolgte mit einer 35-mm Kamera die Aufnahme von Farbdias als Referenz zur besseren Identifizierung der Läsionen.

Die Läsions- und Gesamtfläche des Endothels wurde mit Image-Pro Plus in den digitalen Bildern bestimmt: Unter Zuhilfenahme der Farbdias wurden die Konturen der gesamten Gefäßfläche und jeder Plaque umfahren und so die Ausdehnung bestimmt. Für jedes Tier wurde der Quotient aus Läsions- zu Gesamtfläche gebildet.



**Abb. 3.4:** schwarz-weiß Bild eines „en-face“ präparierten Aortenbogens; dichtere, plaquebeladene Anteile kommen durch stärkere Lichtreflexion heller zur Abbildung.

### **3.9 Proteinextraktion aus Aorten**

Am Tag der Proteinextraktion wurde zum benötigten Aliquot RIPA-Puffer die entsprechende Menge Proteinaseinhibitor gegeben (eine Tablette auf 20 ml RIPA-Puffer). Die aufgetaute Aorta wurde in 20 µl dieses RIPA-cOmplete Puffers in kleine Stücke zerschnitten und in einen Mikromörser transferiert. Mit weiteren 50 µl des Puffers wurden die Gewebesteile zermahlen und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wurde in eine 1 ml Feindosierungsspritze aufgezogen und der Mörser mit 10 µl des RIPA-cOmplete Puffers gespült. Das gesamte Volumen Proteinlysats wurde dreimal durch eine 22 Gage-Kanüle in eine 1 ml Spritze aspiriert, um die in der Probe vorhandene DNS zu scheren. Danach wurde die Probe in ein Eppendorf Cup überführt und bei 4° C und 20000 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde abpipettiert, in ein frisches Eppendorf Cup übertragen und bei den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Wieder wurde die flüssige Phase gewonnen und in einem neuen Behältnis bei -20° C eingefroren.

### **3.10 Messung der Proteinkonzentration**

Zur Messung der Proteinkonzentration bedienen wir uns des BCA™ Protein Assay Kits der Firma Pierce. Proteine reduzieren  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen im alkalischen Medium zu  $\text{Cu}^{1+}$  (die so genannte Biuret Reaktion). Zwei Moleküle Bicinchonische Säure (BCA) bilden dann mit einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Molekül einen farbigen Chelatkomplex. Der wasserlösliche Komplex weist eine starke Lichtabsorption bei 562 nm auf, welche zur Quantifizierung genutzt werden kann<sup>44</sup>.

13 µl Proteinlösung wurden nach dem Auftauen mit 39 µl HPLC-Wasser 1:4 verdünnt und davon 10 µl in die Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert. Eine 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 wurde aus dem mitgelieferten Albumin Standard (2 mg/ml) erstellt und diente zur Erzeugung einer Standardkurve. Eine ausreichende Menge Reaktionsagenz wurde im Verhältnis 5 ml zu 100 µl aus den Reagenzien A und B des Kits angesetzt und davon jeweils 200 µl in die wells gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37° C wurde die Absorption bei 550 nm gemessen und die Konzentration in den Proben ermittelt.

### **3.11 Western Blot**

Der Western Blot ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von einzelnen Proteinen aus einem Proteingemisch nach elektrophoretischer Auftrennung. Die Proteine durchwandern dabei zunächst ein Sammelgel und werden danach in einem Trenngel nach der Größe aufgetrennt. Die Proben werden daraufhin auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, auf der mittels spezifischer Antikörper die Darstellung des gesuchten Proteins erfolgt. Dabei bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an das gesuchte Protein. Ein enzymkonjugierter Sekundärantikörper bindet dann an diesen Komplex und ermöglicht einen enzymatischen Nachweis des gesuchten Proteins.

#### **3.11.1 Auftrennung der Proteine durch Acrylamidgelelektrophorese**

Das Proteingemisch wird in einem siebenprozentigen Acrylamid/Bis-Acrylamidgel getrennt, welches 0,1 % SDS enthält. Das SDS führt zur Denaturierung der Proteine, maskiert durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine und ermöglicht somit eine Auftrennung nach der Molekülmasse. Über dem Trenngel befindet sich das Sammelgel (3 % Acrylamid/Bis-Acrylamid, 0,1 % SDS) welches zur Aufkonzentration der schmalen Lauffront führt.

15 µg Protein werden mit Ladepuffer auf ein Volumen von 25 µl gebracht, kurz auf 95° C erhitzt und in eine Tasche des Sammelgels geladen. Als Größenstandard diente eine Full Range Rainbow™ Leiter. Anschließend wurde die Elektrophorese mit 70 V im Elektrophoresepuffer gestartet. Nach 20 Minuten wurde die Spannung auf 120 V erhöht und für 45 Minuten beibehalten.

#### **3.11.2 Durchführung des Nasstransfers mit anschließendem Blocken der Membran**

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel auf eine mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt, beiderseits zwei Lagen feuchtes Whatmanpapier und eine Lage in Transferpuffer eingelegtes Fließ hinzugefügt und das ganze in eine Halterung geklemmt, um die Proteine elektrophoretisch auf die Membran

übertragen zu können. Dies erfolgte in Transferpuffer und guter Kühlung bei einer Stromstärke von 0,25 Ampere für 90 Minuten.

Die Membran wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und über Nacht in Blockpuffer eingelegt um das unspezifische Binden von Antikörpern an die Membran zu verhindern.

### **3.11.3 Proteinidentifikation mittels Antikörpern**

Nach dem Blocken wurde der Teil mit der Leiter abgetrennt und die Membran horizontal in Höhe der gelben Markierung der Leiter (75 kDa) durchgeschnitten. Der obere Teil, auf dem sich bei einem Molekulargewicht von 140 kDa die eNOS-Banden befanden und die untere Hälfte, die zur Darstellung der 43 kDa  $\alpha$ -SMC-Aktinbande diente, wurden daraufhin mit den Primärantikörpern inkubiert. Dazu wirkten der eNOS-Antikörper 1:200 und der Aktinantikörper 1:500 in insgesamt 8 ml für eine Stunde auf einem Schwenker auf die entsprechenden Membranteile ein. Anschließend wurden die Membranen eine halbe Stunde in Waschpuffer gereinigt. Dabei wurde die Pufferlösung alle fünf Minuten ersetzt. Der Sekundärantikörper für eNOS (anti mouse IgG-HRP linked F(ab')<sub>2</sub> fragment) wurde 1:2000, der für Aktin (anti-goat IgG-HRP) 1:4000 verdünnt und die Membranteile wiederum für eine Stunde darin inkubiert. Abschließend wurde erneut für 30 Minuten gewaschen um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

### **3.11.4 Chemilumineszenznachweis der Sekundärantikörper**

Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit der Peroxidase des Meerrettichs (HRP) konjugiert. Das ECL Plus Nachweiskit enthält das Lumigen PS-3 Acridan, welches in Anwesenheit von Peroxid und HRP zu Acridiniumester oxidiert wird. Dieser wird unter dem Einfluss des ebenfalls enthaltenen Peroxids hydrolysiert, wobei Licht der Wellenlänge 430 nm emittiert wird. Die Detektion erfolgt mittels eines Röntgenfilms. Der Grad der Schwärzung des Films entspricht dabei der Menge des entstandenen Lichts an der entsprechenden Stelle der Membran, wodurch eine Abschätzung der Antikörpermenge und damit auch der Proteinmenge möglich ist. Aktin dient dabei als Standard, da es im Gewebe in konstanter Menge exprimiert wird.

Unter Lichtabschluss wurden acht ml der Lösung A des Kits mit 200  $\mu$ l der Lösung B gemischt und jeweils 4 ml auf die Membranen gegeben. Nach fünf Minuten wurden die Teile entnommen, mit dem Leiterabschnitt in der ursprünglichen Konfiguration in eine Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer Entwicklerkassette mit Klebeband fixiert. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme in die Kassette eingelegt und nach 30 Sekunden beziehungsweise einer Minute entwickelt.

### **3.12 Statistik**

Zum Vergleich wurden für alle Gruppen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und ein Vergleich mittels ANOVA durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse dem Scheffe's F-Test unterzogen (Stat View 4.51). Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Student's t-Test herangezogen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung des Genotyps für apoE (PCR)

Die erwarteten PCR-Produkte liegen für apoE-Wildtyp bei 155 bp und für apoE-Ko bei 245 bp. Bei einer homozygoten Knockout Maus sieht man nur eine Bande, genauso wie bei einem homozygoten Wildtypier. Heterozygote Tiere zeigen in der PCR beide Banden. Eine Darstellung eines PCR-Ergebnisses zeigt Abb. 4.1.

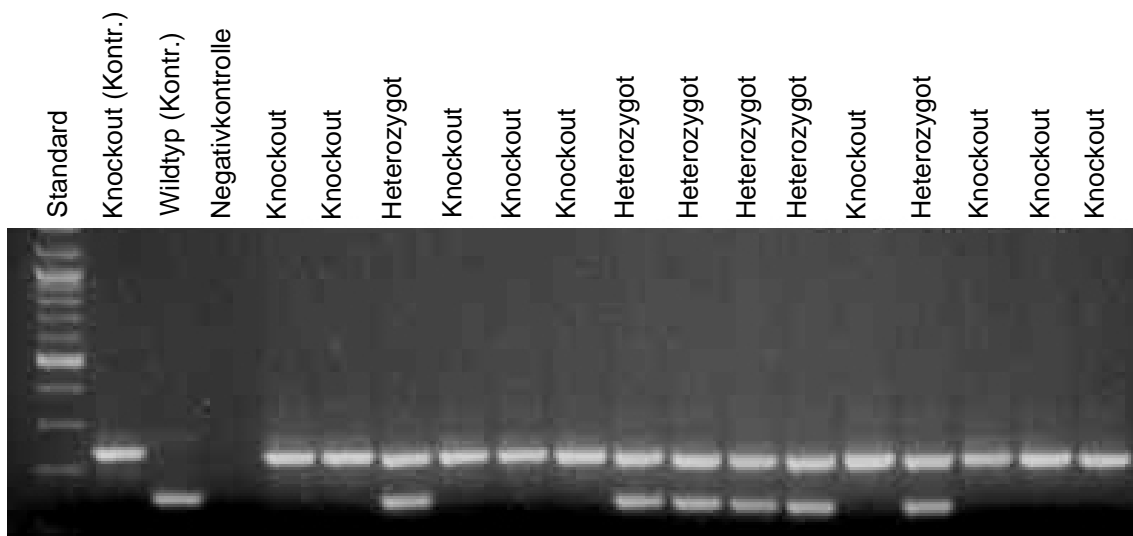


Abb. 4.1: Fotografie eines beispielhaften apoE-PCR-Agarosegels zur Genotypisierung.

### 4.2 Bestimmung des Genotyps für eNOS (Southern Blot)

Nach dem Verdau der genomischen DNS mittels Restriktionsendonukleasen entsteht ein 4 kb Fragment für eNOS-Ko Allele und ein 7 kb Fragment für eNOS-Wildtyp Allele (Abb. 4.2).

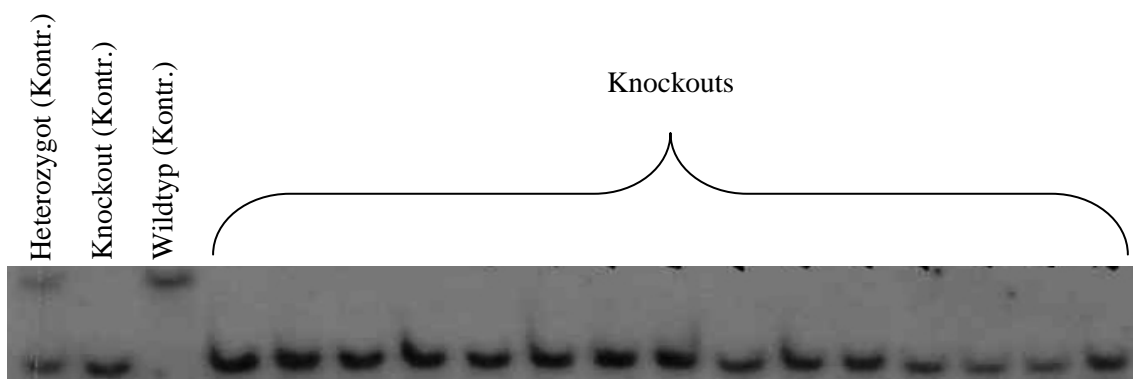
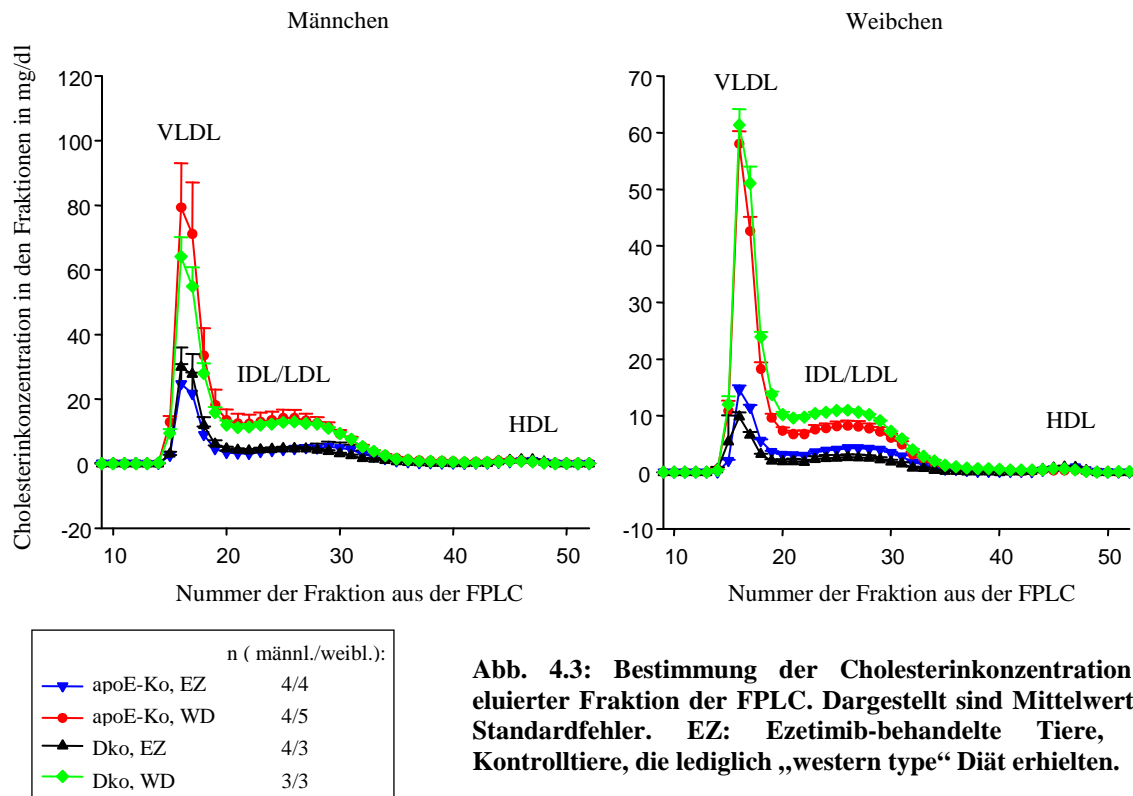


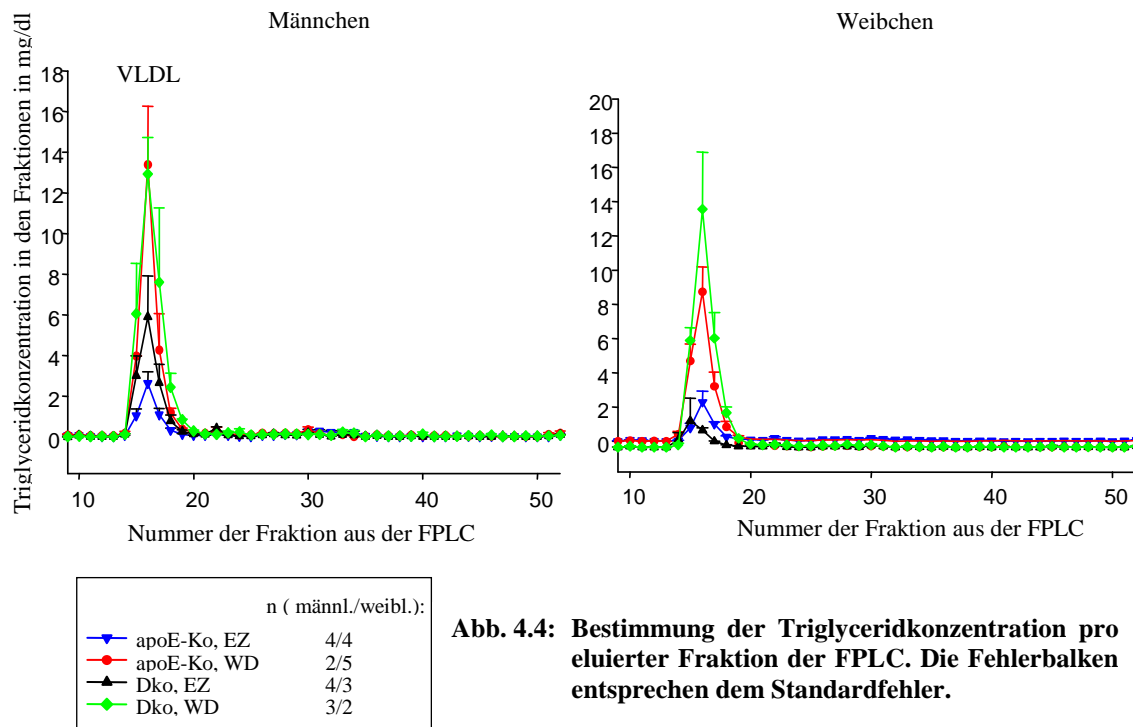
Abb. 4.2: Exemplarischer Röntgenfilm eines southern Blots für eNOS.

### 4.3 Lipide und Lipoproteinprofile

#### 4.3.1 Die Behandlung mit Ezetimib nicht aber der eNOS-Genotyp verringert die Konzentration von Cholesterin und Triglyceriden in den VLDL- und LDL-Fractionen der FPLC



Die Analyse der Plasmaproben in der FPLC ergab eine signifikante Verringerung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentration in den VLDL-, IDL- und LDL-Fractionen in den Ezetimib behandelten Gruppen im Vergleich mit den unbehandelten Tieren, wohingegen der Genotyp keinen Einfluss auf die Lipoproteinprofile hatte. (Abb. 4.3 und 4.4).

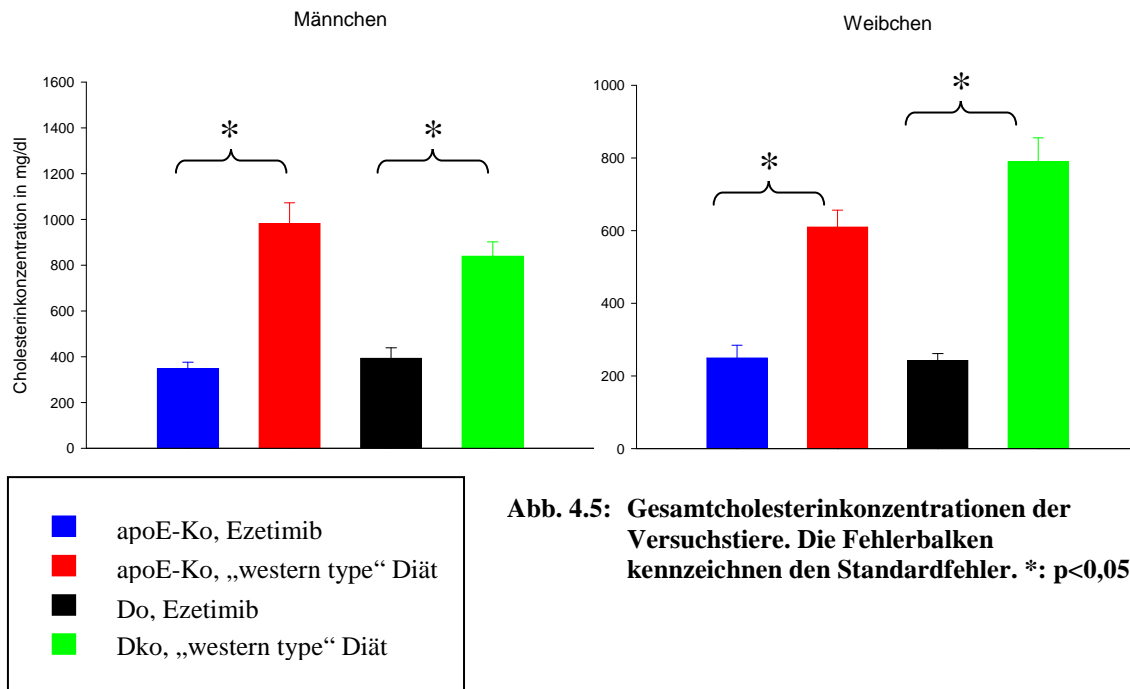


**Abb. 4.4:** Bestimmung der Triglyceridkonzentration pro eluierter Fraktion der FPLC. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

### 4.3.2 Ezetimib verringert im Gegensatz zum eNOS-Genotyp die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma

Die Gesamtcholesterinkonzentrationen im Plasma wurden in allen Gruppen durch Behandlung mit Ezetimib signifikant vermindert. Bei den männlichen apoE-Ko Tieren sank der Spiegel von  $982,2 \pm 224,0$  mg/dl ( $n=7$ ) um 64,7 % auf  $346,5 \pm 106,9$  mg/dl ( $n=14$ ). Bei den apoE/eNOS-Dko Mäusen betrug die Reduktion 53,1 % ( $839,7 \pm 152,6$  mg/dl auf  $393,5 \pm 131,7$  mg/dl;  $n=7$  und  $n=9$ ). Bei den Weibchen nahm die Gesamtcholesterinkonzentration bei den apoE-Ko Tieren um 59,1 % von  $608,9 \pm 115,0$  mg/dl ( $n=7$ ) auf  $249,2 \pm 100,6$  ( $n=9$ ) mg/dl ab. Bei den apoE/eNOS-Doppelknockout Mäusen betrug der Rückgang 69,3 % (von  $789,0 \pm 174,7$  mg/dl auf  $242,0 \pm 61,4$ ;  $n=8$  und  $n=11$ ; Abb. 4.5). Der eNOS-Genotyp hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtcholesterinkonzentration der Tiere.

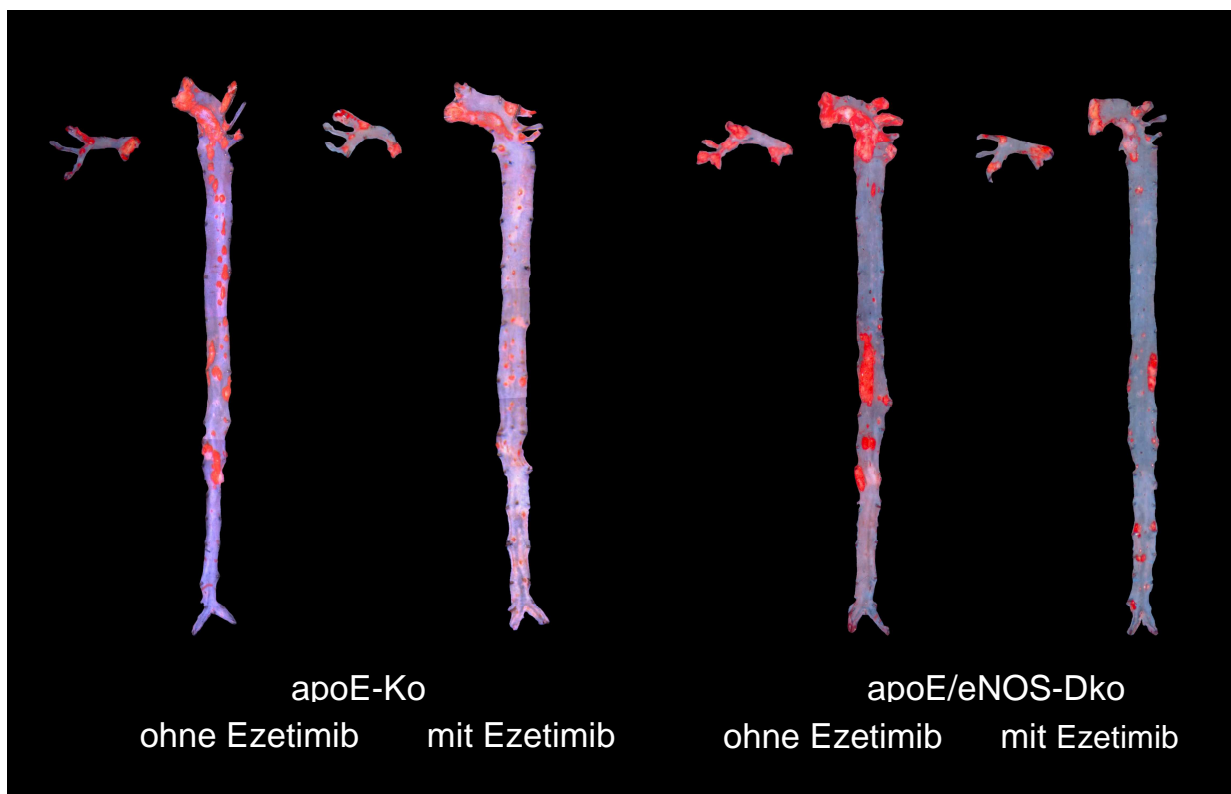




**Abb. 4.5:** Gesamtcholesterinkonzentrationen der Versuchstiere. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler. \*:  $p < 0,05$ ;

#### 4.4 Messung der Plaquemasse in den Aorten

Arteriosklerotische Plaques entstehen im apoE-Ko Tiermodell an Prädilektionsstellen mit gestörtem laminarem Blutfluss (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Sudan IV gefärbte Aorten weiblicher Tiere; im Bereich des Aortenbogens musste aufgrund der Krümmung ein Segment herausgeschnitten werden.

Einen Überblick über die mittlere arteriosklerotische Läsionsfläche in den Aorten der für diese Studie untersuchten Tiere vermitteln die Tabellen 4.1 und 4.2.

**Tabelle 4.1: Anteil der Plauefläche an der Gesamtfläche der Aorten männlicher Tiere mit Standardabweichung:**

Genotyp:	Mit Ezetimib behandelt:	Lediglich „western type“ Diät:
apoE-Ko	10,2 ± 3,6 % (n=14)	19,2 ± 5,3 % (n=7)
apoE/eNOS-Dko	18,5 ± 7,4 % (n=10)	28,1 ± 7,3 % (n=7)

**Tabelle 4.2: Anteil der Plauefläche an der Gesamtfläche der Aorten weiblicher Tiere mit Standardabweichung:**

Genotyp:	Mit Ezetimib behandelt:	Lediglich „western type“ Diät:
apoE-Ko	12,5 ± 2,2 % (n=10)	17,2 ± 3,3 % (n=10)
apoE/eNOS-Dko	15,7 ± 2,9 % (n=12)	21,1 ± 3,5 % (n=8)

#### **4.4.1 Bei eNOS-Defizienz nimmt die Plaquemasse von ApoE-Ko Tieren zu**

apoE/eNOS-Dko Tiere entwickeln im Vergleich zu apoE-Ko Mäusen vermehrt arteriosklerotische Plaques. Bei dieser Studie betrug die Zunahme bei den ausschließlich „western type“ Diät gefütterten Männchen signifikante 46,4 % (von einem Anteil von 19,2 % an der aortalen Gesamtfläche auf 28,1 % ( $p=0,01$ )). Bei den weiblichen Tieren stieg der Plaueanteil von 17,2 % um 22,7 % ( $p=0,036$ ) auf 21,1 %.

#### **4.4.2 Behandlung mit Ezetimib reduziert die Plaquemasse bei jedem Genotyp, bei männlichen apoE/eNOS-Doppelknockout Tieren jedoch weniger als in den entsprechenden apoE-Knockout Mäusen**

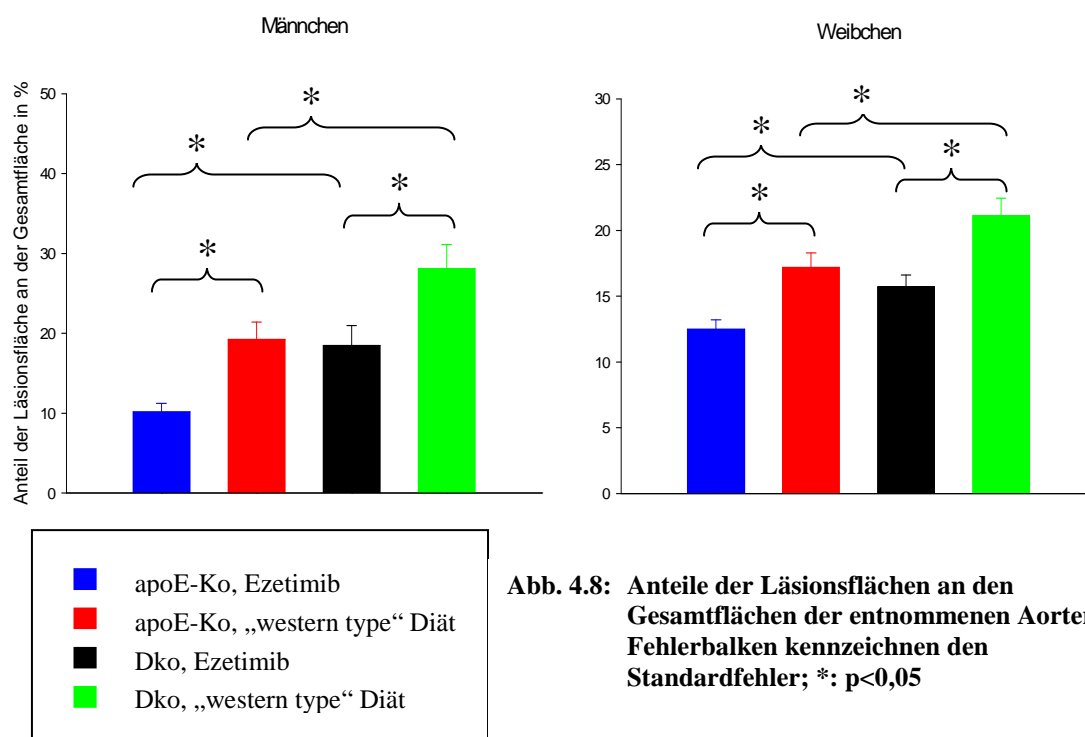
Durch Ezetimibfütterung konnte der Anteil erkrankter Gefäßabschnitte in allen vier Gruppen signifikant reduziert werden. Bei männlichen apoE-Ko Tieren nahm der Plaueanteil von 19,2 % um 46,9 % auf 10,2 % ab ( $p=0,0004$ ). Die Reduktion bei den

Dko Mäusen betrug 34,2 % (von 28,1 % auf 18,5 %;  $p=0,03$ ). Bei den Weibchen konnte in der apoE-Ko Gruppe ein Rückgang von 17,2 % um 27,3 % auf 12,5 % verzeichnet werden ( $p=0,002$ ). Die apoE/eNOS-Dko Weibchen erfuhren eine Plaqueabnahme von 25,6 % (von 21,1 % auf 15,7 %;  $p=0,003$ ).

Beim Vergleich der Reduktion der Plaqueflächen zwischen den apoE/eNOS-Dko und den apoE-Ko Gruppen durch Ezetimib fällt für die Männchen ein deutlich unterschiedlicher Rückgang von 34,2 % für Dko und 46,9 % für apoE-Ko auf, wohingegen die Reduktion bei den Weibchen mit 25,6 % (Dko) und 27,3 % (apoE-Ko) nicht signifikant differiert.

#### 4.4.3 Auch unter Ezetimibbehandlung haben apoE/eNOS-Doppelknockouttiere eine größere Plaquelast als apoE-Knockoutmäuse

Im Vergleich zu mit Ezetimib behandelten apoE-Ko Tieren, zeichnen sich Ezetimib gefütterte Dko Tiere beider Geschlechter durch eine signifikant vergrößerte Plaquefläche der Aorten aus (männlich apoE-Ko: 10,2 %, männlich Dko: 18,5 %;  $p=0,003$ ; weiblich apoE-Ko: 12,5 %, weiblich Dko: 15,7 %;  $p=0,02$ ). Einen Überblick über diese Zahlen vermittelt Abbildung 4.8.

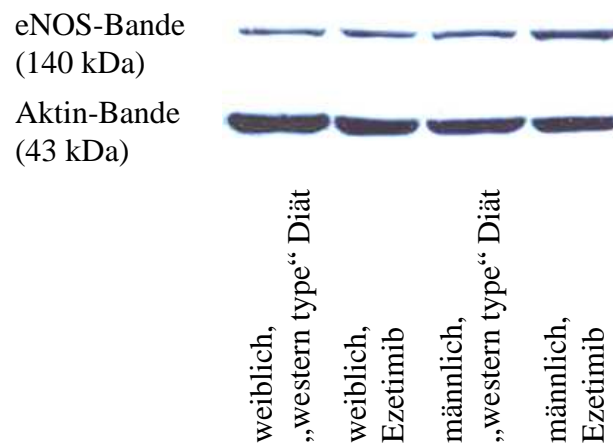


**Abb. 4.8:** Anteile der Läsionsflächen an den Gesamtflächen der entnommenen Aorten; Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler; \*:  $p<0,05$

Die verschiedenen Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich des Gewichts der Tiere ( $31,7 \pm 8,7$  Gramm) und der Gesamtfläche der Aorta ( $87,1 \pm 9,9$  mm<sup>2</sup>).

#### **4.5 Weder Geschlecht noch Behandlung mit Ezetimib beeinflussen die Menge an eNOS-Protein in der Gefäßwand von apoE-Ko Mäusen**

Das eNOS-Protein hat ein Molekulargewicht von 140 kDa und wandert deshalb langsamer durch das Polyacrylamidgel als die  $\alpha$ -Untereinheit des SMC-Aktin mit 75 kDa welches beim Western Blot der Standardisierung dient. Wie man in Abbildung 4.9 sehen kann ist sowohl die eNOS-Bande als auch die Bande des Aktin im Western Blot aus Proteinlysate von Aorten aus Tieren in allen vier apoE-Ko Gruppen gleich stark ausgebildet. Das bedeutet, dass weder das Geschlecht noch eine Behandlung mit Ezetimib einen Einfluss auf die eNOS-Menge im Gefäß haben.



**Abb. 4.9: repräsentative Darstellung eines Western Blots für eNOS; die Blots wurden pro Gruppe mindestens dreimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt**

## 5 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die apoE-Ko Maus ein für die Arterioskleroseforschung sehr nützliches Tiermodell<sup>7</sup>. Sind diese Tiere zusätzlich noch Defizient für die NO-Synthese der eNOS, verstärkt sich der Krankheitsverlauf noch weiter, da über die endotheliale NO-Produktion eine Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen, eine Unterdrückung der Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten, eine Reduzierung des oxidativen Stresses sowie eine verminderte Degranulation proinflammatorischer Vesikel vermittelt wird<sup>41, 45-50</sup>. Um die Rolle der eNOS an der antiarterosklerotischen Wirkung von Ezetimib zu beleuchten, verglichen wir die Medikamentenwirkung in apoE/eNOS-Dko Tieren mit der in apoE-Ko Mäusen. Um gültige Schlüsse aus diesem Vergleich ziehen zu können, ist es notwendig, dass andere die Wirkung beeinflussende Parameter wie die Abnahme des Cholesterinspiegels durch Ezetimibbehandlung in allen Gruppen gleich stark ausfallen.

### 5.1 Veränderungen der Lipide und Lipoproteine

Die Behandlung mit Ezetimib führte in allen untersuchten Gruppen zu einer signifikanten Abnahme von Gesamtcholesterin, VLDL-Cholesterin und Triglyceriden. Vergleicht man unbehandelte apoE-Ko Tieren mit unbehandelten apoE/eNOS-Dko Tieren, so zeigte sich jeweils kein signifikanter Unterschied in den Cholesterin- und Triglyceridspiegeln. Analog haben mit Ezetimib behandelte Tiere unabhängig vom eNOS-Genotyp identische Blutfettwerte. Es ist folglich von einer von der eNOS-Funktion unabhängigen Wirkung von Ezetimib auf die Cholesterin- und Triglyceridspiegel auszugehen.

### 5.2 Veränderungen der Gesamtläsionsfläche

Bei der Beurteilung der Gesamtfläche der arteriosklerotischen Läsionen konnte gezeigt werden, dass Ezetimib zu einer deutlichen Reduktion der Plaqueoberfläche und somit auch der Plaquemasse bei behandelten Tieren führte. Dieser Effekt war bereits nach achtwöchiger Therapiedauer bei Tieren nachweisbar, bei denen die Plaquebildung bereits eingesetzt hatte. Eine Wirkung konnte in allen untersuchten Gruppen beobachtet werden, eine endotheliale NO-Produktion ist für die atheroprotektive Wirkung von

Ezetimib folglich keine Voraussetzung. In weiblichen Tieren fiel die Verzögerung des Plaquewachstums durch Ezetimib in apoE-Ko und in apoE/eNOS-Dko Tieren gleich stark aus. Ezetimib schützte hier sowohl Tiere mit intakter als auch mit fehlender endothelialer NO Produktion im gleichen Ausmaß vor Arteriosklerose. Additive über die Cholesterinsenkung hinausgehende Effekte waren für diese Tiere nicht zu belegen.

Im Gegensatz dazu erfuhren männliche apoE-Ko Mäuse, deren endotheliale NO-Produktion nicht gestört ist, durch Ezetimibfütterung ein signifikant langsames Plaquewachstum im Vergleich mit männlichen apoE/eNOS-Dko Tieren. In dieser Gruppe verbesserte die intakte endotheliale NO-Produktion die Wirkstärke von Ezetimib. Die Ursache dafür, dass dieses Phänomen bei den weiblichen Tieren in dieser Versuchsanordnung nicht nachweisbar war, könnte an deren absoluter Plaquemasse liegen. Diese war bei den weiblichen Mäusen deutlich geringer als in den entsprechenden männlichen Gruppen. Es ist also denkbar, dass diese zusätzlichen Effekte erst bei fortgeschrittener Arteriosklerose zum Tragen kommen. Andere geschlechtsabhängige Effekte von Ezetimib können selbstverständlich nicht ausgeschlossen werden.

Da es im Western Blot in Abhängigkeit von der Behandlung zu keiner Änderung der eNOS-Proteinmenge in den Gefäßen der eNOS-kompetenten Tiere kam, ist nicht von einer ezetimibabhängigen Expressionsveränderung für die eNOS auszugehen. Eine erhöhte NO-Produktion kann jedoch auch durch eine verstärkte Aktivierung der vorhandenen eNOS erreicht werden. Es ist bereits bekannt, dass sich Veränderungen der Lipoproteinkonzentrationen auf die endotheliale NO-Produktion auswirken. So bewirkt eine erhöhte Konzentration an oxidiertem LDL sowohl eine Inaktivierung des eNOS-Proteins als auch eine Translokation des Proteins aus den zellmembranständigen Caveolae<sup>51</sup>. eNOS wirkt in gesunden Zellen in diesen Caveolae und wird dort von Caveolin reguliert<sup>52</sup>. Folglich vermindert oxidiertes LDL die konstitutive endotheliale NO-Produktion. HDL andererseits vermag die ungünstigen Auswirkungen von oxidiertem LDL auf die eNOS Aktivität zu verhindern<sup>53</sup>. Auch dieser Pathomechanismus könnte die unterschiedliche Wirkstärke von Ezetimib in männlichen Tieren erklären. Während in der apoE/eNOS-Dko Gruppe die eNOS Funktion durch Ezetimib nicht verbessert werden kann, verbessert die Cholesterinsenkung möglicherweise die NO-Bioverfügbarkeit in eNOS kompetenten apoE-Ko Mäusen.

Über die eingangs erwähnten Mechanismen bewirkt eine gesteigerte NO-Konzentration in der Gefäßwand ein langsames Fortschreiten der Arteriosklerose.

Um eine Aussage über die eNOS-Aktivität im Gefäß treffen zu können, führten wir im Anschluss an die hier beschriebenen Experimente Vasoreaktivitätsmessungen durch. Hierbei wird in der präparierten thorakalen Aorta im Organbad durch beigesetzte Pharmaka wie Acetylcholin die endotheliale NO-Produktion stimuliert und die daraus resultierende Gefäßerschaffung nach Vorkontraktion als Marker der Endothelfunktion gemessen. Hierbei konnte keine verbesserte Endothelfunktion bei ezetimibbehandelten Tieren festgestellt werden. Das Ausmaß der Kontraktion nach Acetylcholingabe ist in den untersuchten apoE-Ko Tieren beider Geschlechter mit und ohne Ezetimibtherapie gleich<sup>54</sup>. Da es sich bei der Vasoreaktivität um einen indirekten Nachweis der NO-Produktion handelt, der möglicherweise einer größeren Störanfälligkeit unterliegt, ist es hilfreich, auf Methoden zurückzugreifen, welche das NO-Radikal direkt nachweisen können. Hierzu kommt die Methode des elektronischen paramagnetischen „spin trapping“ in Frage. Hierbei reagiert das NO-Radikal mit Eisen-(II)-Diethyldithiocarbamat zu einer stabilen Form, welche sich mittels elektronischer Spinresonanzspektrometrie nachweisen und quantifizieren lässt<sup>55</sup>. Bei der Bestimmung der NO-Produktion in den Aorten der hier beschriebenen apoE-Ko Tieren lässt sich keine Steigerung in den Ezetimib gefütterten Tieren nachweisen<sup>54</sup>. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine erhöhte eNOS-Aktivität in den behandelten Tieren. Die Vasoreaktivitätsmessung kann jedoch nicht in stark arteriosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten eingesetzt werden, da großvolumige Plaques die Gefäßkontraktion aus mechanischen Gründen behindern würden und auch der NO-Nachweis mittels elektronischen paramagnetischen „spin trappings“ gelingt nur für das gesamte Gefäß. Eine Auflösung der endothelialen NO-Produktion in der direkten Umgebung einer Plaque ist hiermit bisher nicht möglich. Eine mögliche Erklärung für den größeren Nutzen von Ezetimib in männlichen apoE-Ko Tieren ist also die begrenzte Verbesserung der endothelialen NO-Produktion bzw. der NO-Bioverfügbarkeit in der direkten Umgebung arteriosklerotischer Plaques. Auch hierdurch könnte NO über die oben genannten Mechanismen den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen.

Hinweise hierfür gibt es auch durch klinische Studien: In Kombination mit Atorvastatin konnte Ezetimib die Endothelfunktion in Patienten mit metabolischem Syndrom im Vergleich zur Statinmonotherapie signifikant verbessern<sup>56</sup>.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass Ezetimib die Arterioskleroseentwicklung unabhängig von der Schwere der Erkrankung und einer intakten Endothelfunktion erheblich verzögert. Ezetimib hat dabei keinen direkten Einfluss auf die eNOS Expression. Die in den männlichen Tieren beobachtete verstärkte Wirkung von Ezetimib bei erhaltener eNOS-Funktion kann auf einer Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit beruhen, welche über die Veränderung des Lipoproteinprofils vermittelt sein kann.



## 6 Zusammenfassung

Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen. Zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zählt eine cholesterinsenkende Therapie heute zum üblichen Standard. Die bislang am häufigsten eingesetzte Präparate, die Statine verfügen neben der primären cholesterinsenkenden Wirkung auch über sogenannte pleiotrope Effekte: andere, den Krankheitsverlauf günstig beeinflussende Wirkungen, die unter Anderem über eine verbesserte endotheliale NO-Verfügbarkeit vermittelt werden.

Ezetimib ist ein neuartiges Medikament, welches die Cholesterinresorption im Darm hemmt, das ebenfalls die Arterioskleroseentwicklung bremst und von dem wenig über zusätzliche, von der Cholesterinsenkung unabhängige Effekte bekannt ist. Um die Rolle der endothelialen NO-Synthase für die arterioprotektive Wirkung von Ezetimib näher beleuchten zu können wurde apoE-Ko und apoE/eNOS-Doppelknockoutmäusen eine fetthaltige Diät mit oder ohne 0,05 % Ezetimib verabreicht.

Sowohl in apoE-Ko, als auch in apoE/eNOS-Dko Tieren bewirkte Ezetimib eine deutliche Senkung der Konzentration des Gesamtcholesterins und der atherogenen Lipoproteine. Aorten von apoE-Ko Mäusen, die mit Ezetimib gefüttert wurden, enthielten die gleiche Menge eNOS wie die von Tieren, denen Ezetimib vorenthalten wurde. In allen Gruppen konnte die Krankheitsprogression, gemessen an der Gesamtfläche der arteriosklerotischen Läsionen in den Aorten, durch Ezetimib signifikant günstig beeinflusst werden. Im Vergleich des Ausmaßes der Plaquereduktion zwischen apoE-Ko und apoE/eNOS-Dko Tieren fiel eine deutlich verstärkte Wirkung von Ezetimib in den männlichen apoE-Ko Mäusen auf. Obwohl in weiterführenden Untersuchungen weder eine Hochregulierung der Expression noch der Aktivität von eNOS durch Ezetimib nachzuweisen war, könnte dieses Phänomen durch eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von NO in direkter Plaquenähe zu erklären sein.

## 7 Literatur

1. *The world health report 2003 - shaping the future*. World Health Organization; 2003.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
3. Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, Krebs A, Nauck M, Wanner C, Potempa LA, Galle J. Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2005;112:1016-1023.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
5. Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Berlin ; Heidelberg: Springer; 2001.
6. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4431-4435.
7. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-471.
8. Drexler H, Zeiher AM, Wollschlager H, Meinertz T, Just H, Bonzel T. Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation*. 1989;80:466-474.
9. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
10. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
11. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244:181-189.
12. Busse R, Fleming I. Regulation of NO synthesis in endothelial cells. *Kidney Blood Press Res*. 1998;21:264-266.
13. Wyatt AW, Steinert JR, Mann GE. Modulation of the L-arginine/nitric oxide signalling pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Soc Symp*. 2004:143-156.
14. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998;273:25804-25808.
15. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993;91:2546-2551.
16. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74:3203-3207.

17. 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*. 1995;377:239-242.
18. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Herold; 2005.
19. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
20. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7-22.
21. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1149-1158.
22. Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int J Cardiol*. 2002;86:5-18.
23. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1712-1719.
24. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:729-736.
25. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000;6:1004-1010.
26. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1129-1135.
27. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
28. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
29. Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, Talley JD, Stillabower ME, Kosinski AS, Zhang J, Boccuzzi SJ, Cedarholm JC, Alexander RW. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1995;332:481-487.
30. Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. *Circulation*. 1995;92:898-903.
31. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation*. 1997;95:76-82.
32. van Heek M, Farley C, Compton DS, Hoos L, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR, Jr. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption

- inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol*. 2000;129:1748-1754.
33. Van Heek M, France CF, Compton DS, McLeod RL, Yumibe NP, Alton KB, Sybertz EJ, Davis HR, Jr. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:157-163.
  34. Jeu L, Cheng JW. Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH 58235), a cholesterol-absorption inhibitor. *Clin Ther*. 2003;25:2352-2387.
  35. Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP, Crona JH, Davis HR, Jr., Dean DC, Detmers PA, Graziano MP, Hughes M, Macintyre DE, Ogawa A, O'Neill K A, Iyer SP, Shevell DE, Smith MM, Tang YS, Makarewicz AM, Ujjainwalla F, Altmann SW, Chapman KT, Thornberry NA. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8132-8137.
  36. Davis HR, Jr., Compton DS, Hoos L, Tetzloff G. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:2032-2038.
  37. Rosenblum SB, Huynh T, Afonso A, Davis HR, Jr., Yumibe N, Clader JW, Burnett DA. Discovery of 1-(4-fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4 -hydroxyphenyl)-2-azetidinone (SCH 58235): a designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. *J Med Chem*. 1998;41:973-980.
  38. van Heek M, Compton DS, Davis HR. The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys. *Eur J Pharmacol*. 2001;415:79-84.
  39. Hawes BE, O'Neill K A, Yao X, Crona JH, Davis HR, Jr., Graziano MP, Altmann SW. In vivo responsiveness to ezetimibe correlates with niemann-pick C1 like-1 (NPC1L1) binding affinity: Comparison of multiple species NPC1L1 orthologs. *Mol Pharmacol*. 2007;71:19-29.
  40. 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. *J Clin Invest*. 2000;105:451-458.
  41. 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*. 2001;104:448-454.
  42. 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*. 2001;104:2391-2394.
  43. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133-140.
  44. 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. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.

45. Bath PM. The effect of nitric oxide-donating vasodilators on monocyte chemotaxis and intracellular cGMP concentrations in vitro. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993;45:53-58.
46. Goss SP, Hogg N, Kalyanaraman B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1997;272:21647-21653.
47. Matsushita K, Morrell CN, Cambien B, Yang SX, Yamakuchi M, Bao C, Hara MR, Quick RA, Cao W, O'Rourke B, Lowenstein JM, Pevsner J, Wagner DD, Lowenstein CJ. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell.* 2003;115:139-150.
48. Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25:674-678.
49. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12:87-88.
50. Huie RE, Padmaja S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 1993;18:195-199.
51. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem.* 1999;274:32512-32519.
52. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* 1997;272:15583-15586.
53. Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem.* 2000;275:11278-11283.
54. Kuhlencordt PJ, Padmapriya P, Rutzel S, Schodel J, Hu K, Schafer A, Huang PL, Ertl G, Bauersachs J. Ezetimibe potently reduces vascular inflammation and arteriosclerosis in eNOS-deficient ApoE ko mice. *Atherosclerosis.* 2008.
55. Kleschyov AL, Munzel T. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol.* 2002;359:42-51.
56. Bulut D, Hanefeld C, Bulut-Streich N, Graf C, Mugge A, Spiecker M. Endothelial function in the forearm circulation of patients with the metabolic syndrome--effect of different lipid-lowering regimens. *Cardiology.* 2005;104:176-180.

## 8 Anhang

### Verwendete Abkürzungen

%	Prozent
° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
apoE	Apolipoprotein E
bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumkation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
Dko	Doppelknockout
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EDRF	endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-synthase
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Gramm
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA	β-Hydroxy-β-methylglutarylcoenzym A
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase: Peroxidase des Meerrettichs
IDL	intermediate density lipoprotein
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen

---

kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
Ko	Knockout
LDL	low density lipoprotein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
M	Molar
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	parts per million
rcf	relative centrifuge force: Beschleunigung in Vielfachen der Erdbeschleunigung von 9,81 m/s <sup>2</sup>
SDS	Natriumdodecyl-Sulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer
V	Volt
vgl.	vergleiche
VLDL	very low density lipoprotein

Sebastian Rützel  
Riebeckstraße 15  
04317 Leipzig

## Lebenslauf von Sebastian Rützel

\* 10.11.1979 in Würzburg

### Schulische Ausbildung:

09/90 – 06/99

Otto Hahn Gymnasium Marktredwitz  
Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst:

08/99 – 06/00

Klinikum Fichtelgebirge  
*Pflegediensthelfer* (internistische Station und  
ZPA), *Fahrer des Notarzteinsatzfahrzeugs*

07/00 – 09/00

Bayrisches Rotes Kreuz / Kreisverband  
Wunsiedel im Fichtelgebirge  
*Rettungsdiensthelfer*

### Studium:

10/00 – 09/07

Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
*Studium der Humanmedizin*

09/02

Ärztliche Vorprüfung

08/03

erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/05

zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/07

dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Famulaturen:

02/03 – 03/03

Klinikum Fichtelgebirge (Marktredwitz)  
*(Chirurgie)*

03/04

Klinikum Fichtelgebirge (Marktredwitz)  
*(Innere Medizin)*

08/04

Kinderklinik am Mönchberg (Würzburg)  
*(Kinderheilkunde)*



Sebastian Rützel  
Riebeckstraße 15  
04317 Leipzig

03/05

Praxis Dres. Sack, Glotzbach-Sack und  
Kozuschek (Würzburg)  
(*Kinderheilkunde*)

**PJ-Tertiale:**

04/06 – 08/06

Universitäts-Kinderklinik Würzburg  
(*Kinderheilkunde*)

08/06 – 12/06

Missionsärztliche Klinik Würzburg  
(*Innere Medizin*)

12/06 – 03/07

St. Elizabeth's Regional Medical Center  
(Lincoln, Nebraska, USA)  
(*Chirurgie*)

**Berufliche Tätigkeit:**

Seit 11/07

Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für  
Kinder und Jugendliche

**Doktorarbeit:**

„Ezetimib reduziert Arteriosklerose in eNOS-defizienten apoE-Ko-Mäusen“ in der Arbeitsgruppe Kuhlencordt in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg.

Leipzig, den 10.11.09

Sebastian Rützel