

Rheumatoide Arthritis und Arteriosklerose:

- Bedeutung der zu Grunde liegenden
chronisch entzündlichen Prozesse
für die endotheliale Dysfunktion**
- Wirkung der antiinflammatorischen Substanz
Galiellalacton in murinen Arteriosklerosemodellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

M.Sc. Biotechnologie Franziska Bollmann
geboren am 24.03.1986 in Berlin

Mainz, 2014

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2014

The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries,
is not, "Eureka!" ("I found it!")
but rather,
"Hmm... that's funny..."

Isaac Asimov

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne die Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe. Alle den Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat.

Franziska Bollmann

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | V |
| TABELLENVERZEICHNIS | IX |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Regulation der Genexpression | 1 |
| 1.1.1 Regulation der Transkription – Promotoraktivität | 1 |
| 1.1.2 Prozessierung der hnRNA | 4 |
| 1.1.3 Kern-Zytoplasmatransport | 4 |
| 1.1.4 Regulation der mRNA-Stabilität | 4 |
| 1.2 Das RNA-BP Tristetraprolin (TTP) | 6 |
| 1.2.1 Aktivität von TTP | 6 |
| 1.2.2 TTP-abhängiger mRNA-Abbau | 7 |
| 1.2.3 Rolle von TTP in Entzündung und Krebs | 9 |
| 1.2.4 TTP-defiziente Mäuse als Modell einer chronischen Entzündung | 10 |
| 1.3 Rheumatoide Arthritis und Arteriothrombose | 11 |
| 1.3.1 Pathogenese der RA | 11 |
| 1.3.2 Pathogenese der AT | 13 |
| 1.3.3 Mechanismen der vorzeitigen AT in der RA-Erkrankung | 16 |
| 1.3.4 Rolle von oxidativem Stress in RA und AT | 18 |
| 1.3.5 Der Transkriptionsfaktor nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) | 20 |
| 1.3.6 Diabetes als klassischer Risikofaktor für die AT in einer RA-Erkrankung | 21 |
| 1.3.7 Behandlung der RA | 22 |
| 1.3.8 Neue Substanzen zur Behandlung der RA und AT | 23 |
| 1.3.9 ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse als Modell einer AS- bzw. AT-Erkrankung | 24 |
| 2 ZIELSETZUNG | 27 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 3.1 Material und Chemikalien | 29 |
| 3.1.1 Geräte | 29 |
| 3.1.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien | 29 |
| 3.1.3 Oligonukleotide | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.4 | Antikörper | 33 |
| 3.2 | Zellen | 34 |
| 3.2.1 | Eukaryote Zelllinien und Primärzellen | 34 |
| 3.2.2 | Kultivierung eukaryoter Zellen | 34 |
| 3.2.3 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 35 |
| 3.2.4 | Stimulation von eukaryoten Zellen | 35 |
| 3.2.4.1 | Stimulation mit organischen Nitraten | 35 |
| 3.2.4.2 | Stimulation mit Zytokinen | 35 |
| 3.2.5 | Transiente Transfektion von Zellen mit siRNA | 36 |
| 3.2.6 | Analyse der mRNA-Stabilität | 36 |
| 3.3 | Tiermodelle | 37 |
| 3.3.1 | Mausstämme | 37 |
| 3.3.1.1 | TTP ^{-/-} -Mäuse | 37 |
| 3.3.1.2 | TNFα ^{-/-} -Mäuse | 38 |
| 3.3.1.3 | TNFα ^{-/-} TTP ^{-/-} -Mäuse | 38 |
| 3.3.1.4 | ApoE ^{-/-} -Mäuse | 38 |
| 3.3.1.5 | ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse | 39 |
| 3.3.2 | Behandlung der TTP ^{+/-} -Zuchtmäuse mit N-Acetyl-L-Cystein (NAC) | 39 |
| 3.3.3 | Behandlung der ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse mit Galiellalacton | 40 |
| 3.3.4 | Entblutung, Töten und Organentnahme der Mäuse | 41 |
| 3.3.5 | Peritoneallavage | 41 |
| 3.4 | Molekularbiologische Methoden | 41 |
| 3.4.1 | Klonierungen | 41 |
| 3.4.2 | DNA-Isolation aus Mausschwanzspitzen | 43 |
| 3.4.3 | Genotypisierung mittels PCR | 44 |
| 3.4.4 | RNA-Isolation aus Zellen und Geweben | 45 |
| 3.4.5 | qRT-PCR | 46 |
| 3.4.6 | UV-Crosslink | 48 |
| 3.4.6.1 | Linearisierung der 3' UTR-Konstrukte | 49 |
| 3.4.6.2 | <i>In vitro</i> Transkription | 49 |
| 3.4.6.3 | UV-Crosslink | 50 |
| 3.4.7 | Reportergenanalysen | 51 |
| 3.5 | Proteinbiochemische Methoden | 53 |
| 3.5.1 | Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford | 53 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.5.2 | Proteinisolation aus Zellen und Geweben | 53 |
| 3.5.3 | Fällung von Proteinen | 53 |
| 3.5.4 | Immunfärbungen mittels Western Blot und Dot Blot | 54 |
| 3.5.4.1 | Western Blot | 54 |
| 3.5.4.2 | Dot Blot | 55 |
| 3.6 | Funktionsanalysen | 56 |
| 3.6.1 | Blutdruckmessung | 56 |
| 3.6.2 | Bestimmung des Blutbildes | 56 |
| 3.6.3 | Endothelfunktionsmessung | 56 |
| 3.6.4 | Lipidprofil | 56 |
| 3.6.5 | ROS-Messungen | 57 |
| 3.6.5.1 | ROS-Bildung im Vollblut | 57 |
| 3.6.5.2 | NADPH-Oxidaseaktivität in Herzfraktionen | 57 |
| 3.6.5.3 | Vaskuläre ROS-Bildung | 57 |
| 3.6.6 | Schwanzvenenblutungszeit | 57 |
| 3.6.7 | Gerinnungsanalysen | 58 |
| 3.6.8 | Intravitalmikroskopie | 58 |
| 3.6.9 | Plauefärbungen | 59 |
| 3.6.10 | Quantifizierung von L-Arginin und ADMA mittels HPLC | 59 |
| 3.7 | Statistik | 59 |
| 4 | ERGEBNISSE | 61 |
| 4.1 | Untersuchung zentraler Mediatoren der RA und AT | 61 |
| 4.1.1 | Charakterisierung der TTP ^{-/-} und TNF α ^{-/-} TTP ^{-/-} -Mäuse | 61 |
| 4.1.1.1 | Die Embryonenabstoßung in TTP ^{+/-} -Mäusen wird durch oxidativen Stress und TNF α -Erhöhung vermittelt | 61 |
| 4.1.1.2 | Die verringerte Gewichtszunahme in TTP ^{-/-} -Mäusen kann durch zusätzliche Deletion des TNF α -Gens revidiert werden | 62 |
| 4.1.1.3 | Verringerung des Blutdrucks durch eine TTP-abhängige chronische Entzündung | 64 |
| 4.1.2 | Kardiovaskuläre Erkrankung im Modell der chronischen Entzündung | 65 |
| 4.1.2.1 | Die TTP-Defizienz führt zu der Ausbildung einer eDF | 65 |
| 4.1.2.2 | Die massive eDF in TTP ^{-/-} -Mäusen ist unabhängig von Veränderungen der Chlosterinblut- oder Glukosewerte | 68 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1.2.3 | Eine verringerte NO-Bioaktivität ist für die eDF in TTP ^{-/-} -Mäusen verantwortlich | 69 |
| 4.1.2.4 | Die Expression der NO-produzierenden Enzyme ist in TTP ^{-/-} -Mäusen nicht verändert | 70 |
| 4.1.2.5 | Weder eine Substratverarmung noch eNOS-Inhibition erklären die eDF in TTP-defizienten Mäusen | 71 |
| 4.1.2.6 | In TTP-defizienten Mäusen kommt es zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies | 72 |
| 4.1.2.7 | Die erhöhte RONS-Produktion in TTP ^{-/-} -Mäusen beruht auf einer erhöhten Expression der Nox2 | 75 |
| 4.1.2.8 | In TTP ^{-/-} -Mäusen ist die Stabilität der Nox2-mRNA erhöht | 76 |
| 4.1.2.9 | TTP bindet nicht an die 3'-UTR der Nox2-mRNA | 78 |
| 4.1.2.10 | Die verstärkte Einwanderung von Makrophagen in TTP ^{-/-} -Aorten führt zu einer erhöhten Expression proarteriosklerotischer Markergene | 79 |
| 4.1.2.11 | TTP ^{-/-} -Mäuse zeigen hämostatische Veränderungen | 81 |
| 4.1.2.12 | In der Leber von TTP-defizienten Mäusen sind die Expressionen intrinsischer Gerinnungsfaktoren nicht verändert. | 81 |
| 4.1.2.13 | Die TTP-Defizienz verändert das Blutbild der Mäuse | 82 |
| 4.1.3 | Einfluss von TNF α auf den kardiovaskulären Phänotyp der TTP ^{-/-} -Mäuse | 84 |
| 4.1.3.1 | Die veränderte Endothelfunktion in TTP-defizienten Mäusen ist von TNF α unabhängig | 84 |
| 4.1.3.2 | Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in TTP-defizienten Mäusen ist nur zu einem geringen Anteil TNF α -vermittelt | 85 |
| 4.1.3.3 | Die Inaktivierung von TNF α in TTP ^{-/-} -Mäusen verändert nicht die erhöhte Nox2-mRNA-Expression | 86 |
| 4.1.3.4 | Der proarteriosklerotische Phänotyp der TTP ^{-/-} -Mäuse ist nicht ausschließlich TNF α -vermittelt | 87 |
| 4.1.3.5 | TNF α besitzt nur einen schwachen Einfluss auf die hämostatischen Störungen in TTP-defizienten Mäusen | 88 |
| 4.2 | Untersuchung der Wirkung organischer Nitrate auf oxidativen Stress im Diabetesmodell | 90 |
| 4.2.1 | PETN induziert die HO-1-Promotoraktivität | 90 |
| 4.2.2 | Nrf2 induziert den HO-1-Promotor | 91 |

| | |
|---|------------|
| 4.3 Analyse der antiarteriothrombotischen Effekte von Galiellalacton in murinen Arteriosklerosemodellen | 93 |
| 4.3.1 Charakterisierung der ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse | 93 |
| 4.3.1.1 TFPI-abhängige Veränderung der Schwanzvenenblutungszeit | 93 |
| 4.3.1.2 TFPI-abhängige Änderungen der Blutgerinnung | 95 |
| 4.3.1.3 Erhöhung der arteriosklerotischen Plaques durch TFPI-Mangel | 95 |
| 4.3.1.4 Die Plättchenadhäsion an Läsionsflächen wird durch TFPI- Mangel und Fettfutter beeinflusst | 96 |
| 4.3.1.5 Die Endothelfunktion wird durch die TFPI-Heterozygotie und Fettfutter beeinflusst | 98 |
| 4.3.2 Gal senkt die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker in der Zellkultur | 100 |
| 4.3.3 Behandlung der ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse mit Gal | 101 |
| 4.3.3.1 Gal verringert die Adhäsion von Thrombozyten an Läsionsstellen in ApoE-defizienten Mäusen | 101 |
| 4.3.3.2 Gal verbessert nicht die Endothelfunktion im AS- oder AT-Modell | 102 |
| 4.3.3.3 Effekte von Gal auf die Blutgerinnung | 104 |
| 4.3.3.4 Gal senkt die mRNA-Expression einiger AT-Markergene | 105 |
| 5 DISKUSSION | 113 |
| 5.1 Untersuchung zentraler Mediatoren der RA und AT | 113 |
| 5.1.1 Charakterisierung der TTP ^{-/-} - und TNFα ^{-/-} TTP ^{-/-} -Mäuse | 113 |
| 5.1.1.1 Behandlung der TTP ^{+/-} -Zuchtmäuse mit NAC | 113 |
| 5.1.1.2 Die verringerte Gewichtszunahme in TTP ^{-/-} -Mäusen kann durch zusätzliche TNFα-Defizient revidiert werden | 114 |
| 5.1.2 Kardiovaskuläre Erkrankung im Modell der chronischen Entzündung | 115 |
| 5.1.2.1 Verringerung des Blutdrucks in chronisch entzündeten Mäusen | 115 |
| 5.1.2.2 Die TTP-Defizienz führt zu einer eDF auf Grund der durch RONS-Erhöhung reduzierten NO-Bioaktivität | 116 |
| 5.1.2.3 Regulation der Nox2-mRNA durch TTP | 117 |
| 5.1.2.4 Die verstärkte Einwanderung von Makrophagen in TTP ^{-/-} -Aorten führt zu einer erhöhten Expression proarteriosklerotischer Markergene | 118 |
| 5.1.2.5 Hämostatische Veränderungen in TTP ^{-/-} -Mäusen | 119 |

| | |
|--|---------------|
| 5.2 Untersuchung der Wirkung organischer Nitrate auf oxidativen Stress im Diabetesmodell | 122 |
| 5.3 Analyse der antiarteriothrombotischen Effekte von Galiellalacton in murinen Arteriosklerosemodellen | 123 |
| 5.3.1 Charakterisierung der ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse | 123 |
| 5.3.1.1 TFPI-abhängige hämostatische Veränderungen | 123 |
| 5.3.1.2 TFPI-abhängige Plättchenadhäsion an Läsionen der Karotisarterie | 124 |
| 5.3.1.3 TFPI-abhängige Veränderung der Endothelfunktion | 125 |
| 5.3.2 Test des Galiellalactons in der Zellkultur | 125 |
| 5.3.3 Behandlung der ApoE ^{-/-} - und ApoE ^{-/-} TFPI ^{+/-} -Mäuse mit Gal | 126 |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG | 129 |
| 7 ABSTRACT | 131 |
| LITERATURVERZEICHNIS | XI |
| DANKSAGUNG | XXXI |
| LEBENS LAUF | XXXIII |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------------|--|
| +/+ | homozygot Wildtyp |
| +/- | heterozygot |
| -/- | homozygot defizient |
| ADMA | asymmetrisches Dimethyl-L-Arginin |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| aPTT | partielle Thromboplastinzeit |
| ARE | AU-reiches Element |
| AS | Arteriosklerose |
| AT | Arteriothrombose |
| BH ₂ | Dihydrobiopterin |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopterin |
| BMI | Körpermassenindex (<i>body mass index</i>) |
| bpm | Schläge pro Minute (<i>beats per minute</i>) |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cDNA | komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>) |
| Cox | Cyclooxygenase |
| CPM | Anzahl pro Minute (<i>counts per minute</i>) |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTSS | Cathepsin S |
| DCs | dendritische Zellen |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DHE | Dihydroethidin |
| DIC | disseminierte intravaskuläre Koagulation (<i>disseminated intravascular coagulation</i>) |
| DLD-1 | humane Kolonepithelzellen; <i>Dukes type C colorectal adenocarcinoma</i> |
| DMARDs | krankheitsmodifizierende Antirheumatika |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxiribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DRB | 5,6-Dichlorbenzimidazol-1-β-D-Ribofuranosid |
| DTT | Dithiothreitol |
| eDF | endotheliale Dysfunktion |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| FVIII | Koagulationsfaktor VIII |
| FIX | Koagulationsfaktor IX |
| FX | Koagulationsfaktor X |
| FXI | Koagulationsfaktor XI |
| FXII | Koagulationsfaktor XII |
| FAM | 6-Carboxyfluorescein |
| FKS | fötales Kälberserum |
| G | Gauge (Maß für den Außendurchmesser von Kanülen) |
| Gal | Galiellalacton |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase |
| GCH1 | GTP-Cyclohydrolase 1 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| GIT | Guanidinisocyanat |
| Glu | Glukose |
| GM-CSF | granulozyten- und monozytenkoloniestimulierender Faktor |
| GPVI | Glykoprotein VI |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| Häm | Hämoglobin |
| HDL | <i>high density lipoprotein</i> |
| hnRNA | Vorläufer-RNA (<i>heterogenous nuclear RNA</i>) |
| HO-1 | Hämoxygenase 1 |
| HPLC | Hochdruckflüssigchromatographie |
| HuR | humanes Antigen R |
| ICAM | intrazelluläres Adhäsionsmolekül |
| ler3 | <i>immediate early response gene-3</i> |
| IFN- γ | Interferon γ |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| ISMN | Isosorbidmononitrat |
| Jak | Januskinase |
| kb | Kilobasenpaare |
| Keap1 | <i>Kelch ECH associating protein 1</i> |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LDLR | LDL-Rezeptor |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| Mip-1 α | Makrophagen inflammatorisches Protein 1 α (<i>Ccl3</i>) |
| MK2 | MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 |
| MM6 | humane Monotyzen/Makrophagen-Zelllinie (Mono Mac 6) |
| mmHg | Millimeter Quecksilber |
| MP | Milchpulver |
| mRNA | Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| miRNA | Mikro-RNA |
| NaAc | Natriumacetat |
| NAC | N-Acetyl-L-Cystein |
| ND | Normaldiät |
| NF κ B | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| nHDL | nicht-HDL |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| Nox | NADPH-Oxidase |
| NQO1 | NAD-(P)-H-Chinon-Oxidoreduktase |
| Nrf2 | <i>nuclear factor E2-related factor 2</i> |
| NSAIDs | nicht-steroidale entzündliche Medikamente |
| PABP | Poly-A-bindendes Protein |
| PAI-2 | Plasminogenaktivatorinhibitor 2 |
| PBMCs | periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDBu | Phorbol-12,13-Dibutytrat |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| PETN | Pentaerythrityltetranitrat |
| PLB | passiver Lysepuffer (<i>passive lysis buffer</i>) |
| Pol2a | DNA-Polymerase IIa |
| PROCR | Protein C-Rezeptor |
| PT | Prothrombinzeit |
| qPCR | quantitative Echtzeit-PCR (<i>quantitative RealTime-PCR</i>) |
| qRT-PCR | Zweischrittverfahren aus reverser Transkription und qPCR |
| RA | Rheumatoide Arthritis |
| RAW | murine Monozyten/Makrophagen-Zelllinie (RAW 264.7) |
| RLU | relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNA-BP | RNA-bindendes Protein |
| RONS | reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| S100A8 | Calgranulin A |
| SEM | Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sGC | lösliche Guanylylcyclase |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SNP | Natriumnitroprussid |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SPP1 | Osteopontin |
| sRNA | <i>sense RNA</i> |
| Stat | Signaltransduktor und Aktivator der Transkription |
| STE | Natriumchlorid-Tris-EDTA |
| TAFI | thrombinaktivierter Fibrinolyseinhibitor |
| TAMRA | Carboxytetramethylrhodamin |
| TC | Gesamtcholesterin |
| TC/HDL | Verhältnis Gesamtcholesterin zu HDL-Cholesterin |
| TF | Gewebefaktor (<i>tissue factor</i>) |
| TFPI | Gewebefaktorsignalweginhibitor (<i>tissue factor pathway inhibitor</i>) |
| TH-Zellen | T-Helferzellen |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TTP | Tristetraprolin |
| Treg-Zellen | regulatorische T-Zellen |
| TRG | Triglyceride |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TVBT | Schwanzvenenblutungszeit |
| UTR | untranslatierter Bereich |
| VAS-2870 | 3-Benzyl-7-(2-Benzoxazolyl)Thio-1,2,3-Triazolo(4,5-d)-Pyrimidin |
| VASP | vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein |
| VCAM | vaskuläres Zelladhäsionsprotein |
| VLDL | <i>very low density lipoprotein</i> |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| WD | Westerntyp-Diät |
| xg | Zentrifugalbeschleunigung |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1: Schematische Darstellung einer eukaryoten Promotorsequenz. | 2 |
| Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Präinitiationskomplexes von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen. | 3 |
| Abbildung 1-3: Deadenylierungsabhängige und –unabhängige Mechanismen des mRNA-Abbaus in Säugerzellen. | 5 |
| Abbildung 1-4: Kontrolle des TTP-abhängigen mRNA-Abbaus durch Phosphorylierungen des TTP..... | 7 |
| Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des TTP-vermittelten Abbaus ARE-haltiger mRNAs..... | 8 |
| Abbildung 1-6: Darstellung der Pathogenese der RA. | 12 |
| Abbildung 1-7: Die Entwicklung einer arteriosklerotischen Läsion..... | 14 |
| Abbildung 1-8: Zusammenhang der inflammatorischen Prozesse, die zu einer AS-Ausbildung in RA-Patienten führen können. | 17 |
| Abbildung 1-9: Wirkung des oxidativen Stresses auf die NO-abhängige Gefäßrelaxation..... | 19 |
| Abbildung 1-10: Strukturformel des Pilzsekundärmetaboliten Galiellalacton..... | 24 |
| Abbildung 3-1: Kreuzungsschema zur Zucht der $TNF\alpha^{-/-}TTP^{-/-}$ -Mäuse..... | 38 |
| Abbildung 3-2: Kreuzungsschema zur Zucht der $ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}$ -Mäuse. | 39 |
| Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Behandlung der $ApoE^{-/-}$ - und $ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}$ -Mäuse mit Gal. | 41 |
| Abbildung 3-4: Kugelprinzip des Amelung Koagulometers. | 58 |
| Abbildung 4-1: Die Gabe von NAC erhöht die Anzahl von $TTP^{-/-}$ -Nachkommen. | 62 |
| Abbildung 4-2: Die verringerte Gewichtszunahme von $TTP^{-/-}$ -Mäusen ist $TNF\alpha$ -vermittelt..... | 63 |
| Abbildung 4-3: Die TTP- und $TNF\alpha$ -Defizienz führt zu verringerten BMI-Werten. | 64 |
| Abbildung 4-4: Eine TTP-Defizienz führt zu einem verringerten Blutdruck mit gleichzeitiger Erhöhung des Pulses..... | 65 |
| Abbildung 4-5: Die TTP-Defizienz führt zu der Ausbildung einer eDF..... | 66 |
| Abbildung 4-6: Die durch TTP-Defizienz bedingten Größenunterschiede beeinträchtigen nicht die Kontraktilität der Aortenringe..... | 67 |
| Abbildung 4-7: Die Gefäßrelaxation nach Gabe eines direkten NO-Donors wird nicht durch die TTP-Defizienz beeinflusst. | 68 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4-8: Die durch die TTP-Defizienz induzierte eDF ist unabhängig vom Lipidstatus und Blutzuckerwert der TTP ^{-/-} -Mäuse. | 69 |
| Abbildung 4-9: Die TTP-Defizienz führt zu einer Verringerung des bioaktiven NO.... | 70 |
| Abbildung 4-10: Die Expression der iNOS und eNOS ist in TTP ^{-/-} -Mäusen nicht verändert. | 71 |
| Abbildung 4-11: Die TTP-vermittelte eDF beruht nicht auf einer Argininverarmung oder NO-Synthasehemmung durch ADMA. | 72 |
| Abbildung 4-12: Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies in TTP-defizienten Mäusen. | 73 |
| Abbildung 4-13: Die PDBu-induzierte ROS-Bildung in TTP ^{-/-} -Mäusen ist NADPH-oxidaseabhängig. | 74 |
| Abbildung 4-14: Die TTP-Defizienz führt zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Stickstoffspezies. | 75 |
| Abbildung 4-15: Die TTP-Defizienz führt zu einer erhöhten Expression der Nox2. ... | 76 |
| Abbildung 4-16: Die Nox2-mRNA-Stabilität ist in TTP-defizienten Mäusen stark erhöht. | 77 |
| Abbildung 4-17: HuR, nicht aber TTP, bindet direkt an die Nox1- und Nox2-3'-UTR. | 78 |
| Abbildung 4-18: Die TTP-Defizienz führt zu einer verstärkten Aktivierung der Endothelzellen und zu einer erhöhten Einwanderung von Makrophagen in das Aortengewebe. | 79 |
| Abbildung 4-19: Proarteriosklerotische und –thrombotische Markergene werden in TTP-defizienten Mäusen verstärkt exprimiert. | 80 |
| Abbildung 4-20: TTP ^{-/-} -Mäuse zeigen eine verlängerte intrinsische und Schwanzvenenblutungszeit. | 81 |
| Abbildung 4-21: Die mRNA-Expression der intrinsischen Gerinnungsfaktoren in der Leber ist nicht durch eine TTP-Defizienz beeinträchtigt. | 82 |
| Abbildung 4-22: Schematische Darstellung der Beeinflussung des intrinsischen Blutgerinnungsweges durch eine TTP-Defizienz. | 83 |
| Abbildung 4-23: Eine TTP-Defizienz führt zu erhöhten Mengen an neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten, sowie zu einer Erhöhung der Erythrozytenverteilungsbreite. Die Anzahl der Lymphozyten ist leicht verringert. | 83 |
| Abbildung 4-24: Die TNF α -Defizienz in TTP ^{-/-} -Mäusen verbessert nicht die Endothelfunktion in diesen Tieren. | 85 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4-25: Die TNF α -Defizienz reduziert nur leicht die ROS-Bildung in TTP $^{-/-}$ -Mäusen. | 86 |
| Abbildung 4-26: Die Nox2-mRNA-Expression wird durch TNF α -Inaktivierung in TTP $^{-/-}$ -Mäusen nicht reduziert..... | 87 |
| Abbildung 4-27: Die Inaktivierung von TNF α hat keinen Einfluss auf die erhöhte mRNA-Expression von SSP1 und Mip-1 α in TTP $^{-/-}$ -Mäusen..... | 88 |
| Abbildung 4-28: Die Dysregulation der Hämostase in einer TTP-induzierten entzündlichen Erkrankung ist nicht vollständig TNF α -vermittelt. | 89 |
| Abbildung 4-29: PETN aber nicht ISMN induziert die Aktivität des HO-1-Promotors. | 90 |
| Abbildung 4-30: Die genutzte Nrf2-siRNA ist funktionell..... | 91 |
| Abbildung 4-31: Der Effekt von PETN auf den HO-1-Promotor ist Nrf2-abhängig..... | 92 |
| Abbildung 4-32: Die TFPI-haploiden Mäuse zeigen nach 14-wöchiger WD-Fütterung keine veränderten TVBTs. | 94 |
| Abbildung 4-33: ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäuse zeigen nach 30wöchiger Fütterung mit WD tendenziell eine verkürzte TVBT. | 94 |
| Abbildung 4-34: ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäuse zeigen keine Unterschiede in der extrinsischen und eine tendenzielle Verringerung in der intrinsischen Gerinnungszeit. | 95 |
| Abbildung 4-35: Der prozentuale Anteil an arteriosklerotischen Läsionen ist in ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäusen tendenziell leicht erhöht..... | 96 |
| Abbildung 4-36: Beeinflussung der Plättchenadhäsion an Läsionsstellen durch die TFPI-Heterozygotie und Westerntyp-Diät. | 97 |
| Abbildung 4-37: Die Fütterung der ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäuse mit WD verschlechtert die Endothelfunktion dieser Mäuse..... | 99 |
| Abbildung 4-38: Gal verringert die Expression einiger proinflammatorischer Markergene. | 100 |
| Abbildung 4-39: Gal-Behandlung verringert die Adhäsion der Plättchen an die Läsionsstelle in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen. | 102 |
| Abbildung 4-40: Gal verbessert die Endothelfunktion weder in ApoE $^{-/-}$ - noch in ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäusen. | 103 |
| Abbildung 4-41: Gal-Behandlung zeigt keinen Effekt auf die TVBT der ApoE $^{-/-}$ TFPI $^{+/-}$ -Mäuse. | 104 |
| Abbildung 4-42: Die Behandlung der Mäuse mit Gal verlängert die Blutungszeiten der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade. | 105 |

Abbildung 4-43: Gal verringert die IL6-mRNA-Expression in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen.
..... 106

Abbildung 4-44: Gal moduliert die mRNA-Expression der proarteriosklerotischen
Marker CTSS und SPP1. 107

Abbildung 4-45: Die mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker S100A8
und TNF α wird durch Gal-Gabe verringert..... 108

Abbildung 4-46: Die Expression der iNOS-mRNA kann nach Gal-Behandlung leicht,
aber nicht signifikant in ApoE^{-/-}-Mäusen reduziert werden..... 109

Abbildung 4-47: Die mRNA-Expression prothrombotischer Mediatoren ist in ApoE^{-/-}-
und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen unverändert. 110

Abbildung 4-48: Gal verringert die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und
ICAM-1 in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen. 111

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 3-1: Genutzte Geräte und deren Hersteller..... | 29 |
| Tabelle 3-2: Zusammensetzung der genutzten Puffer..... | 29 |
| Tabelle 3-3: Zusammensetzung der genutzten Lösungen..... | 30 |
| Tabelle 3-4: Genutzte Reagenzien und deren Hersteller..... | 30 |
| Tabelle 3-5: Zur Genotypisierung der Mäuse genutzte Primer..... | 31 |
| Tabelle 3-6: Für Klonierungen genutzte Primer..... | 32 |
| Tabelle 3-7: Zur qPCR genutzte Primer und Sonden..... | 32 |
| Tabelle 3-8: Genutzte Primär- und Sekundärantikörper..... | 34 |
| Tabelle 3-9: Genutzte Zelllinien und Primärzellen..... | 34 |
| Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Westerntyp-Diät-Futters..... | 40 |
| Tabelle 3-11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Klonierung der Nox1- bzw. Nox2-3'UTR aus murinen cDNA-Proben..... | 42 |
| Tabelle 3-12: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Genotypisierung und Reaktionsbedingungen..... | 44 |
| Tabelle 3-13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur reversen Transkription und Reaktionsbedingungen..... | 47 |
| Tabelle 3-14: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes mit Sonde oder SybrGreen® und die jeweiligen Reaktionsbedingungen..... | 48 |
| Tabelle 3-15: Für UV-Crosslink-Analysen genutzte 3' UTR-Konstrukte und deren Restriktionsenzyme für die Linearisierung..... | 49 |
| Tabelle 3-16: Zusammensetzung von Mix 1 für UV-Crosslink..... | 50 |
| Tabelle 3-17: Zusammensetzung von Mix 2 für UV-Crosslink..... | 50 |
| Tabelle 3-18: Zusammensetzung von Mix 3 für UV-Crosslink..... | 51 |
| Tabelle 3-19: Zusammensetzung von Mix 4 für UV-Crosslink..... | 51 |
| Tabelle 3-20: Zusammensetzung der Luziferasesubstratlösung..... | 52 |
| Tabelle 3-21: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel..... | 54 |

1 Einleitung

1.1 Regulation der Genexpression

Die Genexpression eukaryoter Zellen verläuft in mehreren Schritten, die auf vielfältigen Ebenen reguliert werden, sodass die Zellen angemessen auf äußere Reize reagieren können. Für den Start der Transkription zum Beispiel ist die Zugänglichkeit der zu transkribierenden DNA durch geöffnete Chromatinstrukturen von zentraler Bedeutung. Die genomische DNA einer Zelle ist mit Histonen komplexiert, indem sich die negativ geladene DNA um positiv geladenen Histonoktamere windet, sodass die DNA sich aufspiralisiert. Bei einer starken Aufspiralisierung können sich die zur Transkription der DNA notwendigen Strukturen nicht an diese binden. Sind die DNA-Histonkomplexe jedoch entspiralisiert, kann die Transkription initialisiert werden. Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsregulation ist die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an *cis*-Elemente in den Promotorregionen. Neben der Regulation der Transkription kann weiterhin die Prozessierung der Boten-RNA (mRNA) und der Transport der reifen mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma reguliert werden. Innerhalb des Zytoplasmas bestimmt die Stabilität der mRNA, sowie die Regulation der Translation und posttranslationale Modifikationen die Proteinbiosynthese und die Lebensdauer bzw. Aktivität der Polypeptide. Im Folgenden werden einige dieser Regulationsmechanismen näher betrachtet.

1.1.1 Regulation der Transkription – Promotoraktivität

Für die Transkription eukaryoter Gene sind drei RNA-Polymerasen zuständig. Die RNA-Polymerase I transkribiert die etwa 80 % der Gesamt-RNA ausmachende ribosomale RNA (rRNA), jedoch nicht die 5S-rRNA. Die RNA-Polymerase III ist für die Transkription der Transfer-RNA (tRNA) und einiger weiterer kleiner RNAs zuständig. Proteincodierende Gene und Gene für Mikro-RNAs (miRNA) werden hauptsächlich von der RNA-Polymerase II in RNA umgeschrieben. Die RNA-Polymerasen binden in den Promotorsequenzen der betreffenden Gene, die wiederum die Expression des stromabwärtsliegenden Gens regulieren. Eukaryote Promotoren beinhalten außerdem basale und regulative Bindestellen, die für die Ausbildung des Präinitiationskomplexes wichtig sind. Diese Bindestellen können distal (etwa -200 bp oder mehr), proximal (-50 bis -200 bp) oder im zentralen Bereich (-40 bp bis +50 bp) des Transkriptionsstartes (+1 bp; INR) gelegen sein (Abbildung 1-1).

Einleitung

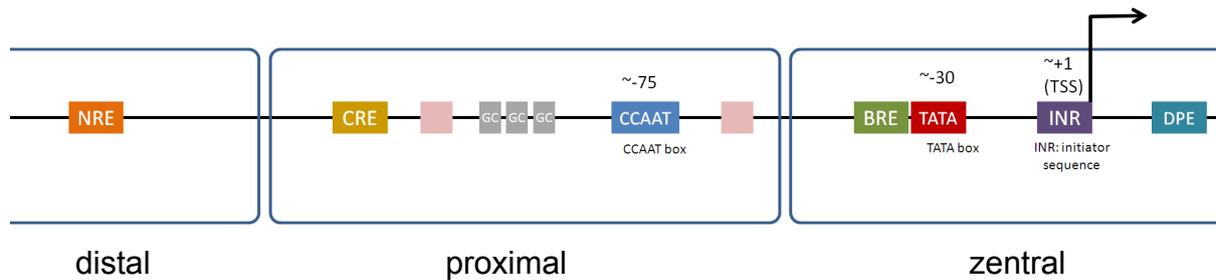


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung einer eukaryoten Promotorsequenz.

NRE: negatives regulatorisches Element; CRE: cAMP responsives Element; GC: GC-reiche Sequenz; CCAAT: CCAAT-Box; BRE: durch den Transkriptionsfaktor IIB erkanntes Element; TATA: TATA-Box; INR: Initiatorsequenz, Transkriptionsstart; DPE: stromabwärts liegendes Promotorelement.

Verändert nach <http://genocon.org/assignment-2012/assignment-a/basic-science-a-eukaryotic-promoter>; 14.09.2013; 20:18 Uhr.

Der basale Promotor eines jeden Gens enthält zumeist eine TATA-Box¹, deren Aktivität durch das Vorhandensein weiterer DNA-Sequenzen moduliert werden kann. Zu diesen Sequenzen gehören GC-reiche Sequenzen wie die *specific protein 1* (Sp1)-Box², cAMP responsive Elemente (CRE)³, die CCAAT-Box⁴, sowie das durch den Transkriptionsfaktor IIB erkannte Element (BRE)⁵. Außerdem können distal liegende Sequenzen wie negativ regulatorische Elemente (NRE) oder hinter dem INR positionierte stromabwärts liegende Promotorelemente (DPE) die Promotoraktivität eines zu transkribierenden Gens beeinflussen. Zu diesen *cis*-agierenden negativ oder positiv regulatorischen Elementen gehören *enhancer*- oder *silencer*-Sequenzen, an welche *trans*-agierende Proteine wie Transkriptionsfaktoren binden, um die Transkriptionsrate zu beeinflussen. Das Zusammenspiel dieser Faktoren dient der Feinregulation der Transkription eines Gens.

Sind alle Komponenten des Transkriptionsapparates wie die RNA-Polymerase, Transkriptionsfaktoren, Mediatoren und chromatinmodulierende Faktoren (z.B. Helikasen) an den Promotor rekrutiert, bildet sich der Präinitiationskomplex (Abbildung 1-2).

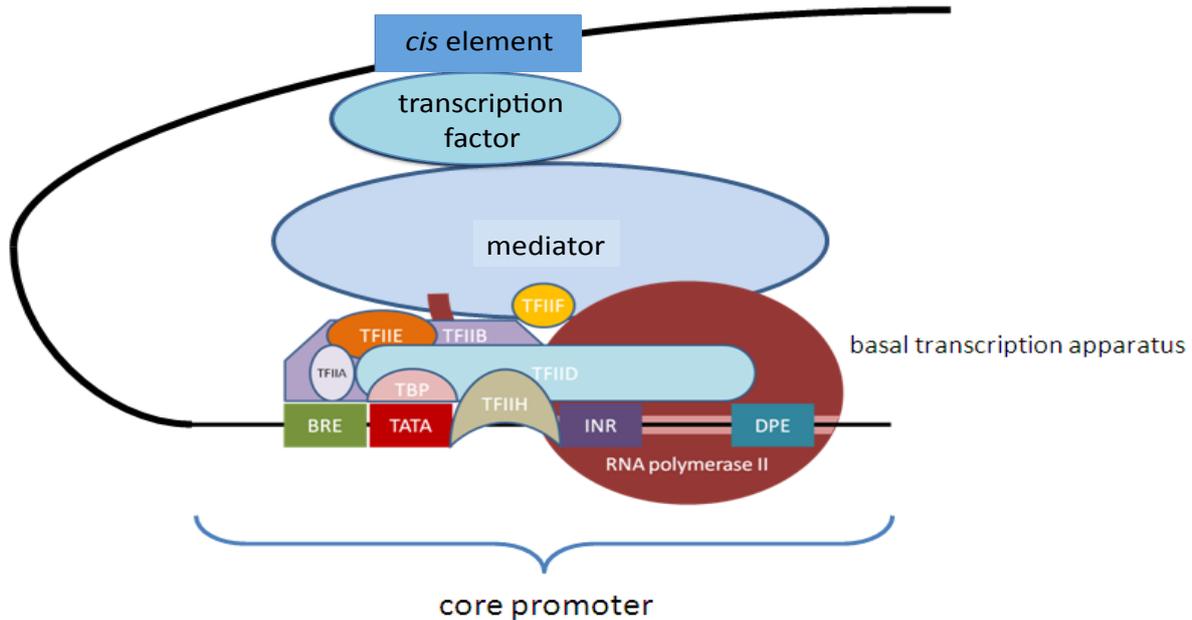


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Präinitiationskomplexes von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen.

TBP: TATA-Box-bindendes Protein; TFIIA, B, D, E, F, H: generelle Transkriptionsfaktoren für die RNA-Polymerase II-vermittelte Transkription; BRE: durch den Transkriptionsfaktor IIB erkanntes Element; TATA: TATA-Box; INR: Initiatorsequenz; DPE: stromabwärts liegende Promotorelemente. Verändert nach <http://genocon.org/assignment-2012/assignment-a/basic-science-a-eukaryotic-promoter>; 14.09.2013; 20:18 Uhr.

Zu den nötigen Transkriptionsfaktoren zählen die generellen Transkriptionsfaktoren IIA, IIB, IID, IIE, IIF und IIH, die für die Funktionalität der RNA-Polymerase II notwendig sind. Außerdem können spezifische Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren oder Repressoren) als Antwort auf bestimmte Umgebungssignale über die Bindung an *cis*-agierende Elemente die Transkriptionsrate über Mediatoren wie Coaktivatoren oder Corepressoren beeinflussen.

Nachdem Helikasen den Promotorkomplex des zu transkribierenden Gens geöffnet haben, werden die ersten Phosphodiesterbindungen ausgebildet und zunächst kurze RNA-Fragmente durch den Einbau von Nukleotiden synthetisiert. Durch Dissoziation verschiedener Transkriptionsfaktoren vom Transkriptionsapparat verlässt der Transkriptionsapparat die Promotorregion und die Elongation der RNA erfolgt. Schon während dieses Prozesses wird an das 5'-Ende der naszierenden RNA die *cap*-Struktur 7-Methylguanylat gebunden. Die RNA-Polymerase II-vermittelte Transkriptionstermination erfolgt nach der Synthese einer spezifischen Polyadenylierungsstelle an bestimmten Terminationssequenzen. Die durch die 5'-*cap*-Struktur vor dem RNA-Abbau geschützte Vorläufer-RNA (hnRNA) wird vor dem Transport in das Zytoplasma in weiteren Schritten prozessiert.

1.1.2 Prozessierung der hnRNA

Der erste Prozessierungsschritt der hnRNA erfolgt mit dem Anhängen der 5'-*cap*-Struktur während der Elongation der Transkription. Dieser *cap* dient neben der Stabilitätserhöhung der RNA außerdem während der Translation als Erkennungssignal für die Bindung der Ribosomen an die RNA. Weiterhin wird an die hnRNA nach dem Entfernen der Polyadenylierungsstelle (AAUAAA) durch Endonukleasen ein 3'-Poly-A-Schwanz angehängen. Dieser dient ebenfalls der erhöhten RNA-Stabilität. Die noch in der hnRNA vorhandenen Intronsequenzen werden während des Spleißens im Spliceosom zumeist in einem Zweischrittverfahren durch Bildung und Freisetzung einer so genannten Lariat-Struktur entfernt.

1.1.3 Kern-Zytoplasmatransport

Die derart prozessierte mRNA, die nur noch die 5'-*cap*-Struktur, den 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR), den proteincodierenden Bereich, die 3'-UTR und den Poly-A-Schwanz besitzt, wird über die zahlreich in der Nukleusmembran vorhandenen Kernporen in das Zytoplasma transportiert. Durch diese Poren können jedoch nur kleine Moleküle (< 20 kDa) uneingeschränkt diffundieren. Größere Proteine oder mRNAs werden aktiv mittels Transportrezeptoren vom Kern in das Zytoplasma transportiert. Hierbei spielen Verpackungsproteine (z.B. TAP) eine wichtige Rolle. Sie dienen dem Transport der mRNA zu den Kernporen und vermitteln über ihre Kernexportsignalsequenzen den Transport durch die Kernmembran⁶. Einige mRNAs, wie z.B. die der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und über 3'-UTR-regulierte mRNAs, werden über einen anderen Mechanismus transportiert. Es konnte beispielsweise für die humane iNOS-mRNA ein von dem nukleären Exportfaktor *chromosome region maintenance 1-* (CRM1-) abhängiger Kern-Zytoplasmatransport nachgewiesen werden⁷, der außerdem abhängig von dem eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4E ist. Diese Regulation des iNOS-mRNA-Transports ist ein Mechanismus, der die iNOS-Expression posttranskriptionell beeinflusst.

1.1.4 Regulation der mRNA-Stabilität

Der Abbau von mRNAs ist ein weiterer Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation. Der mRNA-Abbau kann entweder abhängig oder unabhängig von einem vorherigen Deadenylierungsschritt erfolgen (Abbildung 1-3).

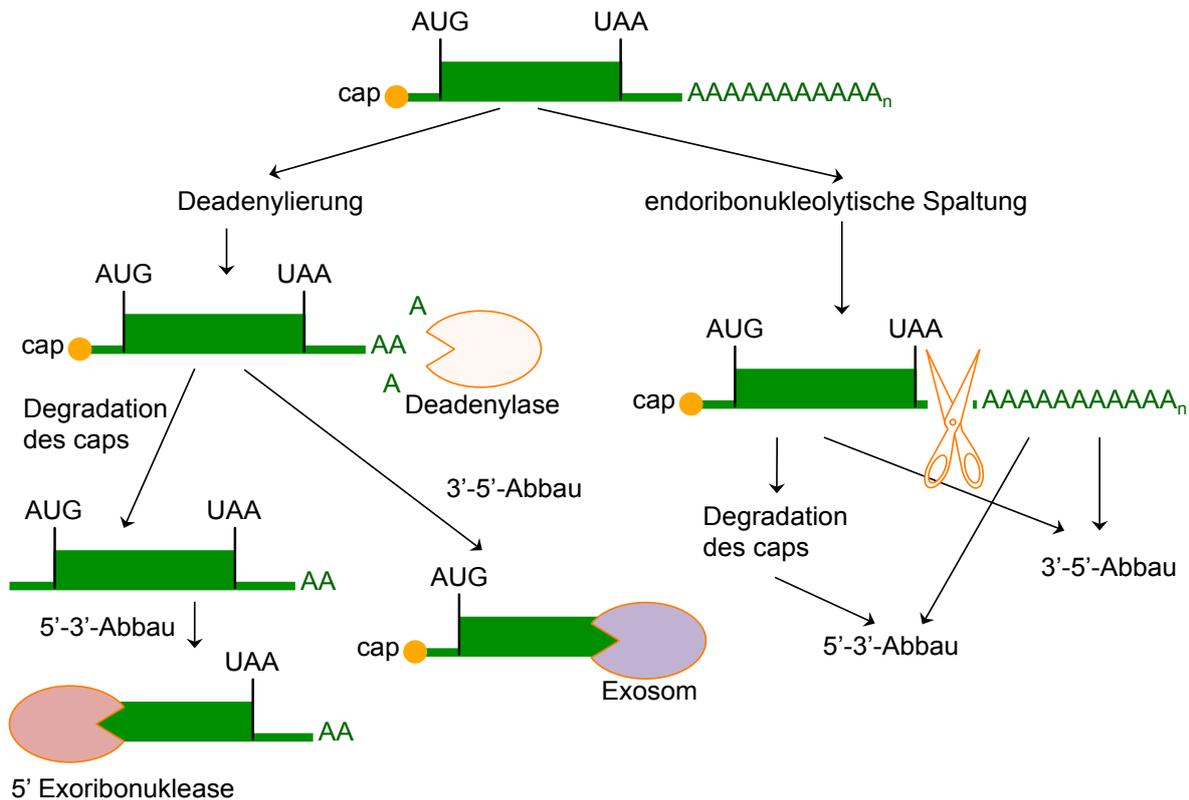


Abbildung 1-3: Deadenylierungsabhängige und -unabhängige Mechanismen des mRNA-Abbaus in Säugerzellen.

Auf der linken Seite sind die deadenylierungsabhängigen Mechanismen des mRNA-Abbaus dargestellt. Auf der rechten Seite des Bildes ist der mRNA-Abbau nach endoribonukleolytischer Spaltung zu sehen. Verändert nach ⁸.

Ein deadenylierungsabhängiger Abbau der mRNA kann in 3'-5'-Richtung nach der Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes durch das Zusammenspiel der drei Deadenylasen (Pan2-Pan3, Ccr4-Not oder PARN) und anschließendem Abbau der ungeschützten mRNA durch das Exosom erfolgen⁹. Der 5'-3'-Abbau ist nach der Deadenylierung und Degradation der 5'-cap-Struktur durch Dcp1-Dcp2, sowie durch eine anschließende Degradation durch Exoribonukleasen möglich¹⁰. Der mRNA-Abbau durch Endoribonukleasen wie z.B. PMR1¹¹ erfolgt wesentlich seltener¹² und kann auch miRNA-vermittelt ablaufen¹³.

Die Lebensdauer instabiler mRNAs wie z.B. von proinflammatorischen Genen wird außerdem über einen weiteren Mechanismus reguliert. Die mRNAs solcher Gene enthalten in ihren 3'-UTR-Bereichen *cis*-agierende AU-reiche Elemente (ARE), über die eine Regulation des mRNA-Abbaus stattfinden kann. Eine Klassifizierung dieser AREs erfolgt nach ihrer Sequenz und den funktionellen Eigenschaften in drei Klassen^{14, 15}. Klasse I und II AREs enthalten vielzählige Kopien des AUUUA-Motifs in der Nähe von U-reichen Sequenzen und sind vor allem in 3'-UTRs der mRNA proin-

flammatorischer Zytokine wie des Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder granulozyten- und monozytenkoloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) zu finden¹⁶. Klasse III AREs fehlt dieses Pentanukleotid (*non-AUUUA*) und es finden sich stattdessen nur prädominante U-reiche Sequenzen, wie z.B. in der 3'-UTR des Jun-Protoonkogens (*c-jun*)¹⁵. An diese *cis*-agierenden Sequenzen können *trans*-agierende Proteine binden und somit posttranskriptionell die Genexpression beeinflussen. Zu diesen RNA-bindenden Proteinen (RNA-BP) gehören unter anderem die auf die mRNA destabilisierend wirkende Proteine Tristetraprolin (TTP)¹⁷, der ARE/poly(U)-bindende Degradationsfaktor (AUF1)¹⁸ oder das KH-Typ regulatorische Spleißprotein (KSRP)¹⁹. Als mRNA-stabilisierende RNA-BP wurde das humane Antigen R (HuR)²⁰ oder das intrazelluläre T-Zellantigen 1 (TIA1)²¹ identifiziert. Die Rolle dieser und anderer RNA-BP zeigt sich in der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen. So kann z.B. eine Dysregulation der TNF α -mRNA-Expression durch RNA-BP zu der Ausbildung von Leukämien führen²² und die erhöhte TNF α -Expression in TTP-defizienten Mäusen führt zu einem chronisch entzündlichen Phänotyp dieser Mäuse²³.

1.2 Das RNA-BP Tristetraprolin (TTP)

Das RNA-BP TTP (oder TIS11, ZFP36) wurde ursprünglich als ein Gen identifiziert, dessen Expression durch Wachstumsfaktoren²⁴ oder Insulinbehandlung²⁵ induziert werden kann. Das TTP-Gen kodiert ein prolinreiches (drei Pro-Pro-Pro-Pro-Wiederholungen), etwa 36 kDa großes Zinkfingerprotein, das an der Destabilisierung AU-reicher mRNAs beteiligt ist²⁶. TTP ist neben BRF-1 (TIS11b, ZFP36L1) und BRF-2 (TIS11d, ZFP36L2), die vor allem in der Region der zwei Zinkfingerdomänen eine über 70 %ige Sequenzidentität zu TTP aufweisen, ein Mitglied der TIS11-Familie²⁷. Außerdem wird in der Plazenta von Nagern zusätzlich das ZFP3613 exprimiert²⁸. Die TTP-mRNA selbst ist mit Halbwertszeiten von 17 Minuten in unstimulierten und 45 Minuten in serumstimulierten Fibroblasten stark reguliert²⁹. TTP verringert über einen negativen *feedback*-Mechanismus durch Bindung an AREs seiner 3'-UTR die eigene Expression^{30, 31}.

1.2.1 Aktivität von TTP

Für die Bindung von TTP an seine Zielstrukturen ist die Integrität der Zinkfingerdomänen von großer Bedeutung. Schon ein einziger Cystein-Arginin-Austausch in einem der beiden Domänen vermindert drastisch die ARE-Bindung von TTP³². Die Aktivität von TTP ist von multiplen Phosphorylierungen durch verschiedene Signalwege

wie die der ERK MAPK-, p38 MAPK- oder PKC-Signalwege abhängig^{33, 34}. Diese posttranslationalen Modifikationen am TTP-Protein können entweder hemmende oder aktivierende Wirkungen auf den TTP-abhängigen mRNA-Abbau haben, wie sie in Abbildung 1-4 beispielhaft dargestellt sind.

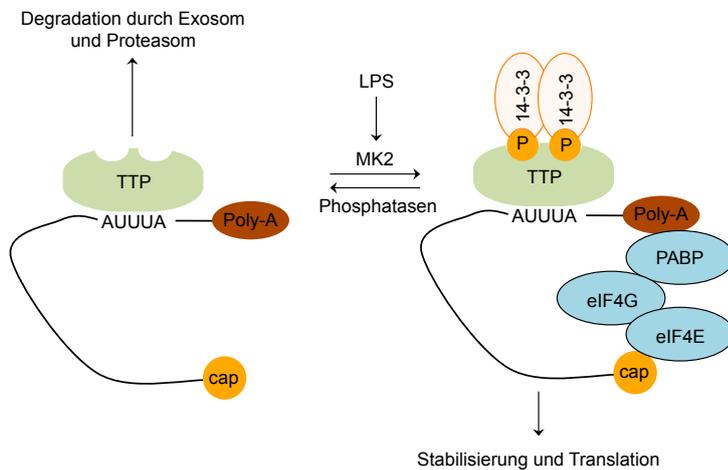


Abbildung 1-4: Kontrolle des TTP-abhängigen mRNA-Abbaus durch Phosphorylierungen des TTP.

LPS: Lipopolysaccharid; MK2: MAPK-aktivierte Proteinkinase 2; 14-3-3: Protein 14-3-3; PABP: Poly-A-bindendes Protein; eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; CAP: 5'-cap-Struktur. Verändert nach ³⁵.

Nach einer p38 MAPK-vermittelten Phosphorylierung der Serine an Position 52 und 178 (Maus)³⁶ bzw. an den Positionen 60 und 186 (Mensch)³⁷ durch die MK2, komplexiert TTP mit dem Adapterprotein 14-3-3. Zum Einen wird durch diese Inaktivierung von TTP die Ziel-mRNA stabilisiert³⁸, zum Anderen wird TTP vor der Degradation durch das Proteasom geschützt^{39, 40} und akkumuliert im Zytoplasma⁴¹. Die Phosphatase 2 konkurriert mit dem Protein 14-3-3 um die Bindung an TTP⁴², dephosphoryliert TTP und fördert so den TTP-abhängigen Abbau der Zielstrukturen.

1.2.2 TTP-abhängiger mRNA-Abbau

TTP, sowie die beiden anderen Mitglieder der TIS11-Familie BRF-1 und -2, bindet spezifisch an das Nonamer-motiv UUAUUUAUU⁴³ in ARE-haltigen mRNAs und sorgt über die Verkürzung des Poly-A-Schwanzes für einen schnellen Abbau der Zielstrukturen¹⁷.

Während der ersten Translationsrunde werden mRNAs, die entweder kein Stoppcodon besitzen (*nonstop mRNA decay*; NSD), bei deren Translation die Elongation zum Stocken gekommen ist (*no-go mRNA decay*; NGD) oder mRNAs mit frühzeitigen Stoppcodons (*nonsense-mediated mRNA decay*; NMD) dem Exosom zum Abbau zur Verfügung gestellt (Zusammengefasst in ⁸). Man geht davon aus, dass TTP während dieses Translations-schrittes den mRNA-Abbau seiner Zielstrukturen vermittelt. Ist die Aktivität der p38 MAPK niedrig, ist TTP an den jeweiligen Serinen unphosphoryliert. TTP rekrutiert spezifisch den Ccr4/Caf1/Not-Deadenylasekomplex über eine Bindung

an Not1, sodass es zu einer Deadenylierung der Ziel-mRNA kommt³⁸. Da TTP in der unphosphorylierten Form nicht vor dem Abbau im Proteasom geschützt ist und eine Proteasominhibierung zu einem Verlust des TTP-vermittelten Abbaus führt, kann es während des ARE-vermittelten mRNA-Abbaus wahrscheinlich auch selbst abgebaut werden⁴⁴. Ist die p38 MAPK-Aktivität jedoch durch z.B. LPS-Stimulation erhöht, ist TTP phosphoryliert und kann keine Bindung mit Not1 eingehen, um den Ccr4/Caf1/Not-Deadenylasekomplex zu rekrutieren. Der TTP-mRNA-Komplex ist vor dem Abbau geschützt und TTP selbst ist in der phosphorylierten Form nicht anfällig für die proteasominduzierte Degradation³⁹. Neben diesem Reaktionsweg, kann TTP auch über eine indirekte Interaktion mit der Deadenylase PARN die Verkürzung des Poly-A-Schwanzes von ARE-haltigen Zielstrukturen induzieren⁴⁵. Die deadenylierte mRNA kann anschließend entweder über einen 5'-3'-Abbau in prozessierenden Strukturen (*P-bodies*) oder über 3'-5'-Abbau durch das Exosom degradiert werden. Die beiden möglichen Wege des TTP induzierten Abbaus ARE-haltiger mRNAs sind in Abbildung 1-5 dargestellt.

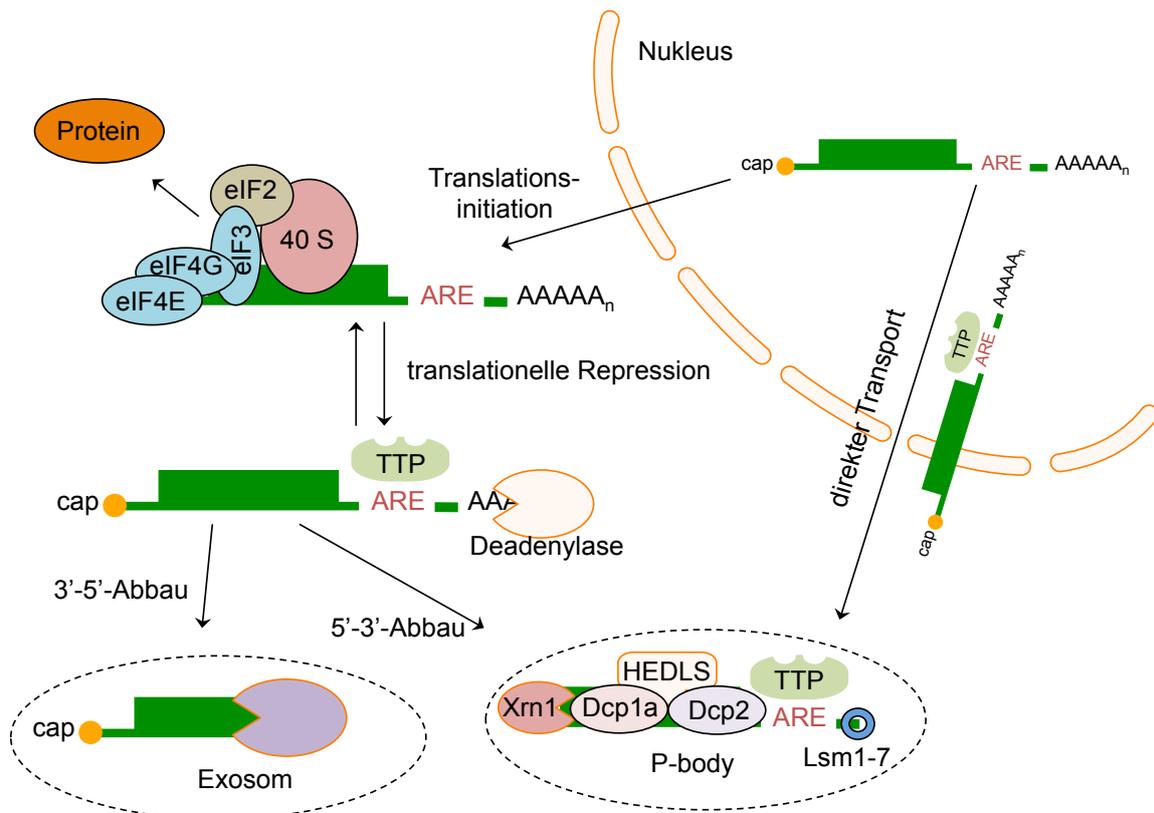


Abbildung 1-5: Schematische Darstellung des TTP-vermittelten Abbaus ARE-haltiger mRNAs.

eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; 40S: 40S-Untereinheit des Ribosoms; Xrn1: Exoribonuklease 1; Dcp: mRNA-*decapping* Enzym; HEDLS: Interaktionsfaktor; Lsm1-7: Sm-ähnliches Protein.
Verändert nach ⁴⁶.

Der 5'-3'-Abbau der deadenylierten mRNA erfolgt in *P-bodies* nach dem Entfernen der 5'-*cap*-Struktur durch die mRNA-*decapping* Enzyme Dcp1a und Dcp2. Anschließend ist die mRNA frei zugänglich für den Abbau durch die Exoribonuklease Xrn1. TTP kann mit Komponenten der *P-bodies* assoziieren und somit die Lokalisation der gebundenen ARE-haltigen mRNA in diesen vermitteln⁴⁷. Außerdem ist TTP über seine Zinkfingerdomänen dazu in der Lage, in Stressgranula, die sich unter Stressbedingungen in der Zelle bilden und translationell arretierte mRNAs, Translationsinitiationsfaktoren, sowie die RNA-BP TIA-1 und TIAR enthalten⁴⁸, einzuwandern⁴⁹. In Immunfluoreszenzmikroskopanalysen konnte gezeigt werden, dass TTP durch die Bindung an die ARE-haltigen mRNAs der Stressgranula einen Kontakt zwischen Stressgranula und *P-bodies* herstellen kann^{49, 50}, sodass es zur Degradation dieser mRNAs kommt.

Da TTP mit dem Exosom interagiert und dieses an die gebundene ARE-haltige mRNA rekrutiert, erfolgt auch ein 3'-5'-Abbau der Ziel-mRNAs über diesen Degradationsweg⁵¹.

Weiterhin ist eine Rolle von TTP als Mitglied des miRNA-abhängigen mRNA-Abbaus in *P-bodies* beschrieben worden. Hierbei ist TTP durch Bindung an die Argonautproteine Ago2 und Ago4 an der gezielten Rekrutierung der ARE-spezifischen miRNA-16 an die TNF α -mRNA beteiligt und führt so zu einem Abbau dieser mRNA⁵².

Da TTP in vielzählige Regulationsmechanismen der Genexpression involviert ist, kommt es nach einem Verlust der TTP-Expression zu dramatischen Konsequenzen für den gesamten Organismus.

1.2.3 Rolle von TTP in Entzündung und Krebs

Ein normales Zellwachstum ist mit einem schnellen Abbau ARE-haltiger mRNAs, die oftmals mRNAs proinflammatorischer Gene sind, assoziiert, sodass die TTP-vermittelte Degradation solcher mRNAs einen wichtigen Kontrollweg darstellt. In der neoplastischen Transformation von Krebszellen konnte ein fehlender Abbau solcher mRNAs beobachtet werden⁵³. Genexpressionsanalysen geben einen Hinweis darauf, dass während früher Phasen der Darmkrebstumogenese der ARE-vermittelte mRNA-Abbau gestört ist⁵⁴, da die TTP-Expression in diesen Phasen bei gleichzeitiger Erhöhung der Expression des mRNA-stabilisierenden Gens HuR stark verringert ist⁵⁵.

TTP ist auf Grund seiner biologischen Funktion unter anderem ein Regulator von vielen proinflammatorischen Zytokinen, die bei einer TTP-Defizienz im Mausmodell

vermehrt exprimiert werden (siehe Kapitel 1.2.4). Jedoch zeigte sich in chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA) keine verringerte TTP-Expression⁵⁶. Eigene Analysen in einem RA-Mausmodell deuten jedoch auf eine verringerte Expression von TTP in entzündeten Gelenken hin⁵⁷. Makrophagen, die mit arteriosklerotischen Plaques assoziiert sind, weisen eine erhöhte TTP-Expressionen auf⁵⁸. Scheinbar kann es während der Progression inflammatorischer Erkrankungen wie der RA eher einer lokalen Induktion der TTP-Expression am Ort der Entzündung kommen. Andererseits zeigten RA-Patienten mit hohen Serumkonzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP), einem Entzündungsmarker mit dem die Arthritisaktivität überprüft wird, eine inverse Korrelation mit der TTP-Expression⁵⁹. Weiterhin konnte in einem Entzündungsmodell des periodontalen Knochenverlustes mit Hilfe von adenovirusproduziertem TTP ein protektiver Effekt durch TTP-Überexpression in Bezug auf den entzündungsmedierten Knochenverlust nachgewiesen werden⁶⁰, sodass sich im Umkehrschluss eine TTP-Limitierung fördernd auf die Ausbildung von inflammatorischen Erkrankungen auswirken könnte. Hierfür liefern auch zwei Studien zu Einzelnukleotidpolymorphismen Hinweise. Im Vergleich einer gesunden Kontrollgruppe mit Patienten mit Autoimmunerkrankungen war der Polymorphismus ZFP36*8, der einen C-T-Austausch im zweiten Exon enthält, welcher zwar nicht zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz des TTP führt, mit einer höheren RA-Erkrankung assoziiert⁶¹. Auch ein Polymorphismus in der TTP-Promotorregion (359 A/G), bei dessen Vorkommen sich die TTP-Promotoraktivität um etwa 50 % verringert, konnte im Vergleich zu RA-Patienten mit heterozygotem Genotyp zu einem früheren RA-Ausbruch führen⁶².

1.2.4 TTP-defiziente Mäuse als Modell einer chronischen Entzündung

Die ersten Analysen zur funktionellen Rolle von TTP wurden von Taylor *et. al.* in Mäusen mit defektem ZFP36-Gen durchgeführt²³. Diese TTP-defizienten (TTP^{-/-}) Mäuse weisen eine massive systemische Entzündung auf, die durch verringertes Wachstum, Abmagerung, Dermatitis, eine myeloide Hyperplasie und erosive Arthritis charakterisiert ist. Außerdem konnten entzündliche Abszesse in dem interventrikulären Septum in diesen Mäusen nachgewiesen werden. Als weiteres Zeichen einer kardiovaskulären Störung in den TTP^{-/-}-Mäusen konnte eine linksseitige Herzklappenentzündung beobachtet werden⁶³. Der chronisch entzündliche Phänotyp der TTP^{-/-}-Mäuse ist zu einem Großteil TNF α -abhängig. Eine Behandlung der Mäuse mit TNF α -Antikörpern kann sowohl den Gewichtsverlust als auch fast alle Symptome

dieser Mäuse verbessern²³. Ein direkter Effekt von TTP auf die TNF α -mRNA konnte durch einen verringerten mRNA-Abbau in TTP^{-/-}-Makrophagen mit einhergehender Erhöhung der TNF α -Expression nachgewiesen werden²⁶. Mittlerweile wurden verschiedenste mRNAs als Zielstrukturen von TTP beschrieben. Zu ihnen zählen neben TNF α unter anderem die mRNAs der proinflammatorischen Gene GM-CSF⁶⁴, IL2, IL3, c-Fos⁶⁵, IL23⁶⁶ oder die genomische RNA des HIV-1⁶⁷.

Da TTP-defiziente Mäuse auf Grund der erhöhten TNF α -Expression dem chronisch entzündlichen Phänotyp von RA-Patienten ähneln⁶⁸ (siehe Kapitel 1.3) und TTP eine inhibitorische Rolle bei der Entwicklung einer RA-assoziierten Arteriosklerose (AS) spielt^{58, 69}, wurden diese Mäuse während der Bearbeitung dieser Doktorarbeit für die Untersuchung der Rolle der TTP-vermittelten chronischen Entzündung auf die frühen Entwicklungsphasen einer RA- bzw. Arteriothromboseerkrankung genutzt.

1.3 Rheumatoide Arthritis und Arteriothrombose

Die RA ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die etwa 0,5 – 1 % der Bevölkerung in Industrieländern betrifft⁷⁰. Die Kardinalsymptome wie Gelenkschwellung, Steifheit und Gelenkschmerzen können zumeist mit einer frühzeitigen antientzündlichen Therapie verbessert werden, jedoch treten somit vermehrt Sekundärsymptome wie kardiovaskuläre Krankheiten, Osteoporosen oder Infektionen auf⁷¹. In der Tat besitzen RA-Patienten ein etwa 50 % höheres Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben als der Rest der Bevölkerung⁷² und diese kardiovaskulären Vorfälle betreffen die RA-Patienten eher als gesunde Patienten⁷³. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Grund für die erhöhte Mortalität von RA-Patienten die Entwicklung einer AS bzw. Arteriothrombose (AT) ist. Klassische Risikofaktoren, die die Ausprägung einer erworbenen AT fördern, wie z.B. Rauchen, Alter und Geschlecht, sowie Bluthochdruck, können nicht allein das gesteigerte kardiovaskuläre Risiko von RA-Patienten⁷⁴ erklären. In RA-freien Patienten erklären diese Faktoren etwa 80 % des Risikos an Herzversagen zu versterben, jedoch ist dies in nur 40 % der RA-Patienten der Fall⁷⁵. Als neuer nicht-traditioneller Risikofaktor einer kardiovaskulären Erkrankung vor dem Hintergrund einer RA gilt der Einfluss der systemischen Inflammation auf die Ausbildung einer erworbenen AT.

1.3.1 Pathogenese der RA

Die Pathogenese der RA, die vor allem die peripheren Gelenke der Finger und Zehen betrifft, beinhaltet das Zusammenspiel diverser immunologischer und inflamma-

torischer Vorgänge, die sich gegenseitig bedingen und verstärken. Verschiedenste Zelltypen wie zum Beispiel dendritische Zellen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten wandern nach Aktivierung der Endothelzellen aus dem Blutstrom in das Gelenkewebe ein, werden dort aktiviert und bewirken die Bildung des Pannus, sowie die Knorpel- und Knochenzerstörung. In Abbildung 1-6 sind die Mechanismen, die zu der Ausbildung einer RA führen, vereinfacht dargestellt.

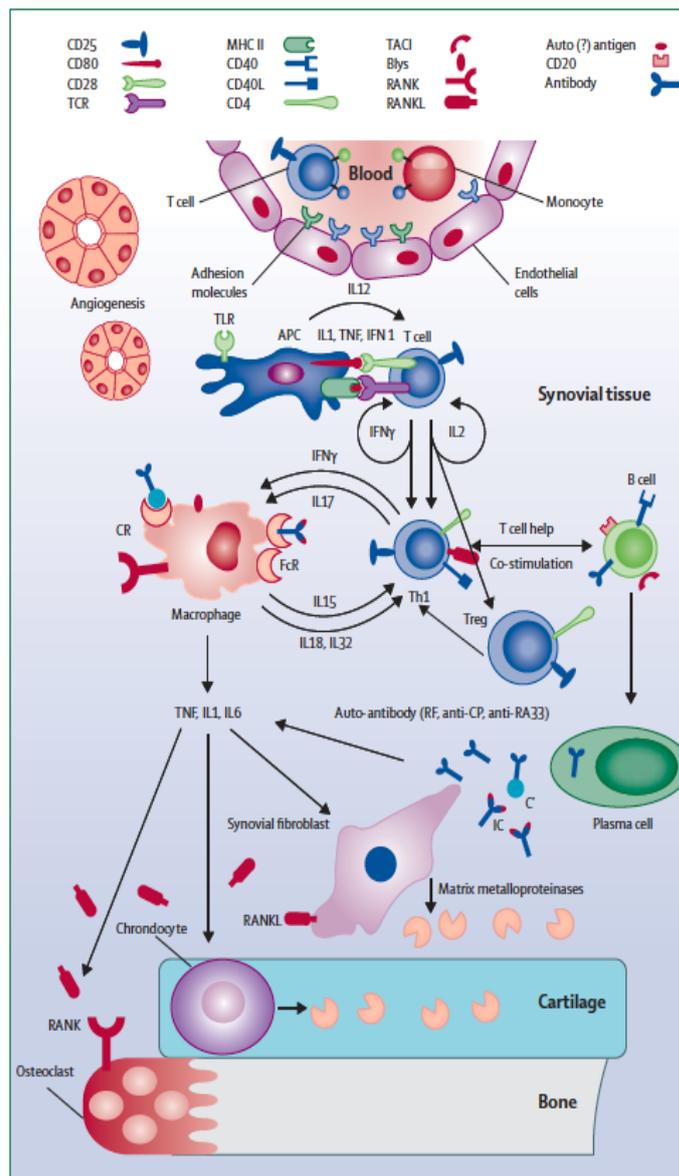


Abbildung 1-6: Darstellung der Pathogenese der RA.

CD: Differenzierungscluster; TCR: T-Zellrezeptor; MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex; TAC1: Transmembranaktivator und Calciummodulator und Zytophyllinligandinteraktor; APC: antigenpräsentierende Zelle; TLR: *toll-like* Rezeptor; Blys: B-Lymphozytenstimulator; RANK: Rezeptoraktivator von NF- κ B; RANKL: RANK-Ligand; IFN: Interferon; IL: Interleukin; RF: Rheumafaktor; TNF: Tumornekrosefaktor α ; CR: Komplementrezeptor; FcR: Rezeptor der konstanten Kette von Antikörpern; Th1: T-Helferzelle vom Typ 1; Treg: regulatorische T-Zelle; CP: citrulliertes Protein; RA33: RA-Antigen (33kDa); IC: Immunkomplex; C': Komplement.

Aus ⁷⁶.

Es wird davon ausgegangen, dass ein bisher unbekanntes Autoantigen⁷⁷, das von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen oder aktivierten B-Zellen präsentiert wird, autoreaktive T-Zellen aktiviert⁷⁸. Etwa 80 % der RA-Patienten besitzen einen spezifischen Polymorphismus in dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), welches für die Präsentation von Antigenen auf APCs zuständig ist. Durch das Vorkommen dieses HLA-DRB1*0401-Allels^{79, 80} wird die Stimulation und Expansion von autoantigenspezifischen T-Zellen gefördert⁸¹. Die Sekretion von Interleukin 2 (IL2), IL12 und Interferon- γ (IFN- γ) durch die aktivierten T-Zellen führt zu der Entwicklung von T-Helferzellen des Typ 1 (Th1), die wiederum Makrophagen, B-Zellen, Fibroblasten⁸² und Osteoklasten⁸³ aktivieren können. Gleichzeitig migrieren durch die ausgeschütteten Zytokine weitere Immunzellen in den Gelenkspalt, werden aktiviert und führen so zu einer Verstärkung der Immunantwort. Die Differenzierung der B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen kann während der RA zu der Bildung von Autoantikörpern gegen IgG (Rheumafaktor), citrullierte Proteine (Anti-CP) oder gegen das RA-Antigen von 33 kDa (Anti-RA33) führen⁸⁴, durch welche das Komplementsystem aktiviert werden kann, sodass weitere Immunzellen in den Synovialspalt einwandern. Auch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen durch aktivierte Makrophagen verstärkt die Aktivierung von Immunzellen, Osteoklasten, Fibroblasten und Chondrozyten. Aktivierte Osteoklasten, Fibroblasten und Chondrozyten sekretieren destruktive Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) oder Kollagenasen, die eine Zerstörung der Knochen- und Knorpelsubstanz verursachen⁸⁵, die bei etwa 80 % der RA-Patienten bereits im ersten Jahr nach der Diagnose durch die andauernde Inflammation im Gelenk zu massiven Schädigungen führt⁸⁶. Die Ausschüttung synovialer Zytokine wie des Rezeptoraktivators von NF- κ B-Liganden (RANKL)⁸⁷, sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL1 und IL6⁸⁸ fördern die Differenzierung, Aktivierung und Einwanderung der Osteoklasten in den Knorpel. Die Osteoblastendifferenzierung von RA-Patienten wird zytokinabhängig inhibiert, sodass das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und Abbau zugunsten des Abbaus verschoben ist^{89, 90}.

1.3.2 Pathogenese der AT

Die AT bezeichnet eine Arterioskleroseerkrankung in den mittleren und großen Blutgefäßen, deren klinische Manifestation die Thrombose ist⁹¹. Lange Zeit wurde die AS als eine passive Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand der großen Arterien verstanden, jedoch hat sich heute die Erkenntnis der Schlüsselrolle der Inflammation

in der Pathogenese der AT durchgesetzt^{92, 93}. Zahlreiche Mediatoren wie z.B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Proteinasen und reaktive Sauerstoffspezies, die in komplexen Netzwerken interagieren, spielen eine große Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung^{94, 95}. Die Entwicklung einer arteriosklerotischen Läsion in einem gesunden Gefäß ist in Abbildung 1-7 vereinfacht dargestellt. Die gesunde Arterienwand setzt sich aus drei Schichten zusammen. Eine Einzelzellschicht aus Endothelzellen bildet die Abgrenzung zum zirkulierenden Blut. Darunter befindet sich die Intima, die aus einigen glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht. Die interne elastische Lamina bildet die Grenzschicht zwischen Intima und darunter liegender Media, die wiederum aus ruhenden glatten Muskelzellen in einer elastinreichen Matrix besteht.

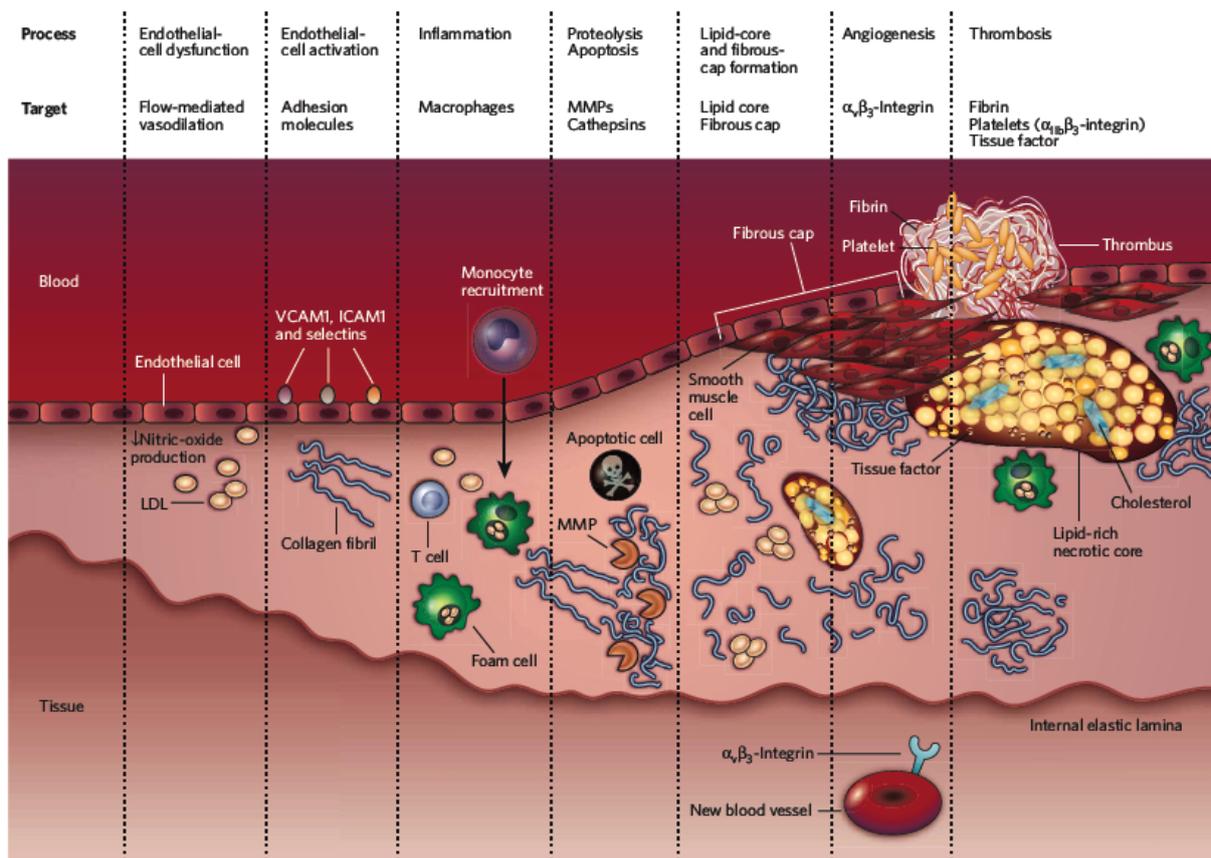


Abbildung 1-7: Die Entwicklung einer arteriosklerotischen Läsion.

Ausgehend von einem gesunden Blutgefäß (ganz links) ist die Entwicklung eines arteriosklerotischen Plaques mit Thrombusbildung (ganz rechts) vereinfacht dargestellt.

LDL: *low density lipoprotein*; VCAM1: vaskuläres Adhäsionsmolekül 1; ICAM1: intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1; MMP: Matrixmetalloproteinase.

Aus⁹⁶.

Die Initiation einer AS-Erkrankung erfolgt meist auf Grund von Änderungen im äußeren Milieu wie oxidativen Stress, durch die es zu einer Aufnahme von Lipiden in die

Gefäßwand und damit zu einer Aktivierung von Endothelzellen kommt⁹⁷. Die Aktivierung der Endothelzellen führt zu einer unbalancierten Produktion von Vasokonstriktoren und –dilatoren, welche zu der Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion (eDF) führt, die als ein früher Marker einer AS-Erkrankung angesehen wird⁹⁸. Außerdem exprimieren aktivierten Endothelzellen verstärkt P- und E-Selektine^{99, 100}, Adhäsionsmoleküle wie das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1)¹⁰¹ und Chemokine¹⁰², sodass T-Zellen, dendritische Zellen (DCs) und Monozyten in die Intima rekrutiert werden. Regionen mit geringem Scherstress oder gestörtem Blutfluss, z.B. an Verzweigungen von Blutgefäßen, sind bevorzugt von der Atherombildung betroffen, da diese Faktoren die Funktion der Endothelzellen und die Verteilung der Adhäsionsmoleküle beeinflussen¹⁰³. Die Infiltration von Immunzellen in die Intima und deren Aktivierung führt zu der Ausschüttung verschiedenster Chemokine, Zytokine oder chemotaktische Stoffe wie z.B. des monozytenchemotaktischen Proteins 1 (MCP-1), T-Zellchemokinen oder des monozytenkoloniestimulierenden Faktors (M-CSF) durch alle beteiligten Zellen^{94, 104}, was zu einem weiteren Einstrom von Leukozyten und Monozyten in den subendothelialen Raum führt. Die eingewanderten Monozyten entwickeln sich durch Vorhandensein des M-CSF zu Makrophagen¹⁰⁵, nehmen über *scavenger*-Rezeptoren oxidiertes Lipoprotein geringer Dichte (oxLDL) auf und differenzieren zu lipidbeladenen Schaumzellen, die charakteristisch für arteriosklerotische Läsionen sind. Diese Schaumzellen sekretieren proinflammatorische Zytokine (z.B. IL8), Prostaglandine oder chemotaktische Zytokine in die Intima. Eingewanderte DCs können LDL-Komponenten wie ApoB100 zur anschließenden Antigenpräsentation in den Lymphknoten aufnehmen und diese naiven T-Zellen präsentieren⁹⁷. Diese Effektor-T-Zellen gelangen über den Blutstrom zu dem Entzündungsort, können dort durch Makrophagen und DCs reaktiviert werden und eine Verstärkung der adaptiven Immunantwort zur Folge haben^{106, 107}. Aktivierte T-Zellen produzieren proarteriosklerotische Mediatoren und tragen so zur Pathogenese der AT bei. Die Entwicklung eines fettreichen Plaques beinhaltet weiterhin die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima durch ausgeschüttete Chemokine und Wachstumsfaktoren. Dort teilen sich die glatten Muskelzellen und sekretieren extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Elastin¹⁰⁸. Immer mehr einwandernde Zellen bewirken über die Zeit die Bildung eines reifen arteriosklerotischen Plaques, der aus einem lipidreichen Kern aus Makrophagen, apoptotischen Zellen und extrazellulärer Matrix besteht, welcher von einer fibrösen Kappe aus sekretierten Kollagen- und Elastinfrag-

menten zur Endothelzellschicht hin abgegrenzt ist¹⁰⁹. Die Ausschüttung der proinflammatorischen Mediatoren durch aktivierte Lymphozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen bewirkt die Freisetzung von kollagendegradierenden MMPs^{110, 111}, sowie den apoptotischen Zelltod in der Läsion. Dadurch freigesetzte Proteinasen, Kollagenasen und Elastasen zersetzen die fibröse Kappe und es kann zu einer Thrombusbildung kommen. Zusätzlich zu der Sekretion von Proteinasen können T-Zellen über die Expression des CD40-Liganden, welcher die Ausschüttung des Prokoagulations *tissue factor* (TF) durch Makrophagen fördert, die Thrombogenese vorantreiben¹¹². Ausgeschüttetes TNF α und IL1 bewirken über die erhöhte Expression von TF in Endothelzellen ebenfalls ein erhöhtes thrombotisches Risiko¹¹³. Kommt der durch z.B. vollständige Ruptur der fibrösen Kappe freigesetzte TF in Kontakt mit den Koagulationsfaktoren des Blutes, kann es zu thrombotischen Komplikationen kommen.

1.3.3 Mechanismen der vorzeitigen AT in der RA-Erkrankung

Die RA und AT sind zwei Krankheiten die stark miteinander verbunden sind. Unter RA-Patienten sind kardiovaskuläre Erkrankungen der häufigste Todesgrund¹¹⁴, der sich jedoch nur teilweise durch die traditionellen Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Bluthochdruck oder Typ-II-Diabetes erklären lässt⁷⁴. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die erhöhte systemische Entzündung ein neuer Risikofaktor für die erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit in RA-Patienten ist¹¹⁵.

Es zeigte sich beispielsweise bei RA-Patienten, dass etwa 48 % aller arteriosklerotischer Plaques in der linken Koronararterie instabil waren, jedoch nur 22 % bei Patienten ohne RA. Dies kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass die Ursache einer kardiovaskulären Erkrankung in RA-Patienten eine andere sein könnte als in Patienten ohne RA und dass die chronische Entzündung in diesen Patienten eine größere Rolle in der Ausprägung der Krankheit spielt¹¹⁶. Es zeigen sich zahlreiche Ähnlichkeiten zwischen den inflammatorischen Signalwegen der RA und AT (siehe Abbildung 1-8).

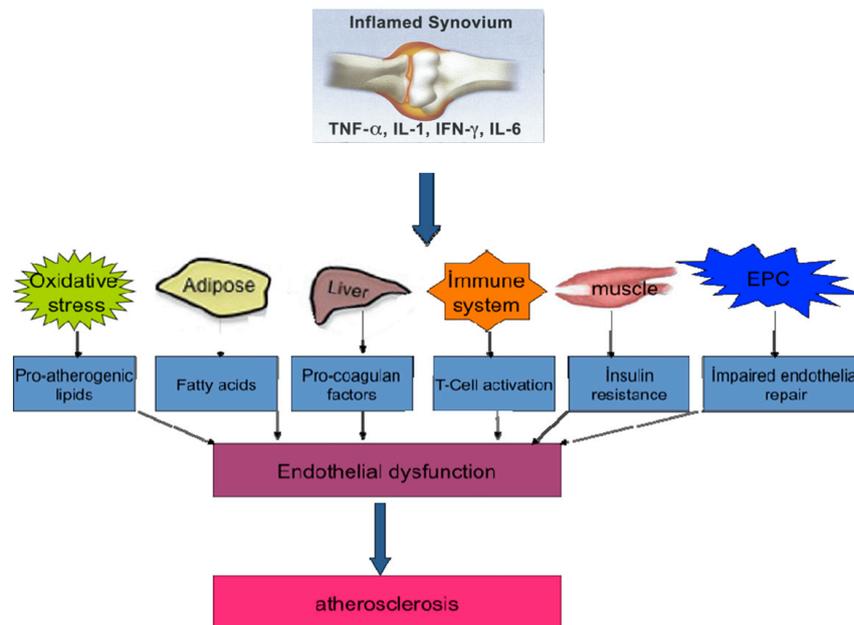


Abbildung 1-8: Zusammenhang der inflammatorischen Prozesse, die zu einer AS-Ausbildung in RA-Patienten führen können.

Dargestellt ist, wie die während einer RA ausgeschütteten Zytokine systemisch wirken und Effekte auf verschiedene Organe ausüben. Dies führt zu einem proatherogenen Profil, welches die Entwicklung einer eDF als erstes Symptom einer erworbenen Arteriosklerose begünstigt.

EPC: endotheliale Vorläuferzelle; IFN- γ : Interferon- γ ; IL: Interleukin; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α .
Verändert nach ¹¹⁷.

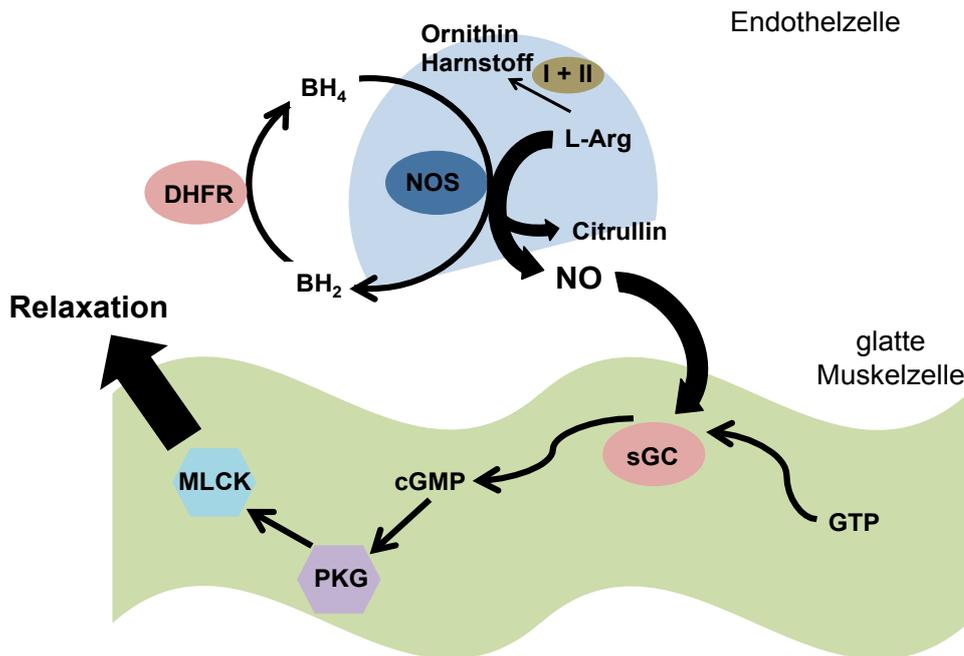
Das rheumatoide Gelenk und arteriosklerotische Plaques weisen eine ähnliche Akkumulation von T-Zellen, Makrophagen und Monozyten auf. Diese aktivierten Immunzellen tragen durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL6, sowie durch die Sekretion von MMPs zu der Ausprägung der Krankheiten bei^{117, 118}. Auch die Neoangiogenese, die als ein wichtiger Faktor in der RA-Entwicklung gesehen wird¹¹⁹, trägt zu der Atherogenese bei¹²⁰. Die proinflammatorischen Zytokine wie TNF α , IL1, IL6 und IFN- γ , die im Gelenk von RA-Patienten ausgeschüttet werden, gelangen in die systemische Zirkulation und wirken auf verschiedenste Organe wie die Leber, das Endothel, Muskeln oder Immunsystem¹²¹. Dort führen sie zu Veränderungen, die ein proatherogenes Profil fördern, welches unter anderem durch erhöhten oxidativen Stress, Insulinresistenz und die Ausprägung einer endothelialen Dysfunktion gekennzeichnet ist¹¹⁷.

Auf Grund der starken Verzahnung beider Krankheitsbilder ist das Verständnis der gemeinsamen Pathomechanismen notwendig, um eine RA-Erkrankung zu behandeln und gleichzeitig das AT-Risiko und die damit verbundenen kardiovaskulären Vorfälle zu senken.

1.3.4 Rolle von oxidativem Stress in RA und AT

Die Aktivierung der Endothelzellen während der RA- und AT-Pathogenese führt unter anderem zu einer unbalancierten Freisetzung von Vasokonstriktoren und -dilatoren und dadurch zu der Entwicklung einer eDF. Sowohl RA-Patienten als auch AS-Patienten zeigten eine schlechtere endothelabhängige Relaxation als die Kontrollkohorten^{122, 123}. Die während der RA- und AS-Erkrankung ausgeschütteten proinflammatorischen Moleküle begünstigen die Ausbildung einer eDF, die durch erhöhte Expressionen von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen¹²⁴, sowie durch eine verringerte Produktion des Vasodilators Stickstoffmonoxid (NO)¹²⁵ charakterisiert ist. Ein weiterer Faktor für die Ausbildung der eDF stellt oxidativer Stress dar¹²⁶, der durch eine Erhöhung von reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS; zusammen: RONS) gefördert wird. RONS nehmen auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit des wichtigsten Vasodilators NO bzw. auf nachgeschaltete Signalwege (schematische Darstellung siehe Abbildung 1-9) und beeinflussen so die Vasodilatation der Gefäße.

A Physiologischer Zustand



B Oxidativer Stress

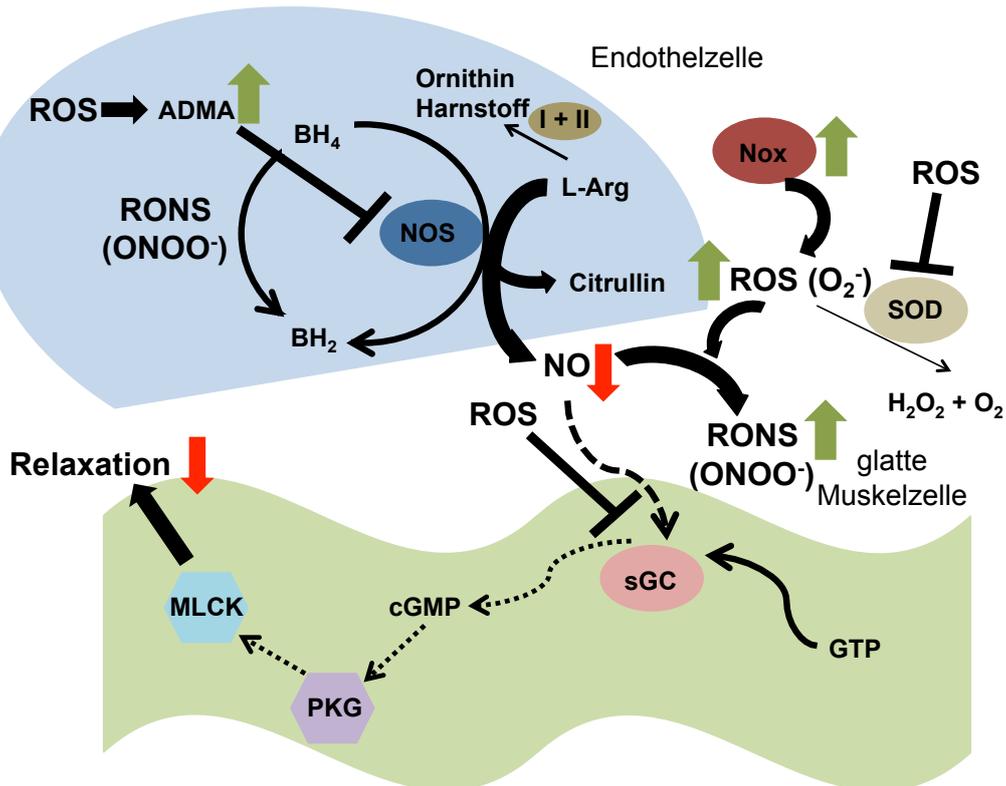


Abbildung 1-9: Wirkung des oxidativen Stresses auf die NO-abhängige Gefäßrelaxation.

Schematische Darstellung der NO-abhängigen Vasodilatation unter physiologischen Bedingungen (A) und unter dem Einfluss von oxidativem Stress (B).

I + II: Arginase-1 und -2; L-Arg: L-Arginin; NOS: NO-Synthase; ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin; BH₄: Tetrahydrobiopterin; BH₂: Dihydrobiopterin; DHFR: Dihydrofolatreduktase; ONOO⁻: Peroxynitrit; SOD: Superoxiddismutase; Nox: NADPH-Oxidase; O₂⁻: Hyperoxidanion; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; sGC: lösliche Guanylylcyclase; GTP: Guanositriphosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; PKG: Proteinkinase G; MLCK: Myosinleichtkettenkinase.

Unter physiologischen Bedingungen katalysieren NO-Synthasen (NOS) der Endothelzellen die Bildung von NO und Citrullin aus L-Arginin unter Beihilfe verschiedener Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH₄). Das freigesetzte NO bewirkt in den glatten Muskelzellen eine Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC)¹²⁷ und somit die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP aktiviert wiederum die Proteinkinase G (PKG), welche die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) derart moduliert, dass die Gefäße relaxieren. Das bei der Reaktion der NOS entstehende Dihydrobiopterin (BH₂) wird mit Hilfe der Dihydrofolatreduktase zu BH₄ recycelt. Zu einer Verringerung des NOS-Substrates L-Arginin kann es durch die Konkurrenzreaktion von L-Arginin mit den Arginasen-1 oder -2 zu Ornithin und Harnstoff kommen. Unter Bedingungen von oxidativem Stress verändert sich der beschriebene NO-Metabolismus drastisch. So kommt es durch Anwesenheit von oxLDL¹²⁸ oder oxidativen Stress¹²⁹ zu erhöhten Methylierungen von Argininresten in Endothelzellen und damit zu einer Akkumulation des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA). ADMA wurde als Inhibitor der endothelialen NOS beschrieben¹²⁹ und verringert die Synthese von NO in Endothelzellen unter oxidativem Stress. Kardiovaskuläre Risikofaktoren erhöhen die Expression der NADPH-Oxidasen (Nox) und tragen so zu einer vermehrten ROS-Bildung bei. So wurden in Coronararterien von AS-Patienten erhöhte Nox2- und Nox4-Expressionen nachgewiesen¹³⁰. Freigesetztes NO und ROS reagieren etwa 3-4fach schneller zu Peroxynitrit als die Abbaureaktion von ROS zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, welche von Superoxiddismutasen (SOD) katalysiert wird¹³¹. Somit wird die Bioverfügbarkeit von NO weiter gesenkt¹³². Außerdem führen ROS durch Inhibierung der löslichen Guanylylcyclase zu einer verringerten Gefäßrelaxation¹³¹. Durch RONS kann weiterhin der oxidative Stress erhöht werden, da sie zu einer Entkopplung der NO-Synthasen mit gleichzeitiger O₂⁻-Generierung führen¹³³.

Eine Erhöhung des NO-Spiegels hat nicht nur protektive Wirkung vor der Ausbildung einer eDF, sondern kann auch die Infiltration und Aggregation von Immunzellen wie Thrombozyten und Leukozyten, sowie die Migration und das Wachstum von glatten Muskelzellen während der AS-Pathogenese verringern¹³⁴.

1.3.5 Der Transkriptionsfaktor nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)

Unter oxidativem Stress verhindern zwei verschiedene Schutzmechanismen die Akkumulation von ROS in den Zellen. Zum Einen können antioxidative Verbindungen

wie Vitamin C und E, die mit der Nahrung aufgenommen werden, das ROS-Ungleichgewicht in den Zellen verhindern¹³⁵. Zum Anderen werden Phase II-Enzyme wie Glutathion-S-Transferasen (GST) vermehrt exprimiert, welche die Konjugation von polaren Resten an die reaktiven Verbindungen katalysieren, sodass diese neutralisiert und ausgeschieden werden können¹³⁶. Auch eine Detoxifikation des akkumulierenden ROS durch Enzyme, die nicht zu dem Phase II-Metabolismus gezählt werden, ist möglich. Zu diesen Enzymen gehören die Hämoxxygenase 1 (HO-1) oder die NAD-(P)-H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1). In den regulatorischen Regionen der Gene von z.B. GST oder NQO1 finden sich antioxidansresponsive Elemente, an die Proteine des *Kelch ECH associating protein 1*- (Keap1)-Nrf2-Signalweges binden. Dieser Keap1-Nrf2-Signalweg reguliert die Zellantwort in Bezug auf endogenen oder exogenen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder Elektrophile^{137, 138}. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist unter basalen Bedingungen an zwei Keap1-Moleküle gebunden, wird polyubiquitiniert und im Proteasom degradiert^{139, 140}. Medikamente¹⁴¹, Umwelteinflüsse wie Zigarettenrauch oder oxidativer Stress, führen zu einer Dissoziation von Nrf2 aus dem Komplex durch Modifikation der Keap1-Cysteine. Nrf2 wird nicht ubiquitiniert und gelangt in den Nukleus. Dort bildet Nrf2 Heterodimere mit dem kleinen Maf-Protein und bindet an die antioxidansresponsiven oder elektrophilenresponsive Elemente¹⁴² seiner Zielgene, die in der Glutathion-synthese, Medikamententransport und Elimination von ROS involviert sind^{143, 144}, und erhöht die Expression dieser.

1.3.6 Diabetes als klassischer Risikofaktor für die AT in einer RA-Erkrankung

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, bei der Patienten hohe Blutglukosespiegel aufweisen. Diese Hyperglykämie kommt entweder durch zu geringe Insulinbildung durch den Pankreas (Typ I-Diabetes) oder durch eine Insulinresistenz der Körperzellen (Typ II-Diabetes) zustande. In beiden Fällen wird die Entstehung einer eDF begünstigt¹⁴⁵. Es konnte gezeigt werden, dass kardiovaskuläre Erkrankungen häufiger in Zusammenhang mit einer Typ I- oder II-Diabetes auftreten^{146, 147}. RA-Patienten können eine ähnliche Symptomatik zeigen¹⁴⁸. Das sogenannte metabolische Syndrom, welches durch eine zentrale Fettleibigkeit, Bluthochdruck, hohe Triglycerid- und geringe *high density lipoprotein* (HDL)-Werte gekennzeichnet ist, tritt häufig mit einer Insulinresistenz auf¹⁴⁹. Das metabolische Syndrom während einer RA-Erkrankung zeigt sich außerdem durch eine abnormale viszerale Fettverteilung und die Produktion verschiedene Zytokine wie z.B. TNF α und

IL6 durch die Adipozyten, welche die Ausbildung einer Insulinresistenz fördern¹⁵⁰. Die durch die Insulinresistenz verstärkte Typ II-Diabetes begünstigt wiederum das Entstehen einer endotheliale Dysfunktion, wodurch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht wird¹⁵¹. Eine RA-Erkrankung fördert jedoch auch ihrerseits die Ausprägung des metabolischen Syndroms. Es zeigte sich, dass weibliche RA-Patienten durch die beeinträchtigte körperliche Aktivität, die mit dieser Erkrankung einhergeht, erhöhte oxLDL-Spiegel und Insulinresistenzen aufwiesen¹⁵².

Die eDF, die früh während einer Diabeteserkrankung zu Tage tritt¹⁵³, führt zu einem erhöhten Atherogeneserisiko¹⁵⁴, sodass Diabetes als ein wichtiger Faktor für das Vorkommen kardiovaskulärer Ereignisse gilt¹⁵⁵.

1.3.7 Behandlung der RA

Da RA-Patienten ein etwa 50 % höheres Risiko besitzen, an kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben als der Rest der Bevölkerung⁷², ist ein wirksames Therapiekonzept für diese Patienten nötig. Zur Zeit werden fünf Medikamentenklassen für die Behandlung von RA-Patienten genutzt: Diese Klassen beinhalten Analgetika, nicht-steroidale antientzündliche Medikamente (NSAIDs), Glukokortikoide, sowie nicht-biologische und biologische krankheitsmodifizierende Antirheumatika (DMARDs). Mittel der Wahl sind zur Zeit biologische und nicht-biologische DMARDs, da sie den Therapieerfolg stark verbessern konnten. Zeigen die Patienten eine schlechte Antwort auf ein oder zwei nicht-biologische DMARDs, wird eine Behandlung mit biologischen DMARDs empfohlen¹⁵⁶.

Für die Langzeittherapie aber auch während akuter Krankheitsschübe können außerdem Analgetika und NSAIDs eingesetzt werden. Zu den kurzwirksamen NSAIDs, die eingesetzt werden, gehören Ibuprofen oder Diclofenac, zu den langwirksamen Naproxen oder Nabumeton¹⁵⁶. Es ist jedoch bekannt, dass sich die Gabe von NSAIDs schädigend auf die Magenschleimhaut auswirkt und die Ulkusbildung begünstigt¹⁵⁷. Die Nebenwirkungen dieser nicht-selektiven Cyclooxygenase-2 (Cox-2)-Hemmer konnten zum Teil durch Therapien mit selektiven Cox-2-Hemmern wie Celecoxib¹⁵⁸ oder Refecoxib¹⁵⁹ verringert werden. Diese Medikamente beeinflussen nicht den Cox-1-Signalweg, über den die magenschleimhautschützenden Prostaglandine synthetisiert werden, sondern hemmen spezifisch nur die Produktion der entzündungsrelevanten Prostaglandine über den Cox-2-Signalweg¹⁶⁰. Im Vergleich zu einer Behandlung mit Naproxen erhöhen selektive Cox-2-Hemmer jedoch das Risiko kardiovaskulärer Vorfälle in ähnlichem Maße wie eine Hochdosistherapie mit

traditionellen NSAIDs wie Diclofenac oder Ibuprofen¹⁶¹ und sind daher eher ungeeignet für die Therapie kardiovaskulärer Risikopatienten.

Um die Krankheitsaktivität während einer aktiven RA zu verringern, werden die Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Glukokortikoiden wie Prednisolon oder Triamcinolon und DMARDs behandelt, da diese Kombination verbesserte Krankheitsverläufe zur Folge hatte als eine DMARD-Monotherapie¹⁶². Um jedoch Langzeitschädigungen zu vermeiden, muss die Dosis der Glukokortikoide in der Langzeittherapie minimal, d.h. unter der Cushing-Grenze mit maximal 7,5 mg/Tag Prednisolon, gehalten werden.

Zu den meistgenutzten nicht biologischen DMARDs gehören Methotrexat, Sulfasalazin, Leflunomid und Hydroxychloroquin. Methotrexat als erste Wahl DMARD ist ein Folsäureantagonist, der die T-Zellaktivierung hemmt und als Mono- oder Kombinationstherapie verabreicht werden kann. Bekannte Nebenwirkungen sind unter anderem Übelkeit, Mundgeschwüre oder Haarausfall. Methotrexat darf u.a. nicht von Schwangeren eingenommen werden. Eine Kombinationstherapie aus Methotrexat, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin zeigte einen verbesserten Effekt in Patienten mit schlechter Antwort auf Methotrexat oder andere DMARD-Monotherapien¹⁶³.

Therapien mit biologischen DMARDs beinhalten die Nutzung von TNF α -Inhibitoren (z.B. Infliximab, Etanercept), die Anti-B-Zelltherapie (Rituximab), T-Zellcostimulationsblocker (Abatacept), die Anti-IL6-Therapie (Tocilizumab), Anti-IL1-Therapie (Anakinra) oder Proteinkinaseinhibitoren (Tofacitinib). Diese Medikamente sind direkt gegen wichtige Komponenten der Inflammationskaskade der RA gerichtet. Neben der Wirkung und den Nebenwirkungen wie Antikörperbildung gegen die verwendeten Antikörperpräparate oder ein erhöhtes Infektionsrisiko dieser biologischen DMARDs spielen auch die relativ hohen Kosten eine Rolle bei der Wahl dieser Medikamente. Die Behandlung mit TNF α -Inhibitoren in Kombination mit Methotrexat konnte in einigen Studien das kardiovaskuläre Risiko in RA-Patienten senken¹⁶⁴. Andere Studien zeigten keinen Mehrwert dieser Therapie in Bezug auf die Senkung des kardiovaskulären Risikos¹⁶⁵.

Trotz der verbesserten RA-Therapien ist es auf Grund der immensen Nebenwirkungen wichtig, wirksame und sichere Medikamente zu finden.

1.3.8 Neue Substanzen zur Behandlung der RA und AT

Da die Nebenwirkungen der Patientenbehandlung mit antirheumatischen Medikamenten sehr massiv sind und die bisher verfügbaren Medikamente nicht zu einer

100 %igen Remission dieser Patienten führen können, ist die Untersuchung neuer wirksamer und zugleich nebenwirkungsarmer Therapiekonzepte nötig.

Als eine neue Strategie der Analyse von potenziell antientzündlichen Stoffen isoliert die Gruppe um PD Dr. Erkel in Kaiserslautern Sekundärmetabolite aus Pilzen und analysiert diese in Zellkulturmodellen auf ihr antiinflammatorisches Potenzial. Auf diese Weise gelang es, mehrere Substanzen, die in pathophysiologische Signalwege eingreifen können, zu gewinnen. Zu diesen gehören die Pilzsekundärmetabolite (S)-Curvularin, Oxacyclododecindion und Galiellalacton (Gal)¹⁶⁶.

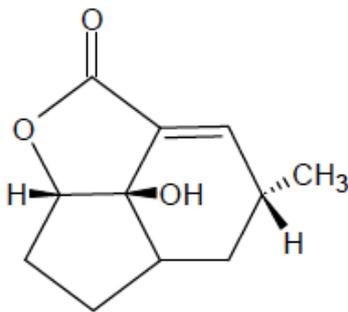


Abbildung 1-10: Strukturformel des Pilzsekundärmetaboliten Galiellalacton.

Gal wurde aus dem Ascomyceten *Galiella rufa* (A111-95)¹⁶⁷ isoliert und konnte in zellbasierten Reporteranalysen die IL6-abhängige Aktivierung des Signalweges der Januskinase/Signaltransduktor und Aktivator der Transkription (JAK/STAT) für die Induktion der Akutphasenantwort inhibieren¹⁶⁸. Dabei verhindert Gal die Bindung der aktivierten Stat3-Dimere an ihre DNA-Bindestellen. Außerdem zeigte sich Gal dazu in der Lage, in einem murinen Asthmodell die Sekretion von IL6 zu reduzieren¹⁶⁹. Da IL6 eine Schlüsselrolle in der Progression der rheumatischen Arthritis und Arteriosklerose einnimmt, wurde Gal im Rahmen dieser Doktorarbeit in einem AS- und AT-Mausmodell getestet, um dessen antientzündliches Potenzial zu untersuchen.

1.3.9 ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse als Modell einer AS- bzw. AT-Erkrankung

Die Ursachen einer AS-Erkrankung sind komplex (siehe Kapitel 1.3.2, 1.3.3, 1.3.4) und bei der Pathogenese wird die AS unter anderem vom Lipidmetabolismus beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen im Katabolismus von cholesterinreichen Lipiden ein Grund für die Entwicklung von Hypercholesterinämien und AS sind: Defekte im LDL-Rezeptor (LDLR) führen zu einer familiären Hypercholesterinämie¹⁷⁰ und Mutationen in einem der LDLR-Liganden Apolipoprotein E (ApoE) füh-

ren zu der Ausbildung einer Typ III-Hyperlipoproteinämie¹⁷¹ mit gleichzeitiger Erhöhung des kardiovaskulären Risikos¹⁷².

Verschiedenste Tiermodelle wurden für Untersuchungen der Pathogenese und Behandlung arteriosklerotischer Läsionen genutzt (z.B. Hasen, Schweine, Affen), jedoch haben sich Mäuse als Tiermodell einer AS durchgesetzt. Wildtypmäuse sind *per se* resistent gegen die Ausprägung einer AS. Werden jedoch C57BL/6-Mäuse mit fett- oder cholesterinreicher Diät gefüttert, entwickeln sie vaskuläre Läsionen¹⁷³. Da Mäuse (mehr HDL) ein grundsätzlich anderes Lipidprofil als Menschen (ca 75 % LDL) aufweisen, unterscheiden sich diese Läsionen in ihrer Zusammensetzung stark von humanen Läsionen^{174, 175}. Mäuse mit einer Defizienz im ApoE- oder LDLR-Gen zeigen eine dem Menschen ähnliche Hypercholesterinämie und sind daher als Mausmodelle für eine spontane futterinduzierte AS etabliert. LDLR-defiziente Mäuse bilden futterabhängig arteriosklerotische Läsionen aus. Mit normaler Chow-Diät zeigen sie zwar erhöhte LDL- und VLDL-Spiegel, arteriosklerotische Läsionen lassen sich aber nicht nachweisen. Werden sie mit fettreichen Diäten wie der Westerntyp-Diät gefüttert, bilden sich große Plaques aus.

Die für die Untersuchung der AS am besten geeigneten Mäuse sind ApoE-defiziente Mäuse, da sie sowohl eine Hypercholesterinämie als auch spontane arteriosklerotische Läsionen ausbilden¹⁷⁶. ApoE ist ein Glykoprotein, das in der Leber, im Gehirn und anderen Organen gebildet wird. Es ist ein struktureller Bestandteil von Lipoproteinen (außer LDL) und vermittelt nach der Bindung an seine Rezeptoren (z.B. LDLR) die Aufnahme ApoE-haltiger Partikel in die Leber¹⁷⁷. ApoE-defiziente Mäuse (ApoE^{-/-}) zeigen nach Fütterung mit normaler Chow-Diät einen spezifischen Phänotyp, der durch erhöhte Gesamtplasmalevel und Triglyceride bei verringerten HDL-Mengen gekennzeichnet ist¹⁷⁸. Die Analyse der AS-Erkrankung der ApoE^{-/-}-Mäuse zeigte, dass diese in ihrem Verlauf der Plaquebildung dem anderer Tiermodelle und dem humanen Fall ähnelt¹⁷⁶. Werden diese Mäuse mit fettreicher Westerntyp-Diät gefüttert, erhöhen sich zum Einen die VLDL- und LDL-Spiegel im Serum, zum Anderen treten Plaquebildung und Formierung fibrotischer Plaques früher auf als in genotypgleichen Mäusen, die mit Chow-Diät gefüttert wurden¹⁷⁹. Ein Nachteil des ApoE^{-/-}-Mausmodells ist jedoch, dass keine spontanen Plaquerupturen auftreten. Thrombosen müssen in diesem Tiermodell erst durch verschiedene Techniken wie die Behandlung mit Eisenchlorid¹⁸⁰ oder photochemische Reaktion¹⁸¹ induziert werden.

2001 publizierte die Gruppe um Dr. Eitzmann, dass ApoE^{-/-}-Mäuse, die eine heterozygote Inaktivierung des Gewebefaktorsignalweginhibitors (TFPI) aufwiesen, ein größeres Thrombose- und AS-Risiko als ApoE^{-/-}-Mäuse zeigten¹⁸². TFPI ist ein Kunitztyp Proteinaseinhibitor, der den extrinsischen Weg der Blutgerinnung reguliert, indem er die Bildung des katalytischen Komplexes aus TF und Gerinnungsfaktor VIIa inhibiert¹⁸³, der für die Initiation der extrinsischen Blutgerinnung zuständig ist. Die Plasmakonzentration von TFPI ist mit 2 nM eher gering und zirkulierendes TFPI ist vor allem an LDL assoziiert¹⁸⁴. Plättchenassoziiertes TFPI, das in etwa 10 % des zirkulierenden TFPI ausmacht, kann nach Thrombinstimulation freigesetzt werden¹⁸⁵. Zusätzlich scheinen Endothelzellen dazu in der Lage zu sein, glukosaminoglykangebundenes TFPI zu produzieren^{186, 187}. Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression des TFPI das Thromboserisiko nach vaskulärer Verletzung reduziert^{188, 189}. Eine verringerte Expression des TFPI führte im Kaninchenmodell zu einem erhöhten Risiko einer Stenose der Karotisarterie¹⁹⁰. Etwa 60 % der Mäuse mit kompletter TFPI-Defizienz versterben schon während der Embryonalphase zwischen Tag E9.5 und E11.5 auf Grund einer Dottersackblutung¹⁹¹. Schwerwiegende Blutungsstörungen im Zentralnervensystem treten bei den TFPI^{-/-}-Mäusen nach Tag E11.5, sodass sie die neonatale Periode nicht überleben¹⁹¹. In TFPI-heterozygoten Mäusen (TFPI^{+/-}) ist das zirkulierende TFPI im Vergleich zu Wildtyptieren um etwa 60 % reduziert und funktionelle Tests ergaben eine Reduktion der TFPI-Aktivität um 50 %¹⁹¹. Auf Grund des erhöhten AS- und Thromboserisikos in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen nach 30wöchiger Fütterung mit normaler Chow-Diät, wurden sowohl ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}- und ApoE^{-/-}-Mäuse während der Durchführung dieser Doktorarbeit genutzt, um die Wirkung des Pilzsekundärmetaboliten Gal auf das AS- und AT-Risiko zu untersuchen.

2 Zielsetzung

Chronisch entzündliche Erkrankungen wie die RA sind mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität auf Grund von verstärkten arteriosklerotischen und thrombotischen Vorfällen assoziiert. Bisher ist jedoch noch nicht vollständig klar, wie die abnormale Expression proinflammatorischer Mediatoren von RA-Patienten zu diesem gesteigerten kardiovaskulären Risiko beiträgt.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, zentrale Mediatoren zu analysieren, die eine wichtige Rolle bei dem Auftreten einer erworbenen AS vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung spielen. Dafür wurden Mäuse mit inaktiviertem TTP-Gen genutzt, die auf Grund des Fehlens dieses zentralen RNA-BPs einen chronisch entzündlichen Phänotyp ausbilden, der dem einer humanen RA-Erkrankung ähnelt. Initiale Versuche zeigten bereits, dass diese Mäuse eine beeinträchtigte acetylcholinabhängige Gefäßrelaxation aufweisen, die als ein erstes Symptom einer sich entwickelnden AS angesehen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen, die zu der Ausbildung dieser eDF führen, untersucht. Ebenso wurde in doppeldefizienten Mäusen ($\text{TNF}\alpha^{-/-}\text{TTP}^{-/-}$) analysiert, welche Wirkung der wichtige proinflammatorische Mediator $\text{TNF}\alpha$ auf die Endothelfunktion dieser Mäuse hat.

Ein weiterer Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Vorfällen stellt die Diabeteserkrankung dar. Auch in diesem Krankheitsbild spielt die eDF eine wichtige Rolle. In einem zweiten Versuchsansatz wurde der Einfluss von organischen Nitraten auf den oxidativen Stress und somit auf die Ausprägung der eDF untersucht.

Die bisherigen Therapien von chronisch entzündlichen Erkrankungen können schwere Nebenwirkungen haben und führen zur Zeit meist nicht zu einer vollständigen Remission. Ein besseres Verständnis für die Zusammenhänge zwischen RA und AS kann helfen, die Behandlungskonzepte von Patienten zu verbessern. Aus diesem Grund wurde im dritten Teil dieser Arbeit in Kooperation mit PD Erkel aus Kaiserslautern die antiarteriosklerotische Kapazität des Pilzsekundärmetaboliten Gal in zwei unterschiedlichen arteriosklerotischen Mausmodellen getestet. Der Einfluss dieser Substanz wurde in Hinblick auf die Regulation der mRNA verschiedener wesentlich an der AS beteiligter Markergene und Mediatoren, sowie auf die Einflussnahme auf die Plättchenadhäsion an verletzte Gefäße untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Chemikalien

3.1.1 Geräte

Die während der Durchführung dieser Arbeit genutzten Geräte und deren Hersteller sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Tabelle 3-1: Genutzte Geräte und deren Hersteller.

| Gerät | Hersteller |
|---|------------------|
| Amelung Koagulometer KC4Δ | Trinity Biotech |
| Bioruptor plus | Diagenode |
| Brutschrank Hera Cell 150 | Heraeus |
| CODA Monitor | Kent Scientific |
| GS Genelinker UV-Chamber | BioRad |
| Hemavet 950 FS | Drew Scientific |
| Kühlzentrifuge MicroStar 17R | VWR |
| Nanodrop ND-1000 | Peqlab |
| Organbad | DMT |
| PCR-Gerät MyCycler | BioRad |
| qPCR-Gerät MyiQ | BioRad |
| TissueLyser LT | Qiagen |
| TRI-CARB 1900CA Liquid Scintillation Analyzer | Canberra Packard |
| Gel Dryer Model 583 | BioRad |

3.1.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Für die Versuche wurden die in Tabelle 3-2, Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 beschriebenen Puffer, Lösungen und Reagenzien verwendet.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der genutzten Puffer.

| Puffer | Zusammensetzung |
|---------------------|---|
| ACK-Puffer | 150 mM NH ₄ Cl, 1 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA in DNA-H ₂ O, steril filtriert (0,2 µm Porengröße) |
| Crosslink-Puffer | 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM KCl in DEPC-H ₂ O |
| DNA-Ladepuffer, 5 x | 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanolblau, 50 % Glycerin in DNA-H ₂ O |
| EDTA-Puffer | 30 mM EDTA, 0,01 % NaN ₃ in 1 x PBS |
| GIT-Puffer | 4 M GIT, 2 mM Natriumcitrat, 0,5 % Sarcosyl, 0,1 M β-Mercaptoethanol (frisch zugeben) in DEPC-H ₂ O |
| Laemmli-Puffer, 5 x | 312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 mM EDTA, 15 % SDS, 0,015 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 40 mM DTT (frisch zusetzen) in H ₂ O |

Material und Methoden

| | |
|-----------------------|--|
| Laufpuffer, 5 x | 124 mM Tris-HCl, 959 mM Glyzin, 17 mM SDS in H ₂ O, pH 8,3 |
| Luziferasepuffer, 2 x | 60 mM Tricin, 0,2 mM EDTA, 30 mM MgSO ₄ , 20 mM DTT in H ₂ O |
| PBSTT | 1 x PBS, 0,1 % Tween |
| Puffer für qPCR, 2 x | 40 mM Tris-HCl (pH 8,7), 20 mM (NH ₄)SO ₄ , 8 mM MgCl ₂ , 20 mM KCl in DEPC-H ₂ O |
| PLB, 1 x | 4:1 Mischung von H ₂ O mit 5 x PLB (frisch angesetzt) |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM EDTA (pH 8), 10 % Glycerin in H ₂ O auf 10 mL Puffer je 1 Tablette Protease- und Phosphatasehemmer (frisch zusetzen) |
| STE-Puffer | 50 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 10 % SDS, 1 mM EDTA in DNA-H ₂ O |
| TAE-Puffer, 10x | 400 mM Tris, 20 mM Na ₂ EDTAx2H ₂ O, 1,142 % Essigsäure, pH 8,0 in H ₂ O |
| Transferpuffer | 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glyzin, 20 % Methanol in H ₂ O |
| Waschpuffer (TBST) | 1 x TBS, 0,1 % Tween |

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der genutzten Lösungen.

| Lösungen | Zusammensetzung |
|---------------------------|---|
| CAG-Mix | 3,3 mM CTP, 3,3 mM ATP, 3,3 mM GTP |
| Chloroform/Isoamylalkohol | 24:1 Mischung von Chloroform und Isoamylalkohol |
| DEPC-H ₂ O | DNA-Wasser mit 0,1 Vol% DEPC, autoklaviert |
| DNA-H ₂ O | deionisiertes H ₂ O, autoklaviert |
| dNTPs, 10 mM | 10 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 10 mM TTP |
| DRB | 78 µM DRB in DMSO |
| Ethanol, 70 % | 70 % Ethanol absolut in DNA-H ₂ O |
| Ethanol, 80 % | 80 % Ethanol absolut in DEPC-H ₂ O |
| Glycerin, 10 % | 10 % Glycerin in DNA-H ₂ O |
| NaAc, 2M | 2 M Natriumacetat in DEPC-H ₂ O |
| NaAc, 3M | 3 M Natriumacetat in DNA-H ₂ O |
| NaCl | 162 mM NaCl in H ₂ O, steril filtriert |
| Phenol/Chloroform | 1:1 Mischung von Phenol und Chloroform |
| Pentobarbitallösung | 1 % Pentobarbital in PBS |
| Proteinase K | 0,1 mM Proteinase K, 50 % Glycerin, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl ₂ in DNA-H ₂ O |
| RNase A | 0,73 mM RNase A in H ₂ O |
| TBS, 10 x | 100 mM Tris, 1,5 M NaCl in H ₂ O, pH 7,4 |

Tabelle 3-4: Genutzte Reagenzien und deren Hersteller.

| Reagenzien | Hersteller |
|------------------------|-----------------------|
| ³² P-UTP | Hartmann Analytic |
| Amersham Hyperfilm ECL | GE Healthcare Limited |
| Calciumchloridlösung | Siemens |
| Citratlösung | Sigma Aldrich |
| DNaseI (10000 U/mL) | Roche |

| | |
|--|---------------------|
| dNTPs (ATP, GTP, CTP, TTP, UTP), 100 mM | Peqlab |
| ECL Chemilumineszenzsubstrat | Thermo Scientific |
| EDTA-Röhrchen Microvette 200 K3E | Sarstedt |
| HiPerfect Transfektionsreagenz | Qiagen |
| iProof HF Taq Polymerase | BioRad |
| KAPA-Sybr®FAST | Peqlab |
| Lipidprofil-Testkassetten | Alere |
| Pathromtin SL | Siemens |
| Phosphataseinhibitor Cocktail | Roche |
| Proteaseinhibitor Cocktail | Roche |
| PageRuler Prestained Protein Standard | Thermo Scientific |
| Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI | New England Biolabs |
| RNasin | Fermentas |
| T4-DNA Ligase | New England Biolabs |
| T7-RNA Polymerase | Roche |
| Taq DNA Polymerase | Peqlab |
| Taq DNA Polymerase | Qiagen |
| Thromborel S | Siemens |
| Quick Spin Säulen | Roche |
| Wischtestlösung Ultima Gold | Perkin Elmer |

3.1.3 Oligonukleotide

Alle genutzten Primer für Mausgenotypisierungen, Klonierungen, sowie die Primer und gegebenenfalls Sonden für die qPCR sind in Tabelle 3-5, Tabelle 3-6 und Tabelle 3-7 angegeben. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Tabelle 3-5: Zur Genotypisierung der Mäuse genutzte Primer.

| Allel | 5' Primer | 3' Primer |
|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| TTP wt | GAG GGC CGA AGC TGC GGC | GGC TGG CCA GGG AGA GCT |
| TTP ko | TGG GT | AGG TC |
| TNF α wt | GCA CAG AAA GCA TGA TCC G | GGC TGG CCA GGG AGA GCT AGG TC |
| TNF α ko | CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC | TCC TTA TCT CTC ATG CCT CTC TC |
| ApoE wt | GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG | AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC |
| ApoE ko | | TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C |
| TFPI wt | TCT GAG CTG GGG TCA ATG AAA CC | GCC GCC CCG ACT GCA TCT |
| TFPI ko | | TCT GAG CTG GGG TCA ATG AAA CC |
| | | TTC CTG ACT AGG GGA GGA GTA GAA G |

Tabelle 3-6: Für Klonierungen genutzte Primer.

Die Sequenzen der Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind Fett markiert.

| Gen | 5' Primer | 3' Primer |
|--------------|---|--|
| muNox1-3'UTR | GGC TCG AGC TTG GAG GAA GCA GCA CAG C | CCG GAT CCT AGC CAA AAT TAT AAC TTT TTT CTT TTT ATA ATA C |
| muNox2-3'UTR | GGC TCG AGC TCC GCT CTT TCA CCA GGA AAC | CCG GAT CCT TA ATG TTT GCT ATT TCT GTT TAT TAG C |

Tabelle 3-7: Zur qPCR genutzte Primer und Sonden.

Die doppelmodifizierten Sonden enthielten an ihrem 5'-Ende 6-FAM und an ihrem 3'-Ende TAMRA.

| Gen | 5' Primer | 3' Primer | Sonde |
|----------|--|------------------------------------|--|
| huGAPDH | CCC ATG TTC GTC ATG GGT GT | TGG TCA TGA GTC CTT CCA CGA TA | CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC ACC C |
| huiNOS | TGC AGA CAC GTG CGT TAC TCC | GGT AGC CAG CAT AGC GGA TG | TGG CAA GCA CGA CTT CCG GGT G |
| huNrf2 | AAA CCA GTG GAT CTG CCA AC | GCA ATG AAG ACT GGG CTC TC | ACT CCC AGG TTG CCC ACA TTC CCA |
| muCTSS | CAT GGT GTT CTT GTG GTT GG | CAA TAA CTA GCA ATT CCG CAG TG | CTG GCT TGT GAA AAA CAG TTG GGG C |
| mueNOS | CCT TCC GCT ACC AGC CAG A | CAG AGA TCT TCA CTG CAT TGG CTA | - |
| muFVIII | TGC CTG ACC CGC TAT TAT TC | AGC GTT GCA TGT TCT CTG TG | ATC AAG ACT CAG GGT GCT CGT CAG AAA TT |
| muFIX | CTG AGG GAT ACC AAC TTG CAG | TAT TAA GAA TGG CAC CAT CAG TG | CCA ACA GTT CCA TTT CCA TGT GGG A |
| muFX | TCA GCC TGC TCT GTG TTG TC | TCG AAG ATT TCA CGG ACC TC | ATT AAC CGG GAA CGT GCC AAC AAT G |
| muFXI | TCT TCA CGT TCA TGG CTG AG | ACT TAA TTG CTG AGG GCA TTG | CCT ACC AAA TGG TTT GCC TGC ATC C |
| muFXII | GCT CCA CCA TGG AAA GAC TC | TGC TGA TCT TCA TCA AAG TTG G | TTC TCA CTG TGG ATG GGA GGC TCT G |
| muGAPDH | TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC | GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA | TGC ATC CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG |
| muGCH1 | TGG TGA TTG TGA AGG ACA TAG ATA TG | GCC AAT ATG GAC CCT TCC TAC A | - |
| mulCAM-1 | ACC CCG CAG GTC CAA TTC | CCA GAG CGG CAG AGC AAA | - |
| mulL6 | GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC | AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA | TCC TAC CCC AAT TTC CAA TGC TCT CC |
| muiNOS | CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT | CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG | CGG GCA GCC TGT GAG ACC TTT GA |

| | | | |
|------------------|---------------------------------------|---|--|
| muMip-1 α | CTG CAA CCA AGT CTT CTC AGC | CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG | ACT GCC TGC TGC TTC TCC TAC AGC C |
| muNox1 | GGA GGA ATT AGG CAA AAT GGA TT | GCT GCA TGA CCA GCA ATG TT | - |
| muNox2 | CCA ACT GGG ATA ACG AGT TCA | GAG AGT TTC AGC CAA GGC TTC | - |
| muNox4 | TGT AAC AGA GGG AAA ACA GTT GGA | GTT CCG GTT ACT CAA ACT ATG AAG AGT | - |
| muPol2a | ACC ACG TCC AAT GAT ATT GTG GAG | ATG TCA TAG TGT CAC ACA GGA GCG | CTG GGC ATT GAG GCT GTG CGG AA |
| muPROCR | TGG AGT TCC TGG AGA ACC AC | CTT GTG CAC ATG AAG ATG CC | TCA CCA CGC AAA ACA TGA AAG GGA G |
| muS100A8 | CTC CGT CTT CAA GAC ATC GTT TG | TCA TTC TTG TAG AGG GCA TGG TG | CAA TGC CGT CTG AAC TGG AGA AGG CC |
| muSOD1 | CCA GTG CAG GAC CTC ATT TTA AT | TCT CCA ACA TGC CTC TCT TCA TC | - |
| muSOD2 | GCT CTG GCC AAG GGA GAT G | TGT CCC CCA TTG AAC TT | - |
| muSOD3 | TTC TTG TTC TAC GGC TTG CTA CTG | AGC TGG ACT CCC CTG GAT TT | - |
| muSPP1 | GCT TGG CTT ATG GAC TGA GG | CCT CAT CTG TGG CAT CAG G | TCA AAG TCT AGG AGT TTC CAG GTT TCT GAT GA |
| muTF | CGG CAA GTC TTT GGC AAG | CCT TCT TCC ACA TCA ATC GAG | AGG CTC AAG CAC GGG AAA GAA AAC AAA CAT |
| muTFPI | CGA GAA CCG ATT TGA TAC CC | CAG AAA TCT GGC CTT TCT GC | TGA GAA GAC AGC TGT GAA GGC AGC A |
| muTNF α | CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA | TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC | CAC GTC GTA GCA AAC CAC CAA GTG G |
| muVCAM-1 | GAC TCC ATG GCC CTC ACT TG | CGC GTT TAG TGG GCT GTC TAT C | - |
| muvWF | GTT GGC GAG GAT GGA GTT C | CAG GGT TGG TCA GGG TTG | CCC AGA GTA TGA GTC TGT GTG TGA CCT GTT |

3.1.4 Antikörper

Die in Tabelle 3-8 angegebenen Antikörper, sowie Zweitantikörper und Blockierlösungen wurden in den angegebenen Verdünnungen für die Analysen mittels Dot Blot und Western Blot genutzt.

Tabelle 3-8: Genutzte Primär- und Sekundärantikörper.

| Antigen | Blockiermedium | Primärantikörper | Sekundärantikörper |
|--------------|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| β-Aktin | TBST + 3 % BSA | αβ-Aktin 1:2500 (Sigma Aldrich) | αHase 1:10000 (Vector Laboratories) |
| CD68 | TBST + 3 % BSA | αCD68 1:500 (Millipore) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |
| eNOS | TBST + 3 % BSA | αeNOS 1:1000 (BD Bioscience) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |
| iNOS | TBST + 3 % BSA | αiNOS 1:1250 (BD Bioscience) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |
| Nox1 | TBST + 3 % BSA | αNox1 1:00 (Santa Cruz) | αZiege 1:5000 (Vector Laboratories) |
| Nox2 | TBST + 3 % BSA | αNox2 1:500 (BD Bioscience) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |
| Nox4 | TBST + 3 % BSA | αNox4 1:125 (Abcam) | αHase 1:3500 (Sigma Aldrich) |
| Nitrotyrosin | TBST + 5 % MP | αNitrotyrosin 1:1000 (Millipore) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |
| P(239)VASP | PBSTT + 1 % Häm | αP(239)VASP 1,5 µg/mL (Millipore) | αMaus 1:10000 (Vector Laboratories) |

3.2 Zellen

3.2.1 Eukaryote Zelllinien und Primärzellen

Die für die Untersuchungen genutzten Zelllinien und Primärzellen sind in Tabelle 3-9 zusammengestellt.

Tabelle 3-9: Genutzte Zelllinien und Primärzellen.

| Zellbezeichnung | Beschreibung |
|-------------------------------------|---|
| DLD-1-HO-1-Prom | DLD-1-Zellen (ATCC [CCL-221]) stabil mit dem humanen Promotor der HO-1 transfiziert |
| Mono Mac 6 | immortalisierte humane Monozyten/Makrophagen (DSMZ [ACC124]) |
| RAW 264.7 | immortalisierte murine Monozyten/Makrophagen (ATCC [CRL-2278]) |
| TTP ^{+/+} Peritonealzellen | Peritonealzellen aus TTP-Wildtypmäusen |
| TTP ^{-/-} Peritonealzellen | Peritonealzellen aus TTP-defizienten Mäusen |

3.2.2 Kultivierung eukaryoter Zellen

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde bei Arbeiten mit eukaryoten Zellen mit sterilisierten Geräten, steril verpackten Zellkulturflaschen und Pipetten, sowie mit sterilisierten Medien unter einer Reinluftwerkbank gearbeitet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Begasung und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die stabil mit dem Promotor der humanen Hämoxygenase 1 transfizierten Zellen (DLD-1-HO-1-Prom) wurden in DMEM mit 10 % FKS und 0,2 mg/mL Zeozin kultiviert, dem zusätzlich 1 % PenStrep und 1 % Pyruvat zugesetzt wurden. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurden die Zellen 1:9 in Kulturmedium verdünnt und weiter kultiviert.

Die immortalisierten Zelllinien Mono Mac 6 (MM6) und RAW 264.7 (RAW) wurden in DMEM mit 10 % FKS, 1 % PenStrep und 1 % Pyruvat kultiviert.

Die aus den Mäusen isolierten Peritonealzellen (siehe Kapitel 3.3.5) wurden in DMEM mit 1 % Pyruvat, jedoch ohne FKS und Phenolrot kultiviert.

3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau, der intakte Zellmembranen nicht passieren kann, sodass lebende Zellen unter einem Lichtmikroskop hell erscheinen, währenddessen tote Zellen blau angefärbt werden. Hierfür wurden die Zellen 1:2 mit physiologischer Trypanblaulösung gemischt und auf eine Neubauer Zählkammer gebracht. Die Anzahl der Zellen lässt sich nach folgender Formel berechnen, wobei n die Anzahl der ausgezählten Großquadrate angibt und der Kammerfaktor in diesem Fall 10^4 war.

$$\text{Zellzahl / mL} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad (3-1)$$

3.2.4 Stimulation von eukaryoten Zellen

3.2.4.1 Stimulation mit organischen Nitraten

Um den Effekt von organischen Nitraten auf den Promotor der humanen Hämoxygenase zu ermitteln, wurden die DLD-1-HO-1-Prom-Zellen mit PETN oder ISMN behandelt. Hierfür wurden die Zellen, wenn sie zu 80 % konfluent waren für 16 Stunden in DMEM mit 1 % Pyruvat, ohne FKS und Phenolrot kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 8 Stunden entweder mit 50 μ M PETN und DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder mit 50 μ M ISMN und H₂O als Lösungsmittelkontrolle behandelt.

3.2.4.2 Stimulation mit Zytokinen

Die aus den Mäusen isolierten Peritonealzellen und die RAW-Zellen wurden für Untersuchung der Expression proinflammatorischer Gene genutzt. Für deren Analyse

war eine Induktion der Expression dieser Gene nötig. Dafür wurden die Peritonealzellen nach einer 2-stündigen Adhärenzphase an die Kulturschalen mit einem Gemisch aus 1 µg/mL LPS und 30 ng/mL murinen IFN-γ für die entsprechenden Zeiten in DMEM ohne FKS und Phenolrot inkubiert. Als Kontrolle wurde nur DMEM ohne FKS und Phenolrot genutzt.

Für die Stimulation der MM6-Zellen wurden diese mit einem Zytokinmix aus 37,5 ng/mL TNFα, 30 ng/mL IFN-γ und 3 ng/mL IL1β für 2 bis 6 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Zellen mit DMEM ohne FKS und Phenolrot behandelt. Für den Test des Pilzmetabolits Gal wurden die Zellen 1 Stunde vor der Zytokinstimulation mit 1 mM Gal behandelt.

3.2.5 *Transiente Transfektion von Zellen mit siRNA*

Um den Einfluss eines Gens zu untersuchen, eignet sich entweder die Überexpression dieses Gens oder die Verringerung des zu analysierenden Gens durch RNA-Interferenz. Um den Effekt des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf die Aktivität des humanen HO-1-Promotors herauszuarbeiten, wurde in den DLD-1-HO-1-Prom-Zellen spezifisch die Nrf2-mRNA durch eine validierte anti-Nrf2-siRNA (SI03246950) verringert. Zur Kontrolle wurde eine Kontroll-siRNA (SI03650325) transient in die Zellen transfiziert. Die so erhaltenen Zellen wurden mit PETN bzw. ISMN oder den Lösungsmitteln DMSO bzw. H₂O stimuliert und die HO-1-Promotoraktivität in Reporteranalysen (siehe Kapitel 3.4.7) ermittelt.

Es wurden $8 \cdot 10^4$ DLD-1-HO-1-Prom-Zellen pro Vertiefung auf 12-Lochplatten ausgesät und am Folgetag ein Mediumwechsel mit 500 µL Kulturmedium durchgeführt. 37,5 nM siRNA wurden in 100 µL Medium ohne FKS mit 3 µL/Ansatz HiPerfekt Transfektionsreagenz nach den Herstellerangaben zugegeben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, mit 50 µM PETN bzw. 50 µM ISMN oder den Lösungsmitteln DMSO bzw. H₂O für 8 Stunden stimuliert, um die PETN- und ISMN-induzierte HO-1-Promotoraktivität zu messen. Die erfolgreiche Verringerung von Nrf2 in den DLD-1-HO-1-Prom-Zellen wurde mittels qRT-PCR überprüft.

3.2.6 *Analyse der mRNA-Stabilität*

Die Kontrolle der Stabilität von mRNAs, insbesondere die von proinflammatorischen Genen, ist ein wichtiger Regulationspunkt zur Aufrechterhaltung bzw. zur Verringerung der Entzündung im Organismus. TTP als mRNA-bindendes Protein ist bekannt

dafür, seine Ziel-mRNAs über die Regulation der mRNA-Stabilität zu beeinflussen. Um dies in Mauszellen zu analysieren, wurden mRNA-Abbauversuche durchgeführt. Hierbei wurde DRB als Inhibitor der mRNA-Synthese eingesetzt, da es die RNA-Polymerase II-vermittelte Transkription hemmt. Nach der DRB-Zugabe kann keine neue mRNA mehr transkribiert werden und es ist möglich, den Verlauf des mRNA-Abbaus mittels qRT-PCR zu untersuchen. Die mRNA-Expression wurde nach 4-stündiger Stimulation gemessen und der Abbau über einen Zeitraum von 6 Stunden nach DRB-Gabe in den Peritonealzellen verfolgt.

Die murinen Peritonealzellen wurden, wie im Kapitel 3.3.5 beschrieben, aus den TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen isoliert. Nach 2-stündiger Adhärenzphase wurden die Zellen für 4 Stunden mit Zytokinen stimuliert (siehe Kapitel 3.2.4.2). Anschließend wurden die Zellen mit 78 µM DRB behandelt und nach 0, 15, 30, 60, 120, 240 und 360 Minuten mit GIT-Puffer lysiert. Nach Isolation der RNA (siehe Kapitel 3.4.4) erfolgte die Analyse der mRNA-Mengen mittels qRT-PCR (Kapitel 3.4.5).

3.3 Tiermodelle

3.3.1 Mausstämme

Für die verschiedenen Untersuchungen wurden die im Folgenden näher beschriebenen Mausstämme genutzt. Alle Tiere wurden in der zentralen Tierversuchseinrichtung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus mit Wasser und Futter *ad libitum* gehalten.

3.3.1.1 TTP^{-/-}-Mäuse

Tristetraprolindefiziente Mäuse auf dem Hintergrund von C57BL/6J-Mäusen wurden durch Insertion eines Neomycinresistenzgens in die proteinkodierende Region des zweiten Exons in das Tristetraprolin generiert. Dadurch wurden vielfältige Stoppcodons vor die Sequenz des putativen Zinkfingers eingeführt und es kommt nicht zur Ausbildung des funktionellen TTP. Es konnte keine TTP-Expression in TTP^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden²³. Diese Mäuse wurden freundlicherweise von P.J. Blackshear (Research Triangle Park, NC 27709) zur Verfügung gestellt und wurden heterozygot verpaart. Die Mäuse wurden im Alter von 3 ½ bis 4 Monaten für die Untersuchungen genutzt.

3.3.1.2 TNF α ^{-/-}-Mäuse

C57BL/6J-Mäuse mit Defizienz im Gen des Tumornekrosefaktor α (Stock 003008) wurden von The Jackson Laboratory bezogen. Die TNF α ^{-/-}-Mäuse konnten homozygot verpaart werden. Die Mäuse wurden im Alter von 3 ½ bis 4 Monaten für die Untersuchungen genutzt.

3.3.1.3 TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse

TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse wurden durch Verpaaren von TNF α ^{-/-}-Mäusen mit TTP^{+/-}-Mäusen über drei Generationen erhalten (Kreuzungsschema siehe Abbildung 3-1). Die doppeldefizienten Mäuse konnten homozygot verpaart werden. Die Mäuse wurden im Alter von 3 ½ bis 4 Monaten für die Untersuchungen genutzt.

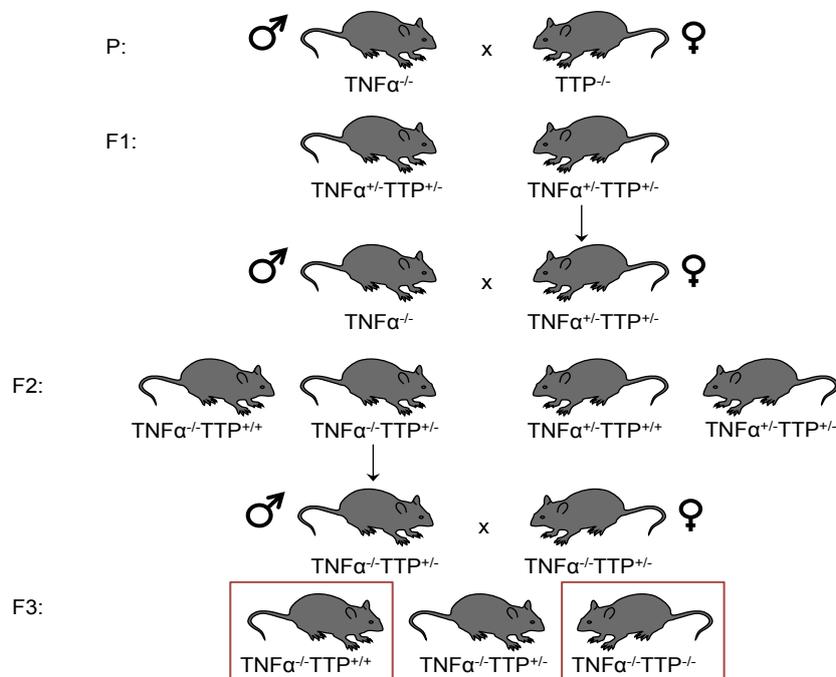


Abbildung 3-1: Kreuzungsschema zur Zucht der TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse.

3.3.1.4 ApoE^{-/-}-Mäuse

Änderungen im Lipidstoffwechsel sind ein Faktor, welcher das Risiko von proarteriosklerotischen Veränderungen erhöht. Apolipoprotein E ist unter anderem für die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen über den LDL-Rezeptor verantwortlich. Mäuse mit Defizienz in diesem Gen besitzen ein erhöhtes Risiko an Arteriosklerose zu erkranken. C57BL/6J-ApoE^{-/-}-Mäuse wurden von Charles Rivers Laboratories bezogen und für die Behandlung von Arteriothrombosen mit dem Pilzmetabolit Galiellalacton genutzt.

3.3.1.5 ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse

Ein erhöhtes arteriosklerotisches und thromborisches Risiko konnte in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen nachgewiesen werden¹⁸². TFPI als Inhibitor des TF-FVIIa-Komplexes dient dem Stopp der Blutgerinnung während des extrinsischen Gerinnungsweges. Da Mäuse mit kompletter TFPI-Defizienz nicht überlebensfähig sind, wurden die Untersuchungen zu der Wirkung von Gal mit TFPI-heterozygoten Mäusen durchgeführt. Bei diesen Mäusen konnte eine Verringerung der TFPI-Expression um etwa 50 % im Vergleich zu Wildtypmäusen nachgewiesen werden, was zu einer verkürzten Blutungsdauer führt¹⁸². Die heterozygoten TFPI-Mäuse wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise von D.Eitzman (University of Michigan Medical Center, MI 48109-0644) zur Verfügung gestellt. Sie wurden über 3 Generationen mit ApoE^{-/-}-Mäusen gekreuzt, um die doppeldefiziente Mäuse (ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}) zu erhalten. Das Kreuzungsschema ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

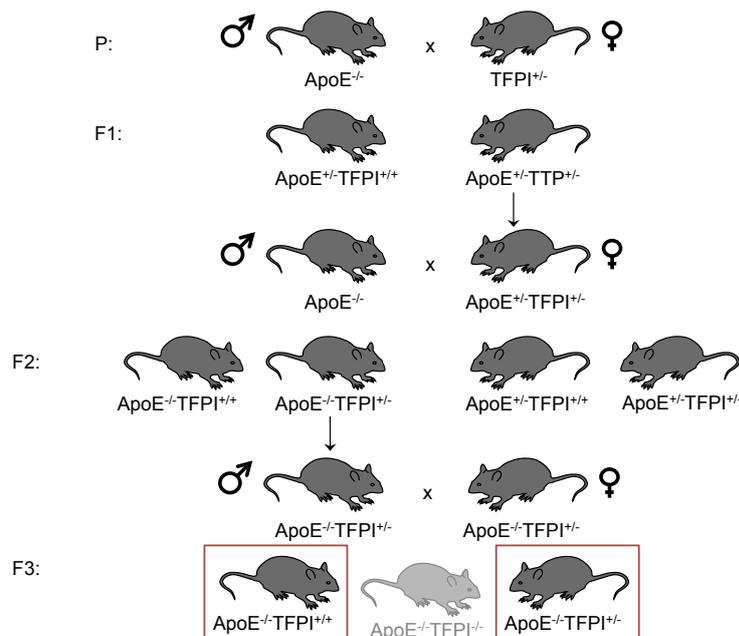


Abbildung 3-2: Kreuzungsschema zur Zucht der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse.

3.3.2 Behandlung der TTP^{+/-}-Zuchtmäuse mit N-Acetyl-L-Cystein (NAC)

Da TTP^{-/-}-Mäuse infertil sind, erfolgte die Zucht der Mäuse auf heterozygotem Genotyp der Parentalgeneration. Hier zeigte sich jedoch schnell, dass nicht das nach Mendel erwartete 1:2:1-Verhältnis von wildtyp : heterozygot : defizient erreicht wurde, da deutlich weniger TTP-defiziente Mäuse geboren wurden. Auf Grund des starken prooxidativen Phänotyps der Mäuse, der durch einen Mangel an bioaktivem NO ge-

kennzeichnet ist, wurde erwartet, mit einer antioxidativen Substanz das Geburtenverhältnis deutlich zu Gunsten der TTP^{-/-}-Mäuse zu verschieben. NAC ist ein oral verfügbarer antioxidativer Stoff, der den Mäusen in den Zuchtkäfigen in einer Konzentration von 43 mM NAC über das Trinkwasser verabreicht wurde¹⁹².

3.3.3 Behandlung der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit Galiellalacton

Um in murinen Tierversuchsmodellen arteriosklerotische Veränderungen auszulösen, ist eine Fütterung der Mäuse mit fettreichem Futter notwendig. Als besonders geeignet für ApoE-defiziente Mäuse hat sich die Westerntyp-Diät (WD) erwiesen. Die Zusammensetzung des Futters ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3-10: Zusammensetzung des Westerntyp-Diät-Futters.

(Ssniff Spezialdiäten, E15775-34)

| Komponente | Zusammensetzung [%] |
|------------|---------------------|
| Rohprotein | 17,1 |
| Rohfett | 22,2 |
| Rohfaser | 5,0 |
| Rohasche | 3,7 |
| Stärke | 5,7 |
| Zucker | 34,0 |
| Wasser | 14,3 |

Sowohl die ApoE^{-/-}-Mäuse als auch die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden für 12 bis 18 Wochen mit dieser Diät gefüttert. Eine Kontrollgruppe bekam für den Zeitraum von 12 Wochen Normalfutter (ND), um den Einfluss der Diät auf den Krankheitsverlauf zu analysieren. Um die Effekte einer Langzeitbehandlung mit dem antientzündlichen Pilzsekundärmetabolit Gal auf die Ausprägung von arteriosklerotischen und thrombotischen Veränderungen zu untersuchen, wurden die mit WD gefütterten Mäuse für 6 Wochen alle zwei Tage mit 10 mg/kg Gal *intra peritoneal (i.p.)* behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt PBS+10 % Ethanol (PBS+EtOH) *i.p.* Nach 12 bzw. 18 Wochen wurden die Mäuse für die Versuche getötet und die Organe entnommen. In Abbildung 3-3 ist das Versuchsschema der Behandlung der Mäuse dargestellt.

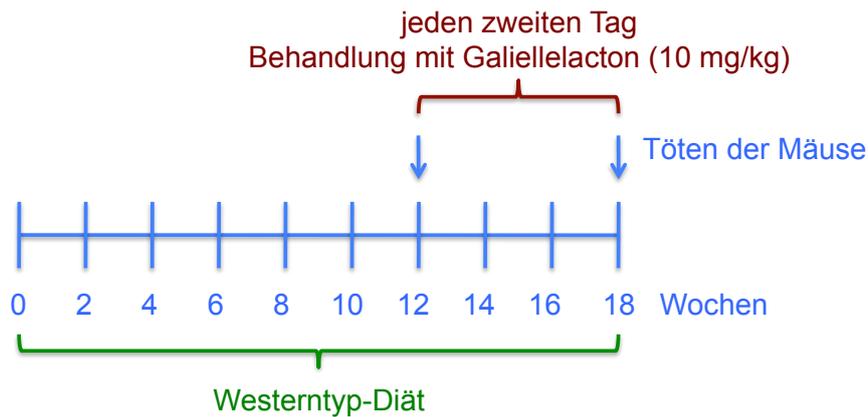


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Behandlung der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit Gal.

3.3.4 Entblutung, Töten und Organentnahme der Mäuse

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Pentobarbital (700 µL) *i.p.* lethal betäubt. Anschließend wurde der Thorax geöffnet und das Blut über Herzpunktion entnommen. Außerdem wurden Herz, Leber und die Aorta der Mäuse entnommen und bei -80 °C gelagert.

3.3.5 Peritoneallavage

Die Isolation der Peritonealzellen aus Mäusen wurde wie bereits beschrieben durchgeführt¹⁹³. Für die Entnahme der Peritonealzellen wurde den Mäusen nach Töten durch zervikale Dislokation zunächst 5 mL einer kalten PBS-Lösung mit 3 % FKS mit Hilfe einer 27 G Kanüle in die Bauchhöhle gespritzt. Nach der Injektion wurde der Bauch der Mäuse für 5 Minuten sanft massiert, sodass sich die Peritonealzellen von der Bauchhöhle ablösen. Die Flüssigkeit wurde unter zu Hilfenahme einer 25 G Kanüle vorsichtig entnommen. Die erhaltene Suspension wurde für 10 Minuten bei 200 xg zentrifugiert, die Zellen in DMEM ohne FKS resuspendiert und für die mRNA-Abbauversuche verwendet (siehe Kapitel 3.2.6).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Klonierungen

Für spätere RNA-Proteinbindungsanalysen wurden die 3'UTR-Bereiche der murinen Nox1 und Nox2 in ein geeignetes Plasmid eingebracht. Hierfür wurde mittels PCR die Nox1- und Nox2-3'UTR aus murinen cDNAs amplifiziert. Da die dafür genutzten Primer Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XhoI und BamHI enthielten,

konnten die mit diesen Enzymen restringierten 3'UTR-Fragmente in den ebenfalls mit XhoI und BamHI geschnittenen Vektor pCRSkript eingeführt werden.

Die Klonierungs-PCR wurde mit den in Tabelle 3-6 angegebenen Primern unter Nutzung der iProof HF Taq Polymerase von BioRad nach dem in Tabelle 3-11 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3-11: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Klonierung der Nox1- bzw. Nox2-3'UTR aus murinen cDNA-Proben.

| Klonierungs-PCR | | Bedingungen | |
|--------------------------|--------------|-------------|---|
| 5 x Puffer | 9 µL | 94 °C | 3 Minuten |
| 10 mM dNTPs | 2 µL | 30 x | |
| 10 µM 5' Primer | 2 µL | 94 °C | 30 Sekunden |
| 10 µM 3' Primer | 2 µL | 67,2 °C | 45 Sekunden |
| 25 mM MgCl ₂ | 1,5 µL | 72 °C | 1 Minute (Nox1-3'UTR) 3 Minuten (Nox2-3'UTR) |
| iProof HF Taq-Polymerase | 0,5 µL | | |
| H ₂ O | 26 µL | 72 °C | 7 Minuten |
| DNA (50 ng/µL) | 2 µL | | |
| Gesamt | 45 µL | | |

Nach vorangegangener Agarosegelelektrophorese und Dialyse wurde die gewonnene DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolfällung gereinigt. Hierfür wurde die DNA aus den Gelfragmenten in einem Dialyseschlauch für 1 Stunde bei 100 V in 600 µL TAE-Puffer (1 x) extrahiert. Dem DNA-haltigen TAE-Puffer wurde anschließend 10 Vol% NaAc (3 M) und 100 Vol% Phenol/Chloroform zugesetzt. Die Lösung wurde vollständig durchmischt und für 5 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 100 Vol% Chloroform zugegeben, gut durchmischt und erneut für 5 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA für 1 Stunde bei -20 °C mit 250 Vol% Ethanol absolut gefällt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 16200 xg wurde der Überstand entfernt und das DNA Pellet durch Zugabe von 70 %igem Ethanol und erneuter Zentrifugation gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 20 µL DNA-H₂O gelöst.

Die derart hergestellten 3'UTR-Fragmente und das Plasmid pCRSkript wurden anschließend über Nacht in einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI nach den Herstellerangaben geschnitten. Am Folgetag wurde die DNA aus allen drei Ansätzen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende

Ethanol-fällung (siehe oben) gereinigt. Die Ligation der 3'UTR-Fragmente mit dem Vektor erfolgte mit der T4-DNA Ligase nach den Herstellerangaben.

Anschließend wurden die so hergestellten Plasmide pCRSkript-muNox1-3'UTR und pCRSkript-muNox2-3'UTR in kompetente Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dafür wurden 10 µL der Ligationsansätze mit 100 µL rekombinanten Bakterien gemischt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 50 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurde die Mischung 2 Minuten auf Eis ruhen gelassen. Nachdem die Bakterien 1 Stunde bei 37 °C in 400 µL LB-Medium geschüttelt wurden, wurden sie auf Selektionsagaroseplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine Kultur mit einigen der gewachsenen Kolonien angesetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die bakterielle DNA isoliert. Mittels DNA-Sequenzierung wurde die Sequenz der hergestellten Plasmide kontrolliert.

3.4.2 DNA-Isolation aus Mausschwanzspitzen

Da die verschiedenen für die Untersuchungen genutzten Mäuse zum Teil heterozygot verpaart werden mussten, für die Versuche jedoch nur defiziente Mäuse und deren Wildtypgeschwister genutzt wurden, mussten die Mäuse nach dem Entwöhnen von den Elterntieren zunächst genotypisiert werden. Hierfür wurde aus Schwanzgewebe der Tiere die DNA isoliert und in späteren Genotypisierungsanalysen mittels PCR eingesetzt.

Den Mäusen wurden 0,5 cm des Schwanzes entfernt und über Nacht bei 55 °C in 250 µL STE-Puffer mit 5 Vol% Proteinase K inkubiert. Am nächsten Tag wurden Zelltrümmer und grobe Schwebstoffe bei 16200 xg für 10 Minuten pelletiert und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 10 Vol% NaAc (3 M), sowie 100 Vol% Phenol/Chloroform zugegeben, die Lösung vollständig durchmischt und für 15 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 100 Vol% Ethanol absolut für 5 Minuten bei RT gefällt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 16200 xg wurde die pelletierte DNA mit 70 %iger Ethanol-lösung durch erneutes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 16200 xg gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die DNA über Kopf für 10 Minuten bei RT getrocknet und in 50 µL DNA-Wasser aufgenommen. Die enthaltene DNA-Menge wurde photometrisch mittels NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm durch Nutzung des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt. Die Reinheit der DNA-Proben wurde zusätz-

lich bei einem Verhältnis der Adsorptionen bei 260 nm zu 280 nm von 1,8 angenommen.

3.4.3 Genotypisierung mittels PCR

Die aus den Mausschwanzspitzen isolierte DNA wurde mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf den Genotyp hin untersucht. Hierfür wurden je nach Mausstamm die in Tabelle 3-5 aufgelisteten Primerpaare eingesetzt.

Die einzelnen Reaktionen wurden für jedes Allel, wie in Tabelle 3-12 für einen Reaktionsansatz beschrieben, pipettiert und die PCR unter den angegebenen Bedingungen durchgeführt. Für die Genotypisierungen des *TTP*-, *TFPI*- und *TNF α* -Lokus wurden Reagenzien von Peqlab und für die Typisierung des *ApoE*-Lokus Reagenzien von Qiagen verwendet.

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Genotypisierung und Reaktionsbedingungen.

| TTP/TFPI Genotypisierung | | TTP/TFPI Bedingungen | |
|---|---------------|---|---|
| 10 x Puffer | 2,5 μ L | 94 °C | 3 Minuten |
| 10 mM dNTPs | 0,75 μ L | 30 x (TTP); 35 x (TFPI) | |
| 10 μ M 5' Primer | 1,5 μ L | 94 °C | 30 Sekunden (TTP) 45 Sekunden (TFPI) |
| 10 μ M 3' Primer | 1,5 μ L | 65 °C (TTP) 58 °C (TFPI) | 45 Sekunden |
| 25 mM MgCl ₂ | 2 μ L | 72 °C | 1 Minute (TTP) 45 Sekunden (TFPI) |
| DNA-Polymerase | 0,3 μ L | | |
| H ₂ O | 14,45 μ L | 72 °C | 7 Minuten |
| DNA (50 ng/ μ L) | 2 μ L | | |
| <i>Gesamt</i> | 25 μ L | | |
| TNFα Genotypisierung | | TNFα Bedingungen | |
| 10 x Puffer | 2 μ L | 94 °C | 5 Minuten |
| 2 mM dNTPs | 2 μ L | 30 x | |
| 10 μ M 5' Primer | 2 μ L | 94 °C | 1 Minute |
| 10 μ M 3' Primer | 2 μ L | 55 °C | 1 Minute |
| 1 mM MgCl ₂ | 1 μ L | 72 °C | 1 Minute |
| DMSO | 0,2 μ L | | |
| DNA-Polymerase | 0,2 μ L | 72 °C | 10 Minuten |
| H ₂ O | 9 μ L | | |
| DNA (50 ng/ μ L) | 2 μ L | | |
| <i>Gesamt</i> | 20,4 μ L | | |

| ApoE wt Genotypisierung | | ApoE wt Bedingungen | |
|-------------------------|--------------|---------------------|------------|
| 10 x Puffer | 2,5 µL | 94 °C | 5 Minuten |
| 10 mM dNTPs | 2 µL | 35 x | |
| 10 µM 5' Primer | 2 µL | 94 °C | 1 Minute |
| 10 µM 3' Primer | 2 µL | 62 °C | 1 Minute |
| 25 mM MgCl ₂ | 2 µL | 72 °C | 1 Minute |
| DNA-Polymerase | 0,25 µL | | |
| H ₂ O | 13,25 µL | 72 °C | 10 Minuten |
| DNA (50 ng/µL) | 1 µL | | |
| Gesamt | 25 µL | | |
| ApoE ko Genotypisierung | | ApoE ko Bedingungen | |
| 10 x Puffer | 3 µL | 94 °C | 5 Minuten |
| 25 mM dNTPs | 0,3 µL | 35 x | |
| 10 µM 5' Primer | 1 µL | 94 °C | 1 Minute |
| 10 µM 3' Primer | 1 µL | 57 °C | 1 Minute |
| DNA-Polymerase | 0,25 µL | 72 °C | 1 Minute |
| H ₂ O | 23,45 µL | | |
| DNA (50 ng/µL) | 1 µL | 72 °C | 10 Minuten |
| Gesamt | 30 µL | | |

Die Ansätze wurden nach der PCR mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf 2%igen Agarosegelen gelelektrophoretisch nach ihrer Ladung und dementsprechend ihrer Größe bei 120 V aufgetrennt. Die für das betreffende Gen heterozygoten Mäuse wurden für die Zucht eingesetzt, die jeweiligen Wildtyp- und defizienten Mäuse wurden für die verschiedenen Untersuchungen genutzt.

3.4.4 RNA-Isolation aus Zellen und Geweben

Zur Untersuchung der mRNA-Expression in Zellen und Geweben wurde zunächst die gesamte RNA mittels Guanidiniumthiocyanat/Phenol/Chloroform-Extraktion¹⁹⁴ isoliert. Im Fall von Geweben wurden Stücke der gefrorenen Organe in 800 µL GIT-Puffer in einem TissueLyser bei 50 Hz für 5 Minuten zerkleinert. Nach dem Entfernen von Zelltrümmern durch 5minütiges Zentrifugieren bei 16200 xg und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 10 Vol% 3 M NaAc, 100 Vol% Phenol, sowie 50 Vol% eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemischs versetzt und gut durchmischt. Die Proben wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 15 Minuten bei 16200 xg bei 4 °C zentrifugiert, bevor die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Anschließend wurde die RNA für mindestens 60 Minuten bei -20 °C durch Zugabe von 100 Vol% Isopropanol gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 16200 xg wurde das RNA-Pellet mit 50 Vol% 80 %igem Ethanol durch erneutes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 16200 xg und 4 °C gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für 5 Minuten bei RT

getrocknet, bevor es in 40 μ L DEPC-H₂O aufgenommen wurde. Die Menge an isolierter RNA wurde photometrisch mittels Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm durch Nutzung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Als rein galt die RNA bei einem Adsorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm von 2,0.

Handelte es sich bei den Ausgangsproben nicht um Gewebe sondern um Zellen, so wurden diese mit 300 μ L GIT-Puffer versetzt, von den Zellkulturplatten durch Abschaben gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt, bevor mit der RNA-Isolation begonnen wurde.

3.4.5 qRT-PCR

Für die Untersuchung der Expression von mRNA wurde in einem Zweischrittverfahren zunächst die isolierte RNA in einer reversen Transkriptionsreaktion in cDNA umgeschrieben und diese dann anschließend als Matrize in einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) eingesetzt. Mit Hilfe dieser qPCR kann eine Matrizen-cDNA gleichzeitig mit der Amplifikation quantifiziert werden. Es wird zwischen zwei verschiedenen qPCR-Arten unterschieden: sondenbasierte oder sondenfreie Systeme.

Bei der sondenbasierten Analyse erfolgt die Quantifizierung der cDNA-Menge über spezifische TaqMan-Sonden. Hierbei ist die TaqMan-Sonde ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, das zwischen 5'- und 3'Primer an die Matrizen-cDNA bindet und am 5'Ende an einen Reporterfarbstoff, wie zum Beispiel 6-Carboxyfluorescein (FAM), und am 3'Ende an einen Quencher, zum Beispiel Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA), gebunden hat. Während der Elongation wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der genutzten DNA-Polymerase der Reporterfarbstoff von der gebundenen Sonde abgespalten. Durch diese räumliche Trennung von Reporter und Quencher ist ein Fluoreszenzsignal messbar. Je mehr DNA amplifiziert wird, umso mehr Reporterfarbstoff liegt ungebunden vor und dies führt zu einer Zunahme der Signalstärke. Dieses Signal ist proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Die Menge der untersuchten mRNA kann durch den Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen normalisiert werden.

Weiterhin kann die cDNA-Menge auch über die Interkalierung eines DNA-Farbstoffs wie SybrGreen® in die amplifizierte DNA festgestellt werden. Diese Methode beruht auf dem Lichtemissionspotential des Komplexes aus amplifizierter DNA und Farbstoff, da die genutzten Farbstoffe bevorzugt in doppelsträngige DNA eingebaut werden. Auch hier ist die Menge des Fluoreszenzsignals proportional zu der Menge an amplifizierter DNA, die im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen quantifi-

ziert werden kann. Da bei dieser Methode das dritte spezifische Oligonukleotid (die Sonde) fehlt, wird die Spezifität der genutzten Primer nach der eigentlichen qPCR-Reaktion über eine Schmelzkurve ermittelt. Hierbei wird die Temperatur schrittweise von 60 °C auf 95 °C erhöht. Bei der für das jeweilige Fragment spezifischen Schmelztemperatur trennt sich der Doppelstrang und es kommt zu einem Abfall des gemessenen Fluoreszenzsignals. Eine Unterscheidung zwischen spezifischen PCR-Produkten und unspezifischen Primerdimeren ist auf Grund der Schmelztemperaturen möglich. Außerdem gibt die Höhe der Scheitelpunkte der Schmelzkurven in etwa die amplifizierte DNA-Menge wieder.

Als Richtwert für die Quantifizierung der Ergebnisse wird der Schwellenwert C(T) genutzt. Dieser bezeichnet den PCR-Zyklus, bei der sich die Fluoreszenzintensität der DNA gerade deutlich von dem Hintergrundsignal abhebt.

Für die im ersten Schritt der qRT-PCR nötigen reversen Transkription der RNA in cDNA wurde das High Capacity cDNA RT Kit von Applied Biosystems verwendet. In Tabelle 3-13 ist beispielhaft die Zusammensetzung eines Ansatzes für die reverse Transkription aufgezeigt.

Tabelle 3-13: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur reversen Transkription und Reaktionsbedingungen.

| Einfacher Ansatz | | PCR Bedingungen | |
|-----------------------|--------------|-----------------|-------|
| 10 x Puffer | 2 µL | 10 Minuten | 25 °C |
| 100 mM dNTPs | 0,8 µL | 2 Stunden | 37 °C |
| 10 x Primer | 2 µL | 5 Sekunden | 85 °C |
| Reverse Transkriptase | 0,5 µL | | |
| H ₂ O | 4,7 µL | | |
| RNA (50 ng/µL) | 10 µL | | |
| <i>Gesamt</i> | <i>20 µL</i> | | |

Jeweils 2 µL der so hergestellten cDNA wurden mit den in Tabelle 3-7 angegebenen Primern und Sonden für einen Ansatz in die qPCR eingesetzt. Tabelle 3-14 zeigt den Reaktionsansatz und die Bedingungen der qPCR sowohl für den Einsatz von Sonden als auch für die Nutzung des KAPA-Sybr®FAST-Mix von Peqlab. Die qPCR wurde in dem MyiQ von BioRad durchgeführt.

Tabelle 3-14: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes mit Sonde oder SybrGreen® und die jeweiligen Reaktionsbedingungen.

| qPCR mit Sonde | | PCR Bedingungen | |
|---------------------|--------------|-----------------|---------------|
| 2 x Puffer | 12,5 µL | 5 Minuten | 95 °C |
| 10 mM dNTPs | 1 µL | 45 x | |
| 10 µM 5'-Primer | 2 µL | 15 Sekunden | 95 °C |
| 10 µM 3'-Primer | 2 µL | 1 Minute | 60 °C |
| 10 µM Sonde | 1 µL | | |
| DNA-Polymerase | 0,5 µL | | |
| H ₂ O | 4 µL | | |
| cDNA | 2 µL | | |
| <i>Gesamt</i> | <i>25 µL</i> | | |
| qPCR mit SybrGreen® | | PCR Bedingungen | |
| 2 x Mix | 12,5 µL | 5 Minuten | 95 °C |
| 10 µM 5'-Primer | 0,4 µL | 45 x | |
| 10 µM 3'-Primer | 0,4 µL | 15 Sekunden | 95 °C |
| H ₂ O | 7,2 µL | 1 Minute | 60 °C |
| cDNA | 2 µL | | |
| <i>Gesamt</i> | <i>20 µL</i> | 10 Sekunden | 60 °C → 95 °C |

Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach der Elongation. Bei Messungen mit interkalierendem Farbstoff erfolgte zusätzlich eine Messung des Fluoreszenzsignals nach jedem Erhöhen der Schmelztemperatur.

Die Auswertung der Ergebnisse bei sondenbasiertem und sondenfreiem System erfolgte mit Hilfe der $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ -Methode¹⁹⁵, bei der die jeweiligen C(T)-Werte jeder Probe auf die Werte der konstitutiv exprimierten Gene bezogen werden und diese anschließend auf eine Kontrollgruppe normiert werden.

3.4.6 UV-Crosslink

Eine Möglichkeit die direkte Interaktion von RNA und Protein zu untersuchen ist die des UV-Crosslinks. Während der Arbeit wurde diese Technik genutzt, um Proteinbindungsstudien an der 3'UTR der murinen Nox2 und Nox1 durchzuführen. Bei dieser Methode wird ein rekombinant hergestelltes Protein (TTP und HuR) an *in vitro* transkribierte und mit ³²P-radioaktiv markierte RNA (murine Nox1- und Nox2-3'UTR-Sequenz) mittels UV-Exposition irreversibel gebunden. Nicht durch Proteinbindung geschützte RNA wird mittels RNase-Verdau entfernt. Der Protein-RNA-Komplex wird über eine SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Nach Belichtung eines Positivfilms durch radioaktiven Zerfall der RNA-Markierung kann dieser Komplex nachgewiesen werden.

3.4.6.1 Linearisierung der 3' UTR-Konstrukte

Die für den UV-Crosslink eingesetzten Konstrukte, die in Tabelle 3-15 zusammengefasst sind, waren durch Klonierung hergestellte Plasmide, die die gewünschten 3'UTR-Sequenzen unter der Regulation eines T7-Polymerasepromotors beinhalten. Diese wurden zunächst durch Restriktionsverdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert und für die *in vitro* Transkription eingesetzt.

Tabelle 3-15: Für UV-Crosslink-Analysen genutzte 3' UTR-Konstrukte und deren Restriktionsenzyme für die Linearisierung.

| 3' UTR Konstrukt | Restriktionsenzym |
|------------------|-------------------|
| hu c-Fos | BamHI |
| hu TNF α | BamHI |
| mu Nox1 | BamHI |
| mu Nox2 | BamHI |
| hu iNOS | BamHI |

Für den Restriktionsverdau wurden jeweils 30 μ g der 3'UTR-Konstrukte mit den entsprechenden Enzymen über Nacht geschnitten und am Folgetag gereinigt. Dafür wurden dem Reaktionsansatz 10 Vol% NaAc (3 M) und 100 Vol% Phenol/Chloroform zugegeben, gut durchmischt und für 5 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 Vol% Chloroform versetzt, gemischt und wiederum 5 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Der oberen Phase wurden 250 Vol% Ethanol absolut zugegeben und die DNA für 60 Minuten bei -20 °C gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 16200 xg und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet in 70 %iger Ethanolösung erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet 5 Minuten über Kopf getrocknet, bevor die DNA in 40 μ L DEPC-H₂O gelöst wurde. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop bestimmt.

3.4.6.2 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription der linearisierten 3'UTR-Konstrukte wurde 1 μ g dieser mit einer T7-RNA-Polymerase in sRNA umgeschrieben. Hierfür wurde zunächst pro 3'UTR-Konstrukt der in Tabelle 3-16 angegebene Mix 1 zusammengestellt.

Tabelle 3-16: Zusammensetzung von Mix 1 für UV-Crosslink.

| Mix 1 | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 10 x Transkriptionspuffer | 2 μ L |
| 3,3 mM CAG-Mix | 3 μ L |
| RNasin | 1 μ L |
| 100 μ M UTP | 1 μ L |
| ³² P-UTP | 3 μ L |
| RNA-Polymerase | 1 μ L |
| DEPC-H ₂ O | x μ L |
| Linearisierte 3'UTR | 1 μ g |
| <i>Gesamt</i> | <i>20 μL</i> |

Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit dem Mix 2 (siehe Tabelle 3-17) versetzt.

Tabelle 3-17: Zusammensetzung von Mix 2 für UV-Crosslink.

| Mix 2 | |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1 x Transkriptionspuffer | 3 μ L |
| DEPC-H ₂ O | 25 μ L |
| DNaseI | 2 μ L |
| <i>Gesamt</i> | <i>30 μL</i> |

Die Ansätze wurden für 45 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und die radioaktive RNA mit Hilfe von Quick Spin Säulen gereinigt. Hierfür wurden diese Säulen mit den Ansätzen beladen und für 2 Minuten bei 600 xg zentrifugiert. 1 μ L des Durchflusses wurden in 4 mL Wischtestlösung zur Bestimmung der Aktivität [CPM] und somit für die Bestimmung des Einbaumaßes der ³²P-UTPs in die RNA entnommen und im TRI-CARB 1900CA vermessen. Die restliche radioaktiv-markierte Sonde wurde über Nacht bei -20 °C gelagert.

3.4.6.3 UV-Crosslink

Die am Vortag hergestellten radioaktiven RNA-Sonden wurden am Folgetag mittels UV-Strahlung irreversibel mit den zu untersuchenden Proteine verknüpft. Hierfür wurde der in Tabelle 3-18 angegebene Mix 3 hergestellt.

Tabelle 3-18: Zusammensetzung von Mix 3 für UV-Crosslink.

| Mix 3 | |
|-------------------------|------------------------------------|
| 1,6 Mio CPM Sonde | x μL |
| DEPC-H ₂ O | y μL |
| Protein | 5 μL |
| Crosslink-Puffer | 7,5 μL |
| 12,5 mM ATP | 1 μL |
| 80 mM MgCl ₂ | 1 μL |
| 0,5 M Creatinphosphat | 1 μL |
| 0,4 M tRNA | 1 μL |
| 2,4-7,5 mM Heparin | 1 μL |
| 40 mM DTT | 1 μL |
| 0,14 mM BSA | 1 μL |
| <i>Gesamt</i> | <i>30 μL</i> |

Die Ansätze wurden 20 Minuten bei 37 °C zur Protein-RNA-Bindung inkubiert. Die Interaktion wurde anschließend für 2 x 999 Sekunden bei 125 mJ im UV-Crosslinker (GS Genelinker UV-Chamber) irreversibel verbunden. Die nicht durch Proteininteraktion geschützte RNA wurde durch RNasen abgebaut. Dafür wurde der in Tabelle 3-19 beschriebene Mix 4 zugegeben.

Tabelle 3-19: Zusammensetzung von Mix 4 für UV-Crosslink.

| Mix 4 | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| RNase A/T1-Puffer | 1,8 μL |
| 730 mM RNase A | 2 μL |
| RNase T1 (100 U/ μL) | 0,2 μL |
| <i>Gesamt</i> | <i>4 μL</i> |

Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert, bevor ihnen 6 μL 5 x Laemmli-Puffer zugegeben wurde und die Proben für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert wurden. Anschließend wurden sie auf ein 10 %iges SDS-Gel (siehe Kapitel 3.5.4.1) geladen und die Protein-RNA-Komplexe für 2 Stunden bei 100 V aufgetrennt. Das zuvor in 10 % Glyzerin eingelegte Gel wurde in einem Vakuumtrockner (Gel Dryer) getrocknet und ein aufgelegter Positivfilm für 3 Tage bei -80 °C belichtet und anschließend entwickelt.

3.4.7 Reporteranalysen

Reporteranalysen sind eine Methode zur Untersuchung von regulatorischen Elementen, wie 3'- oder 5'UTRs, sowie Promotoren. Bei Promotoruntersuchungen wird der zu analysierende Bereich, in diesem Fall die 11 kb Promotorsequenz der humanen HO-1, vor ein Reporter gen kloniert. Als Reportergene eignen sich vor allem Ge-

ne, deren Produktaktivität mittels Chemilumineszenz untersucht werden kann, wie zum Beispiel das Luziferasegen des Leuchtkäfers (*firefly*-Luziferase) oder das der Seefeder (Renillaluziferase). Wird ein Luziferasekonstrukt in Zielzellen transfiziert und von diesen exprimiert, kann die Menge des exprimierten Proteins über einen Enzymtest nachgewiesen werden. Dabei wandelt die Luziferase ihr Substrat D-Luziferin unter Einwirkung der Cofaktoren ATP, Coenzym A und Mg^{2+} in Oxyluziferin um. Die bei der Umwandlung entstehende Biolumineszenz kann in einem Luminometer ermittelt werden und ist proportional zur Expression des Reportergens. Für die Normierung der so erhaltenen Aktivität kann entweder die Gesamtproteinmenge der Proben für stabil transfizierte Zellen oder die Luziferaseaktivität eines bei der transienten Transfektion mittransfizierten zweiten Plasmids mit z.B. einem Renillaluziferasekonstrukt genutzt werden. Im letzteren Fall wird im Luminometer die Umsetzung des Renillasubstrats Coelenterazin detektiert. Da die DLD-1-HO-1-Prom-Zellen jedoch stabil mit dem HO-1-Promotor transfiziert worden waren, erfolgte bei diesen Zellen die Normierung der Luciferasewerte auf Grund der Gesamtproteinmenge.

Für die Reporteranalysen wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung DLD-1-HO-1-Prom-Zellen auf eine 24-Lochplatte ausgebracht und bei einer Konfluenz von 80 % für 16 Stunden mit DMEM ohne FKS und Phenolrot kultiviert. Für die Stimulation der Zellen wurden diese 8 Stunden mit den organischen Nitraten PETN und NTG und den dementsprechenden Lösungsmittelkontrollen DMSO und H_2O behandelt (siehe Kapitel 3.2.4). Anschließend wurden die Zellen in 1 x PLB lysiert. Die Luziferasesubstratlösung wurde, wie in Tabelle 3-20 angegeben, hergestellt. Es wurden 20 μ L der Zelllysate in 96-Lochplatten vorgelegt und die Luziferasewerte 5 Sekunden nach Zugabe von je 100 μ L Luziferasesubstratlösung gemessen. Um den Faktor des Lyse-puffers zu prüfen, wurden ebenfalls die Luziferasewerte des 1 x PLB ermittelt. Die Normierung auf die Gesamtproteinmenge erfolgte durch Quotientenbildung von Luziferasewerten zu Proteinwerten der jeweiligen Proben.

Tabelle 3-20: Zusammensetzung der Luziferasesubstratlösung.

| Luziferasesubstratlösung | |
|---------------------------------|--------------|
| 2 x Luziferasepuffer | 5 mL |
| H_2O | 4,471 mL |
| 12,5 mM D-Luziferin | 376 μ L |
| 27 μ M Coenzym A | 100 μ L |
| 100 mM ATP | 53 μ L |
| <i>Gesamt</i> | <i>10 mL</i> |

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford

Um die Gesamtproteinmenge von Zell- oder Gewebelysaten zu messen, wurde eine photometrische Bestimmung nach Bradford¹⁹⁶ genutzt. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Änderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau von rostrot in der unkomplexierten, kationischen Form zu blau in der proteingebundenen, anionischen Form bei 595 nm. Die Zunahme der gemessenen Extinktion ist proportional zur Menge der in der Lösung enthaltenen Proteine. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration genutzt. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration mittels Standardgerade ermittelt.

Da der zur Herstellung von Zell- und Gewebelysaten (siehe Kapitel 3.5.2) genutzte RIPA-Puffer, im Gegensatz zu dem bei Reporteranalysen genutzten PLB, einen Einfluss auf die Proteinmessung hat, wurde für diese Proben auch den BSA-Standardproben RIPA in gleichen Mengen zugesetzt.

3.5.2 Proteinisolation aus Zellen und Geweben

Zur Untersuchung von Proteinexpressionen mittels Western Blot oder Dot Blot in Zell- oder Gewebeproben wurden diese mit Hilfe eines RIPA-Puffers lysiert. Hierfür wurden Stücke der gefrorenen Mausgewebe in 250 µL RIPA für 5 Minuten bei 50 Hz in einem TissueLyser zerkleinert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 16200 xg für 5 Minuten abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -20 °C bis -80 °C bis zur Benutzung aufbewahrt.

Bei der Proteinisolation aus Zellen wurden diese nach der vorangegangenen Behandlung mit RIPA durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers von der Zellkulturschale abgelöst, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und in einem Bioruptor mittels Ultraschall für 8 Zyklen zu je 30 Sekunden homogenisiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16200 xg für 5 Minuten abgetrennt und die Proben bei -20 °C bis -80 °C gelagert.

3.5.3 Fällung von Proteinen

Um Proteine für spätere Untersuchungen zu konzentrieren, wurden diese mit Hilfe von Methanol und Chloroform¹⁹⁷ gefällt. Hierzu wurde die gewünschte Proteinmenge mit H₂O auf 100 µL aufgefüllt und 400 Vol% Methanol, 100 Vol% Chloroform, sowie 300 Vol% H₂O zugegeben und stark durchmischt. Zur Phasentrennung wurde

5 Minuten bei 16200 xg zentrifugiert. Da sich die Proteine in der Interphase sammeln, wurde die obere Phase vorsichtig verworfen und die Proteine mit 300 Vol% Methanol gefällt. Nach anschließender Zentrifugation bei 16200 xg für 5 Minuten konnte der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Proteinpellet für 5 Minuten getrocknet werden. Wurden die Proben für Immunfärbungen mittels Western Blot genutzt, wurden sie in 15 µL 2 x Laemmli aufgenommen und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert.

3.5.4 Immunfärbungen mittels Western Blot und Dot Blot

3.5.4.1 Western Blot

Für Analysen der Proteinexpression in verschiedenen Proben wurden diese mittels Western Blot nachgewiesen. Vor dem eigentlichen Western Blot wurde eine eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Durch Zugabe des anionischen Detergens SDS wird dabei die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass die Proteinauftrennung in der Matrix bei dieser Methode allein der Größe der Proteine entsprechend erfolgt. Außerdem werden durch Erhitzen der Proben für 5 Minuten bei 95 °C in SDS-haltigen Laemmli-Puffer die Tertiär- und Quartärstrukturen denaturiert. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Komponenten: Einem hochprozentigen Trenngel und dem niederprozentigen Sammelgel, welches das Trenngel überschichtet. Zunächst werden die Proteine im grobporigen Sammelgel konzentriert, sammeln sich an der Phasengrenze zum engporigen Trenngel und werden dort aufgetrennt. Nach erfolgter Gelelektrophorese werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und können dort durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für je zwei 1,5 mm dicke Gele ist in Tabelle 3-21 dargestellt.

Tabelle 3-21: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.

| | Sammelgel (4 %) | Trenngel (10 %) |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| H ₂ O | 4,60 mL | 6,70 mL |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) | 1,88 mL | 4,22 mL |
| 10 % SDS | 75,00 µL | 168,75 µL |
| 30 % Acrylamid | 975 µL | 5,63 mL |
| TEMED | 9,75 µL | 11,25 µL |
| 10 % APS | 49,50 µL | 112,5 µL |

Nach dem Polymerisieren des Gels wurden die in Laemmli-Puffer aufgenommenen Proben für 5 Minuten bei 95 °C im Heißblock denaturiert, kurz zentrifugiert und in das Gel, welches in eine mit 1 x Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingespannt wurde, eingefüllt. Als Größenmarker wurde ein Proteinstandard von Thermo Scientific verwendet. Bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel wurde eine Initialspannung von 80 V angelegt. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Proteine so lange aufgetrennt, bis die Lauffront gerade aus dem Gel hinausgelaufen war. Das Sammelgel wurde abgetrennt und das Trenngel für 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert, bevor ein 3 Lagen Whatmanpapier, Nitrocellulosemembran, Gel und 3 weitere Lagen Whatmanpapier übereinander gestapelt wurden. Im WetBlot-Verfahren wurden anschließend die Proteine auf die Nitrocellulosemembran in Transferpuffer für 2,5 Stunden bei 300 mA übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde 1 Stunde in Blockierlösung geschwenkt, um ungesättigte Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach drei 5minütigen Waschschritten mit Waschpuffer der meerrettichperoxidasegekoppelte Zweitantikörper für 1,5 Stunden bei RT an den Primärantikörper gebunden. Nach erneutem Waschen der Membran für je 3 x 5 Minuten mit Waschpuffer wurde die Membran mittels ECL-System von Thermo Scientific entwickelt. Die Expression der untersuchten Proteine wurde mit Hilfe eines konstitutiv exprimierten Proteins (z.B. GAPDH) normalisiert. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mittels densitometrischer Analyse.

3.5.4.2 Dot Blot

Eine vereinfachte Möglichkeit für die Analyse von Proteinen ist die Dot Blot-Methode. Hierbei wird auf die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine verzichtet. Die Proteine werden direkt als Punkte auf eine Membran aufgebracht und durch spezifische Antikörper detektiert.

Für die Untersuchung von nitrotyrosinpositiven Proteinen in Herzen von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden 20 µg Protein pro Punkt unter Absaugen auf die Membran aufgebracht. Anschließend wurden die Punkte mit jeweils 200 µL PBS 2 x gespült. Nach Entfernen der Membran aus der Apparatur wurden freie Bindungsplätze auf dieser unspezifisch durch Zugabe von Blockierlösung für 1 Stunde besetzt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 5 Waschschritten für jeweils 10 Minuten mit PBST wurde der Sekundärantikörper für 1 Stunde zugegeben.

Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese mit ECL-Substrat entwickelt. Die Auswertung der Dot Blots erfolgte mittels densitometrischer Analyse.

3.6 Funktionsanalysen

3.6.1 Blutdruckmessung

Der systolische und diastolische, sowie der Gesamtblutdruck und der Puls der Mäuse wurde mit einer am Schwanz angelegten Manschette von einem Sensor (CODA Monitor) aufgenommen. Die Messungen wurden zwischen 13:00 und 17:00 Uhr von Zhixiong Wu durchgeführt. Nach 30 Minuten Gewöhnungszeit im Mausfixierer auf einer Wärmeplatte wurde die Blutdruckmessung pro Maus 10-15 Mal wiederholt.

3.6.2 Bestimmung des Blutbildes

Die Bestimmung des Mausblutbildes erfolgte mit Hilfe des Hemavet 950 FS. Frisches Vollblut wurde in EDTA-beschichteten Röhrchen aufgefangen und gut durchmischt, um sicherzustellen, dass das Blut mit dem Koagulanzen in Berührung kam. Die Proben wurden mindestens 5 Minuten bei RT inkubiert. Zur Analyse der Blutwerte im Hemavet 950 FS wurden 20 μ L Blut benötigt.

3.6.3 Endothelfunktionsmessung

Eine Verschlechterung der Endothelfunktion ist ein erstes Symptom für die Ausbildung von arteriosklerotischen Veränderungen⁹⁸. Daher wurde die Endothelfunktion verschiedener Mausearten untersucht. Hierfür wurden 3 mm große Aortenringe in Organbadkammern für isometrische Spannungsmessungen gehangen, mit Norepinephrin maximal kontrahiert und die endothelabhängige Relaxation mit zunehmenden AcetylcholinKonzentrationen ermittelt. Zusätzlich erfolgten Messungen mit dem spezifischen NO-Synthasehemmer L-NAME (1mM). Außerdem wurde die Gefäßrelaxation mit dem generellen NO-Donor SNP ermittelt. Die Messungen wurden von Dr. Ning Xia und Zhixiong Wu nach dem etablierten Protokoll durchgeführt.

3.6.4 Lipidprofil

Es wurde beschrieben, dass die Entwicklung einer eDF während der Entwicklung einer Arteriosklerose im Menschen abhängig vom Lipidstoffwechsel ist¹⁹². Um zu untersuchen, ob dies auch für das chronische Entzündungsmodell der TTP^{-/-}-Mäuse zutrifft, wurde das Lipidprofil in Vollblutproben von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen mit Hilfe des Alere Cholestech LDX Systems und Lipidprofiltestkassetten ermittelt. Es wurden 40 μ L Vollblut auf eine Kassette aufgebracht und die Werte für Gesamtcho-

lesterin (TC), HDL-, LDL- und nicht-HDL-Cholesterin (nHDL), sowie Triglyceride (TRG), Glukose (Glu) und das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL-Cholesterin (TC/HDL) bestimmt.

3.6.5 ROS-Messungen

Da reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Prozessen wie bei oxidativem Stress spielen, wurde deren Vorkommen in murinen Proben auf unterschiedliche Weisen getestet: Im Vollblut wurde die ROS-Bildung unter PDPu-stimulierten Bedingungen ermittelt, in Herzfraktionen wurde die NADPH-Oxidaseaktivität bestimmt, während die vaskuläre ROS-Produktion in Aortenschnitten mit Dihydroethidin (DHE) ermittelt wurde.

3.6.5.1 ROS-Bildung im Vollblut

Die oxidative Belastung in frischem Vollblut, das mit Citrat versetzt wurde, wurde unter dem Einfluss von 1 μM PDBu mittels 100 μM L-012-ECL in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Daiber in der 2. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz nach dem dort gängigen Protokoll ermittelt.

3.6.5.2 NADPH-Oxidaseaktivität in Herzfraktionen

Die NADPH-Oxidase-abhängige Superoxidbildung wurde in Herzgeweben nach einer Glas/Glas-Homogenisierung in Anwesenheit von 200 μM NADPH durch 5 μM Luzigenin gemessen. Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Daiber in der 2. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.6.5.3 Vaskuläre ROS-Bildung

Die vaskuläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde mit Hilfe von DHE-abhängiger (1 μM) Fluoreszenzmikrotopographie in Aortenschnitten analysiert. Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Daiber in der 2. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

3.6.6 Schwanzvenenblutungszeit

Um die Hämostase in Mausmodellen zu evaluieren, wurden die Schwanzvenenblutungszeiten (TVBT) in den verschiedenen Mausstämmen ermittelt. Hierzu wurden die Mäuse fixiert, ein 0,5 cm langes Stück vom Schwanz abgetrennt und der Schwanz in 37 °C warme NaCl-Lösung (162 mM) getaucht. Die Zeit zum vollständigen Stopp der Blutung wurde gemessen.

3.6.7 Gerinnungsanalysen

Die Untersuchung des intrinsischen und extrinsischen Koagulationsweges erfolgte in einem Amelung Koagulometer. Der intrinsische Blutgerinnungsweg wurde über die Messung der partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), die extrinsische Gerinnung über die Prothrombinzeit (PT) ermittelt.

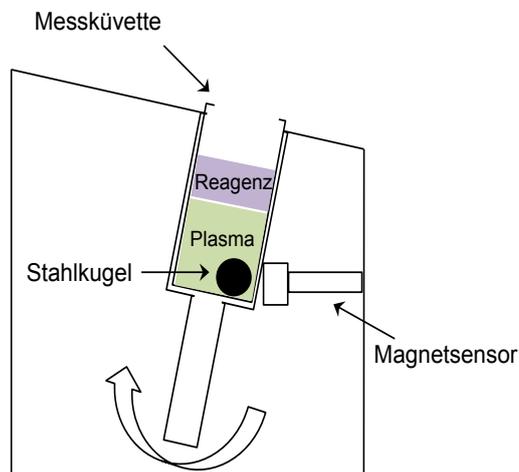


Abbildung 3-4: Kugelprinzip des Amelung Koagulometers.

Verändert nach MERLIN Medical, 31.07.2013, 13:41

die Gerinnung vollständig, dreht sich die Stahlkugel mit, verlässt den Erfassungsbereich des Magnetsensors und stoppt die Zeitmessung.

Für die Messungen würde das Blut frisch mittels Herzpunktion gewonnen und 9:1 mit Citratlösung gemischt, um ein vorzeitiges Gerinnen der Proben zu verhindern. Das Blut wurde bei 600 xg 20 Minuten bei RT zentrifugiert und das Plasma für die Untersuchungen eingesetzt.

Zur Ermittlung der Prothrombinzeit (PT) wurden 50 µL Plasma in die Kuvette gegeben, für eine Minute bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 µL Thromborel S gestartet. Die Zeit bis zur vollständigen Gerinnung der Probe wurde gemessen.

Die partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde durch die Zugabe von 50 µL Pathromtin SL zu 50 µL Citratplasma gemessen. Nach einer 5minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Messung durch Zugabe von 50 µL einer 0,025 M Calciumchloridlösung gestartet. Die Zeit zur Bildung des Koagels wurde gemessen und entspricht der partiellen Thromboplastinzeit.

3.6.8 Intravitalmikroskopie

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie wurde die Plättchen-Endothelzell-Interaktion in der Karotisarterie von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen vor dem Hintergrund einer ar-

Das Prinzip des Koagulometers ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Während der Messung dreht sich die Messkuvette in der Apparatur. Durch die Schräglage bleibt die Stahlkugel in der Messkuvette immer am tiefsten Punkt. Durch Zugabe der jeweiligen Reagenzien wird die Gerinnungsreaktion eingeleitet. Ist

teriosklerotischen Erkrankung *in vivo* ermittelt. Hierfür wurden Empfängermausen nach Verletzung durch 5minütiges Abbinden der Karotisarterie fluoreszenzmarkierte Plättchen einer Spendermaus injiziert und die Adhäsion dieser Plättchen an die Läsionsstelle mittels Videofluoreszenzmikroskopie beobachtet.

Die Messung der Thrombozytenadhäsion an lädierte Mauseorten mittels Intravitalmikroskopie wurde von Dr. Sven Jäckel am Centrum für Thrombose und Hämostase in Mainz nach dem dort etablierten Protokoll durchgeführt.

3.6.9 Plaquefärbungen

Die Färbung arteriosklerotischer Plaques erfolgte im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz nach dem dortigen Protokoll mittels Sudan-Färbung. Bei dieser Methode werden im Plaque befindliche Triglyceride, Lipide und Lipoproteine spezifisch durch den genutzten Farbstoff angefärbt und liefern ein Maß für den Plaquebefall in den Aorten.

3.6.10 Quantifizierung von L-Arginin und ADMA mittels HPLC

Für die Quantifizierung von L-Arginin- und ADMA-Spiegeln wurde zunächst mit Citrat versetztes Vollblut 15 Minuten bei 600 xg und 4 °C zentrifugiert, um Blutzellen und Plasma zu trennen. Das Plasma wurde für die HPLC-Analyse eingesetzt. Die HPLC-Untersuchungen wurden von Alice Habermaier durchgeführt.

3.7 Statistik

Alle dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM (Standardfehler der Mittelwerte) oder den Mittelwert + SEM. Die statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism Version 5.0b durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen untereinander wurde ein t-Test, für den Vergleich mehrerer Gruppen mit nur einer Variablen wurde ein One-way ANOVA (Varianzanalyse) angewendet. Wurden mehrere Gruppen mit verschiedenen Variablen untereinander verglichen, wurde ein Two-way ANOVA durchgeführt. Für beide wurde außerdem ein *Bonferroni multiple comparison test* angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung zentraler Mediatoren der RA und AT

Eine systemische Entzündung, wie sie bei einer RA auftritt, ist ein Risikofaktor, der zu der Ausbildung einer AT führen kann und unabhängig von den klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes oder Dyslipidämien ist⁷⁴.

TTP^{-/-}-Mäuse zeigen eine deutlich erhöhte TNF α -Expression, da TTP die Stabilität der TNF α -mRNA reguliert. Daher sind sie ein gut geeignetes Mausmodell für chronische Entzündungen, bei denen eine erhöhte TNF α -Expression einen zentralen Mechanismus bei der Pathogenese einnimmt. Der entzündliche Phänotyp dieser Mäuse ähnelt in vielen Punkten denen von RA-Patienten, sodass sie sich gut für die mechanistischen Untersuchungen über den Zusammenhang von RA und AT eignen. Während der Doktorarbeit wurden außerdem doppeldefiziente Mäuse (TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}) gezüchtet, um den Einfluss von TNF α auf die Ausbildung der AT im Kontext dieser chronischen Entzündung zu untersuchen.

4.1.1 Charakterisierung der TTP^{-/-} und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse

4.1.1.1 Die Embryonenabstoßung in TTP^{+/-}-Mäusen wird durch oxidativen Stress und TNF α -Erhöhung vermittelt

Da TTP^{-/-}-Mäuse infertil sind, mussten die TTP^{-/-}-Mäuse durch Verpaaren von heterozygoten Mäusen gezüchtet werden. Es zeigte sich jedoch nach kurzer Zeit, dass sich bei dieser Zucht nicht das erwartete Mendelsche Verhältnis von 1:2:1 von wildtyp : heterozygot : defizient einstellte. Es waren nur 14 % aller Nachkommen TTP-defizient (siehe Abbildung 4-1). Auf Grund des starken prooxidativen Phänotyps der TTP^{-/-}-Mäuse wurde vermutet, dass schon das Einnisten bzw. die Versorgung der Embryonen negativ beeinflusst sein könnte. In Ratten mit hypoxischer Schwangerschaft konnte die Gabe von Vitamin C die Funktion der Plazenta und das Fötowachstum positiv beeinflussen¹⁹⁸. Als Präventionsmaßnahme wurde dem Trinkwasser der TTP^{+/-}-Mäuse daher das oral bioverfügbare Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) zugegeben.

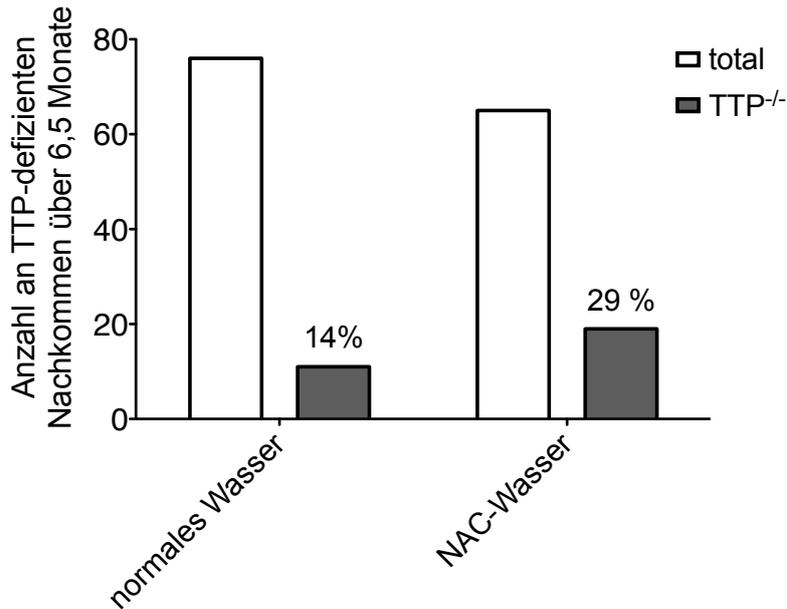


Abbildung 4-1: Die Gabe von NAC erhöht die Anzahl von TTP^{-/-}-Nachkommen.

TTP^{+/-}-Zuchtmäuse wurden mit 7 mg/mL NAC oral über das Trinkwasser behandelt. Die Anzahl der TTP^{-/-}-Nachkommen in Bezug auf die Gesamtmenge der Nachkommen in Prozent wurde über 6,5 Monate untersucht.

Die Gabe von NAC bewirkte über einen Untersuchungszeitraum von 6,5 Monaten eine Zunahme der TTP-defizienten Nachkommen um 15 %, sodass das erwartete Mendelsche Verhältnis der Nachkommen einer heterozygoten Zucht erreicht werden konnte. Um die weiteren Untersuchungen jedoch nicht durch die NAC-Gabe zu beeinflussen, wurde dem Wasser der entwöhnten Tiere kein NAC mehr zugesetzt und nur Mäuse in einem Alter von 3 ½ bis 4 Monaten für die Untersuchungen genutzt.

Die TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse, die im Rahmen dieser Doktorarbeit gezüchtet wurden, ließen sich im Gegensatz zu den TTP^{-/-}-Mäusen auch homozygot verpaaren, sodass neben der Rolle des oxidativen Stresses auch TNF α -abhängige Effekte die TTP-abhängige Infertilität der Mäuse beeinflussen.

4.1.1.2 Die verringerte Gewichtszunahme in TTP^{-/-}-Mäusen kann durch zusätzliche Deletion des TNF α -Gens revidiert werden

Schon bei der ersten Beschreibung der TTP^{-/-}-Mäuse von der Gruppe um Dr. Blackhear konnte gezeigt werden, dass TTP-defiziente Mäuse während ihrer Entwicklung weniger an Gewicht als Wildtyptiere zunahmen. Diese verringerte Gewichtszunahme konnte durch eine Anti-TNF α -Therapie behoben werden und die derart behandelten Tiere zeigten in etwa die gleiche Gewichtszunahme wie Wildtypmäuse²³. Um diesen

Befund auch in den eigenen Analysen zu untersuchen, wurden alle Versuchstiere zum Todeszeitpunkt gewogen und der Körpermaßindex (BMI) bestimmt.

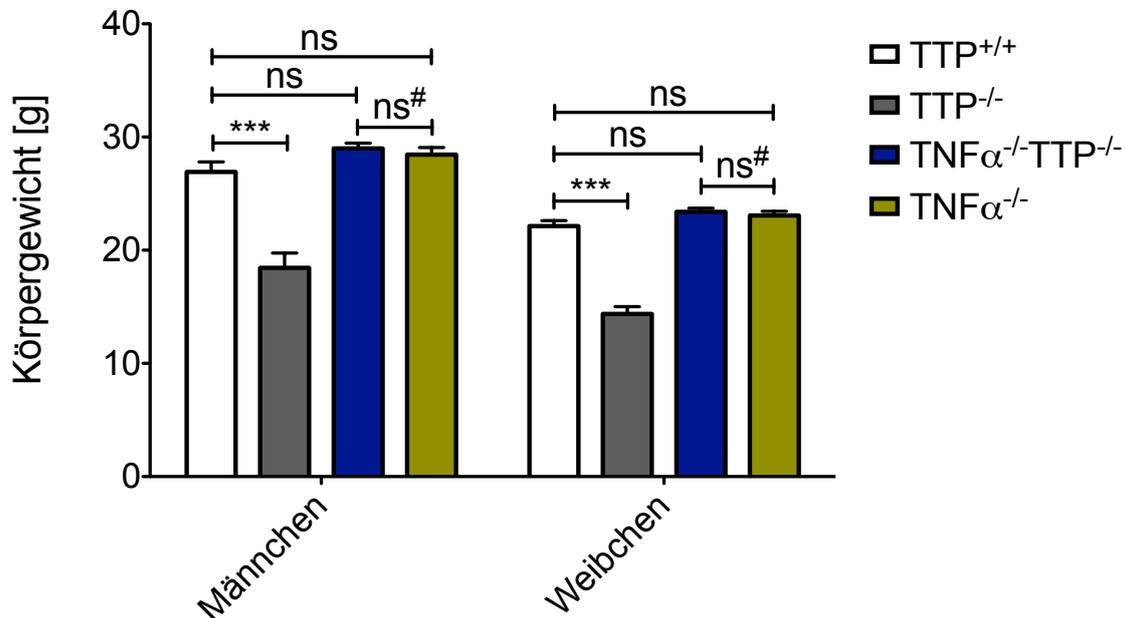


Abbildung 4-2: Die verringerte Gewichtszunahme von TTP^{-/-}-Mäusen ist TNFα-vermittelt.

Das Körpergewicht von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNFα^{-/-}- und TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurde im Alter von 3 ½ bis 4 Monaten zum Zeitpunkt des Todes ermittelt.

Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte der Körpergewichte von 11-24 Männchen und 13-18 Weibchen + SEM (***) = p < 0,001; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; ns# = nicht signifikant verschieden von TNFα^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA).

Es zeigte sich, dass die TTP-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen (TTP^{+/+}) im Alter von 3 ½ bis 4 Monaten um ca. 30-35 % leichter waren und dieser Befund nicht geschlechtsabhängig war. TNFα^{-/-}TTP^{-/-}- und TNFα^{-/-}-Mäuse zeigten kein verringertes Gewicht im Vergleich zu den TTP^{+/+}-Mäusen, was auf einen TNFα-vermittelten Effekt auf den Gewichtsverlust in den TTP^{-/-}-Mäusen hinweist.

Es zeigte sich außerdem, dass die TTP-defizienten Mäuse kleiner als deren Wildtypgeschwister waren. Es ist bekannt, dass ein hoher BMI einen starken Einfluss (zu 49 %) auf die vaskuläre Funktion hat¹⁹⁹. Um den Einfluss der Körpergröße auf die nachfolgenden Untersuchungen aufzuzeigen, wurde daher zusätzlich zum Gewicht der BMI dieser Mäuse bestimmt.

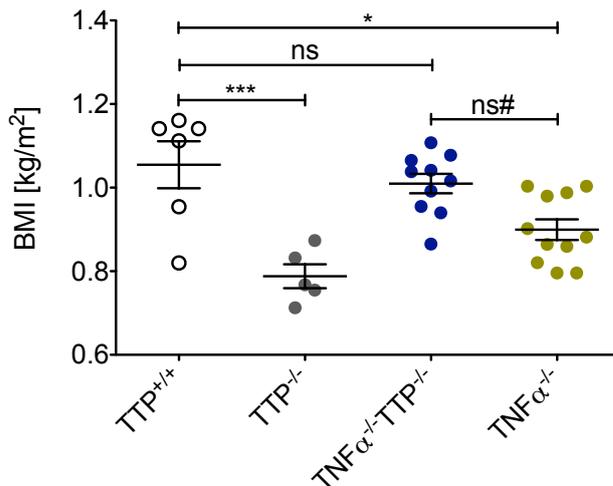


Abbildung 4-3: Die TTP- und TNFα-Defizienz führt zu verringerten BMI-Werten.

Der BMI von TTP^{+/-}, TTP^{-/-}, TNFα^{-/-} und TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurde zum Todeszeitpunkt ermittelt. Die Körpergröße wurde von der Nasenspitze zum Schwanzende gemessen.

Die dargestellten Werte sind die Einzel- und Mittelwerte ± SEM von 2-6 Tieren (** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/-}-Mäusen; ns# = nicht signifikant verschieden von TNFα^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA).

Es zeigte sich im Vergleich zu den TTP^{+/-}-Mäusen eine starke Verringerung der BMI-Werte in den TTP-defizienten Mäusen, sowie eine moderate, jedoch signifikante Änderung der BMI-Werte der TNFα^{-/-}-Mäuse. Ein erhöhter BMI wirkt sich beim Menschen negativ auf die vaskuläre Funktion aus. Folglich sollten die Mäuse mit geringerem BMI verglichen mit den TTP^{+/-}-Kontrollen eine verbesserte vaskuläre Funktion aufweisen. Der mittlere BMI der doppeldefizienten Mäuse war im Vergleich mit den Wildtypindizes leicht aber nicht signifikant verringert. Dieses Ergebnis könnte auf eine unveränderte Endothelfunktion der TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen hinweisen.

4.1.1.3 Verringerung des Blutdrucks durch eine TTP-abhängige chronische Entzündung

Der Zusammenhang von Blutdruck und der Ausbildung einer eDF als ein erster Indikator einer beginnenden AT ist bekannt²⁰⁰. Auf Grund der Beeinflussung der Gefäßwandfunktion durch einen hohen Blutdruck zeigen hypertensive Patienten eine Beeinträchtigung in ihrer vasodilatorabhängigen Gefäßrelaxation²⁰¹. Um zu überprüfen ob dies auch vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung der Fall ist, wurden der systolische, diastolische und der Gesamtblutdruck, sowie der Puls der TTP^{-/-}- und TTP^{+/-}-Mäuse ermittelt.

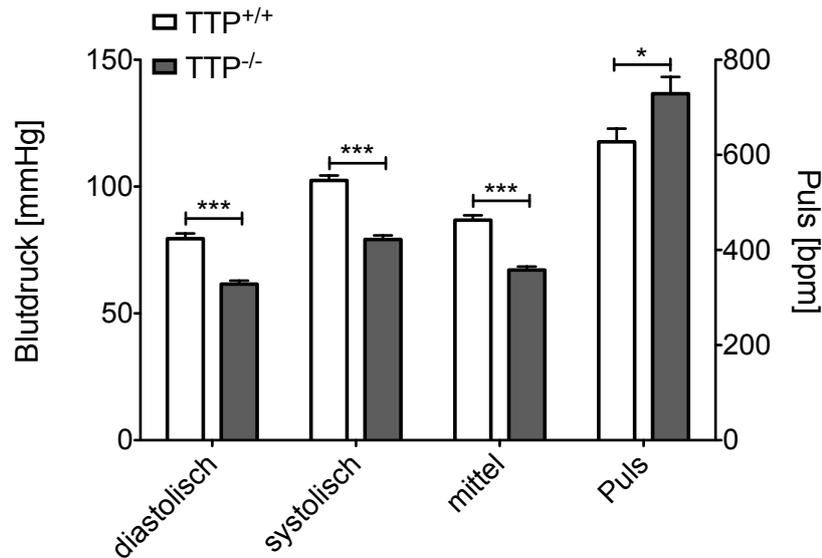


Abbildung 4-4: Eine TTP-Defizienz führt zu einem verringerten Blutdruck mit gleichzeitiger Erhöhung des Pulses.

Der diastolische, systolische und der Gesamtblutdruck, sowie der Puls wurden mittels einer am Schwanz der Mäuse angelegten Manschette gemessen. Nach einer 30minütigen Eingewöhnungszeit wurden die Messwerte pro Maus 10-15 Mal ermittelt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte des Blutdrucks bzw. des Pulses von 14 Mäusen + SEM (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$ im Vergleich mit TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Es zeigte sich, dass sowohl der systolische und diastolische als auch der Gesamtblutdruck der TTP-defizienten Mäuse im Vergleich zu den TTP^{+/+}-Tieren deutlich verringert war. Der Puls dieser Mäuse war im Vergleich leicht erhöht, was auf eine Gegenregulation des Organismus schließen lässt. Die TTP-defizienten Mäuse sollten auf Grund des geringeren Blutdrucks besser vor der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion geschützt sein als Wildtypmäuse.

4.1.2 Kardiovaskuläre Erkrankung im Modell der chronischen Entzündung

Es ist bekannt, dass Patienten mit chronischen Entzündungen wie der RA vermehrt an kardiovaskulären Vorfällen versterben⁷². Das chronische Entzündungsmodell der TTP^{-/-}-Mäuse, in denen es zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Mediatoren kommt, wurde daher für die mechanistischen Untersuchungen zur Entstehung von inflammationsgetriebenen kardiovaskulären Krankheiten genutzt.

4.1.2.1 Die TTP-Defizienz führt zu der Ausbildung einer eDF

Die Entwicklung einer eDF, als eines der ersten Symptome einer entstehenden AT, kann durch eine systemische Entzündung induziert werden. Für die Untersuchungen der Endothelfunktion durch isometrische Spannungsmessungen wurden Aortenringe

in Organbadkammern maximal mit einem Vasokonstriktor wie Norepinephrin kontrahiert und die vasodilatorabhängige Relaxation der Aortenringe nach Acetylcholingabe aufgezeichnet. Um zu untersuchen, ob die ermittelte Endothelfunktion abhängig von NO ist, wurden die Aortenringe vor der Kontraktion mit dem NO-Synthasehemmer L-NAME inkubiert und der Versuch wie zuvor durchgeführt.

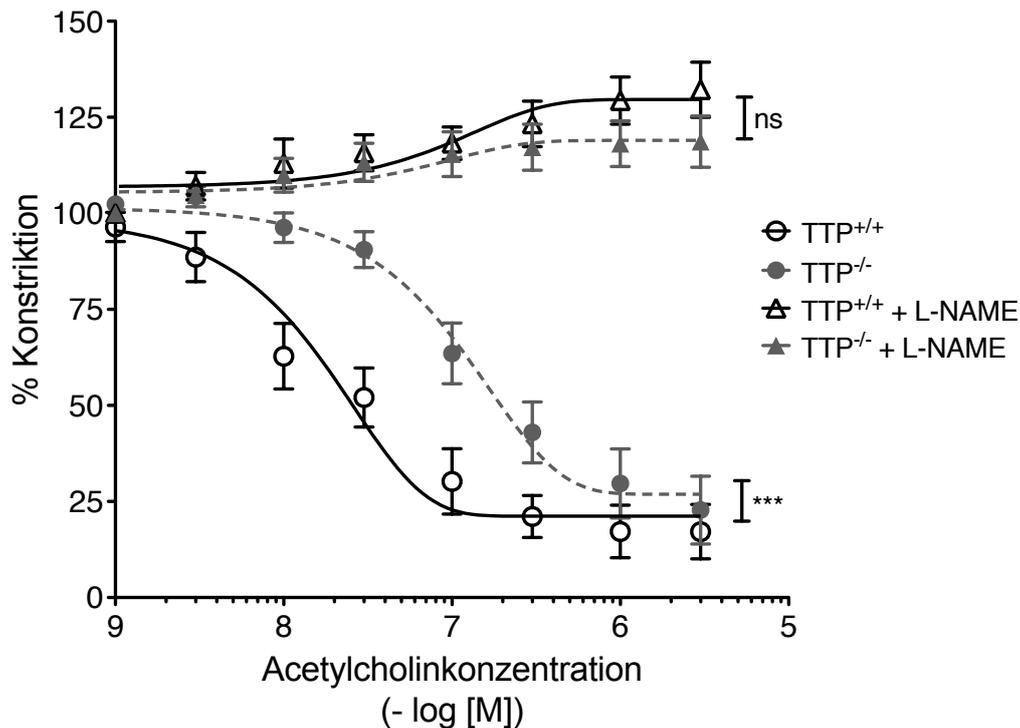


Abbildung 4-5: Die TTP-Defizienz führt zu der Ausbildung einer eDF.

3 mm große Aortenringe von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden für isometrische Spannungsmessungen in Organbadkammern mit 100 nM Norepinephrin maximal kontrahiert und mit steigenden Konzentrationen Acetylcholin in An- oder Abwesenheit von 1 mM L-NAME relaxiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM von 4-7 unabhängigen Messungen (***) = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; Two-way ANOVA)⁵⁷.

In den Relaxationsversuchen von Aortenringen aus Wildtyp (TTP^{+/+})- und TTP-defizienten Mäusen zeigte sich eine massive Dysregulation der Endothelfunktion in TTP^{-/-}-Mäusen durch eine verringerte Sensibilität der Gefäße auf Acetylcholin. Die EC₅₀-Werte für Acetylcholin durch die TTP-Defizienz erhöhten sich von $2 \cdot 10^{-8}$ M im Wildtyp auf 10^{-7} M in TTP-defizienten Gefäßen, was für einen deutlichen Verlust der Acetylcholinsensitivität spricht.

Die vorangegangene Inkubation der Aortenringe mit dem NO-Synthasehemmer L-NAME (+ L-NAME) verhinderte die acetylcholininduzierte Gefäßrelaxation in beiden Gruppen. Dies weist darauf hin, dass NO-abhängige Mechanismen zu der beobachteten Relaxation beitragen.

bachteten eDF in TTP^{-/-}-Aorten führen. Um auszuschließen, dass die Gefäße beider Gruppen auf Grund der unterschiedlichen Größenverhältnisse (siehe Kapitel 4.1.1.2) verschieden auf die Versuchsverhältnisse reagierten, wurde die Kontraktilität der Aortenringe mit steigenden Konzentrationen des Vasokonstriktors Phenylepinephrin in An- oder Abwesenheit von L-NAME ermittelt.

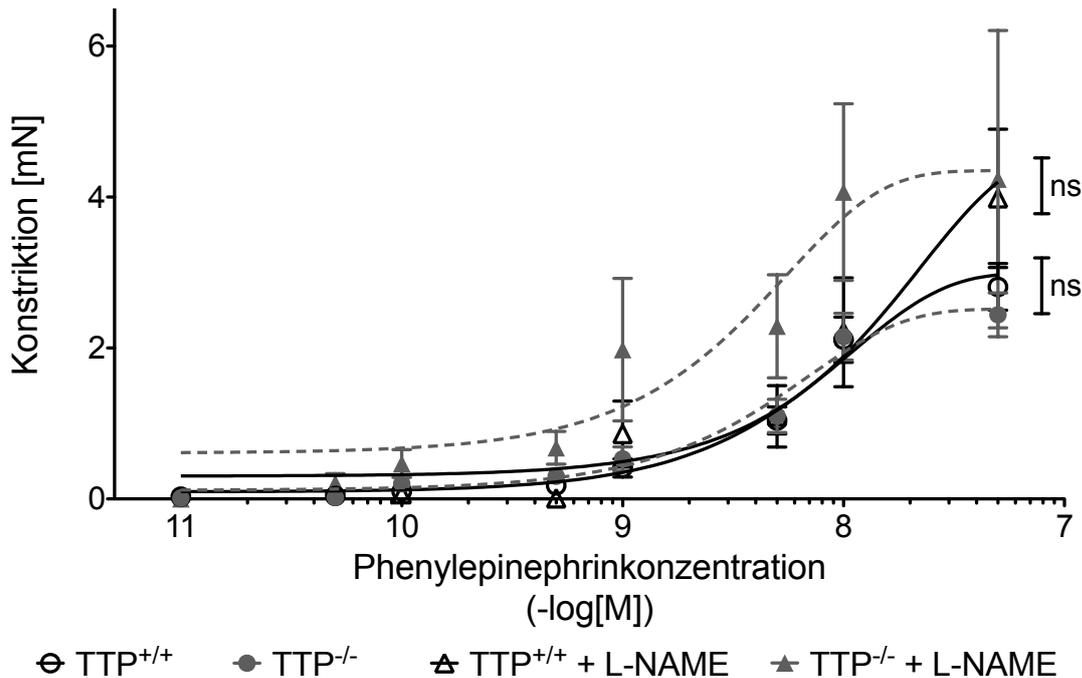


Abbildung 4-6: Die durch TTP-Defizienz bedingten Größenunterschiede beeinträchtigen nicht die Kontraktilität der Aortenringe.

3 mm große Aortenringe von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden für isometrische Spannungsmessungen mit steigenden Konzentrationen Phenylepinephrin in An- oder Abwesenheit von 1 mM L-NAME kontrahiert.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± SEM von 4-7 unabhängigen Messungen (ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; Two-way ANOVA).

Die Fähigkeit der Gefäße zu einer phenylepinephrininduzierten Konstriktion beider Versuchsgruppen in An- bzw. Abwesenheit von L-NAME war nicht verschieden. Dies lässt darauf schließen, dass die Verringerung in Körpergröße bzw. BMI der TTP-defizienten Mäuse keinen Einfluss auf die Messung der Endothelfunktion hatte.

Es wurde in einem nächsten Versuch durch Nutzen des NO-Donors Natriumnitroprussid (SNP) getestet, ob in TTP^{-/-}-Mäusen eine Veränderung der nachgeschalteten Signalwege der sGC für die eDF verantwortlich ist.

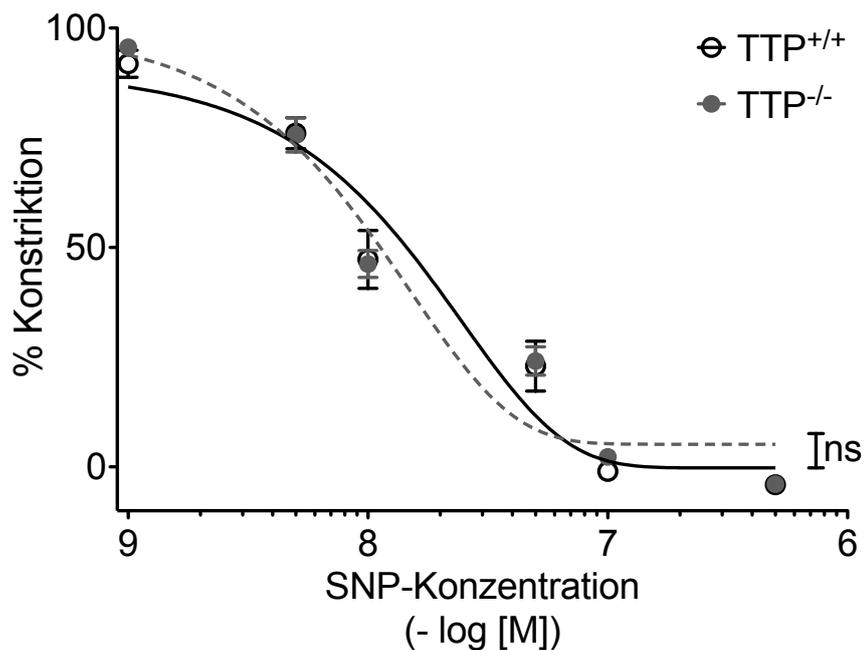


Abbildung 4-7: Die Gefäßrelaxation nach Gabe eines direkten NO-Donors wird nicht durch die TTP-Defizienz beeinflusst.

3 mm große Aortenringe von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden für isometrische Spannungsmessungen mit 10 nM Phenylepinephrin kontrahiert. Die Relaxation der Gefäße wurde mit steigenden Konzentrationen SNP ermittelt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Messungen (ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; Two-way ANOVA)⁵⁷.

Die durch Behandlung der Gefäße mit dem direkten NO-Donor SNP induzierte Relaxation war in TTP^{-/-}-Mäusen nicht signifikant verschieden von der Vasodilatation in Wildtypgefäßen und lag bei einem EC₅₀-Wert von ca. $2 \cdot 10^{-8}$ M. Dieser Befund weist auf intakte nachgeschaltete Signalwege der sGC in TTP-defizienten Mäusen hin.

4.1.2.2 Die massive eDF in TTP^{-/-}-Mäusen ist unabhängig von Veränderungen der Cholesterinblut- oder Glukosewerte

Das Auftreten von Dyslipidämien durch eine systemische Inflammation und die Aufnahme von oxidiertem LDL durch in die Aorta eingewanderte Makrophagen ist stark mit der Ausprägung einer AS verbunden. Bei AS-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer eDF abhängig von veränderten Cholesterinwerten ist¹⁹². Um zu untersuchen, ob auch TTP-defiziente Mäuse einen veränderten Lipidstatus aufweisen, wurden die Lipidprofile der Mäuse analysiert.

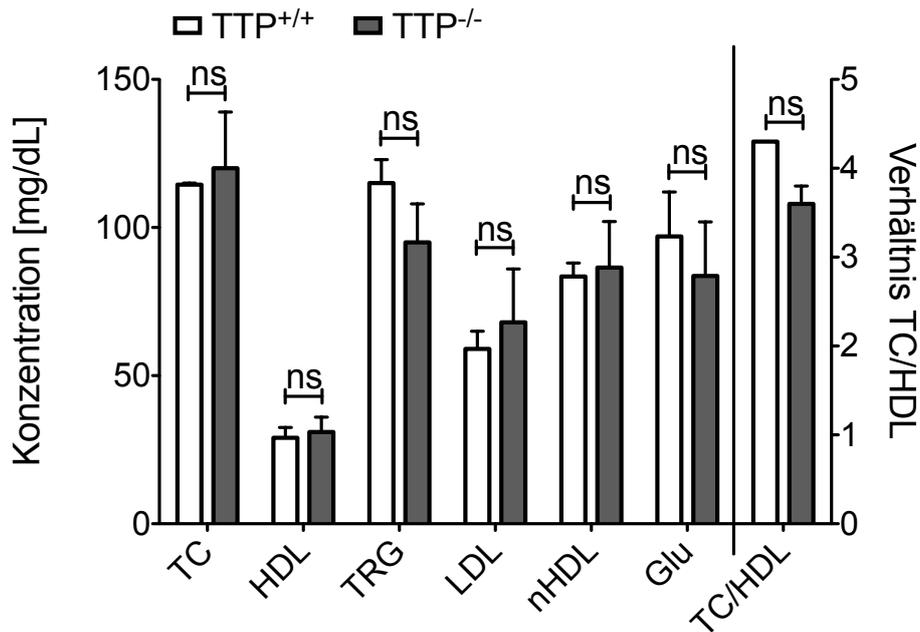


Abbildung 4-8: Die durch die TTP-Defizienz induzierte eDF ist unabhängig vom Lipidstatus und Blutzuckerwert der TTP^{-/-}-Mäuse.

40 μ L Vollblut von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurde in Lipidprofiltestkassetten im Alere Cholestech LDX System untersucht. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte von je drei TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen + SEM (ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Es zeigte sich, dass TTP^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu TTP^{+/+}-Tieren keine Veränderungen in ihrem Lipidprofil aufwiesen. Die getesteten Parameter Totalcholesterin (TC), HDL- und LDL-Cholesterin (HDL, LDL), Triglyceride (TRG), nicht-HDL-Cholesterin (nHDL), Glukose (Glu) und das Verhältnis von Total- zu HDL-Cholesterin (TC/HDL) waren zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht verändert. Es konnte in diesem chronischen Entzündungsmodell kein proarteriosklerotischer Phänotyp des Lipidstatus nachgewiesen werden. Die in den TTP^{-/-}-Mäusen beobachteten kardiovaskulären Veränderungen beruhen daher nicht auf einer Dyslipidämie.

4.1.2.3 Eine verringerte NO-Bioaktivität ist für die eDF in TTP^{-/-}-Mäusen verantwortlich

Die in den TTP-defizienten Mäusen auftretende, NO-abhängige (siehe Kapitel 4.1.2.1) eDF könnte verschiedene Ursachen haben: z.B. eine verringerte Bildung des Vasodilators NO, eine Substratverarmung oder die Reaktion mit reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies. Mit Hilfe der folgenden Versuche sollten die Gründe für die kardiovaskulären Veränderungen der TTP^{-/-}-Mäuse geklärt werden. Zunächst wurde die Bioaktivität des verfügbaren NOs untersucht. Als Marker für bioaktives NO eignet

sich die Quantifizierung der Phosphorylierung des vasodilatatorstimulierten Phosphoproteins (VASP) an Stelle 239. Daher wurden Immunfärbungen von Aortenproteinen mittels Western Blot und einem spezifischen P(239)-VASP-Antikörper durchgeführt.

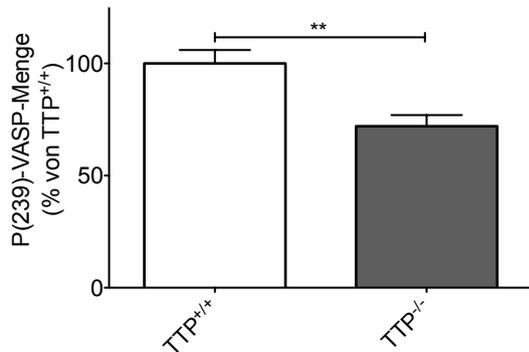


Abbildung 4-9: Die TTP-Defizienz führt zu einer Verringerung des bioaktiven NO.

Aortenproteine wurden durch Homogenisieren in RIPA-Puffer isoliert und für Western Blot-Analysen zur Ermittlung der Proteinexpression von P(239)-VASP genutzt. Die Proteinexpression wurde durch densitometrische Analyse der Western Blots ermittelt.

Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte + SEM der Analysen von 5-6 Mäusen (** = $p < 0,01$ im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Es konnte eine etwa 25 %ige Reduktion des bioverfügbaren NOs in TTP-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Dieser Befund weist auf eine Störung im NO/cGMP-Signalweg hin.

4.1.2.4 Die Expression der NO-produzierenden Enzyme ist in TTP^{-/-}-Mäusen nicht verändert

Da eine gestörten NO-Synthese zu der Reduktion des bioaktiven NOs führen könnte, wurde untersucht, ob die Generierung von NO in TTP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen verändert ist. NO als wichtiger Vasodilator wird in Gefäßen durch die endotheliale (eNOS) oder nach Induktion von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) gebildet. Ob die Expression dieser Enzyme in TTP^{-/-}-Mäusen verändert ist, wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht.

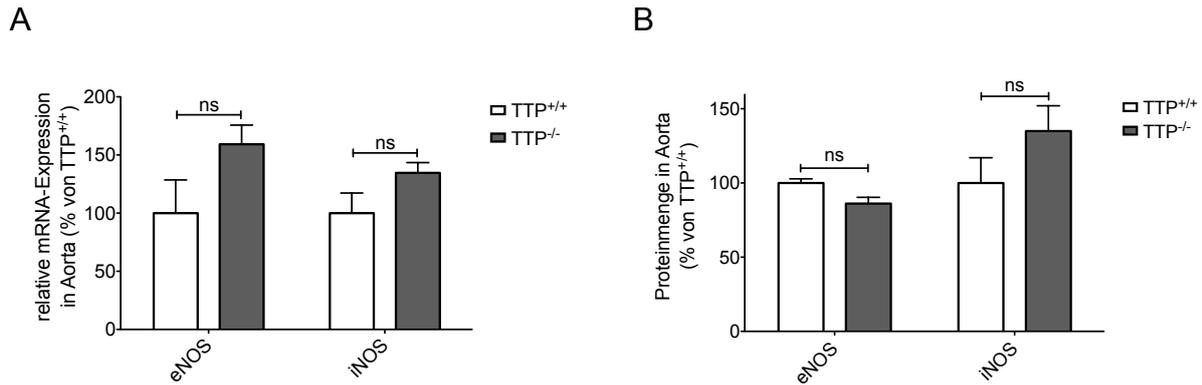


Abbildung 4-10: Die Expression der iNOS und eNOS ist in TTP^{-/-}-Mäusen nicht verändert.

Aorten von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden **A** in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen auf die mRNA-Expression von iNOS und eNOS untersucht oder **B** die Aortenproteine wurden durch Homogenisieren in RIPA-Puffer gewonnen und für Western Blot-Analysen zur Ermittlung der Proteinexpression von eNOS und iNOS mit spezifischen Antikörpern genutzt. Die Proteinexpression wurde durch densitometrische Analyse der Western Blots ermittelt. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte + SEM der Analysen von 4-8 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}- Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Es zeigte sich, dass weder die eNOS- noch die iNOS-mRNA-Expression oder die Proteinbiosynthese dieser zwei NO-bildenden Enzyme in TTP-defizienten Mäusen im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen verändert waren. Eine verringerte eNOS- oder iNOS-Enzymmenge ist daher in diesem Modell als Grund für die massive eDF auszuschließen.

4.1.2.5 Weder eine Substratverarmung noch eNOS-Inhibition erklären die eDF in TTP-defizienten Mäusen

Da auch eine Substratverarmung zu einer verringerten NO-Bildung führen könnte, wurde zum Einen die Expression der L-Arginin-abbauenden Enzyme Arginase-1 und -2 auf mRNA-Ebene und zum Anderen die Argininspiegel im Plasma der Versuchstiere mittels HPLC-Analysen ermittelt. Auch könnten methylierte Argininanaloga (z.B. ADMA) die eNOS in ihrer Funktion inhibieren, was zu einer geringeren NO-Synthese und damit zu einer gestörten Endothelfunktion führen würde. Daher wurden ebenfalls die Plasmakonzentrationen des ADMA mittels HPLC untersucht.

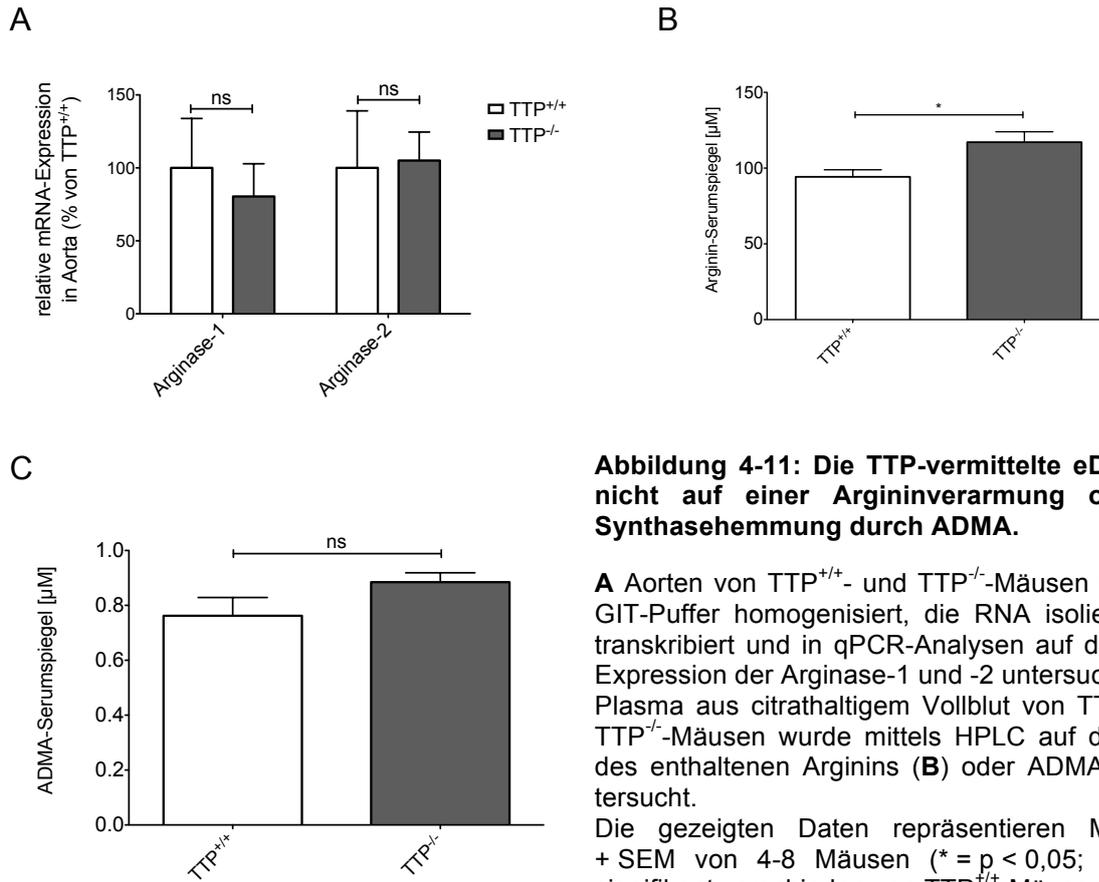


Abbildung 4-11: Die TTP-vermittelte eDF beruht nicht auf einer Argininverarmung oder NO-Synthasehemmung durch ADMA.

A Aorten von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen auf die mRNA-Expression der Arginase-1 und -2 untersucht. Plasma aus citrathaltigem Vollblut von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurde mittels HPLC auf die Menge des enthaltenen Arginins (**B**) oder ADMA (**C**) untersucht.

Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte + SEM von 4-8 Mäusen (* = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test).

In TTP^{-/-}-Aorten konnten keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression der Arginase-1 und -2 nachgewiesen werden, sodass eine Substratverarmung durch Abbau des L-Arginin in Ornithin und Harnstoff als Grund für die massive eDF in TTP-defizienten Mäusen wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Es zeigten sich leicht erhöhte Argininspiegel in den TTP^{-/-}-Aorten im Vergleich zu TTP^{+/+}-Tieren. Auf Grund der leicht erhöhten Substratmenge sollten TTP^{-/-}-Mäuse mehr NO produzieren können als TTP^{+/+}-Mäuse. Die Hemmung der eNOS-Aktivität durch das L-Argininanalogon ADMA konnte durch die HPLC-Analysen ebenfalls ausgeschlossen werden, da es keine signifikanten Unterschiede in den ADMA-Spiegeln der untersuchten Mäuse gab.

4.1.2.6 In TTP-defizienten Mäusen kommt es zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies, die in unter Stressbedingungen vermehrt gebildet werden, können sehr schnell mit NO reagieren und so die Gesamtmenge an bioverfügbarem NO verringern. Daher wurde die Bildung von ROS in TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen untersucht. Hierfür wurde zum einen die PDBu-induzierte, sowie die

NADPH-oxidaseabhängige ROS-Bildung und zum anderen die vaskuläre Superoxidbildung durch DHE-Färbungen untersucht.

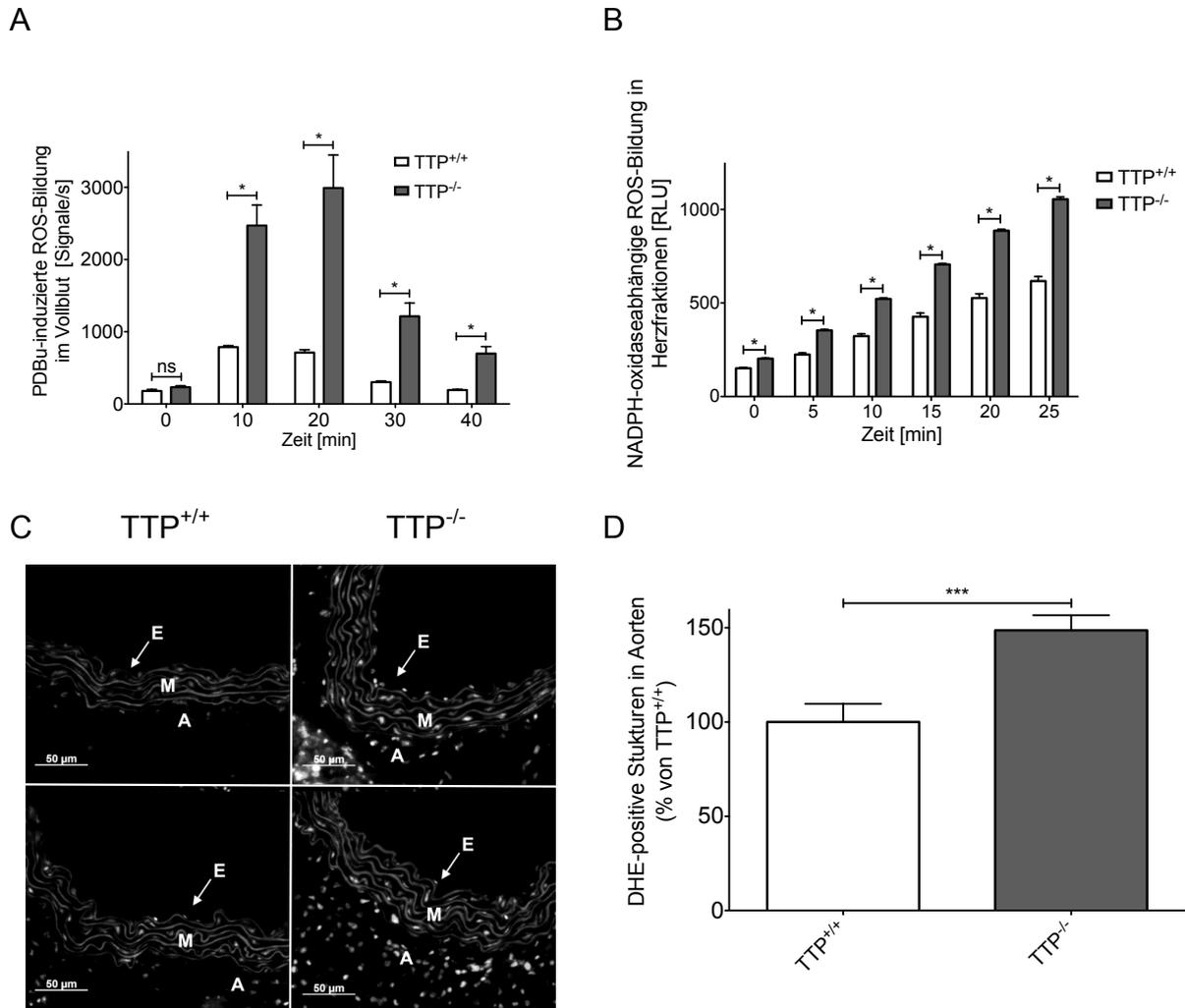


Abbildung 4-12: Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies in TTP-defizienten Mäusen.

A Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde im Blut von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen unter PDBu-induzierten Bedingungen mit L-012-ECL gemessen.

B In Herzmembranfraktionen wurde die NADPH-oxidaseabhängige ROS-Bildung in TTP^{-/-}- und Wildtypmäusen in Anwesenheit von NADPH durch Luzigenin ermittelt.

Aortenkryosektionen von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden mittels DHE-abhängiger Fluoreszenz auf die vaskuläre Superoxidbildung untersucht. **C** zeigt repräsentative DHE-Färbungen von ROS-produzierenden Zellen. Die Lokalisation des Endothels (E), der Media (M) und Adventitia (A) sind markiert. **D** stellt die quantitative Analyse aller Untersuchungen dar.

Die Daten stellen die Mittelwerte + SEM der Analysen von 5-10 Mäusen pro Genotyp dar (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Bei diesen Untersuchungen konnte eine erhöhte oxidative Belastung der TTP-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. In allen Analysen war die ROS-Bildung in Mäusen mit TTP-Gendefekt höher als in Wildtypmäusen.

Die Hauptursache für vaskuläres ROS, das einen großen Einfluss auf die Endothelfunktion und den Gefäßdruck hat²⁰², ist die Bildung von Superoxid durch NADPH-

Oxidasen (Nox). Um den NADPH-oxidaseabhängigen Effekt der ROS-Erhöhung zu verifizieren, wurden in einem weiteren Versuch die Nox-Isoformen durch Inkubation mit VAS-2870 spezifisch inhibiert und die PDBu-induzierte ROS-Bildung im Vollblut erneut gemessen.

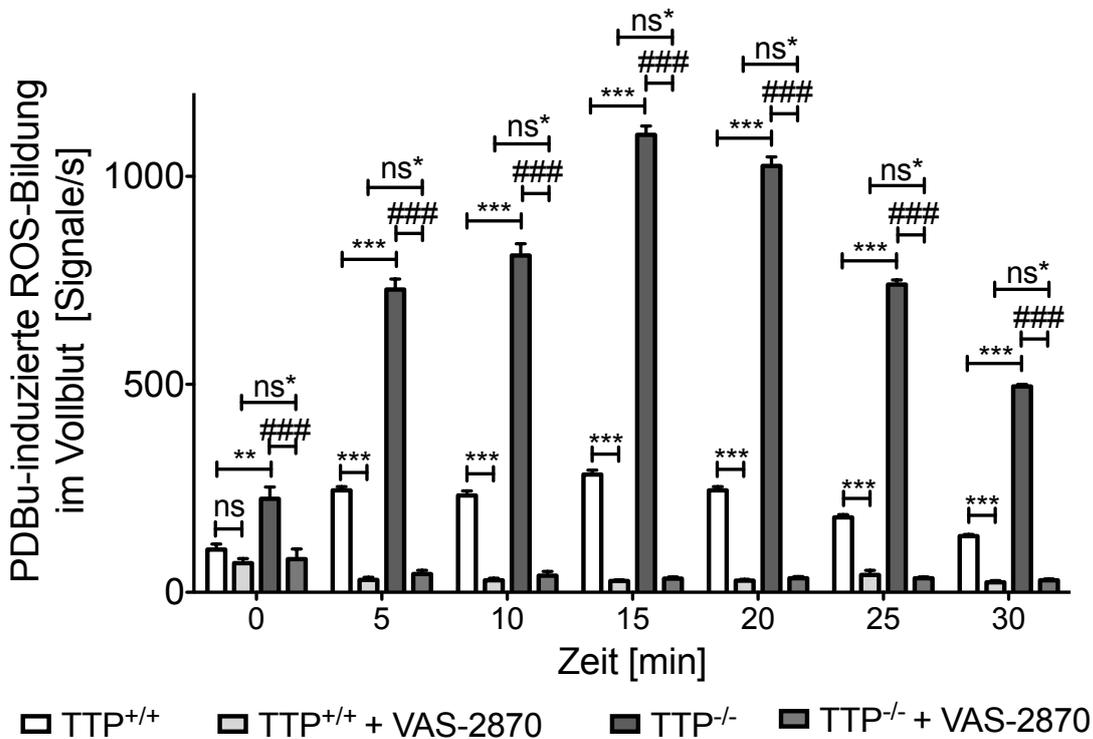


Abbildung 4-13: Die PDBu-induzierte ROS-Bildung in TTP^{-/-}-Mäusen ist NADPH-oxidaseabhängig.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde im Blut von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen unter PDBu-induzierten Bedingungen in An- bzw. Abwesenheit von VAS-2870 mit L-012-ECL gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte + SEM von 8 Mäusen pro Gruppe (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; ### = $p < 0,001$ im Vergleich zu TTP^{-/-}-Mäusen; ns* = nicht verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen + VAS-2870; One-way ANOVA⁵⁷.

Der Nox-Hemmer VAS-2870 hob die PDBu-induzierte ROS-Bildung im Vollblut der TTP^{-/-}-Mäuse vollständig auf, sodass kein Unterschied zwischen den beiden mit Inhibitor behandelten Gruppen und den TTP^{+/+}-Mäusen mehr vorlag. Diese Befunde zeigen eine Nox-abhängige Erhöhung der ROS-Bildung vor dem Hintergrund einer TTP-induzierten chronischen Entzündung.

Da reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxid sehr schnell mit bioverfügbarem NO zu reaktiven Stickstoffverbindungen wie Peroxinitrit reagieren, wurde in den Versuchstieren auch die Menge an Peroxinitrit analysiert. Als Marker der Peroxinitritbil-

ung wurde hierfür die Nitrierung von Tyrosinresten in Herzgeweben mittels Dot Blot untersucht.

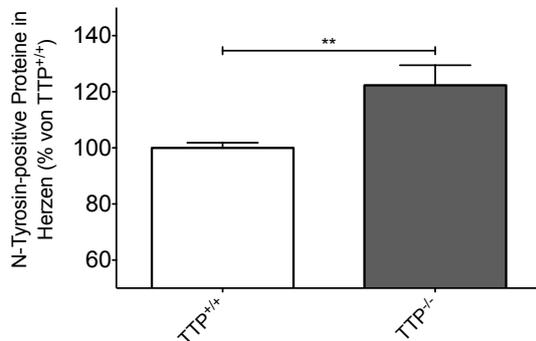


Abbildung 4-14: Die TTP-Defizienz führt zu einer verstärkten Bildung von reaktiven Stickstoffspezies.

Herzen von Wildtyp- und TTP-defizienten Mäusen wurden in RIPA-Puffer homogenisiert und für Dot Blot-Untersuchungen mit einem spezifischen N-Tyrosinantikörper eingesetzt. Die Expression N-Tyrosin-positiver Strukturen wurde durch densitometrische Auswertung ermittelt.

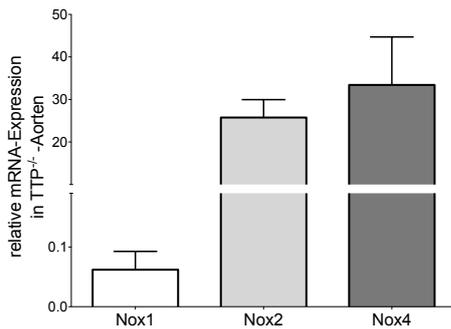
Die gezeigten Daten sind Mittelwerte von 5-6 Mäusen + SEM (** = $p < 0,01$ im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Es zeigte sich, dass TTP-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen höhere Spiegel an N-Tyrosin-positiven Proteinen und somit mehr Peroxynitrit in den Herzfraktionen aufwiesen. Eine TTP-induzierte chronische Entzündung führt folglich zu erhöhtem oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS).

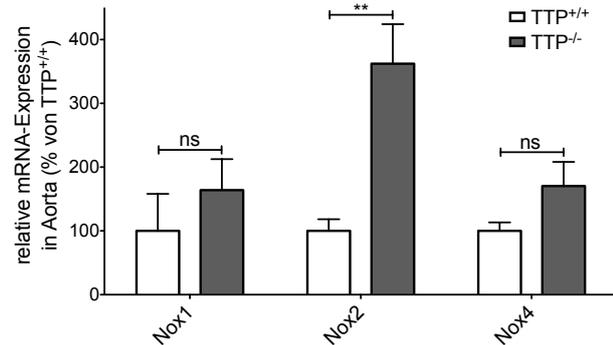
4.1.2.7 Die erhöhte RONS-Produktion in TTP^{-/-}-Mäusen beruht auf einer erhöhten Expression der Nox2

Wie in den Versuchen mit dem Nox-Hemmer VAS-2870 gezeigt werden konnte, ist die erhöhte ROS-Produktion in den TTP-defizienten Mäusen Nox-abhängig. Die drei wichtigsten in einer Mauseorta vorkommenden Nox-Isoformen sind die Nox1, Nox2 und Nox4. Es wurde mittels qRT-PCR und Western Blot in Mauseorten untersucht, ob die TTP-Defizienz einen Einfluss auf die mRNA- und Proteinexpression der drei Isoformen hat. Die Rolle dieser an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in TTP-defizienten Mäusen wurde außerdem durch einen Vergleich der relativen mRNA-Expressionsmengen in TTP^{-/-}-Aorten untersucht.

A



B



C

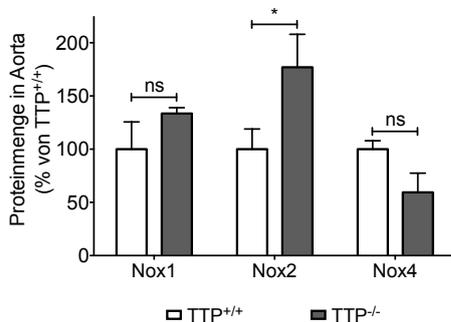


Abbildung 4-15: Die TTP-Defizienz führt zu einer erhöhten Expression der Nox2.

Aorten von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert und für mRNA-Expressionsanalysen eingesetzt (A und B) oder die Aorten wurden in RIPA-Puffer homogenisiert und die Proteinmenge der Nox1,2 und 4 untersucht (C). In A ist der Vergleich der mRNA-Expressionen der drei Nox-Isoformen in TTP^{-/-}-Mäusen dargestellt. B zeigt die Änderungen in der mRNA-Expression der Nox1, -2 und -4 in Bezug auf Wildtypiere und C die Änderungen der Proteinexpressionen, die durch densitometrische Auswertungen der Membranen nach Western Blot-Analysen ermittelt wurden.

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte + SEM von 5-7 Tieren (** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Der Vergleich der relativen mRNA-Expressionen der drei Isoformen in TTP-defizienten Aorten zeigte, dass nur die Nox2 und Nox4 in großem Maße exprimiert werden. Die Nox1-mRNA wurde zu 1/500 bzw. 1/600 im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen exprimiert. Dieser Befund führte zu der Annahme, dass die Nox1-mRNA-Expression in diesem chronischen Entzündungsmodell wesentlich weniger zu der erhöhten ROS-Bildung beiträgt, als die der beiden anderen Isoformen.

Im Vergleich zu TTP^{+/+}-Tieren zeigte sich in TTP^{-/-}-Mäusen nur eine Erhöhung der Nox2-Expression auf mRNA- und Proteinebene, sodass die erhöhte ROS-Bildung in den Versuchstieren wohl auf eine veränderte Nox2-Expression zurückzuführen ist.

4.1.2.8 In TTP^{-/-}-Mäusen ist die Stabilität der Nox2-mRNA erhöht

Bei Sequenzanalysen der murinen Nox2-mRNA fällt auf, dass diese in der 3'-UTR viele AREs besitzt, die als potentielle Bindestelle für RNA-BP dienen können. TTP könnte daher direkt an die AREs der Nox2-3'-UTR binden und unter physiologischen Bedingungen die mRNA-Stabilität der Nox2 verringern. Um einen potenziellen Effekt

von TTP auf den Nox2-mRNA-Abbau zu untersuchen, wurden mRNA-Abbauversuche mit DRB durchgeführt. Hierfür wurden TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen Peritonealzellen entnommen, mit LPS und IFN- γ stimuliert, mit dem Transkriptionshemmer DRB behandelt und zu verschiedenen Zeiten die Nox2-mRNA-Menge mittels qPCR ermittelt.

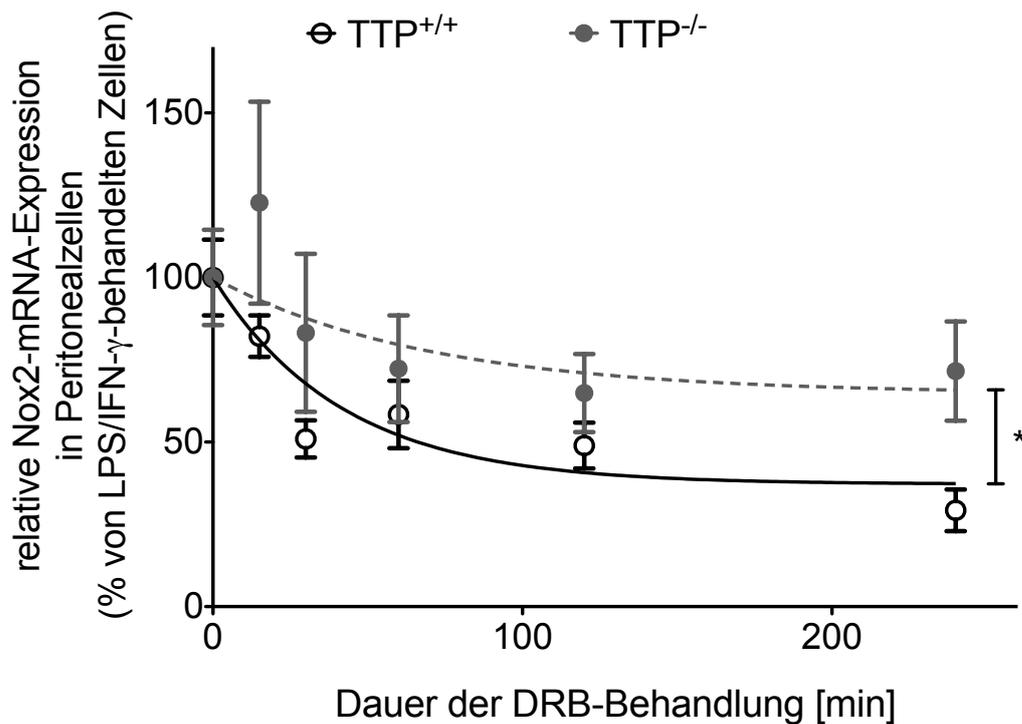


Abbildung 4-16: Die Nox2-mRNA-Stabilität ist in TTP-defizienten Mäusen stark erhöht.

Peritonealzellen von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden isoliert, mit LPS und IFN- γ für 4 Stunden stimuliert, bevor DRB für die angegebenen Zeiten zugegeben wurde. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 Mäusen pro Genotyp (* = $p < 0,05$ im Vergleich zu TTP^{+/+}-Zellen; Two-way ANOVA)⁵⁷.

Es konnte mit Hilfe dieser Versuche gezeigt werden, dass das RNA-BP TTP einen starken Einfluss auf die Nox2-mRNA-Stabilität hat. Während in den Wildtypzellen ein etwa 60%iger Abbau der Nox2-mRNA über einen Zeitraum von 6 Stunden beobachtet werden konnte, wurde diese mRNA in den TTP-defizienten Peritonealzellen nur zu etwa 35 % abgebaut. Dies hatte eine Verlängerung der Halbwertszeit der Nox2-mRNA von $97,8 \pm 24,1$ Minuten in TTP^{+/+}-Zellen auf $402,4 \pm 219,3$ Minuten in TTP^{-/-}-Zellen zur Folge.

4.1.2.9 TTP bindet nicht an die 3'-UTR der Nox2-mRNA

Um zu analysieren, ob die Nox2-mRNA direkt mit TTP interagiert, wurden UV-Crosslinkexperimente mit radioaktiv markierter, *in vitro* transkribierter Nox2-3'-UTR und rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Als mögliche Bindepartner wurde rekombinantes TTP und HuR als weiteres RNA-BP eingesetzt. Außerdem wurden diese Experimente mit der Nox1-3'-UTR, die ebenfalls viele AREs in ihrer 3'-UTR aufweist durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde die Bindung von TTP an die 3'-UTR-Sequenzen des humanen TNF α und des humanen Protoonkogens c-Fos analysiert, da diese als Ziel-mRNAs von TTP bekannt sind²⁰³.

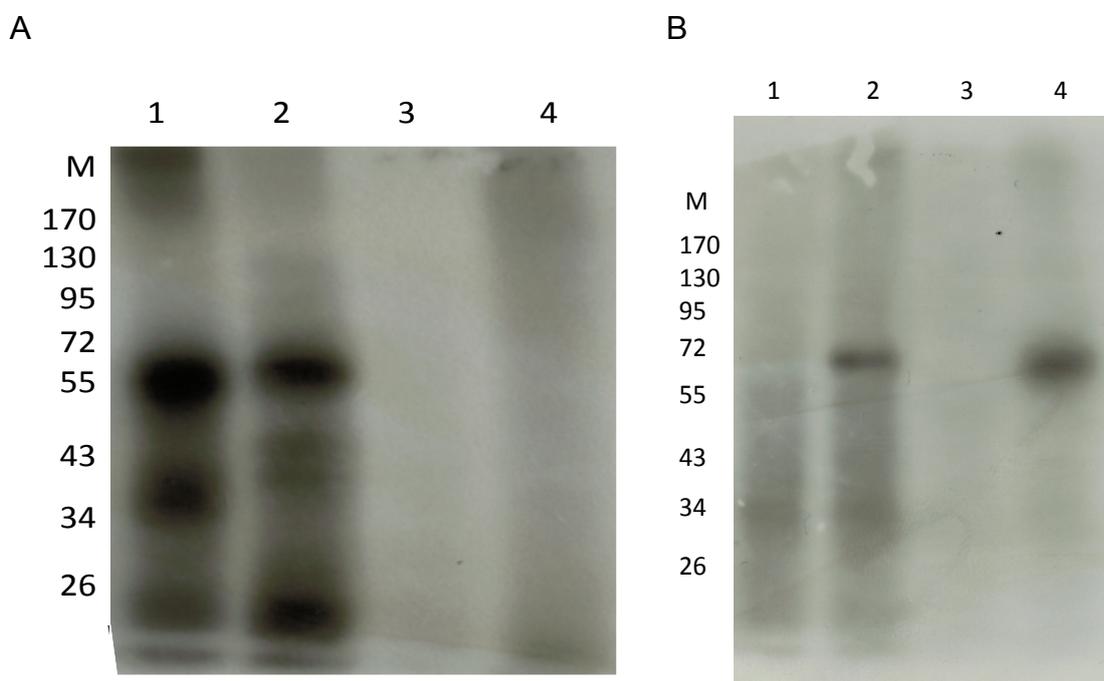


Abbildung 4-17: HuR, nicht aber TTP, bindet direkt an die Nox1- und Nox2-3'-UTR.

3'-UTR-Konstrukte wurden linearisiert, während der *in vitro* Transkription mit ³²P-dUTPs radioaktiv markiert und in UV-Crosslinkversuchen an rekombinant hergestellte Proteine gebunden. Der Nachweis der mRNA-Proteinbindung erfolgte durch radioaktiven Zerfall auf Positivfilmen.

A Rekombinant hergestelltes TTP wurde für Bindungsstudien an die humane TNF α - (1) und c-Fos-3'-UTR (2), sowie an die murinen Nox1- (3) und Nox2-3'-UTR (4) eingesetzt.

B zeigt die Bindung des rekombinanten GST-HuR-Proteins an die murine Nox1- (2) und Nox2-3'-UTR (4). Weiterhin wurde die Bindung von TTP an die murine Nox1- (1) und Nox2-3'-UTR (3) untersucht.

Mit Hilfe dieser Versuche konnte nachgewiesen werden, dass TTP weder direkt an die Nox1- noch direkt an die Nox2-3'-UTR bindet. Durch die Bindung von TTP an die bekannten Zielsequenzen der cFos- und TNF α -3'-UTR konnte die Funktionalität des eingesetzten Proteins nachgewiesen werden. In einem zweiten Versuchsansatz konnte die direkte Bindung des RNA-BP HuR an die 3'-UTR-Sequenzen der beiden Nox-Isoformen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass TTP nicht di-

rekt an die 3'-UTR der Nox1 und Nox2 bindet und die Expression der Nox2 indirekt reguliert. Diese Kontrolle der Nox2-mRNA-Stabilität durch TTP muss daher über indirekte Mechanismen erfolgen.

4.1.2.10 Die verstärkte Einwanderung von Makrophagen in TTP^{-/-}-Aorten führt zu einer erhöhten Expression proarteriosklerotischer Markergene

Die Ausprägung einer eDF im Rahmen einer RA und AT beinhaltet neben einem gestörten Verhältnis von Vasokonstriktoren zu –dilatoren auch eine Aktivierung der Endothelzellen, die vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimieren und so zu einer erhöhten Einwanderung von Immunzellen in die Gefäßwand führen. Dort sekretieren die rekrutierten Zellen verschiedene Zytokine und Chemokine, die zu einem Fortschreiten der kardiovaskulären Erkrankung führen. Um zu untersuchen, ob die chronische Entzündung der TTP-defizienten Mäuse auch einen Einfluss auf die Entstehung einer inflammationsgetriebenen kardiovaskulären Krankheit haben könnte, wurde zunächst die Aktivierung der Endothelzellen über die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, sowie die Infiltration von Makrophagen in das Aortengewebe, als Marker einer beginnenden AT, mit Hilfe des spezifischen Oberflächenmoleküls CD68 mittels Western Blot analysiert.

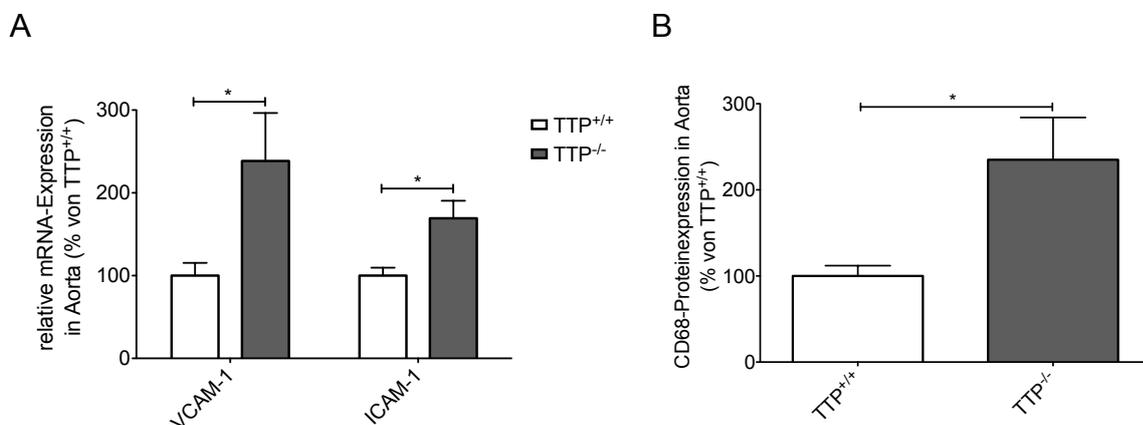


Abbildung 4-18: Die TTP-Defizienz führt zu einer verstärkten Aktivierung der Endothelzellen und zu einer erhöhten Einwanderung von Makrophagen in das Aortengewebe.

Arten von Wildtyp- und TTP-defizienten Mäusen wurden **A** in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA isoliert und in qRT-PCR-Analysen die mRNA-Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen untersucht oder **B** in RIPA-Puffer homogenisiert und für Western Blot-Untersuchungen eingesetzt. Die CD68-Expression wurde durch densitometrische Auswertung der Membranen ermittelt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-8 Mäusen (* = $p < 0,05$ im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

Eine TTP-Defizienz führte zu einer erhöhten mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, sodass von einer Aktivierung der Endothelzellen in den

TTP^{-/-}-Mäusen ausgegangen werden kann. Die Western Blot Analysen zeigten eine Verdopplung der CD68-Expression in Aorten von TTP^{-/-}-Mäusen, was auf eine verstärkte Infiltration von Monozyten und Makrophagen in die Gefäße der TTP-defizienten Mäuse hinweist.

Mittels qRT-PCR wurde anschließend die Expression verschiedener proarteriosklerotischer und prothrombotischer Markergene in den Aorten der TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäuse analysiert.

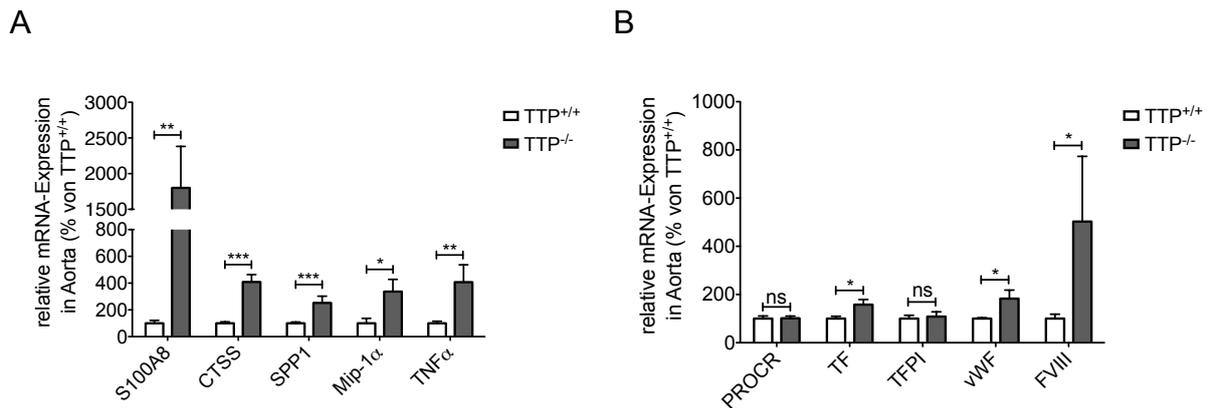


Abbildung 4-19: Proarteriosklerotische und -thrombotische Markergene werden in TTP-defizienten Mäusen verstärkt exprimiert.

Aorten von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen auf die mRNA-Expression von proarteriosklerotischen (A) und prothrombotischen (B) Genen untersucht. Die Werte repräsentieren Mittelwerte + SEM von 4-16 Mäusen pro Genotyp (*** = p < 0,001; ** = p < 0,01; * = p < 0,05; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test)⁵⁷.

In Aorten von TTP^{-/-}-Mäusen wurden im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen neben den bekannten TTP-Ziel-mRNAs TNFα und Mip-1α verschiedene proarteriosklerotische und prothrombotische Markergene verstärkt exprimiert. Es konnte eine Erhöhung des proinflammatorischen Biomarkers Calgranulin A (S100A8)²⁰⁴, sowie eine erhöhte Expression von Cathepsin S (CTSS) und Osteropontin (SPP1) nachgewiesen werden, die ihrerseits an der Arteriogenese²⁰⁵ und der Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen²⁰⁶ beteiligt sind. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass TTP-defiziente Mäuse erhöhte mRNA-Expressionen der an der Blutgerinnung beteiligten Marker *tissue factor* (TF), von Willebrand Faktor (vWF) und des Koagulationsfaktors VIII (FVIII) aufwiesen. In erhöhten Mengen könnten diese zu einem vergrößerten Risiko einer AT beitragen.

4.1.2.11 TTP^{-/-}-Mäuse zeigen hämostatische Veränderungen

Chronische Entzündungen spiegeln sich auch in der Hämostase wieder, da sie das Risiko arterieller Thrombosen erhöhen²⁰⁷. Daher wurde erwartet, dass die Schwanzvenenblutungszeit (TVBT) und die intrinsischen (aPTT) und extrinsischen (PT) Gerinnungszeiten der TTP^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu TTP^{+/+}-Mäusen verringert wären.

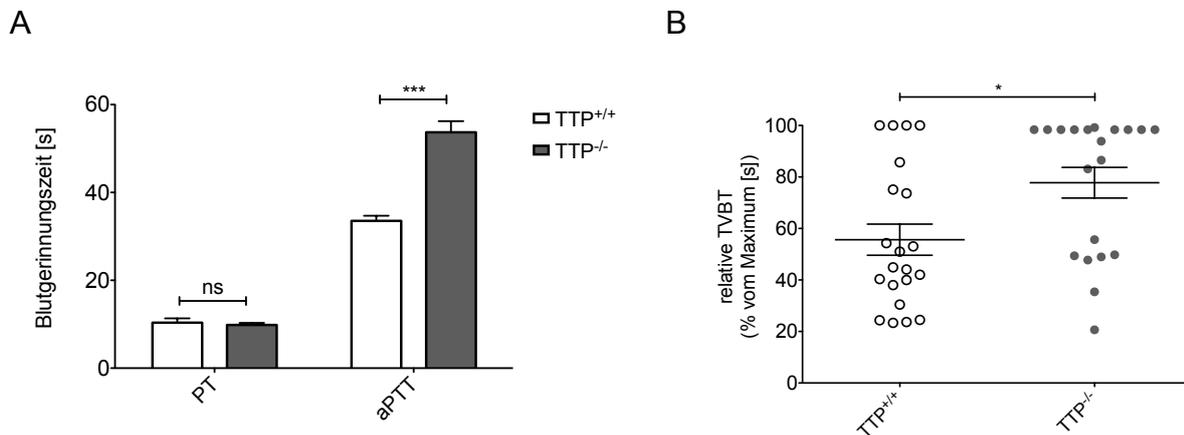


Abbildung 4-20: TTP^{-/-}-Mäuse zeigen eine verlängerte intrinsische und Schwanzvenenblutungszeit.

A Blut von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurde mit Citratpuffer gemischt und für die Analyse der extrinsischen (PT) und intrinsischen (aPTT) Gerinnungszeit im Koagulometer eingesetzt.

B Für die Ermittlung der TVBT wurde den Mäusen ein 0,5 cm langes Stück vom Schwanz entfernt, der Schwanz in 37 °C warme 0,9 %ige NaCl-Lösung gehalten und die Zeit bis zum vollständigen Wundverschluss ermittelt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM (**A**) bzw. Einzel- und Mittelwerte ± SEM (**B**) von 14-21 Mäusen (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test).

Die Analysen der Blutgerinnung zeigten, dass der PT-Wert als Marker für den extrinsischen Gerinnungsweg nicht unterschiedlich zwischen den beiden Versuchsgruppen war. Unerwarteter Weise wiesen die TTP-defizienten Mäuse eine etwa 1,5fach verlängerten aPTT-Wert und eine 1,75fach erhöhte TVBT auf. Trotz der erhöhten TNF α -Spiegel in TTP-defizienten Mäusen, die eine verkürzte Blutungszeit zur Folge haben sollten, zeigten die chronisch entzündeten TTP^{-/-}-Mäuse verlängerte Blutungszeiten.

4.1.2.12 In der Leber von TTP-defizienten Mäusen sind die Expressionen intrinsischer Gerinnungsfaktoren nicht verändert.

Obwohl TTP^{-/-}-Mäuse erhöhte TNF α -Spiegel aufweisen, zeigten sie verlängerte Blutungszeiten. Um zu untersuchen, ob TTP die mRNA-Expression der Blutgerinnungsfaktoren beeinflussen könnte, wurden die mRNA-Expressionen der verschiedenen an dem intrinsischen Koagulationsweg beteiligten Gerinnungsfaktoren in Leberproben analysiert.

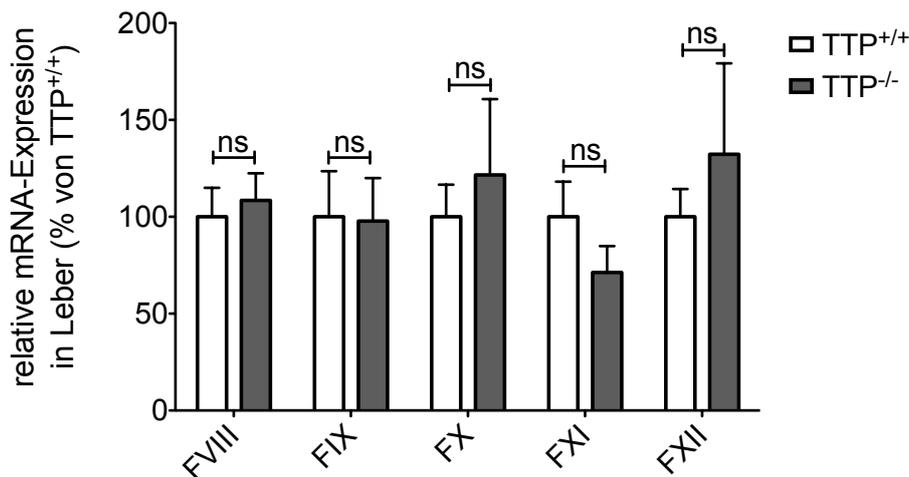


Abbildung 4-21: Die mRNA-Expression der intrinsischen Gerinnungsfaktoren in der Leber ist nicht durch eine TTP-Defizienz beeinträchtigt.

Lebern von TTP^{+/+}- und TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde isoliert und die mRNA-Expression der bei der intrinsischen Blutgerinnung beteiligten Koagulationsfaktoren in qRT-PCR-Untersuchungen analysiert.

Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte + SEM von 3-11 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; t-Test).

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass eine TTP-Defizienz nicht die mRNA-Expression der intrinsischen Gerinnungsfaktoren beeinflusst. Bei keinem der analysierten Faktoren (FVIII, FIX, FX, FXI, FXII) kam es zu einer veränderten mRNA-Expression im Vergleich zu Wildtypmäusen.

4.1.2.13 Die TTP-Defizienz verändert das Blutbild der Mäuse

Literaturrecherchen ergaben, dass eine TTP-Defizienz über einer Erhöhung der Granulozyten²⁰⁸ zu einer Hemmung der Aktivierung des Gerinnungsfaktors IX²⁰⁹ führen könnte, was wiederum eine verlängerte intrinsische Blutungszeit und eine erhöhte Schwanzvenenblutungszeit erklären könnte. Abbildung 4-22 zeigt schematisch die Zusammenstellung dieser Befunde.

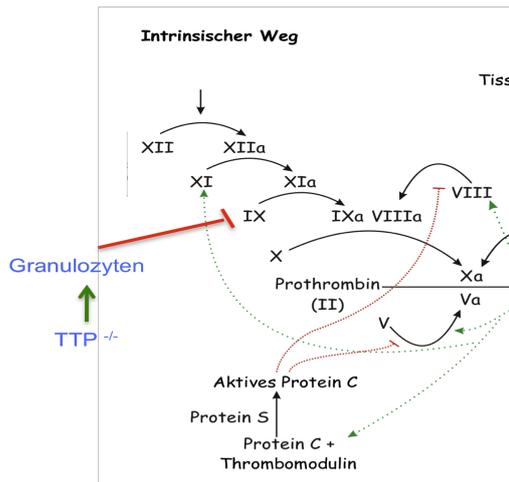
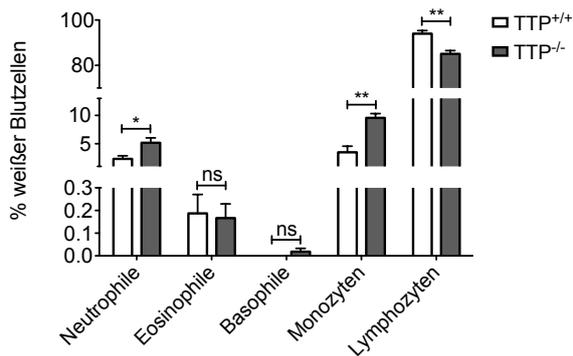


Abbildung 4-22: Schematische Darstellung der Beeinflussung des intrinsischen Blutgerinnungsweges durch eine TTP-Defizienz.

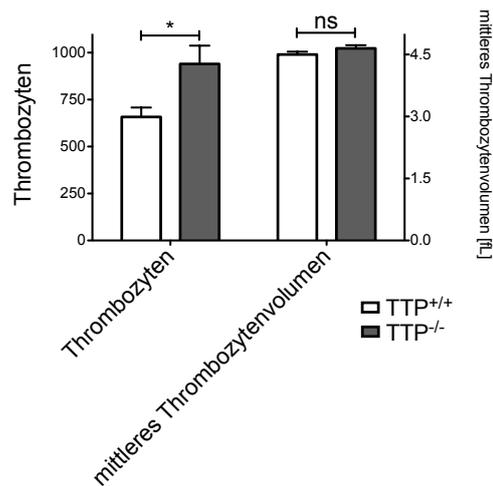
(verändert nach <http://images-mediawiki-sites.thefullwiki.org/03/1/5/0/58281633453916107.png> [01.05.2011])

Auf Grund dieser Literaturbefunde wurde das Blutbild der TTP^{-/-}- und TTP^{+/-}-Mäuse in einem Hemavet 950 FS aus Vollblut analysiert.

A



B



C

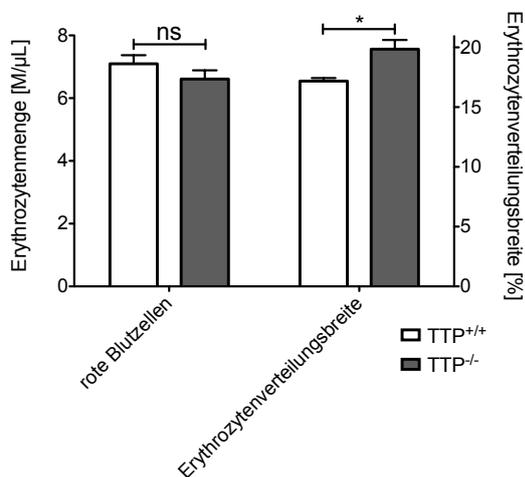


Abbildung 4-23: Eine TTP-Defizienz führt zu erhöhten Mengen an neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten, sowie zu einer Erhöhung der Erythrozytenverteilungsbreite. Die Anzahl der Lymphozyten ist leicht verringert.

Blut von Wildtyp- und TTP-defizienten Mäusen wurde in EDTA-beschichteten Röhrchen aufgefangen und für die Blutbildbestimmung im Hemavet 950 FS vermessen. **A** zeigt die Änderungen der weißen Blutzellen, **B** die der thrombozyten- und **C** die der erythrozytenrelevanten Messparameter.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-6 Mäusen (** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/-}-Mäusen; t-Test).

Die Analysen des Blutbildes bestätigten die Arbeit von Kaplan, dass in TTP-defizienten Mäusen eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden kann²⁰⁸. Außerdem zeigten diese Mäuse im Vergleich zu TTP^{+/+}-Tieren erhöhte Mengen an Monozyten und Thrombozyten jedoch eine Verringerung der Lymphozyten. Die Erythrozytenverteilungsbreite als ein Maß für die Größenverteilung der Erythrozyten ist in TTP^{-/-}-Mäusen erhöht und könnte sich auf eine Anämie zurückführen lassen. Die erhöhten Mengen an neutrophilen Granulozyten in den TTP-defizienten Mäusen könnten daher durch Inaktivierung des Gerinnungsfaktors IX zu verlängerten Blutungszeiten in diesen Mäusen führen. Die Aktivität des Faktors IX, sowie nachgeschalteter Gerinnungsfaktoren sollte in weiteren Analysen untersucht werden.

4.1.3 Einfluss von TNF α auf den kardiovaskulären Phänotyp der TTP^{-/-}-Mäuse

TNF α ist ein in vielfältigen entzündlichen Prozessen involviertes Protein. Die TNF α -mRNA wird von TTP destabilisiert und TNF α ist in TTP-defizienten Mäusen erhöht. Um zu untersuchen, welche der in den TTP^{-/-}-Mäusen auftretenden Befunde TNF α -vermittelt sind und welche Rolle TTP in chronischen Entzündungen neben der Destabilisierung der TNF α -mRNA hat, wurden während der Doktorarbeit TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse gezüchtet. Mit diesen Mäusen wurde der Einfluss von TNF α auf die kardiovaskulären Veränderungen, die Expression proarteriothrombotischer Markergene und auf die Blutungsstörung vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung untersucht.

4.1.3.1 Die veränderte Endothelfunktion in TTP-defizienten Mäusen ist von TNF α unabhängig

Es ist bekannt, dass das proinflammatorische Protein TNF α ein wichtiger Mediator der Arteriosklerose ist²¹⁰ und auch die Nox-Expression in Mausmodellen beeinflusst²¹¹. Daher wurde erwartet, dass sich in TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-doppeldefizienten Mäusen die Nox2-abhängige Ausbildung einer eDF (siehe Kapitel 4.1.2.1) verbessern würde. Daher wurde die acetylcholinabhängige Relaxation von Aortenringen von Wildtyp-, TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen untersucht.

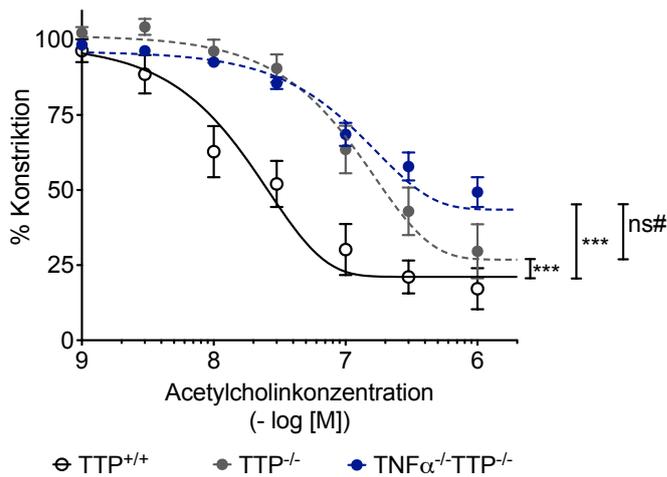


Abbildung 4-24: Die TNF α -Defizienz in TTP^{-/-}-Mäusen verbessert nicht die Endothelfunktion in diesen Tieren.

Aortenringe von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurden für isometrische Spannungsmessungen mit Norepinephrin maximal kontrahiert und die acetylcholinabhängige Gefäßrelaxation aufgezeichnet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von 7-14 unabhängigen Messungen (***) = $p < 0,001$ verglichen mit TTP^{+/+}-Mäusen; ns# = nicht signifikant verschieden von TTP^{-/-}-Mäusen; Two-way ANOVA)⁵⁷.

Jedoch zeigte sich in den doppeldefizienten Mäusen keine Verbesserung der TTP-abhängigen eDF im Vergleich zu den TTP^{-/-}-Mäusen. Die Endothelfunktion in den TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen war etwas schwächer ausgeprägt als in den TTP^{-/-}-Mäusen, da die Aortenringe der doppeldefizienten Mäuse sich nur um etwa 50 % mit Acetylcholin relaxieren ließen. Die EC₅₀-Werte der doppeldefizienten Mäuse und der TTP^{-/-}-Mäuse unterschieden sich jedoch kaum und lagen bei etwa 10⁻⁷ M. Die in den TTP-defizienten Mäusen beobachtete eDF ist folglich nicht TNF α -induziert.

4.1.3.2 Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in TTP-defizienten Mäusen ist nur zu einem geringen Anteil TNF α -vermittelt

Da im chronischen Entzündungsmodell der TTP^{-/-}-Mäuse die eDF schon auf eine durch ROS-Produktion verringerte NO-Bioverfügbarkeit zurückgeführt werden konnte, wurde der Einfluss des TNF α auf die erhöhte ROS-Bildung untersucht. Hierfür wurde in Vollblutproben von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen die PDBu-induzierte ROS-Bildung analysiert.

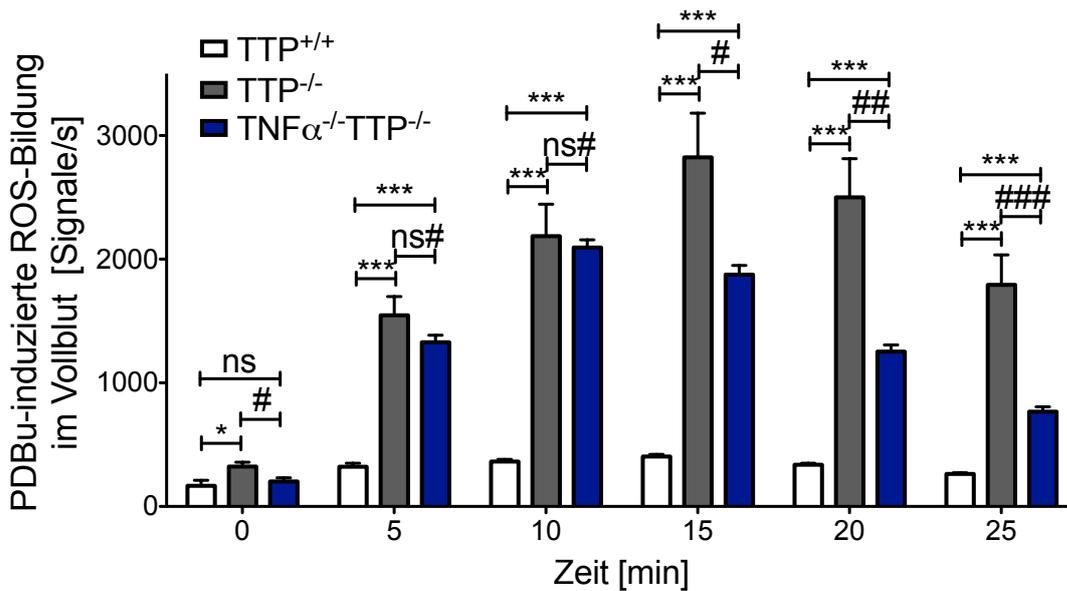


Abbildung 4-25: Die TNF α -Defizienz reduziert nur leicht die ROS-Bildung in TTP^{-/-}-Mäusen.

Im Vollblut von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurde nach PDBu-Induktion die ROS-Bildung durch L-012-ECL ermittelt.

Die Werte repräsentieren Mittelwerte + SEM von 16-24 Messungen (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; #### = $p < 0,001$; ### = $p < 0,01$; # = $p < 0,05$; ns# = nicht signifikant verschieden von TTP^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA)⁵⁷.

Diese Untersuchungen zeigten eine Abnahme der PDBu-induzierten ROS-Bildung in den doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu TTP^{-/-}-Mäusen, jedoch keine Angleichung an die ROS-Level, die in Wildtypblut gemessen wurden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass TNF α einen Beitrag zu der erhöhten ROS-Bildung in TTP-defizienten Mäusen leistet, aber nicht allein für die massive Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich ist.

4.1.3.3 Die Inaktivierung von TNF α in TTP^{-/-}-Mäusen verändert nicht die erhöhte Nox2-mRNA-Expression

Der Einfluss von TNF α auf die Nox-Expression wurde mittels qRT-PCR-Analysen in Mausearten untersucht.

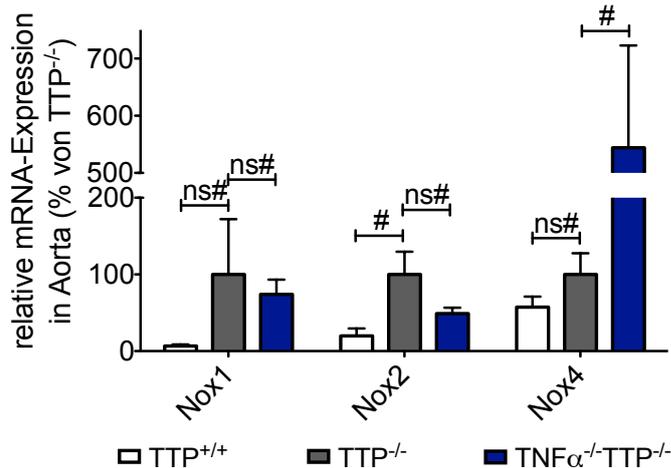


Abbildung 4-26: Die Nox2-mRNA-Expression wird durch TNF α -Inaktivierung in TTP^{-/-}-Mäusen nicht reduziert.

Aorten von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert und für mRNA-Expressionsanalysen der Nox1, Nox2 und Nox4 mittels qRT-PCR eingesetzt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 2-11 Mäusen (# = p < 0,05; ns# = nicht signifikant verschieden von TTP^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA)⁵⁷.

Es zeigte sich, dass eine zusätzliche TNF α -Defizienz zwar die Expression der Nox2-mRNA im Vergleich zu der Expression in TTP^{-/-}-Tieren leicht verringerte, jedoch war diese Verringerung nicht signifikant verschieden von der Nox2-mRNA-Expression, die in den Aorten der TTP^{-/-}-Mäuse gemessen werden konnte. Unerwarteter Weise konnte in den Aorten der doppeldefizienten Mäuse mehr Nox4-mRNA nachgewiesen werden als in denen der TTP^{-/-}-Mäuse. Die Nox1-mRNA-Expression änderte sich nicht signifikant in den drei untersuchten Maustypen.

4.1.3.4 Der proarteriosklerotische Phänotyp der TTP^{-/-}-Mäuse ist nicht ausschließlich TNF α -vermittelt

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Entzündungsmediators TNF α die Arteriosklerose in einem ApoE^{-/-}-Mausmodell verringert²¹⁰. Daher wurde erwartet, dass die zusätzliche TNF α -Defizienz in TTP^{-/-}-Mäusen die Erhöhung der mRNA-Expression der proarteriosklerotischen Markergene verringert. Diese Markergene wurden mittels qRT-PCR-Analyse in TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNF α ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Aorten untersucht.

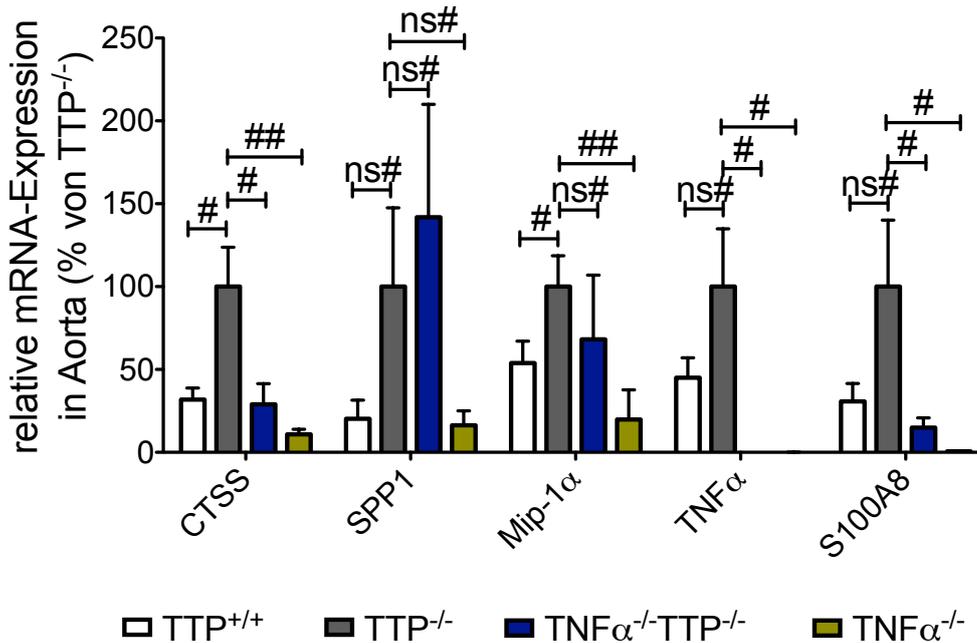


Abbildung 4-27: Die Inaktivierung von TNFα hat keinen Einfluss auf die erhöhte mRNA-Expression von SPP1 und Mip-1α in TTP^{-/-}-Mäusen.

Aorten von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNFα^{-/-}- und TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde isoliert und in qRT-PCR-Untersuchungen auf die Expression der proarteriosklerotischen Markergene hin analysiert.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 8-16 Mäusen (## = p < 0,01; # = p < 0,05; ns# = nicht signifikant verschieden von TTP^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA)⁵⁷.

Die zusätzliche Inaktivierung von TNFα hatte in diesen Untersuchungen die Verringerung der CTSS-, TNFα- und S100A8-mRNA in den doppeldefizienten Mäusen zur Folge. Jedoch konnte in den TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu TTP-defizienten Mäusen keine Veränderung der SPP1- und Mip-1α-mRNA nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass diese mRNAs direkt von TTP beeinflusst werden. TNFα ist also für die erhöhte mRNA-Expression einiger aber nicht aller untersuchten Gene in TTP^{-/-}-Mäusen verantwortlich.

4.1.3.5 TNFα besitzt nur einen schwachen Einfluss auf die hämostatischen Störungen in TTP-defizienten Mäusen

Da chronische Entzündungen auch einen Einfluss auf arterielle Thrombosen nehmen, jedoch eine TNFα-Defizienz die generelle Entzündung verringert, sollten in den doppeldefizienten Mäusen die Blutungsstörungen, die in den TTP^{-/-}-Mäusen beobachtet wurden, normalisiert werden. Daher wurden Untersuchungen zur TVBT und zur intrinsischen und extrinsischen Gerinnungszeit mit Blut von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNFα^{-/-}- und TNFα^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen durchgeführt.

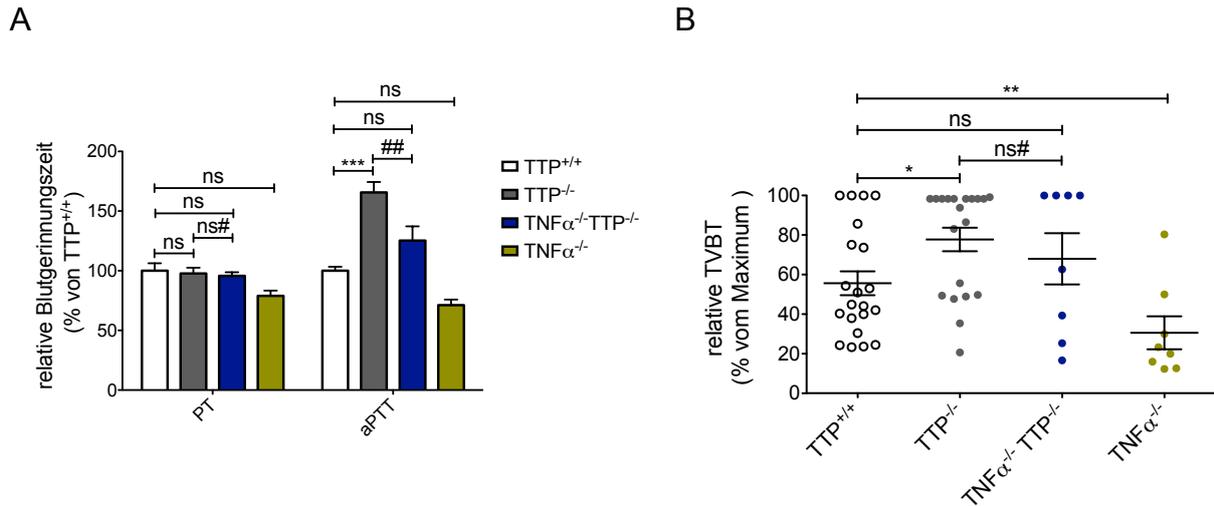


Abbildung 4-28: Die Dysregulation der Hämostase in einer TTP-induzierten entzündlichen Erkrankung ist nicht vollständig TNF α -vermittelt.

A Die Koagulation des Blutes von TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNF α ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäusen wurde mit Citratpuffer gestoppt und das nach Zentrifugation erhaltene Plasma für die Bestimmung der extrinsischen (PT) und intrinsischen (aPTT) Gerinnungszeit eingesetzt.

B Die TVBT der TTP^{+/+}-, TTP^{-/-}-, TNF α ^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse wurde durch Amputation eines 0,5 cm langen Schwanzstückes und Eintauchen des Schwanzes in 37 °C warme 0,9 %ige NaCl-Lösung ermittelt. Die Zeit zum vollständigen Verschluss der Gefäße wurde gemessen.

Die dargestellten Werte sind **(A)** relative Mittelwerte + SEM bzw. **(B)** Einzel- und Mittelwerte \pm SEM von 7-22 Mäusen (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von TTP^{+/+}-Mäusen; ## = $p < 0,01$; ns# = nicht signifikant verschieden von TTP^{-/-}-Mäusen; One-way ANOVA).

Die intrinsischen Blutungszeiten (aPTT) der Proben der doppeldefizienten Mäuse sanken zwar im Vergleich zu den TTP^{-/-}-Mäusen, waren aber immer noch erhöht im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die TVBT-Werte der TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Proben sanken im Vergleich zu den Zeiten der TTP-defizienten Mäuse, waren aber weder zu den TTP^{+/+}- noch zu den TTP^{-/-}-Ergebnissen signifikant verändert. Die TNF α ^{-/-}-Mäuse zeigten verringerte TVBTs und auch tendenziell geringere PT- und aPTT-Werte.

Die Ergebnisse der Versuche legen die Annahme nahe, dass eine zusätzliche TNF α -Defizienz im Hintergrund der TTP-induzierten chronischen Entzündung die hämostatischen Veränderungen nur zum Teil verbessern kann.

4.2 Untersuchung der Wirkung organischer Nitrate auf oxidativen Stress im Diabetesmodell

Diabetes ist ein klassischer Risikofaktor für die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen. Ein frühes Zeichen einer Diabeteserkrankung ist das Auftreten einer eDF²⁰¹ durch einen erhöhten oxidativen Stress und Nox-Aktivierung. Patienten mit Coronararterienkrankung werden zum Teil mit organischen Nitraten wie NTG, ISMN oder ISDN therapiert, die jedoch als unerwünschten Effekt eine Nitrattoleranz also den Verlust der Wirkung der Nitrate zeigen. PETN ist ein organisches Nitrat, das diese Nebenwirkungen nicht aufweist und daher in den Fokus gerückt ist.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob PETN im Vergleich zu anderen organischen Nitraten wie ISMN eine Reduktion des vaskulären oxidativen Stresses zur Folge hat. Oxidativer Stress kann durch eine verstärkte Expression des antioxidativen Enzyms HO-1 reduziert werden.

4.2.1 PETN induziert die HO-1-Promotoraktivität

In Vorarbeiten von Dr. C. Voss im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit²¹² konnte gezeigt werden, dass der Promotor der humanen HO-1 durch organische Nitrate in seiner Funktion beeinflusst werden kann (siehe Abbildung 4-29).

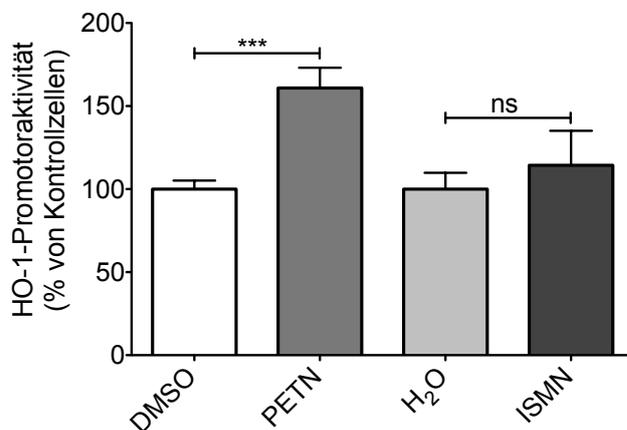


Abbildung 4-29: PETN aber nicht ISMN induziert die Aktivität des HO-1-Promotors.

DLD-1-HO-1-Prom-Zellen wurden für 6 Stunden mit 50 μ M PETN oder 50 μ M ISMN bzw. den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen DMSO oder H₂O behandelt. Die Zellen wurden in 1 x PLB lysiert und mittels Reporteranalysen die nitratinduzierte Promotoraktivität bestimmt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 21-35 Messungen (***) = $p < 0,001$; ns = nicht signifikant verschieden von Lösungsmittelkontrollzellen; t-Test).

Diese Ergebnisse wurden freundlicherweise von Dr. C.Voss zur Verfügung gestellt²¹².

Die für die Versuche genutzten DLD-1-HO-1-Prom-Zellen enthalten ein stabil in ihr Genom integriertes Konstrukt, das aus dem humanen HO-1-Promotor von 11 kb Größe vor dem Luciferasereporter besteht. Die Behandlung der DLD-1-HO-1-Prom-Zellen mit dem organischen Nitrat PETN zeigte in Reporteranalysen eine 1,5fache Steigerung der HO-1-Promotoraktivität verglichen mit der Lösungsmittelkon-

trolle DMSO. Mit dem NO-Donor ISMN jedoch konnte die Promotoraktivität der HO-1 nicht signifikant verändert werden. Scheinbar ist nur PETN und nicht ISMN dazu in der Lage, die HO-1-Promotoraktivität zu erhöhen und dadurch antioxidative Wirkungen zu induzieren.

4.2.2 Nrf2 induziert den HO-1-Promotor

Um einen Einblick in den Mechanismus der PETN-vermittelten Erhöhung der HO-1-Promotoraktivität zu gewinnen, wurde der Transkriptionsfaktor Nrf2 als wichtiger Regulator einer antioxidativen Antwort auf oxidativen Stress und als Modulator der HO-1-Antwort in den DLD-1-HO-1-Prom-Zellen ausgeschaltet. Hierfür wurde in den Zellen die Nrf2-Expression durch Transfektion einer chemisch synthetisierten siRNA reduziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA transfiziert. Die erfolgreiche Verringerung von Nrf2 wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe von qRT-PCR-Untersuchungen verifiziert.

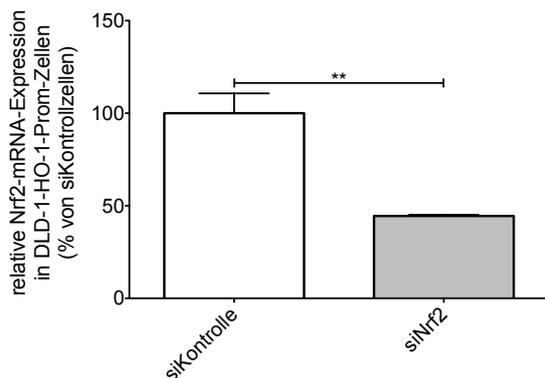


Abbildung 4-30: Die genutzte Nrf2-siRNA ist funktionell.

DLD-1-HO-1-Prom-Zellen wurden transient mit einer anti-Nrf2 siRNA (siNrf2) bzw. mit einer Kontroll-siRNA (siKontrolle) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen zur Detektion der Nrf2-mRNA eingesetzt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 2-3 unabhängigen Messungen (** = $p < 0,01$; t-Test).

Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression der Nrf2-mRNA durch die genutzte chemisch hergestellte Nrf2-siRNA signifikant um über die Hälfte in den DLD-1-HO-1-Prom-Zellen verringert werden konnte. Anschließend wurden Zellen, die mit diesen siRNAs behandelt wurden, in Reporteranalysen zur Untersuchung der PETN-abhängigen HO-1-Promotorinduktion eingesetzt. Dafür wurde die siNrf2- und siKontrollzellen mit PETN bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 6 Stunden behandelt und die lysierten Zellen auf die Induktion des HO-1-Promotors untersucht.

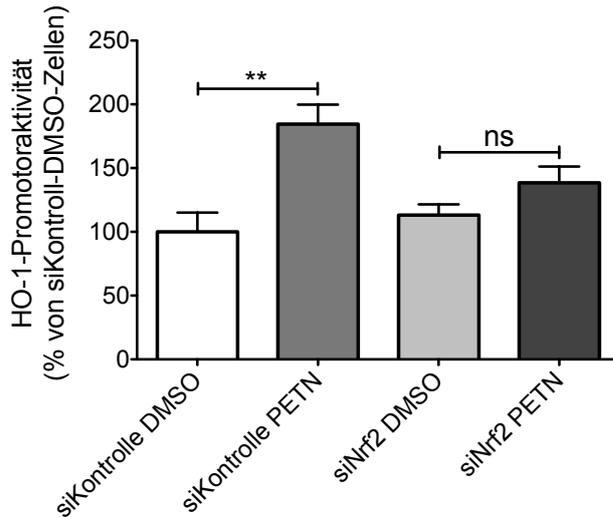


Abbildung 4-31: Der Effekt von PETN auf den HO-1-Promotor ist Nrf2-abhängig.

DLD-1-HO-1-Prom-Zellen wurden transient mit einer anti-Nrf2 siRNA (siNrf2) bzw. mit einer Kontroll-siRNA (siKontrolle) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 50 μ M PETN bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 8 Stunden behandelt, in 1 x PLB lysiert und für die Analyse der PETN-induzierten HO-1-Promotoraktivität eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von 6-10 unabhängigen Experimenten (** = $p < 0,01$; ns = nicht signifikant verschieden von DMSO-behandelten siKontrollzellen; t-Test)²¹³.

In den Nrf2-siRNA-behandelten DLD-1-HO-1-Prom-Zellen konnte keine Induktion der HO-1-Promotoraktivität nach PETN-Behandlung im Vergleich zu den siKontrollzellen, bei denen PETN eine 1,6fache Induktion der Promotoraktivität zur Folge hatte, mehr festgestellt werden. Die PETN-induzierten HO-1-Promotoraktivität ist folglich von dem Transkriptionsfaktor Nrf2 abhängig.

4.3 Analyse der antiarteriothrombotischen Effekte von Galiellalacton in murinen Arteriosklerosemodellen

Arteriothrombosen bezeichnen den Vorgang einer Arteriosklerose mit anschließender Ruptur von arteriosklerotischen Plaques und dem Eintreten einer Thrombose. Da Mäuse *per se* nicht empfindlich für eine Arterioskleroseerkrankung sind, müssen geeignete Mauslinien, wie ApoE^{-/-}-Mäuse, mit fettreichem Futter (Westerntyp-Diät) gefüttert werden, um die Krankheiten auszulösen. Die Ruptur der Thromben jedoch ist in Mausmodellen nur schwer nachstellbar²¹⁴. Die Gruppe um Dr. Eitzman zeigte jedoch ein erhöhtes thrombotisches Risiko in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen¹⁸². Nach photochemischer Plaqueruptur waren die Zeiten für eine vollständige Akklusion des Gefäßes der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen signifikant verkürzt.

4.3.1 Charakterisierung der ApoE^{-/-} - und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse

Da eine vollständige TFPI-Defizienz zum Absterben aller Embryonen in der neonatalen Periode führt, wurde in den Untersuchungen mit TFPI-heterozygoten Mäusen (TFPI^{+/-}) gearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse eine Reduktion der TFPI-Aktivität um 50 % im Vergleich zu TFPI^{+/+}-Tieren besitzen¹⁹¹.

Nach der erfolgreichen Zucht der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse durch Kreuzen von ApoE^{-/-}- und TFPI^{+/-}-Mäusen wurden diese für eine erste Charakterisierung beider Mausstämme für 14 bis 30 Wochen mit Westerntyp-Diät (WD) gefüttert und die Blutungszeiten, das Vorhandensein von arteriosklerotischen Plaques, die Endothelfunktion und die Thrombozytenadhäsion an verletzte Gefäße untersucht.

4.3.1.1 TFPI-abhängige Veränderung der Schwanzvenenblutungszeit

TFPI ist unter physiologischen Bedingungen ein Inhibitor des extrinsischen Gerinnungsweges, indem es die zur Aktivierung des Koagulationsfaktors VII nötige Protease inhibiert²¹⁵. Dadurch kommt es nicht zur Ausbildung des TF-FVIIa-Komplexes und der extrinsische Gerinnungsweg wird gestoppt. Um den Einfluss der heterozygoten Inaktivierung des TFPI-Gens zu analysieren, wurden zunächst die Schwanzvenenblutungszeiten (TVBT) der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse, die 14 Wochen mit WD gefüttert wurden, untersucht.

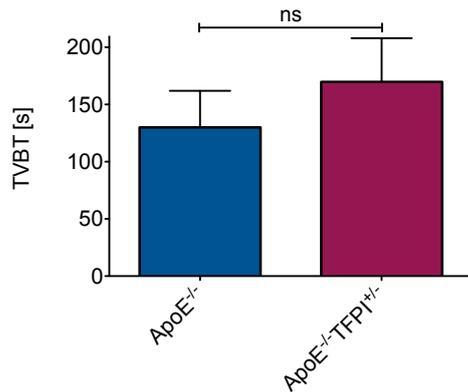


Abbildung 4-32: Die TFPI-haploiden Mäuse zeigen nach 14-wöchiger WD-Fütterung keine veränderten TVBTs.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden 14 Wochen mit WD gefüttert. 0,5 cm der Schwanzspitze wurde entfernt und der Schwanz in 37 °C warme 0,9 %ige NaCl-Lösung gehalten. Die Zeit zum vollständigen Wundverschluss wurde gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-5 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; t-Test).

Nach AS-Induktion durch 14wöchige Fütterung der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit WD zeigte sich überraschender Weise kein Unterschied in den TVBTs beider Versuchsgruppen. Die TFPI-Heterozygotie hatte unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Blutungszeiten der Mäuse. Um zu untersuchen, ob nach einer längeren Fütterung mit WD (Referenzwert siehe Erstbeschreibung der Mäuse¹⁸²) und somit einer schwereren arteriosklerotischen Erkrankung der Tiere, die TFPI-haploiden Mäuse eine verkürzte Blutungszeit und ein größeres Thromboserisiko aufweisen, wurden die Mäuse 30 Wochen mit WD gefüttert und deren TVBTs ermittelt.

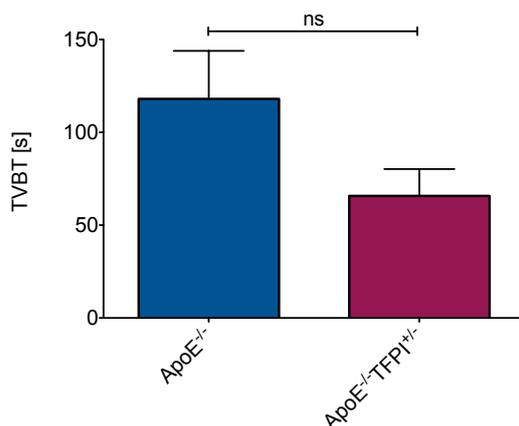


Abbildung 4-33: ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse zeigen nach 30wöchiger Fütterung mit WD tendenziell eine verkürzte TVBT.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden 30 Wochen mit WD gefüttert. 1 cm der Schwanzspitze wurde entfernt und der Schwanz in 37 °C warme 0,9 %ige NaCl-Lösung gehalten. Die Zeit zum vollständigen Wundverschluss wurde gemessen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-5 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; t-Test).

Die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse, die für 30 Wochen mit WD gefüttert wurden, zeigten tendenziell verringerte TVBTs im Vergleich zu den ApoE^{-/-}-Mäusen. Das Blut der TFPI-haploiden Tiere wies eine etwa 45 % schnellere Blutgerinnung auf als das der TFPI-diploiden Mäuse.

4.3.1.2 TFPI-abhängige Änderungen der Blutgerinnung

Um die TVBTs nach dem Beitrag des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungsweges aufzuschlüsseln, wurde das Blut der für 30 Wochen mit WD gefütterten ApoE^{-/-} TFPI^{+/-}- und ApoE^{-/-}-Mäuse für Koagulationsanalysen im Amelung Koagulometer eingesetzt.

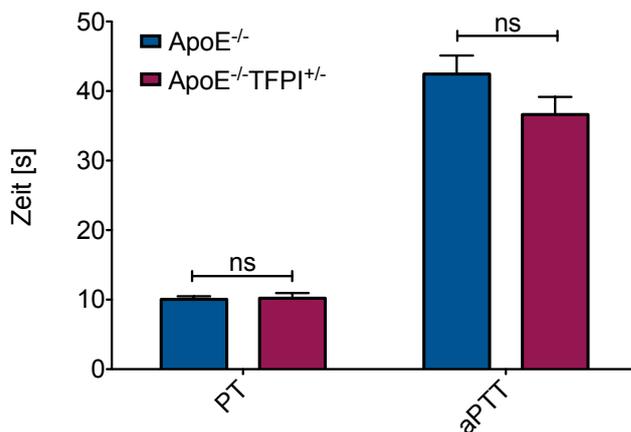


Abbildung 4-34: ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse zeigen keine Unterschiede in der extrinsischen und eine tendenzielle Verringerung in der intrinsischen Gerinnungszeit.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden für 30 Wochen mit WD gefüttert, bevor ihnen Blut abgenommen wurde. Das Blut wurde mit Citratpuffer gemischt und für die Bestimmung der extrinsischen (PT) und intrinsischen (aPTT) Gerinnungszeit eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-5 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; t-Test).

Überraschender Weise zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den PT-Werten beider Gruppen, jedoch eine tendenzielle Verringerung der aPTT-Werte. Die TFPI-Heterozygotie hatte unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die extrinsische Blutgerinnung, auch wenn TFPI unter physiologischen Bedingungen ein Inhibitor dieses Gerinnungsweges ist. Der Einfluss von TFPI auf die intrinsische Blutgerinnung muss in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

4.3.1.3 Erhöhung der arteriosklerotischen Plaques durch TFPI-Mangel

Um zu untersuchen, ob die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse ein vermehrtes arteriothrombotisches Risiko im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen aufweisen, wurden die arteriosklerotischen Plaques der über einen Zeitraum von 30 Wochen mit WD gefütterten Mäuse mittels Sudan-Färbung angefärbt und der prozentuale Anteil der Läsionsfläche über die gesamte Aortenfläche bestimmt.

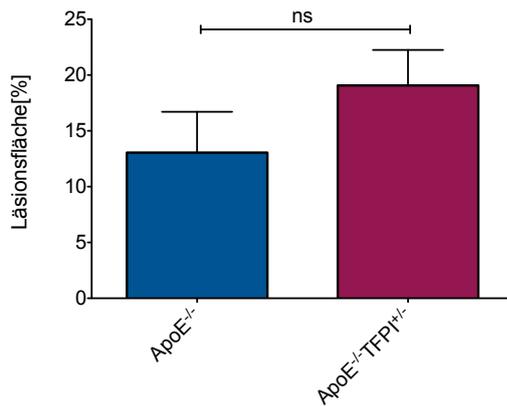


Abbildung 4-35: Der prozentuale Anteil an arteriosklerotischen Läsionen ist in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen tendenziell leicht erhöht.

ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden für 30 Wochen mit WD gefüttert und die arteriosklerotischen Plaques in den cranialen, medialen und caudalen Bereichen der Aorten mittels Sudan-Färbung sichtbar gemacht.

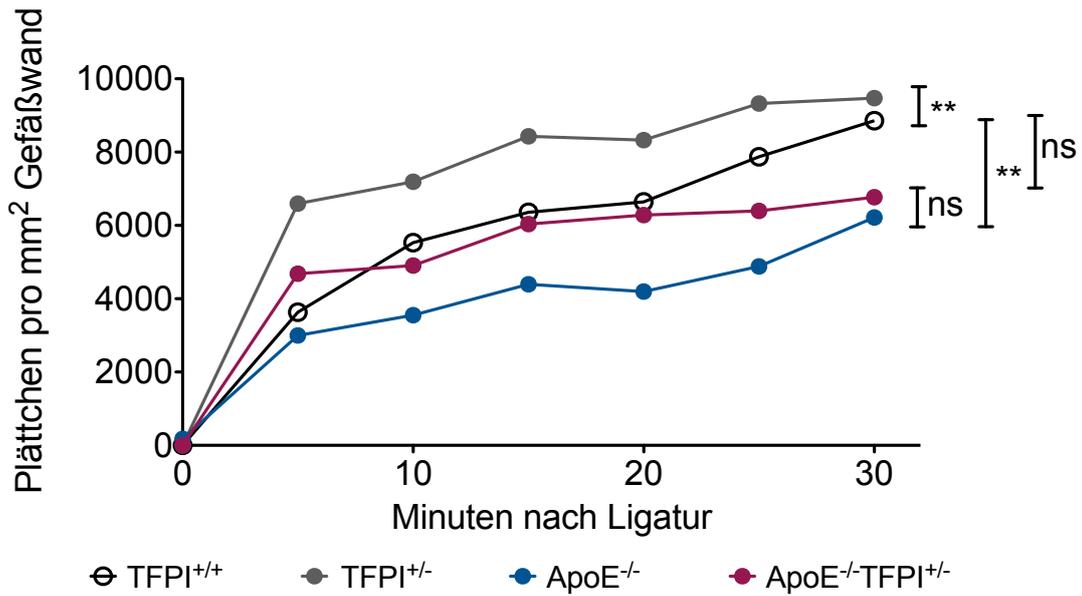
Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte + SEM der prozentualen Anteile der Läsionen über die gesamte Aortenfläche von 4-5 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; t-Test).

Die Ergebnisse der Plauefärbungen zeigten zwar eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung der Läsionsflächen in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den ApoE^{-/-}-Mäusen. Scheinbar tendieren die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse nach WD-Fütterung eher zu der Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques als ApoE^{-/-}-Tiere.

4.3.1.4 Die Plättchenadhäsion an Läsionsflächen wird durch TFPI- Mangel und Fettfutter beeinflusst

Während der Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur ist die Zeit zur Okklusion des Gefäßes unter anderem von der Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand abhängig. Dies kann mittels Intravitalmikroskopie nachgestellt werden. Dafür werden fluoreszenzmarkierte Thrombozyten einer Spendermaus in eine genotypgleiche Empfängermaus injiziert und die Adhäsion dieser nach einer 5minütigen Verletzung der Endothelzellen durch Abbinden mittels Videofluoreszenzmikroskopie verfolgt. Für die ersten Charakterisierungen der gezüchteten Mäuse und zur Analyse des Effekts der WD-Fütterung wurden sowohl Wildtypmäuse (TFPI^{+/+}), als auch TFPI^{+/-}, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse in einem Alter von 14-18 Wochen mit oder ohne WD-Futter untersucht.

A



B

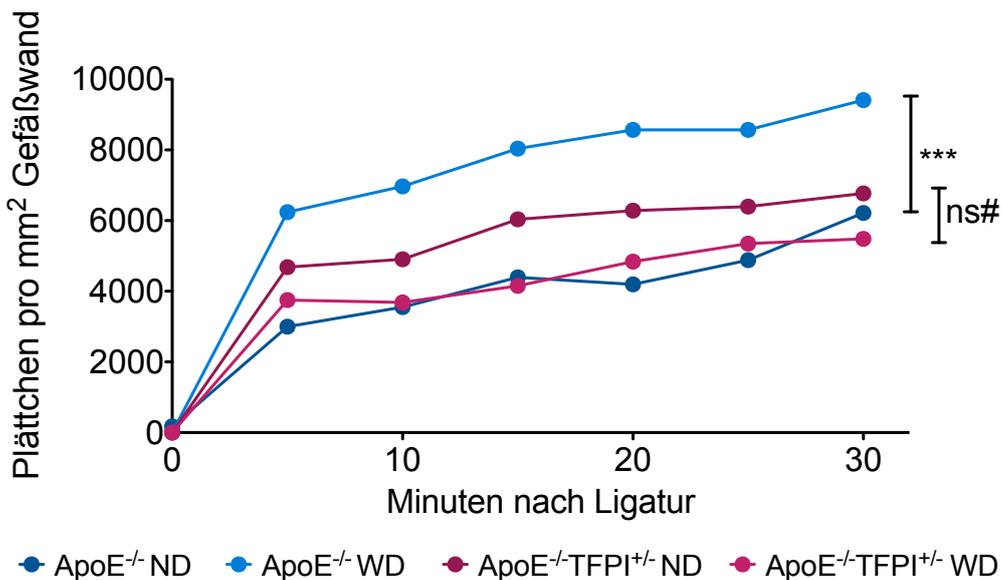


Abbildung 4-36: Beeinflussung der Plättchenadhäsion an Läsionsstellen durch die TFPI-Heterozygotie und Westerntyp-Diät.

A TFPI^{+/+}, TFPI^{+/-}, ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen mit ND-Fütterung wurde im Alter von 14 bis 18 Wochen eine 5minütige Läsion an der Karotisarterie zugefügt und fluoreszenzmarkierte Plättchen einer genotypgleichen Spendermaus zugeführt. Die Adhäsion der markierten Plättchen an die Läsionsstelle wurde mittels Videofluoreszenzmikroskopie für 30 Minuten beobachtet.

B ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden für 18 Wochen mit WD oder ND gefüttert, bevor ihnen an der Karotisarterie eine 5minütige Läsion durch Abbinden der Arterie zugefügt wurde. Die Adhäsion zugeführter fluoreszenzmarkierter Plättchen einer genotypgleichen Spendermaus wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten durch Videofluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

Dargestellt sind die Mittelwerte der adhärennten Plättchen an die Läsionsstelle (** = p < 0,01; *** = p < 0,001; ns = nicht signifikant verschieden von Kontrolltieren; Two-way ANOVA).

Die ersten Analysen ergaben eine erhöhte Plättchenadhäsion und damit ein vergrößertes Thromboserisiko bei einer TFPI-Heterozygotie im Vergleich zu Wildtypmäusen. Die mit ND-gefütterten ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse (**A**) zeigten untereinander keine Unterschiede in der Plättchenadhäsion an die Läsionsstelle, waren jedoch leicht verringert im Vergleich zu Wildtypmäusen mit ND. Die Adhäsion der ApoE^{-/-}-Plättchen war sogar signifikant verringert von denen der Wildtypkontrollgruppe (TFPI^{+/+}). Dies deutet auf ein geringeres Thromboserisiko in ApoE^{-/-}-Mäusen, die mit ND gefüttert wurden, als in Wildtypmäusen hin. Der Einfluss der Fütterung mit WD auf die Plättchenadhäsion (**B**) zeigte sich nur bei den ApoE^{-/-}-Tieren und führte bei ihnen verglichen mit ND-Tieren des selben Genotyps zu einer drastischen Erhöhung der Adhäsion der Plättchen an das verletzte Gewebe und somit zu einer Erhöhung des Thrombopotenziels in diesen Mäusen. Die Plättchen der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse zeigten keine Veränderung in ihrer Adhäsionshäufigkeit im Vergleich zu der genotypgleichen ND-Kontrolle.

Die Fütterung der Mäuse mit fettreicher WD konnte zumindest in ApoE-defizienten Mäusen das Thromboserisiko durch vermehrte Plättchenadhäsion an das verletzte Blutgefäß erhöhen. Es ist jedoch fraglich, welche Rolle TFPI in der Thrombozytenadhäsion spielt und warum die WD-Fütterung der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse diese nicht verstärkte.

4.3.1.5 Die Endothelfunktion wird durch die TFPI-Heterozygotie und Fettfutter beeinflusst

Eine eDF gilt als erstes Symptom einer beginnenden AT. Daher wurde auch in ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen mit oder ohne WD die acetylcholinabhängige Relaxation von Aortenringen untersucht.

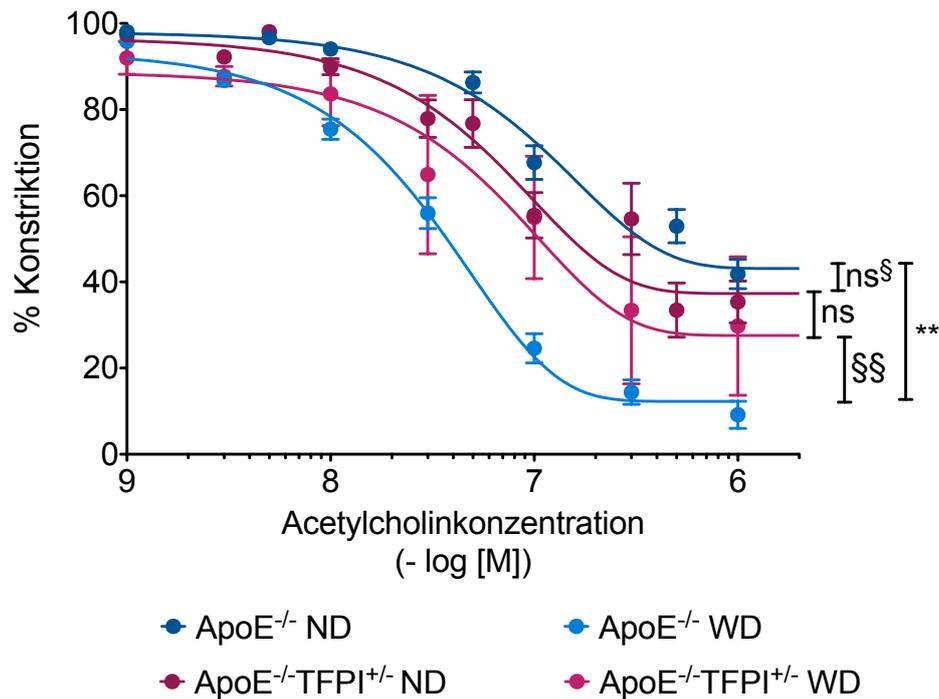


Abbildung 4-37: Die Fütterung der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit WD verschlechtert die Endothelfunktion dieser Mäuse.

3 mm große Aortenringe von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die für 12-18 Wochen mit ND bzw. WD gefüttert wurden, wurden für isometrische Spannungsmessungen mit 100 nM Norepinephrin maximal kontrahiert und mit steigenden Konzentrationen Acetylcholin relaxiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte ± SEM von 4-8 unabhängigen Messungen (** = p < 0,01; ns = nicht signifikant verschieden von ND-Tieren; §§ = p < 0,01; ns[§] = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; Two-way ANOVA).

Es zeigte sich, dass die Endothelfunktionen von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen mit Normaldiät nicht signifikant voneinander verschieden waren. Unter ND-Fütterung konnte kein Einfluss der TFPI-Heterozygotie auf die acetylcholininduzierte Gefäßrelaxation nachgewiesen werden. Die EC₅₀-Werte für beide Genotypen unter ND lagen für Gefäße von ApoE-defizienten Mäusen bei 10⁻⁷ M und für Gefäße von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen bei 6•10⁻⁸ M. Auffällig war jedoch, dass die Gefäße dieser Mäuse nach maximaler Kontraktion mit Norepinephrin nur zu 45 – 60 % relaxieren konnten. Nach Fütterung mit Fettfutter (WD) verbesserte sich überraschender Weise die Endothelfunktion der ApoE^{-/-}-Mäuse signifikant. Der EC₅₀-Wert für Acetylcholin sank bei den mit WD gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen auf 3,5•10⁻⁸ M und die Gefäßrelaxation dieser Mäuse verbesserte sich auf etwa 90 % der maximalen Kontraktion. Nach Fütterung mit WD änderte sich die Endothelfunktion der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den mit ND gefütterten Tieren des gleichen Genotyps nicht

(EC₅₀ = 7•10⁻⁸ M), jedoch war die Gefäßrelaxation im Vergleich zu den mit WD gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen durch die TFPI-Heterozygotie verschlechtert.

4.3.2 Gal senkt die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker in der Zellkultur

Die unterschiedlichen Chargen des während der Versuche genutzten Pilzsekundärmetabolits Gal wurden in einem Zellkulturmodell mit MM6- bzw. RAW-Zellen getestet. Hierfür wurden die Zellen 1 Stunde vor der Zytokinstimulation mit 1 mM Gal behandelt und nach Zytokinstimulation wurde die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker mittels qRT-PCR analysiert. Da die iNOS-Expression unter den gewählten Bedingungen nicht in MM6-Zellen stimuliert werden kann, wurde die Regulation der iNOS-mRNA nach Gal-Behandlung in RAW-Zellen untersucht.

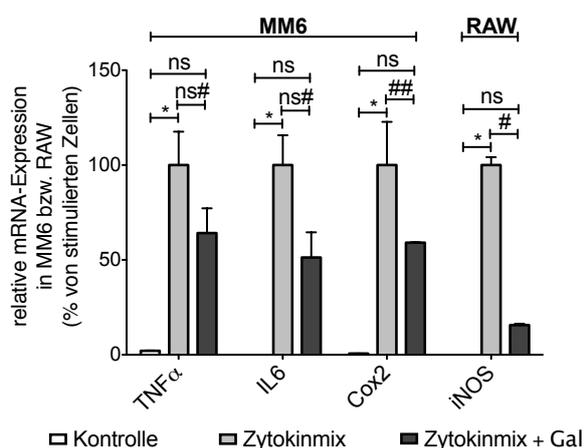


Abbildung 4-38: Gal verringert die Expression einiger proinflammatorischer Marker-gene.

MM6- bzw. RAW-Zellen wurden 1 Stunde mit 1 mM Gal behandelt, bevor sie für die jeweiligen Zeiträume (TNFα, IL6, Cox2 = 2 Stunden; iNOS = 6 Stunden) mit einem Zytokinmix (MM6: 37,5 ng/mL TNFα, 30 ng/mL IFN-γ und 3 ng/mL IL1β; RAW: 1 µg/mL LPS und 30 ng/mL IFN-γ) stimuliert wurden. Die Kontrollzellen wurden für die jeweiligen Zeiträume mit DMEM ohne FKS behandelt. Die Zellen wurden mit GIT-Pfifer lysiert, die RNA in qRT-PCR-Analysen für die Genexpressionsuntersuchungen eingesetzt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 2-4 unabhängigen Messungen (* = p < 0,05; ns = nicht signifikant verschieden von Kontrollzellen; ## = p < 0,01; # = p < 0,05; ns# = nicht signifikant verschieden von stimulierten Zellen; One-way ANOVA).

In den Analysen zur Funktionalität von Gal zeigte sich, dass die Substanz dazu in der Lage war, die mRNA-Expression proinflammatorischer Gene in MM6- bzw. RAW-Zellen zu verringern. Die Expressionen der Cox2- und iNOS-mRNA konnten signifikant verändert werden, die der TNFα- und IL6-mRNA wurden tendenziell verringert. Auf Grund dieser Ergebnisse in der Zellkultur wurde Gal für die Behandlung der durch Fettfutter induzierten AS bzw. AT in ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen eingesetzt.

4.3.3 Behandlung der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit Gal

Die Behandlung der AT der Versuchstiere mit dem Pilzsekundärmetabolit Gal erfolgte nach dem in Kapitel 3.3.3 dargestellten Versuchsschema. ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden entweder 12 Wochen mit ND oder 18 Wochen mit WD gefüttert. Den WD-Mäusen wurde die letzten 6 Wochen jeden zweiten Tag 10 mg/kg Gal bzw. PBS + 10 % EtOH (PBS/EtOH) *i.p.* verabreicht, um einen therapeutischen Effekt des Pilzmetaboliten zu untersuchen. Als funktionelle Tests wurden die Plättchenadhäsion mittels Intravitalmikroskopie, die Endothelfunktion, sowie die Blutgerinnungszeiten analysiert. Weiterhin wurde die mRNA-Expression verschiedener proarteriothrombotischer Mediatoren mittels qRT-PCR untersucht.

4.3.3.1 Gal verringert die Adhäsion von Thrombozyten an Läsionsstellen in ApoE-defizienten Mäusen

Den mit Gal bzw. PBS/EtOH behandelten Mäusen wurden fluoreszenzmarkierte Thrombozyten einer genotypgleichen Spendermaus injiziert und die Adhäsion dieser an eine durch 5minütiges Abbinden verletzte Karotisarterie über einen Zeitraum von 30 Minuten mittels Videofluoreszenzmikroskopie untersucht.

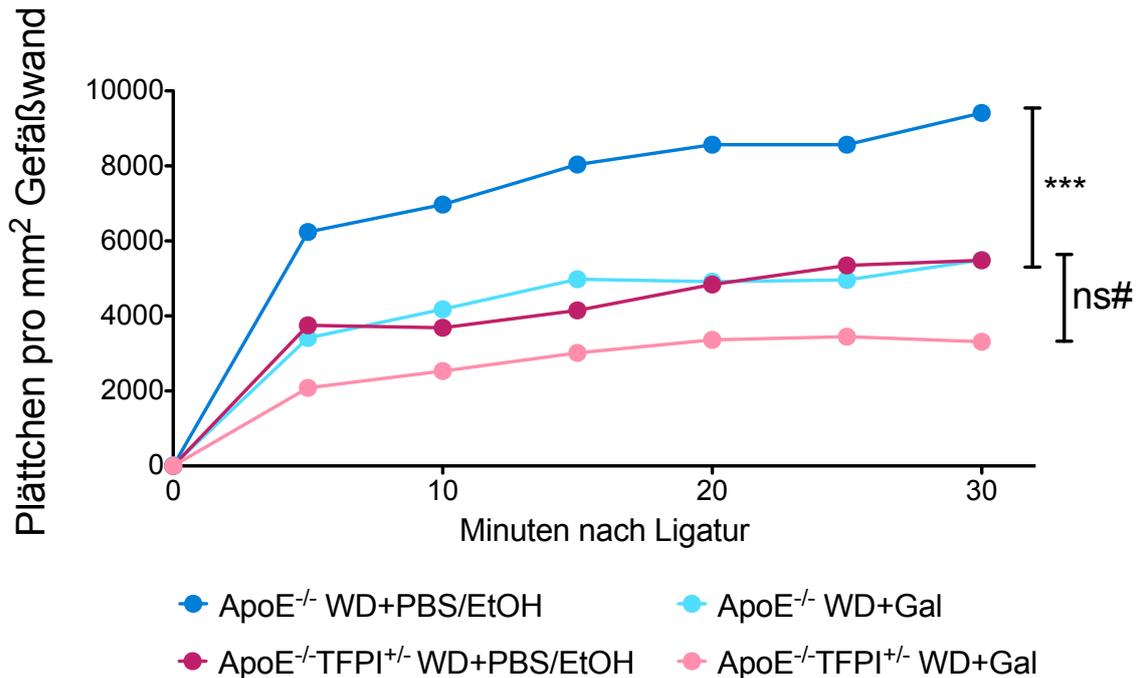


Abbildung 4-39: Gal-Behandlung verringert die Adhäsion der Plättchen an die Läsionsstelle in ApoE^{-/-}-Mäusen.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden für 18 Wochen mit WD gefüttert und die letzten sechs Wochen mit 10 mg/kg Gal bzw. PBS/EtOH *i.p.* behandelt, bevor ihnen an der Karotisarterie eine 5minütige Läsion durch Abbinden der Arterie zugefügt wurde. Die Adhäsion zugeführter fluoreszenzmarkierter Plättchen einer genotypgleichen Spendermaus wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten durch Videofluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

Dargestellt sind die Mittelwerte der adhärenen Plättchen an die Läsionsstelle (***) = $p < 0,001$ verglichen mit ApoE^{-/-}-Mäusen mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; Two-way ANOVA).

Die Auswertungen der IVM-Untersuchungen ergaben, dass die Gal-Behandlung verglichen mit der PBS/EtOH-Gabe in WD-gefütterten ApoE^{-/-}-Mäusen signifikant die Thrombozytenadhäsion an die lädierte Stelle verringern konnte. In ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen konnte eine leichte Reduktion der adhärenen Plättchen ermittelt werden, jedoch war diese Reduktion nicht signifikant verändert im Bezug auf die PBS/EtOH-Kontrollgruppe. Gal scheint auf funktioneller Ebene die Plättchenadhäsion in ApoE^{-/-}-Mäusen zu verringern, was zu einem verminderten Thromboserisiko in diesen Mäusen führen könnte.

4.3.3.2 Gal verbessert nicht die Endothelfunktion im AS- oder AT-Modell

Um einen frühen Marker einer beginnenden Arterioskleroseerkrankung zu untersuchen, wurde die Endothelfunktion der für 18 Wochen mit WD und für 6 Wochen mit Gal bzw. PBS/EtOH behandelten Mäuse bestimmt. Dafür wurden isometrische Spannungsmessungen der Aortenringe durchgeführt. Die Aortenringe wurden mit

Norepinephrin maximal kontrahiert und mit zunehmenden Konzentrationen Acetylcholin relaxiert.

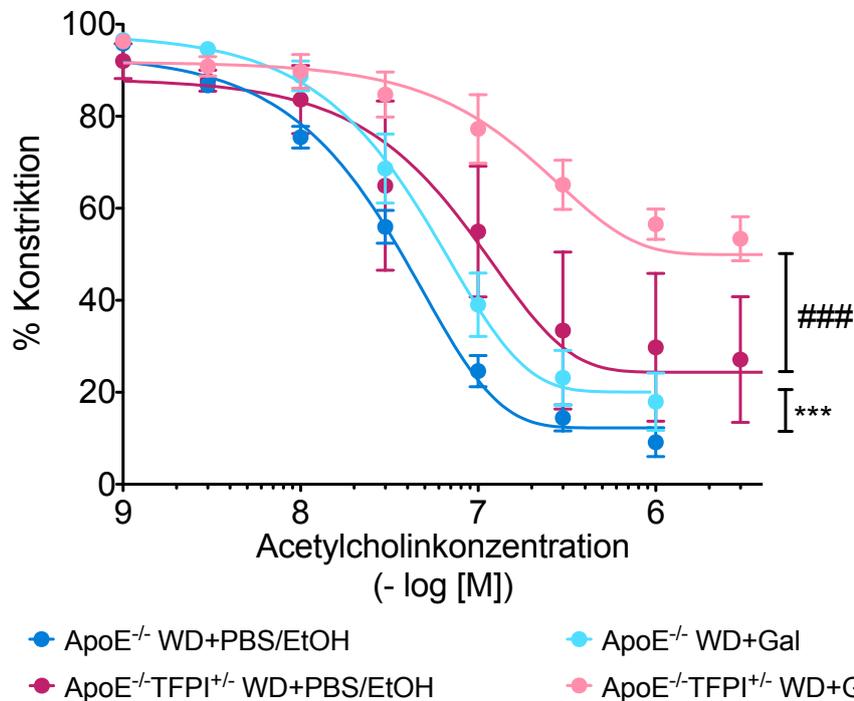


Abbildung 4-40: Gal verbessert die Endothelfunktion weder in ApoE^{-/-}- noch in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen.

3 mm große Aortenringe von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die für 18 Wochen mit WD gefüttert und die letzten 6 Wochen mit 10 mg/kg Gal bzw. PBS/EtOH *i.p.* behandelt wurden, wurden für isometrische Spannungsmessungen mit Norepinephrin maximal kontrahiert und mit steigenden Konzentrationen Acetylcholin relaxiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM von 4-8 unabhängigen Messungen (***) = $p < 0,001$ im Vergleich mit ApoE^{-/-}-Mäusen mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; ### = $p < 0,001$ verglichen mit ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; Two-way ANOVA).

In ApoE^{-/-}-Mäusen war Gal nicht in der Lage, die Endothelfunktion im Vergleich zu der in mit PBS/EtOH-behandelten Mäusen ermittelten Funktion zu verbessern. Es kam sogar zu einer leichten Verschlechterung der achetylcholinabhängigen Relaxation nach Gal-Behandlung. Der EC₅₀-Wert stieg von $3 \cdot 10^{-8}$ M in PBS/EtOH-behandelten Mäusen auf $5 \cdot 10^{-8}$ M in Gal-behandelten Tieren. In ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen hatte Gal im Vergleich zu PBS/EtOH überraschender Weise einen dramatischen Effekt auf die Endothelfunktion der Mäuse. Die Aortenringe der Mäuse, die für 6 Wochen mit Gal behandelt wurden, waren nicht mehr dazu in der Lage, mit Acetylcholin über 50 % zu relaxieren. Die EC₅₀-Werte stiegen von $9 \cdot 10^{-8}$ M in PBS/EtOH-behandelten Mäusen auf $2 \cdot 10^{-7}$ M nach Gal-Behandlung. Gal scheint auf Grund der

Ergebnislage nicht dazu geeignet zu sein, in einem Arteriosklerose- oder Arteriothrombosemodell die Endothelfunktion zu verbessern.

4.3.3.3 Effekte von Gal auf die Blutgerinnung

Die Wirkung des Pilzmetabolits Gal auf die Blutgerinnung der mit WD-gefütterten und mit PBS/EtOH- bzw. Gal-behandelten Mäuse wurde zunächst über Ermittlung der TVBTs beispielhaft nur in den ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen untersucht.

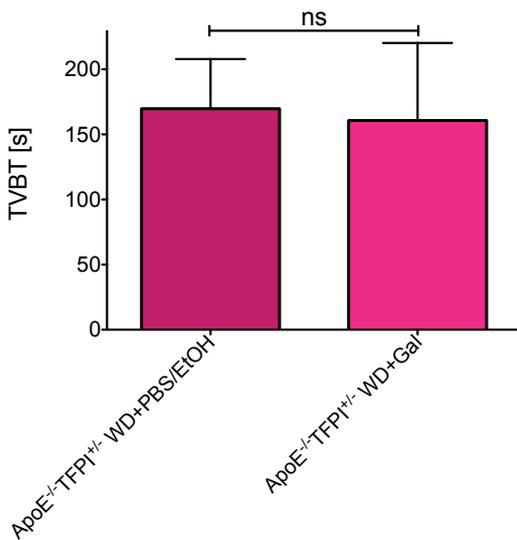


Abbildung 4-41: Gal-Behandlung zeigt keinen Effekt auf die TVBT der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse.

ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden 18 Wochen mit WD gefüttert und die letzten 6 Wochen jeden zweiten Tag mit 10 mg/kg Gal *i.p.* behandelt. 0,5 cm der Schwanzspitze wurde entfernt und der Schwanz in 37 °C warme 0,9 %ige NaCl-Lösung gehalten. Die Zeit zum vollständigen Wundverschluss wurde gemessen.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 3-4 Mäusen (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Mäusen; t-Test).

Es zeigte sich zwischen den zwei Versuchsgruppen kein Unterschied in den Schwanzvenenblutungszeiten. Durch die Behandlung der Mäuse mit Gal wurde die Thrombusbildung nicht beeinflusst.

Um zu untersuchen, ob die Behandlung der Mäuse mit Gal einen Einfluss auf die extrinsische und intrinsische Gerinnungszeit hatte, wurde den Mäusen, die 18 Wochen mit WD gefüttert worden waren und die letzten 6 Wochen jeden zweiten Tag 10 mg/kg Gal *i.p.* verabreicht bekommen hatten, Blut entnommen, mit Citratpuffer 1:9 vermischt und das nach Zentrifugation gewonnene Plasma für die Analyse der PT- und aPTT-Werte eingesetzt.

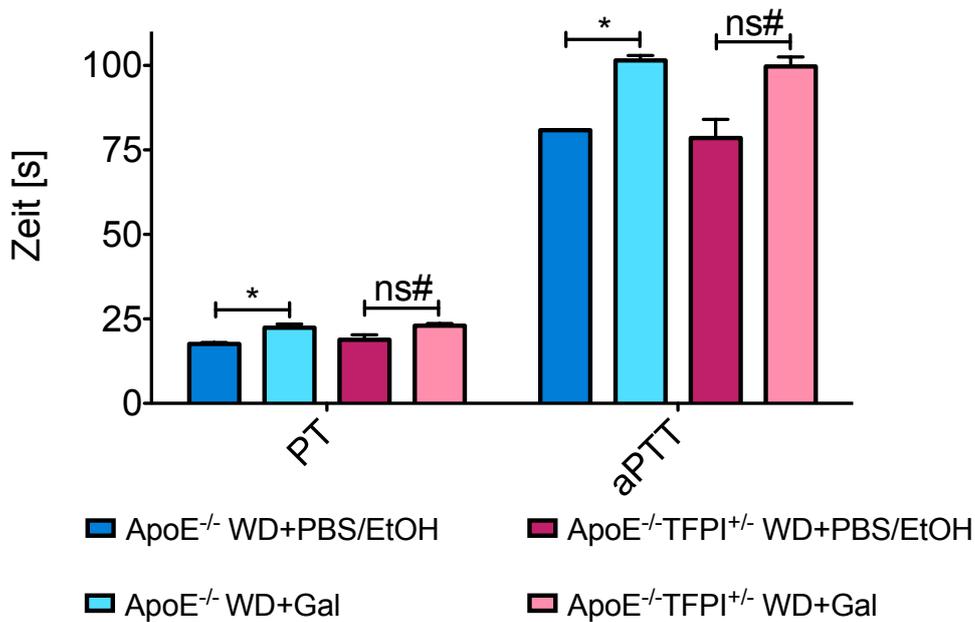


Abbildung 4-42: Die Behandlung der Mäuse mit Gal verlängert die Blutungszeiten der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade.

Blut von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse, die 18 Wochen mit WD gefüttert und sechs Wochen mit Gal (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH behandelt wurden, wurde mit Citratpuffer gemischt und für die Bestimmung der extrinsischen (PT) und intrinsischen (aPTT) Gerinnungszeit eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 2-4 Mäusen (* = $p < 0,05$ im Vergleich zu ApoE^{-/-}-Mäusen mit WD + PBS/EtOH; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD + PBS/EtOH; t-Test).

In den Analysen der PT- und aPTT-Werte zeigte sich eine verlängerte Gerinnungszeit nach 6wöchiger Behandlung der Mäuse mit Gal in der extrinsischen und intrinsischen Koagulationskaskade (signifikant für ApoE-defiziente Tiere und tendenziell für ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse) in den untersuchten Gruppen. Die Gal-Behandlung scheint einen negativen Effekt auf die Thrombusbildung zu haben.

4.3.3.4 Gal senkt die mRNA-Expression einiger AT-Markergene

Gal wurde im chronischen Entzündungsmodell des Asthmas¹⁶⁹ sowie in Zellkulturexperimenten¹⁶⁸ als eine Substanz beschrieben, die über IL6-Reduktion zu einer Verringerung der Inflammation führt. Um zu untersuchen, ob Gal auch in den ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen die Expression von IL6 moduliert, wurde in den aus Aorten isolierten RNAs der mit Gal- bzw. PBS/EtOH-behandelten Mäuse die IL6-mRNA-Expression mittels qRT-PCR analysiert.

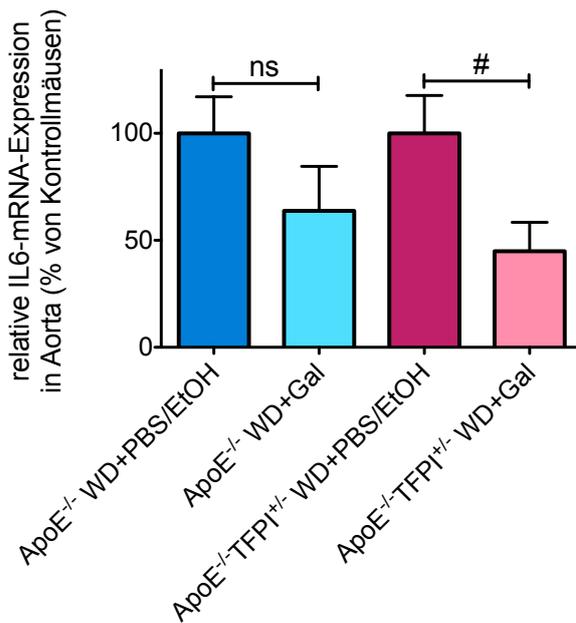


Abbildung 4-43: Gal verringert die IL6-mRNA-Expression in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen.

Aorten von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die 18 Wochen mit WD und sechs Wochen mit Gal (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH behandelt worden waren, wurden in GIT-Puffer homogenisiert. Die isolierte RNA wurde in qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der IL6-mRNA-Expression eingesetzt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 3-9 Mäusen pro Gruppe (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD + PBS/EtOH; # = p < 0,05 im Vergleich zu ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD + PBS/EtOH; t-Test).

In diesen Untersuchungen zeigte sich eine verringerte Expression der IL6-mRNA in den ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den für sechs Wochen mit PBS/EtOH behandelten Mäusen des gleichen Genotyps. In ApoE^{-/-}-Mäusen konnte eine tendenzielle Reduktion der IL6-mRNA-Expression in den Mausearten durch Gal-Gabe erreicht werden.

Da die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse als ein Mausmodell für Arteriosklerosen mit verstärkter Thrombose beschrieben wurden, wurden in den Aorten der Versuchstiere die Expression verschiedener proarteriosklerotischer, prothrombotischer und proinflammatorischer Markergene untersucht. Ebenfalls wurde die Wirkung von Gal auf die Expression dieser Mediatoren analysiert. Die Aorten der Mäuse wurden in GIT-Puffer homogenisiert und die RNA nach der Isolation in qRT-PCR-Untersuchungen eingesetzt.

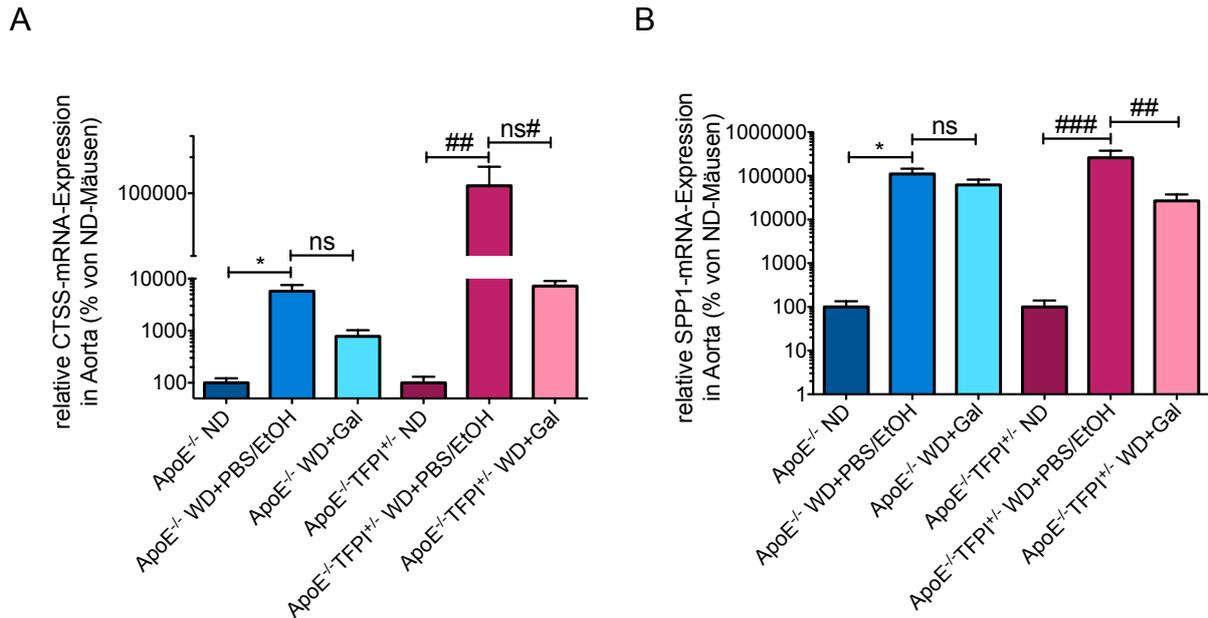
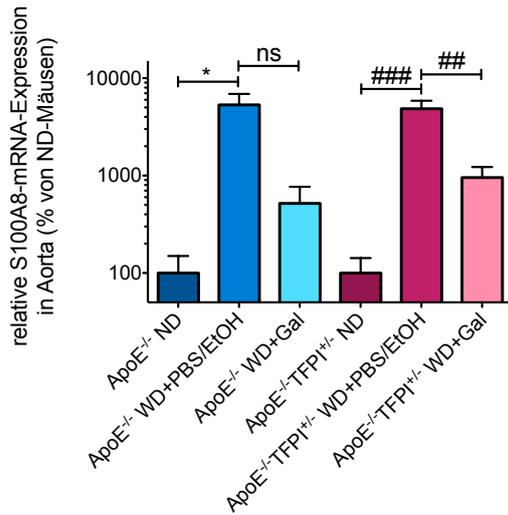


Abbildung 4-44: Gal moduliert die mRNA-Expression der proarteriosklerotischen Marker CTSS und SPP1.

Aorten von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die entweder 12 Wochen ND oder 18 Wochen WD mit sechswöchiger Gal- (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH-Behandlung erhalten hatten, wurden in GIT-Puffer homogenisiert. Die RNA wurde isoliert, revers transkribiert und in qPCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Expression der proarteriosklerotischen Markergene CTSS (A) und SPP1 (B) eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-12 Mäusen pro Gruppe (* = p < 0,05; ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH behandelt; ### = p < 0,001; ## = p < 0,01; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH behandelt; One-way ANOVA).

Es zeigte sich bei der Analyse der mRNA-Expression zweier proarteriosklerotischer Gene, dass die Expression dieser mit WD induziert werden konnte. Die Induktion der CTSS-mRNA-Expression in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen durch die fettreiche Diät war in etwa 10fach höher als die in ApoE^{-/-}-Mäusen. Diese Expressionserhöhung deutet auf einen Effekt der TFPI-Heterozygotie auf die mRNA-Expression dieses Gens hin. Die Behandlung der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit Gal konnte im Vergleich zu der Behandlung mit dem Lösungsmittel PBS/EtOH die mRNA-Expression des proarteriosklerotischen Gens SPP1 signifikant auf 10 % verringern. Gal konnte jedoch nicht in ApoE^{-/-}-Mäusen die SPP1-mRNA-Expression senken. Die Untersuchungen der CTSS-mRNA-Expressionen zeigten sowohl in ApoE^{-/-}- als auch in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen eine tendenzielle Verringerung auf 13 % bzw. 6 % der mit PBS/EtOH behandelten Tiere durch die Behandlung mit dem Pilzmetabolit.

A



B

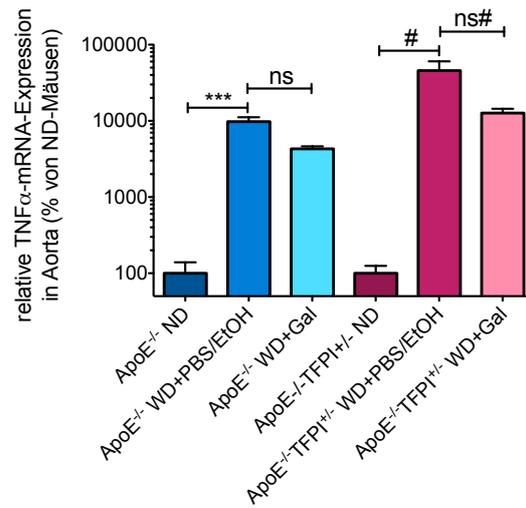


Abbildung 4-45: Die mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker S100A8 und TNFα wird durch Gal-Gabe verringert.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden entweder 12 Wochen mit ND oder 18 Wochen mit WD gefüttert. Die WD-Tiere wurden 6 Wochen mit Gal (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH *i.p.* behandelt. Aorten dieser Mäuse wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde in qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Expression der proinflammatorischen Markergene S100A8 (A) und TNFα (B) eingesetzt.

Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 3-11 Mäusen pro Gruppe (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; #### = $p < 0,001$; ## = $p < 0,01$; # = $p < 0,05$; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH behandelt; One-way ANOVA).

Die Untersuchungen zur mRNA-Expression der proinflammatorischen Marker TNFα oder S100A8 zeigten eine Induktion beider mRNAs durch die WD-Fütterung. Jedoch war diese Expressionssteigerung nicht von der TFPI-Heterozygotie abhängig, da zwischen den beiden Genotypen mit gleicher Fütterung kein Unterschied in der mRNA-Expression zu erkennen war. Es konnte eine Verringerung der S100A8-mRNA-Expression durch die Gal-Behandlung in den ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen auf etwa 19 % beobachtet werden. Es zeigte sich eine Erniedrigung der Expression der S100A8-mRNA auf 9 % in ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu PBS/EtOH-behandelten Tieren. Die Analyse der TNFα-mRNA-Expression in den Aorten der ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse nach Gal-Gabe ergab keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe. Jedoch konnte die Behandlung der Mäuse mit Gal die TNFα-mRNA-Expression in ApoE^{-/-}-Mäusen tendenziell auf 43 % und in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen tendenziell auf 27 % der Expressionsmenge der mit PBS/EtOH behandelten Mäuse senken.

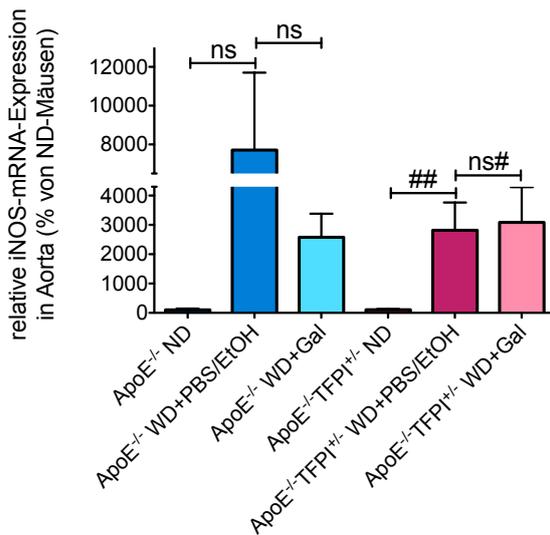


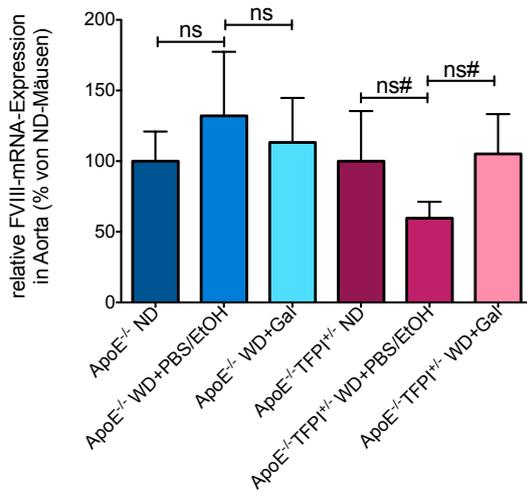
Abbildung 4-46: Die Expression der iNOS-mRNA kann nach Gal-Behandlung leicht, aber nicht signifikant in ApoE^{-/-}-Mäusen reduziert werden.

Aorten von ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die entweder 12 Wochen einer ND oder 18 Wochen einer WD mit sechswöchiger Gal- (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH-Behandlung unterzogen worden waren, wurden in GIT-Puffer homogenisiert. Die RNA wurde isoliert und in qRT-PCR-Untersuchungen für die Analyse der mRNA-Expression der iNOS eingesetzt.

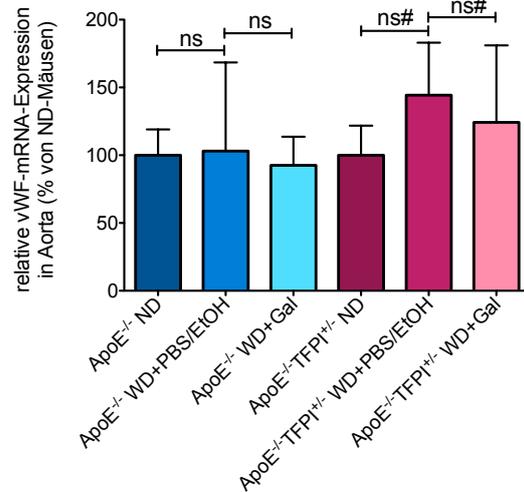
Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 7-12 Mäusen pro Gruppe (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; ## = p < 0,01; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH behandelt; One-way ANOVA).

Die mRNA-Expression des NO-produzierenden Enzyms iNOS konnte durch die Fütterung der Mäuse mit WD induziert, jedoch nicht signifikant nach Gal-Behandlung verringert werden. Die Behandlung der ApoE^{-/-}-Mäuse mit Gal führte im Vergleich zu der Behandlung mit PBS/EtOH zu einer leichten, tendenziellen Verringerung der iNOS-mRNA-Menge auf 33 %, währenddessen die Gal-Gabe in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen keinen Effekt auf die mRNA-Expression hatte.

A



B



C

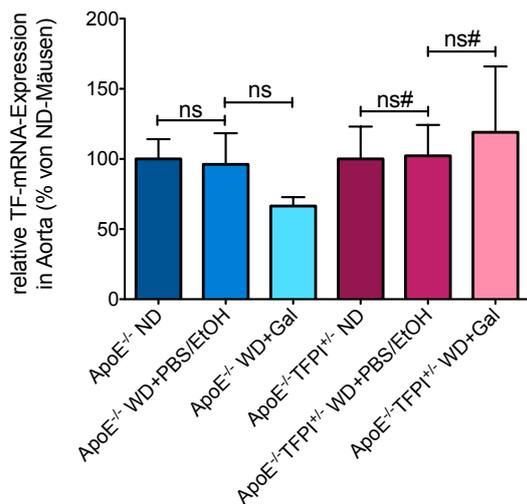


Abbildung 4-47: Die mRNA-Expression prothrombotischer Mediatoren ist in ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen unverändert.

ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse wurden entweder 12 Wochen mit ND oder 18 Wochen mit WD gefüttert. Die WD-Tiere wurden 6 Wochen mit Gal (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH *i.p.* behandelt. Aorten dieser Mäuse wurden in GIT-Puffer homogenisiert, die RNA wurde in qRT-PCR-Analysen zur Untersuchung der mRNA-Expression der prothrombotischen Markergene FVIII (A), vWF (B) und TF (C) eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 5-11 Mäusen pro Gruppe (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH-Behandlung; ns# = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD und PBS/EtOH behandelt; One-way ANOVA).

Weitere qRT-PCR-Analysen zeigten, dass die Expression von verschiedenen an Thrombosen beteiligten Markergenen wie FVIII, vWF oder TF nicht durch die Fütterung der Mäuse mit fettreicher Diät beeinflusst werden konnte. Auch war die Expression dieser Gene abhängig vom Genotyp der Mäuse. Die Behandlung der Mäuse mit Gal hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expressionen der untersuchten prothrombotischen Gene in beiden Maustypen.

Da für eine beginnende Arteriosklerose aktivierte Endothelzellen, die Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 oder ICAM-1 exprimieren, eine wichtige Rolle für die Einwanderung von Immunzellen und somit für die Progression einer AS spielt, wurde die

mRNA-Expression von VCAM-1 und ICAM-1 in ND- und WD-Tieren, die mit Gal bzw. PBS/EtOH behandelt wurden, analysiert.

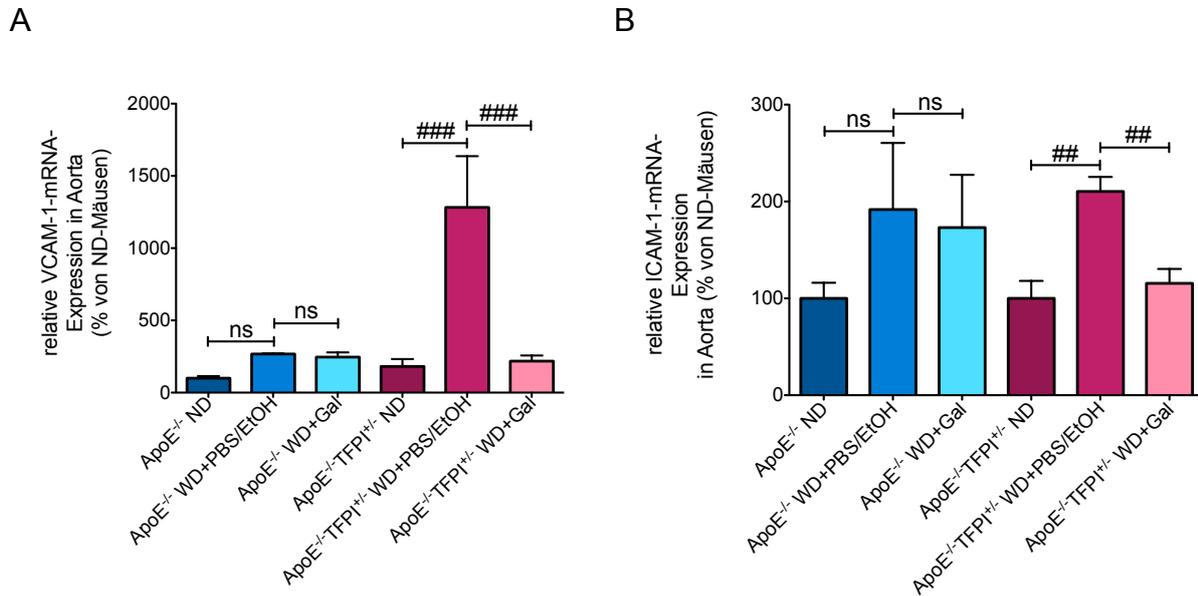


Abbildung 4-48: Gal verringert die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen.

Aorten von ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die entweder 12 Wochen einer ND oder 18 Wochen einer WD mit sechswöchiger Gal- (10 mg/kg) bzw. PBS/EtOH-Behandlung unterzogen worden waren, wurden in GIT-Puffer homogenisiert. Die RNA wurde isoliert und in qRT-PCR-Untersuchungen für die Analyse der mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (A) und ICAM-1 (B) eingesetzt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte + SEM von 4-5 Mäusen pro Gruppe (ns = nicht signifikant verschieden von ApoE^{-/-}-Tieren mit WD + PBS/EtOH; ### = p < 0,001; ## = p < 0,01 im Vergleich zu ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren mit WD + PBS/EtOH; One-way ANOVA).

Es konnte beobachtet werden, dass die mRNA-Expression von VCAM-1 und ICAM-1 nur TFPI-heterozygotieabhängig durch die fettreiche Fütterung (WD) induziert werden konnte. In ApoE^{-/-}-Mäusen war keine Erhöhung der mRNA-Expressionen beider Gene durch die Fütterungsbedingungen nachweisbar und auch die Behandlung dieser Mäuse mit Gal hatte keine verringere Wirkung auf die mRNA-Expression dieser Gene. In den ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen jedoch konnte die mRNA-Expression beider Adhäsionsmoleküle signifikant durch die WD-Gabe erhöht werden. Gal war in der Lage, die VCAM-1- und ICAM-1-mRNA-Expression signifikant bis auf das Level der ND-Mäuse zu senken. Die Endothelzellen in diesen Mäusen sind nach Gal-Gabe scheinbar weniger aktiviert als nach der Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle.

Gal zeigte also in den verschiedenen Analysen unterschiedliche Wirkungen auf die mRNA-Expressionen der untersuchten Gene. Es zeigte sich, dass die Behandlung der Mäuse mit Gal eine vermehrte Wirkung auf die ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse zu haben

schien. Nur die iNOS-mRNA-Expression der ApoE^{-/-}-Mäuse war tendenziell in größerem Maße Gal-verringert. Viele der untersuchten mRNAs wurden erst durch die Fütterung der Mäuse mit WD induziert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Mäuse an einer AS bzw. AT erkrankt waren.

5 Diskussion

5.1 Untersuchung zentraler Mediatoren der RA und AT

Patienten, die an einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie der RA leiden, haben ein 50 % höheres Risiko an kardiovaskulären Vorfällen zu versterben als der Rest der Bevölkerung⁷². Es zeigte sich, dass diese Patienten vermehrt AT ausbilden, deren Ausprägung unabhängig von den klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, Alter oder Geschlecht ist⁷⁴. Bisher sind die Mechanismen, die die AT-Ausbildung von RA-Patienten begünstigen noch nicht klar, obwohl bekannt ist, dass in beiden Erkrankungen die vorherrschende chronische Entzündung eine wichtige Rolle einnimmt. Beispielsweise korrelieren erhöhte Konzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP) mit einer erhöhten Mortalität von RA-Patienten⁷³, aber auch proinflammatorische Mediatoren wie TNF α oder IL6 treiben die Pathogenese einer erworbenen AS voran⁹⁴. Die Expression vieler dieser proinflammatorischer Markergene wird posttranskriptionell über RNA-BP reguliert, die vorwiegend über Bindung an AREs ihrer Zielstrukturen den mRNA-Abbau inhibieren oder stimulieren können¹⁴. Das RNA-BP TTP stimuliert die Deadenylierung und den Abbau ARE-haltiger mRNAs²¹⁶ wie die der proinflammatorischen Gene TNF α ²⁶ oder Mip-1 α ²¹⁷. Mäuse mit TTP-Defizienz zeigen einen starken inflammatorischen Phänotyp und haben unter anderem, wie auch RA-Patienten⁶⁸, hohe TNF α -Spiegel²³. Sie eignen sich daher gut, um den mechanistischen Zusammenhang zwischen RA und AT vor dem Hintergrund einer chronischen Entzündung zu untersuchen.

5.1.1 Charakterisierung der TTP^{-/-}- und TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse

5.1.1.1 Behandlung der TTP^{+/-}-Zuchtmäuse mit NAC

Da bei der Zucht der TTP-defizienten Mäuse aus den heterozygoten Eltern über einen Zeitraum von 6,5 Monaten nur 14 % der Nachkommen TTP-defizient waren, wurden die Zuchtmäuse mit dem oral bioverfügbaren Antioxidans NAC behandelt. Wie sich an der gesteigerten Anzahl der TTP^{-/-}-Geburten nach Behandlung der Elterntiere mit NAC auf 29 % innerhalb des gleichen Zeitraums erkennen lässt (siehe Abbildung 4-1), scheint der durch die chronische Entzündung bedingte oxidative Stress einen Einfluss auf die Geburtenrate zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass sich in den frühen Phasen (Empfängnis und Trächtigkeit) einer Schwanger-

schaft oxidativer Stress hemmend auf die Reproduktion von Labormäusen auswirkt²¹⁸. Ein weiterer Faktor, der die Geburtenanzahl der TTP^{-/-}-Mäuse beeinflussen kann, liegt auf der Seite der Embryonen. Das sich entwickelnde Gehirn reagiert auf Grund seines hohen Sauerstoffverbrauchs und der geringen Abwehr durch antioxidativ wirksame Verbindungen empfindlich auf oxidativen Stress^{219, 220}. Verschiedene Antioxidantien wirkten in *in vivo*²²¹- und *in vitro*²²²-Studien neuroprotektiv nach ethanolinduziertem oxidativen Stress. Ein solcher neuroprotektiver Effekt konnte auch mit NAC in fötalen und neonatalen Neuronen nachgewiesen werden, in denen NAC die ethanolassozierte ROS-Erhöhung verringerte²²³. In dieser Studie wurde durch NAC außerdem die Expression des antiapoptotischen Gens Xiap erhöht. Es ist daher also möglich, dass durch NAC-Gabe zum Einen die Empfängnis bzw. Trächtigkeit der TTP^{+/-}-Weibchen positiv beeinflusst wird und zum Anderen scheint NAC in den fötalen Neuronen die Belastung durch ROS zu senken und möglicherweise eine antiapoptotische Wirkung zu besitzen, sodass mehr TTP-defiziente Mäuse nach NAC-Behandlung der Zuchttiere geboren werden.

5.1.1.2 Die verringerte Gewichtszunahme in TTP^{-/-}-Mäusen kann durch zusätzliche TNF α -Defizient revidiert werden

Der durch verringertes Wachstum und verzögerte Gewichtszunahme charakterisierte Phänotyp der TTP^{-/-}-Mäuse, konnte durch zusätzliche Inaktivierung des TNF α -Gens verhindert werden, sodass sich die doppeldefizienten Mäuse in Gewicht und BMI nicht von den Wildtypkontrollen unterschieden (siehe Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3). Dieser Effekt konnte auch in TTP-defizienten Mäusen nach Behandlung mit einer anti-TNF α -Therapie über einen Zeitraum von neun Wochen erreicht werden²³. In dieser Studie waren Wachstum und Gewichtszunahme dieser derart behandelten Mäuse nicht unterschiedlich von denen der TTP^{+/+}- und TTP^{+/-}-Mäuse. Es konnte gezeigt werden, dass in TTP-defizienten Mäusen mit zusätzlicher Defizienz im TNF α -Rezeptor 1 (TNF α R1), jedoch nicht im Gen des TNF α R2, ebenfalls das verringerte Wachstum, welches TTP^{-/-}-Mäuse aufweisen, revidiert werden konnte²²⁴. Zusätzlich zeigte sich in beiden Studien der Verlust anderer phänotypischer Abnormalitäten der TTP^{-/-}-Mäuse, wie die Entwicklung einer inflammatorischen Arthritis oder die Ausbildung einer myeloiden Hyperplasie nach anti-TNF α -Therapie bzw. zusätzlicher Defizienz im TNF α R1-Gen. Auch die während der Durchführung dieser Arbeit genutzten TNF α ^{-/-}TTP^{-/-}-Mäuse zeigten während des Versuchszeitraums keine der als TTP-Defizienzsyndrom festgelegten Symptome. Diese und die eigenen Befunde zeigen

die große pathogene Rolle von TNF α für die Ausbildung dieses Syndroms. Mäuse mit einer myeloidspezifischen TTP-Defizienz zeigen ein minimales TTP-Defizienzsyndrom²²⁵, jedoch scheint das von myeloiden Zellen durch TTP-Inaktivierung produzierte TNF α kritisch für das Überleben einer LPS-induzierten septischen Schocks zu sein und die TTP-Expression in myeloiden Zellen ein wichtiger Aspekt der Immunantwort zu sein.

5.1.2 Kardiovaskuläre Erkrankung im Modell der chronischen Entzündung

5.1.2.1 Verringerung des Blutdrucks in chronisch entzündeten Mäusen

Bluthochdruck gilt als ein klassischer Risikofaktor für erhöhte kardiovaskuläre Vorfälle in der RA²²⁶, auch wenn der Einfluss des Bluthochdrucks in RA-Patienten auf die Ausbildung dieser Vorfälle verglichen mit gesunden Probanden gleich ist²²⁷. Auf Grund der höheren kardiovaskulären Risiken von RA-Patienten treten Todesfälle in dieser Gruppe durch einen erhöhten Blutdruck jedoch vermehrt auf. Die chronische Entzündung in diesen Patienten, die über die CRP-Mengen gemessen wird, führt zu einer Verringerung des bioaktiven NO in den Endothelzellen und somit zu einer erhöhten Vasokonstriktion, sowie Endothelin-1- und Plasminogenaktivatorinhibitor-1-Expression^{228, 229}, wodurch die Ausbildung einer AT begünstigt wird²³⁰. Weiterhin beeinflusst ein erhöhter CRP-Spiegel das Renin-Angiotensin-System, führt zu einer Erhöhung des Blutdrucks²³¹ und damit zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen sowie einer erhöhten Inflammation in der Gefäßwand²³². Die damit einhergehende Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen erhöht in einer positiven Rückkopplung den CRP-Spiegel²³³. In den TTP^{-/-}-Mäusen, die auf Grund ihres TTP-Defizienzsyndroms eine systemische Entzündung zeigen, wurde daher ein erhöhter Blutdruck erwartet. Es zeigte sich jedoch eine Verringerung des Gesamt-, diastolischen und systolischen Blutdrucks in diesen Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren. Als kompensatorische Reaktion auf den verringerten Blutdruck konnte ein erhöhter Puls in den TTP-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-4). In globalen Microarray-Analysen mit TTP^{-/-}- und Wildtypfibroblasten wurde das *immediate early response gene-3* (Ier3) als TTP-Zielstruktur nachgewiesen²⁹, welches bei der physiologischen Kontrolle des Blutdrucks eine Rolle spielt²³⁴. TTP vermittelt unter physiologischen Bedingungen den Abbau der Ier3-mRNA durch direkte Bindung an AREs der Ier3-3'-UTR. Eine Ier3-Defizienz resultiert in einer drastischen Erhöhung des Blutdrucks²³⁴, wohingegen in

TTP^{-/-}-Fibroblasten die Ier3-mRNA stark stabilisiert wurde²⁹. Diese Ergebnisse und die eigenen Daten zeigen, dass in Mäusen mit TTP-Defizienzsyndrom Veränderungen im Blutdruck wahrscheinlich vorwiegend durch die direkte Stabilisierung der Ier3-mRNA und nicht durch die allgemeine systemische Inflammation zu Stande kommen.

5.1.2.2 Die TTP-Defizienz führt zu einer eDF auf Grund der durch RONS-Erhöhung reduzierten NO-Bioaktivität

TTP ist ein wichtiger Regulator der proinflammatorischen Genexpression, jedoch ist seine genaue Rolle bei der Entwicklung von RA und AS noch nicht klar. Es zeigte sich, dass TTP neben der TNF α -mRNA²⁶ auch die von anderen bei der RA- und AS-Pathogenese wichtigen Markern wie z.B. von Mip-1 α ²¹⁷ destabilisiert. TTP wird in arteriosklerotischen Plaques exprimiert und führt dort lokal zu dem Abbau seiner Zielstrukturen und somit zu einer Verringerung der Inflammation⁶⁹.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit TTP-defizienten Mäusen zeigten einen Zusammenhang zwischen der chronischen Entzündung dieser Mäuse und der Entwicklung einer eDF, die als frühzeitiger Marker für eine AS gilt⁹⁸. TTP-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyptieren eine massive Dysregulation der vasodilatatorabhängigen Gefäßrelaxation auf, die ihrerseits abhängig von NO ist, wie in isometrischen Spannungsmessungen mit dem NOS-Inhibitor L-NAME nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 4-5). Die zusätzliche Inaktivierung des TNF α -Gens in diesen Mäusen führt nicht zu einer Verbesserung der Endothelfunktion (siehe Abbildung 4-24), sodass ein TNF α -unabhängiger Effekt vor dem Hintergrund der chronischen Entzündung zu der beobachteten eDF führen muss. Die unveränderte Kontraktionsfähigkeit der Gefäße dieser Mäuse (siehe Abbildung 4-6) trotz eines geringeren BMI (siehe Abbildung 4-3), sowie das Fehlen einer Dyslipidämie (siehe Abbildung 4-8), weist auf den großen Einfluss nicht-traditioneller Risikofaktoren auf die Entwicklung der beobachteten eDF hin. Ähnliche Beobachtungen können auch bei RA-Patienten bestätigt werden, die in Nachfolgeuntersuchungen eher geringe BMI-Werte und ein vermindertes Vorkommen von Dyslipidämien zeigen¹¹⁶, sowie in der Abwesenheit klassischer Risikofaktoren eine eDF ausbilden¹²³.

Die Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass weder eine veränderte Expression der NO produzierenden Enzyme (siehe Abbildung 4-10), eine Substratverarmung oder Hemmung der eNOS durch ADMA (siehe Abbildung 4-11) die um $\frac{1}{4}$ reduzierte bioaktive NO-Menge (siehe Abbildung 4-9) in den chronisch entzündeten Mäusen erklären kann. Auch nachgeschaltete sGC-Signalwege waren in den Mäusen nicht beeinflusst

(siehe Abbildung 4-7). Die Reduktion der bioaktiven NO-Menge in TTP-defizienten Mäusen konnte auf eine Erhöhung des oxidativen Stresses durch eine verstärkte Nox2-mRNA-Stabilität und –Expression zurückgeführt werden (siehe Abbildung 4-12 bis Abbildung 4-16). Dies wird durch Befunde von RA-Patienten unterstützt, deren Synovialflüssigkeiten höhere RONS-Mengen und Nox-Aktivitäten aufweisen²³⁵. Wie auch in den eigenen Versuchen im TTP-Mausmodell wurden erhöhte Nitrotyrosinmengen als Marker von oxidativem Stress bei RA-Patienten nachgewiesen²³⁶. Nitrotyrosin entsteht unter Einwirkung der reaktiven Stickstoffverbindung Peroxynitrit, welche den für die NO-Synthese wichtigen Cofaktor BH₄ oxidiert²³⁷ und zu einem BH₄-Mangel führt. Sinkt das intrazelluläre molare Verhältnis von eNOS zu BH₄ unter 1, wird die eNOS entkoppelt²³⁸ und produziert nicht mehr NO und Citrullin, sondern Superoxid und Stickstoffmonoxid^{239, 240}, sodass es zu einer verstärkten RONS-Bildung kommt. Die verstärkte RONS-Bildung in TTP-defizienten Mäusen ist überwiegend TNF α -unabhängig, da erhöhte ROS-Level, wenn auch in etwas geringeren Mengen, in den doppeldefizienten Mäusen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 4-25).

5.1.2.3 Regulation der Nox2-mRNA durch TTP

Da sich die PDBu-induzierte ROS-Bildung in TTP^{-/-}-Mäusen als NADPH-oxidaseabhängig zeigte (siehe Abbildung 4-13), wurde der Einfluss von TTP auf die drei wichtigsten in Mausgefäßen vorkommenden Nox-Isoformen untersucht. Die etwa 3,5 fache Erhöhung der Nox2-mRNA in TTP-defizienten Mäusen (siehe Abbildung 4-15), die auch in den doppeldefizienten Mäusen nachweisbar war (siehe Abbildung 4-26), weist auf einen TNF α -unabhängigen Effekt des RNA-BP TTP auf die mRNA-Regulation der Nox2 hin. Da bisher nicht viel über die Regulation der Nox2-Expression bekannt war²⁴¹, wurden initiale Versuche zur posttranskriptionellen Regulation durchgeführt. Die Nox2-mRNA-Stabilität war in Peritonealzellen von TTP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den TTP^{+/+}-Zellen drastisch verlängert (siehe Abbildung 4-16). Die Nox2-3'-UTR enthält viele AREs, die als mögliche Bindestelle von TTP agieren können. In Bindungsanalysen mit der murinen Nox2-3'-UTR an rekombinant hergestelltes TTP konnte jedoch keine direkte Bindung von TTP an die *in vitro* transkribierte Sequenz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-17). Jedoch konnte die direkte Bindung des RNA-BP HuR an die Nox2-3'UTR nachgewiesen werden. TTP und HuR sind zwei RNA-BP, deren Funktionen stark gegensätzlich sind: So konnte für die translationelle Kontrolle der TNF α -mRNA eine kompetitive Bindung von HuR

und TTP, die phosphorylierungsabhängig ist, nachgewiesen werden²⁴². Nach LPS-stimulierter, MK2-abhängiger Phosphorylierung von TTP verschiebt sich das Bindungsäquilibrium zu Gunsten von HuR und es kommt zu einer verstärkten Translation der TNF α -mRNA, währenddessen die Inhibierung von HuR zu einer Akkumulation der TNF α -mRNA-TTP-Komplexe bzw. zum Abbau der TNF α -mRNA führt. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für die Nox2-mRNA denkbar. Möglicherweise bindet TTP an Sequenzen in der 5'-UTR der Nox2-mRNA und steht so in einer Konkurrenz mit HuR, welches mindestens an die AREs der 3'-UTR bindet, sodass es zu einem diffizilen Bindungsgleichgewicht zwischen mRNA-destabilisierenden und -stabilisierenden Faktoren kommt. Ähnliche Effekte konnten für die posttranskriptionelle Regulation der humanen iNOS-mRNA durch das Poly-A-bindende Protein (PABP) gezeigt werden²⁴³. Mutationen der verschiedenen PABP-Bindestellen in der 5'- und 3'-UTR der iNOS-mRNA zeigten einen stabilisierenden Effekt von PABP auf die iNOS-Expression nach Bindung an seine 5'-UTR-Bindestelle, nicht aber nach Bindung an die 3'-UTR. Ob dieses Modell auch die TTP-vermittelte Destabilisierung der Nox2-mRNA erklären kann, muss in weiteren Analysen untersucht werden.

5.1.2.4 Die verstärkte Einwanderung von Makrophagen in TTP^{-/-}-Aorten führt zu einer erhöhten Expression proarteriosklerotischer Markergene

Während einer chronischen Entzündung wie der RA oder AS spielt die Aktivierung der Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Ausprägung einer eDF. In den Aorten der TTP-defizienten Mäuse konnte eine Aktivierung der Endothelzellen über erhöhte mRNA-Mengen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-18 A), die zu einer vermehrten Immunzelleinwanderung in die Intima führen²⁴⁴. Eine erhöhte Einwanderung von Monozyten/Makrophagen in das Aortengewebe konnte in den TTP^{-/-}- im Vergleich zu Wildtypmäusen durch ein vermehrtes Vorkommen des Oberflächenproteins CD68, welches von diesen Zellen exprimiert wird, beobachtet werden (siehe Abbildung 4-18 B). Neben der bekannten TNF α -vermittelten Erhöhung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression²⁴⁵ könnte TTP auch direkten Einfluss auf die VCAM-1-Expression ausüben, da dieses Adhäsionsmolekül in DNA-Microarrayanalysen mit Embryonalfibroblasten von Wildtyp- und TTP-defizienten Mäusen als mögliche TTP-Zielsequenz identifiziert werden konnte²⁴⁶. Durch die Einwanderung der Makrophagen in das Aortengewebe kommt es zu einer erhöhten Expression verschiedener proarteriosklerotischer Markergene (siehe Abbildung 4-19 A), die entweder bekannt für eine erhöhte Entzündungsantwort

(TNF α , Mip-1 α und S100A8) oder Arteriogenese (SPP1 und CTSS) sind. Eine verstärkte TNF α - und Mip-1 α -mRNA-Expression in den TTP-defizienten Mäusen wurde erwartet, da sowohl TNF α als auch Mip-1 α als direkte Zielgene von TTP beschrieben wurden^{23, 217}. Die erhöhten mRNA-Expressionen von S100A8, CTSS und SPP1 spielen auch eine Rolle bei chronischen Entzündungen. In der Synovialflüssigkeit und im Synovium von RA-Patienten konnten erhöhte Mengen sowohl der proinflammatorischen Proteine S100A8, A9 und A12²⁴⁷, als auch von SPP1²⁴⁸ nachgewiesen werden. SPP1 ist unter anderem an der Rekrutierung von Makrophagen beteiligt²⁰⁶ und könnte so die Einwanderung der Makrophagen in die Intima der TTP-defizienten Mäuse positiv beeinflussen. Ebenfalls konnten erhöhte CTSS-Expressionen in makrophagenähnlichen Synoviozyten in rheumatoiden Gelenken²⁴⁹ und auch in humanen arteriosklerotischen Läsionen beobachtet werden²⁵⁰. In den doppeldefizienten Mäusen normalisierte sich die mRNA-Expression von S100A8 und CTSS (siehe Abbildung 4-27), sodass diese Gene anscheinend TNF α -abhängig reguliert werden. Die mRNA-Expressionen von SPP1 und Mip-1 α hingegen waren in den doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu den TTP-defizienten Mäusen nicht verschieden, sodass ein TNF α -unabhängiger Effekt für die Erhöhung der mRNA-Mengen beider Gene anzunehmen ist. Für die Mip-1 α -mRNA wurde bereits eine direkte Interaktion mit TTP beschrieben²¹⁷. Eine mögliche direkte Interaktion von TTP mit der SPP1-mRNA wurde noch nicht untersucht. Eigene initiale mRNA-Stabilitätsexperimente mit Peritonealzellen aus TTP^{-/-}- und TTP^{+/+}-Mäusen zeigten eine signifikante Verlängerung der SPP1-mRNA-Stabilität in TTP-defizienten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Stabilität der SPP1-mRNA kann, wie gezeigt wurde, entweder posttranskriptionell über die Bindung des Elongationstranslationsfaktors 1A1 an die 5'-UTR²⁵¹ oder durch den Einfluss der miRNA-140 auf die 3'-UTR reguliert werden²⁵². Ob der Effekt von TTP auf die SPP1-mRNA daher direkt oder indirekt erfolgt, muss erst noch untersucht werden.

5.1.2.5 Hämostatische Veränderungen in TTP^{-/-}-Mäusen

Neben der verstärkten Expression proarteriosklerotischer Markergene waren in den Aorten der TTP-defizienten Mäuse auch einige mRNAs prothrombotischer Gene (TF, vWF und FVIII) vermehrt exprimiert (siehe Abbildung 4-19 B). Derzeit ist noch nicht viel über den Einfluss von TTP auf Thrombosen oder die Blutgerinnung bekannt. Jedoch wurde bisher die direkte Bindung von TTP an zwei wichtige prothrombotische Komponenten beschrieben: TTP destabilisiert die mRNA des thrombinaktivierten Fi-

brinolyseinhibitors (TAFI)²⁵³ und die Plasminogenaktivatorinhibitor-2 (PAI-2)-mRNA²⁵⁴. Erhöhte PAI-Level (PAI-Aktivität, PAI-1- und PAI-2-Mengen) regulieren positiv die Expression des Endothelzellaktivierungsmarkers vWF^{255, 256}. In Patienten mit einer tiefen Beinvenenthrombose korrelieren hohe TAFI-Spiegel mit hohen FVIII-Leveln²⁵⁷ und auch Patienten mit einer venösen Thromboembolie weisen hohe TAFI-Spiegel mit gleichzeitiger Erhöhung der Plasmamengen der Koagulationsfaktoren XI, VIII und IX auf²⁵⁸. In Mäusen erhöht sich die TAFI-Expression etwa 24 Stunden nach LPS-Behandlung über einen TNF α -abhängigen Weg nach Translokation des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF κ B) in den Nukleus²⁵⁹. Die Stimulation von Monozyten mit LPS bzw. die Stimulation von Endothelzellen und Monozyten mit TNF α und anderen Zytokinen führt zu einer verstärkten TF-Expression auf diesen Zellen²⁶⁰⁻²⁶². Diese Befunde weisen auf eine Regulation der in TTP-defizienten Mäusen verstärkt exprimierten Markergene vWF, TF und FVIII durch die mRNA-Stabilisierung der Regulatoren PAI-2 und TAFI hin.

Die Regulation der Blutgerinnung während Entzündungsprozessen spielt eine große Rolle. Die hierbei greifenden Mechanismen der Koagulationskaskade lassen sich dem extrinsischen und intrinsischen Weg zuordnen. Diese Wege führen über die Aktivierung von Thrombin zu einer Spaltung von Fibrinogen in das unlösliche Fibrin und somit zur Blutgerinnselbildung und sind stark von TNF α abhängig^{263, 264}. Überraschenderweise neigen TTP^{-/-}-Mäuse, die verstärkt TNF α exprimieren, jedoch nicht zu einer verstärkten Thrombose, sondern weisen stark verlängerte Schwanzvenen- und intrinsische Blutungszeiten auf (siehe Abbildung 4-20). Die Expressionen der an der intrinsischen Gerinnungskaskade beteiligten Faktoren (FVIII-XII) in Lebern der TTP^{-/-}-Mäuse ist im Vergleich zu Wildtyptieren dabei dennoch nicht verändert (siehe Abbildung 4-21). Diese Ergebnisse deuten eher auf eine veränderte Aktivität dieser Faktoren in TTP-defizienten Mäusen hin. Bisher ist fast nichts über die Regulation der Blutgerinnung durch TTP bekannt. Jedoch könnte die erhöhte Menge an Granulozytenelastasen in TTP-defizienten Mäusen, die an einer massiven Granulopoese leiden²⁰⁸, zu einer inaktivierenden Spaltung von FIX führen²⁰⁹. In Folge kann es zu einer verringerten Koagulationskapazität über den intrinsischen Weg und damit zu verlängerten Blutungszeiten kommen. Erhöhte Mengen an neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 4-23 A) konnte in den TTP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen nachgewiesen werden, ob jedoch erhöhte Elastasevorkommen zu einer Inaktivierung des FIX führen, muss erst in weiteren Analysen untersucht werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz der verlängerten Blutung in TTP-defizienten Mäusen könnte das Auftreten einer Verbrauchskoagulopathie (disseminierte intravaskuläre Blutgerinnung (DIC)) sein, welche eine bekannte Komplikation verschiedener klinischer Bedingungen wie infektiösen Erkrankungen mit Sepsis ist. Während einer DIC kommt es durch massive intravaskuläre Mikroblutungen zu einem Verbrauch aller verfügbaren Koagulationsfaktoren. Durch diesen Verbrauch bedingt, leiden betroffene Patienten²⁶⁵ und Labortiere an verlängerten Blutungszeiten^{266, 267}. Initiale Untersuchungen der D-Dimermengen im Serum, einem Abbauprodukt von verbundenen Fibrinfasern, welcher als Marker für eine DIC gilt²⁶⁸, zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen TTP-defizienten und Wildtypmäusen (Daten nicht gezeigt), sodass die verlängerte Blutgerinnung in diesen Mäusen wahrscheinlich nicht mit einer DIC assoziiert ist.

Die zusätzliche Inaktivierung des TNF α -Gens in TTP-defizienten Mäusen führte zu einer Verringerung der intrinsischen Blutgerinnungszeit, sowie einer leichten Reduktion der Schwanzvenenblutungszeit im Vergleich zu TTP^{-/-}-Mäusen (siehe Abbildung 4-28). Auch die TNF α -defizienten Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyptieren eine verringerte Schwanzvenenblutungszeit auf. Diese Ergebnisse scheinen zunächst sehr kontrovers zu sein, da Zytokine wie TNF α gerinnungsfördernd wirken können²⁶⁹. Jedoch konnte in Mäusen, die systemisch mit TNF α behandelt wurden, gezeigt werden, dass unter sepsisähnlichen Bedingungen TNF α die Plättchenaktivierung und die Thrombusbildung verringert und so zu verlängerten Blutungszeiten in diesen Mäusen führt²⁷⁰. Möglicherweise können in den während der Durchführung dieser Doktorarbeit genutzten TNF α -defizienten Mäuse diese antithrombotischen Mechanismen nicht mehr greifen, sodass das Auftreten des beobachteten prothrombotischen Phänotyps begünstigt wird.

5.2 Untersuchung der Wirkung organischer Nitrate auf oxidativen Stress im Diabetesmodell

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Schlüsselfaktor für die reduzierte vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit, die bei Diabetespatienten beobachtet wird²⁷¹. Die Ausbildung einer eDF in diesen Patienten wird daher als ein frühes Symptom dieser Erkrankung angesehen²⁰¹. In einem streptozotocininduzierten Diabetes- bzw. Hyperglykämiemodell in der Ratte konnte gezeigt werden, dass das antioxidative Stressgen HO-1 als Gegenregulation während einer Diabeteserkrankung induziert wird^{272, 273}. Das organische Nitrat PETN, das im Gegensatz zu anderen organischen Nitraten wie ISMN keine Ausbildung einer Nitrattoleranz bei Koronararterienerkrankungen zur Folge hat, erhöht die Expression der HO-1^{274, 275}. Diese Induktion der HO-1 ist auf eine erhöhte Promotoraktivität nach PETN-, aber nicht nach ISMN-Behandlung zurückzuführen²¹² (siehe Abbildung 4-29). Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf die Ursache des verbesserten Behandlungsprofils bei einer chronischen Behandlung mit PETN²⁷⁶. Da die Regulation der HO-1 über antioxidansresponsive Elemente mit Hilfe des Keap1-Nrf2-Signalweges erfolgt^{138, 277}, wurde die Rolle von Nrf2 für die PETN-abhängige HO-1-Promotorinduktion untersucht. Der fördernde Effekt von PETN auf die Induktion des HO-1-Promotors wurde nach Inhibierung des Nrf2 durch spezifische siRNAs verhindert (siehe Abbildung 4-31). Diese Versuche zeigen, dass die HO-1-Induktion durch PETN über den Transkriptionsfaktor Nrf2 vermittelt wird. Die derartige Wirkung von PETN als Aktivator intrinsischer, antioxidativer Signalwege macht diese Substanz zu einem interessanten Therapeutikum bei kardiovaskulären Komplikationen. Neben der Induktion der HO-1 besitzt PETN unter anderem die Kapazität, die vaskuläre extrazelluläre SOD und andere kardioprotektive Gene zu induzieren^{278, 279}. Außerdem verbessert die Gabe von PETN eine Angiotensin II-abhängige endotheliale Dysfunktion²⁸⁰, sowie die Endothelfunktion bei einer bereits bestehenden AS²⁸¹.

5.3 Analyse der antiarteriothrombotischen Effekte von Galiellalacton in murinen Arteriosklerosemodellen

In Studien konnte gezeigt werden, dass das thrombotische Risiko in Patienten durch die vaskuläre Expression von pro- und antithrombotischen Faktoren reguliert ist und dass die Expression von TF eine wichtige Rolle dabei einnimmt^{282, 283}. Die Aktivität des TF in humanen arteriosklerotischen Plaques kann durch die Präsenz des Inhibitors TFPI verringert werden²⁸⁴. Um den Einfluss dieser Balance zwischen TF und TFPI auf den proarteriosklerotischen Phänotyp zu untersuchen und das antiarteriothrombotische Potential des Pilzmetaboliten Gal zu analysieren, wurden während dieser Doktorarbeit ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse genutzt.

5.3.1 Charakterisierung der ApoE^{-/-} - und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse

5.3.1.1 TFPI-abhängige hämostatische Veränderungen

Eine erste Charakterisierung der Mäuse ergab einen leicht verstärkten proarteriothrombotischen Phänotyp in den ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den konventionell für derartige Versuche eingesetzten ApoE^{-/-}-Mäusen nach Krankheitsinduktion durch 30 wöchige Fütterung mit WD. Dies ließ sich jedoch nach einer 14-wöchigen Fütterung der Mäuse nicht feststellen (siehe Abbildung 4-32). Dieser Phänotyp ließ sich durch verringerte Schwanzvenenblutungszeiten (siehe Abbildung 4-33) und aPTT-Werte (siehe Abbildung 4-34), sowie durch eine leicht erhöhte Plaquebildung (siehe Abbildung 4-35) in diesen Mäusen nachweisen. Der erhöhte Anteil an arteriosklerotischen Läsionen in den TFPI-heterozygoten Mäusen wurde erwartet, da zum Einen in der Erstbeschreibung der Mäuse durch Dr. Eitzman mehr arteriosklerotische Plaques in den Aorten der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse nachgewiesen werden konnten¹⁸² und zum Anderen in Analysen in ApoE^{-/-}-Mäusen, deren glatte Muskelzellen TFPI überexprimierten, verringerte Läsionsflächen detektiert wurden²⁸⁵. In TFPI-überexprimierenden Mäusen konnten, trotz der erwarteten hämostatischen Veränderungen, keine verlängerten Blutungszeiten nachgewiesen werden²⁸⁶. Und auch die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten TFPI-heterozygoten Mäuse zeigten im Vergleich mit ApoE^{-/-}-Mäusen nach einer Langzeitfütterung mit WD für 30 Wochen lediglich tendenziell verringerte Schwanzvenenblutungszeiten und aPTT-Werte, jedoch keine Veränderung in den extrinsischen Gerinnungszeiten (PT-Wert).

5.3.1.2 TFPI-abhängige Plättchenadhäsion an Läsionen der Karotisarterie

In Untersuchungen der Dynamik der Plättchen-Gefäßwand-Interaktion mittels Intravitalmikroskopie zeigte sich eine Erhöhung der Plättcheninteraktion mit den Endothelzellen in TFPI-heterozygoten Mäusen (siehe Abbildung 4-36 A). ApoE-defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyptieren eine verringerte Plättchen-Endothelzell-Interaktion auf. Durch die zusätzliche heterozygote Inaktivierung des TFPI erhöhte sich diese jedoch wieder auf das Niveau der Wildtypiere. Nach Induktion des proarteriosklerotischen Phänotyps durch WD zeigte sich in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten²⁸⁷ in ApoE^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Adhäsion von Plättchen an die Läsionsstelle (siehe Abbildung 4-36 B). Dieser Effekt konnte unerwarteter Weise jedoch nicht in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen nach Induktion des proarteriosklerotischen Phänotyps durch die WD-Fütterung beobachtet werden. Ein Anstieg der Plättchenadhäsion an die Läsionsstelle wäre zumindest in gleichem Rahmen wie bei den ApoE^{-/-}-Mäusen erwartet worden, da durch die Fütterung dieser Mäuse mit fettreicher Diät das arteriothrombotische Risiko steigt. Es konnte gezeigt werden, dass Versuchstiere nach Fütterung mit WD eine verstärkte TF-mRNA-Expression in LPS-stimulierten Monozyten aufwiesen²⁸⁸. In den TFPI-heterozygoten Mäusen hätte eine solche Erhöhung auf Grund der verringerten Menge des natürlichen Inhibitors einen viel drastischeren Effekt auf die Thrombozytenadhäsion haben sollen, als in den ApoE-defizienten Mäusen. Auch in humanen arteriosklerotischen Plaques korreliert die Menge an TFPI invers mit der TF-Aktivität²⁸⁴, sodass in den TFPI-heterozygoten Mäusen von einer verstärkten TF-Aktivität ausgegangen werden konnte, deren Einfluss durch die WD-Fütterung und die damit verbundene erhöhte Plaquebildung noch zunehmen hätte sollen. Andererseits ist die Rolle der TF-vermittelten Plättchenadhäsion in dem genutzten Ansatz fraglich. Während der Ligation der Carotisarterie wird die subendotheliale Matrix freigelegt, die eine anschließende Adhäsion und Aggregation der gefärbten Spenderplättchen zur Folge hat. Unterschiedliche Komponenten des subendothelialen Raumes wie zum Beispiel vWF, Fibronectin oder der Plättchenkollagenrezeptor Glykoprotein VI (GPVI) können diese Adhäsion begünstigen. Durch Inhibierung des GPVI durch einen monoklonalen Antikörper bzw. in GPVI-defizienten Mäusen konnte die Adhäsion und Aggregation von Plättchen in einem ähnlichen Versuchsaufbau verhindert werden²⁸⁹. Diese Ergebnisse zeigen, dass in dem genutzten Modell der Carotisarterienverletzung die Plättchen-Kollageninteraktion eine wichtige Rolle einnimmt. Eventuell ist daher die Analyse mit-

tels IVM nicht dafür geeignet gewesen, den Einfluss der TFPI-Heterozygotie auf die Plättchenadhäsion zu untersuchen.

5.3.1.3 TFPI-abhängige Veränderung der Endothelfunktion

Es ist bekannt, dass ApoE-defizienten Mäuse nach Fütterung mit WD eine schlechtere Endothelrelaxation nach Acetylcholingabe zeigen, als Wildtypiere oder ApoE^{-/-}-Mäuse, die mit einer Standarddiät gefüttert wurden²⁹⁰. Diese Befunde ließen sich überraschender Weise jedoch nicht in den eigenen Untersuchungen bestätigen. Es zeigte sich, dass ApoE-defiziente Mäuse, die für 18 Wochen mit WD gefüttert wurden, eine bessere Gefäßrelaxation aufwiesen, als die Tiere gleichen Genotyps, die mit Normalfutter behandelt wurden (siehe Abbildung 4-37). Auch in den TFPI-heterozygoten ApoE-defizienten Mäusen zeigte sich ein ähnliches Bild: Nach Fütterung der Mäuse mit WD zeigte sich keine Verschlechterung der acetylcholinabhängigen Refäßrelaxation im Vergleich zu den mit ND gefütterten Mäusen des gleichen Genotyps. Überraschender Weise spielte jedoch die TFPI-Heterozygotie nach WD-Fütterung eine Rolle in der Relaxationsfähigkeit der Gefäße. Im Vergleich zwischen den mit WD gefütterten ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen zeigten die TFPI-haploiden Tiere eine stark verschlechterte Relaxation der Gefäße nach Acetylcholingabe. Dies könnte durch eine Reduktion des endothelzellosoziierten TFPI durch z.B. Bindung an oxidiertes LDL im Rahmen einer eDF hervorgerufen werden^{291, 292}. Dieser Verdacht könnte auch die verschlechterte Endothelfunktion in den mit WD gefütterten ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Tieren erklären. Jedoch sind weitere Versuche nötig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

5.3.2 Test des Galiellalactons in der Zellkultur

Der während der Durchführung dieser Doktorarbeit für die Behandlung der AT genutzte Pilzsekundärmetabolit Gal wurde in verschiedenen Vorversuchen auf sein antientzündliches Potential hin untersucht: Hausding *et. al.* zeigten eine verringerte IL6-Sekretion in einem Modell des murinen Asthmas nach intra-nasaler Verabreichung von Gal und somit eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes¹⁶⁹. Auch in einem akuten Entzündungsmodell konnte Gal die Expression verschiedenen proinflammatorischer Mediatoren wie TNF α , IL1 β , iNOS oder S100A8 verringern²⁹³. Gal verringerte in HepG2-Zellen über die Blockade der Stat3-Dimerbindung an die jeweiligen DNA-Bindesequenzen den IL6 abhängigen Signalweg¹⁶⁸. Daher wurde die mRNA-Expression verschiedener, entweder direkt an diesem Signalweg beteiligter oder indi-

rekt über den NFκB-Signalweg regulierter Gene zum Test von Gal in der Zellkultur untersucht. Die Zielgene des Stat3- und NFκB-Signalweges überlappen größtenteils und werden oft additiv oder synergistisch durch Stat3 oder NFκB aktiviert²⁹⁴. Die präventive Gal-Behandlung führte im Vergleich zu der Kontrollgruppe (stimulierte Zellen) in humanen (MM6) und murinen (RAW) Monozyten/Makrophagen zu einem signifikanten (Cox-2 und iNOS) oder tendenziellen (IL6 und TNFα) Abfall der mRNA-Expression dieser Gene (siehe Abbildung 4-38). Die nur tendenziell reduzierte mRNA-Expression von IL6 lässt sich im Vergleich zu den bisher erhobenen Daten durch eine geringere Gal-Konzentration in den eigenen Versuchen (1 mM vs. 2,5 mM), sowie eine geringere Versuchsdauer (1 h vs. 2 h) erklären¹⁶⁹. Zusammengefasst zeigt Gal in den Zellkulturexperimenten ein breites antientzündliches Potenzial durch Hemmung des proinflammatorischen NFκB/Stat3-Signalweges.

5.3.3 Behandlung der ApoE^{-/-} - und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse mit Gal

Neue, antientzündliche Medikamente könnten den Verlauf einer AS abschwächen und so die im Endstadium auftretende Thrombose zeitlich verschieben. In den zwei genutzten Mausmodellen wurde zunächst der Einfluss von Gal auf die Plättchenadhäsion an ein verletztes Endothel untersucht, da somit im Laufe einer AT das Auftreten von Gefäßokklusionen verhindert oder vermindert werden könnte. Gal wies in den konventionell für AS-Untersuchungen genutzten ApoE^{-/-}-Mäusen einen negativen Effekt auf die Plättchen-Endothelzell-Interaktion (siehe Abbildung 4-39) auf. Gal verhindert die proarteriosklerotische Erhöhung der Plättchenadhäsion an die Läsionsstelle. In ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen, die für 6 Wochen mit Gal behandelt worden waren, konnte die Plättchenadhäsion an das verletzte Endothel im Vergleich zu der Kontrollgruppe tendenziell verringert werden. Da jedoch in diesen Mäusen keine WD-induzierte Verstärkung der Plättchenadhäsion zu beobachten war (siehe Abbildung 4-36 B), lässt sich dieser Effekt des antientzündlichen Pilzsekundärmetaboliten nicht genau einordnen.

Die Behandlung der Mäuse mit Gal konnte jedoch nicht ein frühes Symptom der AS, die eDF, positiv beeinflussen, denn durch die Behandlung der Mäuse mit Gal verschlechterte sich die Endothelfunktion verglichen mit der Gefäßrelaxation der Kontrollgruppe des selben Genotyps leicht in ApoE-defizienten Mäusen bzw. drastisch in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen (siehe Abbildung 4-40). Die Gefäße der Mäuse, die mit Gal behandelt wurden, reagierten schlechter auf Acetylcholin als die der Mäuse, die mit dem Lösungsmittel behandelt worden waren. Scheinbar verändert Gal die Gefäß-

funktion der Mäuse. Ob diese Effekte NO-vermittelt sind oder welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, muss erst in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Die Behandlung der Mäuse mit Gal zeigte keinen Effekt auf die Blutgerinnung der ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse, da sich die Schwanzvenenblutungszeiten dieser Mäuse im Vergleich zwischen Gal- und Lösungsmittelbehandlung nicht unterschieden. Interessanter Weise konnte bei der Untersuchung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade leichte Verlängerungen in der Gerinnungszeit der Seren nach Gal-Behandlung festgestellt werden (siehe Abbildung 4-42). Hierbei schien Gal Effekte auf beide Wege zu haben, da sich sowohl in der aPTT- und PT-Messung Unterschiede zeigten. Die Mäuse, die mit dem Pilzsekundärmetaboliten behandelt wurden, könnten daher eine tendenziell verlängerte Blutung und somit ein leicht verringertes Thromboserisiko besitzen. Bisher ist noch nichts über die Wirkung von Gal auf die Gerinnungskaskaden bekannt, sodass die erhobenen Daten verifiziert und der Mechanismus in weiteren Analysen untersucht werden sollte. Trotz der Hemmung der Blutgerinnung zeigte Gal keine Effekte auf die mRNA-Expression der untersuchten prothrombotischen Markergene (FVIII, TF, vWF), die maßgeblich an der Thrombusbildung beteiligt sind²⁹⁵. Jedoch führte die Behandlung der Mäuse mit dem Metaboliten zu verringerten Expressionen der proinflammatorischen und –arteriosklerotischen mRNAs sowohl in ApoE^{-/-}- als auch in ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäusen. Auf Grund dieser Untersuchungen ist es denkbar, dass die Gal-Gabe den Arterioskleroseverlauf in den zwei genutzten Tiermodellen verringern könnte: Die Endothelzellen in den Mäusen sind, wie durch Messung der mRNA-Reduktion der Adhäsionsmarker VCAM-1 und ICAM-1 bestätigt werden konnte, durch die Behandlung der Tiere mit Gal weniger aktiviert. Dies führt zu einer dezimierten Immunzelleinwanderung in das Aortengewebe dieser Mäuse²⁴⁴. Die verminderte Einwanderung von Immunzellen führt lokal zu einer verringerten Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF α oder S100A8. Murines S100A8 rekrutiert in starkem Maße periphere Monozyten und Neutrophile²⁹⁶ und zusammen mit seinem Bindepartner S100A9 reguliert es MAPK-abhängig die transendotheliale Phagozytenmigration²⁹⁷. Es wurde beschrieben, dass nach S100A8-Stimulus differenzierte Makrophagen einen pro-atherogenen Phänotyp zeigen, sowie über die Scavengerrezeptoren acetyliertes LDL binden können und ein Lipidprofil aufweisen, dass denen in humanen arteriosklerotischen Plaques ähnelt²⁹⁸. Die verringerte Expression der proinflammatorischen Markergene hat daher wahrscheinlich über eine verringerte Entzündung wiederum eine geringere

Migration von Leukozyten in das Gefäß zu Folge und könnte so das Arteriothromboserisiko in diesen Mäusen senken. Diesen Effekt kann auch die Reduktion des Serumverkalkungsmarkers SPP1 in den behandelten Mäusen unterstützen (siehe Abbildung 4-44 B). In Studien mit Patienten, die Karotisstentimplantate bekommen hatten, korrelierte eine verringerte Expression von Verkalkungsmarkern wie SPP1 mit einer erhöhten Plaquestabilität²⁹⁹. Die Reduktion der endogenen Proteinase CTSS durch Behandlung mit Gal, welche eine große Rolle bei der Ruptur arteriosklerotischer Plaques spielt³⁰⁰, könnte ebenfalls das Voranschreiten einer AS mindern, wie in CTSS-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, deren arteriosklerotische Läsionen weniger nekrotische Kerne durch verringerte Apoptose und eine geringere Einwanderung von glatten Muskelzellen in das arteriosklerotische Plaquegewebe aufwiesen³⁰¹. Eine verminderte mRNA-Expression der Markergene IL6 und iNOS wurde auf Grund der Vorversuche in der Zellkultur erwartet und konnte sich zum Teil auch in den Mausmodellen wiederfinden. Zusammengefasst scheint der Pilzsekundärmetabolit Gal dazu in der Lage zu sein, in den zwei verwendeten Tiermodellen der AS den Krankheitsverlauf über Senken der Plättchenendothelzellinteraktion und eine verringerte Markergenexpression zu beeinflussen und könnte eine vielversprechende neue Leitsubstanz für die AS-Behandlung sein.

6 Zusammenfassung

Erhöhte arteriosklerotische und thrombotische Vorfälle sind ein Hauptgrund für die gesteigerten Zahlen kardiovaskulärer Todesfälle von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA). Diese erhöhte Mortalität ist nicht auf die traditionellen Risikofaktoren, wie Alter, Geschlecht, Bluthochdruck oder Diabetes zurückzuführen. Man nimmt an, dass die systemische Entzündung einen nicht-traditionellen Risikofaktor für die erhöhten kardiovaskulären Todesfälle von RA-Patienten darstellt. Da die derzeitige Behandlung der RA zum Teil schwere Nebenwirkungen zur Folge haben kann, war es das Ziel dieser Doktorarbeit, die Zusammenhänge zwischen RA und Arteriosklerose (AS) näher zu untersuchen, sowie die neue antiinflammatorische Substanz Galiellalacton (Gal) für die Behandlung der AS zu charakterisieren.

In dem chronisch inflammatorischen Tiermodell der TTP-defizienten Mäuse, dessen Phänotyp dem einer humanen RA-Erkrankung ähnelt, konnte eine verschlechterte Endothelfunktion, die als ein erstes Symptom einer erworbenen AS gilt, nachgewiesen werden. Dies konnte auf eine erhöhte Stabilität der Nox2-mRNA zurückgeführt werden, die unabhängig von der erhöhten Expression des Entzündungsmarkers TNF α war. Diese gesteigerte Nox2-Menge führte wiederum zu einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies und somit zu einer verringerten Menge an bioaktivem Stickstoffmonoxid, welches die endotheliale Dysfunktion (eDF) bedingte.

Als ein traditioneller Risikofaktor für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen gilt unter anderem eine Diabeteserkrankung. Durch die Ausbildung einer Nitrattoleranz bei der Therapie mit organischen Nitraten wie NTG, ISMN oder ISDN kommt es zu der Entwicklung einer eDF. PETN, ein weiteres organisches Nitrat zeigt diese Nebenwirkung nicht. PETN, vermittelt seinen antioxidativen Effekt über die Nrf2-abhängige Induktion der HO-1-Promotoraktivität.

Die Behandlung von arteriosklerotischen Mäusen (ApoE^{-/-}- und ApoE^{-/-}TFPI^{+/-}-Mäuse) mit dem antiinflammatorischen Pilzsekundärmetaboliten Gal zeigte eine verringerte mRNA-Expression von arteriosklerotischen und inflammatorischen Mediatoren, sowie eine reduzierte Thrombenbildung durch eine verringerte Plättchenadhäsion.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass inflammationsabhängiger oxidativer Stress ein Hauptgrund für die entzündungsgetriebene Arteriogenese ist und Gal eine neue Leitsubstanz für die Behandlung dieser Erkrankung ist.

7 Abstract

Atherosclerotic events are one of the major risk factors for cardiovascular death in patients suffering from chronic inflammatory diseases as rheumatoid arthritis (RA). This elevated mortality is independent of the traditional risk factors, as age, gender, hypertension, or diabetes. So far, it is believed that the systemic inflammation confers a non-traditional risk factor for the cardiovascular morbidity of RA-patients. Since the current treatment can have severe side effects, the aim of this study was to analyse the correlation between RA and atherosclerosis (AS), as well as to characterise the new anti-inflammatory fungal substance Galiellalactone (Gal) for the treatment of AS.

In the chronic inflammatory TTP deficient mouse model that resembles the human RA, the endothelial function is impaired, which is known to be a first symptom of a beginning AS. This correlates with an increased Nox2 mRNA stability that is independent of the augmented TNF α expression. The amplified Nox2 amount leads to increased levels of reactive oxygen and nitrogen species, in turn indicating decreased amounts of bioactive NO that attributes to the endothelial dysfunction (eDF). One traditional risk factor for cardiovascular death is diabetes. The therapy with organic nitrates results in the development of a nitrate tolerance-induced eDF. PETN, another organic nitrate, does not have this adverse effect. PETN mediates its anti-oxidative effects *via* an Nrf2-dependent induction of the HO-1 promoter activity. The treatment of atherosclerotic-prone mice (ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-}TFPI^{+/-} mice) with the anti-inflammatory fungal metabolite Gal decreases the mRNA expression of atherosclerotic and inflammatory marker genes and reduces the thrombus formation due to an impaired platelet adhesion.

In summary, the inflammation-related oxidative stress is a principal reason for inflammation-driven atherogenesis. Furthermore Gal is a promising new leading substance for the treatment of AS.

Literaturverzeichnis

1. Lifton RP, Goldberg ML, Karp RW, Hogness DS. The organization of the histone genes in drosophila melanogaster: Functional and evolutionary implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1978;42 Pt 2:1047-1051
2. Dynan WS, Saffer JD, Lee WS, Tjian R. Transcription factor sp1 recognizes promoter sequences from the monkey genome that are simian virus 40 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:4915-4919
3. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-amp-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:6682-6686
4. McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell.* 1986;46:795-805
5. Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH. New core promoter element in rna polymerase ii-dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor iib. *Genes Dev.* 1998;12:34-44
6. Gruter P, Taberero C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E. Tap, the human homolog of mex67p, mediates cte-dependent rna export from the nucleus. *Mol Cell.* 1998;1:649-659
7. Bollmann F, Fehir K, Nowag S, Koch K, Art J, Kleinert H, Pautz A. Human inducible nitric oxide synthase (inos) expression depends on chromosome region maintenance 1 (crm1)- and eukaryotic translation initiation factor 4e (elf4e)-mediated nucleocytoplasmic mrna transport. *Nitric Oxide.* 2013;30:49-59
8. Wu X, Brewer G. The regulation of mrna stability in mammalian cells: 2.0. *Gene.* 2012;500:10-21
9. Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB. Concerted action of poly(a) nucleases and decapping enzyme in mammalian mrna turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:1054-1063
10. Fenger-Gron M, Fillman C, Norrild B, Lykke-Andersen J. Multiple processing body factors and the are binding protein ttp activate mrna decapping. *Mol Cell.* 2005;20:905-915
11. Yang F, Peng Y, Schoenberg DR. Endonuclease-mediated mrna decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (pmr1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mrna. *J Biol Chem.* 2004;279:48993-49002
12. Bracken CP, Szubert JM, Mercer TR, Dinger ME, Thomson DW, Mattick JS, Michael MZ, Goodall GJ. Global analysis of the mammalian rna degradome reveals widespread mirna-dependent and mirna-independent endonucleolytic cleavage. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:5658-5668
13. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. Microrna-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian p-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005;7:719-723
14. Chen CY, Shyu AB. Au-rich elements: Characterization and importance in mrna degradation. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:465-470
15. Peng SS, Chen CY, Shyu AB. Functional characterization of a non-auuua au-rich element from the c-jun proto-oncogene mrna: Evidence for a novel class of au-rich elements. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1490-1499

16. Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:1670-1674
17. Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blakeshear PJ. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4311-4323
18. DeMaria CT, Brewer G. AU1 binding affinity to AU-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem*. 1996;271:12179-12184
19. Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, Chen CY. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell*. 2004;14:571-583
20. Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HUR, a ubiquitously expressed ELAV-like protein. *J Biol Chem*. 1996;271:8144-8151
21. Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Krusys V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *EMBO J*. 2000;19:4154-4163
22. Liu RY, Fan C, Liu G, Olashaw NE, Zuckerman KS. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor- α -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *J Biol Chem*. 2000;275:21086-21093
23. Taylor GA, Carballo E, Lee DM, Lai WS, Thompson MJ, Patel DD, Schenkman DI, Gilkeson GS, Broxmeyer HE, Haynes BF, Blakeshear PJ. A pathogenetic role for TNF- α in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*. 1996;4:445-454
24. DuBois RN, McLane MW, Ryder K, Lau LF, Nathans D. A growth factor-inducible nuclear protein with a novel cysteine/histidine repetitive sequence. *J Biol Chem*. 1990;265:19185-19191
25. Lai WS, Stumpo DJ, Blakeshear PJ. Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J Biol Chem*. 1990;265:16556-16563
26. Carballo E, Lai WS, Blakeshear PJ. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science*. 1998;281:1001-1005
27. Varnum BC, Ma QF, Chi TH, Fletcher B, Herschman HR. The TIS11 primary response gene is a member of a gene family that encodes proteins with a highly conserved sequence containing an unusual CYS-HIS repeat. *Mol Cell Biol*. 1991;11:1754-1758
28. Blakeshear PJ, Phillips RS, Ghosh S, Ramos SB, Richfield EK, Lai WS. Zfp3613, a rodent X chromosome gene encoding a placenta-specific member of the tristetraprolin family of CCH tandem zinc finger proteins. *Biol Reprod*. 2005;73:297-307
29. Lai WS, Parker JS, Grissom SF, Stumpo DJ, Blakeshear PJ. Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2006;26:9196-9208
30. Brooks SA, Connolly JE, Rigby WF. The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: Evidence for an extracellular signal-

- regulated kinase-specific, au-rich element-dependent, autoregulatory pathway. *J Immunol.* 2004;172:7263-7271
31. Tchen CR, Brook M, Saklatvala J, Clark AR. The stability of tristetraprolin mrna is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraprolin itself. *J Biol Chem.* 2004;279:32393-32400
 32. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ. Interactions of ccch zinc finger proteins with mrna: Non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of au-rich element-containing mRNAs. *J Biol Chem.* 2002;277:9606-9613
 33. Cao H, Dzineku F, Blackshear PJ. Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor- α mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Arch Biochem Biophys.* 2003;412:106-120
 34. Cao H, Lin R. Phosphorylation of recombinant tristetraprolin in vitro. *Protein J.* 2008;27:163-169
 35. Gaestel M. Mapk kinases - mks - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:120-130
 36. Chrestensen CA, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Pelo JW, Worthington MT, Sturgill TW. Mapk kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Biol Chem.* 2004;279:10176-10184
 37. Rigby WF, Roy K, Collins J, Rigby S, Connolly JE, Bloch DB, Brooks SA. Structure/function analysis of tristetraprolin (ttp): P38 stress-activated protein kinase and lipopolysaccharide stimulation do not alter ttp function. *J Immunol.* 2005;174:7883-7893
 38. Clement SL, Scheckel C, Stoecklin G, Lykke-Andersen J. Phosphorylation of tristetraprolin by mk2 impairs au-rich element mRNA decay by preventing deadenylase recruitment. *Mol Cell Biol.* 2011;31:256-266
 39. Brook M, Tchen CR, Santalucia T, McIlrath J, Arthur JS, Saklatvala J, Clark AR. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2408-2418
 40. Hitti E, Iakovleva T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A, Gaestel M. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol.* 2006;26:2399-2407
 41. Johnson BA, Stehn JR, Yaffe MB, Blackwell TK. Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2002;277:18029-18036
 42. Sun L, Stoecklin G, Van Way S, Hinkovska-Galcheva V, Guo RF, Anderson P, Shanley TP. Tristetraprolin (ttp)-14-3-3 complex formation protects ttp from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor- α mRNA. *J Biol Chem.* 2007;282:3766-3777
 43. Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA, Blackshear PJ. Interactions of ccch zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to au-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem.* 2000;275:17827-17837
 44. Deleault KM, Skinner SJ, Brooks SA. Tristetraprolin regulates TNF mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol Immunol.* 2008;45:13-24

45. Lai WS, Kennington EA, Blackshear PJ. Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of au-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol.* 2003;23:3798-3812
46. Sanduja S, Blanco FF, Young LE, Kaza V, Dixon DA. The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Front Biosci.* 2012;17:174-188
47. Franks TM, Lykke-Andersen J. Ttp and bfl1 proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* 2007;21:719-735
48. Anderson P, Kedersha N. Stress granules: The tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci.* 2008;33:141-150
49. Murata T, Morita N, Hikita K, Kiuchi K, Kaneda N. Recruitment of mRNA destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain. *Exp Cell Res.* 2005;303:287-299
50. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 2005;169:871-884
51. Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell.* 2001;107:451-464
52. Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J. Involvement of miRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell.* 2005;120:623-634
53. Lopez de Silanes I, Quesada MP, Esteller M. Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol.* 2007;29:1-17
54. Kanyes CL, Smith JJ, Kis C, Schmidt C, Levy S, Khabar KS, Morrow J, Deane N, Dixon DA, Beauchamp RD. Oncogenic Ras and transforming growth factor- β synergistically regulate AU-rich element-containing mRNAs during epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1124-1136
55. Young LE, Sanduja S, Bemis-Standoli K, Pena EA, Price RL, Dixon DA. The mRNA binding proteins HUR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2009;136:1669-1679
56. Brooks SA, Connolly JE, Diegel RJ, Fava RA, Rigby WF. Analysis of the function, expression, and subcellular distribution of human tristetraprolin. *Arthritis Rheum.* 2002;46:1362-1370
57. Bollmann F, Wu Z, Oelze M, Siuda D, Xia N, Henke J, Daiber A, Li H, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Kleinert H, Pautz A. Endothelial dysfunction in tristetraprolin-deficient mice is not caused by enhanced TNF- α expression. *J Biol Chem.* 2014
58. Patino WD, Kang JG, Matoba S, Mian OY, Gochuico BR, Hwang PM. Atherosclerotic plaque macrophage transcriptional regulators are expressed in blood and modulated by tristetraprolin. *Circ Res.* 2006;98:1282-1289
59. Tsutsumi A, Suzuki E, Adachi Y, Murata H, Goto D, Kojo S, Matsumoto I, Zhong L, Nakamura H, Sumida T. Expression of tristetraprolin (gO24) mRNA, a regulator of tumor necrosis factor- α production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31:1044-1049
60. Patil CS, Liu M, Zhao W, Coatney DD, Li F, VanTubergen EA, D'Silva NJ, Kirkwood KL. Targeting mRNA stability arrests inflammatory bone loss. *Mol Ther.* 2008;16:1657-1664

61. Carrick DM, Chulada P, Donn R, Fabris M, McNicholl J, Whitworth W, Blackshear PJ. Genetic variations in zfp36 and their possible relationship to autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2006;26:182-196
62. Suzuki T, Tsutsumi A, Suzuki H, Suzuki E, Sugihara M, Muraki Y, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Miyazawa K, Sumida T. Tristetraprolin (ttp) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Mod Rheumatol.* 2008;18:472-479
63. Ghosh S, Hoenerhoff MJ, Clayton N, Myers P, Stumpo DJ, Maronpot RR, Blackshear PJ. Left-sided cardiac valvulitis in tristetraprolin-deficient mice: The role of tumor necrosis factor alpha. *Am J Pathol.* 2010;176:1484-1493
64. Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger rna deadenylation and stability. *Blood.* 2000;95:1891-1899
65. Raghavan A, Robison RL, McNabb J, Miller CR, Williams DA, Bohjanen PR. Hua and tristetraprolin are induced following t cell activation and display distinct but overlapping rna binding specificities. *J Biol Chem.* 2001;276:47958-47965
66. Molle C, Zhang T, Ysebrant de Lendonck L, Gueydan C, Andrienne M, Sherer F, Van Simaey G, Blackshear PJ, Leo O, Goriely S. Tristetraprolin regulation of interleukin 23 mrna stability prevents a spontaneous inflammatory disease. *J Exp Med.* 2013;210:1675-1684
67. Maeda M, Sawa H, Tobiume M, Tokunaga K, Hasegawa H, Ichinohe T, Sata T, Moriyama M, Hall WW, Kurata T, Takahashi H. Tristetraprolin inhibits hiv-1 production by binding to genomic rna. *Microbes Infect.* 2006;8:2647-2656
68. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101:2149-2153
69. Zhang H, Taylor WR, Joseph G, Caracciolo V, Gonzales DM, Sidell N, Seli E, Blackshear PJ, Kallen CB. Mrna-binding protein zfp36 is expressed in atherosclerotic lesions and reduces inflammation in aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:1212-1220
70. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001;27:269-281
71. Michaud K, Wolfe F. Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2007;21:885-906
72. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of observational studies. *Arthritis and rheumatism.* 2008;59:1690-1697
73. Goodson N, Marks J, Lunt M, Symmons D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1595-1601
74. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis and rheumatism.* 2001;44:2737-2745
75. Gabriel SE. Heart disease and rheumatoid arthritis: Understanding the risks. *Ann Rheum Dis.* 2010;69 Suppl 1:i61-64
76. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2007;370:1861-1874

77. Voulgari PV, Drosos AA. Catastrophic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;35:2062-2063
78. Voll RE, Kalden JR. Do we need new treatment that goes beyond tumor necrosis factor blockers for rheumatoid arthritis? *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:799-810
79. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30:1205-1213
80. Winchester R. Reshaping cinderella's slipper: The shared epitope hypothesis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:109
81. Snir O, Rieck M, Gebe JA, Yue BB, Rawlings CA, Nepom G, Malmstrom V, Buckner JH. Identification and functional characterization of t cells reactive to citrullinated vimentin in hla-drb1*0401-positive humanized mice and rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2873-2883
82. Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM, Blue ML. Cell contact between t cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol.* 1993;54:399-406
83. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated t cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature.* 1999;402:304-309
84. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, Saigo K, Morinobu A, Koshihara M, Kuntz KM, Kamae I, Kumagai S. Meta-analysis: Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2007;146:797-808
85. Korb A, Tohidast-Akrad M, Cetin E, Axmann R, Smolen J, Schett G. Differential tissue expression and activation of p38 mapk alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2745-2756
86. van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1995;34 Suppl 2:74-78
87. Gravallese EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 1998;152:943-951
88. Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and arthritis. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1142-1146
89. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999;45:1353-1358
90. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13:156-163
91. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:297-329
92. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165-197
93. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874
94. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *The American journal of clinical nutrition.* 2006;83:456S-460S

95. Elahi M, Asopa S, Matata B. No-cgmp and tnf-alpha counter regulatory system in blood: Understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:5-14
96. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*. 2008;451:953-957
97. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12:204-212
98. Jayakody L, Kappagoda T, Senaratne MP, Thomson AB. Impairment of endothelium-dependent relaxation: An early marker for atherosclerosis in the rabbit. *Br J Pharmacol*. 1988;94:335-346
99. 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
100. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of p-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest*. 1997;99:1037-1043
101. Iademaro MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by il-4 and tnf-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest*. 1995;95:264-271
102. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1897-1908
103. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902:230-239; discussion 239-240
104. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor kappa-b signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem*. 1997;272:15817-15824
105. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein e. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264-8268
106. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic t-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. *Circulation*. 2006;114:2482-2489
107. Niessner A, Weyand CM. Dendritic cells in atherosclerotic disease. *Clin Immunol*. 2010;134:25-32
108. Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008;121:S21-31
109. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of t cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-138
110. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:501-507
111. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 1999;274:11924-11929
112. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by

- ligation of cd40: Induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997;96:396-399
113. Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 2000;85:967-972
114. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994;37:481-494
115. John H, Kitas G, Toms T, Goodson N. Cardiovascular co-morbidity in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23:71-82
116. Gabriel SE. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008;121:S9-14
117. Ozbalkan Z, Efe C, Cesur M, Ertek S, Nasiroglu N, Berneis K, Rizzo M. An update on the relationships between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010;212:377-382
118. Pasceri V, Yeh ET. A tale of two diseases: Atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation*. 1999;100:2124-2126
119. Firestein GS. Starving the synovium: Angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1999;103:3-4
120. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or tnp-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*. 1999;99:1726-1732
121. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003;108:2957-2963
122. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051
123. Kerekes G, Szekanecz Z, Der H, Sandor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipo I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomjak E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltesz P. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: A multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol*. 2008;35:398-406
124. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126
125. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res*. 2004;64:172-178
126. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part ii: Animal and human studies. *Circulation*. 2003;108:2034-2040
127. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994;23:1121-1131
128. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. Ldl cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: Involvement of s-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000;87:99-105
129. Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C, Stefanadis C,

- Channon KM. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (adma) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Implications for endothelial function in human atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2009;30:1142-1150
130. Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus RE, Szocs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griending KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1429-1435
131. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cgmp-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1551-1557
132. Price DT, Vita JA, Keaney JF, Jr. Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal*. 2000;2:919-935
133. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation*. 2006;113:1708-1714
134. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S193-201
135. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-84
136. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione s-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130-7139
137. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase ii detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:313-322
138. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10:549-557
139. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem*. 2003;278:21592-21600
140. Sekhar KR, Yan XX, Freeman ML. Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by kiaa0132, the human homolog to inrf2. *Oncogene*. 2002;21:6829-6834
141. Auyeung DJ, Kessler FK, Ritter JK. Mechanism of rat udp-glucuronosyltransferase 1a6 induction by oltipraz: Evidence for a contribution of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Pharmacol*. 2003;63:119-127
142. Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating nrf2-keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:1208-1213
143. Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:79-88
144. Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, Silkworth JB, Taguchi K, Yamamoto M, Williams CR, Liby KT, Sporn MB, Sutter TR, Kensler TW. Genetic versus chemoprotective activation of nrf2 signaling:

- Overlapping yet distinct gene expression profiles between keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis*. 2009;30:1024-1031
145. Li H, Isomaa B, Taskinen MR, Groop L, Tuomi T. Consequences of a family history of type 1 and type 2 diabetes on the phenotype of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23:589-594
 146. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland OS, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Kahn CR. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 1987;59:750-755
 147. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, Gatling W, Bingley PJ, Patterson CC. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:760-765
 148. Crowson CS, Myasoedova E, Davis JM, 3rd, Matteson EL, Roger VL, Thorneau TM, Fitz-Gibbon P, Rodeheffer RJ, Gabriel SE. Increased prevalence of metabolic syndrome associated with rheumatoid arthritis in patients without clinical cardiovascular disease. *J Rheumatol*. 2011;38:29-35
 149. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal: Joint statement from the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28:2289-2304
 150. Giles JT, Allison M, Blumenthal RS, Post W, Gelber AC, Petri M, Tracy R, Szklo M, Bathon JM. Abdominal adiposity in rheumatoid arthritis: Association with cardiometabolic risk factors and disease characteristics. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3173-3182
 151. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: The role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:143-159
 152. Elkan AC, Hakansson N, Frostegard J, Hafstrom I. Low level of physical activity in women with rheumatoid arthritis is associated with cardiovascular risk factors but not with body fat mass--a cross sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:13
 153. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:183-192
 154. Pansuria M, Xi H, Li L, Yang XF, Wang H. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4:916-931
 155. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353:2643-2653
 156. Kumar P, Banik S. Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2013;6:35-43
 157. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med*. 1999;340:1888-1899
 158. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: The class study: A randomized controlled trial. Celecoxib long-term arthritis safety study. *JAMA*. 2000;284:1247-1255
 159. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in

- patients with rheumatoid arthritis. Vigor study group. *N Engl J Med.* 2000;343:1520-1528, 1522 p following 1528
160. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11693-11697
 161. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2006;332:1302-1308
 162. Gotzsche PC, Johansen HK. Meta-analysis of short-term low dose prednisolone versus placebo and non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis. *BMJ.* 1998;316:811-818
 163. Katchamart W, Trudeau J, Phumethum V, Bombardier C. Efficacy and toxicity of methotrexate (mtx) monotherapy versus mtx combination therapy with non-biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1105-1112
 164. Greenberg JD, Kremer JM, Curtis JR, Hochberg MC, Reed G, Tsao P, Farkouh ME, Nasir A, Setoguchi S, Solomon DH. Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:576-582
 165. Al-Aly Z, Pan H, Zeringue A, Xian H, McDonald JR, El-Achkar TM, Eisen S. Tumor necrosis factor-alpha blockade, cardiovascular outcomes, and survival in rheumatoid arthritis. *Transl Res.* 2011;157:10-18
 166. Rudolph K, Serwe A, Erkel G. Inhibition of tgf-beta signaling by the fungal lactones (s)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. *Cytokine.* 2013;61:285-296
 167. Kopcke B, Johansson M, Sterner O, Anke H. Biologically active secondary metabolites from the ascomycete a111-95. 1. Production, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo).* 2002;55:36-40
 168. Weidler M, Rether J, Anke T, Erkel G. Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. *FEBS Lett.* 2000;484:1-6
 169. Hausding M, Tepe M, Ubel C, Lehr HA, Rohrig B, Hohn Y, Pautz A, Eigenbrod T, Anke T, Kleinert H, Erkel G, Finotto S. Induction of tolerogenic lung cd4+ t cells by local treatment with a pstat-3 and pstat-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma. *Int Immunol.* 2011;23:1-15
 170. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: Mechanism for a dominant disorder in man. *Science.* 1974;185:61-63
 171. Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Tun P, Bersot T. Atypical familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoprotein phenotype e3/3. *J Clin Invest.* 1983;72:379-387
 172. Glueck CJ, Fallat DW. The heritable hyperlipoproteinemias and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 1975;63:305-316
 173. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 1987;68:231-240
 174. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D, Albee D. Comparison of atherosclerotic lesions and hdl-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains c57bl/6, balb/c, and c3h. *Atherosclerosis.* 1987;64:215-221

175. Hoff HF, Titus JL, Bajardo RJ, Jackson RL, Gotto AM, DeBakey ME, Lie JT. Lipoproteins in atherosclerotic lesions. Localization by immunofluorescence of apo-low density lipoproteins in human atherosclerotic arteries from normal and hyperlipoproteinemics. *Arch Pathol.* 1975;99:253-258
176. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. Apoe-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:133-140
177. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein e. *Science.* 1992;258:468-471
178. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-517
179. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice created by homologous recombination in es cells. *Cell.* 1992;71:343-353
180. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res.* 1990;60:269-280
181. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D. Hyperlipidemia promotes thrombosis after injury to atherosclerotic vessels in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1831-1834
182. Westrick RJ, Bodary PF, Xu Z, Shen YC, Broze GJ, Eitzman DT. Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation.* 2001;103:3044-3046
183. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med.* 1995;46:103-112
184. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr. Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem.* 1989;264:18832-18837
185. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1988;72:2020-2025
186. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML. Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (epi). *Thromb Res.* 1988;50:803-813
187. Novotny WF, Palmier M, Wun TC, Broze GJ, Jr., Miletich JP. Purification and properties of heparin-releasable lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1991;78:394-400
188. Zoldhelyi P, McNatt J, Shelat HS, Yamamoto Y, Chen ZQ, Willerson JT. Thromboresistance of balloon-injured porcine carotid arteries after local gene transfer of human tissue factor pathway inhibitor. *Circulation.* 2000;101:289-295
189. Nishida T, Ueno H, Atsuchi N, Kawano R, Asada Y, Nakahara Y, Kamikubo Y, Takeshita A, Yasui H. Adenovirus-mediated local expression of human tissue factor pathway inhibitor eliminates shear stress-induced recurrent thrombosis in the injured carotid artery of the rabbit. *Circ Res.* 1999;84:1446-1452
190. Ragni M, Golino P, Cirillo P, Scognamiglio A, Piro O, Esposito N, Battaglia C, Botticella F, Ponticelli P, Ramunno L, Chiariello M. Endogenous tissue factor pathway inhibitor modulates thrombus formation in an in vivo model of rabbit carotid artery stenosis and endothelial injury. *Circulation.* 2000;102:113-117

191. Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood*. 1997;90:944-951
192. Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Nutr*. 1996;126:1053S-1057S
193. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*. 2010
194. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159
195. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408
196. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254
197. Wessel D, Flugge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138:141-143
198. Richter HG, Camm EJ, Modi BN, Naeem F, Cross CM, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Dunster C, Mudway IS, Kelly FJ, Burton GJ, Poston L, Giussani DA. Ascorbate prevents placental oxidative stress and enhances birth weight in hypoxic pregnancy in rats. *J Physiol*. 2012;590:1377-1387
199. Petrofsky JS, Alshammari F, Bains GS, Khowailed IA, Lee H, Kuderu YN, Lodha RD, Rodrigues S, Nguyen D, Potnis PA, Deshpande PP, Yim JE, Berk L. What is more damaging to vascular endothelial function: Diabetes, age, high bmi, or all of the above? *Med Sci Monit*. 2013;19:257-263
200. Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: A strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch*. 2010;459:995-1004
201. Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension*. 1992;20:253-263
202. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S170-180
203. Blackshear PJ. Tristetraprolin and other cch tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:945-952
204. Schmidt N, Art J, Forsch I, Werner A, Erkel G, Jung M, Horke S, Kleinert H, Pautz A. The anti-inflammatory fungal compound (s)-curvularin reduces proinflammatory gene expression in an in vivo model of rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343:106-114
205. Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;111:897-906
206. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2302-2309
207. Xu J, Lupu F, Esmon CT. Inflammation, innate immunity and blood coagulation. *Hamostaseologie*. 2010;30:5-6, 8-9
208. Kaplan IM, Morisot S, Heiser D, Cheng WC, Kim MJ, Civin CI. Deletion of tristetraprolin caused spontaneous reactive granulopoiesis by a non-cell-

- autonomous mechanism without disturbing long-term hematopoietic stem cell quiescence. *J Immunol.* 2011;186:2826-2834
209. Takaki A, Enfield DL, Thompson AR. Cleavage and inactivation of factor ix by granulocyte elastase. *J Clin Invest.* 1983;72:1706-1715
210. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2137-2142
211. Moe KT, Yin NO, Naylynn TM, Khairunnisa K, Wutyi MA, Gu Y, Atan MS, Wong MC, Koh TH, Wong P. Nox2 and nox4 mediate tumour necrosis factor-alpha-induced ventricular remodelling in mice. *J Cell Mol Med.* 2011;15:2601-2613
212. Voß C. Analysen zur regulation der genexpression durch organische nitrate. *Department of Pharmacology.* 2013
213. Schuhmacher S, Oelze M, Bollmann F, Kleinert H, Otto C, Heeren T, Steven S, Hausding M, Knorr M, Pautz A, Reifenberg K, Schulz E, Gori T, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. Vascular dysfunction in experimental diabetes is improved by pentaerithryl tetranitrate but not isosorbide-5-mononitrate therapy. *Diabetes.* 2011;60:2608-2616
214. Matoba T, Sato K, Egashira K. Mouse models of plaque rupture. *Curr Opin Lipidol.* 2013
215. Stephan F, Dienava-Verdoold I, Bulder I, Wouters D, Mast AE, Te Velthuis H, Aarden LA, Zeerleder S. Tissue factor pathway inhibitor is an inhibitor of factor vii-activating protease. *J Thromb Haemost.* 2012;10:1165-1171
216. Brooks SA, Blackshear PJ. Tristetraprolin (ttp): Interactions with mrna and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1829:666-679
217. Kang JG, Amar MJ, Remaley AT, Kwon J, Blackshear PJ, Wang PY, Hwang PM. Zinc finger protein tristetraprolin interacts with ccl3 mrna and regulates tissue inflammation. *J Immunol.* 2011;187:2696-2701
218. Stier A, Reichert S, Massemin S, Bize P, Criscuolo F. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: Correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Front Zool.* 2012;9:37
219. Gruener N, Gozlan O, Goldstein T, Davis J, Besner I, Iancu TC. Iron, transferrin, and ferritin in cerebrospinal fluid of children. *Clin Chem.* 1991;37:263-265
220. Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. *Neurobiol Aging.* 2005;26 Suppl 1:128-132
221. Marino MD, Aksenov MY, Kelly SJ. Vitamin e protects against alcohol-induced cell loss and oxidative stress in the neonatal rat hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 2004;22:363-377
222. Druse MJ, Tajuddin NF, Gillespie RA, Dickson E, Atieh M, Pietrzak CA, Le PT. The serotonin-1a agonist ipsapirone prevents ethanol-associated death of total rhombencephalic neurons and prevents the reduction of fetal serotonin neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004;150:79-88
223. Sheth DS, Tajuddin NF, Druse MJ. Antioxidant neuroprotection against ethanol-induced apoptosis in hn2-5 cells. *Brain Res.* 2009;1285:14-21
224. Carballo E, Blackshear PJ. Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood.* 2001;98:2389-2395

225. Qiu LQ, Stumpo DJ, Blackshear PJ. Myeloid-specific tristetraprolin deficiency in mice results in extreme lipopolysaccharide sensitivity in an otherwise minimal phenotype. *J Immunol.* 2012;188:5150-5159
226. Panoulas VF, Douglas KM, Milionis HJ, Stavropoulos-Kalinglou A, Nightingale P, Kita MD, Tselios AL, Metsios GS, Elisaf MS, Kitis GD. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:1477-1482
227. Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Gabriel SE. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? *Ann Rheum Dis.* 2008;67:64-69
228. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: Implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation.* 2003;107:398-404
229. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of c-reactive protein. *Circulation.* 2002;105:1890-1896
230. Dawson S, Henney A. The status of pai-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: A review. *Atherosclerosis.* 1992;95:105-117
231. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, Li RK, Mickle DA, Verma S. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation.* 2003;107:1783-1790
232. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR, Kamm RD, Garcia-Cardena G, Gimbrone MA, Jr. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14871-14876
233. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695
234. Sommer SL, Berndt TJ, Frank E, Patel JB, Redfield MM, Dong X, Griffin MD, Grande JP, van Deursen JM, Sieck GC, Romero JC, Kumar R. Elevated blood pressure and cardiac hypertrophy after ablation of the gly96/iex-1 gene. *J Appl Physiol (1985).* 2006;100:707-716
235. Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res.* 2012;46:1482-1489
236. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Andreadou I, Kaplanoglou T, Katsimbri P, Skarantavos G, Soucacos PN, Kremastinos DT. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2008;117:2662-2669
237. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003;278:22546-22554
238. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, Channon KM, Alp NJ. Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (enos) coupling by both tetrahydrobiopterin-enos stoichiometry and biopterin redox status: Insights from cells with tet-regulated gtp cyclohydrolase i expression. *J Biol Chem.* 2009;284:1136-1144

239. Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:340-344
240. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* 1998;273:25804-25808
241. Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of NOX and DUOX enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:319-331
242. Tiedje C, Ronkina N, Tehrani M, Dhamija S, Laass K, Holtmann H, Kotlyarov A, Gaestel M. The p38/MK2-driven exchange between TRISTETRAPROLIN and HUR regulates an RNA-rich element-dependent translation. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002977
243. Casper I, Nowag S, Koch K, Hubrich T, Bollmann F, Henke J, Schmitz K, Kleinert H, Pautz A. Post-transcriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP). *Nitric Oxide.* 2013;33:6-17
244. Crook MF, Southgate KM, Newby AC. Both ICAM-1- and VCAM-1-integrin interactions are important in mediating monocyte adhesion to human saphenous vein. *J Vasc Res.* 2002;39:221-229
245. McMurray RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;25:215-233
246. Ishmael FT, Fang X, Galdiero MR, Atasoy U, Rigby WF, Gorospe M, Cheadle C, Stellato C. Role of the RNA-binding protein TRISTETRAPROLIN in glucocorticoid-mediated gene regulation. *J Immunol.* 2008;180:8342-8353
247. Baillet A, Trocme C, Berthier S, Arlotto M, Grange L, Chenau J, Quetant S, Seve M, Berger F, Juvin R, Morel F, Gaudin P. Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49:671-682
248. Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T, Umeshita-Sasai M, Kobayashi H, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Nomura S, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Uede T, Kawase I, Saeki Y. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol.* 2002;29:2061-2067
249. Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravallesse EM, Goldring SR, Bromme D. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum.* 2002;46:663-674
250. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1998;102:576-583
251. Zhang J, Guo H, Mi Z, Gao C, Bhattacharya S, Li J, Kuo PC. E1A1-actin interactions alter mRNA stability to determine differential osteopontin expression in HepG2 and Hep3B cells. *Exp Cell Res.* 2009;315:304-312
252. Lim W, Jeong W, Kim J, Ka H, Bazer FW, Han JY, Song G. Differential expression of secreted phosphoprotein 1 in response to estradiol-17 β and in ovarian tumors in chickens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422:494-500
253. Novakovic D, Kuo AC, Lin JH, Koschinsky ML, Boffa MB. Identification of TRISTETRAPROLIN as a factor that modulates the stability of the TAFI transcript through binding to the 3'-untranslated region. *J Thromb Haemost.* 2012

254. Yu H, Stasinopoulos S, Leedman P, Medcalf RL. Inherent instability of plasminogen activator inhibitor type 2 mrna is regulated by tristetraprolin. *J Biol Chem.* 2003;278:13912-13918
255. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J.* 1992;6:2591-2599
256. Philip-Joet F, Alessi MC, Philip-Joet C, Aillaud M, Barriere JR, Arnaud A, Juhan-Vague I. Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural effusions. *Eur Respir J.* 1995;8:1352-1356
257. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood.* 2000;95:2855-2859
258. Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Schneider B, Quehenberger P, Kyrle PA. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood.* 2004;103:3773-3776
259. Garand M, Lin JH, Hill CE, Zagorac B, Koschinsky ML, Boffa MB. Regulation of the mouse gene encoding tafi by tnfa: Role of nf-kappa-b binding site. *Cytokine.* 2012;57:389-397
260. Semeraro F, Ammollo CT, Semeraro N, Colucci M. Tissue factor-expressing monocytes inhibit fibrinolysis through a tafi-mediated mechanism, and make clots resistant to heparins. *Haematologica.* 2009;94:819-826
261. Macey MG, Wolf SI, Wheeler-Jones CP, Lawson C. Expression of blood coagulation factors on monocytes after exposure to tnf-treated endothelium in a novel whole blood model of arterial flow. *J Immunol Methods.* 2009;350:133-141
262. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res.* 2005;96:1233-1239
263. Ulfhammer E, Larsson P, Karlsson L, Hrafnkelsdottir T, Bokarewa M, Tarkowski A, Jern S. Tnf-alpha mediated suppression of tissue type plasminogen activator expression in vascular endothelial cells is nf-kappa-b- and p38 mapk-dependent. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1781-1789
264. Pircher J, Merkle M, Wornle M, Ribeiro A, Czermak T, Stampnik Y, Mannell H, Niemeyer M, Vielhauer V, Krotz F. Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha in vivo are amplified by the absence of tnf-alpha receptor subtype 1 and require tnf-alpha receptor subtype 2. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R225
265. Baglin T. Disseminated intravascular coagulation: Diagnosis and treatment. *BMJ.* 1996;312:683-687
266. Cueni LN, Chen L, Zhang H, Marino D, Huggenberger R, Alitalo A, Bianchi R, Detmar M. Podoplanin-fc reduces lymphatic vessel formation in vitro and in vivo and causes disseminated intravascular coagulation when transgenically expressed in the skin. *Blood.* 2010;116:4376-4384
267. Calkosinski I, Rosinczuk-Tonderys J, Dobrzynski M, Palka L, Bazan J. Occurrence of disseminated intravascular coagulation in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced pneumonia in the rat. *Adv Exp Med Biol.* 2013;788:283-292
268. Bick RL, Baker WF. Diagnostic efficacy of the d-dimer assay in disseminated intravascular coagulation (dic). *Thromb Res.* 1992;65:785-790
269. Esmon CT. Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Clin Haematol.* 1994;7:453-468
270. Cambien B, Bergmeier W, Saffaripour S, Mitchell HA, Wagner DD. Antithrombotic activity of tnf-alpha. *J Clin Invest.* 2003;112:1589-1596

271. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res*. 2001;88:E14-22
272. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes*. 2002;51:413-423
273. Oksala NK, Lappalainen J, Laaksonen DE, Khanna S, Kaarniranta K, Sen CK, Atalay M. Alpha-lipoic acid modulates heat shock factor-1 expression in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:497-506
274. Oberle S, Abate A, Grosser N, Hemmerle A, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schroder H. Endothelial protection by pentaerythrityl trinitrate: Bilirubin and carbon monoxide as possible mediators. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228:529-534
275. Wenzel P, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, Mollnau H, Stalleicken D, Weiner H, Lehmann J, Li H, Forstermann U, Munzel T, Daiber A. Heme oxygenase-1: A novel key player in the development of tolerance in response to organic nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1729-1735
276. Oberle S, Abate A, Grosser N, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schroder H. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:1539-1544
277. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a cap'n'collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*. 1999;274:26071-26078
278. Oppermann M, Balz V, Adams V, Dao VT, Bas M, Suvorava T, Kojda G. Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1271-1278
279. Pautz A, Rauschkolb P, Schmidt N, Art J, Oelze M, Wenzel P, Forstermann U, Daiber A, Kleinert H. Effects of nitroglycerin or pentaerythrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: Evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol Genomics*. 2009;38:176-185
280. Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, Gori T, Jansen T, Knorr M, Karbach S, Hortmann M, Mathner F, Bhatnagar A, Forstermann U, Li H, Munzel T, Daiber A. Pentaerythritol tetranitrate improves angiotensin ii-induced vascular dysfunction via induction of heme oxygenase-1. *Hypertension*. 2010;55:897-904
281. Hacker A, Muller S, Meyer W, Kojda G. The nitric oxide donor pentaerythritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2001;132:1707-1714
282. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997;95:594-599
283. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2839-2843

284. Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Simari RD. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation*. 1998;98:1051-1057
285. Pan S, White TA, Witt TA, Chiriac A, Mueske CS, Simari RD. Vascular-directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development. *Circ Res*. 2009;105:713-720, 718 p following 720
286. Pan S, Kleppe LS, Witt TA, Mueske CS, Simari RD. The effect of vascular smooth muscle cell-targeted expression of tissue factor pathway inhibitor in a murine model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost*. 2004;92:495-502
287. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887-896
288. Casani L, Segales E, Vilahur G, Bayes de Luna A, Badimon L. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation*. 2004;110:460-465
289. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein vi for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197:41-49
290. Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein e-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:751-757
291. Kokawa T, Enjyoji K, Kumeda K, Kamikubo Y, Harada-Shiba M, Koh H, Tsushima M, Yamamoto A, Kato H. Measurement of the free form of tfpi antigen in hyperlipidemia. Relationship between free and endothelial cell-associated forms of tfpi. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:802-808
292. Lupu C, Zhu H, Popescu NI, Wren JD, Lupu F. Novel protein adtrp regulates tfpi expression and function in human endothelial cells in normal conditions and in response to androgen. *Blood*. 2011;118:4463-4471
293. Casper I. Analysen zur expression proinflammatorischer mediatoren in humanen zellkulturmodellen und murinen tiermodellen chronisch-inflammatorischer erkrankungen. *Department of Pharmacology*. 2013
294. Yoshimura A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*. 2006;97:439-447
295. Sugita C, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Matsuda S, Matsumoto T, Inoue O, Harada A, Kitazawa T, Hattori K, Shima M, Asada Y. Elevated plasma factor viii enhances venous thrombus formation in rabbits: Contribution of factor xi, von willebrand factor and tissue factor. *Thromb Haemost*. 2013;110:62-75
296. Lackmann M, Rajasekariah P, Iismaa SE, Jones G, Cornish CJ, Hu S, Simpson RJ, Moritz RL, Geczy CL. Identification of a chemotactic domain of the pro-inflammatory s100 protein cp-10. *J Immunol*. 1993;150:2981-2991
297. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. Mrp8 and mrp14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260-4268
298. Lau W, Devery JM, Geczy CL. A chemotactic s100 peptide enhances scavenger receptor and mac-1 expression and cholesteryl ester accumulation in murine peritoneal macrophages in vivo. *J Clin Invest*. 1995;95:1957-1965

299. Kadoglou NP, Sailer N, Moutzouglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD. Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *J Vasc Surg.* 2010;51:114-121
300. Rodgers KJ, Watkins DJ, Miller AL, Chan PY, Karanam S, Brissette WH, Long CJ, Jackson CL. Destabilizing role of cathepsin s in murine atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:851-856
301. de Nooijer R, Bot I, von der Thusen JH, Leeuwenburgh MA, Overkleeft HS, Kraaijeveld AO, Dorland R, van Santbrink PJ, van Heiningen SH, Westra MM, Kovanen PT, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ, Shi GP, Biessen EA. Leukocyte cathepsin s is a potent regulator of both cell and matrix turnover in advanced atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:188-194

Danksagung

Lebenslauf

