

**Estrogen improves vascular function  
via peroxisome-proliferator-activated-receptor- $\gamma$**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Stephen Ngum Fung  
aus Kumba/Kamerun  
2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Cornelius Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wüllner

Tag der Mündlichen Prüfung: 16.05.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin; Kardiologie, Angiologie,  
Pneumologie und Internistische Intensivmedizin  
Direktor: Professor Dr.med. G. Nickenig

Meinen lieben Eltern  
Anthony Abang Fung und Nsen Catherine Fung



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seiten</b>
<b>1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
2.1 Einführung in die Thematik.....	9
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
3.1 Tiere und Behandlungsprotokoll.....	12
3.2 Western Blot (WB).....	15
3.2.1 Materialien.....	15
3.2.2 Durchführung.....	16
3.2.2.1 SDS-PAGE.....	17
3.2.2.2 Transfer.....	18
3.2.2.3 Blocken.....	19
3.2.2.4 Detektion.....	19
3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	20
3.3.1 Materialien.....	20
3.3.2 Durchführung.....	20
3.4 Messungen von Blutdruck, Herzfrequenz, Cholesterin und Körpergewicht.....	21
3.4.1 Materialien.....	21
3.4.2 Durchführung.....	21
3.5 Glukose- und Insulintoleranztest.....	22
3.5.1 Materialien.....	22
3.5.2 Durchführung.....	22
3.6 Präparation der Aortenringe und Messung der Endothelfunktion.....	22
3.6.1 Materialien.....	22
3.6.2 Durchführung.....	23
3.7 Färbung der atherosklerotischen Läsionen und morphometrische Analyse.....	25
3.7.1 Materialien.....	25
3.7.2 Durchführung.....	25
3.8 Vaskuläre ROS Messung (L-012).....	26
3.8.1 Materialien.....	26

3.8.2	Durchführung.....	26
3.9	Immunhistochemische Analyse des Monozyten/Makrophagen-Marker MOMA-2.....	26
3.9.1	Materialien.....	26
3.9.2	Durchführung.....	27
3.10	Statistische Analyse.....	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
4.1	Östrogenabhängige PPAR $\gamma$ -Expression in der Gefäßwand von WT-Mäusen.....	28
4.2	Östrogenabhängige vaskuläre ROS-Freisetzung in WT-Mäusen.....	30
4.3	Metabolische Parameter, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz der untersuchten WT-Mäuse.....	31
4.4	Östrogenabhängige PPAR $\gamma$ -Expression in der Gefäßwand von ApoE $^{-/-}$ -Mäusen.....	34
4.5	Östrogenabhängige vaskuläre ROS-Freisetzung in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen.....	36
4.6	Endothelfunktion in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen.....	37
4.7	Metabolische Parameter, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz der untersuchten ApoE $^{-/-}$ -Mäuse.....	40
4.8	Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen.....	44
4.9	Monozyteninfiltration der atherosklerotischen Läsionen in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen.....	45
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>56</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knock Out (gezielte Deaktivierung eines bestimmten Gens)
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E defiziente-Maus
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bpm	Beats per minute
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CVD	Cardiovascular disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
ER	Östrogenrezeptor ( <i>Estrogen receptor</i> )
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRT	Hormonersatztherapie ( <i>Hormone replacement therapy</i> )
IgG	Immunglobulin G
i.p	Intraperitoneal
ipGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
ipITT	Intraperitonealer Insulintoleranztest
kD	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
Konc.	Konzentration
LDLR	Low density lipoprotein receptor
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
mmol/l	Millimol pro Liter
MOMA-2	Monozyten/Makrophagen Marker 2
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Normal goat serum
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase ( <i>Nitrogen oxide synthase</i> )
OVX	Ovarektomierte Maus
OVX/E2	Ovarektomierte Maus + Östrogen
OVX/E2+GW9662	Ovarektomierte Maus + Östrogen + PPARγ-Antagonist
OVX+Pioglitazon	Ovarektomierte Maus + PPARγ-Agonist
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PPARγ	Peroxisome-proliferator-activated-receptor-gamma
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
ROS	Sauerstoffradikale ( <i>Reactive oxygen species</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sham	Schein-operierte Maus
T	Thymin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
vs.	Versus
VSMCs	Vaskuläre glatte Muskelzellen ( <i>Vascular smooth muscle cells</i> )
WT	Wildtyp

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung in die Thematik

Die geringe Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen vor der Menopause und die Zunahme von kardiovaskulären Ereignissen nach der Menopause suggerieren eine wichtige Rolle von  $17\beta$ -Östrogen in der Pathogenese der Atherosklerose.

Die Bindung von Östrogen an Östrogenrezeptoren (ER), Mitglied der Familie der Geschlechtshormonrezeptoren, bewirkt eine Konformationsänderung innerhalb des Östrogenrezeptors. Diese Konformationsänderung führt zu spezifischen Interaktionen des Rezeptors mit intrazellulären Signaltransduktionskaskaden und DNA-Zielsequenzen die das kardiovaskuläre System beeinflussen können. Hierunter nimmt das Zusammenspiel zwischen den Geschlechtshormon-rezeptoren mit nicht-steroidalen, nuklearen Hormon-Rezeptoren, wie PPAR $\gamma$ , eine zentrale Rolle ein (Mendelsohn und Karas, 2005). Neben den gut dokumentierten Funktionen auf die Adipogenese und den Glukosestoffwechsel hat PPAR $\gamma$  einen direkten Einfluss auf vaskuläre Zellen. In Mausmodellen der Atherosklerose konnten die hemmenden Wirkungen von PPAR $\gamma$  und Östrogen auf die Atherogenese dargestellt werden (Hodgin et al., 2002). Im Hinblick auf die Atherogenese wurde die Interaktion beider nuklearer Rezeptorsysteme noch nicht untersucht. In den meisten Tierexperimenten führte die exogene Verabreichung von  $17\beta$ -Östrogen zu positiven vaskulären Effekten. In erster Linie wirkt Östrogen auf frühe Stadien der Plaquebildung mit einer Modulation der Expression von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen, der Freisetzung von vasoprotektiven Substanzen sowie von immunmodulatorischen Faktoren, die die Atherogenese günstig beeinflussen (Caulin-Glaser et al., 1996; Nickenig et al., 1996). Andere mögliche Ursachen für die frühe Atheroprotektion durch Östrogen basieren auf Veränderungen des Blut-Cholesterinspiegels. In-vivo-Tierexperimente konnten zeigen, dass eine Behandlung mit  $17\beta$ -Östrogen mit einer Reduktion des gesamten Plasmacholesterinspiegels verbunden war (Wagner et al., 1991). Allerdings wurde ein beobachteter Rückgang der Atherosklerose nicht immer von einer tatsächlichen Reduktion des Plasmacholesterinspiegels begleitet, was darauf hindeutet, dass Östrogen atheroprotektive Effekte unabhängig von Veränderungen des Cholesterinspiegels besitzt. Ähnlich wie die vaskulären Wirkungen des  $17\beta$ -Östrogens führen Störungen der PPAR $\gamma$ -Expression oder eine Behandlung mit

PPAR $\gamma$ -Antagonisten zu einem Progress der Atherosklerose. Ein selektiver PPAR $\gamma$ -Knockout in Makrophagen verstärkt beispielsweise eine cholesterininduzierte Atherosklerose. Darüber hinaus fördert der PPAR $\gamma$ -Knockout die Entstehung von Gefäßläsionen durch vermehrte Expression von VCAM-1 auf vaskulären glatten Muskelzellen. Demgegenüber führt die Stimulation von PPAR $\gamma$  mit dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon zu einer verminderten Expression von VCAM-1 und verbessert dadurch die Gefäßfunktion. Neue Studien zeigen, dass eine spezifische PPAR $\gamma$ -Disruption in Endothelzellen der LDL-Knockout-Maus zu schwerer Dyslipidämie sowie zum signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks führt und eine vaskuläre Entzündung fördert (Qu et al., 2012).

Eine Expression des ER als auch des PPAR $\gamma$  ist in Endothelzellen (EC), vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) und Monozyten/Makrophagen nachgewiesen worden (Mendelsohn und Karas, 2005; Karas et al., 2001; Murphy et al., 2009). In ECs verbessert die Stimulation mit 17 $\beta$ -Östrogen die endotheliale Funktion sowie die Vasodilatation durch vermehrte NO-Freisetzung und die Induktion von NO-Synthase-Genen (Xing et al., 2009; Calnek et al., 2003). Außerdem erhöhen 17 $\beta$ -Östrogen und PPAR $\gamma$  die funktionelle Aktivität der aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Progenitorzellen (EPC) und reduzieren die Apoptose der ECs und wirken somit fördernd auf die endotheliale Regeneration (Strehlow et al., 2003; Besler et al., 2008). Zusätzlich interagieren beide Rezeptortypen mit der Zytokin-aktivierten NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade und verhindern somit die Genexpression von Adhäsionsmolekülen und limitieren damit die Migration von Immunzellen (Xing et al., 2009). Schließlich verhindern aktivierte ERs und PPAR $\gamma$  die Proliferation der VSMC durch Blockade des Zellzyklus (Xing et al., 2009; Plutzky, 2011). Die Koinzidenz der zellulären Wirkungen sowie der beteiligten molekularen Faktoren deutet an, dass 17 $\beta$ -Östrogen die vaskuläre Funktion durch die Stimulation von PPAR $\gamma$  verbessern könnte und dadurch antioxidative und anti-inflammatorische Wirkungen vermittelt.

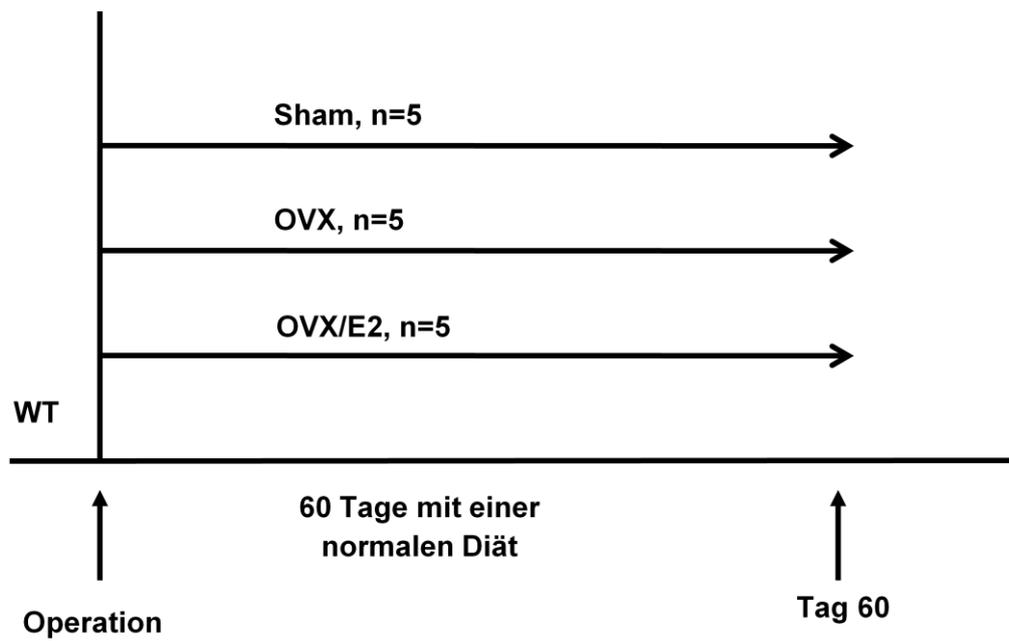
Wir untersuchten die Wirkung von endogenem 17 $\beta$ -Östrogen (Sham), Östrogenmangel (OVX) und exogenem 17 $\beta$ -Östrogen (OVX/E2) auf die Expression von PPAR $\gamma$  im Gefäßsystem von Wildtyp- (WT) und ApoE $^{-/-}$ -Mäusen. Darüber hinaus untersuchten wir die endotheliale Funktion, die Monozytenrekrutierung, die ROS-Freisetzung und die Atherogenese in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen, die unter einer hochkalorischen, cholesterinreichen

Diät eine endotheliale Dysfunktion, Gefäßinflammation und Atherosklerose entwickeln. Weiterhin wurden  $17\beta$ -Östrogen-defiziente ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einem PPAR $\gamma$ -Agonisten und nicht-ovarektomierte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einem PPAR $\gamma$ -Antagonisten behandelt um weitere Erkenntnisse zur Relevanz von PPAR $\gamma$  für die  $17\beta$ -östrogenabhängigen Effekte im Gefäßsystem analysieren zu können.

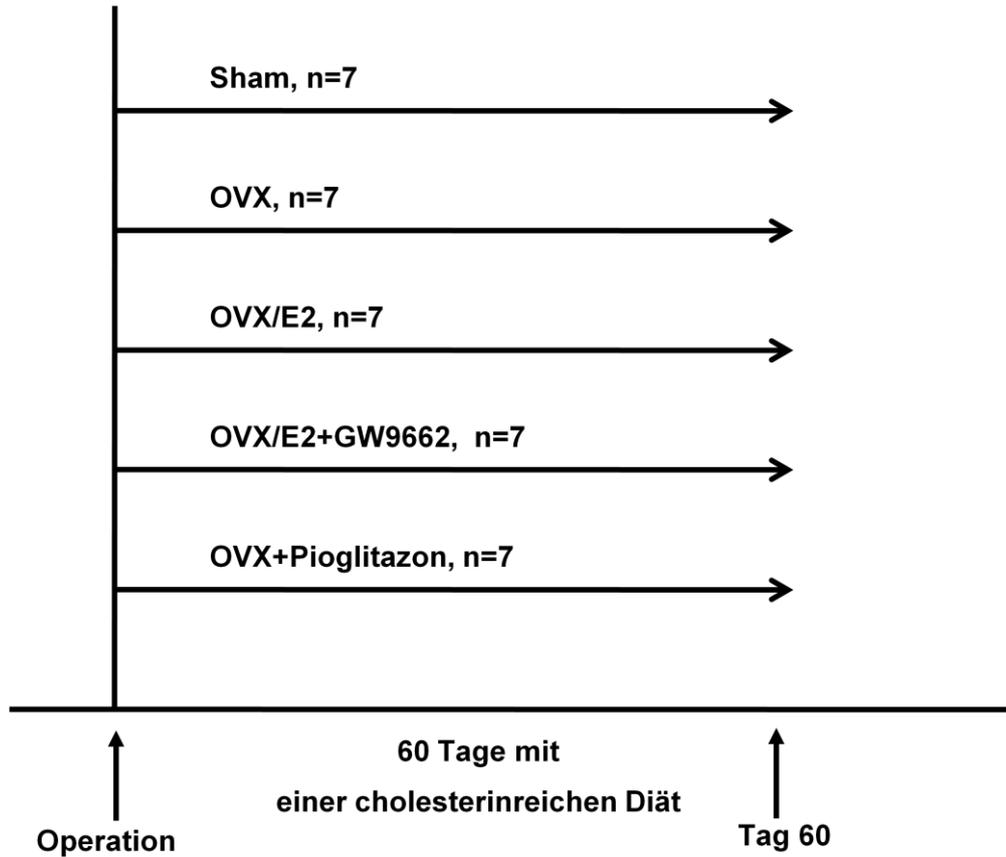
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Tiere und Behandlungsprotokoll

Fünfzehn 8 Wochen alte C57-BL6 weibliche WT-Mäuse wurden in drei Gruppen unterteilt (Abb.1): Die erste Gruppe wurde Schein-operiert (Sham), die zweite Gruppe beidseitig ovariectomiert (OVX) und die dritte Gruppe erhielt eine Ovariectomie mit zusätzlicher 17 $\beta$ -Östrogensersatztherapie (OVX/E2), die als 17 $\beta$ -Östrogen-Pellets (Innovative Research America, Florida USA) subkutan (mit jeweils 1,7 mg 17 $\beta$ -Östrogen, Liberation über 60 Tage) appliziert wurde. Fünfunddreißig 8 Wochen alte weibliche C57-BL6ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden in fünf Gruppen randomisiert (Abb.2): Die ersten drei Gruppen wurden analog zu den Gruppen der WT-Mäusen operiert (Sham, OVX, OVX/E2). Die vierte Gruppe wurde ovariectomiert mit zusätzlicher 17 $\beta$ -Östrogentherapie und dem selektiven PPAR $\gamma$ -Antagonist GW9662 (Sigma<sup>®</sup>, Saint Louis, USA) (OVX/E2+GW9662), welcher i.p mit einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht jeden zweiten Tag appliziert wurde. Die fünfte Gruppe wurde ovariectomiert und mit dem selektiven PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon (Actos<sup>™</sup>, OVX+Pioglitazon), der oral mit einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht appliziert wurde, behandelt. Diese Gruppe erhielt keine 17 $\beta$ -Östrogensersatztherapie. Die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit einer fett- und cholesterinreichen Diät, die 21 % Fett, 19,5 % Casein und 1,25 % Cholesterin (Sniff, Germany) enthielt, ernährt. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien und dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.



**Abb.1:** Weibliche WT-Mäuse wurden wie oben dargestellt in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe wurde Schein-operiert (Sham) und diente als Kontrolle. Die zweite Gruppe wurde ovariectomiert (OVX) und die dritte Gruppe wurde ovariectomiert und erhielt zusätzlich eine exogene  $17\beta$ -Östrogentherapie als Pellets (OVX/E2)



**Abb.2:** Analog zu den WT-Mäusen wurden weibliche ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse in Gruppen unterteilt und wie oben dargestellt operiert. Zusätzlich zu Sham, OVX, OVX/E2 wurden zwei weitere Gruppen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Eine Gruppe wurde ovariectomiert und erhielt eine exogene 17 $\beta$ -Östrogensubstitution sowie zusätzlich eine Therapie mit GW9662, einem spezifischen PPAR $\gamma$ -Antagonist (OVX/E2+GW9662). Die letzte Gruppe wurde ovariectomiert und erhielt den spezifischen PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon ohne zusätzliche Östrogensersatztherapie. Die Mäuse wurden für 60 Tage mit einer cholesterinreichen Diät ernährt, um eine endotheliale Dysfunktion, vaskuläre Inflammation und Atherogenese zu induzieren

## 3.2 Western Blot (WB)

### 3.2.1 Materialien

Reagenzien:

- Lysepuffer:  
62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), 10 % Glycerol, 50 mM DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethan), 0,01 % Bromophenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein), 10 µl Leupeptin, 10 µl Aprotinin
- Unterer Tris-Puffer:  
1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- Oberer Tris-Puffer:  
1 M Tris-HCl pH 6,8
- 12 % Trenngel:  
Aqua dest., Unterer Tris-Puffer, 10 % SDS, 30 % Acrylamide/Bis-Lösung (29:1), 10 % APS; TEMED
- 5 % Sammelgel:  
Aqua dest., Oberer Tris-puffer, 10 % SDS, 30 % Acrylamide/Bis-Lösung (29:1), 10 % APS, TEMED
- 1x Laufpuffer:  
Tris-Base, Glycin, SDS, H<sub>2</sub>O
- 1x Transferpuffer:  
Tris-Base, Glycin, SDS, Methanol, H<sub>2</sub>O
- Proteinladepuffer:  
Glycerin, 10 % SDS, Bromophenolblau, Tris-HCl pH 6,8, EDTA, β-Mercaptoethanol
- Waschlösungen:  
10x PBS (NaCl 80 g; KCl 2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,4 g; 1Liter H<sub>2</sub>O pH 7,4), 1x PBS (100 ml 10x PBS + 900 ml Aqua dest.), 0.1 % Tween 20
- Blocklösungen:  
2,5 % BSA (Bovine-Serum-Albumin), 1x PBS
- Whatman Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad laboratories Germany)

- PPAR $\gamma$ -rabbit-polyclonal IgG-Antikörper (1:1000 Dilution, ab27649 Abcam)
- Goat-anti rabbit-secondary-Antikörper (1:5000 Dilution, Sigma Chemical)
- GAPDH monoclonal Antikörper (1:3000 Dilution ab9484 Abcam)
- Anti-mice IgG-fraction of antiserum (Sigma A9044)
- Chemilumineszenz-kit (ECL<sup>™</sup>-Prime Western blotting detecting reagent-Amersham<sup>™</sup>)
- Chemilumineszenz-Kammer (Software Chemostar-imager INTAS<sup>®</sup>)
- Zentrifuge (Biofuge Pico-Heraeus Instruments)
- Heizblock (HCL-Germany)
- Elektrobloßkammer (Pharmacia Biotech)
- Sonificator

### 3.2.2 Durchführung

Die Technik des Western Blots ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine aus Proteingemischen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Aorten in eiskaltem Lysepuffer, der zusätzlich Aprotinin und Leupeptin enthielt, homogenisiert. Die Proteinproben wurden anschließend auf einem SDS-PAGE getrennt. Das Western-Blotting der Proteine wurde in einer semi-trockenen Elektrobloßkammer durchgeführt (Pharmacia Biotech). Das Immunoblotting wurde mit einem PPAR $\gamma$ -rabbit-polyclonal IgG-Antikörper (1:1000 Dilution, ab27649 Abcam) für 60 min bei 37 C unternommen. Die Immunodetektion wurde unter Verwendung eines Goat-antirabbit-secondary-Antikörper (1:5000 Dilution, Sigma Chemical) und des Chemilumineszenz-Kit (Amersham) durchgeführt.

### 3.2.2.1 SDS-PAGE

Mit der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. SDS bindet an die hydrophobe Regionen der Proteine, die dadurch einerseits denaturiert werden und andererseits eine negative Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht erhalten. Somit überdeckt die SDS die Eigenladung der Proteine, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld nur von der negativen Gesamtladung der Proteine, die dem Molekulargewicht entspricht, und von der Porengröße der Gelmatrix abhängig ist.

Der prozentuale Anteil von Quervernetzern bestimmt die Porengröße einer Gelmatrix. Je höher der prozentuale Anteil an Quervernetzern ist, desto kleinere Proteine können voneinander getrennt werden. Polyacrylamid ist ein Copolymer aus Acrylamid und Bisacrylamid, das im Verhältnis 29:1 (30 % Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) verwendet wird. Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisation des Polyacrylamids gestartet. Die Gabe von TEMED (N,N,N-Tetramethylethylendiamin; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California USA) stabilisiert die Radikale bei der Kettenbildung, sodass möglichst viele Startmoleküle bei Reaktionsbeginn der Polymerisation zur Verfügung stehen. Die Polymerisation erfolgt unter Luftabschluss, da sie sonst ungünstig beeinflusst wird. Daher werden die Gele mit Aqua dest. abgedeckt, was gleichzeitig zu einer planen Abschlusskante führt.

Bei der SDS-PAGE wird ein diskontinuierliches Gelsystem nach Laemmli verwendet, das sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammensetzt. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine in einem schmalen Band. Der Anteil an Polyacrylamid im Sammelgel beträgt 5 %. Somit wird nur die Beweglichkeit der großen Proteine beeinträchtigt. Das Trenngel, in dem die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt, enthält 10 % Polyacrylamid. Diese Konzentration erlaubt eine lineare Trennung von Proteinen deren Größe 16 bis 68 kD beträgt.

Das Prinzip der diskontinuierlichen Gele beruht auf der Verwendung verschiedener pH-Werte für die Puffer. Der Sammelgelpuffer (Oberer Tris-Puffer) besitzt einen pH-Wert von 6,8. Bei diesem pH-Wert liegt die dem Puffer zugefügte Aminosäure Glycin als Kation vor. Die Chloridionen (Cl<sup>-</sup> laufen aufgrund der hohen Ladungsdichte im Gel vor) als Leitonen ziehen die positiv geladenen kleinen Glycinionen hinter sich her. Es entsteht zwischen den Taschen des Gels und der Glycinionenfront ein niedriger

Spannungsgradient. Dadurch erhöht sich auch die Beweglichkeit der negativ geladenen Proteine und sie wandern schneller.

Bevor die SDS-PAGE begonnen wurde, wurden die Proteinproben für sechs Minuten sonifiziert und anschließend für zwei Minuten zentrifugiert (Biofuge Pico-Heraeus Instruments). Die Proteinproben wurden dann sorgfältig in jeder Tasche des Gels pipettiert. Durch ein elektrisches Feld (80-120 mV) über dem Gel konnten die negativ geladenen Proteine in Richtung der positiven Elektrode (Anode) migrieren. Je nach Größe bewegt sich jedes Protein anders durch die Gelmatrix. Kleine Proteine passen leichter durch die Poren des Gels, während größere Proteine mehr Hindernissen begegnen. Nach etwa zwei Stunden (obwohl dies von der Spannung abhängig ist, die über dem Gel angelegt wird; Proteinmigration tritt schneller bei höheren Spannungen auf) migrieren Proteine in der Gelmatrix unterschiedlich nach ihrer Größe. Kleinere Proteine migrieren weit nach unten, während Größere näher am Migrationsstartpunkt bleiben.

Mit Hilfe eines Prestained-Standard-Markers (Spectra™ multicolor ThermoScientific, California, United States), der zehn Proteine mit bekannten Molekulargewichten enthält, lassen sich die Molekulargewichte der Proben anhand ihrer Laufstrecke ermitteln.

### **3.2.2.2 Transfer**

Um die Proteine für den Antikörpernachweis zugänglich zu machen, wurden sie aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- (Whatman Membran) oder Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) übertragen. Diese Methode liegt dem Prinzip des Elektroblots zugrunde und benötigt eine Stromquelle (ca. 350 mA) um die Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulose- oder PVDF-Membran zu übertragen. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden blasenfrei gemacht, zwischen Whatman-Filter gelegt und in einem Elektrodenrahmen montiert. Der Elektrodenrahmen wurde danach an einem mit Transferpuffer gefüllten Puffer-Tank angeschlossen. Danach wurde ein elektrisches Feld angelegt. Die SDS negativ geladenen Proteine lösten sich aus dem Gel in Richtung Anode und blieben an der Nitrocellulosemembran haften. In der Nitrocellulosemembran waren die Proteine für die Reaktion mit dem zugegebenen spezifischen Antikörper leichter zugänglich.

### 3.2.2.3 Blocken

Da die Nitrocellulosemembran nicht nur Proteine sondern auch Antikörper bindet, müssen Maßnahmen getroffen werden, die die Wechselwirkungen zwischen der Membran und den Antikörpern für den Nachweis der Zielproteine verhindern. Das Blocken dieser unspezifischen Bindungen wurde durch das Inkubieren der Membran in einer verdünnten Proteinlösung, typischerweise mit 3-5 % Bovine-Serum-Albumin (BSA) oder Phosphate-Buffered-Saline-Lösung (PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur erreicht. Die Proteine in der verdünnten Lösung binden an allen Stellen, an denen sich das Zielprotein nicht bindet. Somit binden die zugegebenen Antikörper nur an die spezifischen Bindungsstellen der Zielproteine. Dies reduziert Störungen im Endprodukt des Western Blots und führt zu besseren Ergebnissen.

### 3.2.2.4 Detektion

Nach dem Blocken wurde die Membran mit einer verdünnten Lösung des primären Antikörpers (PPAR $\gamma$ -rabbit-polyclonal IgG-Antikörper 1:1000 Dilution; ab27649 Abcam/GAPDH monoclonal Antikörper 1:3000 Dilution ab9484 Abcam) inkubiert. Die Antikörperlösung und die Membran wurden danach über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach dem Waschen der Membran mit dem Waschpuffer, um ungebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurde die Membran einem sekundären Antikörper ausgesetzt (Goat-antirabbit-secondary Antikörper/Anti-mouse IgG-fraction of antiserum). Der sekundäre Antikörper ist in der Regel an Biotin oder an einem Reporter-Enzym, wie die alkalische Phosphatase oder die Meerrettich-Peroxidase, gebunden. Dies ermöglicht die Bindung mehrerer sekundärer Antikörper an einen primären Antikörper und somit wird das Signal verstärkt. Am häufigsten wird eine sekundäre Meerrettich-Peroxidase zur Spaltung eines chemilumineszierenden Mittels verwendet. Das Reaktionsprodukt erzeugt Lumineszenz im Verhältnis zur Menge des Proteins. Je höher die Proteinmenge desto stärker die Lumineszenz. Ein Blatt fotografisches Papier (ECL™ Prime Western blotting detecting reagent-Amersham™) erzeugt nach Inkubation mit der Membran und unter Lichteinwirkung ein Bild der Antikörper, die am Blot gebunden sind. Die erzeugten Proteinbanden können anschließend quantifiziert werden.

### 3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

#### 3.3.1 Materialien

- Aortengewebe
- Stickstoff
- PeqGoldRNAPure™ (peqLAB Biotechnology, Gemisch aus Phenol und Guanidin-isothiocyanat)
- Chloroform
- Isopropanol
- 70 % Ethanol
- Eppendorf-Hütchen
- Zentrifuge (Eppendorf 5430R)
- 0,5 % SDS-Lösung
- Diethylpyrocabonat (DEPC)
- MMLV reverse Transcriptase (Invitrogen)
- TaqMansystem (ABI-7500fastPCRSYSTEM)
- PPAR $\gamma$  Primer

#### 3.3.2 Durchführung

Um die vaskuläre PPAR $\gamma$ -Genexpression untersuchen zu können, wurden die Aorten der Mäuse ausgeschnitten, rasch in flüssigem Stickstoff eingefroren und homogenisiert. Die Homogenisierung wurde durch Zugabe von 1 ml peqGOLDRNAPure (peqLAB Biotechnology) an den ausgeschnittenen Aorten erreicht. Das resultierende Homogenisat wurde zentrifugiert und mit 1 ml peqGOLDRNAPure resuspendiert. Die Proben wurden dann für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Nukleotid-Dissoziation zu gewährleisten. 0,2 ml Chloroform wurde zu den Proben zugegeben und gut gemischt. Eine weitere Zentrifugation (12000 g für 5 min) wurde nach Inkubation der Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Diese High-Speed Zentrifugation bewirkte die Trennung der Proben in drei Phasen: Eine untere gelbe Chloroform-Phase, eine Zwischenphase und eine obere wässrig-farblose Phase. Die wässrige Phase mit einer hohen Dichte an RNA wurde anschließend extrahiert und für die RNA-Präzipitation genutzt.

Zur Präzipitation von RNA wurde 1 ml Isopropanol zur extrahierten wässrigen Probe zugegeben und für zehn Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert (nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur). Der Niederschlag wurde danach gereinigt und mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (10 min, 12000 g und 4 °C). Die isolierten RNA-Pellets wurden mit deionisierter 0,5 % SDS-Lösung (behandelt mit Diethylpyrocabonat um die RNA Kontamination mit RNase zu vermeiden) gewaschen und erhitzt auf 55-60 °C, um die Löslichkeit zu verbessern. Unter Mitbenutzung von randomisierten Primern und MMLV Reverse Transkriptase (Invitrogen) wurde anschließend 1 µg des isolierten RNA reverstranskribiert. Die einzelsträngigen cDNA wurden durch die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit dem TaqMansystem (ABI-7500fastPCRSytem) amplifiziert. Für PPAR $\gamma$  wurden die Primer S 5'-GTC ACG TTC TGA CAG GTG GAC TGT AC-3 'und AS 5'-TAT CAC TGG AGA TCT CCG CCA ACA GC-3' verwendet.

### **3.4 Messungen von Blutdruck, Herzfrequenz, Cholesterin und Körpergewicht**

#### **3.4.1 Materialien**

- EDV Tail-Cuff System (CODA 6, Kent Scientific)
- Elektronische Waage (Accro Tech scientific industries)
- Präparierbesteck
- 1 ml Spritzen (B. Braun<sup>®</sup>)

#### **3.4.2 Durchführung**

Der systolische Blutdruck, der diastolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden durch ein EDV Tail-Cuff System (CODA 6, Kent Scientific) an wachen Tieren gemessen. Die Mäuse wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen am vorgewärmten Tail-Cuff System angeschlossen, um sie an das Messverfahren zu gewöhnen. Für jedes Tier wurden 20 Messungen des Blutdrucks täglich durchgeführt und daraus der Mittelwert ermittelt. Die Mittelwerte aller drei Tage wurden zum Vergleich verwendet. Das Körpergewicht wurde wöchentlich mit einer elektronischen Waage gemessen. Nach Präparation der Tiere wurde Blut aus der Aorta abdominalis mit 1 ml Spritzen für die

Cholesterinbestimmung abgenommen. Der Cholesterinspiegel im Blut wurde im Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pharmakologie der Universität Bonn gemessen.

### **3.5 Glukose- und Insulintoleranztest**

#### **3.5.1 Materialien**

- G 20 % Glukose-Lösung (B. Braun-Germany)
- AccuChek<sup>®</sup>-Sensor (Roche, Mannheim, Germany)
- Human-Insulin (Actrapid; Novo-Nordisk)
- Stoppuhr

#### **3.5.2 Durchführung**

Um die Blut-Glukosetoleranz zu bestimmen, wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) durchgeführt. Die Mäuse wurden für achtzehn Stunden nüchtern gelassen und danach mit Glukose (G 20 % Glucose-Lösung, B. Braun) nach Körpergewicht (2 g/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion (i.p) behandelt. Die Blutzuckerwerte (AccuChek<sup>®</sup>-Sensor, Roche, Mannheim, Deutschland) wurden vor Behandlungsbeginn und nach 15, 30, 60, 90 und 120 min gemessen. Darüber hinaus wurde ein intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) nach sechs Stunden Fastenzeit durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere mit Human-Insulin i.p gespritzt (Novo Nordisk; Actrapid 0,75 U/kg Körpergewicht) und die Blutzuckerwerte vor Behandlungsbeginn und nach 15, 30, 60, 90 und 120 min gemessen.

### **3.6 Präparation der Aortenringe und Messung der Endothelfunktion**

#### **3.6.1 Materialien**

- Ketamin (medistar<sup>®</sup>)
- Xylazin (Xylarium<sup>®</sup>-Alvetra)
- Aortenringe

- Tyrodepuffer (Zusammensetzung, in mmol/l, NaCl 118,0; CaCl<sub>2</sub> 2,5; KCl 4,73; MgCl<sub>2</sub> 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; Na-EDTA 0,026; D (+) Glukose 5,5 pH 7.4.)
- Spannungsmessgerät (mit BeMon software)
- Organbadapparatur
- Stocklösungen (KCl, Phenylephrin, Carbachol, Nitroglycerin.)

### 3.6.2 Durchführung

Den Mäusen wurde intraperitoneal ein nicht-verdünntes Narkotikum (Gemisch aus Ketamin und Xylazin im Verhältnis 2:1) injiziert, um sie in eine tiefe Narkose zu versetzen. Durch sorgfältige Präparation und Darstellung der Aorta wurde die Aorta ascendens exzidiert und in gekühltem Tyrodepuffer eingetaucht. Anschließend wurden die Aorten in 3 mm große Ringe geschnitten. Danach wurden die Aortenringe in Organbädern (bei 37 °C, mit kontinuierlicher Zufuhr von 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>), die mit Tyrodepuffer gefüllt wurde, montiert. Angeschlossen an einem Spannungsmessgerät (BeMon software) konnte die isometrische Spannung der Gefäße in den Organbädern gemessen werden. Die Stocklösungen wurden in steigender Konzentration in den Organbädern hinzugefügt, um kumulative Konzentration-Wirkung-Kurven zu erhalten: KCl 20 mmol/l und 40 mmol/l, Phenylephrin 1 nmol/l bis 10 mol/l, Carbachol 10 nmol/l bis 100 mol/l und Nitroglycerin 1 nmol/l bis 10 mol/l. Die Konzentration der Stocklösungen wurde erhöht wenn die Vasokonstriktion oder die Vasorelaxation abgeschlossen war. Die folgende Tabelle zeigt das Organbadanalyseprotokoll (Tabelle 1).

## KCl

Stammlösung	Konzentration im Bad	Pipettiervolumen
2 M	20 mM	50 µl
	40 mM	100 µl

## Phenylephrin

$10^{-6}$ M	$10^{-9}$ M	5 µl
	$10^{-8}$ M	50 µl
$10^{-4}$ M	$10^{-7}$ M	5 µl
	$10^{-6}$ M	50 µl
$10^{-2}$ M	$10^{-5}$ M	5 µl
	$10^{-4}$ M	50 µl

## Carbachol

$10^{-6}$ M	$10^{-9}$ M	5 µl
	$10^{-8}$ M	50 µl
$10^{-4}$ M	$10^{-7}$ M	5 µl
	$10^{-6}$ M	50 µl
$10^{-2}$ M	$10^{-5}$ M	5 µl
	$10^{-4}$ M	50 µl

## Phenylephrin

$10^{-2}$ M	$10^{-4}$ M	50 µl
-------------	-------------	-------

## Nitroglycerin

$10^{-6}$ M	$10^{-9}$ M	5 µl
	$10^{-8}$ M	50 µl
$10^{-4}$ M	$10^{-7}$ M	5 µl
	$10^{-6}$ M	50 µl
$10^{-2}$ M	$10^{-5}$ M	5 µl
	$10^{-4}$ M	50 µl

**Tabelle 1:** Organbadanalyseprotokoll. Drei mm große Aortenringe wurden in Organbädern montiert und zu einem Spannungsmessgerät angeschlossen. Die isometrische Spannung wurde aufgenommen. Stocklösungen wurden in steigender Konzentration zugegeben, um kumulative Konzentration-Wirkung-Kurven zu erhalten

### **3.7 Färbung der atherosklerotischen Läsionen und morphometrische Analyse**

#### **3.7.1 Materialien**

- Kryoschnitte
- 60 % Isopropanollösung
- Ölrot-Stocklösung (0,5 g Ölrot Pulver in 100 ml 100 % Isopropanol)
- 3,7 % PFA Lösung (Paraformaldehyd)
- Hämatoxylinlösung
- Aqua dest.
- Aquatex (oder Glyceringelatine)
- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (AxioVision Version 4.5.0 Software)

#### **3.7.2 Durchführung**

Um die atherosklerotischen Läsionen nachweisen zu können, wurden die Kryoschnitte der Aorten für 45 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und in 60 % Isopropanol für einige Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser gespült und dann mit der Ölrot-Stocklösung gefärbt. Die Farbreaktion wurde mit Fast-Red (Sigma) als chromogenes Substrat erreicht. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylinlösung gefärbt. Isotypspezifische Antikörper wurden für die negativen Kontrollen verwendet. Alle Abschnitte der Kryoschnitte wurden nach der Beschichtung mit Aquatex unter einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit AxioVision Version 4.5.0 Software untersucht. Zur Quantifizierung der atherosklerotischen Plaquebildung in der Aortenwurzel wurden die lipidgefärbten Flächen und die Gesamtfläche in einer Reihe histologischer Schnitte gemessen. Die Messungen wurden als lipidgefärbte Fläche in Prozent der Gesamtfläche ausgewertet. Die Untersucher der histologischen Analysen wurden zur Behandlung der entsprechenden Tiergruppen geblindet.

### **3.8 Vaskuläre ROS Messung (L-O12)**

#### **3.8.1 Materialien**

- Aortenringe
- L-012 Stocklösung
- HEPES Puffer (pH 7,4; in mmol/l: NaCl 99,01; KCl 4,69; CaCl<sub>2</sub> 1,87; MgSO<sub>4</sub> 1,20; Na-HEPES 20,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; D(+)-Glukose 11,1)
- Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold)
- Elektronische Waage (Accro Tech scientific industries)

#### **3.8.2 Durchführung**

Die Superoxidfreisetzung in intakten Aortensegmenten wurde durch L-012 Chemilumineszenz (Wako Chemicals, Deutschland) bestimmt. L-012 ist ein Luminolderivat mit hoher Empfindlichkeit für Superoxidradikale. Aorten wurden sorgfältig herausgeschnitten und in gekühltem, modifiziertem Krebs-HEPES-Puffer inkubiert. Chemilumineszenz wurde über fünfzehn Minuten in einem Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold) in 1 min Intervallen untersucht. Die Gefäßsegmente wurden dann getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Die Superoxidfreisetzung wurde als relative Chemilumineszenz pro Milligramm Aortengewebe ausgewertet.

### **3.9 Immunhistochemische Analyse des Monozyten/Makrophagen-Marker**

#### **MOMA-2**

#### **3.9.1 Materialien**

- Zeiss Axiovert 200M Mikroskop ( AxioVision Version 4.5.0 Software)
- MOMA-2 rat anti mouse Antikörper-Acris SM065
- IgG goat-anti rat (Alkaline-Phosphatase konjugiert)
- 10 % NGS (Normal goat serum): (1800 µl 1x PBS + 200 µl 100 % NGS)
- 1 % NGS (1980 µl 1x PBS + 20 µl 100 % NGS)
- 3,7 % Formaldehyd
- Fast-Red Tabletten TR/Naphtol AS-MX-Sigma F4648

- Tris-Puffer ( $C_4H_{11}NO_3$ )
- Hämatoxylinlösung
- Aceton bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$
- 1x PBS (10x PBS 100 ml + 900 ml Aqua dest.)
- 10x PBS (NaCl 80 g; KCl 2 g,  $Na_2HPO_4$  14,4 g;  $KH_2PO_4$  2,4 g; + 1 L  $H_2O$ , bei pH 7,4)
- Thermoscientific Polysine Objektträger (25/75/1mm)-VWR
- Kryoschnitte

### 3.9.2 Durchführung

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Kryoschnitte für die Monozyten/Makrophagen-Marker MOMA-2 mit einer indirekten immunoenzymatischen Methode untersucht. Die Kryoschnitte wurden mit einem primären Antikörper (monoclonal rat anti-mouse-MOMA-2-antikörper, Acris) für 1 h bei Raumtemperatur versetzt und danach bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Die Objektträger wurden dann mit einem alkalischen Phosphatase-konjugierten sekundären Antikörper (goat anti-rat IgG, Sigma) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit Fast-Red (Sigma) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylinlösung gefärbt. Isotypspezifische Antikörper wurden für die negativen Kontrollen verwendet. Die Monozytenrekrutierung wurde quantifiziert durch Expression von MOMA-2 positiv gefärbten Flächen in Prozent der gesamten Plauegröße der Aorta. Für jedes Tier wurde der Mittelwert der Plauegröße von fünf Kryoschnitten für die Quantifizierung genutzt. Die Schnitte wurden unter einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop AxioVision Version 4.5.0 Software untersucht.

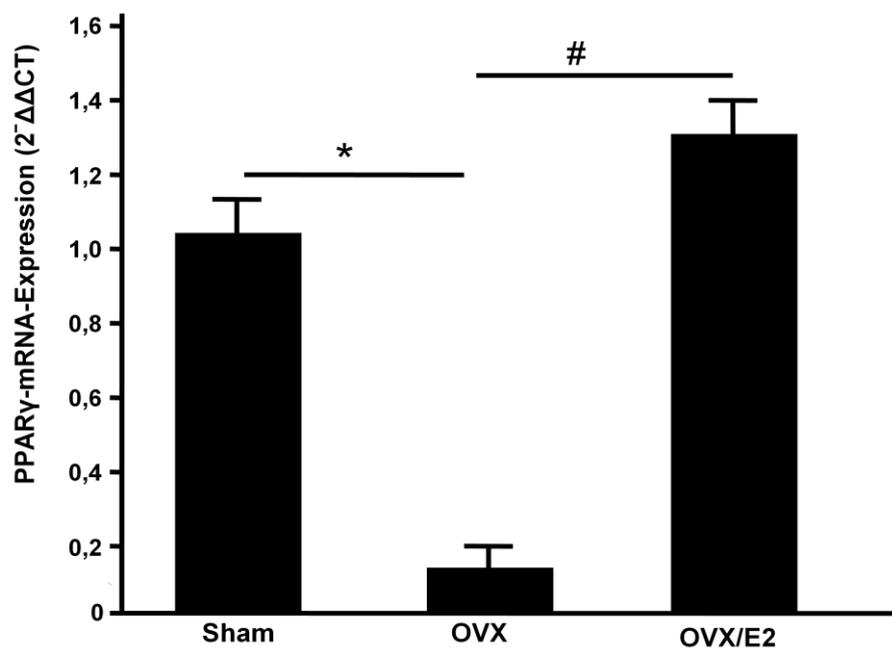
### 3.10 Statistische Analyse

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA-Test gefolgt von einer Newman-Keuls posthoc Analyse.  $P < 0,05$  zeigt statistische Signifikanz.

## 4. Ergebnisse

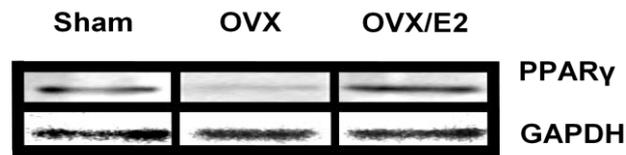
### 4.1 Östrogenabhängige PPAR $\gamma$ -Expression in der Gefäßwand von WT-Mäusen

Weibliche WT-Mäuse wurden in drei Gruppen randomisiert und wie in Abb.1 (Seite 13) behandelt. Die PPAR $\gamma$ -Expression (Abb.3, 4 und 5) in der Aorta von OVX-Tieren war auf der mRNA-Ebene ( $0,2 \pm 0,052^{-\Delta\Delta CT}$ ) im Vergleich zu Sham-Tieren ( $1,0 \pm 0,072^{-\Delta\Delta CT}$ ) signifikant reduziert (Abb.3). Die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression war in ähnlicher Weise signifikant geringer in OVX-Tieren ( $26 \pm 12\%$ ) im Vergleich zu Sham-Tieren (Abb.5). Durch die Östrogensersatztherapie in OVX/E2-Tieren konnte die vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene (Abb.3,  $1,3 \pm 0,22^{-\Delta\Delta CT}$ ) sowie auf Proteinebene (Abb.5,  $146 \pm 14\%$ ) wieder angehoben werden.

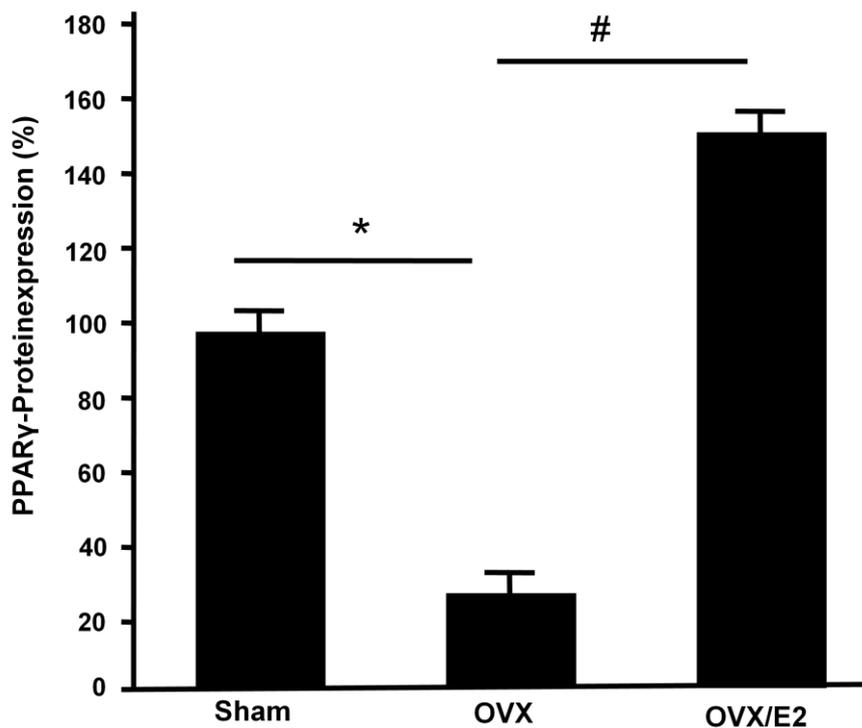


\* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$ ,  $n = 5$

**Abb.3:** PPAR $\gamma$ -mRNA-Expression wurde im Aortengewebe von Sham, OVX und OVX/E2 mittels RT-PCR untersucht. Östrogenmangel in OVX führte zu einem deutlichen Rückgang der PPAR $\gamma$ -mRNA-Expression in OVX ( $0,2 \pm 0,052^{-\Delta\Delta CT}$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,0 \pm 0,072^{-\Delta\Delta CT}$ ) WT-Mäusen (\* $p < 0,05$  Sham vs. OVX). Transdermal zugefügte 17 $\beta$ -Östrogensersatztherapie (OVX/E2) der ovariectomierten WT-Mäuse ( $1,3 \pm 0,22^{-\Delta\Delta CT}$ ) normalisierte die PPAR $\gamma$ -Expression auf mRNA-Ebene in der Aortenwand (#  $p < 0,05$  OVX/E2 vs. OVX)



**Abb.4:** Repräsentativer Western Blot. Der Blot zeigt die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression im Aortengewebe von Sham, OVX und OVX/E2 Tieren (GAPDH diente als Ladekontrolle)

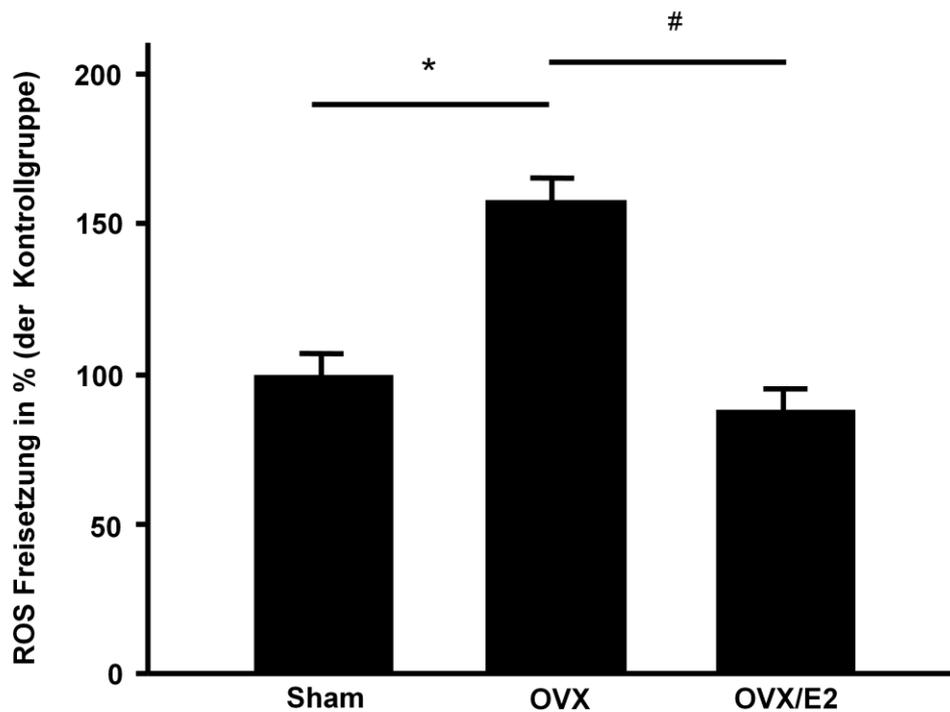


\* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$ ,  $n = 5$

**Abb.5:** PPAR $\gamma$ -Proteinquantifizierung wurde mittels Densitometrie ausgewertet und die Werte in Prozent verglichen mit Sham ausgewertet. Östrogenmangel führte zu einer signifikanten Abnahme der PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in OVX-Tieren ( $26 \pm 12$  %) im Vergleich zu Sham WT-Mäuse (\* $p < 0,05$  Sham vs. OVX). Transdermal exogene 17 $\beta$ -Östrogensersatz-therapie der ovariectomierten WT-Mäuse (OVX/E2) rettete die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression ( $146 \pm 14$  %) in der Aortenwand im Vergleich zu OVX-Tieren (# $p < 0,05$  OVX/E2 vs. OVX)

## 4.2 Östrogenabhängige vaskuläre ROS-Freisetzung in WT-Mäusen

Die vaskuläre Superoxid-Radikalfreisetzung wurde mittels L-012 Chemilumineszenz in intakten Aortensegmenten von Sham, OVX und OVX/E2 Mäusen gemessen (Abb.6). Die vaskuläre Superoxidfreisetzung war in OVX Mäusen ( $158 \pm 21$  %) signifikant erhöht, verglichen mit Sham ( $100 \pm 15$  %) und OVX/E2 Mäusen ( $88 \pm 19$  %).



\* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$ ,  $n = 5$

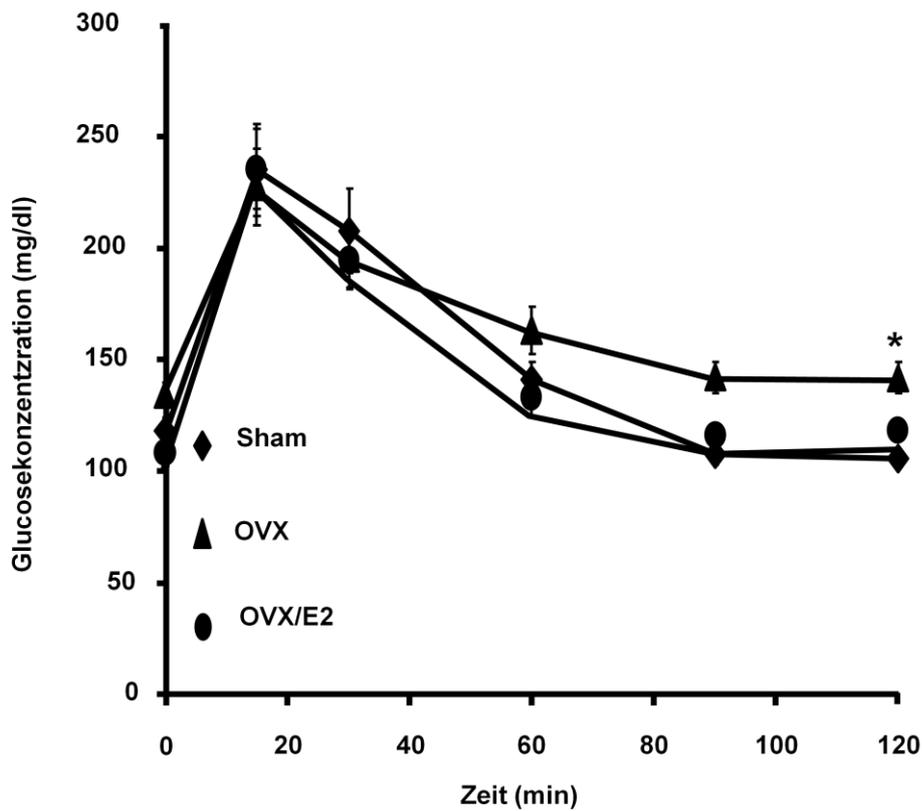
**Abb.6:** Vaskuläre ROS-Freisetzung in WT-Tiergruppen. Die Produktion von ROS wurde mittels L-012 Fluoreszenz gemessen. Die Werte wurden in Prozent (%) im Vergleich zu Sham  $\pm$  SEM ausgewertet. Östrogenmangel führte zu einer signifikant erhöhten ROS-Freisetzung in OVX ( $158 \pm 21$  %) im Vergleich zu Sham ( $100 \pm 15$  %). Exogene  $17\beta$ -Östrogensubstitution (OVX/E2) reduzierte signifikant ( $88 \pm 19$  %) die ROS-Freisetzung im Vergleich zu OVX (\* $p < 0,05$  Sham vs. OVX; # $p < 0,05$  OVX/E2 vs. OVX)

### **4.3 Metabolische Parameter, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz der untersuchten WT-Mäuse**

Metabolische Faktoren und kardiovaskuläre Risikoparameter wurden an WT-Tiergruppen (Tabelle 2) gemessen. Es war kein signifikanter Unterschied im Gesamtserumcholesterinspiegel zwischen Sham, OVX und OVX/E2 Mäusen zu beobachten (Tabelle 2). Der Nüchternblutzuckerspiegel zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Sham und OVX Mäusen. OVX/E2 Mäuse hatten einen signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel im Vergleich zu OVX Mäusen und ähnliche Ausgangswerte mit Sham Mäusen (Tabelle 2). Die Glukosetoleranz (Abb.7) und die Insulintoleranz (Abb.8) waren in OVX Mäusen verglichen mit Sham und OVX/E2 Mäusen tendenziell, aber nicht signifikant, verändert. Deutlich geringere Glukosetoleranz wurde in OVX Mäusen bei 120 min im Vergleich zu Sham und OVX/E2 Mäusen (Abb.7) beobachtet. Zu Untersuchungsbeginn war das Körpergewicht bei allen Tieren identisch. Nach 60 Tagen normaler Diät wiesen alle Tiere eine vergleichbare Gewichtszunahme auf (Tabelle 2). Blutdruck (mmHg) und Herzfrequenz (bpm) wurden in allen Gruppen mittels Tail-Cuff System gemessen. Nach 60 Tagen wurde kein signifikanter Unterschied im systolischen und diastolischen Blutdruck sowie in der Herzfrequenz zwischen den Gruppen (Tabelle 2) beobachtet.

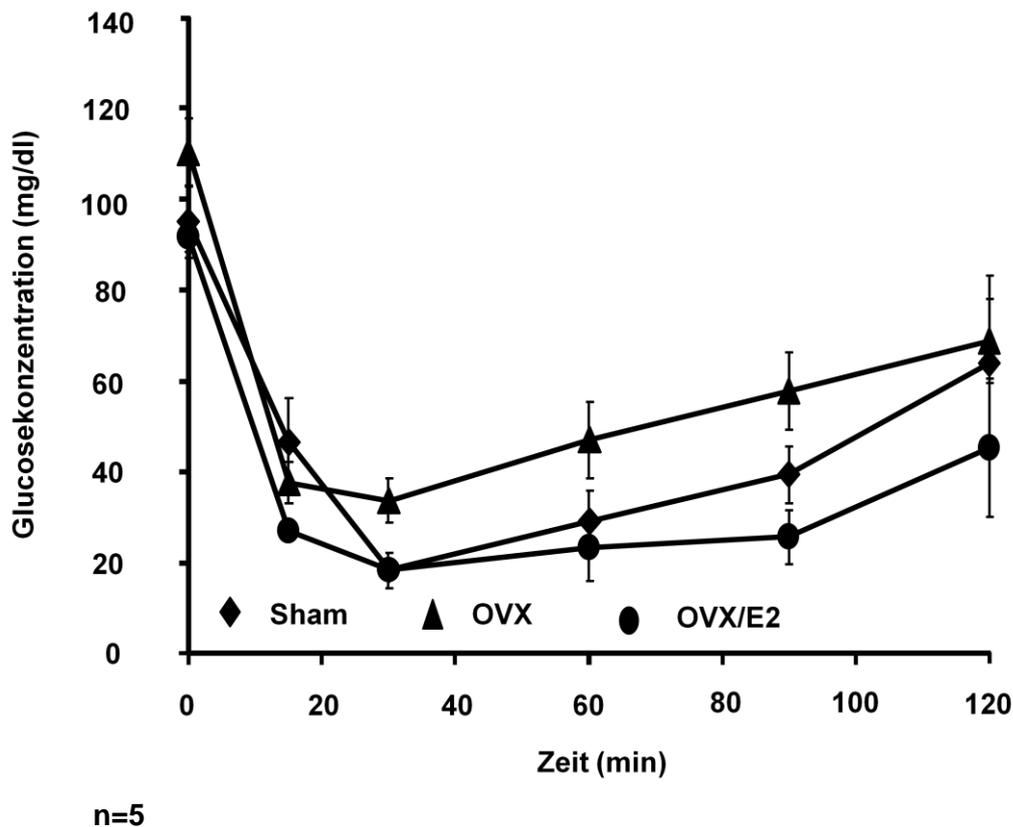
Wildtype (n=5 /Gruppe)	Sham	OVX	OVX/E2
Gesamtcholesterin (mg/dl)	75,8±1	80,6±17	61,1±13
Nüchternblutzucker (mg/dl)	109,5±6	122,3±6	100,1±4 <sup>#</sup>
Körpergewicht (g)	24,2±0,3	24,6±0,3	24,0±0,5
Systolischer Blutdruck (mmHg)	132±3	137±3	137±3
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	92±6	95±4	92±5
Herzfrequenz (bpm)	798±32	764±26	720±77

**Tabelle 2:** Metabolische Parameter, Blutdruck und Herzfrequenz von WT Mäusen. Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Cholesterinspiegel, Nüchternblutzucker, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz) wurden in WT-Tiergruppen untersucht. Kein signifikanter Unterschied im Gesamtserumcholesterinspiegel war zwischen Sham, OVX und OVX/E2 zu beobachten. Der Nüchternblutzuckerspiegel zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen allen 3 Gruppen. OVX/E2 hatten im Vergleich zu OVX einen signifikant niedrigeren Blutzuckerspiegel aber ähnliche Ausgangswerte verglichen mit Sham (\*p<0,05 OVX/E2 vs. OVX). Zu Untersuchungsbeginn war das Körpergewicht bei allen Tieren identisch. Nach 60 Tagen mit einer Standarddiät zeigten alle Tiere eine ähnliche Zunahme des Körpergewichts. Kein signifikanter Unterschied wurde im systolischen und diastolischen Blutdruck sowie in der Herzfrequenz nach 60 Tagen zwischen den Gruppen beobachtet



\* $p < 0.05$  vs. Sham,  $n=5$

**Abb.7:** Glukosemetabolismus in WT-Mäusen. Durch die Untersuchung der Glukosetoleranz in WT Mäusen fanden wir einen signifikant erhöhten Glukosespiegel im OVX ( $122,3 \pm 6$ ) bei 120 min im Vergleich zu Sham ( $109,5 \pm 6$ ) und OVX/E2 ( $100,1 \pm 4$ ) (\* $p < 0,05$  OVX vs. Sham und OVX/E2). OVX/E2 und Sham hatten ähnlichen Glukosespiegel

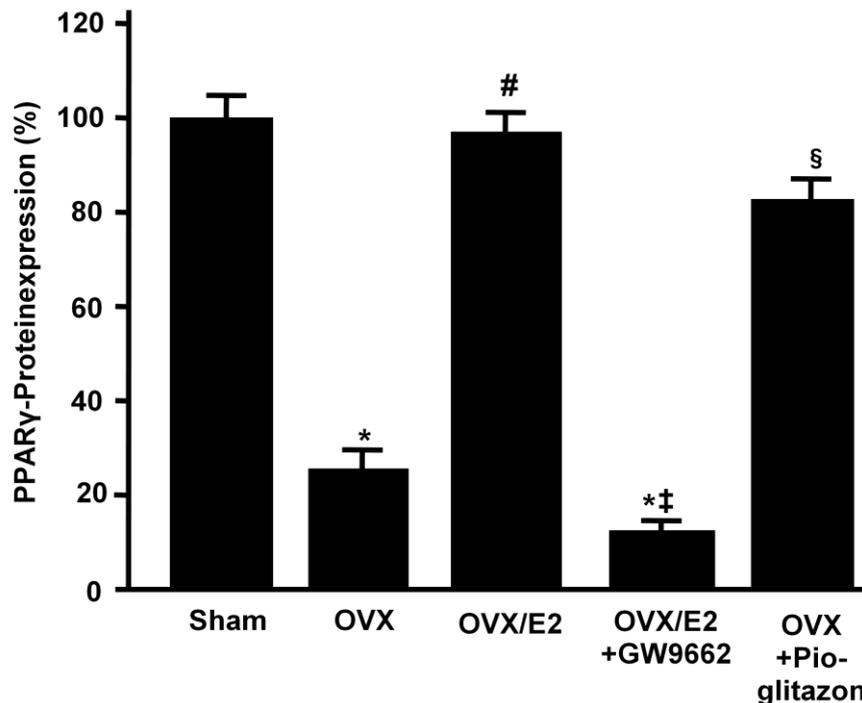


**Abb.8:** Glukosemetabolismus in WT-Mäusen. Der Insulintoleranztest von WT-Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings hatten OVX tendenziell eine schlechtere Insulinempfindlichkeit im Vergleich zu Sham und OVX/E2

#### 4.4 Östrogenabhängige PPAR $\gamma$ -Expression in der Gefäßwand von ApoE $^{-/-}$ -Mäusen

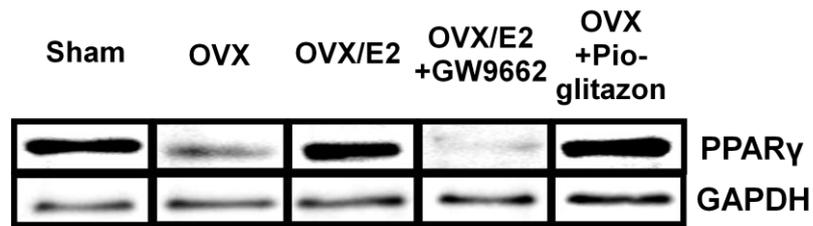
Weibliche ApoE $^{-/-}$ -Mäuse wurden behandelt wie in Abb.2 (Seite 14) dargestellt und als Mausmodell zur Untersuchung der Wirkung von Östrogen-PPAR $\gamma$ -Interaktion in der Atherosklerose angewendet. Analog zu den WT-Gruppen war die PPAR $\gamma$ -Expression östrogenabhängig (Abb.9 und 10). In OVX-Tieren war die PPAR $\gamma$ -Expression ( $22,4 \pm 6,7\%$ ) auf Proteinebene im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant reduziert. OVX/E2-Tiere hatten genauso wie die Sham-Tiere deutlich erhöhte PPAR $\gamma$ -Proteinexpressionswerte ( $92 \pm 9,7\%$ ). Zwei zusätzliche Gruppen von ApoE $^{-/-}$ -Mäusen wurden untersucht. Eine Gruppe von OVX/E2 Mäusen wurde mit GW9662 behandelt, einem spezifischen PPAR $\gamma$ -Antagonist (OVX/E2+GW9662) und schließlich wurde eine Gruppe von OVX Mäusen mit dem spezifischen PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon

(OVX+Pioglitazon) behandelt. Die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in OVX/E2+GW9662-Tieren wurde signifikant reduziert (8,7 $\pm$ 3,9 %). Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in OVX+Pioglitazon-Tieren (79,8 $\pm$ 4,1 %) im Vergleich zu OVX-Tieren (22,4 $\pm$ 6,7 %) festgestellt.



\*p<0,05 vs. Sham, #p<0,05 vs. OVX, ‡p<0,05 vs. OVX/E2, §p<0,05 vs. OVX, n= 7

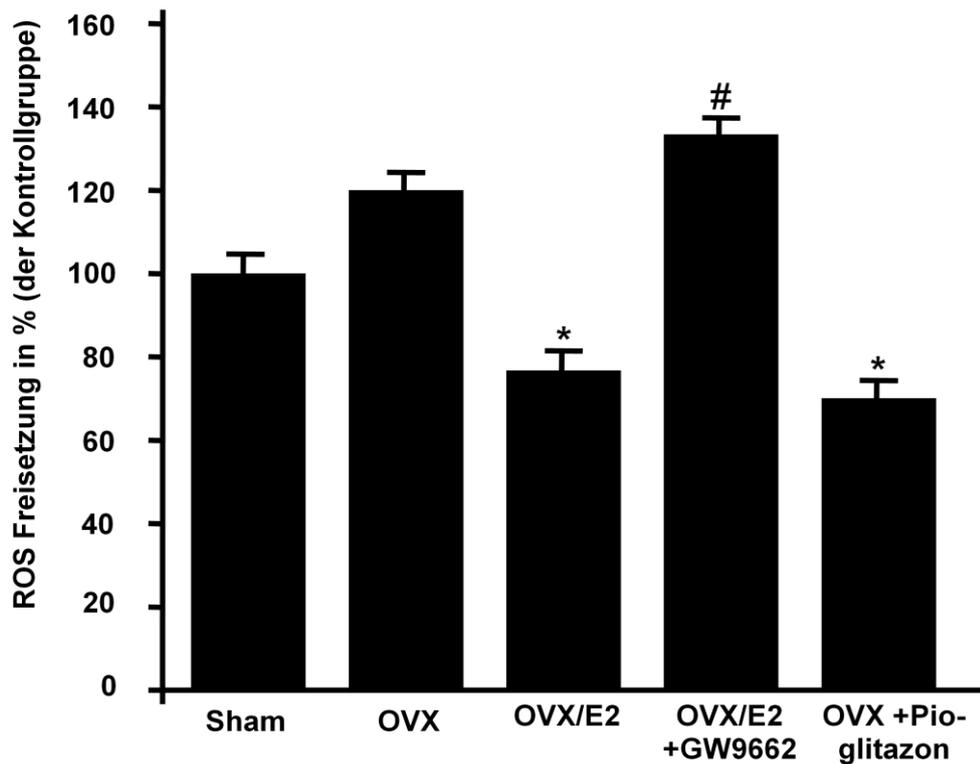
**Abb.9:** Die PPAR $\gamma$ -Proteinquantifizierung wurde mittels Densitometrie gemessen. Die Werte wurden in Prozent im Vergleich zu Sham ausgewertet. Östrogenmangel führte zu einem signifikanten Abfall der PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in OVX-Mäusen (22,4 $\pm$ 6,7 %) im Vergleich zu Sham ApoE $^{-/-}$ -Mäusen (\*p<0,05 Sham vs. OVX). Transdermale 17 $\beta$ -Östrogensersatz-therapie in ovariectomierten ApoE $^{-/-}$ -Mäusen (OVX/E2) konnte die PPAR $\gamma$ -Protein-expression (92 $\pm$ 9,7 %) in der Aortenwand im Vergleich zu OVX Mäusen (#p<0,05 OVX/E2 vs. OVX) anheben. Die mit GW9662 behandelten ovariectomierten ApoE $^{-/-}$ -Mäusen (OVX/-E2+GW9662) hatten eine niedrigere PPAR $\gamma$ -Proteinexpression (8,7 $\pm$ 3,9 %) im Vergleich zu Sham und OVX/E2 (\*p<0,05 OVX/E2+GW9662 vs. Sham; ‡p<0,05 OVX/E2+GW9662 vs. OVX/E2). Dagegen wurde eine erhöhte PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in OVX+Pioglitazon behandelten Tieren (79,8 $\pm$ 4,1 %) im Vergleich zu OVX (§p<0,05 OVX+Pioglitazon vs. OVX) beobachtet



**Abb.10:** Repräsentativer WB zeigt die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression im Aortengewebe aller fünf Gruppen von ApoE $^{-/-}$ -Mäusen (GAPDH diente als Ladekontrolle)

#### 4.5 Östrogenabhängige vaskuläre ROS-Freisetzung in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen

Die vaskuläre ROS-Freisetzung wurde mittels L-012-Chemilumineszenzassay in intakten Aortensegmenten von Sham, OVX, OVX/E2, OVX/E2+GW9662 und OVX+Pioglitazon ApoE $^{-/-}$ -Mäusen (Abb.11) gemessen. Die Superoxidfreisetzung war signifikant erhöht in OVX ( $120 \pm 7,6$  %) und OVX/E2+GW9662 Mäusen ( $132 \pm 8,6$  %) im Vergleich zu Sham ( $100 \pm 11,9$  %) und OVX/E2 Mäusen ( $74 \pm 10,1$  %). Interessanterweise hatten OVX+Pioglitazon Mäuse ( $67 \pm 10,8$  %) signifikant niedrigere ROS-Spiegel, obwohl Östrogenmangel vorherrschte.



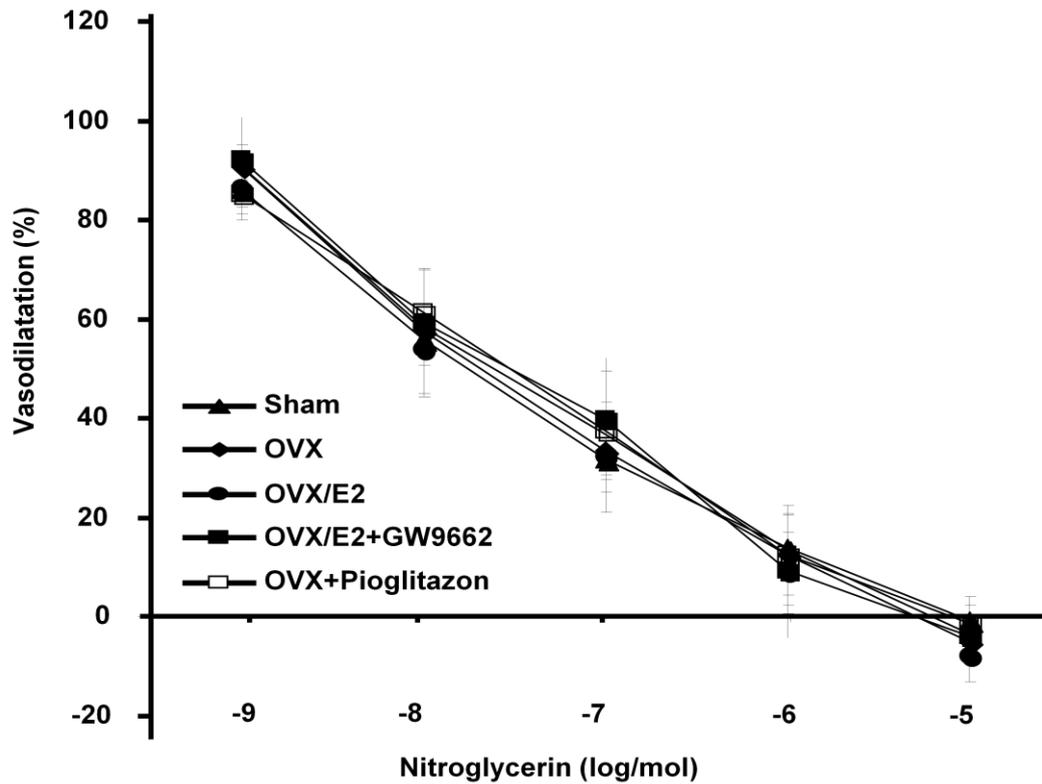
\*p<0,05 vs. OVX, #p<0,05 vs. OVX/E2, n= 7

**Abb.11:** Östrogenabhängige vaskuläre ROS-Freisetzung in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Vaskuläre Freisetzung von ROS wurde durch einen L-012 Chemilumineszenzassay in intakten Aortensegmenten von Sham, OVX, OVX/E2, OVX/E2+GW9662 und OVX+Pioglitazon ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen. Die Werte wurden in Prozent (%) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sham ± SEM) ausgewertet. Messungen zeigten signifikant erhöhte vaskuläre Superoxid-freisetzung in OVX (120±7,6 %) im Vergleich zu OVX/E2 (74±10,1 %) und OVX+Pioglitazon (67±10,8 %) (\*p<0,05 OVX/E2 und OVX+Pioglitazon vs. OVX). Andererseits hatten OVX/E2+GW9662 (132±8,6 %) ebenfalls signifikant erhöhte Spiegel von ROS im Vergleich zu OVX/E2 (#p<0,05 OVX/E2+GW9662 vs. OVX/E2)

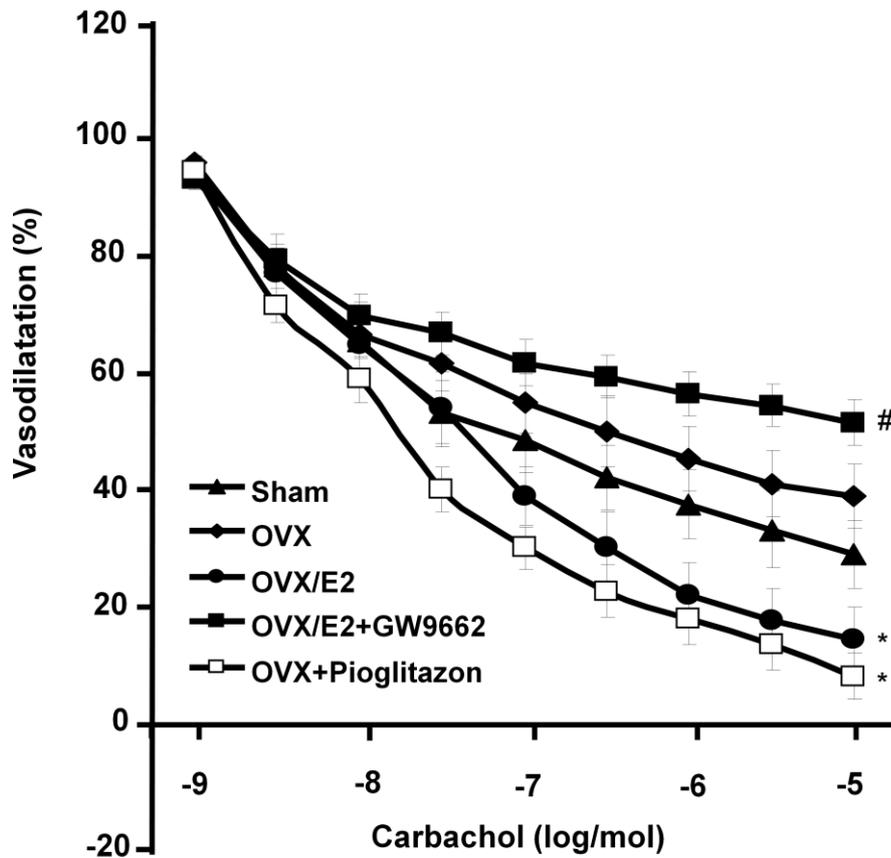
#### 4.6 Endothelfunktion in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Endothelfunktion wurde an isolierten Aortenringen untersucht und als maximale endothelabhängige Vasorelaxation ausgewertet (Abb.13). Im Gegensatz zu Sham-Tieren (29±4 %) wurde die endothelabhängige Vasodilatation in OVX-Tieren (39±6 %) deutlich beeinträchtigt. OVX/E2-Tiere (14±6 %) hatten eine deutlich bessere Endothelfunktion im Vergleich zu OVX-Tieren. Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen OVX/E2- und Sham-Tieren beobachtet. In OVX/E2+GW9662 behandelten Tieren war die Endothelfunktion stark verschlechtert (52±5 %). Im Gegensatz dazu zeigten OVX

Mäusen, die mit Pioglitazon behandelt wurden, deutlich bessere Endothelfunktion trotz Östrogendepletion ( $10 \pm 4\%$ ). Die Nitroglycerin-induzierte endothelunabhängige Vasorelaxation war in allen Gruppen ähnlich (Abb.12).



**Abb.12:** Nitroglycerin-induziert endothelunabhängige Vasorelaxation von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die endothelunabhängige Vasorelaxation von Nitroglycerin ausgewertet in Prozent der maximalen Phenylephrin-induzierten Vasokonstriktion der Kontrollgruppe war in allen Gruppen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse vergleichbar



\* $p < 0.05$  OVX/E2 und OVX+Pioglitazon vs. OVX, # $p < 0.05$  OVX/E2+GW9662 vs. OVX/E2  
n = 7

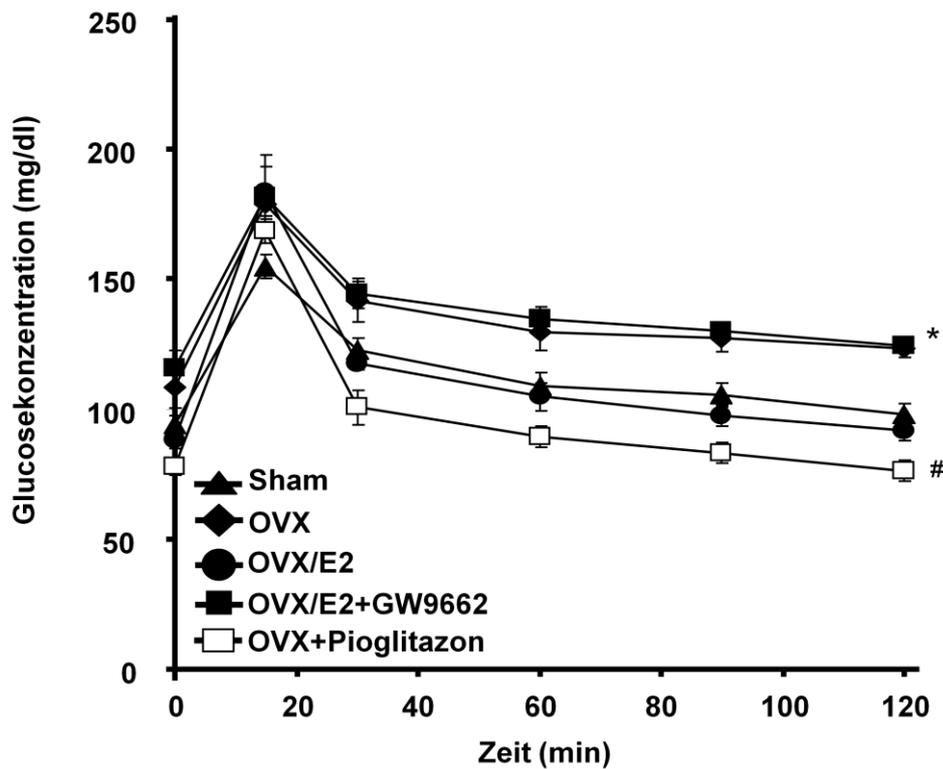
**Abb.13:** Östrogenabhängige Endothelfunktion von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Endothelfunktion in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde an isolierten Aortenringen untersucht. Im Vergleich zu Sham (29±4 %) hatten die OVX Tiere (39±6 %) eine signifikant schlechtere Endothelfunktion nach Stimulation mit Carbachol, was darauf hindeutet, dass der Östrogenmangel die endotheliale Dysfunktion erhöht. OVX/E2 (14±6 %) und OVX+Pioglitazon (10±4 %) hatten eine signifikant bessere Endothelfunktion im Vergleich zu OVX (39±6 %) (\* $p < 0,05$  OVX/E2 und OVX+Pioglitazon vs. OVX). Die am deutlichsten beeinträchtigte Endothelfunktion wurde in OVX/E2+GW-9662 (52±5 %) gefunden (# $p < 0,05$  OVX/E2+GW9662 vs. OVX/E2). Die Nitroglycerin-induziert endothel-unabhängige Vasorelaxation war in allen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb.12)

#### **4.7 Metabolische Parameter, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz der untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Metabolische Parameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen. Es war kein signifikanter Unterschied im Gesamtserumcholesterinspiegel zwischen Sham, OVX, OVX/E2 und OVX/E2+GW9662 Mäusen festzustellen. Pioglitazon reduzierte signifikant den Cholesterinspiegel in OVX+Pioglitazon-Tieren im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Tabelle 3). Der höchste Serumcholesterinspiegel wurde in OVX-Tieren beobachtet (Tabelle 3). Messungen des Nüchternblutzuckerspiegels zeigten keinen Unterschied zwischen Sham, OVX, OVX/E2 und OVX/E2+GW9662 Mäusen. OVX+Pioglitazon Mäuse hatten einen signifikant besseren Blutzuckerspiegel im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Tabelle 3). Glukosetoleranz (Abb.14) und Insulintoleranz (Abb.15) erwiesen sich als deutlich besser in OVX+Pioglitazon Mäusen im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Zu Untersuchungsbeginn war das Körpergewicht bei allen Tieren identisch. Nach 60 Tagen mit einer cholesterinreichen Diät hatten alle Tiere eine ähnliche Gewichtszunahme (Tabelle 3). Der Blutdruck (mmHg) und die Herzfrequenz (bpm) wurden in allen Gruppen durch das Tail-Cuff System gemessen. Ein signifikanter Unterschied wurde nur im systolischen Blutdruck von OVX+Pioglitazon Mäusen gefunden. In allen anderen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied im systolischen sowie im diastolischen Blutdruck (Tabelle 3) beobachtet.

ApoE <sup>-/-</sup> (n=7 /Gruppe)	Sham	OVX	OVX/E2	OVX/E2+ GW9662	OVX+ Pioglitazon
Gesamtcholesterin (mg/dl)	1132,6±154	1284,3±117	1088,1±40	1071,1±88	657±142 <sup>#</sup>
Nüchtern- blutzucker (mg/dl)	109,1±5	116,4±7	106,1±7	120,6±6	92,7±9 <sup>#</sup>
Körpergewicht (g)	24,9±0,5	25,4±0,5	28,8±0,5	26,1±0,7	24,5±1,3
Systolischer Blutdruck (mmHg)	147,7±2	148,1±3	139,5±6	137,8±4	129,7±5 <sup>‡</sup>
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	97,1±3	97,9±7,1	96,7±6	89,0±3	89,9±7
Herzfrequenz (bpm)	628,1±11	663,9±16	689,5±20	695,1±23	695,6±17

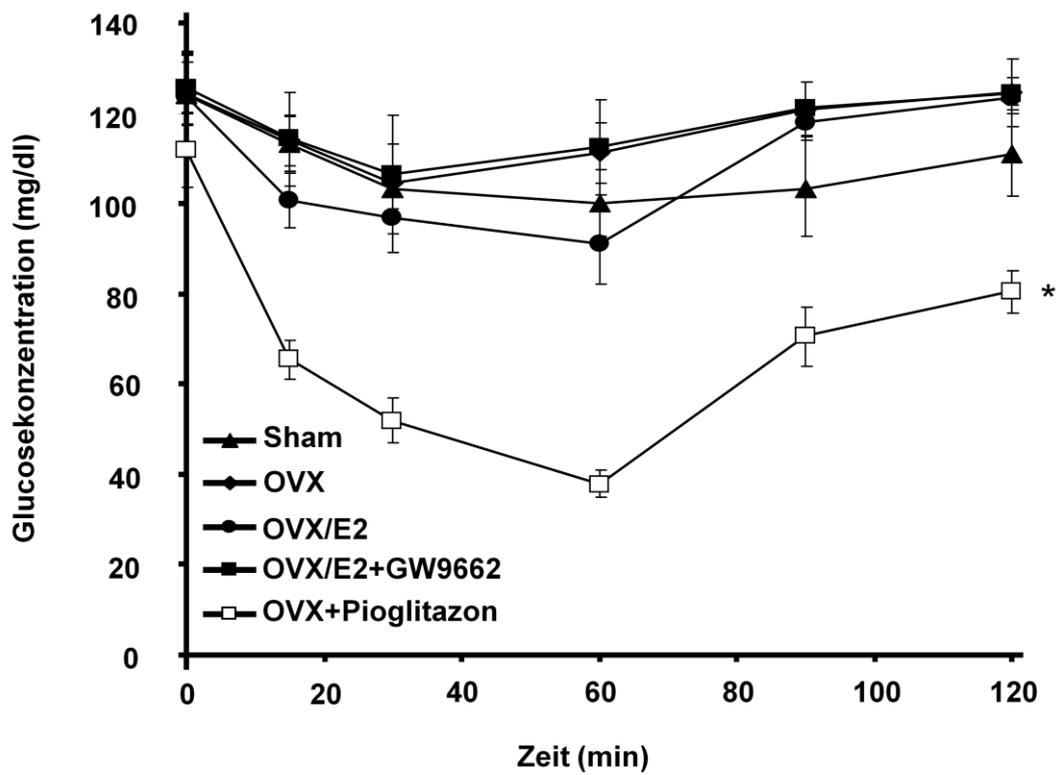
**Tabelle 3:** Metabolische Parameter, Blutdruck und Herzfrequenz in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Cholesterinspiegel, Nüchternblutzucker, Körpergewicht, Blutdruck und Herzfrequenz) wurden in allen fünf Gruppen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse gemessen. Kein signifikanter Unterschied war im Gesamtserumcholesterinspiegel zwischen Sham, OVX, OVX/E2 und OVX/E2+GW9662 bemerkbar. Allerdings reduzierte eine Behandlung mit Pioglitazon signifikant den Cholesterinspiegel (657±142) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (<sup>#</sup>p<0,05 alle Gruppen vs. OVX+Pioglitazon). Messungen des Nüchternblutzuckerspiegels zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Sham, OVX, OVX/E2 und OVX/E2+GW9662, obwohl die Nüchternblutzuckerspiegel in OVX (116,4±7) und OVX/E2+GW9662 (120,6±6) zu erhöhten Werten neigten. OVX+Pioglitazon (92,7±9) hatten einen signifikant besseren Blutzuckerspiegel im Vergleich zu allen anderen Gruppen (<sup>#</sup>p<0,05 alle Gruppen vs. OVX+Pioglitazon). Zu Untersuchungsbeginn war das Körpergewicht identisch. Nach 60 Tagen Ernährung mit einer hochkalorischen Cholesterindiät unterlagen alle Tiere ähnlichen Gewichtszunahmen. Ein signifikanter Unterschied wurde nur im systolischen Blutdruck von OVX+Pioglitazon (129,7±5) gefunden (<sup>‡</sup>p<0,05 alle Gruppen vs. OVX+Pioglitazon). In allen anderen Gruppen wurde kein Unterschied im systolischen sowie im diastolischen Blutdruck beobachtet



\* $p < 0,05$  OVX und OVX+GW9662 vs. Sham, OVX/E2 und OVX+Pioglitazon

# $p < 0,05$  OVX vs. OVX+Pioglitazon

**Abb.14:** Glukosemetabolismus in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Untersuchung der Glukosetoleranz zeigte eine gestörte Glukosetoleranz in OVX (116,4±7) und OVX/E2+GW9662 (120,6±6) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (\* $p < 0,05$  OVX und OVX+GW9662 vs. Sham, OVX/E2 und OVX+Pioglitazon). OVX+Pioglitazon (92,7±9) hatten eine signifikant bessere Glukosetoleranz im Vergleich zu OVX (116,4±7) (# $p < 0,05$  OVX vs. OVX+Pioglitazon)

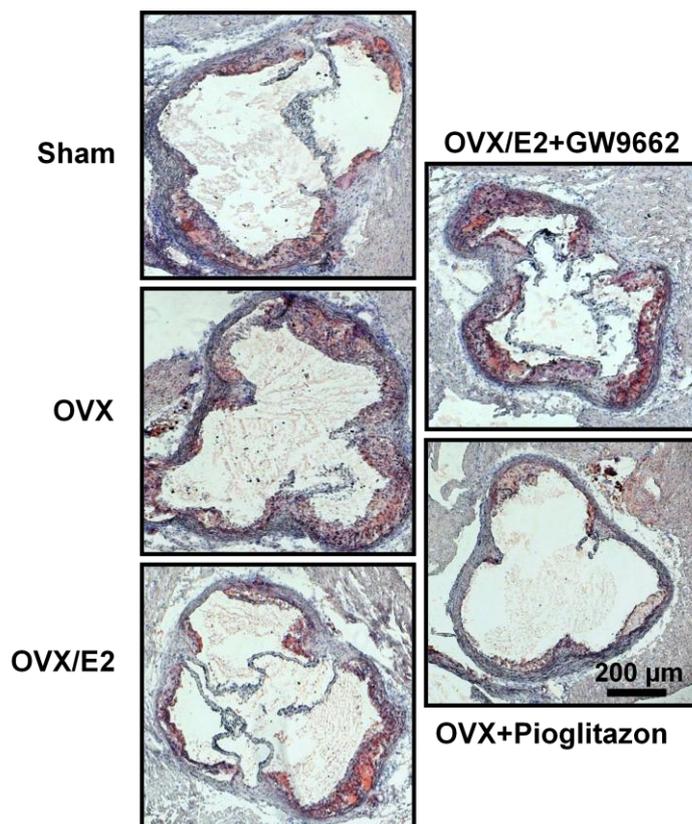


\* $p < 0,05$  OVX+Pioglitazon vs. alle Gruppen

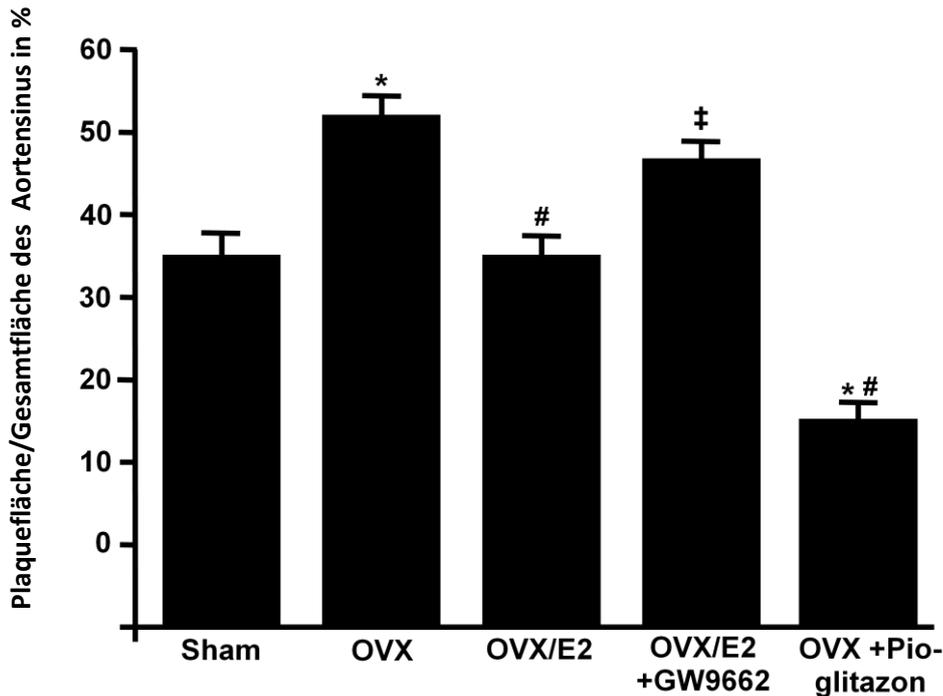
**Abb.15:** Glukosemetabolismus in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Analog zur Glukosetoleranz war die Insulintoleranz besser in OVX+Pioglitazon im Vergleich zu allen Gruppen (\* $p < 0,05$  OVX+Pioglitazon vs. alle Gruppen)

#### 4.8 Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Formation von atherosklerotischen Läsionen wurde nach 60 Tagen mit Ölrot-Färbung und makroskopischer Analyse des Aortensinus quantifiziert. Abb.16 zeigt Querschnitte der Aortenwurzel und die Abb.17 zeigt die Quantifizierung der Plaquefläche in Prozent. Im Gegensatz zu Sham (36±2 %) und OVX/E2 (36±6 %) Mäusen waren OVX Mäuse (51±4 %) am stärksten von der Atherosklerose der Aortenwurzel betroffen. In OVX/E2+GW9662 Mäusen waren die atherosklerotischen Läsionen signifikant größer (47±2 %) im Vergleich zu OVX/E2 Mäusen. Im Gegensatz dazu wurden in OVX+Pioglitazon Mäusen deutlich weniger atherosklerotische Läsionen gefunden (14±6 %).



**Abb.16:** Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Repräsentative Ölrot-Färbung der atherosklerotischen Läsionen in der Aortenwurzel aller Gruppen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse



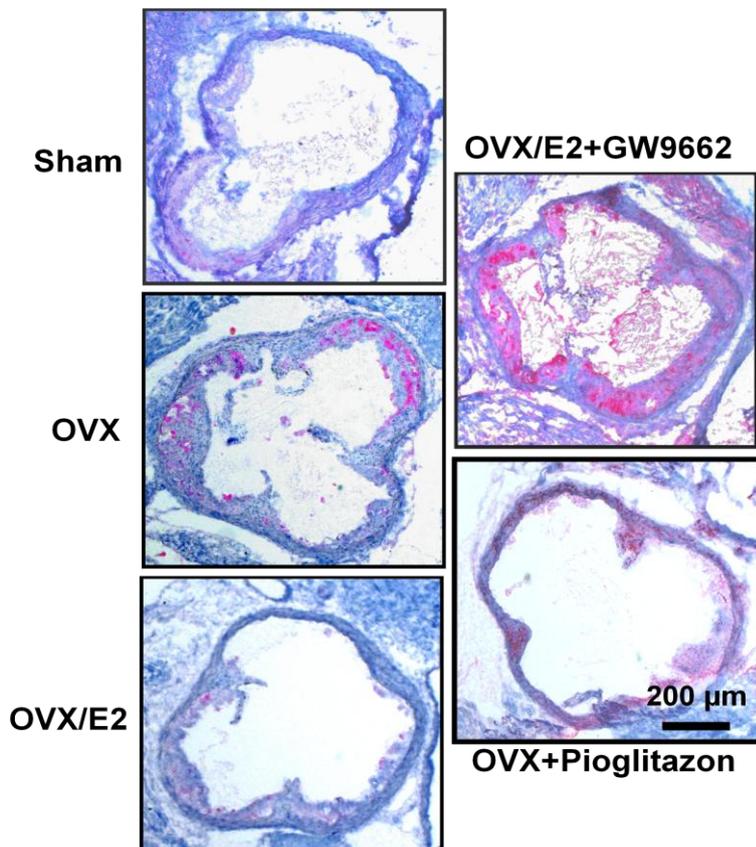
p<0,05 vs. Sham, #p<0,05 vs. OVX, ‡p<0,05 vs. OVX/E2, n= 7

**Abb.17:** Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Formation von atherosklerotischen Läsionen wurde nach 60 Tagen mit Ölrot-Färbung und makroskopischer Analyse des Aortensinus quantifiziert. Die Werte wurden in Prozent ausgewertet (Plauefläche/Gesamtfläche des Aortensinus in %). Im Vergleich zu Sham, (36±2 %) OVX/E2 (36±6 %) und OVX+Pioglitazon (14±6 %) waren OVX (51±4 %) am stärksten von der Atherosklerose der Aortenwurzel betroffen (\*p<0,05 vs. Sham, #p<0,05 vs. OVX). In OVX/E2+GW9662 (47±2 %) waren die atherosklerotischen Läsionen signifikant ausgeprägter verglichen mit OVX/E2 (36±6 %) (‡p<0,05 vs. OVX/E2)

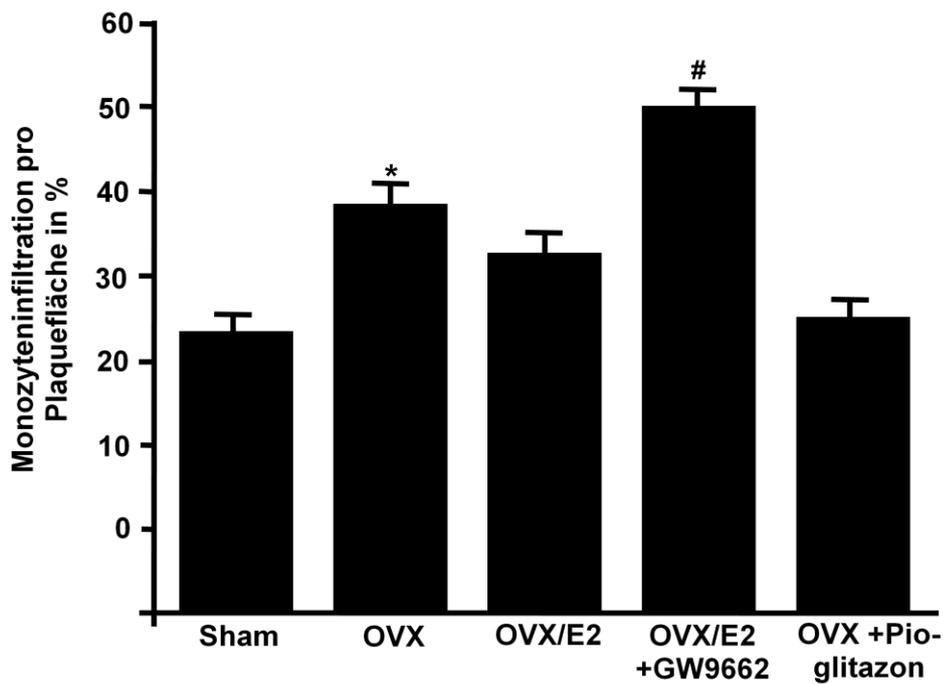
#### 4.9 Monozyteninfiltration der atherosklerotischen Läsionen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Kryoschnitte mit dem Monozyten/Makrophagen-Marker MOMA-2 untersucht. Abb.18 zeigt die repräsentative MOMA-2-Färbung (magenta) der Aortenwurzel aller Tiergruppen und Abb. 19 die Quantifizierung der Monozyteninfiltration in Prozent. Im Vergleich zu Sham- (22±0,1 %) und OVX/E2-Tieren (33±0,3 %) zeigten OVX-Tiere eine erhöhte Monozyteninfiltration der atherosklerotischen Läsionen (37±0,2 %). In OVX/E2+GW9662-Tieren war der Monozytengehalt der Läsionen verglichen mit OVX/E2-Tieren signifikant höher

( $51 \pm 4$  %). Im Gegensatz dazu hatten OVX+Pioglitazon-Tiere signifikant weniger Monozyteninfiltration der atherosklerotischen Läsionen ( $25 \pm 8$  %).



**Abb.18:** Monozyten/Makrophageninfiltration der atherosklerotischen Läsionen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Repräsentative MOMA-2-Färbung (magenta) der Monozyten/Makrophageninfiltration der Aortenwurzel aller Tiergruppen



\* $p < 0,05$  vs. Sham, # $p < 0,05$  vs. OVX/E2,  $n = 7$

**Abb.19:** Monozyten/Makrophageninfiltration der atherosklerotischen Läsionen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Monozyten/Makrophagenrekrutierung der Aortenläsionen wurde in MOMA-2-positiv gefärbten Bereichen in Prozent der Gesamtplaquefläche ausgewertet. Fünf Schnitte jeder Aortenwurzel wurden für die Auswertung genutzt. Die Werte sind in Prozent dargestellt (Monozyten/Makrophagengehalt/Plauefläche in %). Im Gegensatz zu Sham (22±0,1 %) zeigten OVX (37±0,2 %) einen höheren Monozyten-/Makrophagengehalt der atherosklerotischen Läsionen der Aortenwurzel (\* $p < 0,05$  vs. OVX Sham). In OVX/E2+GW9662 (51±4 %) war der Monozyten/Makrophagengehalt ebenso signifikant höher im Vergleich zu OVX/2E (33±0,3 %) (# $p < 0,05$  vs. OVX/E2)

## 5. Diskussion

Die geringe Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) bei prämenopausalen Frauen und die Zunahme der kardiovaskulären Ereignisse nach der Menopause suggerieren die wichtige Rolle von  $17\beta$ -Östrogen in der Pathogenese der Atherosklerose. Die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen sind komplex und nicht vollständig geklärt (Mendelsohn und Karas, 1999). Studien deuten darauf hin, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren wie ein gestörter Glukose- und Lipidmetabolismus, das metabolische Syndrom und die Hypertonie für die erhöhte Inzidenz der CVD bei prämenopausalen Frauen verantwortlich sind (Gerhard und Ganz, 1995). Obwohl diese metabolischen Veränderungen bei postmenopausalen Frauen auftreten, wurde in groß angelegten Studien bei denen verschiedenen Risikofaktoren untersucht wurden, nur 25-50 % der positiven Wirkungen von Östrogen auf metabolische Effekte zurückgeführt (Walsh et al., 1991).

Neben metabolischen Veränderungen hat  $17\beta$ -Östrogen bedeutenden Einfluss auf die molekularen und zellulären Signalwege und die DNA-Transkription (Mendelsohn und Karas, 2005). Einige neue Signaltransduktionskaskaden, die Bedeutung für das kardiovaskuläre System haben, beschreiben die Komplexität der zellulären Interaktion nuklearer Rezeptoren wie PPAR $\gamma$  und ERs und deren Effekte auf molekularer, zellulärer und metabolischer Ebene (Mendelsohn und Karas, 2005). Eine antiinflammatorische und kardioprotektive Wirkung von  $17\beta$ -Östrogen und PPAR $\gamma$  wurde bereits beschrieben (Mendelsohn und Karas, 2005; Strehlow et al., 2003; Duan et al., 2008). Allerdings wurde die Relevanz der Interaktion zwischen  $17\beta$ -Östrogen und PPAR $\gamma$  im vaskulären System bisher noch nicht untersucht. Mittels Western Blot und quantitative RT-PCR konnten wir zeigen, dass die vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression östrogenabhängig ist. Eine erhöhte vaskuläre Sauerstoffradikalbildung in Östrogen-defizienten WT- und ApoE $^{-/-}$ -Mäusen deutet auf eine  $17\beta$ -Östrogen vermittelte Reduktion von ROS, die durch eine Induktion radikal-abbauender Enzyme bedingt ist (Strehlow et al., 2003; O'Lone et al., 1981). Im Vergleich zu OVX Mäusen wurde nicht nur die PPAR $\gamma$ -Expression in den Aorten von OVX/E2 ApoE $^{-/-}$ -Mäusen durch  $17\beta$ -Östrogen hochreguliert, sondern auch die ROS-Freisetzung und die Monozyteninfiltration reduziert. Die Endothelfunktion sowie die Atherogenese wurden dadurch ebenfalls reduziert. Eine Behandlung von OVX/E2 ApoE $^{-/-}$ -Mäusen mit dem selektiven PPAR $\gamma$ -Antagonist GW9662 reduzierte die PPAR $\gamma$ -

Expression und erhöhte die Konzentration von ROS, wodurch eine endotheliale Dysfunktion und die Atherogenese gefördert werden. Dies beweist, dass die antioxidative Wirkung von  $17\beta$ -Östrogen zumindest teilweise durch PPAR $\gamma$  vermittelt wird. Diese Befunde deuten weiterhin darauf, dass die direkte atheroprotektive Wirkung von  $17\beta$ -Östrogen im Gefäßsystem durch PPAR $\gamma$ -Regulierung vermittelt wird. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Cholesterin- und Glukosemetabolismus zwischen Sham, OVX, OVX/E2 und OVX/E2+GW9662 Mäusen beobachtet. Das genutzte Tiermodell zeigte sich sehr nützlich für die Untersuchung der nicht-metabolischen Wirkungen von  $17\beta$ -Östrogen und Östrogenmangel auf die PPAR $\gamma$ -Expression sowie auf die Gefäßinflammation, Gefäßfunktion und Gefäßmorphologie.

Interessanterweise verbesserte die Behandlung von OVX ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Pioglitazon die nachteilige Wirkung des Östrogenmangels und normalisierte die vaskuläre PPAR $\gamma$ -Proteinexpression, reduzierte die vaskuläre ROS-Konzentration und die Monozyteninfiltration und verbesserte die endotheliale Funktion sowie die Atherogenese. Nur in der Gruppe der OVX+Pioglitazon fanden wir signifikant bessere metabolische Parameter, wie eine signifikante Senkung des Cholesterinspiegels, einen verbesserten Glukosestoffwechsel sowie niedrigere systolische Blutdruckwerte. Unser Befund, dass PPAR $\gamma$ -Agonismus die endotheliale Dysfunktion und Plaquebildung reduzierte, auch wenn  $17\beta$ -Östrogen fehlte, und dass der PPAR $\gamma$ -Antagonismus die Gefäßfunktion trotz Östrogenersatz reduzierte, stellt die Relevanz von PPAR $\gamma$  als „downstream-target“ von  $17\beta$ -Östrogen bei der Vermittlung positiver vaskulärer Effekte dar. Diese Daten zeigen, dass die gestörte Gefäßfunktion und Gefäßinflammation im postmenopausalen Zustand im wesentlichen nicht durch eine reduzierte vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression und -Aktivierung bedingt ist und jedoch möglicherweise durch PPAR $\gamma$ -Aktivatoren signifikant verbessert werden kann. Zusätzlich scheint die ROS-Freisetzung und die Monozytenrekrutierung reduzierbar und die Endothelfunktion sowie Gefäßmorphologie besserbar zu sein. Allerdings vermitteln HRT und PPAR $\gamma$ -Agonisten unerwünschte Wirkungen. Dazu gehören periphere Ödeme, Anämie und Gewichtszunahme, die durch eine Proliferation des subkutanen Fettgewebes hervorgerufen werden (Fuchtenbusch et al., 2000). Neue synthetische, nicht-thiazolidindione PPAR $\gamma$ -Agonisten mit geringeren Nebenwirkungen befinden sich zurzeit in Entwicklung. Wie das Expressionsmuster der nuklearen Rezeptoren in kardiovaskulären Zellen durch das Geschlecht, der Anwesenheit von kardiovaskulären Risikofaktoren oder kardiovaskulären Erkrankungen abhängt, ist derzeit unbekannt.

Darüber hinaus ist wenig bekannt über die unterschiedliche Expression und Funktion der koregulatorischen Moleküle sowie die physiologischen Konsequenzen der genetischen Rezeptorvarianten der untersuchten Rezeptoren. Die molekularen und zellulären Grundlagen der kardiovaskulären Homöostase und geschlechtsspezifischen Unterschiede erfordern daher große Aufmerksamkeit für künftige Analysen, um neue diagnostische und therapeutische Maßnahmen kardiovaskulärer Krankheiten nicht nur bei postmenopausalen Frauen, sondern für beide Geschlechter zu eröffnen. Aus klinischer Sicht ist es bedeutend zu untersuchen, ob die hier beschriebene  $17\beta$ -Östrogen-induzierte vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression in der Tat eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung antiatherogener Effekte im Menschen spielt. PPAR $\gamma$ -Liganden könnten demnach nicht nur bei Insulinresistenz und Diabetes indiziert sein, sondern auch bei postmenopausalen Frauen, die anfällig für kardiovaskuläre Erkrankungen sind.

## 6. Zusammenfassung

Die genauen Wirkmechanismen der Vaskuloprotektion von Östrogen bei kardiovaskulären Erkrankungen sind nicht vollständig aufgeklärt. Die geringe Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen vor der Menopause und die Zunahme von kardiovaskulären Ereignissen nach der Menopause suggerieren eine wichtige Rolle von  $17\beta$ -Östrogen in der Pathogenese der Atherosklerose. Wie auch Östrogenrezeptoren (ER) gehört der Peroxisome-proliferator-activated-receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) zur Familie der ligandenaktivierten Kernrezeptoren, die unter anderem atheroprotektive Gene regulieren. Das Ziel dieses Projekts war es, in einem tierexperimentellen Ansatz aufzuklären, ob die Östrogen-induzierten vaskulären Effekte über PPAR $\gamma$  vermittelt werden.

Die PPAR $\gamma$ -Expression wurde mittels Western Blot und quantitativer Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) im Aortengewebe von Mäusen untersucht. Östrogen-defizient ovarrektomierte Wildtyp-Mäuse (OVX) zeigten eine signifikante Reduktion der PPAR $\gamma$  Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit intakter Ovarialfunktion (Sham). Durch eine Hormonersatztherapie mit subdermalen  $17\beta$ -Östrogen-Pellets konnte die PPAR $\gamma$  Expression in ovarrektomierten Wildtyp-Mäusen (OVX/E2) signifikant verbessert werden. Analog zu den Wildtyp-Mäusen hatten Östrogen-defizient ovarrektomierte ApoE $^{-/-}$ -Mäuse eine niedrige vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression, eine erhöhte ROS-Freisetzung sowie eine endotheliale Dysfunktion und gesteigerte Atherogenese. Eine Östrogenersatztherapie (OVX/E2) konnte die PPAR $\gamma$ -Expression signifikant anheben, die ROS-Freisetzung, die Monozyteninfiltration und die atherosklerotische Plaqueformation reduzieren. Auch die endotheliale Funktion verbesserte sich. Durch Inhibition von PPAR $\gamma$  mit GW9662, einem spezifischen PPAR $\gamma$ -Antagonist (OVX/E2+GW9662), konnten die gezeigten atheroprotektiven Effekte der Östrogensubstitution aufgehoben werden. Schließlich konnte trotz Östrogendepletion eine Behandlung mit Pioglitazon (OVX+Pioglitazon), einem selektiven PPAR $\gamma$ -Agonist, die atherosklerotischen Veränderungen reduziert werden.

Die erhobenen Daten zeigen, dass  $17\beta$ -Östrogen die vaskuläre PPAR $\gamma$ -Expression in Wildtyp- und in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen reguliert. Weiterhin zeigen diese Daten die Relevanz von PPAR $\gamma$  als Ziel-Rezeptor der Östrogen-induzierten antiinflammatorischen und atheroprotektiven Effekte im vaskulären System.

## 7. Tabellen-und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Tabellen Seite

1. Organbadanalyseprotokoll.....	24
2. Metabolische Parameter, Blutdruck und Herzfrequenz von WT Mäusen.....	32
3. Metabolische Parameter, Blutdruck und Herzfrequenz von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	41

### 7.2 Abbildungen Seite

1. Tiere und Behandlungsprotokoll von WT-Mäusen.....	13
2. Tiere und Behandlungsprotokoll von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	14
3. PPAR $\gamma$ -mRNA-Expression im Aortengewebe der WT-Mäuse.....	28
4. Repräsentativer WB der PPAR $\gamma$ -Proteinexpression von WT-Mäusen.....	29
5. PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in % von WT-Mäusen.....	29
6. Vaskuläre ROS Freisetzung in WT-Mäusen.....	30
7. Glukosemetabolismus (Glukosetoleranztest) von WT-Mäusen.....	33
8. Glukosemetabolismus (Insulintoleranztest) von WT-Mäusen.....	34
9. PPAR $\gamma$ -Proteinexpression in % von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	35
10. Repräsentativer WB der PPAR $\gamma$ -Proteinexpression von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	36
11. Östrogenabhängige vaskuläre ROS Freisetzung in ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	37
12. Nitroglycerin-induziert endothelabhängige Vasorelaxation.....	38
13. Östrogenabhängige Endothelfunktion von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	39
14. Glukosemetabolismus (Glukosetoleranztest) von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	42
15. Glukosemetabolismus (Insulintoleranztest) von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	43
16. Atherosklerotische Plaqueformation in ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	44
17. Plaquefläche in % der Gesamtfläche von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	45
18. Monozyten/Makrophageninfiltration der atherosklerotischen Läsionen.....	46
19. Monozyten/Makrophageninfiltration pro Plaquefläche in %.....	47

## 8. Literaturverzeichnis

Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, KonV, Breyer MD, Magnuson MA, Fazio S, Linton MF. Conditional knockout of macrophage PPAR $\gamma$  increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1647-1653

Besler C, Doerries C, Giannotti G, Lüscher TF, Landmesser U. Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 6: 1071-1082

Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 52-57

Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17- $\beta$ -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 1996; 98: 36-42

Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987; 316: 1105-1110

Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated-receptor-gamma mediated effects in the vasculature. *Circ Res* 2008; 102: 283-294

Fuchtenbusch M, Standl E, Schatz H. Clinical efficacy of new thiazolidinediones and glinides in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 151-163

Gerhard M, Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. *Circulation* 1995; 92: 5-8

Hamblin M, Chang L, Zhang H, Yang K, Zhang J, Chen YE. Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  mediates pioglitazone-reduced vascular lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 352-359

Hodgin JB, Maeda N. Mini review: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 2002; 143: 4495-4501

Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 2001; 89: 534-539

Mendelsohn ME, KarasRH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811

Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER alpha 46 in human macrophages. *PLoS One* 2009; 4: e5539

Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med* 1993; 328: 1069-1075

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

Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stäblein A, Beckers F, Smits F, Daemen P, Vetter H, Böhm M. Estrogen modulates AT1-receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998; 97: 2197-2201

O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Hansen U, Mendelsohn ME. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1281-1296

Plutzky J. The PPAR-RXR transcriptional complex in the vasculature: energy in the balance. *Circ Res* 2011; 108: 1002-1016

Qu A, Shah YM, Manna SK, Gonzalez FJ. Disruption of endothelial peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  accelerates diet-induced atherogenesis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 65-73

Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, Böhm M, Nickenig G. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 2003; 93: 170-177

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065

Tiyerili V, Müller CF, Fung S, Panek D, Nickenig G, Becher UM. Estrogen improves vascular function via peroxisome-proliferator activated receptor  $\gamma$ . *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53: 268-276

Wagner JD, Clarkson TB, St Clair RW, Schwenke DC, Shively CA, Adams MR. Estrogen and progesterone replacement therapy reduces low density lipoprotein accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal cynomolgus monkeys. *J Clin Invest* 199; 88: 1995-2002

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 199; 325: 1196-1204

Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 3: 289-295

## 9. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Cornelius Müller, Oberarzt der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn, für seine Betreuung und Ansprechbarkeit während dieser Arbeit danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Betreuern Herr Dr. med Vedat Tiyerili und Dr. med Ulrich Becher für die Bereitstellung dieses Themas und für die umfassende Einarbeitung und Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem MTA Team der Molekularen Kardiologie für die gute Einarbeitung an den Gerätschaften sowie in die OP-Methodik.

Besonders danken möchte ich meinen Schwestern Mbi Mariel Noel Fung und Ndou Vivian Fung, die mich während der Doktorarbeit, vor allem in der Endphase, unterstützt haben.

Schließlich möchte ich meinem Gastvater, Herrn Berktaş İzzet und seiner Familie für die Unterstützung während des Studiums sowie während dieser Arbeit danken.