

**Einfluss einer selektiven Leukotrien Rezeptor B2 (BLT2) Inhibition
auf die Atherogenese in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen**

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

Lisa Katharina Albrecht
aus Remscheid

2015

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Cornelius Müller
2. Gutachter: Professor Dr. med. Armin Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.12.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für Innere Medizin -
Kardiologie/Angiologie/Pneumologie, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. G. Nickenig

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	7
2. Einleitung.....	11
2.1 Atherosklerose.....	11
2.2 Leukotriene.....	22
2.3 Rolle der Leukotriene und deren Rezeptoren im Rahmen der Atherogenese	25
2.4 Fragestellung der Arbeit.....	27
2.5 Publikation der Arbeit.....	28
3. Material und Methoden.....	29
3.1 Material.....	29
3.2 Tiere	30
3.3 Messung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	32
3.4 Erfassung der endothelialen Funktion	33
3.5 Beurteilung der atherosklerotischen Plaque Formation	35
3.6 Beurteilung der Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand.....	36
3.7 Real-time PCR.....	37
3.8 Zellkultur	39
3.9 Statistische Analyse.....	39
4. Ergebnisse.....	40
4.1 Cholesterin und Blutdruck.....	40
4.2 Vaskuläre Reaktive Sauerstoffspezies	41
4.3 Endotheliale Funktion	42
4.4 Atherosklerotische Plaque Formation	44
4.5 Vaskuläre Infiltration von Monozyten	45
4.6 Vaskuläre Entzündungsmoleküle und Rac1 Expression.....	46
4.7 Zellkultur	48

5. Diskussion	50
6. Zusammenfassung	54
7. Literaturverzeichnis	56
8. Danksagung	64

1. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ABI	ankle-brachial-index
ACE	angiotensin converting enzyme
ApoE	Apolipoprotein-E
ApoE^(-/)	Apolipoprotein-E-defizient
ATP	Adenosintriphosphat
BLT1	Leukotrien Rezeptor B1
BLT2	Leukotrien Rezeptor B2
BMS	bare mental stents
CaCl²	Calciumchlorid
cPLA₂	Cytosolische Phospholipase A ₂
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerin
DES	drug elution stents
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
eR	endoplasmatische Retikulum
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FLAP	5-Lipoxygenase aktivierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HbA_{1c}	Glykohämoglobin
HDL	high density lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny]- ethansulfonsäure
HMC-1	human mast cell line-1
H₂O₂	Wasserstoffperoxid

HO[•]	Hydroxyl-Radikal
HOO[•]	Perhydroxyl-Radikal
5-HPETE	5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IMT	Intima-media-thickness
INF-γ	Interferon- γ
IP₃	Inosit-1,4,5-trisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL	low density lipoprotein
5-LO	5-Lipoxygenase
LT	Leukotriene
LTA₄	Leukotrien A ₄
LTB₄	Leukotrien B ₄
LTC₄	Leukotrien C ₄
LTD₄	Leukotrien D ₄
LTE₄	Leukotrien E ₄
LDL	low density lipoprotein
Ly255283	spezifischer BLT2 Inhibitor
L-012	Luminol Analogon
MAPKAP kinase	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mN	milli Newton

MLCK	myosin light chain kinase
Moma-2	Anti-Monozyten und Makrophagen-Antikörper-2
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
N	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na EDTA	Natrium Ethylendiamintetraessigsäure
NGS	normal goat serum, normales Ziegen-Serum
NaHCO³	Natriumbicarbonat
NF-κB	nuclear factor-kappaB
NO	Stickstoffmonoxid
Nox-1	NADPH Oxidase-1
O₂⁻	Hyperoxid-Anion
¹O₂	Singulett-Sauerstoff
O₃	Ozon
OCI⁻	Hypochlorit-Anion
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PIP2	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PKA	Phosphokinase A
PLA₂	Phospholipase A ₂
Rac 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RLE	Relative Lumineszierende Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RO[•]	Alkoxyradikal
ROO[•]	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid

ROS	reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
sICAm-1	soluble intercellular adhesion molecule-1
siRNA	small interfering RNA
SOD	Superoxiddismutase
sR	sarkoplasmatische Retikulum
sVCAM-1	soluble vascular cell adhesion molecule-1
TAG	Triacylglycerine
TEE	transoesophageale Echokardiografie
TGF-β	transforming growth factor
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha, Tumornekrosefaktor alpha
tPA	tissue plasminogen activator
TTE	transthorakale Echokardiografie
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoprotein

2. Einleitung

2.1 Atherosklerose

Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert Atherosklerose als eine „variable Kombination von Veränderungen in der Arterienintima, die aus einer herdförmigen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, von Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calcium besteht, verbunden mit regressiven Veränderungen in der Media“.

Es handelt sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung, bei der es im Verlauf trotz ständiger Reparaturversuche zu Abnutzungserscheinungen der Gefäßwände kommt. Charakteristisch ist die atheromatöse Läsion, auch Plaque genannt, eine von der Intima ausgehende pathologische Verdickung der Arterienwand, die durch Lipideinlagerung sowie Anhäufung von Schaumzellen entsteht. Ein Verlust der Elastizität mit Einengung des Lumens ist die Folge. Häodynamisch bedingte Prädilektionsstellen sind die Koronarien, die Bauchaorta, die Arteria carotis interna, die Arteria femoralis und der Circulus arteriosus cerebri (Busse, 2005; Freudenberg, 2011; Luley und Klör, 1993; Pschyrembel, 2007).

Epidemiologie

Im Jahre 2010 stand in Deutschland die Atherosklerose nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) mit 113016 Erkrankten auf Platz 13 der 20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten männlichen Patienten (Statistisches Bundesamt Deutschland, männliche Krankenhauspatienten) und mit 178835 auf Platz 16 der 20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten Patienten insgesamt (Statistisches Bundesamt Deutschland, Krankenhauspatienten). Im Jahre 2010 verzeichnete das Statistische Bundesamt 7916 Sterbefälle wegen Atherosklerose, davon 2769 männliche und 5147 weibliche, wobei die Anzahl der Verstorbenen mit dem Alter zunahm (Statistisches Bundesamt Deutschland,

Gesundheit, Todesursachen in Deutschland). Die häufigsten Todesursachen im Jahre 2010 waren nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) auf Platz 1 die chronische ischämische Herzkrankheit mit 72734 Verstorbenen, auf Platz 2 der akute Myokardinfarkt mit 55541 Verstorbenen und auf Platz 3 die Herzinsuffizienz mit 48306 Verstorbenen (Statistisches Bundesamt Deutschland, Todesursachen).

Ätiologie

In den letzten Jahrzehnten wurden hauptsächlich drei Theorien bezüglich der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert.

Bis heute ist die von Ross und Glomset im Jahre 1973 begründete „response to injury“-Hypothese das führende pathogenetische Erklärungsmodell (Ross und Glomset, 1977). Die Theorie beschreibt die Ursache der Atherosklerose als einen aus mechanischen, immunologischen oder chemischen Einflüssen entstandenen Prozess, bei dem es zur Entzündungsreaktion aufgrund von LDL-Akkumulationen kommt. Die endotheliale Dysfunktion begünstigt dabei die Schädigung der Blutgefäße.

Die zweite, sogenannte Oxidationstheorie sieht die Entstehung der Atherosklerose in oxidativen und inflammatorischen Prozessen. Hierbei wird im Blut angereichertes „low density lipoprotein“ (LDL) in die Gefäßwände aufgenommen und mithilfe oxidativer Prozesse in ein entzündungsauslösendes Molekül verwandelt, welches zu Atherosklerose führt (Freudenberg, 2011).

Die dritte, sogenannte Mainzer Hypothese begründet die zunehmende Lipidablagerung in die Gefäßwand mit einer extrazellulär enzymatischen Modifikation des LDL und mit einer Überlastung des Lipid-Abtransportsystems in Form einer immunologischen Erkrankung. Chronische Entzündungen der Gefäßwände mit einhergehender Entstehung der Atherosklerose sind die Folgen (Bhakdi et al., 1995).

Als Gemeinsamkeit dieser drei Theorien kann die Reduktion der mechanischen Belastbarkeit der Gefäßwand durch die Risikofaktoren gesehen werden (Freudenberg, 2011).

Viele unterschiedliche Faktoren und Erkrankungen verursachen bzw. begünstigen die Entstehung der Atherosklerose. Dazu gehören zum einen zahlreiche Erkrankungen wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Fettstoffwechselstörun-

gen, Hyperfibrinogenämie und Adipositas, zum anderen der Nikotin- und Alkoholabusus, Antigen-Antikörper-Komplexe und Hypoxie. Weitere Risikofaktoren sind Entzündungsparameter wie zum Beispiel das C-reaktive Protein (CRP), Interleukin 6 (IL-6), „tumor necrosis factor-alpha“ (TNF- α) und 5-Lipoxygenase, einige Zelladhäsionsmoleküle wie zum Beispiel „soluble intercellular adhesion molecule-1“ (sICAM-1), „vascular cell adhesion protein 1“ (sVCAM-1) und P-Selektin, oxidative Stressfaktoren wie das oxidierte „low density lipoprotein“ (LDL), Substanzen der Hämostase wie D-Dimere, Faktoren des Stoffwechsels wie Homocystein und Lipoprotein A sowie vaskuläre Stoffe wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und genetische Faktoren wie die Mutation der 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR). Ebenso spielen das Alter, die familiäre Disposition und das Geschlecht eine wichtige Rolle in Bezug auf Atherosklerose. Der Lebensstil wie zum Beispiel die Ernährung, Übergewicht bzw. körperliche Bewegung, psychosozialer Stress und Umweltbedingungen beeinflussen die Entstehung und den Verlauf der Krankheit erheblich (Castelli et al., 1986; Cremer et al., 1997; Freudenberg, 2011; Kannel et al., 1961; Klinker et al., 2009; Pschyrembel, 2007; Silverthorn, 2009; Wilson et al., 1987).

Die genannten Risikofaktoren begünstigen die Entstehung der Atherosklerose bereits ab den ersten Lebensjahrzehnten. Die klinische Symptomatik wie zum Beispiel der akute Herzinfarkt, der Schlaganfall oder die chronische koronare Herzerkrankung (KHK) bzw. die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) werden allerdings erst Jahrzehnte später sichtbar (Erbel et al., 2008).

Pathophysiologie

Die Innenschicht der arteriellen Blutgefäße, die sogenannte Tunica intima, bildet die Grenze zum Blutkreislauf. Sie besteht aus einschichtigen Endothelzellen, einer Schicht aus lockerem Bindegewebe, dem Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna. Die Endothelzellen sorgen für eine glatte innere Oberfläche, ermöglichen eine selektive Permeabilität bezüglich des Stoffaustausches mit dem Blut und exprimieren auf den Gefäßtonus wirkende Substanzen sowie Zelladhäsionsmoleküle. Die in Längsrichtung verlaufenden Fasern wirken den mechanischen Schubkräften des Blutflusses entgegen. Die Tunica intima ist Angriffspunkt der Atherosklerose. Kommt es bedingt

durch die Risikofaktoren wie zum Beispiel der Hypertonie zu einer Läsion der Intima und damit zu einer endothelialen Dysfunktion, so ist die Barrierefunktion gestört (Silverthorn, 2009). Das geschädigte Endothel setzt Zelladhäsionsmoleküle frei. Es findet eine monozytäre Zelladhäsion mit anschließender Infiltration durch die Läsion („injury“) in die Intima statt. Durch die erhöhte Durchlässigkeit können Lipoproteine mit geringer Dichte, sogenannte „low density lipoproteins“ (LDL), aus dem Blut in die Gefäßwand eindringen. LDL transportiert Cholesterin von der Leber in das extrahepatische Gewebe. Über transmembranäre LDL-Rezeptoren wird LDL durch Endozytose mithilfe des Apolipoproteins ApoB-100 aufgenommen. Während das Cholesterin in die Membran der Zelle eingebaut wird oder in die Biosynthese der Steroidhormone gelangt, wird das LDL in seine Aminosäuren aufgespalten (Busse, 2005; Klink et al., 2009; Silverthorn, 2009). Wenn die Transportmöglichkeiten des LDL in die Zelle ausgeschöpft sind, kommt es zu einer vermehrten Anreicherung des LDL im Plasma. Dies führt ebenfalls zu vaskulären Lipidablagerungen und damit zur Entstehung atherosklerotischer Plaques. Der LDL-Cholesterinspiegel steht so im direkten Zusammenhang mit der Entwicklung der Atherosklerose. Die von den Leukozyten abgegebenen Zytokine und Wachstumsfaktoren aktivieren sowohl die Differenzierung der Monozyten zu ortsständigen Makrophagen als auch die Zellteilung glatter Muskelzellen in der Gefäßwand und führen zur Cholesterinaufnahme dieser (Pschyrembel, 2007; Silverthorn, 2009). LDL akkumulieren innerhalb der zwischen den Endothelzellen und dem subendothelialen Bindegewebe gelegenen Läsionen und locken Makrophagen an. Das LDL wird mithilfe der membranständigen Scavenger-Rezeptoren von den Makrophagen aufgenommen und oxidativ phagozytiert. Dies führt durch eine fehlende negative Feedbackhemmung zu einer Umwandlung der Makrophagen zu Schaumzellen, den sogenannte Xanthomzellen. Die Schaumzellen sind nun Bestandteil der Plaque und als weißlich-gelbe Lipidflecken makroskopisch zu erkennen. Der Inhalt der nekrotisierenden Makrophagen gelangt ins umliegende Gewebe und löst eine lokale Entzündungsreaktion in der Plaque aus. Das Endothel wird geschädigt, die Arterienwand verdickt sich, sogenannte „fatty streaks“ entstehen, das Lumen stenosierte und der Blutfluss verändert sich dementsprechend. Blutgerinnsel werden leichter gebildet und können die Gefäße verschließen. Im weiteren Verlauf vergrößert sich die Lipidablagerung und es kommt zur Verhärtung durch Kalzifizierung. Es bil-

det sich eine Kappe aus fibrös kollagenhaltigem Material. Das aus Makrophagen und T-Lymphozyten stammende Zytokin Interferon- γ (INF- γ) und der von Makrophagen freigesetzte Wachstumsfaktor „platelet-derived growth factor“ (PDGF) führen zur Einwanderung und anschließender Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media in den subintimalen Bereich. Diese glatten Muskelzellen produzieren und sezernieren Kollagen, Elastin und Proteoglykane. Sie sind zuständig für die Entstehung der die Plaque umschließende, fibrösen Kappe. Somit wird zwischen gelben Plaques, die weich und cholesterinreich sind, und weißen Plaques, die hart und fibrös sind, unterschieden. Die Elastizität der Gefäße nimmt ab. Komplexe Läsionen, sogenannte atheromatöse Plaques, können durch zentrale Nekrosen der fibrösen Plaques entstehen, bedingt durch eingelagertes Cholesterin oder Mangel an Sauerstoff. Es bildet sich ein nekrotischer, aus Lipiden bestehender Kern (Busse, 2005; Freudenberg, 2011).

Des Weiteren wird zwischen stabiler Plaque und instabiler bzw. vulnerabler Plaque unterschieden. Die stabile Plaque besitzt eine dicke fibröse Kappe, die die Lipidablagerung umschließt, kalzifizierte Areale und eine durch sich teilende glatte Muskelzellen verdickte Intima. Von den Makrophagen werden Enzyme freigesetzt, die proteolytisch auf die fibröse Faserkappe wirken und somit eine stabile in eine vulnerable Plaque umwandeln. Die instabile Plaque weist somit eine dünne Faserkappe über dem lipidreichen Gebiet auf, die in Richtung Gefäßlumen einreißt und eine Plaqueruptur verursachen kann. Es kommt zum Kontakt zwischen Blut und Kollagen bzw. anderen Bindegewebsfasern. Die Gerinnungskaskade und die Aggregation von Thrombozyten werden stimuliert (Silverthorn, 2009).

Nach der WHO werden die Stadien der Atherosklerose wie folgt eingeteilt (Pschyrembel, 2007):

1. Stadium: frühe Läsion, Fettstreifen („fatty streaks“)
2. Stadium: fortgeschrittene Läsion, fibrinöse Plaque
3. Stadium: komplizierte Läsion, klinisch manifeste Folgeerkrankung

Im Verlauf der Atherosklerose können Gefäße stenosieren oder sich komplett verschließen. Eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes und eine Unterversorgung mit Sauerstoff des perfundierten Gewebes sind die Folge (Kuschinsky, 2004).

Ebenfalls besteht die Gefahr der Ruptur oder Erosion der Plaques. Durch das Einreißen der luminalen Deckschicht entstehen Thromboembolien, die lebensbedrohliche Auswirkungen mit sich bringen können. Je nach Ort des thromboembolischen Gefäßverschlusses kann es im Bereich des Versorgungsgebietes zu einer kritischen Mangelversorgung bis hin zur Gewebsnekrose kommen. Das klinische Bild des Betroffenen hängt von der Lokalisation des Gefäßverschlusses ab.

In der Pathogenese der Atherosklerose spielt das Endothel eine entscheidende Rolle. Das Endothel besitzt antiatherosklerotische Eigenschaften, indem es durch die Expression von NO und Prostazyklin die Proliferation und Kontraktion glatter Muskelzellen, die Adhäsion und Aggregation sowohl der Thrombozyten als auch der Leukozyten und die LDL-Oxidation inhibiert. Vom Endothel gebildeter Stickstoffmonoxid (NO) ruft eine Vasorelaxation der Gefäße hervor. Kommt es durch Risikofaktoren, Erkrankungen oder Entzündungsvorgängen zu einer Stimulation des Endothels und einer damit einhergehenden Veränderung der endothelialen Eigenschaften mit eingeschränkter bis fehlender endothelvermittelter Vasodilatation, spricht man von einer endothelialen Dysfunktion (Busse, 2005; Merten, 2006; Suwaidi, 2000). Ist das Endothel funktionell z.B. durch Atherosklerose, Diabetes oder Hypercholesterinämie geschädigt, so wird NO vermindert produziert und es kommt zu Verlusten der protektiven Effekte im Gefäßsystem. Die LDL-Oxidation wird nicht mehr von NO gehemmt. Glatte Muskelzellen proliferieren und es kommt überwiegend zu konstriktorischen Reaktionen. Die von den Plaques bereits reduzierten Gefäßlumen werden zusätzlich verengt. Im Blut zirkulierende Substanzen wie Serotonin und Bradykinin erzeugen durch direkten Kontakt eine Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen. Die Thrombozytenadhäsion, ausgelöst durch unebene Plaquebeschaffenheit, verengt die Gefäße darüber hinaus (Kuschinsky, 2004). Thrombozyten werden aktiviert und setzen Faktoren wie PDGF, „epidermal growth factor“ (EGF), „transforming growth factor“ (TGF β), Serotonin und Thromboxan A₂ frei, die vasokonstriktorisch und wachstumsstimulierend auf die Gefäßwand und somit Atherosklerose fördernd wirken.

Die Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen, die Monozytenadhäsion und Endothelinproduktion ist ebenfalls aufgehoben. Somit wird sowohl der Transkriptionsfaktor „nuclear factor-kappaB“ (NFκB), der für die Regulation der Adhäsionsmoleküle E-Selectin, P-Selectin und „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) zuständig ist, als auch das „monocyte chemoattractant Protein-1“ (MCP-1), das die Monozyten-Infiltration in die Gefäßwand reguliert, ungehindert aktiviert (Busse, 2005; Peters und Charo, 2001; Reape und Groot, 1999). Neben der Expression von P-Selectin, E-Selectin und VCAM-1 führt auch „intracellular cell adhesion molecule-1“ (ICAM-1) zu der Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand (Collins, 2000; Steffel und Lüscher, 2011).

Ist die intravaskuläre NO-Verfügbarkeit reduziert, so ist auch das „antiatherosklerotische Prinzip“ geschwächt. Die NO-Verfügbarkeit in der Gefäßwand wird durch die NO-Synthase-Aktivität und -Expression sowie die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species) bestimmt. ROS bildende Enzyme bauen NO ab und verursachen durch die Abnahme der Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit in den Gefäßen die Dysfunktion im Endothel. Außerdem können die reaktiven Sauerstoffspezies selbst mit NO zu vasoaktivem Nitrit und Nitrat reagieren. Hierdurch wird ebenfalls die endotheliale Dysfunktion verursacht.

Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, abgekürzt NADPH, ist ein Koenzym, welches Hydridionen überträgt und bei Redoxreaktionen im Zellstoffwechsel eine Rolle spielt. NADP⁺ steht für die oxidierte und NADPH für die reduzierte Form. Während NADH katabol gewonnen und in der Atmungskette oxidiert wird, um Energie in Form von ATP zu erzeugen, ist NADPH im anabolen Weg als Reduktionsmittel vorzufinden, um als Elektronen- und Protonen-Lieferant zu dienen. Die z.B. durch Angiotensin II, Endothelin-1 oder Thrombin aktivierbare NADPH Oxidase spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von ROS in Fibroblasten, Phagozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und damit auch bei der Entstehung der Atherosklerose (Busse, 2005; Pongnimitprasert, 2009).

Vaskulärer oxidativer Stress trägt wesentlich zu der endothelialen Dysfunktion in der Pathogenese koronarer Herzerkrankung bei und stellt neben Ruptur und Plaque Formation einen weiteren bedeutenden Risikofaktor der Atherosklerose dar. Reaktive Sauerstoffspezies sind Zwischenprodukte oxidativer Prozesse, die physiologisch bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser entstehen. Sie sind zum einen an

Signaltransduktionswegen und zum anderen bei der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht, können Zellen irreversibel zerstört werden. Daher sind reaktive Sauerstoffradikale beim oxidativen Stress von großer Bedeutung. Der Prozess, bei dem die physiologische Menge an ROS überschritten wird, nennt man oxidativen Stress. Unter oxidativem Stress wird somit ein Ungleichgewicht antioxidativer und prooxidativer Bestandteile im Organismus mit einem Übergewicht der prooxidativen Komponente verstanden. Dieses Ungleichgewicht zwischen reduzierenden und oxidierenden Stoffen führt zu einer Schädigung der zellulären und extrazellulären Makromoleküle. ROS entstehen in Mitochondrien der Entzündungszellen als Nebenprodukt von Stoffwechselprozessen im Rahmen der Zellatmung (Pongnimitprasert, 2009). Die Cytochrom P450 Epoxygenase, Xanthinoxidase, Zyklooxygenasen, Lipoxygenase und nach enzymatischer Entkopplung auch die NO-Synthase können reaktive Sauerstoffspezies in vaskulären Zellen produzieren, wobei die NADPH-Oxidase das entscheidende Enzym ist, da sie schnell und in großer Zahl Superoxidanionen zu anderen reaktiven Sauerstoffradikalen umwandeln kann (Busse, 2005; Mügge, 1998).

Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) ist ein Protein, das in Menschen vom Rac1 Gen codiert wird und in der NADPH Oxidase vorzufinden ist. Es handelt sich um kleine, ca. 21 kDa große GTPasen, die als „Rac“-Untereinheit zu der Familie der Rho-GTPasen gehören. Das Protein reguliert zelluläre Prozesse wie das Zellwachstum, den Zellzyklus, die Zell-Zell-Adhäsion, die Motilität, die epitheliale Differenzierung, die Reorganisation des Zytoskeletts, die Genexpression und die Aktivität der Protein-Kinasen (Westwick et al., 1997).

In den Gefäßen werden die reaktiven Sauerstoffradikale durch unterschiedliche Reaktionen, die jedoch oft mit vaskulären inflammatorischen Prozessen und der Atherogenese in Verbindung stehen, gebildet. Bei Diabetes mellitus wird oxidativer Stress durch eine Zunahme an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien verursacht (Tang et al., 2012). Hierbei handelt es sich um reaktive Sauerstoffspezies wie das Hyperoxid-Anion (O_2^-), Hydroxyl-Radikal (HO^\cdot), Perhydroxyl-Radikal (HOO^\cdot), Peroxylradikal (ROO^\cdot), Alkoxylradikal (RO^\cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3), Hypochlorit-Anion (OCI^-) und der angeregte Singulett-Sauerstoff (1O_2). Wasserstoffperoxid (H_2O_2), ein toxisches Nebenprodukt der Atmungskette, agiert in zahlreichen Signal-

kaskaden als second-messenger, so z.B. bei der Angiotensin-II Wirkung oder bei der Aktivierung von PDGR- β Rezeptoren. Eine weitere, in der Atmungskette anfallende, toxische Sauerstoff-Verbindung ist das Hyperoxid-Anion (O_2^-), welches bei einer unvollständigen Sauerstoffreduzierung entsteht und anschließend entweder spontan oder durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt wird. Wichtig für den Körper ist die kontrollierte Elimination von H_2O_2 durch die Enzyme Katalase, Peroxiredoxine und Glutathion-Peroxidase, da es andernfalls in das toxische Hydroxyl-Radikal (HO^\cdot) zerfallen kann. Die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies stimulieren unterschiedliche, die Funktion des Gefäß betreffende Signalkaskaden. Eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen führt zu einer Zunahme des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen, zu einer Erhöhung des Gefäßtonus und zu inflammatorischen Prozessen, die wiederum zum Umbau der Gefäße und der endothelialen Dysfunktion führen. In niedriger Konzentration wirken Sauerstoffradikale als intrazelluläre Signalmoleküle und Modulatoren der Genexpression und üben einen entscheidenden Einfluss auf pro-atherosklerotische Genprodukte wie das MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, P-Selectin und VEGF aus (Busse, 2005; Poeckel und Funk, 2010).

Folgen

Die Folgen der Atherosklerose sind von der Lokalisation, dem Ausmaß der Plaquebildung sowie den betroffenen Organen bzw. Gefäßen abhängig. So kann es zu einer koronaren, zerebralen, vertebrobasilären oder anderen peripheren arteriellen Unterversorgung kommen. Es wird zwischen Mikro- und Makroangiopathie differenziert. Je nach Ausprägung ist das klinische Erscheinungsbild symptomlos bis akut lebensbedrohlich. Sind kleinste Gefäße wie Kapillaren und Arteriolen betroffen, so handelt es sich um eine Mikroangiopathie, ansonsten um eine Makroangiopathie. Unterschiedliche Folgeerkrankungen wie Thrombosen, Angina pectoris, Schlaganfall, Lungenembolie, Herzinfarkt, Ischämie, Niereninsuffizienz, Retinopathie oder der plötzliche Herztod sind bekannt. Atherosklerose selbst ist symptomlos und wird daher erst erkannt, wenn Folgeerkrankungen auftreten. Durch die Einengung des Gefäßes kommt es zu Ischämien in dem zu versorgenden Gewebe bzw. in den entsprechenden Endorganen (Steffel und Lüscher, 2011).

So führt eine Verengung der Koronargefäße zum typischen Angina-Pectoris-Bild mit Atemnot, Schwindel und drückendem Schmerz auf der Brust und gegebenenfalls Ausstrahlung des Schmerzes in die linke Schulter, Arm oder Unterkiefer. Kommt es im Rahmen einer zunehmenden Minderperfusion des Muskelgewebes zu Nekrosen resultiert ein Myokardinfarkt. Atherosklerotisch bedingte Stenosen zerebraler Gefäße können zu transitorischen ischämischen Attacken (TIA) oder zum Schlaganfall mit peripheren Ausfällen (Apoplex) führen. Je nach Lokalisation und Ausmaß der Ischämie bedingten, irreversiblen Zelluntergänge resultieren klinisch neurologische Ausfälle entsprechender Hirnregionen. Gefäßstenosen oder -verschlüsse im Bereich der Extremitäten führen zum Krankheitsbild der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Sie treten bei nicht behandeltem Diabetes mellitus vermehrt auf und es kommt zum typischen klinischen Bild der Claudicatio intermittens. Eine chronische Arteriopathie führt in den Nieren zur Urämie und im Auge zur Retinopathie. Als Folge eines atherosklerotischen Gefäßprozesses können Aussackungen der gesamten Gefäßwand entstehen, sogenannte Aneurysmen. Sind große Gefäße betroffen wie z.B. die Aorta, sind bei Ruptur lebensbedrohliche Blutungen möglich (Silverthorn, 2009; Zimmer und Zimmer, 2004).

Diagnostik

In der Diagnostik atherosklerotischer Gefäßerkrankungen spielen sowohl die körperliche Untersuchung, die Laborwerte wie zum Beispiel die Lipoproteine hoher Dichte (HDL), die Lipoproteine geringer Dichte (LDL), Triglyzeride, Blutzucker, Homocystein, CRP, HbA_{1c} und Troponin, der Knöchel-Arm-Index (ABI) als auch bildgebende Verfahren wie die Sonografie zur Bestimmung der Intima-media-Dicke (IMT) z.B. der Arteria carotis oder zur Darstellung der Plaque, die Koronarangiografie, Echokardiografie, Computertomografie und Magnetresonanztomografie eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen den Einblick in die Beschaffenheit der Gefäßwände. Während sich hohe HDL-Spiegel positiv auf unseren Organismus auswirken, weisen erhöhte LDL-Werte im Blutplasma ein größeres kardiovaskuläres Risiko auf.

Die Angiografie der Herzkranzgefäße ist eine Röntgenuntersuchung, bei der die Arterien des Herzens mithilfe von Kontrastmittel über einen Herzkatheter dargestellt werden. Bei der Angio- und Sonografie können intrakranielle Gefäße, Halsschlagadern, Herzklap-

pen, Herzkranzgefäße, die Aorta und die Arterien der Beine untersucht werden. Bei der Echokardiografie wird mithilfe des Ultraschalls transthorakal (TTE) und transösophageal (TEE) das Herz untersucht. Des Weiteren ist die Elektrokardiografie (EKG) in Bezug auf die Diagnostik unverzichtbar (Erbel et al., 2008; Klinker et al., 2009; Sechtem et al., 2010; Silverthorn, 2009; Steffel und Lüscher, 2011).

Therapie

Für eine erfolgreiche Therapie ist ein gesunder Lebensstil unumgänglich. Primär sind auf körperliche Aktivität, mediterrane hypokalorische Mischkost, Gewichtsreduktion und Vermeidung bzw. Reduktion beeinflussbarer atherogener Risikofaktoren wie zum Beispiel das Rauchen zu achten (Yusuf et al., 2004). Medikamentös werden verschiedene Medikamente wie Aspirin, Statine, Betablocker und ACE-Hemmer bezüglich der Senkung des Bluthochdrucks, des Cholesterins, der Triglyceride sowie der Hemmung der Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation empfohlen. Innerhalb der ersten Stunden nach Schmerzbeginn können lysierende Medikamente wie u.a. t-PA-Derivate und Streptokinasen zur Reperfusionstherapie verwendet werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit des invasiven Eingriffs. Plaques können mit einem Katheter gedehnt und Thromben mechanisch beseitigt werden. Mittels Koronarangiografie wird die Stenose bzw. der Verschluss dargestellt und mithilfe der Ballondilatation wieder erweitert oder wiedereröffnet. Gefäßstützende Stents werden implantiert. Hier wird zwischen „bare metal stents“ (BMS) und „drug elution stents“ (DES) unterschieden. Während BMS unbeschichtete kleine, röhrenförmige Gittergerüste aus Metall oder Kunststoff sind, haben die DES die Besonderheit, dass sie mit Arzneistoffen beschichtet sind. Die in kleinen Mengen vom Material freigesetzten Arzneimittelstoffe hemmen die Zellneubildung und damit die Restenose. Operativ bestehen zudem die Möglichkeiten von Bypass-Operationen und Thrombendarteriektomien (Hoth und Wischmeyer, 2010; Silverthorn, 2009; Steffel und Lüscher, 2011; Stiefelhagen, 2004).

2.2 Leukotriene

Leukotriene (leuko: weiß; Trien: ein Molekül mit drei „C=C“-Doppelbindungen) gehören zu der Stoffgruppe der Eikosanoide. Sie sind von der Arachidonsäure abgeleitet und werden von der 5-Lipoxygenase (5-LO), die vor allem in Leukozyten exprimiert wird, und nachgeschalteten Enzymen auf dem sogenannten „linearen Weg“ des Arachidonsäurestoffwechsels gebildet. Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die über die Cyclooxygenase ebenfalls Ausgangsmolekül für Prostaglandine und Thromboxane ist. Die offenkettigen Leukotriene sind hochwirksame Botenstoffe entzündlicher und allergischer Reaktionen und spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel der Atherosklerose, dem Asthma bronchiale, bestimmten Krebserkrankungen und der Anaphylaxie.

Die zytosolische Phospholipase A_2 (PLA₂) setzt die Arachidonsäure aus membranständigen Phospholipiden frei, die durch das Enzym 5-Lipoxygenase zur 5-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (5-HPETE) und anschließend durch das gleiche Enzym zum instabilen Leukotrien A₄ (LTA₄) katalysiert wird. Bei dem Leukotrien A₄ handelt es sich um die Ausgangssubstanz für die Biosynthese zahlreicher weiterer Leukotriene wie die Peptido-(Cysteinyl-) Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ und das Cysteinyl freie LTB₄. Das Enzym LTA₄-Hydrolase katalysiert die Reaktion von Leukotrien A₄ zu Leukotrien B₄. Ausgehend vom Leukotrien A₄ werden durch das Enzym LTC₄-Synthase die Leukotriene C₄, D₄ und E₄ gebildet, siehe Abbildung 1 (Funk, 2001; Gulbins und Lang, 2005; Rådmark, 2007; Silverthorn, 2009; Werz und Steinhilber, 2006).

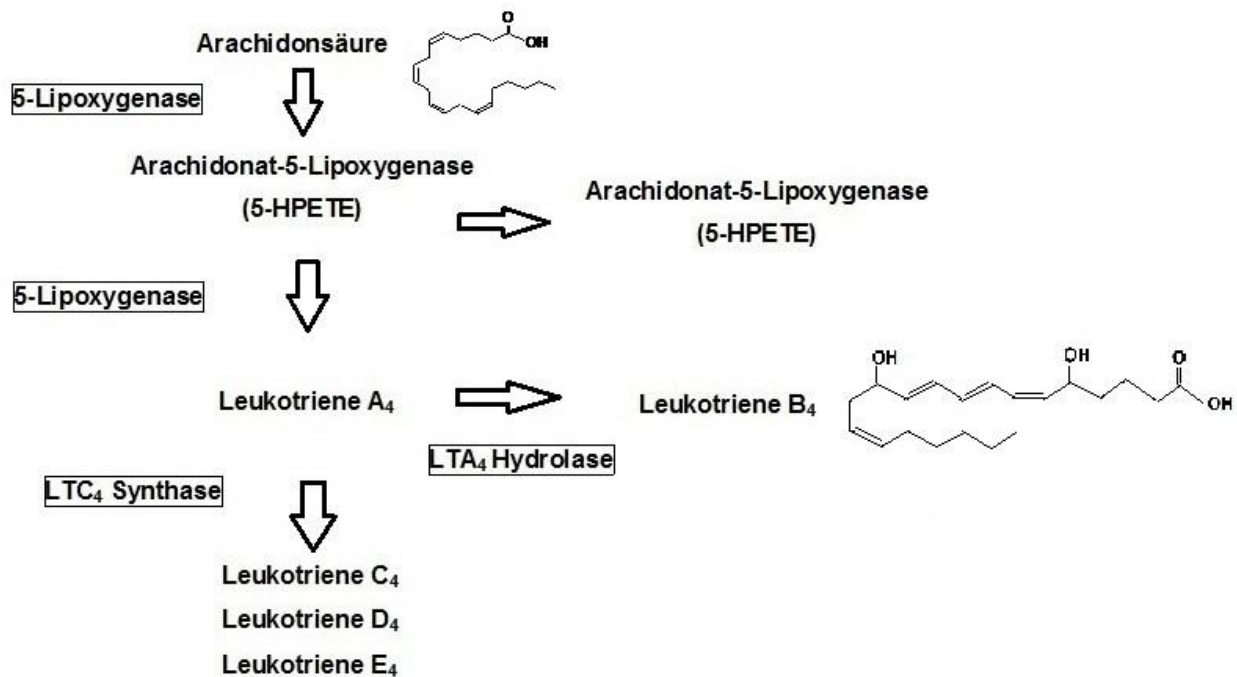


Abb. 1: Der 5-Lipoxygenasestoffwechsel (Werz und Steinhilber, 2006)

Die von der Arachidonsäure ausgehende und von den Enzymen 5-Lipoxygenase, LTA₄ Hydrolase und LTC₄ Synthase abhängige Entstehung der Leukotriene A₄, B₄, C₄, D₄ und E₄.

Die verschiedenen Leukotriene wirken alle über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Die biologisch aktiven Leukotriene sind LTB₄ und LTC₄. Während LTB₄ die Entstehung von Sauerstoffradikalen zur Abwehr von fremden Substanzen und die Adhäsion an Zellen des Endothels aktiviert, wirken LTC₄ und sein Metabolit LTD₄ stark konstriktorisch auf die Bronchien und steigern die Permeabilität der Kapillaren. LTC₄ und LTD₄ spielen somit eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen wie dem Asthma bronchiale. Durch Diglyceride, Calcium-Ionen, dem zellulären Redox-Status und durch Phosphorylierung des Enzyms wird die zelluläre 5-Lipoxygenase-Aktivität reguliert, siehe Abbildung 2 (Busse, 2005; Feinmark und Cannon, 1986; Rådmark, 2007; Werz und Steinhilber, 2006).

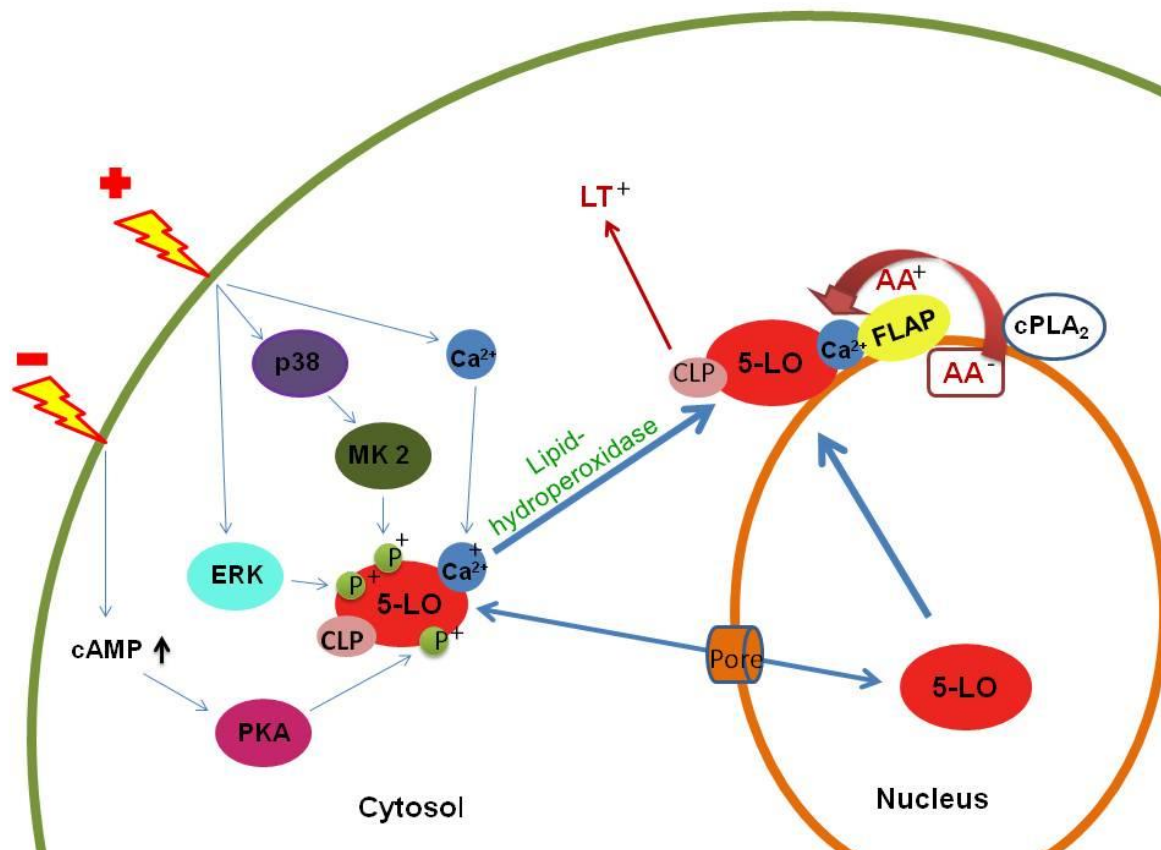


Abb. 2: Die 5-Lipoxygenase-Aktivierung

Die Aktivierung der 5-Lipoxygenase = 5-LO steht in einem engen Zusammenhang mit FLAP = 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein, cPLA₂ = cytosolische Phospholipase A₂, LT = Leukotriene, AA = Arachidonsäure, PKA = Phosphokinase A und ERK = extrazellulär Signal-regulierte Kinase.

Die p38 MAPK-regulierte MAPKAP-Kinase und die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERKs) phosphorylieren die 5-Lipoxygenase. Bei der Phosphorylierung durch die Proteinkinase A wird die Aktivität der 5-Lipoxygenase hingegen inhibiert. Kommt es zu einer Aktivierung, so wandert das Enzym an den Zellkern, an dem FLAP, ein die 5-Lipoxygenase aktivierendes Protein, der Arachidonsäure als Substrat dient. Substanzen, die das Enzym 5-Lipoxygenase inhibieren, sind durch ihre antiinflammatorische Wirkung bzw. ihre Inhibition der Bronchokonstriktion bei asthmatischen Reaktionen von großer Bedeutung (Werz und Steinhilber, 2006).

2.3 Rolle der Leukotriene und deren Rezeptoren im Rahmen der Atherogenese

In mehreren Studien gab es Anhaltspunkte dafür, dass eine Inhibition des Enzyms 5-Lipoxygenase zur möglichen therapeutischen Anwendung nicht nur bei Entzündungen, sondern auch bei weiteren Erkrankungen wie bestimmten Krebserkrankungen, Osteoporose und Atherosklerose herangezogen werden kann (Sánchez-Galán et al., 2009; Werz und Steinhilber, 2006).

Leukotriene sind an verschiedenen inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Atherogenese involviert. Insbesondere Leukotrien B₄ (LTB₄), ein Endprodukt des 5-Lipoxygenase-Weges, induziert mehrere entzündungsfördernde Antworten. Unter anderem fördert LTB₄ die Chemotaxis und Adhäsion von Entzündungszellen. Es wurde gezeigt, dass auch BLT1-defiziente Makrophagen eine LTB₄-induzierte Chemotaxis aufweisen, am ehesten vermittelt durch die Aktivierung von BLT2. LTB₄ fördert die Atherosklerose durch die angelagerten Monozyten, die durch Expression von CD36 zu Schaumzellen umgewandelt werden. Es entstehen Lipidablagerungen (Subbarao et al., 2003). Freigesetzt wird LTB₄ von Leukozyten wie zum Beispiel den Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Mastzellen und Dendritischen Zellen. Im Rahmen der Atherogenese infiltrieren Monozyten die Gefäßwand und potenzieren unter anderem durch Freisetzung mithilfe von LTB₄ die inflammatorischen Reaktionen in der Gefäßwand, indem sie proinflammatorische Zytokine wie IL-6, MCP-1 und TNF- α mit proatherosklerotischer Eigenschaft exprimieren (Bäck, 2006; Lundeen et al., 2006; Poeckel und Funk, 2010; Sánchez-Galán, 2009).

Durch die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf den Oberflächen der Membranen, den sogenannten BLT Rezeptoren, vermitteln die Leukotriene ihre Wirkung. Bezüglich der Leukotriene B₄ (LTB₄) sind zwei Rezeptoren bekannt: BLT1 und BLT2. Diese Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren sind bei Immunantworten und in der Pathogenese von inflammatorischen Krankheiten beteiligt. Sie generieren unterschiedliche intrazelluläre Signale wie die Mobilisation von Calcium oder die Hemmung der Adenylatzyklase. Durch die Inhibition dieser Rezeptoren konnten Entzündungen beeinflusst werden. Während der BLT1 Rezeptor eine hohe Affinität für LTB₄ aufweist, vor allem in Leukozyten und Monozyten produziert wird und eine entscheidene Rolle in

inflammatorischen Prozessen spielt, so besitzt der BLT2 Rezeptor nur eine geringe Affinität gegenüber LTB_4 , kann jedoch auch an andere Eikosanoide binden und wird in verschiedenen Geweben, auch endothelial gebildet. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass BLT2 die Migration von Mastzellen, Keratinozyten und Dendritischen Zellen kontrolliert (Bäck, 2007; Bäck und Hansson, 2006; Hennig et al., 2008; Iizuka et al., 2010; Kim et al., 2009; Lundeen et al., 2006; Sánchez-Galán, 2009; Shin et al., 2006; Tager und Luster, 2003; Woo et al., 2002; Yokomizo et al., 2001).

Die BLT Rezeptoren werden auf Leukozyten und T-Lymphozyten exprimiert. Während in menschlichen Plaques BLT2 Rezeptor Proteine nur in Makrophagen mit CD163 nachgewiesen werden konnten, wurden BLT1 Rezeptor Proteine zusätzlich von glatten Muskelzellen (α -SMA, α -smooth muscle actin) und Endothelzellen (von-Willebrand-Faktor) exprimiert. In Atherosklerose freien Gefäßen wurde der BLT1 Rezeptor nur in glatten Muskelzellen, nicht aber in Endothelzellen gefunden (Bäck et al., 2005).

Die durch LTB_4 ausgelöste BLT1 Aktivierung führt zu einer Leukozyten-Chemotaxis (Bäck, 2007). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die genetische Deletion von BLT1 in $\text{ApoE}^{(-/-)}$ Mäusen die atherosklerotische Plaque Formation nach sechs Wochen cholesterinreicher Fettdiät reduzieren konnte (Heller et al., 2005; Sánchez-Galán, 2009). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich durch eine BLT1 selektive pharmakologische Inhibition mit CP105696 (Aiello et al., 2002).

Erst kürzlich rückte hinsichtlich der Atherosklerose auch der BLT2 Rezeptor in den näheren Fokus des Interesses. Es wurde gezeigt, dass LTB_4 die Aktivität des NF- κ B-Weges durch Stimulation des BLT1 und BLT2 Rezeptors erhöht und proinflammatorische Prozesse in der Atherosklerose zunehmen (Sánchez-Galán, 2008). Dies spiegelt die ebenfalls bedeutungsvolle Rolle des BLT2 Rezeptors in Bezug auf die inflammatorischen Prozesse während der Atherosklerose wieder.

2.4 Fragestellung der Arbeit

Leukotriene sind an verschiedenen inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Atherogenese involviert und vermitteln ihre Wirkung durch die Aktivierung der BLT Rezeptoren. Da derzeit wenig bezüglich der Funktion des BLT2 Rezeptors erforscht ist, beschäftigt sich das Thema dieser Arbeit mit der Fragestellung, ob eine selektive Inhibition des BLT2 Rezeptors den Verlauf der Atherosklerose in ApoE^(-/-) Mäusen beeinflusst. Im Besonderen sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1) Beeinflusst eine selektive BLT2 Inhibition mit Ly255283 den Verlauf der Atherosklerose in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen?
- 2) Welchen Einfluss hat eine selektive BLT2 Inhibition auf den vaskulären oxidativen Stress in vivo?
- 3) Wird die Endothel abhängige und unabhängige Relaxation durch Inhibition von BLT2 beeinflusst?
- 4) Welchen Einfluss hat die BLT2 Blockade auf die Ausbildung von atherosklerotischen Plaques im aortalen Sinus von Mäusen?
- 5) Beeinflusst die BLT2 Inhibition die Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der atherosklerotischen Gefäßwand?
- 6) Welche Auswirkung hat die Inhibition von BLT2 auf die Expression von inflammatorischen Molekülen im vaskulären Gewebe von Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen?
- 7) Beeinflusst die Inhibition von BLT2 die Generierung von Sauerstoffspezies in den für die Atherogenese bedeutungsvollen Endothelzellen?
- 8) Ist die verminderte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die BLT2 Inhibition bedingt durch eine veränderte Expression von der NADPH Untereinheit Rac1?

2.5 Publikation der Arbeit

Wesentliche Anteile dieser Arbeit wurden im Juli 2012 in Mol Cell Biochem publiziert (Hoyer FF, Albrecht L, Nickenig G, Müller C. Selective inhibition of leukotriene receptor BLT-2 reduces vascular oxidative stress and improves endothelial function in ApoE^{-/-} mice. Mol Cell Biochem 2012; 359: 25-31).

3. Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Materialien

Chemikalien	Hersteller	Stadt	Land
Ly255283	Cayman Chemicals	Ann Arbor, Michigan	USA
DMSO (5 %)	AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
L-012	Wako Chemicals	Neuss	Deutschland
Ölrot-Färbung, Oil Red O	Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
Aquadest	Fresenius-Apotheke	Bonn	Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Hämatoxylin-Lösung (modifiziert nach Gill II, enthält Ethanol)	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Trisbase (TRIS Pufferan® ≥ 99,9 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
TNS	Promocell	Heidelberg	Deutschland
Fast Red, TR / Naphthol AS-MX Tablets, to prepare 1	Sigma-Aldrich	St. Louis	USA
Endothelial Cell Growth Medium MV (Supplement Mix C-39225)	Promocell	Heidelberg	Deutschland
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich	St. Louis	USA

Detaillierte Informationen über die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen (Hersteller und Produktionsort).

3.2 Tiere

Für die Studie wurden Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse (ApoE^{-/-} Mäuse) (C57BL/6, Charles River, Wilmington, Massachusetts, USA) verwendet. Bei den ApoE-defizienten Mäusen handelt es sich um ein international standardisiertes experimentelles Maus-Modell zur Untersuchung der Atherosklerose. Apolipoproteine sind Bestandteile von Lipoproteinen. Das Apolipoprotein-E (ApoE) spielt sowohl in Mäusen als auch im Menschen eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel, da es Triacylglycerine (TAGs) und Cholesterinester transportiert. Bei ApoE handelt es sich um das Strukturprotein von VLDL („very low density lipoprotein“), Chylomikronen und HDL („high density lipoprotein“). In der Leber spielt es als Ligand für die Endozytose eine entscheidende Rolle. ApoE-defiziente Mäuse haben daher erhöhte Triglyzerid- und Cholesterin-Werte im Blut. Die LDL-Konzentration ist erhöht und die HDL-Konzentration erniedrigt. Durch diese Störung des Fettstoffwechsels kommt es im Verlauf zu Atherosklerose (Ghiselli et al., 1981; Luley und Klör, 1993; Reape und Groot, 1999).

Die Mäuse wurden in einem 22°C warmen Raum stehenden Scantainer mit einem zwölf Stunden hell-dunkel Zyklus gehalten und erhielten Wasser ad libitum. Um atherosklerotische Bedingungen zu schaffen, wurde den Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen im Alter von zehn Wochen eine fettreiche und cholesterinhaltige Diät, bestehend aus 21 % Fett, 19,5 % Casein und 1,25 % Cholesterin (Ssniff, Soest Germany, Europe, Earth), verabreicht. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen unterteilt, jeweils bestehend aus neun Tieren (n = 9). Der einen Gruppe wurde jeden zweiten Tag 5 mg/kg Körpergewicht Ly255283, ein pharmakologischer BLT2 Inhibitor, intraperitoneal injiziert. Die andere Gruppe erhielt 5 % DMSO als Vehikel. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden mittels eines computerized tail-cuff systems (BP-2000, Visitech System) an den Mäusen, die zurzeit der Durchführung bei Bewusstsein waren, gemessen. Die Mäuse gewöhnten sich drei Tage lang an das vorgewärmte „tail-cuff device“. Anschließend wurden an drei darauffolgenden Tagen der systolischer Blutdruck und die Herzfrequenz mithilfe des Blutdruckmessgerätes (Kent Scientific Corporation, CODA 6) bestimmt, siehe Abbildung 3.



Abb. 3: Blutdruckmessgerät (Kent Scientific Corporation, CODA 6) zur Bestimmung des systolischen Blutdrucks und der Herzfrequenz bei Mäusen.

Mittels Gas-Ionen-Chromatografie wurde der Cholesterin-Spiegel im Plasma berechnet. Der Spiegel an Lipiden wurde anhand von chemischen Routine-Methoden analysiert. Nach acht Wochen Behandlung wurden die Mäuse getötet, das Blut vorsichtig mithilfe einer kleinen Kanüle, gefüllt mit 50 μ l Heparin, aus der Vena cava inferior entnommen und sofort bei 4°C asserviert. Anschließend wurde mit einer chirurgischen Schere der Thorax eröffnet, das Herz vorsichtig frei präpariert und das epikardiale Fettgewebe entfernt. Das Herz wurde herauspräpariert und in „tissuetec“ auf Trockeneis eingefroren. Danach erfolgte die Exzession der thorakalen und abdominalen Aorta. Die abdominale Aorta wurde eingefroren, während die thorakale Aorta in Krebs-HEPES-Puffer, genannt Tyrode, bestehend aus 118,0 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l CaCl_2 , 4,73 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l MgCl_2 , 1,2 mmol/l KH_2PO_4 , 25,0 mmol/l NaHCO_3 , 0,026 Na EDTA und 5,5 mmol/l D(+)Glukose, welcher auf einen pH-Wert von 7,4 titriert wurde, gelagert und in kleine Segmente geschnitten wurde. Dies diente sowohl der Vorbereitung für die späteren Organbad-Experimente als auch der Bestimmung des oxidativ vaskulären Stres-

ses. Alle Experimente wurden sowohl unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes als auch im Einklang mit den Leitlinien des Instituts durchgeführt.

3.3 Messung der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies wurden anhand der Luminol L-012 basierten Chemilumineszenz-Methode bestimmt, da der Farbstoff L-012 eine hohe Spezifität und Sensitivität für das Superoxid anion besitzt. Anhand der Lichtemission lässt sich die Konzentration dieser reaktiven Sauerstoffderivate ermitteln (Yamazaki et al., 2011).

Die zu untersuchenden, in modifiziertem Krebs-HEPES-Puffer aufbewahrten, aortalen Segmente wurden vom umgebenden Fettgewebe befreit. Danach wurden die 2 mm großen aortalen Segmente in eine Szintillationsküvette gegeben, welche in einem Verhältnis von 10:1 100 µM Krebs-HEPES-Puffer und eine Lösung, bestehend aus 100 mM L-012 in DMSO, die 1:100 mit PBS verdünnt wurde, enthielt. Anschließend erfolgte nach fünfminütiger Inkubation das Einsetzen der Küvette in ein Luminometer (Lumat 9501, Berthold) und die Bestimmung der Chemilumineszenz anhand der Detektion emittierter Photonen bei einer Wellenlänge von 550 nm über zehn Minuten in einminütigen Intervallen. Für die anschließende Analyse wurde der Chemilumineszenz-Wert nach fünf Minuten verwendet. Nach Bestimmung der Chemilumineszenz wurden die aortalen Segmente getrocknet und gewogen und damit die Chemilumineszenz auf das aortale Gewicht bezogen. Die Superoxid-Freisetzung aus den aortalen Gefäßen wird als relative lumineszierende Einheit pro Mikrogramm aortalem Gewebe und Minute dargestellt.

3.4 Erfassung der endothelialen Funktion

Zur Bestimmung der endothelialen Funktion wurden Organbad-Experimente durchgeführt. Die Organbad-Apparatur besteht aus 2 x 4 Organbädern, in denen sich die zu untersuchenden Aortenringe befanden, einem Kraftumwandler, der die entstehenden isometrischen Gewebereaktionen in elektrische Signale umwandelt, und einem Computer, der die Ergebnisse empfängt und grafisch auswertet.



Abb. 4: Organbad-Apparatur (IOA-5301 Isolierte Organ Apparatur, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland) zur Bestimmung der endothelialen Funktion.

Durch externe Stimuli wurden reaktive isometrische Spannungsänderungen der Aortenringe erzeugt und gemessen. Dieses Experiment, mit dem die Funktion des Endothels analysiert werden kann, stellt eine der wichtigsten Untersuchungen in Bezug auf die vaskuläre Funktion dar. Nachdem die Mäuse narkotisiert worden waren, wurden mithilfe von Schere und Pinzette Thorax und Abdomen eröffnet, danach Herz und Aorta vom umliegenden Fettgewebe freipräpariert. Anschließend wurde die Aorta in Ringsegmente geschnitten und in einen physiologischen Krebs-HEPES-Puffer gelegt. Die 3 mm großen, in Krebs-HEPES-Puffer gelagerten, aortalen Segmente wurden vorsichtig auf einen kleinen steigbügelartigen Haken aus feinem Draht ohne Beschädigung des Endo-

thels aufgezogen und in das Organbad (IOA-5301 Isolierte Organ Apparatur, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland) gesetzt. Im Organbad befand sich ebenfalls der bereits beschriebene Krebs-HEPES-Puffer. Die Temperatur betrug 37°C. Durchlüftet wurde kontinuierlich mit 95 % O₂ und 5 % CO₂. Die isometrische Spannung wurde ermittelt. Es folgte die Begasung mit Carbogen. Die aortalen Segmente wurden anschließend über 90 Minuten progredient in kleinen Schritten bis zum Erreichen einer Vorspannung von 10 mN gedehnt. Die hierbei erzeugte Spannung wurde mithilfe eines Kraftumwandlers gemessen und grafisch auf einem Computer dargestellt. Durch die erreichte Vorspannung konnte entsprechend des Frank-Starling-Mechanismus eine maximale Gefäßkontraktion und -vasodilatation bei späterer Stimulation erreicht werden. Nun konnten durch die Applikation von vasoaktiven Substanzen standardisierte Werte über den Spannungszustand des Gefäßes erhoben werden. Nachdem die aortalen Segmente vorgespannt waren, erfolgten zunächst die Gaben von 20 und 40 mmol/l Kaliumchlorid (KCl), welches anschließend wieder ausgewaschen wurde. KCl ruft über eine Depolarisation der Zellmembran die direkte Aktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle und somit einen Calciumeinstrom in die Zelle hervor. Durch hineinströmende Ionen aus dem Extrazellularraum und aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (sR) kommt es zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytosol. Die Ca²⁺-Ionen binden an das Protein Calmodulin und bilden sogenannte Ca²⁺-Calmodulin-Komplexe, die die „myosin light chain kinase“ (MLCK) aktivieren. Das aktivierte MLCK spaltet ATP und phosphoryliert die leichte Kette des Myosins. Dadurch wird der Querbrückenzyklus, der den Ablauf der Muskelkontraktion darstellt, ausgelöst. Es kommt zu einer Verkürzung des Muskels. Nach erneuter Äquilibration der Gefäßspannung wurde mit der Applikation von Phenylephrin mit den Dosierungen von 1 nmol/l bis 10 µmol/l begonnen. Hierdurch wurde eine suffiziente Gefäßspannung mit einer Kontraktionszunahme bis zu ungefähr 20 mN bewirkt. Hierbei erfolgte die Gabe der jeweils nächst höheren Dosierung, sobald die Vasokonstriktion beendet war. Zur Bestimmung der Endothel abhängigen Vaso-relaxation wurde nun Carbachol in verschiedenen Dosierungen von 10 nmol/l bis 100 µmol/l appliziert. Hier erfolgte ebenfalls die Gabe der nächst höheren Dosierung, sobald die Vasokonstriktion vollzogen war. Bei Carbachol handelt es sich um ein chemisch stabileres Struktur analogon von Acetylcholin und gehört somit zu den Parasympatho-

mimetika. Die Inaktivierung durch die Cholinesterase läuft jedoch wesentlich langsamer ab. Carbachol bindet an den Muskarinrezeptor M_3 und aktiviert damit das G-Protein, das daraufhin die Phospholipase C stimuliert. Die Phospholipase C spaltet das Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP₂) in das Diacylglycerin (DAG) und in das Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ bindet im Zytosol an den spezifischen IP₃-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum (eR). Diese Bindung bewirkt eine Calcium-Freisetzung aus dem eR. Die Calcium-Konzentration im Zytoplasma steigt. Calcium bindet an Calmodulin und induziert damit wie oben beschrieben den Vorgang der glatten Muskelkontraktion. Nach Abschluss des ersten Relaxationsvorganges wurden die Substanzen erneut ausgewaschen und eine erneute vasokonstringierende Stimulation mit Phenylephrin in einer Dosierung von 10 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. In einer Kontrollgruppe wurde unter Applikation von Nitroglycerin in den Dosierungen von 1 nmol/l Äquilibration auf 10 $\mu\text{mol/l}$ die Endothel unabhängigen Vasorelaxation bestimmt. Nitroglycerin wird in Stickstoffoxid umgewandelt und induziert hierdurch eine direkte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen.

3.5 Beurteilung der atherosklerotischen Plaque Formation

Die Mäuse-Herzen wurden operativ entfernt und direkt in Tissue Freezing Medium eingebettet (OCT embedding mediums, Miles), schock-gefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden 9 μm große histologische Schnitte aus dem aortalen Sinus mithilfe eines Leica Kryostat bei -20°C angefertigt. Zunächst wurden diese Schnitte mit 3,7 % Formaldehyd über eine Stunde fixiert. Danach wurden sie für zehn Minuten mit fließendem destilliertem Wasser behandelt, mit 60 % Isopropanol abgespült und in die 0,5 % Ölrot-Arbeitslösung für 15 Minuten platziert. Die Schnitte wurden erneut mit 60 % Isopropanol und anschließend mit Aquadest behandelt. Danach wurden sie mit Hämatoxylin für 20 Sekunden gegengefärbt, erneut mit destilliertem Wasser gespült, daraufhin 10 bis 15 Minuten in lauwarmes Leitungswasser gestellt, um im letzten Schritt mit Deckgläsern (Mikroskop 24 x 60 mm, Labomedic, Bonn, Deutschland) und Aquatex versehen

zu werden. Zur Quantifizierung der Atherosklerose in den Gefäßen wurden die Herz-schnitte unter einem Mikroskop (Zeiss Mikroskop, Apo Tome) analysiert. Als Software diente für die makroskopische Analyse „Axiovision“. Die atherosklerotische Plaque-Last wird dargestellt als Plaquefläche bezogen auf die Gesamtfläche der Gefäßwand in Prozent.



Abb. 5: Leica Kryostat zur Herstellung von histologischen Schnitten aus dem aortalen Sinus.

3.6 Beurteilung der Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand

Mit dem Leica Kryostat wurden die Schnitte wie oben beschrieben hergestellt. Um die Akkumulation der Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand zu analysieren, wurde die Moma-2-Färbung (Abcam, Cambridge, UK) durchgeführt. Die Schnitte wurden zuerst in Aceton 45 Minuten lang bei -20°C fixiert und dann mit NGS (normal goat serum; normales Ziegen-Serum) für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurden sie für eine Stunde mit dem Moma-2-Antikörper inkubiert und dann mit 0,1 mol Tris bei einem pH-Wert von 6,8 gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde für eine Stunde hinzuge-

fügt. Es folgte eine einminütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Schnitte wurden mit lauwarmem Wasser 15 Minuten lang gewaschen, bevor sie mit Deckgläsern abgedeckt wurden. Die vaskuläre Infiltration der Monozyten wurde mithilfe des oben genannten Mikroskops analysiert und mit der Software „Axiovision“ ausgewertet. Die Infiltration der inflammatorischen Zellen wird als Moma-2 positive Gebiete pro gesamte Fläche der Gefäßwand in Prozent dargestellt.

3.7 Real-time PCR

Die Real-time Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine etablierte Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wie DNA, mRNA oder miRNA und zur Analyse von Gensequenzen. Die Quantifizierung erfolgt anhand von Fluoreszenz-Messwerten, die während einer Polymerase-Kettenreaktion erhoben werden. Je mehr PCR-Produkte vorhanden sind, desto höher die Fluoreszenz. Die Quantifizierung erfolgt an erhaltenen Fluoreszenzsignalen in der exponentiellen Phase mithilfe von SYBR Green I. Dieser Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA. Durch die Interkalation kommt es zum Anstieg der Fluoreszenz dieses Farbstoffes. Daher stehen die Zunahme der Target-DNA und Fluoreszenz in direktem Verhältnis zueinander. Die Messung erfolgt in jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase (Dorak, 2006). In diesem Experiment wurde die Real-Time PCR durchgeführt, um die aortale Genexpression von inflammatorischen Molekülen wie TNF- α , Interleukin-6 und MCP-1 zu bestimmen. Außerdem wurde die Rac1 Expression gemessen. Als Untereinheit der NADPH Oxidase spielt Rac1 wie oben beschrieben bei der Generierung vaskulärer oxidativer Sauerstoffradikale eine essentielle Rolle. Aortale Segmente der ApoE^(-/-) Mäuse, entweder mit Ly oder mit dem Vehikel 5 % DMSO vorbehandelt, wurden vorsichtig entfernt und mit einem motorisierten Homogenisator (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) zerkleinert. Anschließend wurde die RNA mit 1 mL peqGOLD RNA-Pure (peqLAB Biotechnology, Erlangen, Germany) isoliert. Danach wurden 200 μ L Chloroform pro mL RNA-Pure dazugegeben, die Probe wurde 15 Sekunden kräftig geschüttelt, dann zehn Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert und abschließend wieder für zehn Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 4°C geschüttelt. Die nun wässrige obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Anschließend wurden ca. 900 µL Isopropanol (1:1) dazugegeben, 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen und dann für 20 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 4°C geschüttelt. Nun wurde vorsichtig der vollständige Isopropanol-Überstand abpipettiert. Die übrig gebliebenen Pellets wurden mit 75 % EtOH (in RNase freiem H₂O) auf dem Vortex durchmischt und anschließend für zehn Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 4°C geschüttelt. Dieser Waschschrift wurde, nachdem das EtOH vorsichtig und vollständig abpipettiert worden war, wiederholt. Nachdem das EtOH wieder vollständig entfernt worden war, wurde das Pellet an der Luft 20 bis 30 Minuten lang getrocknet. Nun wurden die Pellets je nach Größe in 20 bis 40 µL RNase freiem H₂O gelöst. Um eine bessere Lösbarkeit zu erzielen, wurde die Lösung fünf Minuten lang bei 55 bis 60°C erhitzt. Mit einem Spectrometer (Nano Drop 2000c, peqLab, Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland) wurde die Konzentration und Qualität der RNA gemessen. Als nächstes wurde 1 µg von der RNA mit einem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) revers transkribiert. Der SYBR[®] Green PCR Master Mix für 50 ng bis 2 µg RNA wurde aus folgenden Komponenten hergestellt: 2 µL 10x Buffer, 2 µL dNTP-Mix (5 mM pro dNTP), 2 µL 10x Random-Primer, 1 µL RNase Inhibitor (RNasin, Promega), 1 µL Reverse Transkriptase, RNase freies H₂O und Template RNA. Das Endvolumen betrug 20 µL. Die Einzelstrang cDNA wurde mithilfe der Real-time quantitativen reversen Real Time-PCR mit dem TagMan System (ABI-7500 Fast Real-time PCR System, Carlsbad, California, USA) amplifiziert. Der Interleukin-6-Primer hatte folgende Sequenz, vorwärts: 5'-ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T-3' und rückwärts: 5'-CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC-3', der TNF-α-Primer vorwärts: 5'-GAC CCT CAC ACT CAG ATC ATC TTCT-3' und rückwärts: 5'-CCA CTT GGT GGT TTG CTA CGA-3', der MCP-1-Primer vorwärts: 5'-TCA GCC AGA TGC AGT TAA CGC-3' und rückwärts 5'-TGA TCC TCT TGT AGC TCT CCA GC-3' und der Rac1-Primer vorwärts: 5'-CAG TGA ATC TGG GCC TAT GGG-3' und rückwärts: 5'-ATG GCC AGC CCC TGC GGG TAG-3'. Zur Quantifizierung wurden die Konzentrationen der mRNA auf den endogenen 18s rRNA-Spiegel normalisiert.

3.8 Zellkultur

Humane umbilikale venöse Endothelzellen, sogenannte HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), wurden auf 6 cm großen Petrischalen in speziellem Medium für Endothelzellen (PromoCell, Heidelberg, Germany) bei 37°C und einer 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die Experimente wurden mit Zellen der Passage fünf bis acht durchgeführt, da eine Konfluenz von 70 bis 80 % vorlag. Um die intrazellulären freien Sauerstoffradikale in den Endothelzellen zu bestimmen, wurde erneut das L-012 Chemilumineszenzverfahren angewandt. Angiotensin II diente in der Dosierung 1×10^{-6} mol als Stimulus für die reaktive Sauerstoffspezies Abgabe in den Endothelzellen. Angiotensin II generiert oxidativen Stress unter Aktivierung der NADPH Oxidase (Griendling et al., 1994; Li et al., 2003). Um den Einfluss der selektiven BLT2 Inhibition auf die zelluläre Generierung freier Sauerstoffradikale zu erfassen, wurden die Zellen vor der vierstündigen Angiotensin II - Stimulation mit dem BLT2 selektiven Inhibitor Ly255283 für eine Stunde mit 10 µmol vorbehandelt. Die endothelialen Zellen wurden konsekutiv lysiert und subsequently gewaschen. Anschließend wurde die L-012 Untersuchung wie oben beschrieben durchgeführt.

3.9 Statistische Analyse

Die erhobenen Daten werden im anschließenden Ergebnisteil als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse wurde mit einem „unpaired student's t-test“ durchgeführt, sofern nur zwei Gruppen analysiert wurden. Bei Experimenten mit mehr als zwei Gruppen wurde Signifikanz mittels einer ANOVA Analyse gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test ermittelt. Bei einem P-Wert < 0.05 wurde statistische Signifikanz angenommen. Für die Analyse wurde die Graph Pad Prism Software verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Cholesterin und Blutdruck

Die Mäuse erhielten acht Wochen lang eine fett- und cholesterinreiche Ernährung, die 1,25 % Cholesterin enthielt. Anschließend wurden in den mit Ly vorbehandelten Mäusen und in der Kontrolltiergruppe der Serum-Cholesterin-Spiegel ($1884 \text{ mg/dl} \pm 256 \text{ mg/dl}$ vs. $1880 \text{ mg/dl} \pm 301 \text{ mg/dl}$), der Blutdruck ($122 \text{ mmHg} \pm 3 \text{ mmHg}$ vs. $116 \text{ mmHg} \pm 3 \text{ mmHg}$) und die Herzfrequenz ($751 \text{ min}^{-1} \pm 14 \text{ min}^{-1}$ vs. $799 \text{ min}^{-1} \pm 26 \text{ min}^{-1}$) gemessen. Die angegebenen Messwerte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt, siehe Tabelle 2. Die Vergleichsparameter zeigten sowohl bezüglich des Serum-Cholesterin-Spiegels als auch bezüglich des systolischen Blutdrucks keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Für die statistische Analyse wurde der „unpaired student’s t-test“ verwendet.

Tabelle 2: Übersicht der Messwerte

	ApoE^(-/) + Ly	ApoE^(-/) + Vehikel
Cholesterin (mg/dl)	1884 ± 256	1880 ± 301
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122 ± 3	116 ± 3
Herzfrequenz (bpm)	751 ± 14	799 ± 26

Die Übersicht stellt die mit Ly vorbehandelten ApoE^(-/) Mäuse den Kontrolltieren, die das Vehikel erhielten, bezüglich Serum-Cholesterin-Spiegel, Systolischem Blutdruck und Herzfrequenz, als Mittelwert \pm Standardfehler gegenüber. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

4.2 Vaskuläre Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies wurden mithilfe der L-012 Chemilumineszenz-Methode an intakten aortalen Segmenten der Mäuse nach einer acht Wochen langen fett- und cholesterinreichen Ernährung bestimmt. Die Superoxid-Freisetzung ist als die relative Lumineszenz-Einheit pro Mikrogramm aortalem Gewebe und Minute definiert. Jede Gruppe bestand insgesamt aus neun Tieren ($n = 9$). Die vaskuläre Superoxid-Abgabe war signifikant in den mit dem selektiven BLT2 Inhibitor Ly behandelten Mäusen vermindert im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die das Vehikel erhielt: 68 ± 15 vs. 131 ± 20 RLE (Relative Lumineszierende Einheit), $P < 0,05$. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des „unpaired student’s t-test“ geprüft. Die Werte sind in Abbildung 6 dargestellt.

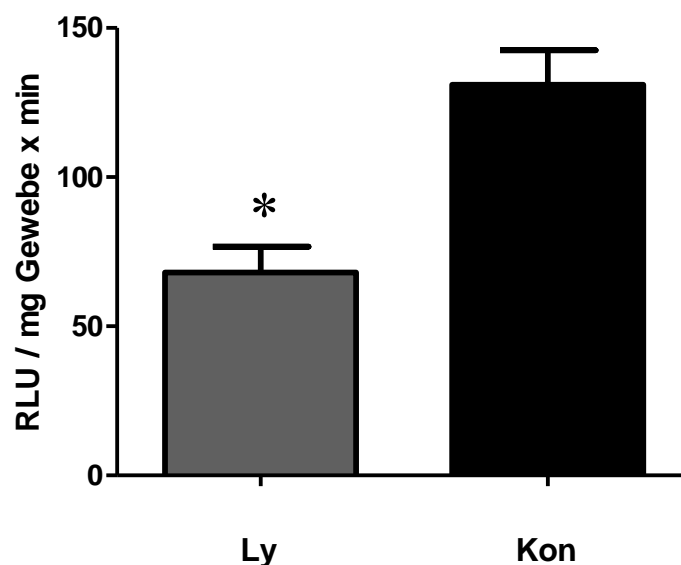


Abb. 6: vaskuläre Superoxid-Abgabe

Die vaskuläre Superoxid-Abgabe wurde mittels L-012 Chemilumineszenz-Methode ermittelt und wird angegeben als Relative lumineszierende Einheit (RLU) pro Mikrogramm aortalem Gewebe und Minute. Die Grafik zeigt eine signifikante Verminderung der vaskulären Superoxid-Abgabe in den mit dem selektiven BLT2 Inhibitor Ly behandelten Mäusen im Vergleich zu der Kontrollgruppe, $P < 0,05$ für Ly vs. Kon.

4.3 Endotheliale Funktion

Nach acht Wochen fett- und cholesterinreicher Ernährung wurden aortale Segmente freipräpariert und die Funktion des Gefäßes mithilfe eines Organbad-Experimentes bestimmt. Nach der Stimulation mit Carbachol war die Endothel abhängige Vasorelaxation signifikant in den Mäusen verbessert, die Ly erhielten ($P < 0,05$), im Gegensatz zu den Kontrolltieren. In den mit dem BLT2 Rezeptor Antagonisten behandelten Mäusen war somit die Endothel abhängige Relaxation verbessert. Die mit Nitroglycerin stimulierte Endothel unabhängige Vasorelaxation zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die mit Carbachol induzierte Endothel abhängige Vasorelaxation und die mit Nitroglycerin ausgelöste Endothel unabhängige Vasorelaxation sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Mittelwerte und ihre mittleren Standardabweichungen bezüglich der Relaxation werden in Prozent der maximalen Phenylephrin induzierten Vasokonstriktion wiedergegeben. Jede Gruppe bestand aus neun Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen ($n = 9$). Für die Analyse wurde der „unpaired student's t-test“ eingesetzt.

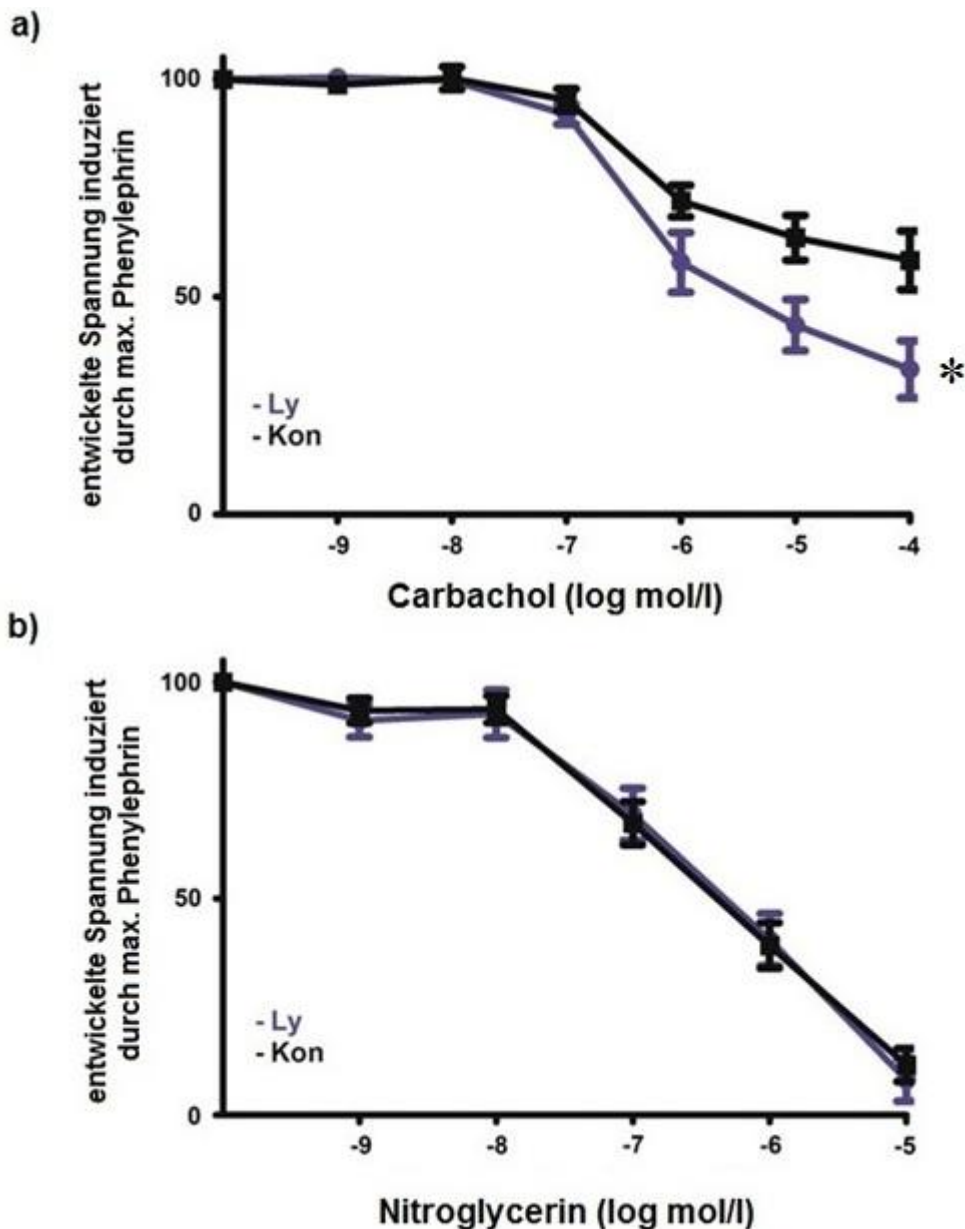


Abb. 7: Endothel abhängige und unabhängige Vasorelaxation

a) Die Grafik zeigt die durch Carbachol stimulierte Endothel abhängige Vasorelaxation anhand der Spannung, die durch maximale Gabe von Phenylephrin induziert wurde. Die mit Ly behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine signifikante Verbesserung, $P < 0,05$ für Ly vs. Kon.

b) Die Grafik zeigt die durch Nitroglycerin stimulierte Endothel unabhängige Vasorelaxation anhand der Spannung, die durch maximale Gabe von Phenylephrin induziert wurde. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen festgestellt werden.

4.4 Atherosklerotische Plaque Formation

Das Ausmaß der Atherosklerose wurde in den Sinus aortae der ApoE^(-/-) Mäuse, die eine bereits achtwöchige fett- und cholesterinreiche Ernährung erhalten hatten, anhand der Ölrot-Färbung quantifiziert. Beide Gruppen, sowohl die mit Ly vorbehandelten Mäuse als auch die Kontrollgruppe, bestanden jeweils aus neun Mäusen (n = 9). Die Ölrot-Färbung zeigte, dass die selektive Inhibition des BLT2 Rezeptors das Ausmaß der atherosklerotischen Plaques nicht beeinflusst. Die Plaque Ausbildung in den mit Ly behandelten Mäusen betrug 36 ± 3 % im Vergleich zu 38 ± 3 % in der Kontrollgruppe, $P > 0,05$. Repräsentative Schnitte werden in Abbildung 8 gezeigt. Außerdem wurde die Plaque-Last in der Aorta ascendens untersucht. Es konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nach achtwöchiger fett- und cholesterinreicher Ernährung nachgewiesen werden. Der „unpaired student's t-test“ wurde für die statistische Analyse verwendet.

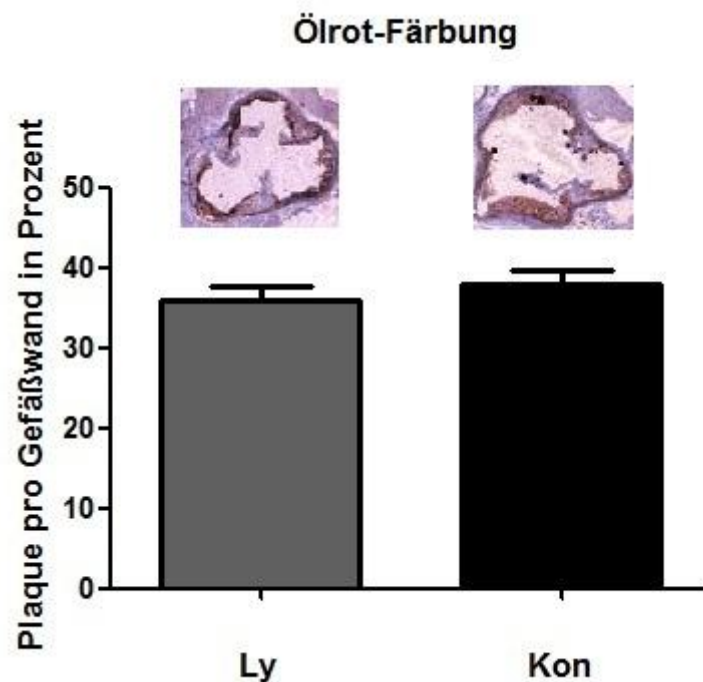


Abb. 8: Plaque Ausbildung

Die Grafik zeigt, dass die Ölrot-Färbung keinen Unterschied bezüglich der Plaquegröße zwischen den mit Ly vorbehandelten Mäusen und den Mäusen der Kontrollgruppe aufweist.

4.5 Vaskuläre Infiltration von Monozyten

Monozyten infiltrieren die Gefäßwand im Rahmen inflammatorischer Prozesse während der Atherogenese. Unter Verwendung der Moma-2-Färbung wurde die Akkumulation der Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand beurteilt. Die Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die atheroklerotischen Plaques zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($31 \pm 3\%$ vs. $34 \pm 2\%$, $P < 0,05$). Repräsentative Schnitte sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Analyse wurde mithilfe des „unpaired student's t-test“ durchgeführt.

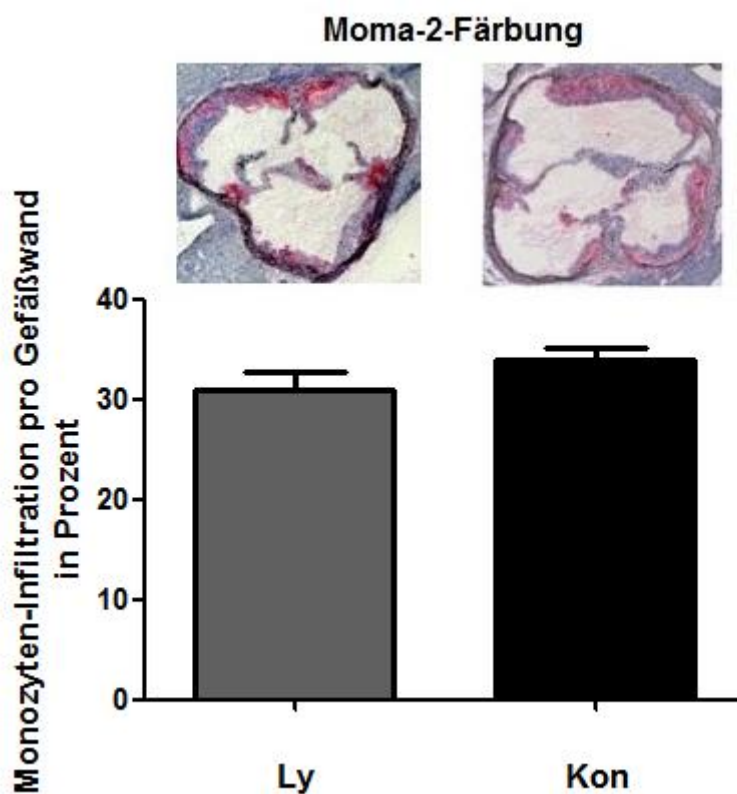


Abb. 9: vaskuläre Monozyten-Infiltration

Die Grafik zeigt, dass sich im Rahmen der Atherogenese die Monozyten-Infiltration pro Gefäßwand in den mit Ly vorbehandelten Mäusen nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet. Die mit der Moma-2-Färbung hergestellten Bilder zeigen ebenfalls keine Unterschiede.

4.6 Vaskuläre Entzündungsmoleküle und Rac1 Expression

Um den Einfluss der selektiven BLT2 Inhibition auf die Expression inflammatorischer Moleküle und auf die an der Generierung von freien Sauerstoffradikalen beteiligten Proteine zu bestimmen, wurden Real-Time PCR Experimente durchgeführt. Die Versuche wurden an abdominal aortalem Gewebe Apolipoprotein-E-defizienter Mäuse nach achtwöchiger fett- und cholesterinreicher Ernährung durchgeführt. Jede Gruppe bestand aus vier bzw. fünf Mäusen ($n = 4-5$). In den mit dem selektiven BLT2 Inhibitor Ly behandelten Mäusen ließ sich lediglich eine 0,24-fache Expression von Interleukin-6 auf Ebene der mRNA nachweisen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit 1,00, $P > 0,05$, siehe Abbildung 10a. Im vergleichbaren Ausmaß zeigte sich ebenfalls eine verringerte Expression von TNF- α in den mit Ly behandelten ApoE^(-/-) Tieren, verglichen mit der Kontrollgruppe (0,27 vs. 1,00), $P > 0,05$, siehe Abbildung 10b. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bezüglich der MCP-1 Expression. Auch hier verringerte die selektive BLT2 Inhibition die Expression dieses proinflammatorischen Moleküls (0,05 vs. 1,00), $P > 0,05$, siehe Abbildung 10c. In den in vivo durchgeführten Versuchen zeigte sich eine signifikante Reduktion des vaskulären oxidativen Stresses nach selektiver BLT2 Inhibition. Um die molekularen Grundlagen näher zu charakterisieren, wurde die Expression der Rho-GTPase Rac1 in aortalem Gewebe untersucht. Rac1 stellt eine Untereinheit der NADPH Oxidase dar und ist essentiell an der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt (Li und Shah, 2003). Interessanterweise wurde eine verminderte Expression von Rac1 in aortalem Gewebe von mit Ly behandelten Tiere verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt (0,24 vs. 1,00), $P = 0,07$, siehe Abbildung 10d. Auch hier erreicht die Inhibition keinen signifikanten Effekt.

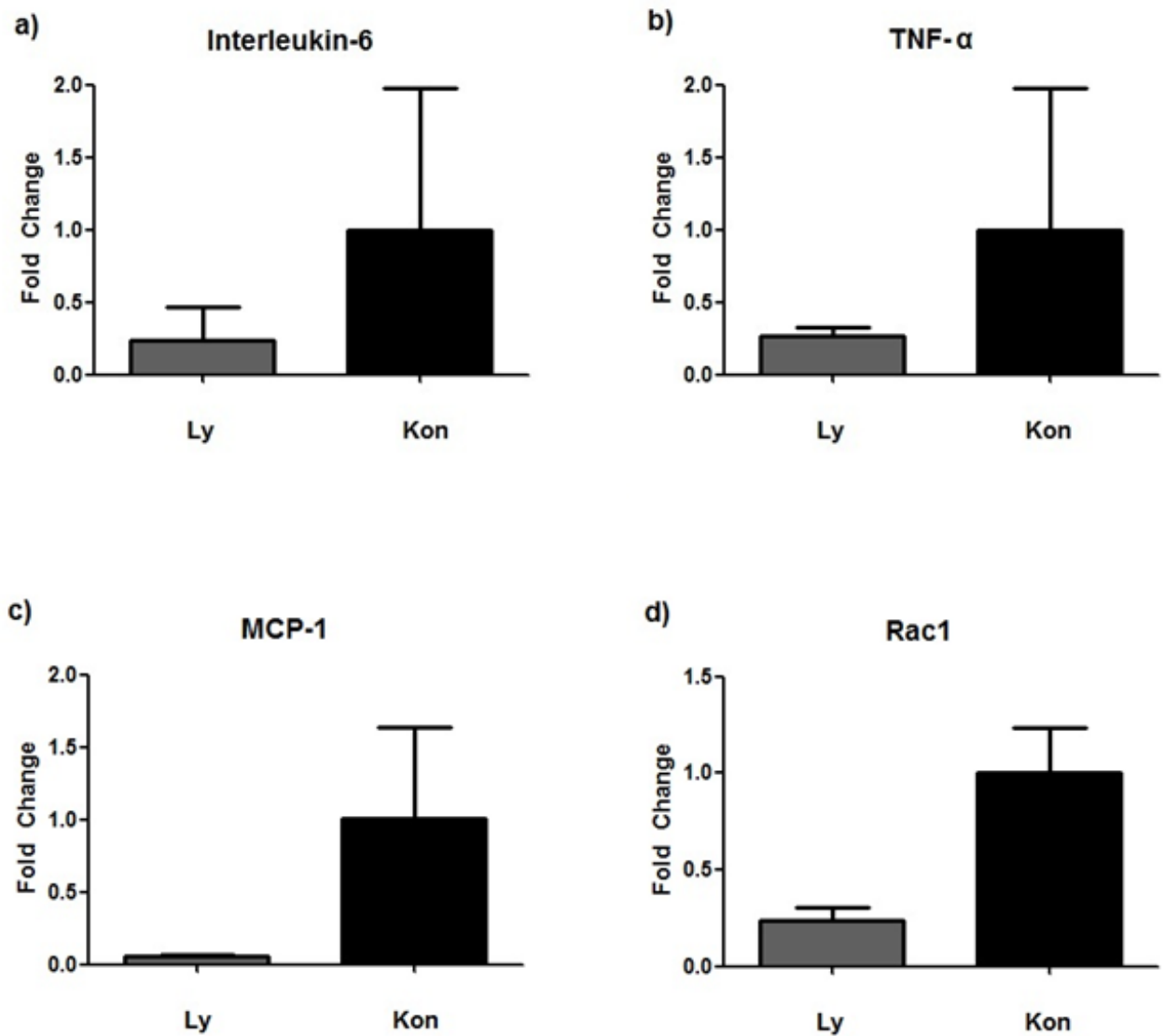


Abb. 10: Real-Time PCR

Die Grafiken zeigen, dass eine selektive BLT2 Inhibition (Ly) die Expression von Interleukin-6 (a), TNF- α (b), MCP-1 (c) und Rac1 (d) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Kon) verringert. Ein signifikanter Effekt wurde durch die Inhibition nicht erreicht.

4.7 Zellkultur

Die selektive BLT2 Inhibition führte in vivo zu einer signifikanten Verminderung von reaktiven Sauerstoffspezies. Um die zellulären Grundlagen näher zu analysieren, wurden Experimente mit humanen Endothelzellen (HUVECs) ausgeführt (n = 4). Es wurde mit Angiotensin II stimuliert, um beurteilen zu können, ob eine BLT2 Inhibition die Bildung von ROS in einem NADPH Oxidase abhängigen Mechanismus in Endothelzellen (HUVEC) beeinflusst. Zwischen der Stimulation mit dem Vehikel und dem BLT2 Inhibitor Ly wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die Stimulation mit Angiotensin II zeigte jedoch eine signifikant erhöhte Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen verglichen mit den Ly und Vehikel behandelten humanen Endothelzellen (281 ± 61 vs. 100, $P < 0,05$), siehe Abbildung 11. Bei Vorbehandlung mit dem selektiven BLT2 Inhibitor Ly und der anschließenden Aktivierung mit Angiotensin II war die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies deutlich reduziert (151 ± 52) im Vergleich zu der nur mit Angiotensin II behandelten Zellkultur. Dies weist auf einen NADPH Oxidase abhängigen Effekt hin. RLE ist die relative lumineszierende Einheit und wird in Prozent angegeben. Signifikanz wurde mittels einer ANOVA Analyse gefolgt von einem Tukey Post-hoc-Test ermittelt.

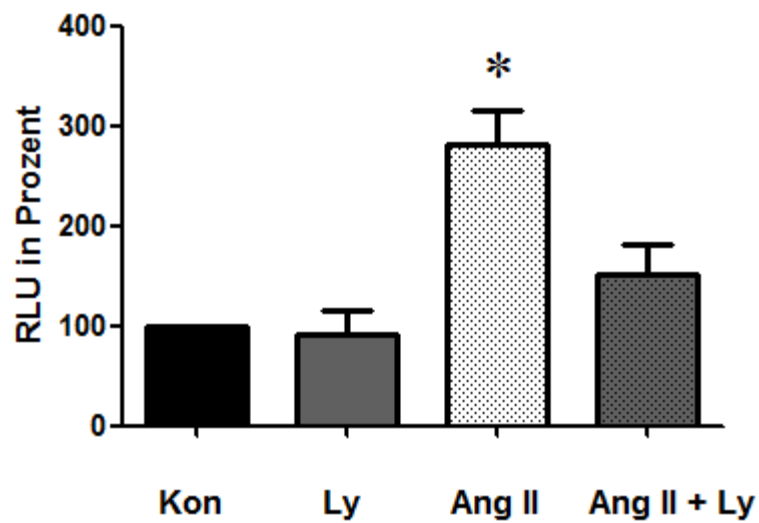


Abb. 11: Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen in Zellkulturen

Die Grafik zeigt, dass eine Stimulation in humanen Endothelzellen (HUVECs) mit Angiotensin II zu einer signifikant höheren Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen führt als eine Aktivierung mit dem BLT2 Inhibitor Ly oder Vehikel, $P < 0,05$ für Ly und Kon vs. Ang II. Mit Ly vorbehandelte Zellkulturen mit anschließender Angiotensin II Stimulation zeigten jedoch im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellkulturen mit der alleinigen Angiotensin II Stimulation eine deutliche Reduktion der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.

5. Diskussion

In dieser Studie wurden die bereits in der Einleitung aufgezählten Fragestellungen bezüglich des Einflusses der selektiven Inhibition des Leukotrien Rezeptors BLT2 auf den Verlauf der Atherosklerose in den näheren Fokus genommen:

- 1) Beeinflusst eine selektive BLT2 Inhibition mit Ly255283 den Verlauf der Atherosklerose in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen?
- 2) Welchen Einfluss hat eine selektive BLT2 Inhibition auf den vaskulären oxidativen Stress in vivo?
- 3) Wird die Endothel abhängige und unabhängige Relaxation durch Inhibition von BLT2 beeinflusst?
- 4) Welchen Einfluss hat die BLT2 Inhibition auf die Ausbildung von atherosklerotischen Plaques im aortalen Sinus von Mäusen?
- 5) Beeinflusst die BLT2 Inhibition die Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der atherosklerotischen Gefäßwand?
- 6) Welche Auswirkung hat die Inhibition von BLT2 auf die Expression von inflammatorischen Molekülen im vaskulären Gewebe von Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen?
- 7) Beeinflusst die Inhibition von BLT2 die Generierung von Sauerstoffspezies in den für die Atherogenese bedeutungsvollen Endothelzellen?
- 8) Ist die verminderte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die BLT2 Inhibition bedingt durch eine veränderte Expression von der NADPH Untereinheit Rac1?

Diese Fragestellungen und Themen wurden wissenschaftlich bearbeitet, dabei ergaben sich folgende Resultate: Nach achtwöchiger Gabe fett- und cholesterinreicher Diät zeigten die mit dem selektiven BLT2 Inhibitor Ly255283 behandelten Apolipoprotein-E-defizienten Mäuse eine verminderte Abgabe vaskulärer reaktiver Sauerstoffspezies verglichen mit der Kontrollgruppe, denen das Vehikel 5 % DMSO verabreicht wurde. Bezüglich der endothelialen Funktion konnte eine Verbesserung der mit Carbachol stimu-

lierten Endothel abhängigen Vasorelaxation in den mit Ly vorbehandelten Mäusen verzeichnet werden. Die Endothel unabhängige Vasorelaxation zeigte hingegen sowohl bei den mit Ly vorbehandelten Mäusen als auch bei den Kontrolltieren keinen Unterschied. Die selektive BLT2 Inhibition verringerte die Expression vaskulärer Entzündungsmoleküle wie IL-6, TNF- α und MCP-1 und der Rho-GTPase Rac1, allerdings nicht signifikant im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ebenfalls konnten keine bedeutenden Unterschiede bezüglich des systolischen Blutdruckes, Serum-Cholesterin-Spiegels, der Herzfrequenz, der Größe vaskulärer atherosklerotischer Plaques und der Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in den Plaques der Gefäßwand nachgewiesen werden. Um die zellulären Grundlagen näher zu analysieren, wurden Experimente mit humanen Endothelzellen (HUVECs) ausgeführt. Eine Stimulation der Zellkulturen mit Angiotensin II zeigte eine signifikant höhere Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen im Vergleich zu den mit Ly oder dem Vehikel behandelten Kulturen. Bei den mit Ly vorbehandelten Zellkulturen führte eine anschließende Stimulation mit Angiotensin II zu einer deutlichen Reduktion der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellkulturen.

Während die Rolle des BLT1 Rezeptors in der Atherogenese erforscht wurde, mangelt es bis jetzt an näheren und ausführlichen Aussagen bezüglich der Auswirkungen des BLT2 Rezeptors. Aus diesem Grund fügt diese Studie den neuen Aspekt hinzu, dass die Inhibition von BLT2 die Abgabe vaskulärer reaktiver Sauerstoffradikale durch den Einfluss der NADPH Oxidase und ihre Untereinheit Rac1 senkt. Die durch Angiotensin II aktivierbare NADPH Oxidase spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von ROS in Fibroblasten, Phagozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und damit auch bei der Entstehung der Atherosklerose (Busse, 2005; Choi et al., 2008; Pongnimitprasert, 2009). Da reaktive Sauerstoffspezies vasoaktives Stickstoffmonoxid zu Nitrit und Nitrat, welches ca. 1000 mal weniger vasoaktiv ist als NO, umwandelt, könnte die Verbesserung der Endothel abhängigen Vasorelaxation durch eine reduzierte Abgabe von ROS bedingt sein (von Bruchhausen et al., 1993). Bezüglich der Ausbildung atherosklerotischer Plaques wurde keine Reduktion in den untersuchten Mäusen vermerkt. Dies ist in Anbetracht der beträchtlichen Abnahme der ROS-Freisetzung verwunderlich und nicht schlüssig. Wieso hat die Reduktion der genannten Werte keinen Effekt auf die

Atherosklerose? Eine der zum Thema wichtigsten Publikationen berichtet, dass die Proteine des 5-Lipoxygenase-Signalweges und die Rezeptoren BLT1 und BLT2 in an Atherosklerose erkrankten Patienten vermehrt exprimiert werden. Dies lässt auf multifaktorielle Parameter schließen sowie auf andere relevante Faktoren, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden. Möglicherweise war die Tieranzahl zu gering oder die Tiere wurden nicht lange genug gefüttert, um auch diese Parameter wirksam zu beeinflussen. Verschiedene Studien berichten von einem Abfall der Größe atherosklerotischer Plaques in ApoE^(-/-) BLT1^(-/-) Mäusen, die eine fünf- bis sechswöchige fett- und cholesterinreiche Diät erhielten (Heller et al., 2005; Sánchez-Galán et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden mithilfe eines pharmakologisch selektiven BLT1 Inhibitors CP105696 erreicht (Aiello et al., 2002). In den frühen Stadien der Atherogenese der Mäuse ist die Ausbildung der Plaques schwer zu bewerten. Aus diesem Grund wurde die atherosklerotische Last nach acht Wochen Fettdiät analysiert. Dies ist ein bewährter Zeitraum zur Bewertung der Atherosklerose in ApoE^(-/-) Mäusen. Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Größe der Plaques festgestellt. Die Inhibition von BLT2 unterscheidet sich diesbezüglich somit von der Hemmung des BLT1 Rezeptors. Da verschiedene Moleküle und Rezeptoren in die vaskuläre Entzündung während der Atherogenese einbezogen sind, ist es denkbar, dass eine selektive Inhibition von BLT2 nicht ausreicht, um die Atherogenese dauerhaft zu unterdrücken.

Es wurde der BLT2 Signalweg untersucht und festgestellt, dass die BLT2 vermittelte IL-8 Synthese die Expression von NOX1, die NOX1-abhängige reaktive Sauerstoffspezies-Generation und die anschließende Aktivierung des redox-sensitiven Transkriptionsfaktors „nuclear factor-kappaB“ (NF-κB) vermindert. Bei NOX1 handelt es sich um eine Untereinheit der Familie der NADPH Oxidase. Die mithilfe spezieller si-RNA, mit dem spezifischen BLT2 Inhibitor Ly255283 oder mit dem NOX-Inhibitor Diphenylamin Iodonium durchgeführte Inhibition von BLT2 und NOX1 supprimiert die IL-1β induzierte IL-8 Synthese. Bei IL-8 handelt es sich um einen potenten Angiogenese Faktor (Kim et al., 2010).

LTB₄ aktiviert NF-κB in kultivierten Monozyten sowohl mit BLT1 als auch mit BLT2. Eine vermehrte NF-κB abhängige Expression von Entzündungszellen wie Interleukin-6, MCP-1 und TNF-α konnte ebenfalls sowohl mit BLT1 als auch mit BLT2 nachgewiesen wer-

den. Interessanterweise zeigte die Inhibition beider BLT Rezeptoren gleichzeitig keinen zusätzlichen Effekt in Bezug auf die Expression von Entzündungsmolekülen und die Aktivierung von NF- κ B (Sánchez-Galán et al., 2009). In unserem Experiment tendierte die vaskuläre Expression von den proinflammatorischen Molekülen Interleukin-6, MCP-1 und TNF- α durch eine selektive BLT2 Inhibition zu einer Reduzierung. Ein signifikanter Effekt lag jedoch nicht vor. Es ist vorstellbar, dass die BLT2 Inhibition die Entzündung zu einem bestimmten Ausmaß reduziert, aber nicht in der Lage ist, die atherosklerotischen Stimuli für acht Wochen zu kompensieren.

Außerdem wurde in der Studie der Effekt des BLT2 Rezeptors auf die Atherogenese erforscht. Obwohl die Inhibition des BLT2 Rezeptors die Expression von Entzündungsmolekülen in kultivierten Monozyten reduziert, konnten keine Auswirkungen bezüglich der Infiltrationen von Monozyten in der Gefäßwand in vivo nach acht Wochen westlicher Ernährung nachgewiesen werden (Sánchez-Galán et al., 2009).

In der VEGF-induzierten Angiogenese spielt BLT2 aber eine entscheidene Rolle. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) regelt die BLT2 Expression in „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC) herunter (Kim et al., 2009).

Die Forschungsarbeit zeigt, wie komplex dieser Rezeptor in dem menschlichen Organismus agiert. Es ergaben sich zudem neue Ansatzpunkte für weitere Projekte. Zusätzliche experimentelle Arbeiten sind notwendig, um die Eigenschaften, Funktionen und Auswirkungen dieses Rezeptors auf die Pathogenese der Atherosklerose zu verstehen. Der Rezeptor BLT2 bleibt weiterhin ein interessanter Ansatzpunkt für die Forschung.

6. Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterien, die primär durch eine Schädigung der Intima entsteht und die häufigste Todesursache in den Industrieländern darstellt (Hansson, 2005). Studien haben gezeigt, dass Leukotriene als hochwirksame Botenstoffe bei entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen (Poeckel und Funk, 2010). Leukotrien B₄ (LTB₄) führt mithilfe seiner zwei G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren BLT1 und BLT2 zu einer vermehrten Expression verschiedener proinflammatorischer Proteine und fördert die Chemotaxis sowie die Bildung von Schaumzellen (Funk, 2001). Damit sind beide Rezeptoren an Immunantworten und in der Pathogenese inflammatorischer Krankheiten wie der Atherosklerose beteiligt. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Spezifität und Affinität. Während der BLT1 Rezeptor näher erforscht wurde, ist bezüglich des BLT2 Rezeptors wenig bekannt (Bäck, 2007; Bäck und Hansson, 2006; Hennig et al., 2008; Iizuka et al., 2010; Kim et al., 2009; Lundeen et al., 2006; Sánchez-Galán, 2009; Shin et al., 2006; Tager und Luster, 2003; Woo et al., 2002; Yokomizo et al., 2001). Um mehr über die Wirkung und Funktion des im Vergleich weniger bekannten Rezeptors zu erfahren, wurde in dieser Studie der Einfluss einer selektiven Leukotrien Rezeptor B2 (BLT2) Inhibition auf den Verlauf der Atherosklerose in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen erforscht.

Um atherosklerotische Bedingungen zu schaffen, wurde den Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen acht Wochen lang eine fett- und cholesterinreiche Diät verabreicht. Eine selektive Inhibition des BLT2 Rezeptors mit Ly255283 in den Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen reduzierte die Abgabe vaskulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch den Einfluss von NADPH Oxidase und ihrer Untereinheit Rac1. Bezüglich der endothelialen Funktion konnte eine Verbesserung der mit Carbachol stimulierten Endothel abhängigen Vasorelaxation in den mit Ly vorbehandelten Mäusen nachgewiesen werden. Eine mit Nitroglycerin stimulierte Endothel abhängige Vasorelaxation zeigte hingegen sowohl bei den mit Ly vorbehandelten Mäusen als auch bei den Kontrolltieren, die das Vehikel DMSO erhielten, keine Unterschiede. Keine signifikanten Unterschiede wurden bezüglich des systolischen Blutdruckes, Serum-Cholesterin-Spiegels und der

Herzfrequenz festgestellt. Die geringfügige Verminderung der Expression vaskulärer, proinflammatorischen Molekülen wie IL-6, TNF- α und MCP-1 und der Rho-GTPase Rac1 reichte nicht aus, um die Entstehung der Atherosklerose zu verhindern. Trotz der reduzierten ROS-Abgabe wurden keine Unterschiede bezüglich der Größe atherosklerotischer Plaques festgestellt. Des Weiteren konnte keine vaskuläre Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in den Plaques nachgewiesen werden. Eine Stimulation der Zellkulturen mit Angiotensin II zeigte eine signifikant höhere Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen im Vergleich zu denen mit Ly oder dem Vehikel behandelten Kulturen. Bei den mit Ly vorbehandelten Zellkulturen führte eine anschließende Stimulation mit Angiotensin II zu einer deutlichen Reduktion der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellkulturen.

Da die Inhibition des BLT2 Rezeptors die Freisetzung vaskulärer reaktiver Sauerstoffspezies reduziert und die Endothel abhängige Relaxation verbessert, ergeben sich weitere Ansatzpunkte bezüglich der Entwicklung neuer Therapiestrategien und Forschungsprojekten. Weitere Experimente sind nötig, um zusätzliche Einblicke in die Funktion des Rezeptors und seiner Auswirkungen auf die Atherogenese zu gewinnen.

7. Literaturverzeichnis

Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Freeman A, Showell HJ. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443-449

Bäck M, Bu DX, Bränström R, Sheikine Y, Yan ZQ, Hansson GK. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17501-17506

Bäck M, Hansson GK. Leukotriene receptors in atherosclerosis. *Ann Med* 2006; 38: 493-502

Bäck M. Leukotriene receptors: crucial components in invascular inflammation. *Scientific World Journal* 2007; 7: 1422-1439

Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Tranum-Jensen J, Walev I, Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med* 1995; 182: 1959-1971

von Buchhausen F, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E. Glyceroltrinitrat. In: von Buchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Hänsel R, Holzgrabe U, Keller K, Nürnberg E, Rimpler H, Schneider G, Surmann P, Wolf HU, Wurm G, Hrsg. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Stoffe E-O*. Berlin - Heidelberg: Springer, 1993: 371

Busse R. Kreislauf. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2005: 631-640

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. JAMA 1986; 256: 2835-2838

Cho KJ, Seo JM, Shin Y, Yoo MH, Park CS, Lee SH, Chang YS, Cho SH, Kim JH. Blockade of airway inflammation and hyperresponsiveness by inhibition of BLT2, a low-affinity leukotriene B4 receptor. Am J Respir Cell Mol Biol 2010; 42: 294-303

Choi JA, Kim EY, Song H, Kim C, Kim JH. Reactive oxygen species are generated through a BLT2-linked cascade in Ras-transformed cells. Free Radic Biol Med 2008; 44: 624-634

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Exp Med 2000; 191: 189-194

Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Müller-Berninger R, Elster H, Seidel D. Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS). I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. Atherosclerosis 1997; 129: 221-230

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. J Clin Invest 1998; 102: 145-152

Dorak MT. Real-time PCR. New York - Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006

Erbel R, Möhlenkamp S, Lehmann N, Schmermund A, Moebus S, Stang A, Dragano N, Hoffmann B, Grönemeyer D, Seibel R, Mann K, Kröger K, Bröcker-Preuss M, Volbracht L, Siegrist J, Jöckel KH. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Zeichen subklinischer Atherosklerose. Daten der bevölkerungsbezogenen Heinz Nixdorf Recall Studie. Deutsches Ärzteblatt 2008; 105: 1-8

Feinmark SJ, Cannon PJ. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 16466-16472

Freudenberg H. Koronarsklerose und Herzinfarkt. Berlin: Lehmanns Media, 2011: 293-348

Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: advances eicosanoid biology. *Science* 2001; 294: 1871-1875

Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB Jr. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 1981; 214: 1239-1241

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148

Gulbins E, Lang F. Signaltransduktion. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2005: 37

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695

Heller EA, Liu E, Tager AM, Sinha S, Roberts JD, Koehn SL, Libby P, Aikawa ER, Chen JQ, Huang P, Freeman MW, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Inhibition of atherogenesis in BLT1-deficient mice reveals a role for LTB4 and BLT1 in smooth muscle cell recruitment. *Circulation* 2005; 112: 578-586

Hennig R, Osman T, Esposito I, Giese N, Rao SM, Ding XZ, Tong WG, Büchler MW, Yokomizo T, Friess H, Adrian TE. BLT2 is expressed in PanINs, IPMNs, pancreatic cancer and stimulates tumour cell proliferation. *Br J Cancer* 2008; 99: 1064-1073

Hoth M, Wischmeyer E. Blut (Fibrinolyse). In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, Hrsg. Physiologie. Stuttgart: Thieme, 2010: 189

Iizuka Y, Okuno T, Saeki K, Uozaki H, Okada S, Misaka T, Sato T, Toh H, Fukayama M, Takeda N, Kita Y, Shimizu T, Nakamura M, Yokomizo T. Protective role of the leukotriene B4 receptor BLT2 in murine inflammatory colitis. *Faseb J* 2010; 24: 4678-4690

Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease - six years follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33-50

Kim GY, Lee JW, Cho SH, Seo JM, Kim JH. Role of the low- affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 915-920

Kim GY, Lee JW, Ryu HC, Wei JD, Seong CM, Kim JH. Proinflammatory cytokine IL-1 β stimulates IL-8 synthesis in mast cells via a leukotriene B4 receptor 2-linked pathway, contributing to angiogenesis. *J Immunol* 2010; 184: 3946-3954

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. Blut: Ein flüssiges Organsystem; Funktion des Magen-Darm-Trakts, Energiehaushalt und Ernährung; Endokrines System. In: Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. Physiologie. Stuttgart: Thieme, 2009: 226-559

Kuschinsky W. Herz-Kreislauf-Funktion. In: Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J, Hrsg. Physiologie. München: Elsevier, 2004: 458-459

Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem* 2003; 278: 12094-12100

Luley C, Klör HU. Lexikon Lipoproteine und Atherosklerose. Basel: Aesopus, 1993: 14-26

Lundeen KA, Sun B, Karlsson L, Fourie AM. Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J Immunol* 2006; 177: 3439-3447

Merten M. Hämostaseologie - Die Rolle der Gefäßwand in der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms. Stuttgart: Schattauer, 2006, 26: 123-130

Mügge A. Die Bedeutung von Sauerstoffradikalen im Prozess der Arteriosklerose. *Zeitschrift für Kardiologie* 1998; 87: 851-864

Peters W, Charo IF. Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 175-180

Poeckel D, Funk CD. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2010; 86: 243-253

Pongnimitprasert N. Atherosclerosis and NADPH Oxidase. *Silpakorn University Science & Tech J* 2009; 3: 13-24

Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch Pschyrembel. Berlin: Walter de Gruyter, 2007

Rådmark O, Werz O, Steinhilber D, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity. *Trends Biochem Sci* 2007; 32: 332-341

Reape TJ, Groot PHE. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999; 147: 213-225

Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-684

Sánchez-Galán E, Gómez-Hernández A, Vidal C, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Ortega L, Egido J, Tuñón J. Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 216-225

Sechtem U, Geissler A, Athanasiadis A, Ong P, Mahrholdt H. Diagnostik der koronaren Herzerkrankung mit Computer- und Magnetresonanztomographie. *Der Internist* 2010; 51: 625-640

Shin EH, Lee HY, Bae YS. Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 606-611

Silverthorn DU. *Physiologie*. München: Pearson, 2009: 224-1037

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2011: Gesundheit, Todesursachen in Deutschland; Fachserie 12, Reihe 4, 2010

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010: Krankenhauspatienten. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DiagnosenInsgesamt.html> (Zugriffsdatum: 02.05.2012)

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010: männliche Krankenhauspatienten. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/DiagnosenMaennlich.html> (Zugriffsdatum: 02.05.2012)

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2010: Todesursachen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html?nn=50808> (Zugriffsdatum: 02.05.2012)

Steffel J, Lüscher TF. *Herz-Kreislauf - Atherosklerose und Folgeerkrankungen*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2011: 45-69

Stiefelhagen P. Kardiovaskuläre Pharmakologie. *Der Internist* 2004; 45: 1205-1210

Subbarao K, Jala VR, Mathis S, Suttles J, Zacharias W, Ahamed J, Ali H, Tseng MT, Haribabu B. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis potential mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 369-375

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long term follow up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-954

Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 123-134

Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol* 2012; 3: 87

Werz O, Steinhilber D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 701-718

Westwick JK, Lambert QT, Clark GJ, Symons M, Van Aelst L, Pestell RG, Der CJ. Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1324-1335

Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults. The Framingham Heart Study. *Am J Cardiol* 1987; 59: 91G-94G

Woo CH, You HJ, Cho SH, Eom YW, Chun JS, Yoo YJ, Kim JH. Leukotriene B (4) Stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J Biol Chem* 2002; 277: 8572-8578

Yamazaki T, Kawai C, Yamauchi A, Kuribayashi F. A highly sensitive chemiluminescence assay for superoxide detection and chronic granulomatous disease diagnosis. *Trop Med Health* 2011; 39: 41-45

Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys* 2001; 385: 231-241

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the Interheart study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952

Zimmer HG, Zimmer R. Altern und Tod. In: Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J, Hrsg. *Physiologie*. München: Elsevier, 2004: 835

8. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Cornelius Müller für die Überlassung des Themas, die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit und die permanente Unterstützung. Sein Engagement trug im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Felix Friedrich Hoyer für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und Betreuung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Georg Nickenig bedanke ich mich für die Kooperation und die Möglichkeit der Arbeit an der Medizinischen Klinik II.

Allen Mitarbeiterinnen des Labors der Experimentellen Kardiologie danke ich für Ihre Zusammenarbeit und freundliche Hilfe.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mir zu allen Zeiten meines Lebens Rückhalt gegeben und mich immer unterstützt haben.