

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle des CD40L für Adipositas-assoziierten vaskulären oxidativen Stress,
Entzündung und vaskuläre Dysfunktion - Studien im Tiermodell und Gewebe von
adipösen Patienten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Fatemeh Kashani
aus Mashhad-Iran

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

20. November 2020

Meinen Eltern

Meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Abbildungsverzeichnis	7
3	Tabellenverzeichnis	8
4	Einleitung und Zielsetzung	9
4.1	Einleitung.....	9
4.2	Zielsetzung.....	10
5	Literaturdiskussion	11
5.1	Adipositas.....	11
5.2	Atherosklerose.....	13
5.3	Oxidativer Stress.....	16
5.4	Endothelfunktion und -dysfunktion.....	20
5.5	CD40/CD40L Signaling:.....	23
5.5.1	Molekulare und zelluläre Eigenschaften von CD40 und CD40L:.....	23
5.5.2	CD40L in der Immunantwort und Entzündung:.....	25
5.5.3	Die CD40/CD40L-Dyade und Adipositas:.....	26
5.5.4	Die CD40/CD40L-Dyade und Atherosklerose:.....	27
6	Material und Methoden	28
6.1	Material.....	28
6.1.1	Tiere.....	28
6.1.2	Chemikalien.....	28
6.1.3	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	29
6.1.4	Kits and Assays:.....	34
6.1.5	Antikörper.....	34
6.1.6	Geräte und Materialien.....	35
6.2	Methoden.....	37
6.2.1	Tiermodell.....	37
6.2.2	Organentnahme und Aortenpräparation.....	37
6.2.3	Organbadstudien mit isometrischer Spannungsmessung.....	38
6.2.4	DHE-Mikrotopographie zur ROS-Detektion in Aortensegmenten.....	39
6.2.5	Herstellung der Herzmembranfraktion.....	40
6.2.6	Proteinbestimmung nach Lowry.....	41
6.2.7	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mittels Chemilumineszenz Assays.....	42
6.2.8	Proteinextraktionen aus Gewebe.....	43

6.2.9	Proteinbestimmung nach Bradford	43
6.2.10	SDS-PAGE und Western-Blot	44
6.2.11	Dot-Blot	47
6.2.12	Quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	48
6.2.13	Durchfluss Zytometrie	49
6.2.14	Humanproben	49
6.2.15	mRNA-Isolierung aus humanem Gewebe und nCounter-Analyse	50
6.2.16	ELISA.....	52
6.2.17	Quantifizierung der Lipidwerte im Serum	52
6.2.18	Statistische Auswertung.....	52
7	Ergebnisse	54
7.1	CD40L-Defizienz vermindert die Gewichtszunahme und den Cholesterinanstieg in Serum der mit fettreicher Diät behandelten Mäusen.....	54
7.2	CD40L-Defizienz verbessert die Hyperlipidämie-induzierte endotheliale Dysfunktion und oxidativen Stress	56
7.2.1	Prüfung der endothelialen Funktion mittels isometrischer Tonusstudien.....	56
7.2.2	ROS Detektion in intaktem Aortengewebe mittels DHE-Mikrotopographie	58
7.2.3	NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen und mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten	59
7.3	CD40L-Defizienz vermindert die Expression der Entzündungsindikatoren und die Thrombozyten-Aktivierung durch Hyperlipidämie	60
7.4	Adipöse Patienten zeigen eine erhöhte Genexpression für Indikatoren der vaskulären Entzündung und einen Anstieg des sCD40L-Spiegel im Serum	62
8	Diskussion	64
8.1	Gewichts- und Lipidprofilveränderungen.....	65
8.2	Endotheliale Funktion und oxidativer Stress.....	67
8.3	Vaskuläre Entzündungsprozesse.....	69
8.4	Expressionsmuster für Indikatoren der vaskulären Entzündung und sCD40L-Serumspiegel in adipösen Patienten.....	71
8.5	Alternatives Tiermodell des metabolischen Syndroms mit T2DM und pharmakologischer Ansatz zur Hemmung des CD40/CD40L Signalwegs	73
9	Zusammenfassung	76
10	Literaturverzeichnis	77
11	Anhang.....	87

12 Danksagung.....	91
13 Tabellarischer Lebenslauf.....	92

1 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ACTB	β-Actin-Gen
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AHA	American Heart Association
AMPK	5' Adenosinmonophosphate aktivierte Proteinkinase
APC	antigenpräsentierende Zellen
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
apo-B100	Apolipoprotein B100
ApoC-II	Apolipoprotein C-II
ApoC-III	Apolipoprotein C-III
ATII, Ang II	Angiotensin II
β-TG	β-Thromboglobulin
BH ₄	(6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
BMI	Body Mass Index (Körpermassenindex)
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Calmodulin
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CETP	Cholesterinester Transferprotein
cGMP	cyclic guanosine-3'-5'-monophosphate
COX-1/2	Cyclooxygenase 1/2
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Cardiovascular Disease
DHE	Dihydroethidium
DZHK	Deutsches Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung
ED	endotheliale Dysfunktion
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-3)
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
FAD	Flavin-Adenosine-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gp	Glykoprotein
HDL	High density lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HFD	High Fat Diet, fettreiche Diät
HIGM	Hyper IgM Syndrom
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule 1
IDL	Intermediate density lipoprotein
IFNG	Interferon-γ
IFNγ	Interferon-γ
IgM	Immunoglobulin M
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-2)

JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheiten
LDL	Low density lipoprotein
LDLr	Low density lipoprotein receptor
LT- α	Lymphotoxin- α
LRP	Lipoprotein receptor-related protein
M	mol/L
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MCP-1	Monocyte- chemoattractant-protein-1 (i.e. CCL2)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP 1 α/β	Makrophagen-inflammatorisches Protein 1 α/β
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Einheit für Blutdruck)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NOX	NADPH-Oxidase
ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE2	Prostaglandin E2
PGIS	Prostaglandin-I2 (Prostazyklin)-Synthase
phox	phagocytic oxidase
PKC	Protein Kinase C
P-selectin	Platelet selectin
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted (i.e. CCL5)
RNA	Ribonukleinsäure
RO(N)S	reaktive Sauerstoff (Stickstoff) Spezies
sCD40L	soluble CD40 ligand
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
SELP	P-Selectin
SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
sGC	soluble guanylyl cyclase
SOD	Superoxiddismutase
SPSS	Statistiksoftware IBM SPSS Statistics
SRA	Scavenger-receptor A

T2DM	Typ2-Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- α converting enzyme
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TBP	TATA-box bindendes Protein
TG	Triglyzeride
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α/β	Tumornekrosefaktor α/β
TRAF-2/6	TNF Rezeptor assoziierter Faktor-2/6
TRAP	Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid
TUBB3	Tubulin- β -3 Gen
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adiposopathie: vereinfachte Darstellung der Beziehung zwischen pathologischer Fettgewebefunktion und Atherogenese.	12
Abbildung 2: Pathogenese der Atherosklerose <i>übernommen aus (38)</i>	15
Abbildung 3: Die Wechselwirkung zwischen NO und Superoxid und die Prozesse, bei denen diese eine Rolle spielt. <i>Modifiziert aus (42).</i>	16
Abbildung 4: Entkopplung der NO-Synthase. <i>Übernommen aus (54)</i>	20
Abbildung 5: Interaktion zwischen oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion und vaskulärer Entzündung. <i>Modifiziert aus (12)</i>	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur des CD40-Moleküls.	24
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur des CD40L-Moleküls. <i>Übernommen aus (103)</i>	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der beschriebenen Organbadanlage.	38
Abbildung 9: Die Reaktion von DHE mit Superoxid. <i>Übernommen aus (139)</i>	40
Abbildung 10: Superoxid und Lucigenin-Reaktion. <i>Übernommen aus (147)</i>	42
Abbildung 11: Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. <i>Übernommen aus (151)</i>	44
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Transferschritten beim Western-Blot Verfahren. <i>Übernommen aus (152)</i>	45
Abbildung 13: Das Prinzip des Western-Blot Verfahrens mit ECL. <i>Übernommen aus (153)</i>	46
Abbildung 14: Der Aufbau des Dot-Blot-Systems <i>Übernommen aus (154)</i>	47
Abbildung 15: Schematische Darstellung des hybridisierten dreigliedrigen Komplexes. <i>Übernommen aus (156)</i>	51
Abbildung 16: CD40L-Expression in Aortengewebe	54
Abbildung 17: Effekte der CD40L-Defizienz auf den A) Glukose- und B) Triglyzerid-Wert im Serum.	54
Abbildung 18 : Effekte der CD40L-Defizienz auf die A) Nahrungsaufnahme und B) Gewicht, C) Gesamtcholesterin, D) Leptin, E) LDL und F) HDL im Serum.....	55
Abbildung 19: Isometrische Spannungsmessung zum Effekt der CD40L-Defizienz auf die endothelabhängige Relaxation bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.	56
Abbildung 20: Isometrische Spannungsmessung zum Effekt der CD40L-Defizienz auf die Endothel-unabhängige Relaxation sowie Vasokonstriktion bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.....	57

Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie zum Effekt der CD40L-Defizienz auf den oxidativen Stress bei HFD-induzierter Hyperlipidämie im vaskulären Gewebe.	58
Abbildung 22: Effekte der CD40L-Defizienz auf den oxidativen Stress bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.....	59
Abbildung 23: Untersuchung der Marker für Entzündung und Thrombozytenaktivität zum Effekt der CD40L-Defizienz bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.	60
Abbildung 24: IL-6 Expression und Effekt der CD40L-Defizienz bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.....	61
Abbildung 25: Gen-Expression in Humanproben von normal- und übergewichtigen Patienten.	62
Abbildung 26: Protein-Expression von Entzündungsmarkern in Humanproben von normal- und übergewichtigen Patienten.....	63
Abbildung 27: CD40L-Defizienz und ATII-induzierten Hypertonie-Folgen. ^{Übernommen aus (157)}	64
Abbildung 28: Lipoprotein Metabolismus. ^{Übernommen aus (158)}	66
Abbildung 29: Medikamentöse Hemmung von CD40/TRAF6 verbessert die Gefäßfunktion und reduziert den oxidativen Stress und Entzündung in db/db Mäusen.	75

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI ⁽¹⁶⁾	11
Tabelle 2: Isoformen der NADPH-Oxidase.....	18
Tabelle 3: Isoformen der NO-Synthase	19
Tabelle 4: Primärantikörper die für Western-Blot und Dot-Blot	46
Tabelle 5: Sekundärantikörper die für Western-Blot und Dot-Blot.....	46
Tabelle 6: Patientencharakteristika	50

4 Einleitung und Zielsetzung

4.1 Einleitung

“American Heart Association Call to Action: Obesity as a Major Risk Factor for Coronary Heart Disease”

Dies war der Titel des AHA (American Heart Association) Artikels, der schon 1998 angesichts der zunehmenden wissenschaftlichen Daten über den Zusammenhang zwischen Adipositas und Koronaren Herzerkrankungen (KHK) publiziert wurde. In diesem Artikel wurde Adipositas als ein modifizierbarer Hauptrisikofaktor für KHK klassifiziert und die medizinische Fachwelt und Forschungsgemeinschaften sowie die Allgemeinbevölkerung wurden zum Handeln aufgefordert ⁽¹⁾.

Langjährige Studien zeigen, dass Adipositas nicht nur einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt, sondern dass Adipositas durch Auswirkung auf viele andere kardiovaskuläre Risikofaktoren, einschließlich Dyslipidämie, Hypertonie und Hyperglykämie das Herz-Kreislaufsystem beeinflussen kann ⁽²⁻⁵⁾.

Dies mag durch eine Funktionsstörung des Fettgewebes verursacht werden, was zu einem chronischen entzündlichen Zustand und zur Dysregulation der endo- und parakrinen Mediatoren führt, die von Adipozyten freigesetzt werden ^(6, 7). Diese Pathomechanismen beeinträchtigen systematisch die vaskuläre Homöostase und führen zur endothelialen Dysfunktion ⁽⁷⁻¹⁰⁾. Der veränderte Phänotyp und die Funktionsstörung der Endothelzellen sind bei allen Adipositas-assoziierten Komplikationen zu sehen. Ein wichtiger Aspekt der endothelialen Dysfunktion ist verminderte Stickstoffmonoxid(NO)-Bioverfügbarkeit ⁽¹¹⁾. Ein systematischer pro-inflammatorischer Zustand in Kombination mit oxidativem Stress begünstigt die Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit ^(12, 13). Außerdem werden pro-inflammatorische Zytokine lokal von perivaskulärem Fettgewebe produziert; durch einen parakrinen Mechanismus führen sie zur Dysfunktion der Endothelzellen und Funktionsstörung der glatten Muskelzellen ^(8, 9). Somit wirkt das lokale Fettgewebe bei der Pathogenese der kardiovaskulären Erkrankungen in adipösen Patienten mit.

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Rolle des Immunsystems und die Bedeutung der Entzündungsprozesse in der Entwicklung der KHK, konnte festgestellt werden, dass die ko-stimulatorischen Moleküle wichtige Regulatoren dieser Prozesse sind. Dabei ist insbesondere die CD40L-CD40-Achse von großer Bedeutung.

4.2 Zielsetzung

Die Intention dieses Projektes lag darin, die maßgebliche Wirkung des CD40L auf die durch Hyperlipidämie induzierte Entwicklung des vaskulären oxidativen Stresses, der endothelialen Dysfunktion und der allgemeinen Entzündungsprozesse zu demonstrieren. Diese beiden Pathomechanismen sind mit großer Wahrscheinlichkeit an den CD40L-vermittelten kardiovaskulären Komplikationen bei der Adipositas und Dyslipidämie beteiligt.

In dieser Studie wurde untersucht, ob die genetische Ausschaltung des CD40L im Rahmen einer Hyperlipidämie eine protektive Wirkung auf folgende Parameter hat:

1. die Gewichtszunahme, den Anstieg der Leptin-, Cholesterin-, HDL-, LDL-Werte,
2. die endotheliale Funktion und die Zunahme der Indikatoren des oxidativen Stresses,
3. den Anstieg der Entzündungsparameter und der Thrombozytenaktivität.

Außerdem wurde im Rahmen eines durch das Deutsche Zentrum für Herz- und Kreislaufforschung (DZHK) geförderten Säule B Projekts (Daiber & Niesler (Heidelberg) & Knosalla (Berlin)) die CD40L Expression in humanem Gewebe und Serum Proben (erhalten von der Biobank des Deutschen Herzzentrums-Berlin, Kooperation mit Dr. Knosalla) untersucht und mit Hilfe der Nanostring Plattform in Heidelberg (Kooperation mit Dr. Niesler) nach veränderten Genexpressionsmustern gesucht, die in unserem Mausmodell auch eine Rolle spielen.

5 Literaturdiskussion

5.1 Adipositas

Adipositas stellt eine der größten Herausforderungen für das öffentliche Gesundheitswesen des 21. Jahrhunderts dar. Laut WHO hat sich die Prävalenz der Adipositas in der europäischen Region von 1980 bis 2007 verdreifacht und zeigt eine weiterhin steigende Tendenz, vor allem bei Kindern ⁽¹⁴⁾. Im Jahr 2008 waren mehr als 50% der Menschen in der WHO-Region Europa übergewichtig und rund 23% der Frauen und 20% der Männer adipös ⁽¹⁵⁾. Nach aktuellen Schätzungen betrifft das Übergewicht 30-70% und Adipositas 10-30% die Erwachsenen in den EU-Länder ⁽¹⁵⁾.

Adipositas (lat. adeps ‚Fett‘) ist bei Erwachsenen definiert als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts. Berechnungsgrundlage für die Gewichtsklassifikation ist der Körpermassenindex [*Body Mass Index (BMI)*]. Der BMI ist der Quotient aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat (kg/m^2). Übergewicht ist definiert als $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$, Adipositas als $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (Tabelle 1) ⁽¹⁶⁾.

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation bei Erwachsenen anhand des BMI ⁽¹⁶⁾

Kategorie	BMI	Risiko für Begleiterkrankungen des Übergewichts
Untergewicht	< 18,5	niedrig
Normalgewicht	18,5 - 24,9	durchschnittlich
Übergewicht	$\geq 25,0$	
Präadipositas	25 - 29,9	gering erhöht
Adipositas Grad I	30 - 34,9	erhöht
Adipositas Grad II	35 - 39,9	hoch
Adipositas Grad III	≥ 40	sehr hoch

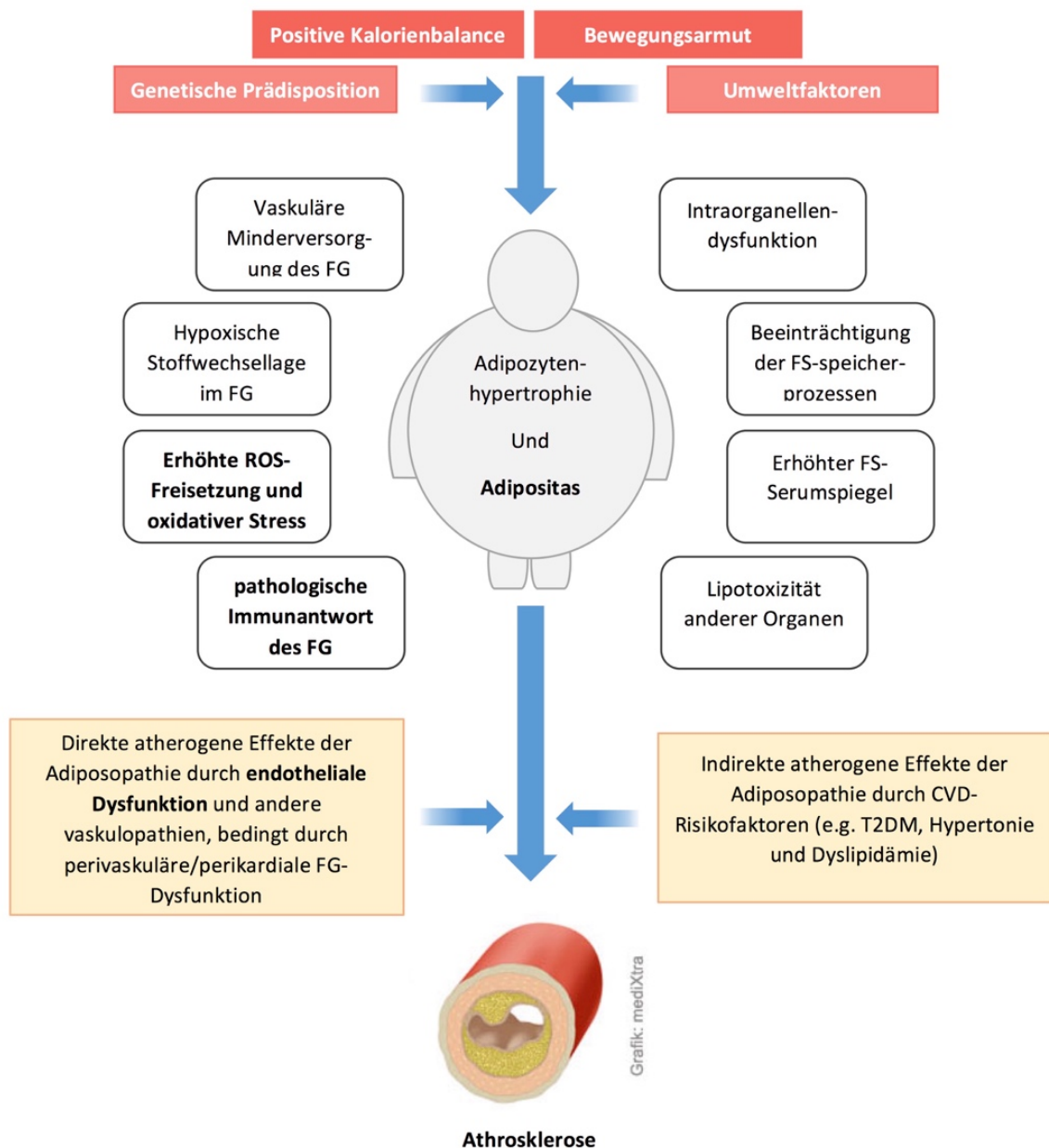


Abbildung 1: Adiposopathie: vereinfachte Darstellung der Beziehung zwischen pathologischer Fettgewebsfunktion und Atherogenese.

Das Fettgewebe bzw. die Adipozyten dienen als der größte Lipidspeicher des Körpers. Positive Kalorienbalance und Bewegungsarmut im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren und genetischer Disposition führen zur Hypertrophie der Adipozyten und zu einer übermäßigen Akkumulation des viszeralen Fettgewebes^(7, 17); was dann das Fettgewebe in einen pathologischen Zustand, die *Adiposopathie*, bringen kann.

In Rahmen der Adiposopathie ruft die Fettzellenhypertrophie eine Organellendysfunktion in den Adipozyten, v.a. in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum, hervor. Die Organellendysfunktion in diesen Zellen führt wiederum zu einer

Beeinträchtigung der Fettsäurespeicherprozesse und einem erhöhten Fettsäurespiegel im Blut. So kommt es zur Lipotoxizität anderer Organe wie Leber, Muskulatur und Pankreas. Hormonelle Dysregulation, vermehrter Energiespeicher und Fettakkumulation in viszeralen, perikardialen und perivaskulären Fettdepots sind weitere Folgen der Organellendysfunktion in Adipozyten ^(17, 18).

Adiposopathie ist nicht nur mit metabolischen und endokrinen Störungen assoziiert, sondern auch mit einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativem Stress ⁽⁹⁾, verstärkten proinflammatorischen Antworten (e.g. erhöhtes TNF- α ⁽¹⁹⁾, IL-6 und CRP⁽¹⁰⁾) und mit verminderten antiinflammatorischen Prozessen (e.g. vermindertem Adiponectin⁽²⁰⁾); denn bei einem übermäßigen Gewebswachstum kann das Fettgewebe nicht ausreichend vaskulär versorgt werden, geht das Fettgewebe in eine hypoxische Stoffwechsellage über und löst anschließend eine pathologische Immunantwort aus ^(8, 9, 18).

Abhängig von dem nachfolgenden Crosstalk und der Interaktion mit anderen Körpergeweben (wie Muskulatur, Leber, Pankreas etc.) können die pathologischen metabolischen und proinflammatorischen Konsequenzen der Adiposopathie direkt, durch perikardiale und perivaskuläre pathogene Effekte, oder indirekt, durch metabolische Erkrankungen wie z.B. T2DM, Hypertonie und Dyslipidämie, an der Entwicklung der Atherosklerose beteiligt sein (Abbildung 1).

5.2 Atherosklerose

Unter Atherosklerose (von griechisch athära = "Grütze" und skleros = "hart") versteht man eine entzündliche Erkrankung der Intima multifaktorieller Genese, die sich an Prädilektionsstellen mit hämodynamischer Belastung manifestiert. Die Pathogenese der Atherosklerose ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts Gegenstand fortdauernder Forschung und noch nicht vollständig geklärt. Die Studien zeigen, dass die Entstehung der Atherosklerose sowohl von den genetischen Faktoren als auch von Umweltfaktoren beeinflusst wird, darunter Hyperlipidämie ⁽²¹⁾ Rauchen ⁽²²⁾, Diabetes mellitus ⁽²³⁾ und Hypertonie ⁽²⁴⁾. Ausgelöst durch endotheliale Dysfunktion und in der Begleitung von strukturellen Veränderungen in der Arterienwand können die LDL-Partikeln in subendotheliale Schichten der Tunica intima gelangen und dort akkumulieren. Dies wird durch die Interaktion zwischen dem Proteinanteil der LDL-Partikeln, Apo-B100, und Proteoglykane in der Intima ⁽²⁵⁾, sowie durch den erhöhten

LDL-Spiegel im Serum ⁽²⁶⁾, angetrieben. Anschließend werden die LDL-Anhäufungen innerhalb der Intimaschicht durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die ursprünglich als Abfallprodukte von den Gefäßzellen bzw. zur Immunabwehr gebildet werden ⁽²⁷⁾, oxidiert. Die oxidierten Lipoproteine hemmen einerseits die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion in den Endothelzellen, wobei die vasodilatatorische Wirkung von NO wegfällt ⁽²⁸⁾, andererseits werden Endothelzellen durch oxidierte Lipoproteine angeregt, Monozyten aus dem Blut anzulocken. Die Endothelzellen können die Monozytenrekrutierung durch die Produktion von Chemokinen, z.B. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), fördern ⁽²⁹⁻³¹⁾.

Die Endothelzellen können aber auch zusätzlich durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen die Bindung von Monozyten an Endothelzellen erleichtern. Die Adhäsionsmoleküle, die eine erhöhte Bindungsaffinität der Intima gewährleisten, stammen hauptsächlich aus zwei Familien. Die erste Gruppe, die Selektine, knüpfen die ersten Kontakte zwischen Endothel und Leukozyten, wobei die P-Selektine besonders bei atherosklerotischen Läsionen vorkommen. Die zweite Gruppe, die Adhäsionsmoleküle aus der Immunglobulin-Familie, können Leukozyten binden und eine dauerhafte Adhäsion verursachen. Vor allem die Expression von Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) ist für die weitere Entwicklung der atherosklerotischen Läsion wichtig. VCAM-1 bindet spezifisch an Monozyten und T-Lymphozyten - zwei Zellgruppen, die bei der Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen von großer Bedeutung sind ⁽³²⁾. Nach dem Durchtritt von Monozyten durch das Endothel proliferieren diese und differenzieren sich unter dem Einfluss von Monocyte Colony Stimulating Factor (MCSF) zu Makrophagen. Die Makrophagen produzieren dann Zytokine wie den Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-1, und den Transforming Growth Factor- β (TGF- β), die daraufhin noch mehr Monozyten und T-Lymphozyten anziehen. Aktivierte T-Lymphozyten setzen ebenfalls Zytokine, wie Interferon- γ und Tumor Necrosis Factor- α und - β , frei, welche den Entzündungsprozess weiter vorantreiben ⁽³³⁾. Die Akkumulation von Makrophagen in der Intima ist zunächst eine Schutzfunktion. Dennoch, während die Makrophagen sich weiter anhäufen und mit Lipiden beladen, schafft ihre Gegenwart die Voraussetzung für die weitere Zerstörung der Arterienwand. Die Makrophagen besitzen Scavenger-Rezeptoren wie Scavenger-Rezeptor A (SRA) und CD-36, die oxidierten Lipoproteine identifizieren können und daraufhin deren Internalisierung initiieren ⁽³⁴⁻³⁶⁾. Weil diese Rezeptoren nicht herabreguliert werden können, kann die weitere Anhäufung

oxidierten Lipoproteine in den Makrophagen zur Zerstörung der Zelle führen. Glatte Muskelzellen können ebenfalls zu Schaumzellen umwandeln, wenn sie dazu aktiviert werden. Deren Wanderung von der Media zur Intima durch chemotaktische Mediatoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF) führt zu einer Akkumulation von glatten Muskelzellen in der Intima, zur Expression von Scavenger-Rezeptoren und Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen ⁽³⁷⁾. Die Schaumzellen, die mit Lipiden aufgefüllt sind, machen höchstwahrscheinlich einen Prozess durch, bei dem die Zellen absterben, deren Zellinhalt austritt und so sich eine Nekrosezone bildet. Der Zelltod kann durch Apoptose oder toxische Effekte oxidierten Lipide herbeigeführt werden. Die Folge ist eine Ausscheidung von oxidiertem LDL und freien Radikalen⁽³²⁾ (Abbildung 2).

Die atherosklerotische Läsion wird oft erst symptomatisch, wenn die Kappe einer instabilen Plaque reißt (Ruptur) und der Inhalt des mit Lipiden und Makrophagen angefüllten Kerns mit dem Blut in Berührung kommt. Dieser Riss kann entweder durch einen Schwächungsprozess innerhalb der Läsion entstehen, oder durch äußere Einflüsse herbeigeführt werden ⁽³²⁾.

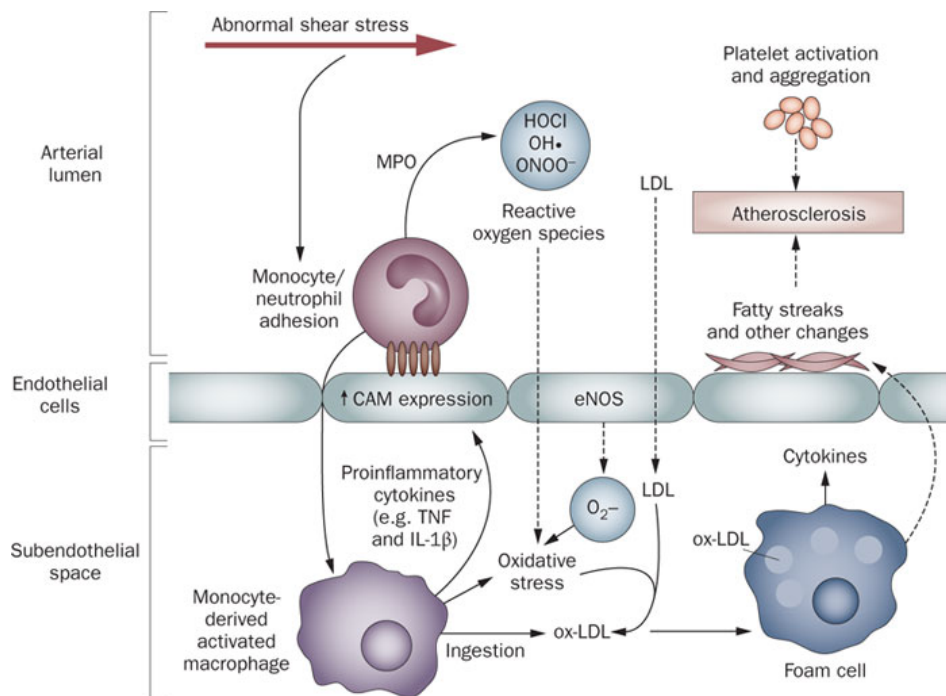


Abbildung 2: Pathogenese der Atherosklerose *übernommen aus (38)*

5.3 Oxidativer Stress

Helmut Sies definierte 1985 den oxidativen Stress als ein Ungleichgewicht zwischen Pro-oxidantien und Anti-oxidantien ⁽³⁹⁾. Dabei kommt es zu erhöhten Spiegeln oxidativ wirksamer Substanzen, die zu einer Schädigung von Biomolekülen führen können. Dies beruht zum einen auf einer erhöhten Produktion dieser reaktiven Spezies und zum anderen auf einer verminderten antioxidativen Abwehr ^(39, 40). Zu den oxidativen Stress verursachenden Molekülen zählen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sowie reaktive Stickstoffspezies (RNS).

Radikale können einerseits durch ihre hohe Reaktivität in biologischen Systemen zerstörend wirken, andererseits fungieren sie bereits in niedrigen Konzentrationen als Signalmoleküle. Dies gilt vor allem für Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) sowie seinen biologischen Gegenspieler, das Superoxidradikalanion ($\cdot\text{O}_2^-$), mit dem es in einer extrem schnellen Reaktion zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagiert. Diese drei Moleküle bilden einen wichtigen Teil eines regulatorischen Redox-Netzwerkes, das für verschiedene biologische Prozesse, beispielsweise den Gefäßtonus, von überragender physiologischer Bedeutung ist. In der Abbildung 3 sind die Reaktionen und Bedingungen, die bei diesen Prozessen beteiligt sind, zusammengefasst dargestellt ⁽⁴¹⁾.

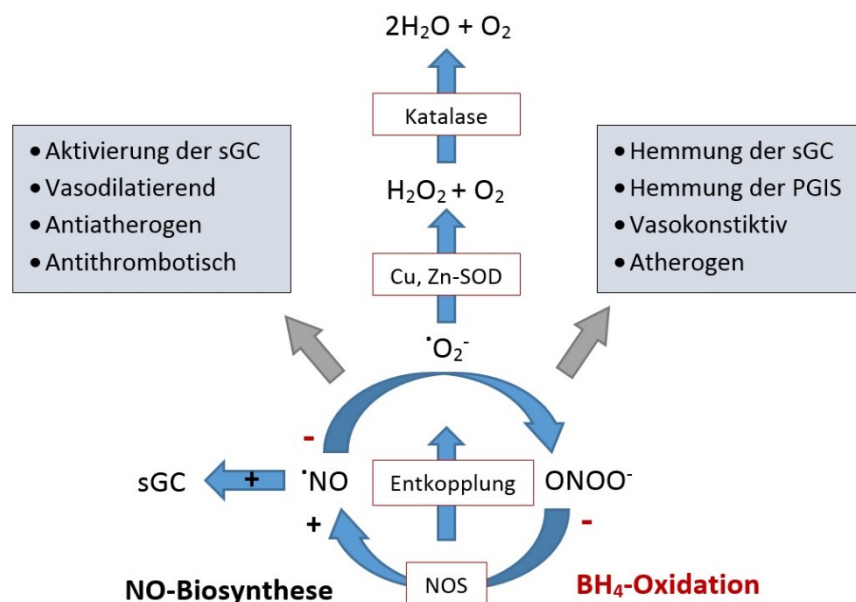


Abbildung 3: Die Wechselwirkung zwischen NO und Superoxid und die Prozesse, bei denen diese eine Rolle spielt. *Modifiziert aus (42).*

Die Tatsache, dass Radikale in niedrigen Konzentrationen auch physiologische Funktionen in der Signaltransduktion übernehmen, zeigt NO anhand der Modulation des Gefäßtonus, aber auch Superoxid und Peroxynitrit anhand der Redoxregulation verschiedener enzymatischer Systeme über Thioloxydation, S-Nitrosylierung, Tyrosinnitrierung und ihrer anschließenden regulatorischen Vorgänge. Konkrete Beispiele dafür repräsentieren die Modulation der Aktivität der Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) und damit die Prostaglandin-/Thromboxan-Bildung, Modulation der mitochondrialen Atmungskette, sowie Aktivierung der Proteinkinase-C durch Wasserstoffperoxid⁽⁴²⁾.

Oxidativer Stress ist eine pathophysiologische Situation, in der die Produktion an Superoxidradikalen die Produktion von NO übersteigt bzw. generell mehr ROS generiert werden als die Zelle abbauen kann, so dass überschüssige Superoxidradikale sowie das gebildete Peroxynitrit frei in der Zelle vorliegen, wo sie die Funktion oder Struktur von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren direkt beeinflussen können^(43, 44). Diese Situation kann durch verschiedene systemische Einflüsse hervorgerufen werden, die zu einer Überaktivierung der nachfolgend genannten Superoxidquellen führen.

Für die Entstehung der ROS sind hauptsächlich NADPH-Oxidasen (Nox), die Xanthinoxidase, die mitochondriale Atmungskette und entkoppelte NO-Synthasen (NOS) verantwortlich:

- **NADPH-Oxidasen** sind Multi-Enzym-Komplexe. Mittlerweile wurden mehrere Isoformen von NADPH-Oxidase entdeckt, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und sich maßgeblich in ihrer Funktion unterscheiden⁽⁴²⁾. Die verschiedenen Isoformen der NADPH-Oxidase und ihre Vorkommensorte sind in der Tabelle 2 dargestellt⁽⁴⁵⁾. Die phagozytäre Isoform (Nox2) benötigt für ihre Aktivierung eine Translokation der zytosolischen Untereinheiten (z.B. p47phox, p67phox, rac1) an die membranständigen Untereinheiten (z.B. gp91phox, p22phox), um Elektronen von NADPH auf Sauerstoff zu übertragen und Superoxid zu bilden. Die Nox1 wird ähnlich wie die Nox2 durch Translokation der zytosolischen regulatorischen Untereinheiten NoxO1 und NoxA1 aktiviert, wohingegen die Regulation der Nox4 wohl überwiegend auf Expressionsebene stattfindet und die Nox4 dadurch als konstitutiv aktiv bezeichnet wird⁽⁴⁶⁾. Durch die permanente Bereitstellung eines niedrigen Wasserstoffperoxidspiegels reguliert die Nox4 vermutlich auch wichtige zelluläre

Funktionen wie Differenzierung, Proliferation und Migration ⁽⁴⁷⁾. Die Nox5 wird in den Nagetieren nicht expremiert, daher sind die traditionellen Studien mit Mäusen und Ratten für diese Isoform nicht möglich; die genaue pathophysiologische Rolle von Nox5 ist noch nicht vollständig bekannt. Eine erhöhte Expression der Nox5 wurde allerdings in vielen humanen Erkrankungen beobachtet ⁽⁴⁸⁾. DUOXs (NOX/DUOX-Familie) sind ebenfalls eine neu entdeckte Reihe von NADPH-Oxidase-Homologen, die die oxidative Basis für die Biosynthese der Schilddrüsenhormone bereitstellen ⁽⁴⁹⁾. Sie kommen zudem im Epithel der exokrinen Drüsen sowie in der Schleimhaut des Gastrointestinal- und Respirationstraktes vor; hier ist ihre Funktion jedoch noch nicht vollständig klar ⁽⁵⁰⁾.

Tabelle 2: Isoformen der NADPH-Oxidase

Isoform	Gewebe
Nox 1	Kolon, glatte Muskulatur, Uterus, Prostata
Nox 2	Phagozyten, Endothel, Myokard, Lunge
Nox 3	Innenohr, Niere, Lunge, Milz
Nox 4	Niere, Endothel, Myokard
Nox 5	Lymphgewebe, Gehirn
Duox	Schilddrüse, Epithel der exokrinen Drüsen, Schleimhaut der Gastrointestinal- und Respirationstrakt

- **Xanthinoxidase** ist ein Molybdän-enthaltendes Enzym, das unter physiologischen Bedingungen als Dehydrogenase Form vorliegt und eine wichtige Rolle bei dem Purinabbau spielt. Als Dehydrogenase bildet es aus Hypoxanthin über Xanthin letztendlich Harnsäure und dabei überträgt zwei Elektronen auf NAD⁺. Unter pathologischen Bedingungen kommt es durch oxidative und proteolytische Veränderungen zur Umwandlung dieses Enzyms in eine Oxidase, die Elektronen auf Sauerstoff überträgt und Superoxid bildet ^(42, 51). Die Xanthinoxidase bindet an das Endothel und bildet dort Radikale. Somit spielt dieses Enzym bei Dysregulation der

endothelialen Gefäßfunktion und kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle (51).

- **Die mitochondriale Atmungskette** präsentiert vielleicht die wichtigste aller Quellen für oxidativen Stress. Die mitochondriale Atmungskette besteht aus Multi-Enzym-Komplexen, die während der mitochondrialen Atmung unvorstellbar große Mengen von Elektronen zur Energiegewinnung transportieren und auf Wasserstoff übertragen, wobei Wasser und ATP als die wichtigste „Energiewährung“ des Körpers entsteht. Diese Enzym-Komplexe, insbesondere der Komplex I und III, können durch oxidative Modifikationen entkoppelt werden und Superoxid generieren (52). Die mitochondriale ROS Bildung wird maßgeblich durch ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) reguliert (53).

- **Die Entkopplung der eNOS** gilt als eine weitere wichtige Quelle für oxidativen Stress (12, 54). Die NO-Synthase (NOS) ist in drei unterschiedlichen Isoformen zu finden, zudem wird eine vierte mitochondriale Isoform postuliert (55, 56) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Isoformen der NO-Synthase

Isoform	Gewebe
nNOS (neuronal) oder NOS I	Gehirn und Nerven
iNOS (inducible) oder NOS II	Immunzellen, glatte Muskelzelle, und viele andere Zelltypen
eNOS (endothelial) oder NOS III	Endothelzellen , Kardiomyozyten und viele andere Zelltypen
mtNOS (mitochondrial) oder NOS IV	Postuliert für Mitochondrien

eNOS ist ein Homodimer, welches sauerstoffabhängig die Oxidation von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid katalysiert. Dabei werden die Elektronen vom Cofaktor NADPH über die Reduktase-Domäne (FAD, FMN) einer Untereinheit auf die Oxygenase-Domäne der zweiten Untereinheit überträgt. Die Elektronenübertragung auf das Eisen-Porphyrin wird durch Tetrahydrobiopterin (BH_4) gewährleistet und reaktive Eisen-Sauerstoffintermediate werden durch BH_4 stabilisiert. Unter oxidativem Stress kann

es zu einer Unterbrechung des Elektronenflusses, zu strukturellen Änderungen und sogar zu einem Auseinanderbrechen des eNOS-Dimers kommen. So können die Elektronen nicht mehr auf das natürliche Substrat L-Arginin übertragen werden, sondern auf Sauerstoff und zwar unter Superoxid-Bildung (Abbildung 4) ⁽⁴²⁾. Eine partiell entkoppelte NOS bildet Superoxid und Stickstoffmonoxid und wird daher als Peroxynitritsynthase bezeichnet, oder auch Janus-gesichtiges Enzym, da es von einer protektiven NO Synthase zu einer schädlichen Superoxidsynthase umschalten kann. Studien zeigen, dass die sogenannten „kindling radicals“, die von Mitochondrien oder NADPH-Oxidasen stammen, zu einer Entkopplung der NOS und dadurch zur Senkung der NO-Bioverfügbarkeit und vermehrten Superoxid- und Peroxynitritbildung führen können ⁽⁴¹⁾.

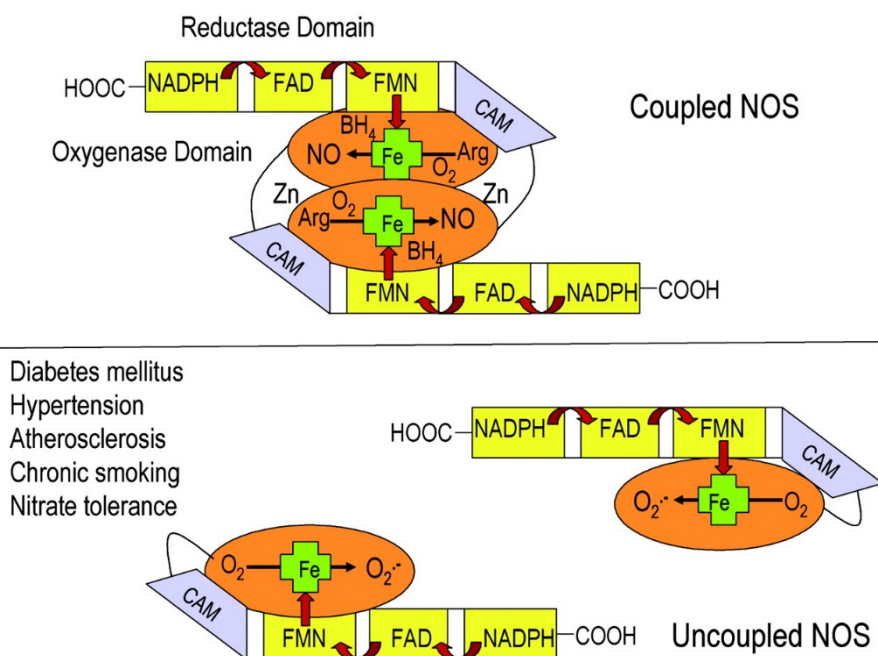


Abbildung 4: Entkopplung der NO-Synthase. *Übernommen aus (54)*

5.4 Endothelfunktion und -dysfunktion

Das Endothel wurde ursprünglich als eine einlagige kontinuierliche Zellschicht an der Innenwand der Gefäße definiert, die das Gefäßgewebe gegen das zirkulierende Blut abgrenzt. Im 20. Jahrhundert wurde es jedoch auf Grund seiner Zellzahl von ca. 5×10^{13} , Masse von insgesamt ca. 1,5 kg, und Oberfläche von ca. 1000 m², sowie seiner Schlüsselrolle in der strategischen anatomischen Position zwischen dem

intravasalen Raum und dem Gefäßmuskulatur der Media als ein eigenständiges Organ aufgefasst ⁽⁵⁷⁾. Neben seiner Barrierefunktion produziert das Endothel vasoaktive, Matrix- und Wachstums-modulierende Substanzen und übt somit auch wesentliche auto-/parakrine Funktionen aus ^(58, 59). Es steuert den Gefäßtonus, reguliert die Blutgerinnung sowie die Adhäsion und transendotheliale Migration der Blutzellen, moduliert das Gefäßwachstum und beeinflusst die Strukturierung der extrazellulären Matrix. Dabei spielt Stickstoffmonoxid (*NO) die Rolle eines zentralen Mediators.

Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin über zwei Oxidationsschritte gebildet. Diese Reaktion wird in den Endothelzellen durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert. Wegen seiner lipophilen Eigenschaften kann NO die Zellmembran passieren und zum glatten Gefäßmuskel diffundieren, wo es durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) intrazellulär zu erhöhten cGMP-Spiegeln führt, die über eine Senkung der intrazellulären Calcium-Spiegel letztendlich zur Vasorelaxation führen. Eine Vielzahl von mechanischen, hormonellen und pharmakologischen Stimuli kann zur NO-Freisetzung führen, hierzu zählen beispielsweise die pulsatile Dehnung der Gefäßwand, Acetylcholin oder Calcium-Ionophore A23187 ⁽⁶⁰⁾.

Die Fähigkeit der Gefäße zur Vasodilatation ist stark mit einer intakten Endothelfunktion verbunden. Nur ein intaktes Endothel garantiert eine ausreichende NO-Bioverfügbarkeit. Die NO-vermittelte Vasodilatation wirkt der physiologisch durch humorale und neuronale Einflüsse erzeugten Spannung der Gefäßmuskulatur entgegen.

Ist die Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit eingeschränkt, sei es durch die Inaktivierung von Stickstoffmonoxid durch Superoxid, durch eine geringere Produktion oder eine verminderte Wirkung am glatten Gefäßmuskel, kommt es zu einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation. Dies beschreibt den Zustand einer *endothelialen Dysfunktion*. Obwohl die Ursachen endothelialer Dysfunktion multifaktorieller Genese sind, ist eine Verbindung von endothelialer Dysfunktion und erhöhtem oxidativem Stress anzunehmen ⁽⁶¹⁾. Oxidativer Stress reduziert die Stickstoffmonoxid- Bioverfügbarkeit ^(62, 63). Die Halbwertszeit und biologische Aktivität von Stickstoffmonoxid werden somit durch ROS begrenzt. Superoxid reagiert schnell mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit. Diese Reaktion läuft schneller ab, als die Umwandlung von Superoxid zu dem Wasserstoffperoxid durch die Superoxiddismutase. Hohe Konzentrationen an Peroxynitrit wirken zytotoxisch ⁽⁶⁴⁾.

Peroxyinitrit kann zur Entkopplung der eNOS durch Oxidation des Kofaktors Tetrahydrobiopterin und des Zink-Thiolatkomplexes und somit zu einer weiteren Erhöhung des oxidativen Stresses führen ^(65, 66).

Am intakten Endothel führen die endotheliale NO-Produktion und anderen Autakoiden zur Herabsetzung des Gefäßtonus, Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Blutgerinnung und Leukozytenadhäsion, zur Hemmung der Proliferation der Gefäßmuskulatur und Apoptose. Alle diese Faktoren wirken *anti-atherosklerotisch* ⁽⁶⁷⁾. Durch Verletzung, Entzündung oder kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie und Rauchen verliert das Endothel nicht nur seine protektiven Eigenschaften, sondern entwickelt sogar *pro-atherosklerotisches* Potenzial. Die endotheliale Dysfunktion zeigt sich dann klinisch durch eine Abschwächung der endothel-abhängigen Relaxation ⁽⁴²⁾.

Die Abbildung 5 zeigt die Interaktion zwischen den Prozessen, die am oxidativen Stress, an der endothelialen Dysfunktion und der vaskulären Entzündung beteiligt sind.

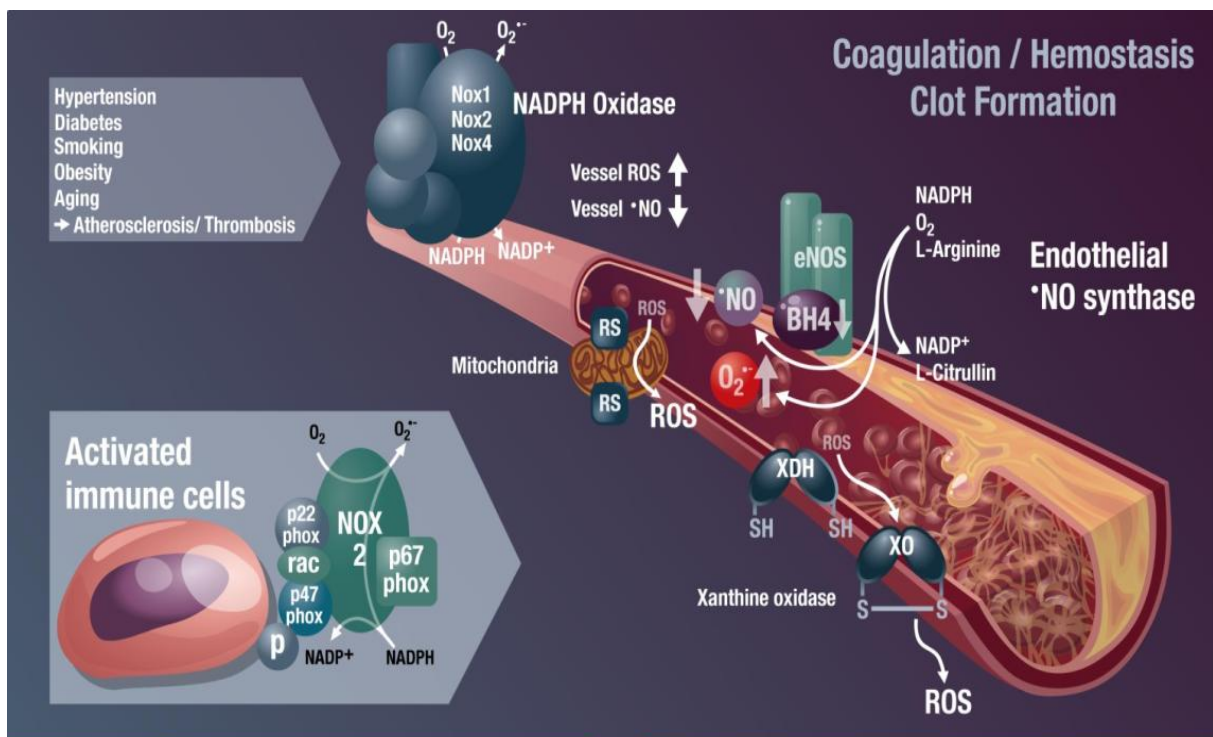


Abbildung 5: Interaktion zwischen oxidativem Stress, endothelialer Dysfunktion und vaskulärer Entzündung. ^{Modifiziert aus (12)}

1. Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren tragen zu einem proinflammatorischen Phenotyp des Gefäßes bei.
2. Infiltration der aktivierten Immunzellen führt durch Aktivierung der sekundären ROS-Quellen, wie vaskuläre NOX1, 2 und 4, mitochondriale Atmungskette, entkoppelte eNOS und Xanthinoxidase, zur Verstärkung des oxidativen Stresses.
3. Verstärkter oxidativer Stress induziert wiederum einen proinflammatorischen Phenotyp in der Gefäßwand und führt zu der Aktivierung der zirkulierenden Immunzellen

5.5 CD40/CD40L Signaling:

Die molekulare Pathophysiologie des CD40/CD40L-Systems beschäftigt die Wissenschaftler seit mehr als 30 Jahren. CD40 wurde zum ersten Mal 1984 auf den B-Lymphozyten detektiert ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Es konnte nur gezeigt werden, dass die Expression dieses ca. 50kDa großen Proteins mit der Zellzyklus-Progression der B-Zellen und interessanterweise mit der Bindung eines unbekanntes Liganden zusammenhängt ⁽⁷¹⁾. Später wurde aufgedeckt, dass die Aktivierung der B-Lymphozyten eher von dem direkten Kontakt mit T-Helferzellen als von den löslichen Zytokinen abhängig ist ^(72, 73) und dabei spielt die Interaktion eines integralen Membranproteins mit CD40 eine zentrale Rolle. Dieses Protein wurde CD40 Ligand (CD40L, CD154, gp39) genannt ⁽⁷⁴⁻⁷⁹⁾. Danach richteten die meisten Studien ihren Fokus auf die Bedeutung des CD40/CD40L-Signalweges bei der Wechselwirkung zwischen B- und T-Lymphozyten. Später wurde festgestellt, dass Mutationen im CD40- oder CD40L-Gen für das Hyper-IgM-Syndrom (HIGM) verantwortlich sind ^(80, 81); eine Immuninsuffizienz mit x-chromosomalem Erbgang, die mit IgA- und IgG-Mangel einhergeht. HIGM-Patienten leiden an einer Vielzahl von chronischen Infektionen, die ohne prophylaktische Behandlung gegen Infektionen (z.B. Antibiotika und intravenöse Immunglobulin Gabe) mit einem letalen Ausgang im jungen Alter verbunden sein können. In den letzten 30 Jahren ergab sich, dass die CD40/CD40L-Dyade an vielen verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist und von vielen unterschiedlichen Zellarten exprimiert wird. Es ist heute bekannt, dass die CD40/CD40L-Dyade eine wichtige Rolle bei diversen Krankheiten, wie zum Beispiel Arthritis ⁽⁸²⁾, M. Alzheimer ⁽⁸³⁾, Lupus Erythematodes ⁽⁸⁴⁾, Hashimoto Thyreoditis ^(85, 86), Behcet-Syndrom ⁽⁸⁷⁾, Abstoßung des Transplantates ⁽⁸⁸⁾, Diabetes mellitus ⁽⁸⁹⁾ und Atherosklerose ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾ spielt.

5.5.1 Molekulare und zelluläre Eigenschaften von CD40 und CD40L:

CD40:

CD40 ist ein Typ 1-transmembranärer Glykoproteinrezeptor mit einem Molekulargewicht von 47-48 kDa. Er besteht aus 277 Aminosäuren, die durch eine 1,5 kb langen mRNA codiert wird. Das entsprechende Gen ist auf der q12-q13.2 Region des Humanen Chromosoms 20 lokalisiert ⁽⁹³⁾.

CD40 ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie (TNFR-SF). Es besteht aus einer intra-, einer trans- und einer extrazellulären Domäne mit jeweils 62, 22 und 171 Aminosäuren. Die extrazelluläre Domäne trägt, wie viele andere Mitglieder dieser Familie, mehrere Cystein-haltige Sequenzwiederholungen, besteht aus drei Subregionen, die jeweils mit einer oder zwei Disulfidbindungen stabilisiert werden, und endet in einem N-Terminus^(80, 94, 95). Es wird angenommen, dass CD40L an die zweite und die dritte Subregion der extrazellulären Domäne bindet⁽⁹³⁾.

CD40 wird hauptsächlich auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z.B. B-Zellen, Makrophagen/Monozyten und dendritischen Zellen gefunden^(80, 95, 96). Außerdem exprimieren viele andere Zellarten dieses Protein, darunter Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten⁽⁹⁶⁻¹⁰⁰⁾. CD40 kann sich in der Zellmembran sowohl als Monomer als auch als Dimer oder Trimer finden. Es wurde gezeigt, dass die Dimer-Form für die CD40-vermittelte Signaltransduktion essenziell ist; während die Trimer-Form eine verstärkende Wirkung auf die Signaltransduktion ausübt^(101, 102).

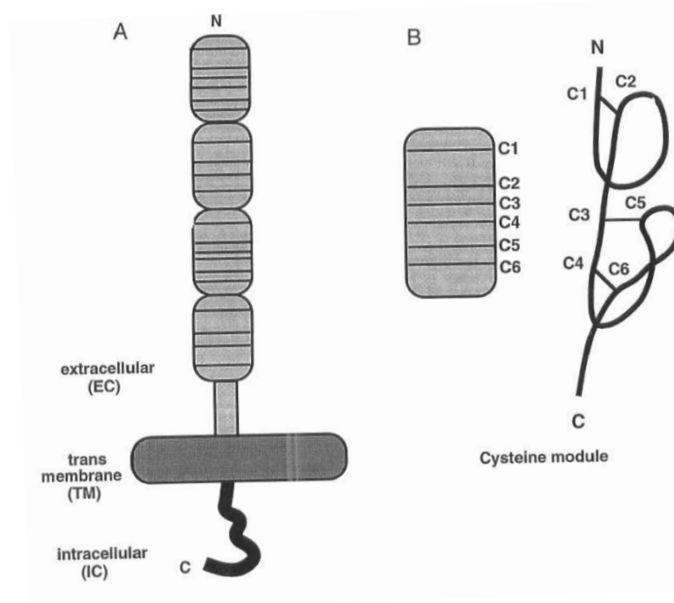


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur des CD40-Moleküls. Die extrazelluläre Domäne ist Cysteinreich. Die horizontalen Linien zeigen die Cysteinreste. *Übernommen aus (103)*

CD40L:

CD40 Ligand (CD40L, gp39, TRAP oder CD154) ist ein Typ II-transmembranäres Protein und Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie. Es wird von einer 2,3 kb

mRNA kodiert und enthält 261 Aminosäuren. Das entsprechende Gen befindet sich auf dem X-Chromosom (q26.3–q27.1). Das Protein besteht aus einer intra-, einer trans- und einer extrazellulären Domäne mit jeweils 22, 24 und 214 Aminosäuren ⁽⁹⁵⁾. CD40L kommt in zwei verschiedenen Formen vor: eine transmembranäre Form mit einem Molekulargewicht von 33 kDa und eine lösliche Form mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Die lösliche Form, sCD40L, ist das Produkt eines Spaltungsprozesses des 33 kDa CD40L Moleküls, die vermutlich von den ADAM-Metalloproteasen katalysiert wird ⁽¹⁰⁴⁾. Aufgrund der nahen Verwandtschaft des sCD40L zu TNF- α , kommen die TNF- α konvertierenden Enzyme (TACE) auch als potenzielle Katalysatoren dieses Prozesses in Betracht ^(105, 106).

CD40L wird, wie CD40 auch, von vielen verschiedenen Zelltypen (e.g. Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Thrombozyten) exprimiert, jedoch im Gegensatz zu CD40-Expression nicht dauerhaft und nur unter Induktion ⁽⁹³⁾.

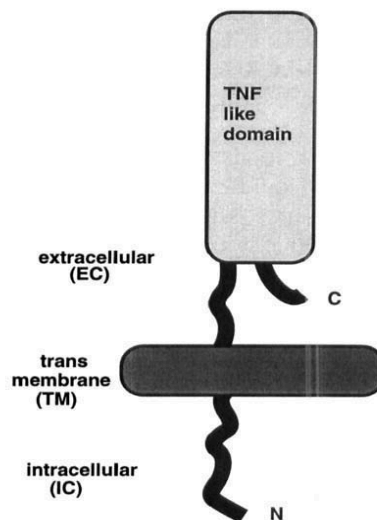


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur des CD40L-Moleküls. *Übernommen aus (103)*

5.5.2 CD40L in der Immunantwort und Entzündung:

Schon in den ersten Studien über die Rolle von CD40L in der Immunantwort wurde festgestellt, dass CD40L sowohl an den zellulären als auch an den humoralen Immunprozessen beteiligt ist. Die Aktivierung der B-Zellen durch CD40L erwies sich als ein unerlässlicher Schritt bei der Proliferation, Differenzierung und Reifungsprozessen der Lymphozyten, sowie Isotyp-Wechsel dieser Zellen ⁽¹⁰⁷⁾. Es ergab sich, dass die Interaktion zwischen CD40L und CD40 die Zytokinbildung (IL-6,

IL-10, TNF- α , LT- α), Expression von Adhäsionsmolekülen und ko-stimulatorischen Rezeptoren (interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM), CD23, B7.2/CD80, B7.2/CD86), Klasse I-II MHC sowie TAP-assoziierten Transportern auf den B-Zellen beeinflusst ⁽¹⁰⁸⁾. Die signifikante Rolle des CD40L/CD40-System in der Immunantwort bestätigte sich durch die Entdeckung der CD40L-Gen Mutation bei HIGM ^(80, 81).

Außerdem führt die Bindung des CD40L an den auf den Endothelzellen und Fibroblasten befindlichen CD40 (Proteinrezeptor) zu einer erhöhten Ausschüttung der Metalloproteasen und einer erhöhten Produktion der Chemokine (IL-8, MCP-1, Makrophagen-inflammatorisches Protein (MIP)-1 α , RANTES) und Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α). Dies lockt wiederum die Lymphozyten zum Entzündungsherd und verstärkt die Expression der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin), die für die Rekrutierung der Monozyten und Lymphozyten verantwortlich sind. So kommt es zu ihrer Akkumulation in der inneren Gefäßmembran ⁽¹⁰⁹⁾.

CD40L/CD40-Interaktion führt zur Überexpression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und einem Überschuss von Prostaglandin-E2 (PGE2) ⁽¹¹⁰⁾. Der sCD40L kann die Thrombozyten aktivieren und β -Thromboglobulin (β -TG) und 5-Hydroxytryptamin Sekretion stimulieren; während die transmembranäre Form, CD40L die Sekretion von RANTES, ein Protein mit starken inflammatorischen Merkmalen, von Thrombozyten auslöst ^(111, 112).

5.5.3 Die CD40/CD40L-Dyade und Adipositas:

In den letzten Jahren wurde bekannt, dass die Pathophysiologie der Adipositas mit einem chronischen, niedergradigen Entzündungszustand einhergeht ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Es ist ebenfalls bekannt, dass die CD40-CD40L Dyade, als ein ko-stimulatorisches Rezeptor-Ligand-Paar, in der Optimierung und der Regulation der Immunantwort sowie in den Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt.

CD40 wird, neben den Leukozyten, auf Präadipozyten sowie reifen Adipozyten exprimiert und sein Präsenz im Fettgewebe korreliert positiv mit dem BMI-Wert ⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾. Studien zeigen, dass seine Stimulation mit dem rekombinanten löslichen oder membrangebundenen CD40L das CD40-Signaling in Adipozyten induziert. Dies führt zur Aktivierung von ERK, p38, JNK, MAPK und NF- κ B und folglich Freisetzung von TNF, IL-6, MCP-1 und PAI-1 ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾. Diese proinflammatorischen Mediatoren

aktivieren im Weiteren Endothel- und Immunzellen, was einen generalisierten proinflammatorischen Zustand im Fettgewebe begünstigt. Dies gilt insbesondere für das viszerale Fettgewebe, denn es ist für Inflammation anfälliger als das subkutane Fettgewebe ⁽¹¹⁹⁾.

5.5.4 Die CD40/CD40L-Dyade und Atherosklerose:

Da die atherosklerotische Läsion viele verschiedene Zellen enthält, die weitgehend an dem CD40/CD40L-Signaling beteiligt sind ^(120, 121), konnte vermutet und später nachgewiesen werden, dass die CD40L-Expression in Plaque-Zellen bei Menschen mit der Instabilität der atherosklerotischen Plaque korreliert ⁽¹²²⁾ und zur Plaque Ruptur beiträgt; denn die CD40/CD40L-Dyade kann einerseits die Produktion von interstitiellem Kollagen in den Zellen der Gefäßmuskulatur vermindern, andererseits kann sie die Bildung der MMP verstärken ⁽¹²³⁾.

Außerdem stellt sCD40L, das überwiegend von Thrombozyten nach ihrer Aktivierung abgespalten wird, einen hilfreichen Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Gesteigerte sCD40L-Werte sind mit Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Hypertonie, ischämischem Insult und akutem Koronarsyndrom assoziiert und repräsentieren prognostische Relevanz für die rezidivierenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen ⁽¹²⁴⁻¹³⁰⁾.

Die proinflammatorische und prothrombotische Aktivität des CD40/CD40L-Systems in Diabetes mellitus, Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden ^(121, 131). Es konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter sCD40L-Spiegel ein prognostischer Risikofaktor für Herzinfarkt, rezidivierende Angina pectoris bei akutem Koronarsyndrom und zukünftige kardiovaskuläre Episode bei gesunden Frauen darstellen kann ⁽¹³²⁾. Es ist ebenso ein zuverlässiger Marker für Patientengruppen mit ACS und hohem Risiko für Herzereignisse ⁽¹²⁹⁾.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Tiere

C57BL/6 Maus	Jackson Laboratories	Bar Harbor, USA
CD40L knockout Maus	Jackson Laboratories via Dr. M. Radsak and H. Schild, Institut für Immunologie, UM Mainz	Bar Harbor, USA

6.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Promega, Mannheim, Deutschland
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamide/bis 40%	Bio-Rad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Aqua B. Braun	B.Braun, Melsungen
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad DC Protein Assay Reagent S	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Braunol®	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Dihydroethidium	Fluka, Seelze, Deutschland
DMEM-NM	Gibco, Darmstadt, Deutschland
ECL™ Western Blotting Reagent	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Heparin 25000IU/5ml	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Isoflurane®	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Lucigenin	Fluka, Seelze, Deutschland
NADPH	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

Phenylmethylsulphonylfluorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Pre-stained protein ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek®	Sakura, Staufen, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

6.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

6.1.3.1 Organbadpuffer (Krebs-Henseleit buffer)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Natriumchlorid	118,3 mM
Kaliumchlorid	4,69 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat	1,03 mM
Glucose	11,1 mM
Natriumhydrogencarbonat	25,00 mM
Glukose	11,1 mM
pH 7,4	

6.1.3.2 Krebs-HEPES Puffer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Natriumchlorid	99,01 mM
Kaliumchlorid	4,69 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Magnesiumsulfat	1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat	1,03 mM
Glucose	11,1 mM
Na ⁺ -HEPES	20 mM
Natriumhydrogencarbonat	25,00 mM
pH 7,4	

6.1.3.3 Inhibitorenpufer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
---------------------	----------------------

Aprotinin (1,2 mg/ml)	100 µl
Pepstatin (2,5mg/ml)	40 µl
Leupeptin (5mg/ml)	10 µl
auf 10 ml Krebs-Hepes Puffer, wie zuvor beschrieben.	

6.1.3.4 Tris-Puffer für Membranfraktion

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl	50 mM
EDTA free COMPLETE	1 Tablette
auf 50 ml Tris-Puffer; pH 7,4	

6.1.3.5 Tris-DTT-Puffer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Membranfraktion Tris-Puffer pH 7,4	10 ml
DTT	1 mM

6.1.3.6 Homogenisierungspuffer (HG-Puffer)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl	20 mM
Sucrose	250 mM
EGTA	3 mM
EDTA	20 mM

6.1.3.7 Homogenisierungslösung (Hg-Lösung)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl	20 mM
Sucrose	250 mM
EGTA	3 mM
EDTA	20 mM
pH	7,5
Auf 10ml H ₂ O bidest +	
Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)	100 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)	10 µl
PMSF (0,1 M; in Methanol)	50 µl
Triton-X-100	100 (1% v/v) µl

6.1.3.8 3x Laemmli-Puffer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl (1M, pH 6,8)	1880 µl
SDS (20%)	3000 µl
Glycerol	3000 µl
1% Bromphenolblau in a.d.	300 µl
H ₂ O bidest	320 µl
2-Mercaptoethanol	150 µl

6.1.3.9 Laufpuffer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	3,5 mM
pH nicht adjustiert	

6.1.3.10 Transferpuffer

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-base	25 mM
Glycin	192 mM
Auf 800ml H ₂ O bidest + 200ml Methanol	
pH nicht adjustiert	

6.1.3.11 Waschpuffer TBS (10x)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-base	200 mM
NaCl	1,4 M
pH 7,6	

6.1.3.12 Waschpuffer TBS-T

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Waschpuffer TBS	1x
Tween-20	1% (v/v)
pH nicht adjustiert	

6.1.3.13 *Waschpuffer PBS (10x)*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
NaCl	1,5 M
Na ₂ HPO ₄	200 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
pH 7,6	

6.1.3.14 *Waschpuffer PBS-T*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Waschpuffer PBS	1x
Tween-20	1% (v/v)
pH nicht adjustiert	

6.1.3.15 *Waschpuffer PBS-TT*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Waschpuffer PBS	1x
Tween-20	1% (v/v)
Triton-X-100	3% (v/v)
pH nicht adjustiert	

6.1.3.16 *Sammelgelpuffer*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl	0,5 M
pH 6,8	

6.1.3.17 *Trenngelpuffer*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
Tris-HCl	1,5 M
pH 6,8	

6.1.3.18 *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS) 10% w/v*

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
SDS	10 g
Auf 100ml H ₂ O bidest.	

6.1.3.19 Ammoniumpersulfat (APS)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
APS	10 g
Auf 100ml H ₂ O bidest.	

6.1.3.20 Sammelgel (4%)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
H ₂ O- bidest.	3,2 ml
0,5M Tris (pH6,6)	1,2 ml
Acrylamid (40%)	1 ml
SDS (10%)	50 µl
APS (10%)	50 µl
TEMED	5 µl

6.1.3.21 Trenngel (7,5%)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
H ₂ O- bidest.	5,4 ml
1,5M Tris (pH8,8)	2,5 ml
Acrylamid (40%)	1,88 ml
SDS (10%)	100 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

6.1.3.22 Trenngel (10%)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
H ₂ O- bidest.	4,8 ml
1,5M Tris (pH8,8)	2,5 ml
Acrylamid (40%)	2,5 ml
SDS (10%)	100 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

6.1.3.23 Trenngel (12%)

<u>Substanzname</u>	<u>Substanzmenge</u>
H ₂ O- bidest.	4,3 ml
1,5M Tris (pH8,8)	2,5 ml
Acrylamid (40%)	3 ml
SDS (10%)	100 µl
APS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

6.1.4 Kits and Assays:

ABC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bio-Rad Protein assay	Bio-Rad, München, Deutschland
CD40L (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Human CCL5/RANTES Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CD40 Ligand/TNFSF5 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA Kit, no. MOB 00	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-6 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
iNOS (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
NOX-1 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
NOX-4 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
QuantiTect™ Probe RTPCR Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Fibrous Tissue Minikit	Quiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Foster City, USA
ICAM-1 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA
VCAM-1 (probe-and-primer)	Applied Biosystems, Foster City, USA

6.1.5 Antikörper

Alpha-Actinin	Sigma Aldrich Hamburg, Deutschland
CD40	Novus Biologicals, Littleton, UK
CD40L	Novus Biologicals, Littleton, UK

CD62P-FITC	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IL-6 (IHC)	Abcam, Cambridge, UK
NOX-2	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
p67phox	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Anti-Maus IgG	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Anti-Kaninchen IgG	Vector Lab., Burlingame, CA, USA

6.1.6 Geräte und Materialien

6.1.6.1 Allgemeine Laborausstattung

Axiocam MRm	Zeiss
Axiovert 40 CFL	Zeiss
Blotting-Anlage	BioRADLaboratories, München
Centro chemiluminescence plate reader	Berthold Technologies
Counter Lumat LB 9507	Bertold Technologies
Chromjet CH1	Spectra Physics
Cryostat Leica	Leica Biosystems, Nussloch
Durchlichtmikroskop MZ 5400	Krüss
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern
Feinwaage LE225D	Sartorius
Filterpapier (Mini Trans- Blot®)	BioRADLaboratories, München
Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 40 CFL	Zeiss
Heizrührer MR 3001	Heidolph
Homogenisator RW16 Basic	IKA Werk Laboratory Equipment
Isometrische Transducer	Kent, Torrington, CO, USA
Isometrische Transducer	Radnoti, Monrovia, CA, USA
Kamera: Axiocam MRm	Zeiss
Microplate reader MRX 2	Magellan Biosciences/Dynex
Mikropräparierschere + Pinzette	Fine Science Tools
Minifold® I System (DotBlot System)	Whatman GmbH-Schleicher und Schuell, Dassel
MiniShaker M52	Laboratory Equipment
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Organbath	Kent, Torrington, CO, USA

Organbath	Radnoti, Monrovia, CA, USA
pH-Meter Microprozessor PH211	Hanna Instruments
Photometer Helios alpha	Thermo electron corporation
Pipetten: Pipetman	Gilson
Power Pac Basic	BioRADLaboratories, München
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney, Australien
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney, Australien
RührerMR 1000	Heidolph
S- Monovette Z- Gel	Sarstedt
Test Tube ThermostatTCR 100	Roth
Thermomixer comfort MTP 5355	Eppendorf
Thermostat 2761	Eppendorf
Tissue Lyser	Qiagen
Tissue-Tek® OCT Compound	Johnson & Johnson, Belgien
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries
Waage KB800-2	Kern
Western Blot Imager, CHEMICAM HR 16	Intas, Göttingen
Zentrifugen:	
Mikro22R Typ 1110	Hettich
Mini Spin Plus 5435	Eppendorf
Rotofix 32 Typ 1205 (Serum)	Hettich
Ultrazentrifuge Discovery M120SE	Sorvall Kendro Laboratory Products

6.1.6.2 Software

Adobe Photoshop CS2, Version 9.0	Adobe Systems
Axiovision 4.3	Carl Zeiss Microimaging
FlowJo Software	Tree Star
Gel- Pro Analyzer™ Version 6.0	Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA
Revelation 4.25	ilf bioserve, D-89129 Langenau

6.2 Methoden

6.2.1 Tiermodell

Alle tierexperimentellen Versuche wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und der Genehmigung des Landesuntersuchungsamtes Koblenz, Rheinland-Pfalz, durchgeführt (Genehmigungsnummer: 21 177-07/G 11-1-020). Vorab überprüfte und genehmigte die Ethikkommission der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Tieren.

Für die Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit wurden CD40L^{-/-} knockout Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund und Wildtyp C57BL/6 Mäuse verwendet. Um die Tiere auf den pathologischen Zustand der Adipositas zu bringen, wurden sie für 16 Wochen mit einer fettreichen Diät (HFD: 34% Fett, 1.25% Cholesterin) gefüttert.

6.2.2 Organentnahme und Aortenpräparation

Die Tiere wurden durch eine Isofluran-Überdosis in eine tiefe Narkose versetzt. Dann wurden das Abdomen und der Thorax eröffnet. Um die postmortale Blutkoagulation zu verhindern, wurden 200 IU Heparin in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens injiziert. Anschließend wurde so viel Blut wie möglich aus der rechten Kammer des Herzens entnommen. Ein Teil der entnommenen Blutprobe wurde in eine Citrat-Monovette und der Rest in eine Serum-Gel-Monovette überführt, die später zentrifugiert wurden. Das Serum wurde in weiteren Versuchsreihen eingesetzt. Danach wurde das Herz von den abgehenden Gefäßen getrennt und sofort in ein Gefäß mit eisgekühltem Krebs-HEPES-Puffer (s. 6.1.3.2) eingebracht.

Anschließend wurde die Aorta, unter Vermeidung von Zugspannung, von den abgehenden Gefäßen getrennt und explantiert. Sofort nach der Entnahme wurde die Aorta in den eisgekühlten Krebs-HEPES-Puffer überführt und im Weiteren nur noch auf Eis bearbeitet. Die Aorta wurde dann unter dem Lichtmikroskop und mit feinchirurgischer Federschere aus dem perivaskulären Bindegewebe vorsichtig freipräpariert. Ziel war es, die Endothelzellschicht der Aorta vollständig zu erhalten,

sodass Quetschungen oder Dehnungen während der Präparation der Aorta vermieden wurden.

6.2.3 Organbadstudien mit isometrischer Spannungsmessung

Aus den frei präparierten Aorten wurden mit einem Skalpell 4 mm lange Aortenringe herausgeschnitten. Diese wurden auf zwei trianguläre Drähte aufgezogen, die am unteren Ende an einem festen Haken angebracht waren und am oberen Ende mit einem Kraftumwandler (Force-transducer) verbunden waren (Abbildung 8). Diese Apparatur konnte nun in ein Organbad eingebracht werden, das mit 25 ml Organbadpuffer (Krebs-Henseleit-Puffer; s. 6.1.3.1) befüllt war. Der Puffer wurde auf 37° C erwärmt und mit 95% CO₂ sowie 5% O₂ begast. Dieser Aufbau sollte eine physiologische Umgebung für die Gefäßzellen simulieren. Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(133, 134).

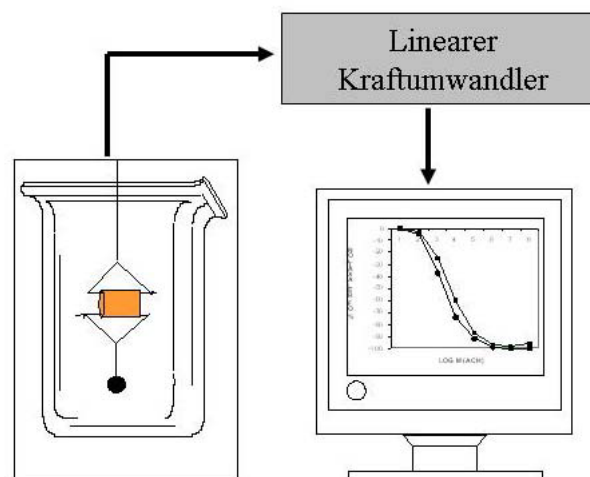


Abbildung 8: Schematische Darstellung der beschriebenen Organbadanlage. Der Aortenring ist durch feine Drähte mit dem Kraftwandler verbunden, so kann jede Veränderung der Gefäßweite registriert werden. Die so gewonnenen Daten werden per EDV weiterverarbeitet. Übernommen aus (135)

Eine manuelle Vorspannung der Aortenringe wurde angelegt. Dazu wurde die Basalspannung schrittweise (jeweils 7 min) von 0,4 g über 1,0 g, 1,6 g und 2,3 g auf 3,0 g erhöht. Darauffolgend wurde eine aufsteigende Menge an KCl in das Organbad gegeben (Finale Konzentration in mM: 5, 10, 20, 40, 80). Dies führte zu einer schrittweisen Konstriktion, die über den Kraftwandler aufgenommen und auf den Computer übertragen wurde. Nach Wiederholung des Vorgangs, konnte das KCl

ausgewaschen werden. Die KCl Konstriktion dient dem Gefäß als „Training“ und dem Test der vollen Funktion des Gefäßmuskels vor den eigentlichen Untersuchungen. Nachdem die Aorta ihre Basalspannung wieder erreicht hatte, wurde durch die Zugabe von Prostaglandintitration ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 3 μM final) eine Vorkontraktion der Aorta auf 40-50% der Maximalspannung bewirkt.

Zur Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation der Aorta, dienten aufsteigende, kummulierende Mengen an Acetylcholin (ACh). Die finale Konzentration wurde von 10^{-9} über $10^{-8,5}$, 10^{-8} , $10^{-7,5}$, 10^{-7} , $10^{-6,5}$, 10^{-6} auf $10^{-5,5}$ M erhöht. ACh wirkt bei intaktem Endothel als potenter Vasodilatator, indem es Rezeptorvermittelt und Calcium-abhängig zu einer NO-Freisetzung aus den Endothelzellen führt ⁽¹³⁶⁾, welches in den glatten Muskelzellen über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Vasodilatation zur Folge hat. Beschädigtes Endothel jedoch, ist nicht mehr in der Lage die NO-Freisetzung zu erhöhen. ACh wirkt dann über den muskarinergen AChR der glatten Gefäßmuskelzellen konstringierend – durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumspiegel in der Glattmuskelzelle kommt es direkt zu einer Aktivierung der Myosinleichtkettenkinase und damit erhöhter Kontraktilität der Actin-Myosin-Filamente. Dieses Phänomen bezeichnet man als paradoxe Vasokonstriktion ⁽¹³⁷⁾, die auch im Katheterlabor diagnostische Anwendung findet, um stenotische Bereiche in den Koronarien zu identifizieren – dafür wird ACh in steigenden Dosen mittels Infusionskatheter direkt in die Koronarien infundiert und dabei die Konstriktion/Vasodilatation der Gefäße im Angiogramm nach Verabreichung entsprechender Kontrastmittel beobachtet. Das bedeutet, dass ein intaktes Endothel, aus der Vorkontraktion heraus, gut relaxieren kann, während ein beschädigtes oder krankhaftes Endothel weniger gut relaxiert oder seltenen Fällen bei hohen ACh Konzentrationen sogar anfängt zu kontrahieren.

6.2.4 DHE-Mikrotopographie zur ROS-Detektion in Aortensegmenten

Dihydroethidin hat sich als Fluoreszenz Farbstoff für die Messung von Superoxidanionen (aber auch anderen ROS) in biologischen Proben sehr bewährt ⁽¹³⁸⁾. Daher ist es sogar möglich ROS-Quellen topographisch in intaktem Gewebe wie Aortensegmenten zu lokalisieren. Abbildung 9 zeigt die Oxidation von DHE durch Superoxid unter der Bildung von 2-Hydroxyethidium.

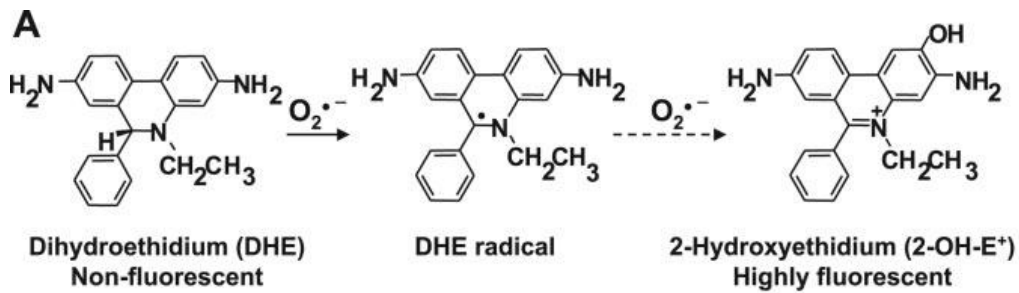


Abbildung 9: Die Reaktion von DHE mit Superoxid. Übernommen aus (139)

Eine Gewinnung von Aortenringsegmenten der Größe von 3-4 mm aus den Aorten wurde mit einem Skalpell vorgenommen. Die Aortenringsegmente inkubierten in Krebs-HEPES-Puffer bei 37°C für 10 min und wurden anschließend langsam in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Einbettmediums (Tissue Tek®) eingefroren. Aus den Aortenblöcken konnten mittels eines Kryotoms 8 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Zur Färbung mit Dihydroethidium (DHE, 1µM in PBS, 0,5% DMSO) inkubierten die Schnitte auf Objektträgern für 30 min auf einem Heizblock (37°C). In weiteren Untersuchungen erfolgte eine Inkubation mit NADPH-Oxidase Inhibitor VAS2870 (25mM) oder Superoxid-Radikalfänger PEG-SOD (200 mU/ml) vor der DHE-Färbung. Direkt darauffolgend konnten mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop von Zeiss, Bilder der Aorten mit AxioVision aufgenommen werden. Die Bilder der einzelnen Gruppen wurden mit Photoshop in einer Übersicht zusammengefügt und densitometrisch mit Hilfe des Programms GelProAnalyzer ausgewertet. DHE reagiert mit Superoxid zu 2 -Hydroxyethidium und unspezifisch mit Sauerstoffradikalen zu Ethidium. Die Produkte interkalieren mit der DNA und weisen eine rote Fluoreszenz auf (Anregung 480- 530 nm, Emission 560- 620 nm). Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe bereits publiziert angewendet⁽¹⁴⁰⁾.

6.2.5 Herstellung der Herzmembranfraktion

Das Herzgewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in Tris-DTT-Puffer (s. 6.1.3.5) homogenisiert (Glas-Glas-Homogenisierung).

Anschließend wurde die Membranfraktion des Herzgewebes durch die folgenden Zentrifugationsschritte von den restlichen Zellbestandteilen getrennt - die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(140, 141):

1. Zentrifugationsschritt: 6 Minuten, 2.000 x g, 4° C

Überstand wurde abgenommen, in neues Eppendorfgefäß überführt und in den nächsten Zentrifugationsschritt eingesetzt. Pellet wurde verworfen.

2. Zentrifugationsschritt: 20 Minuten, 20.000 x g, 4 ° C

Überstand wurde abgenommen, in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und in den nächsten Zentrifugationsschritt eingesetzt. Pellet wurde verworfen.

3. Zentrifugationsschritt: 60 Minuten, 100.000 x g, (in unserer Zentrifuge mit dem vorhandenen Rotor waren dies 42.000 RPM), 4° C

Der Überstand wurde verworfen, Pellet wurde in Tris-Puffer (ohne DTT; s. 6.1.3.4) resuspendiert.

6.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei hintereinander geschalteten Farbreaktionen ⁽¹⁴²⁾. Die erste Farbreaktion ist die Biuret-Reaktion, bei der Peptidbindungen in wässrig alkalischer Lösungen einen farbigen (dunkelvioletten) Komplex mit vorhandenen Kupfer(II)-Ionen eingehen ⁽¹⁴²⁾. Mit dieser Reaktion sind jedoch nur die Proteinkonzentrationen zwischen 1 und 10 µg/mL nachweisbar. Um diese Nachweisgrenze zu verbessern (0,1 bis 1 µg/mL), wird eine zweite Farbreaktion angeschlossen ⁽¹⁴³⁾. Die nächste Reaktion ist die Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen, die wiederum die Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau reduzieren. Daraus resultiert eine intensive Blaufärbung der Lösung, die zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 700 nm verfolgt werden kann. Die verwendeten Assay-Lösungen wurden von der Firma Biorad bezogen.

Die Herzfraktionsproben werden zunächst 1:20 mit 0,1%iger SDS Lösung verdünnt (475 µl 0,1%ig SDS + 25 µl Probe), als Nullabgleich (Blank) wurden 25 µl Tris-Puffer (s. 6.1.3.4) verwendet. Die so hergestellten Verdünnungen wurden dann zehn Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend 25 µl davon in Küvetten vorgelegt. Anschließend wurden 125 µl der vorher hergestellten Mischung aus „Reagent A“ und „Reagent S“

(1.000 µl A + 20 µl S) und 1.000 µl „Reagent B“ in die Küvetten gegeben (Lösungen des kommerziellen Biorad Lowry Assays), vermischt und dann zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm (Photometer Helios alpha).

6.2.7 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies mittels Chemilumineszenz Assays

6.2.7.1 Lucigenin-basierte Chemilumineszenz

Der klassische Chemilumineszenz Assay zur Detektion von Superoxidanionen verwendet den Farbstoff Lucigenin (Bis-N-Methylacridiniumnitrat), der ausschließlich mit Superoxidanionen zu einem Dioxetan-Intermediat reagiert, welches dann zum Acridon-Derivat zerfällt. Dabei wird ein Photon Licht emittiert ⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾. Es ist darauf hinzuweisen, dass Lucigenin aufgrund seiner „redox-cycling“ Eigenschaften beim Einsatz hoher Konzentrationen (> 50 µM) und im Beisein von Xanthinoxidase, NADH oder NADPH selbst die Bildung von Superoxidanionen katalysieren kann. Diese Eigenschaften konnten allerdings bei niedrigeren Konzentrationen von Lucigenin (5µM) nicht beobachtet werden⁽¹⁴¹⁾. Lucigenin wurde in dieser Arbeit verwendet, um in isolierten Herzmembranfraktionen die Aktivität der NADPH-Oxidase über die Bildung von Superoxidanionen zu detektieren.

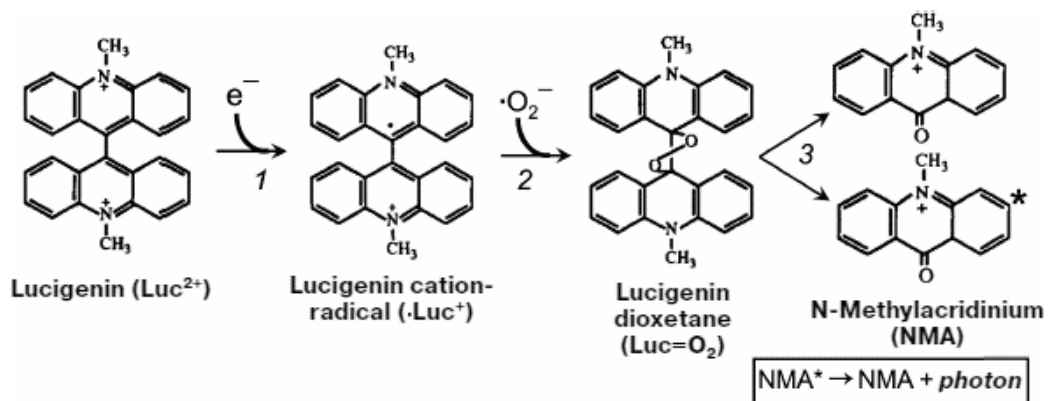


Abbildung 10: Superoxid und Lucigenin-Reaktion. *Übernommen aus (147)*

Die Herzmembranfraktionsproben wurden zunächst mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Lowry auf eine finale Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml in 500 µl PBS eingestellt und dann mit 5 µM Lucigenin versetzt. Die Produktion freier Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“, ROS) nach Stimulation mit NADPH (200 µM) wurde auf einem Luminometer (Lumat, Berthold) in Intervallen von 30 Sekunden

über einen Gesamtzeitraum von fünf Minuten detektiert. Die Signale wurden als Counts/mg Protein/Minute am Ende der Messzeit dargestellt. Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(140, 141).

6.2.8 Proteinextraktionen aus Gewebe

Die frei präparierten Aorten inkubierten für zehn Minuten bei 37° C in einem Protease-Inhibitorenmix aus Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin in KH-Puffer (s. 6.1.3.3). Dies verhinderte einen Abbau der Proteine durch körpereigene Proteasen.

Das entnommene Aortengewebe wurde zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert. Im Volumenverhältnis 1:1 wurde das gewonnene Pulver mit 4°C kalter Homogenisierungslösung (s. 6.1.3.7) versetzt und für eine Stunde inkubiert. Das nicht ionische Tensid Triton-X diente dazu Proteine aus der Zellmembran zu lösen. Um den Zelldetritus aus dem Homogenat zu beseitigen wurden die Proben bei 10.000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Im späteren Western-Blot musste gewährleistet sein, dass für jede Probe gleiche Mengen Protein eingesetzt wurden. Um die Proteinkonzentration der Homogenate zu bestimmen, wurde eine Standard-Proteinbestimmung nach Bradford mit kommerzieller Reaktionslösung durchgeführt⁽¹⁴⁸⁾. Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben im Verhältnis 2:1 mit Laemmli-Puffer versetzt (s. 6.1.3.8). Bei Proben, die für Dot-Blot oder Immunpräzipitation vorgesehen waren, wurde auf die Zugabe von Laemmli-Puffer verzichtet. Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(133, 149).

6.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration des Homogenats festzustellen, wurde eine photometrische Methode, die Proteinbestimmung nach Bradford, durchgeführt⁽¹⁴⁸⁾. Eine Vierfachbestimmung mit 80 µl der jeweiligen, in destilliertem Wasser (1:100), vorverdünnten Probe wurde mit 200 µl Roti-Quant-Reagenz (1:50 in aqua dest.) auf eine 96-Well-Platte vorgenommen. Der Farbstoff „Coomassie brilliant blue G 250“, welcher sich im Roti-Quant-Reagenz befindet, verschiebt sein Absorptionsmaximum unter Bindung an Proteine von 465nm zu 595nm. Damit stellt die Zunahme der

Absorption bei 595nm ein Maß für die vorhandene Proteinkonzentration der Probe dar. Mit bekannten Konzentrationen von BSA (bovines Serumalbumin) im Bereich von 1-50 ng/µl und einem Leerwert konnte eine Eichkurve erstellt werden. Mit Hilfe der Software „Revelation“ konnte aus den Absorptionswerten die Proteinkonzentration der Lysate errechnet werden.

6.2.10 SDS-PAGE und Western-Blot

Ziel der Western-Blot Methode, war die Identifikation und Quantifizierung bestimmter Proteine aus den gewonnen Proteingemischen. Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet ⁽¹⁵⁰⁾. Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer versetzt (s. 6.1.3.8) und bei 95° C für 5 Minuten inkubiert. Das darin enthaltene anionische Tensid SDS bewirkte eine Denaturierung der Proteine und führte zu einer gleichmäßigen Ladungs-Massen-Verteilung. 20 µg Proteingemisch wurde mit 20 µl Laemmli-Puffer auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Daraufhin folgte die elektrophoretische Auftrennung im Laufpuffer (s. 6.1.3.9) bei 130V mit konstanter Stromstärke in etwa 2-3 Stunden. Bromphenolblau im Laemmli-Puffer diente dabei zur Beobachtung der Laufmittelfront und Vermeidung, dass das Gel zu lange läuft und die Proteine am anderen Ende austreten und verloren gehen. Eine Größenzuordnung der aufgetrennten Proteinbanden erfolgte mittels eines Gewichtsstandards am rechten und linken Rand des Gels. Dort liefen ungefärbte bzw. gefärbte Protein-Gewichtsstandards, anhand derer sich die Molekularmasse der einzelnen Proteinbanden in den Proben zuordnen ließen (Abbildung 11).

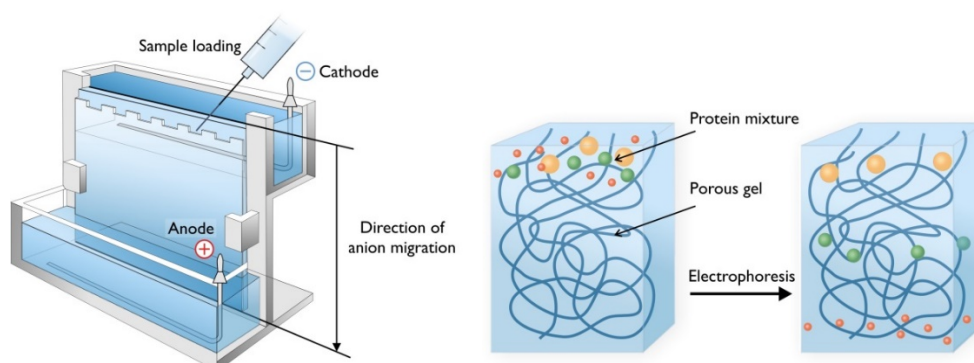


Abbildung 11: Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. *Übernommen aus (151)*

Nach der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Abbildung 12). Dazu wurden die

Membran, sowie Schwämme und Filterpapier in Transferpuffer (s. 6.1.3.10) eingetaucht. Das Gel wurde direkt auf die Membran platziert, die der anodischen Seite der Transferkammer zugewandt war. Bei konstanter Stromstärke von 200 mA fand der Proteintransfer in der in Eis eingebettete Transferkammer statt (2,5 h). Zur Lokalisation der gesuchten Proteinbanden wurde die Membran mit Ponceau-S angefärbt. Zur Vorbereitung der Antikörperinkubation wurden entsprechende Streifen aus der Membran geschnitten, die den Molekulargewichtsbereich umfasste, in dem ein bestimmtes Protein von Interesse zu finden sein musste. Der Proteinmarker Bench Mark®, der zuvor auf das Gel mit aufgetragen wurde, half bei der Orientierung.

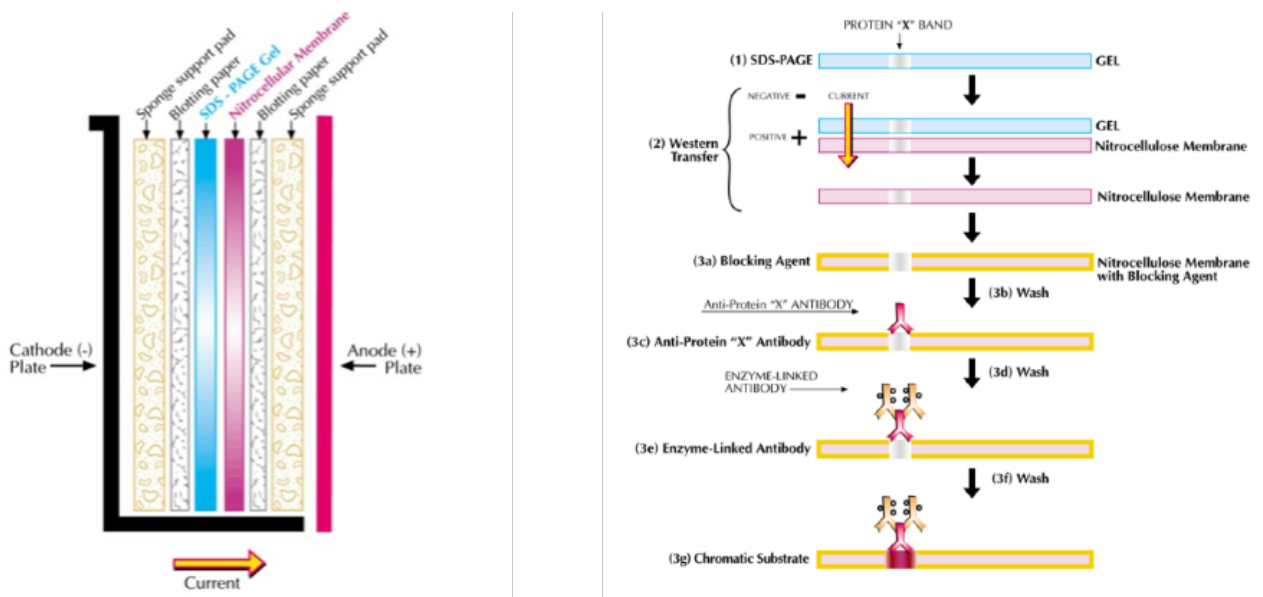


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Transferschritten beim Western-Blot Verfahren.
Übernommen aus (152)

Nach dem Entfärben der Membranstreifen mit dem jeweiligen Waschpuffer des zu inkubierenden Antikörpers, folgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für eine Stunde. Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem in Blockierungspuffer gelösten primären Antikörper (Tabelle 4) über Nacht bei 4°C.

Vor der Inkubation der Membranstreifen mit dem sekundären Antikörper wurden vier Waschschrte mit Waschpuffer für 5 Minuten durchgeführt. Dann konnte die Sekundärantikörperinkubation (Tabelle 5) vorgenommen werden, wobei der Sekundärantikörper der Spezies des Primärantikörpers angepasst wurde. Am Sekundärantikörper befand sich eine gekoppelte Meerrettich-Peroxidase, welche bei der Chemilumineszenzreaktion (ECL), das ECL-Reagenz in Gegenwart eines

Peroxids umsetzte (Abbildung 13). Überschüssiges ECL Reagenz wurde dann von der Membran entfernt. Daraufhin konnten in der Dunkelkammer mittels CCD Detektionskamera (Intas) die Ergebnisse aufgezeichnet werden. Die Belichtungszeit wurde nach bestmöglicher Beurteilbarkeit der Banden ausgewählt.

Tabelle 4: Primärantikörper die für Western-Blot und Dot-Blot verwendet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Waschpuffer/ Blockierungspuffer	Hersteller
IL-6	1:5000	PBS-T + 3 % BSA	Abcam, Cambridge, UK
p47 ^{phox}	1:500	TBS-T + 3 % BSA	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
NOX-2	1:500	TBS-T + 3 % BSA	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
α -Actinin*	1:2500	TBS-T + 3 % BSA	Sigma Aldrich Hamburg, Deutschland

* Alpha-Actin als ubiquitär exprimiertes Strukturprotein diene als Ladungskontrolle.

Tabelle 5: Sekundärantikörper die für Western-Blot und Dot-Blot verwendet wurden.

Antikörper	Verdünnung	Waschpuffer/ Blockierungspuffer	Hersteller
Anti-Maus	Es wurden die gleichen Puffer und Blockmedien verwendet wie für den primären Antikörper.		Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Anti-Kaninchen			

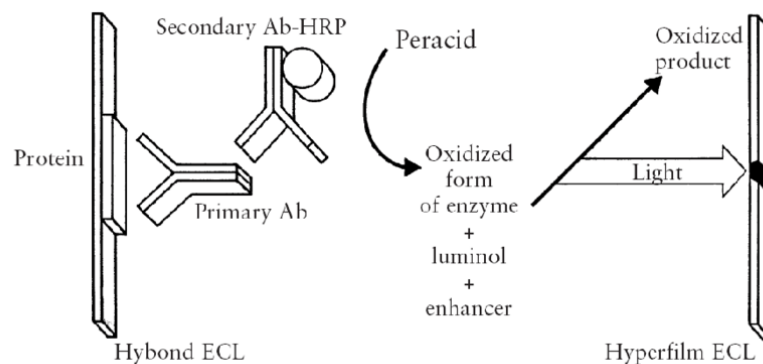


Abbildung 13: Das Prinzip des Western-Blot Verfahrens mit ECL. Übernommen aus (153)

Durch die digitale Detektion der Chemilumineszenz standen die Bilder des Western-Blots direkt zur densitometrischen Auswertung im Computer zur Verfügung. Mit der Software Gel-Pro-Analyzer 3.0 wurden die densitometrischen Werte der einzelnen Banden bestimmt. Mit Hilfe dieser Grauwerte konnten die relativen Unterschiede der Expression einzelner Proteine zwischen den Versuchsgruppen untersucht werden. Alpha-Actinin als ubiquitär exprimiertes Strukturprotein diente als Ladungskontrolle. Die Grauwerte jeder Gruppe wurden auf den entsprechenden Wert der Ladungskontrolle abgeglichen, um Unterschiede durch ungleiche Proteinnengen zu kompensieren. Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(133, 149).

6.2.11 Dot-Blot

Beim Dot Blot wird im Vergleich zum Western Blot auf die Auftrennung der Proteine nach Größe durch Elektrophorese verzichtet. Jedoch entspricht die Vorarbeit des Dot Blots den oben beschriebenen anfänglichen Schritten des Western- Blots. Nach der Proteinbestimmung nach Bradford des Herzgewebes wurde die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Das Proteingemisch wurde nativ, ohne Zusatz von Laemmli-Puffer, verwendet. Mit Hilfe eines Dot-Blot Minifold 96-Well Systems und durch Unterdruck wurden 40 µl des Proteingemisches auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht (Abbildung 14).

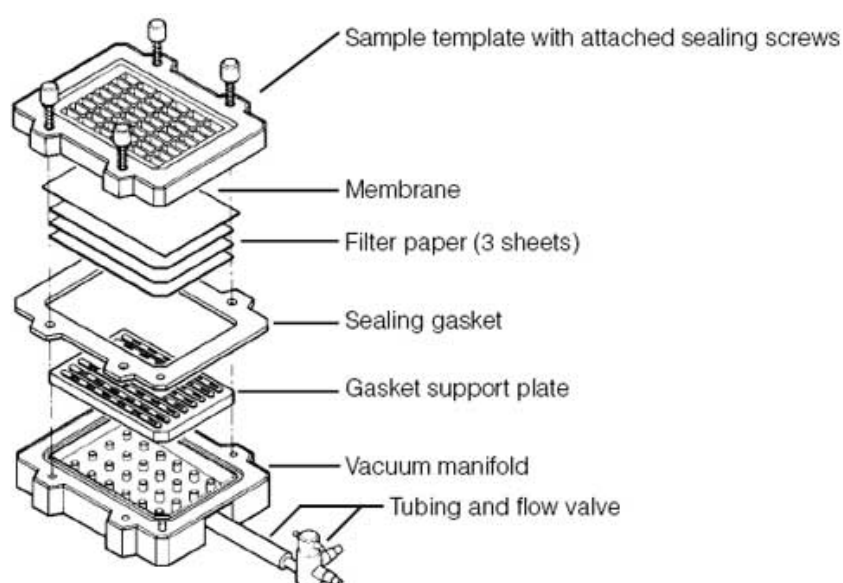


Abbildung 14: Der Aufbau des Dot-Blot-Systems *Übernommen aus (154)*

Nach einer Spülung aller Wells mit jeweils 250µl PBS wurde die feste Bindung der Proteine auf der Membran durch eine 15-minütige Trocknung bei 60°C auf dem Blockheizer sichergestellt. Anschließend wurden freie Bindungsstellen durch Blockierungspuffer besetzt und die Antikörperinkubation, wie für den Western-Blot beschrieben, durchgeführt. Analog zur densitometrischen Auswertung der Western-Blots erfolgte die Auswertung der Dot-Blots. Die Methode wurde wie bereits von meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(133, 149).

6.2.12 Quantitative Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Anhand der quantitativen Echtzeit- Polymerase Kettenreaktion, ist es möglich das DNA-Produkt aus der reversen Transkription der RNA zu quantifizieren⁽¹⁵⁵⁾. Dazu erfolgte die Isolierung von RNA aus Herz- und Aortengewebe mit Hilfe eines gewerblich erhältlichen QIAGEN Kits (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit). Dieser Vorgang beinhaltete eine mechanische und chemische Lyse („RNA Lysis Buffer“), sowie eine Homogenisierung („Qiagen Tissue Lyser“) des gefrorenen Gewebes. Die Reinheit der mRNA wurde mit einem Nanodrop Gerät der Firma peqlab bestimmt. Das Gerät bestimmt die optische Dichte der Probe durch eine UV-Absorptionsmessung bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von RNA bzw. DNA. Gleichzeitig wurde die optische Dichte bei 280 nm bestimmt, wodurch der Protein- bzw. Phenolgehalt der Probe untersucht wurde. Durch die Bildung des Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm zu 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) konnte somit die Reinheit der isolierten RNA errechnet werden. War der Koeffizient OD_{260}/OD_{280} geringer als 1,8, so musste davon ausgegangen werden, dass die Probe mit Protein oder aromatischen Verbindungen (z.B. Phenol) verunreinigt war, was eine erneute Aufreinigung erforderlich machte. Lag der Koeffizient zwischen 1,8 und 2, wurde die Konzentration der Probe nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Anschließend wurde 250 ng isolierte RNA zur RT-PCR-Analyse mit dem QuantiTect™- Probe RT-PCR kit (Qiagen) verwendet. TaqMan® Gene Expression Assays für TATA box binding protein (TBP) wurde als ein Referenzgen und iNOS, CD40L, Nox1, Nox4, IFN γ , VCAM-1, ICAM-1, CD11b und CD68 wurden als Probe-und-Primer Set (Applied Biosystems, Foster City, CA) angewendet. IFN γ , VCAM-1 und ICAM-1 wurden nur im

humanen Gewebe gemessen. Die komparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurde zur relativen Quantifizierung der mRNA herangezogen. Genexpression wurde auf die endogene Kontrolle TBP mRNA (One-step PCR) normalisiert und das Ausmaß der mRNA-Expression für jede Probe relativ zum Kontrollwert dargestellt. Die Methode wurde wie von bereits meiner Arbeitsgruppe publiziert angewendet^(133, 149).

6.2.13 Durchfluss Zytometrie

Mit Citrat antikoagulierte Blutproben wurden 1:5 mit Hanks' Balanced Salt Solution versetzt. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten mit Formaldehyd (0,2%) bei einem pH-Wert von 7,4 fixiert. Im nächsten Schritt wurden sie mit PBS gewaschen und 45 Minuten mit CD62P-FITC Antikörper (1:200 in PBS, BD Pharmingen) gefärbt, um P-Selectin positive Thrombozyten zu detektieren. Messung und Analyse wurde mittels eines FACS Canto II Durchflusszytometers und FlowJo Software (Tree Star) am FACS der Core Facility in Kooperation mit Dr. Hausding durchgeführt.

6.2.14 Humanproben

Basierend auf den von dem CD40L^{-/-}-Mausmodell gewonnenen Daten wurden Biomaterialien von zwei KHK-Patientengruppen analysiert und verglichen: adipöse Patienten mit BMI>35 und nicht-Übergewichtige Patienten mit BMI<25. Die Biobank des Deutschen Herzzentrums (Berlin, Deutschland) stellte im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) kleine Gefäßproben und Serum der Bypass-Patienten zur Verfügung (Ethik-Kommission Berlin #EA4/028/12; Dr. Knosalla, Leitung der Biobank). Alle Gewinnungs- und Versuchsverfahren der Humanproben wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Patientencharakteristika sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Patientencharakteristika

	BMI <25	BMI>35	p-Value
Anzahl in der Gruppe	10	10	
Alter [Jahr]	65,6	66,1	0,914
Gewicht [kg]	68,32	111,28	>0,001
Arterielle Hypertonie [%]	70	100	0,065
KHK [%]	100	100	1
Dyslipidämie [%]	40	90	0,018
Diabetes [%]	20	60	0,074
Schlaganfall [%]	10	10	1
Dialyse [%]	0	20	0,151
Myokardinfarkt [%]	40	50	0,673
Herzinsuffizienz [%]	40	50	0,673
Vorhofflimmern [%]	40	0	0,025
PAVK [%]	30	10	0,288

* p-Value wurde mittels t-Testes mit SPSS v.23 berechnet.

6.2.15 mRNA-Isolierung aus humanem Gewebe und nCounter-Analyse

Die mRNA-Expression in Humanproben wurde unter Einsatz des nCounter-Systems (nanoString Technologies, Seattle, USA) ⁽¹⁵⁶⁾ analysiert. Das nCounter-System ist ein Genexpressionsanalyse-System, das die RNA-Proben direkt und ohne eine enzymatische Amplifikation oder Klonierung misst. Bei dieser Methode kann die Menge der zu untersuchenden RNA-Moleküle in der Probe erfasst und die Konzentration der Transkripte im Verhältnis zu dem internen Standard ermittelt werden (Während z.B. bei der rtPCR die Konzentration des Transkripts aus der Anzahl der enzymatischen Schritte berechnet wird, die zum Erreichen einer gewissen Menge an Produkte notwendig ist). In diesem Verfahren werden zwei sequenzspezifische Sonden für das jeweilig zu untersuchendem Gen angewendet: Fänger- und Reportersonde (Abbildung 15). Die Reportersonde ist mit einem farbkodierten Marker verbunden, der als Detektionssignal dient. Nach der Hybridisierung der Sonden-Sätze mit der zu untersuchenden RNA-Probe in einer einzigen Hybridisierungsreaktion entstehen dreigliedrige Strukturen, bestehend aus Target-mRNAs gebunden an ihrer jeweiligen spezifischen Fänger- und Reportersonde ⁽¹⁵⁶⁾.

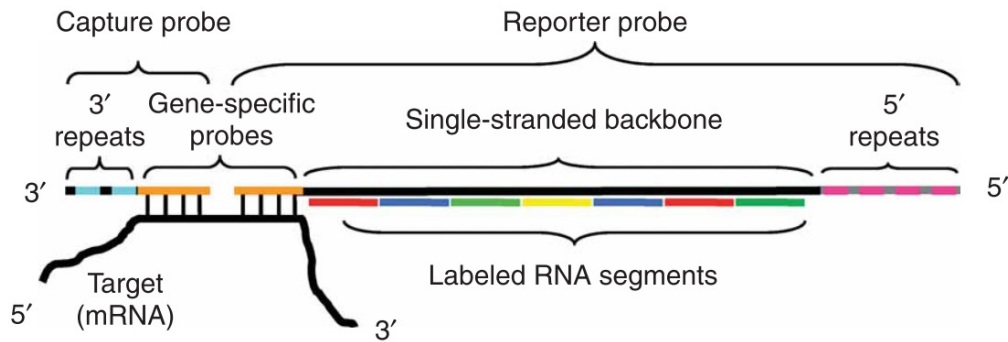


Abbildung 15: Schematische Darstellung des hybridisierten dreigliedrigen Komplexes. Übernommen aus (156)

So kann jedes Targetmolekül mit dem von der Reportersonde präsentierenden Farbcode identifiziert werden. Das Expressionsausmaß wird dann durch Berechnung der Anzahl der Farbcodes ermittelt. Die detektierte Anzahl der Farbcodes des analysierten Gens wird dann auf den geometrischen Mittelwert der Intensität des Referenzgens nach Abzug des Hintergrundes mittels nSolver 2.0 software (NanoString Technologies, USA) normiert. In dieser Arbeit wird der Expressionsgrad des Target-Gen-mRNA in Patienten mit Adipositas im Verhältnis zu dem entsprechenden Wert in nicht adipösen Patienten dargestellt.

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Aortengewebe der Patienten erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Kits (RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit). Prüfung der RNA-Vollständigkeit (mittels Agilent RNA 6000 Nano Kits) und nCounter-Technologie-Analyse mit einem Bioanalyser wurden in der nCounter-Core-Facility (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Heidelberg) durchgeführt. Die individuellen Sonden Sätze für die folgenden humanen Target-Gene wurden gemeinsam mit nanoString-Technologies entworfen und von Integrated DNA-Technologies (IDT, Coralville, USA) hergestellt: *TNF α* , *NOX-1*, *NOX-4*, *p22phox*, *p67phox*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *IL-6*, *SELP*, *CD68*, *CD11b*, *CD40*, *CD40L*, *Gewebfaktor (TF)*, *IFNG*, *TRAF2*, und *TUBB3*. Die Sonden Sätze für die folgenden humanen Referenz-Gene wurden ebenfalls von denselben Anbietern bereitgestellt: *HPRT*, *GAPDH*, *TBP*, *ACTB*, *TRAF6*, und *ACTN*. Weitere Target-Gene wurden entworfen und untersucht ohne verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Eine Reihe von Target-Genen (*CD40L*, *IL-6*, *IFNG*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *NOX-1*, *NOX-4*), die laut nCounter-Analyse deutlich reguliert waren, wurden mittels konventioneller RT-PCR Analyse (wie oben beschrieben) validiert. Auch hierbei handelte es sich um eine wissenschaftliche Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-

Forschung (DZHK). Die Analysen wurden in Kooperation mit Dr. Niesler von der nCounter-Core-Facility in Heidelberg und Dr. Dib aus dem Labor für Molekulare Kardiologie an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

6.2.16 ELISA

Enzyme-linked-immunosorbent-assay ist der englischsprachige Name des Verfahrens, das sich hinter der Abkürzung ELISA verbirgt. ELISA ist in der Molekularbiologie und Medizin weit verbreitet. Im klinischen Alltag findet der ELISA in der Labordiagnostik seine Anwendung. Wie auch in dieser Arbeit wird er dazu verwendet die Menge an sCD40L, IL-6 und RANTES in Serum der Patienten sowie den Leptin-Spiegel in Serum der Mäuse zu quantifizieren. Dafür wurden Quantikine® ELISA Kits von R&D Systems verwendet und die Durchführung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

6.2.17 Quantifizierung der Lipidwerte im Serum

LDL-, HDL-, Gesamtcholesterin-, Triglyzerid- und Blutglukosewert wurden mittels routinemäßiger Laborverfahren in dem Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin-Mainz untersucht (Kooperation mit Prof. Lackner).

6.2.18 Statistische Auswertung

Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Eine zweifache Varianzanalyse (2-Way ANOVA-Analysis of Variance, wiederholte Messungen, mit Tukey's Korrektur) wurde zum Vergleich der Vasodilatatorstärke anhand der isometrischen Tonus-Bestimmung herangezogen (Prism 6.05 Windows, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA.). Eine einfache Varianzanalyse (1-Way ANOVA-Analysis of Variance, mit Bonferroni's oder Dunn's Korrektur) wurde zur Untersuchung von 2 Gruppen wie z.B. Futteraufnahme oder humane ELISAs (Prism 6.05 Windows, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA.) herangezogen. Ein p-Wert $<0,05$ wird als signifikant angesehen. Two-way ANOVA (mit Sidak-Korrektur zum Vergleich von

mehreren Mittelwerten) wurde zum Vergleich von vier Gruppen mit zwei Variablen (Genotyp und Behandlung) verwendet. Ein p-Wert $<0,05$ wird als signifikant angesehen. Die Beschreibung der statistischen Analyse von nCounter nanoString Daten wurden in dem nCounter Abschnitt noch ausführlicher gestaltet.

7 Ergebnisse

7.1 CD40L-Defizienz vermindert die Gewichtszunahme und den Cholesterinanstieg in Serum der mit fettreicher Diät behandelten Mäusen

Während die CD40L-Expression im Aorten-Gewebe des Wildtyps nach der Behandlung mit der fettreichen Diät einen deutlichen Anstieg zeigte, war dieser Effekt in den CD40L^{-/-}-Mäusen nicht zu sehen (Abbildung 16). Die Mäuse der Wildtyp-Gruppe und der CD40L^{-/-}-Gruppe zeigten einen unwesentlichen Unterschied in der Nahrungsaufnahme (Abbildung 18-A). Während der Glukose- und Triglyzeridspiegel keine bedeutenden Veränderungen in den beiden Tiergruppen zeigten (Abbildung 17), führte eine fettreiche Diät zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichts, des Leptin-, Gesamtcholesterin-, LDL- und HDL-Wertes in Serum der Wildtypmäuse, wobei bei der CD40^{-/-}-Gruppe nur einen geringen Anstieg dieser Werte nachgewiesen werden konnte (Abbildung 18).

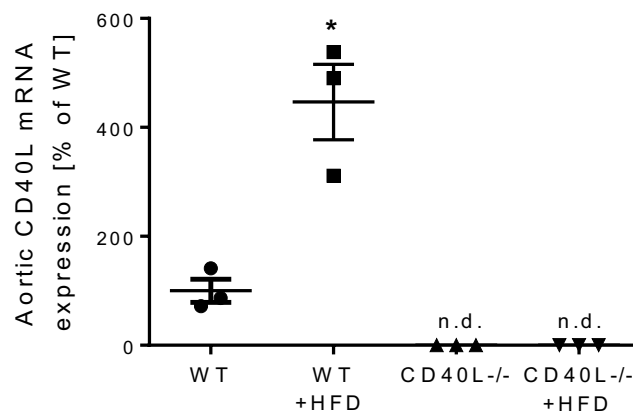


Abbildung 16: CD40L-Expression in Aortengewebe

CD40L-Expression wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; $n = 3$ Tiere in jeder Gruppe; * $p < 0,05$ vs. WT; § $p < 0,05$ vs. WT+HFD.

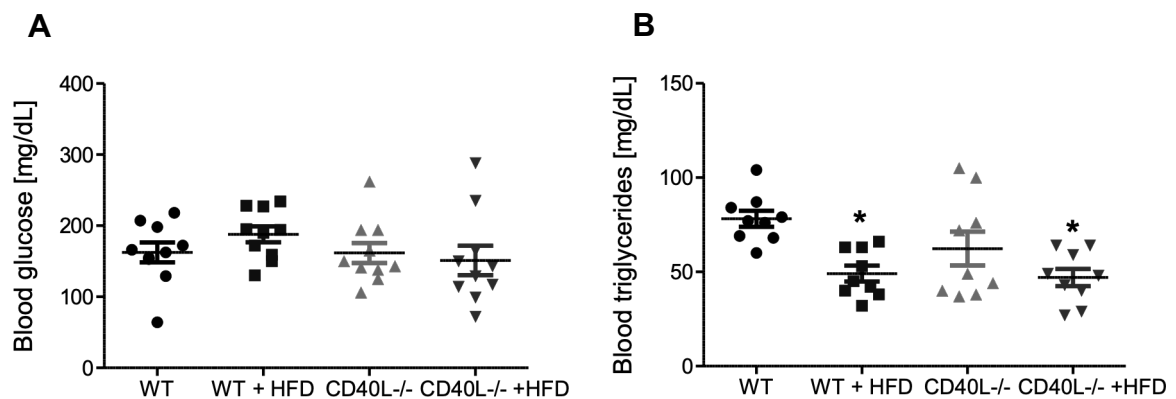


Abbildung 17: Effekte der CD40L-Defizienz auf den A) Glukose- und B) Triglyzerid-Wert im Serum. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; 9-10 Tiere in jeder Gruppe; * $p < 0,05$ vs. WT.

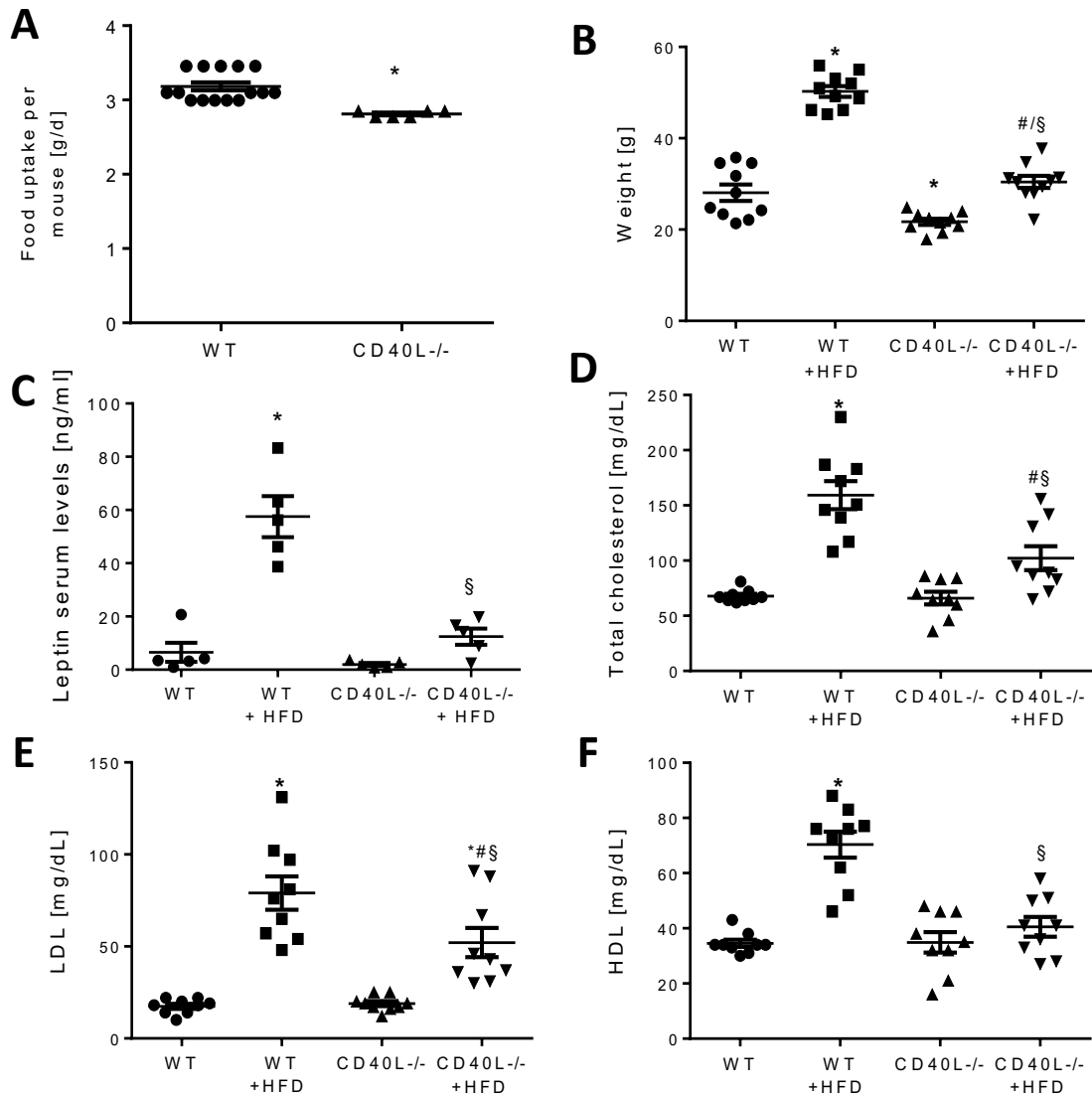


Abbildung 18 : Effekte der CD40L-Defizienz auf die A) Nahrungsaufnahme und B) Gewicht wurden empirisch ermittelt, wohingegen die Effekte auf das C) Gesamtcholesterin, D) Leptin, E) LDL und F) HDL im Serum wurden mittels ELISA ermittelt.

Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; $n= 15$ WT-Tiere und 6 CD40L^{-/-}-Tiere (A), 10 (B), 5 Mischproben (jeweils aus 2-3 Tieren)(C), 9 (D), 9 (E), 9 (F) Tiere in jeder Gruppe; * $p<0,05$ vs. WT; § $p<0,05$ vs. WT+HFD; # $P < 0.05$ vs CD40L^{-/-}.

7.2 CD40L-Defizienz verbessert die Hyperlipidämie-induzierte endotheliale Dysfunktion und oxidativen Stress

7.2.1 Prüfung der endothelialen Funktion mittels isometrischer Tonusstudien

Die isometrischen Spannungsmessungen an Aortenringen wiesen eine signifikante Verschlechterung der endothelialen Funktion bei der Wildtypgruppe nach der Behandlung mit fettreicher Diät auf. Die CD40L^{-/-}-Mäusen zeigten jedoch keinen signifikanten Verlust der endothelialen Funktion durch diese Diät (Abbildung 19).

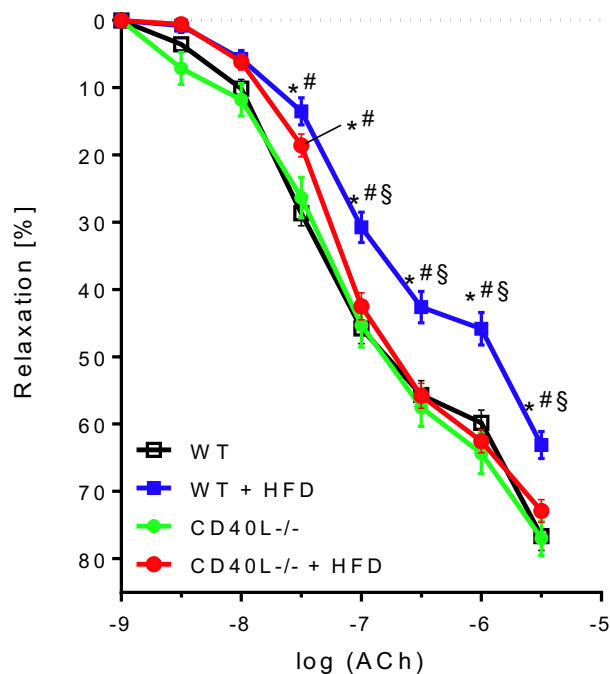


Abbildung 19: Isometrische Spannungsmessung zum Effekt der CD40L-Defizienz auf die endothelabhängige Relaxation bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.

Die Gefäßfunktion wurde durch isometrische Spannungsmessung ermittelt und die Relaxation durch Acetylcholin induziert. Hierdurch lässt sich die endothelabhängige Gefäßfunktion beurteilen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM von Aortenringen von $n=11-18$ Tieren pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs. WT; § $p < 0,05$ vs. WT+HFD; # $P < 0.05$ vs. CD40L^{-/-}.

Abbildung 20 zeigt die Endothel-unabhängige Relaxation sowie Vasokonstriktion in CD40L^{-/-}- und Wild-Mäusen bei HFD-induzierter Hyperlipidämie. Hier konnten keinen bemerkenswerten signifikante Unterschieden zwischen den Tiergruppen festgestellt werden.

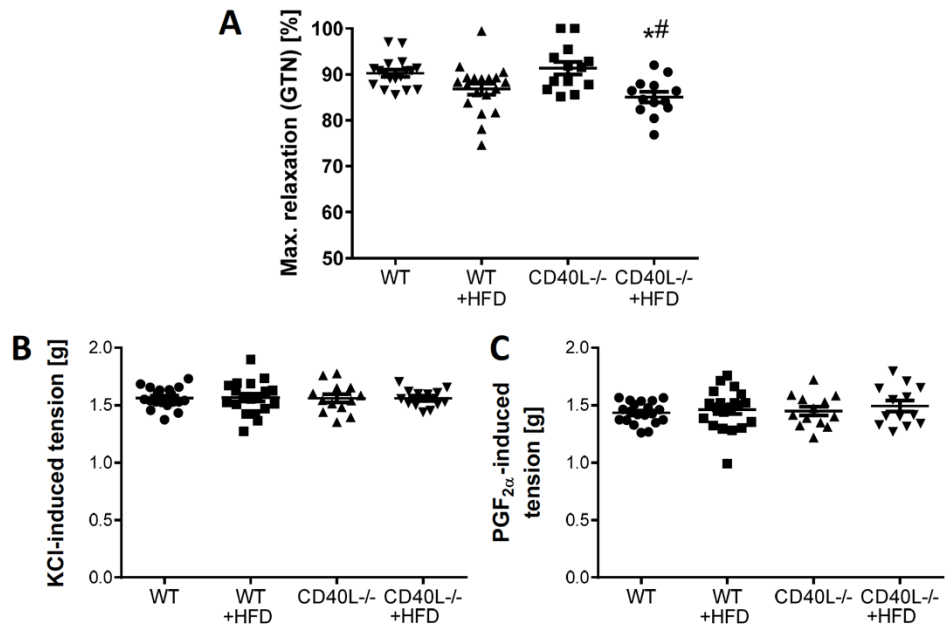


Abbildung 20: Isometrische Spannungsmessung zum Effekt der CD40L-Defizienz auf die Endothel-unabhängige Relaxation sowie Vasokonstriktion bei HFD-induzierter Hyperlipidämie. Die Gefäßfunktion wurde durch isometrische Spannungsmessung in Antwort auf Nitroglyzerin (GTN) (A), 80 mM KCl (B) und 3 μ M PGF_{2α} (C) ermittelt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM von Aortenringen von n=13-20 Tieren pro Gruppe. *, p<0.05 vs WT; #, p<0.05 vs CD40L^{-/-}.

7.2.2 ROS Detektion in intaktem Aortengewebe mittels DHE-Mikrotopographie

Es zeigte sich, dass die ROS-Bildung in der Gefäßwand der mit fettreicher Diät behandelten Wildtypiere im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren erhöht war. In den CD40L^{-/-}-Mäusen konnte aber kein deutlicher Anstieg der ROS-Spiegel unter der Behandlung mit fettreicher Diät beobachtet werden (Abbildung 21). Die Unterdrückung des Signals mit PEG-SOD deutete auf ein Superoxid-spezifisches Signal hin. Die Unterdrückung des Signals mit VAS2870 deutete auf eine Bildung der ROS durch NADPH-Oxidasen hin.

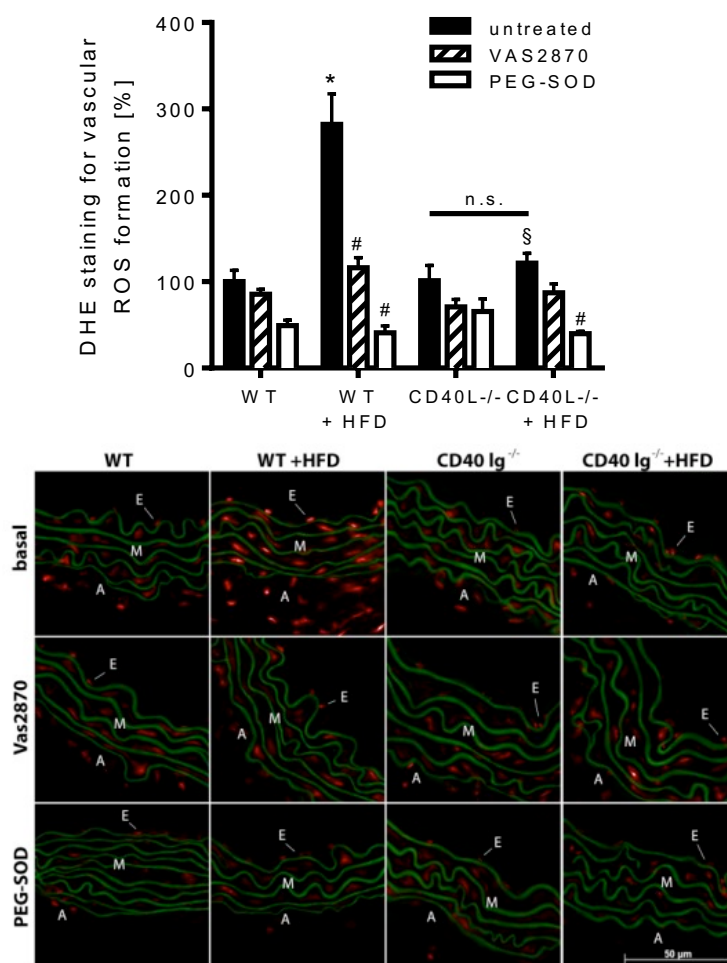


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie zum Effekt der CD40L-Defizienz auf den oxidativen Stress bei HFD-induzierter Hyperlipidämie im vaskulären Gewebe.

Durch Fluoreszenzmikroskopie, in der DHE als Farbstoff verwendet wurde, konnte oxidativer Stress in Gefäßkryoschnitten sichtbar gemacht werden. Unterhalb des Diagramms sind repräsentative Fluoreszenzfärbungen gezeigt. Das Signal wurde mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS2870 abgeschwächt und mit polyethylenglykolierter Superoxiddismutase (PEG-SOD) komplett unterdrückt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM von 8 Tieren pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. CD40L^{-/-}; § $p < 0,05$ vs. WT+HFD.

7.2.3 NADPH-Oxidase Aktivität in Herzmembranfraktionen und mRNA-Expression der NADPH-Oxidase Untereinheiten

Die fettreiche Diät verursachte eine Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität im Herzgewebe der C57BL/6-Mäuse, jedoch nicht im Herzgewebe der CD40L^{-/-}-Mäusen (Abbildung 22-A). Außerdem zeigte die unbehandelte CD40L^{-/-}-Gruppe eine verminderte Aktivität der NADPH-Oxidase im Vergleich zu der Wildtyp-Gruppe. Eine mögliche Erklärung für die verminderte NOX-Aktivität im Herzgewebe könnte der Expressionslevel von NOX2 und p47^{phox} (phagozytäre NADPH-Oxidase-Untereinheiten) sein. Die Behandlung mit fettreicher Diät führte zu einem drei- bzw. vierfachen Anstieg der Expression dieser NOX-Untereinheiten in den Wildtyp-Tieren. CD40L-Defizienz verminderte diese Hoch-Regulation, während die NOX2-Expression auch per se in der CD40L^{-/-}-Tieren geringer war (Abbildung 22-B und C).

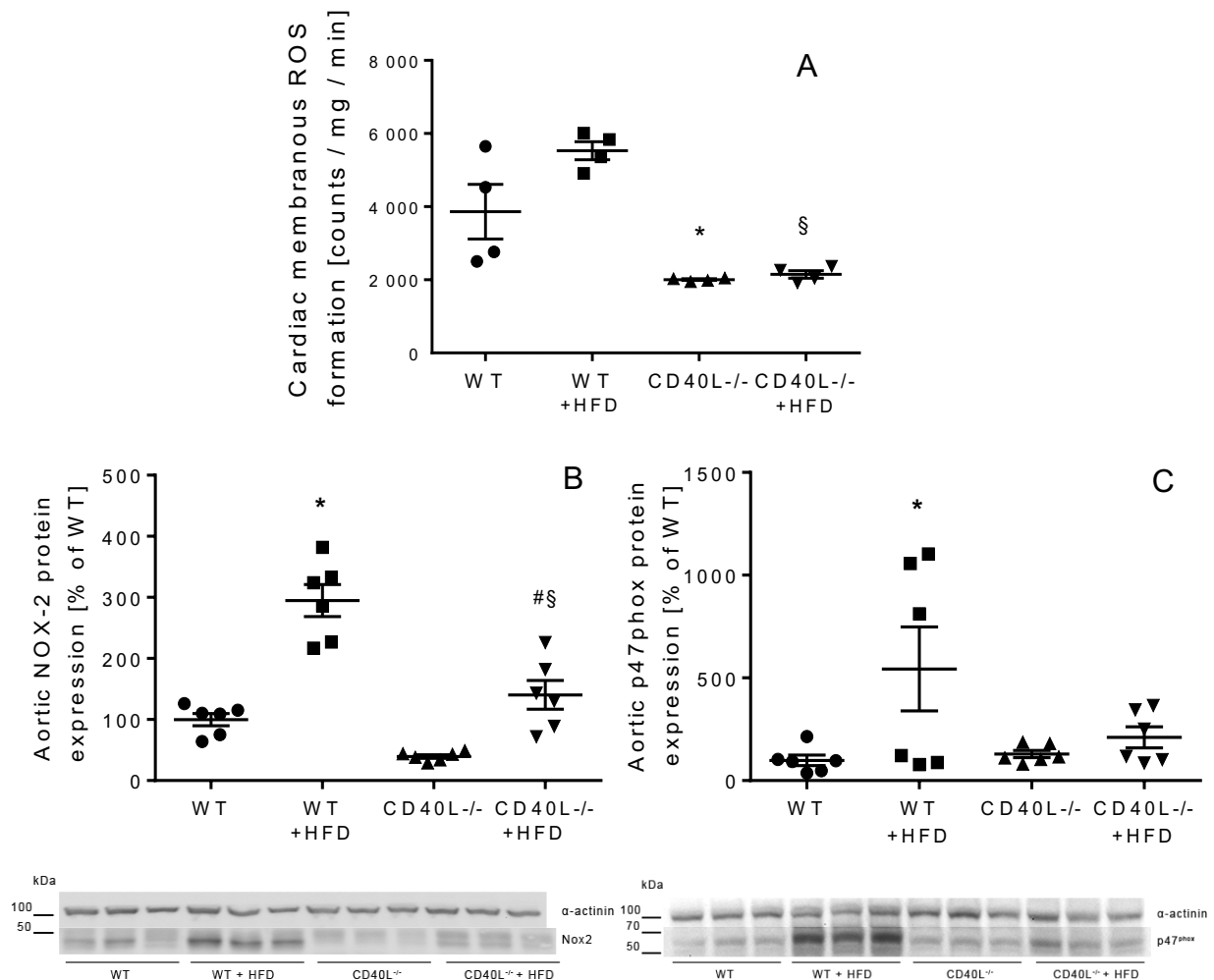


Abbildung 22: Effekte der CD40L-Defizienz auf den oxidativen Stress bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.

NADPH-Oxidase Aktivität (A) wurde mittels Chemilumineszenz-Assay und Expression von NOX-2 (B) und p47^{phox} (C) durch Western-blot ermittelt.

Die Abbildung zeigt Mittelwerte ± SEM; n=4 (A), 6 (B), 6 (C); * p<0,05 vs. WT; § p<0,05 vs. WT+HFD; #p<0,05 vs. CD40L^{-/-}.

7.3 CD40L-Defizienz vermindert die Expression der Entzündungsindikatoren und die Thrombozyten-Aktivierung durch Hyperlipidämie

Die Expressionsstudien ergaben, dass die Behandlung mit der fettreichen Diät die Expression der iNOS-mRNA in der Aorta und von IL-6-Protein im Plasma im Wildtyp signifikant steigerte, was bei CD40L^{-/-} nicht zu sehen war (Abbildung 23-A und 24). Der gleiche Effekt konnte für das Expressionslevel des CD62 (P-Selectin) an der Oberfläche der Thrombozyten als Zeichen deren Aktivierung gezeigt werden (Abbildung 23-B). Zudem wurde eine tendenziell erhöhte Expression von CD11b und CD68 im Aortengewebe von den mit HFD-behandelten Mäusen des Wildtypes festgestellt. Diese Tendenz war in den CD40L^{-/-}-Tieren weniger stark ausgeprägt. HFD-Behandlung führte zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression von Nox1-Gen, während die Expression von Nox4-mRNA in der mit HFD behandelten Wildtyp-Gruppe und in den CD40^{-/-}-Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant reduziert war (Abbildung 23-C).

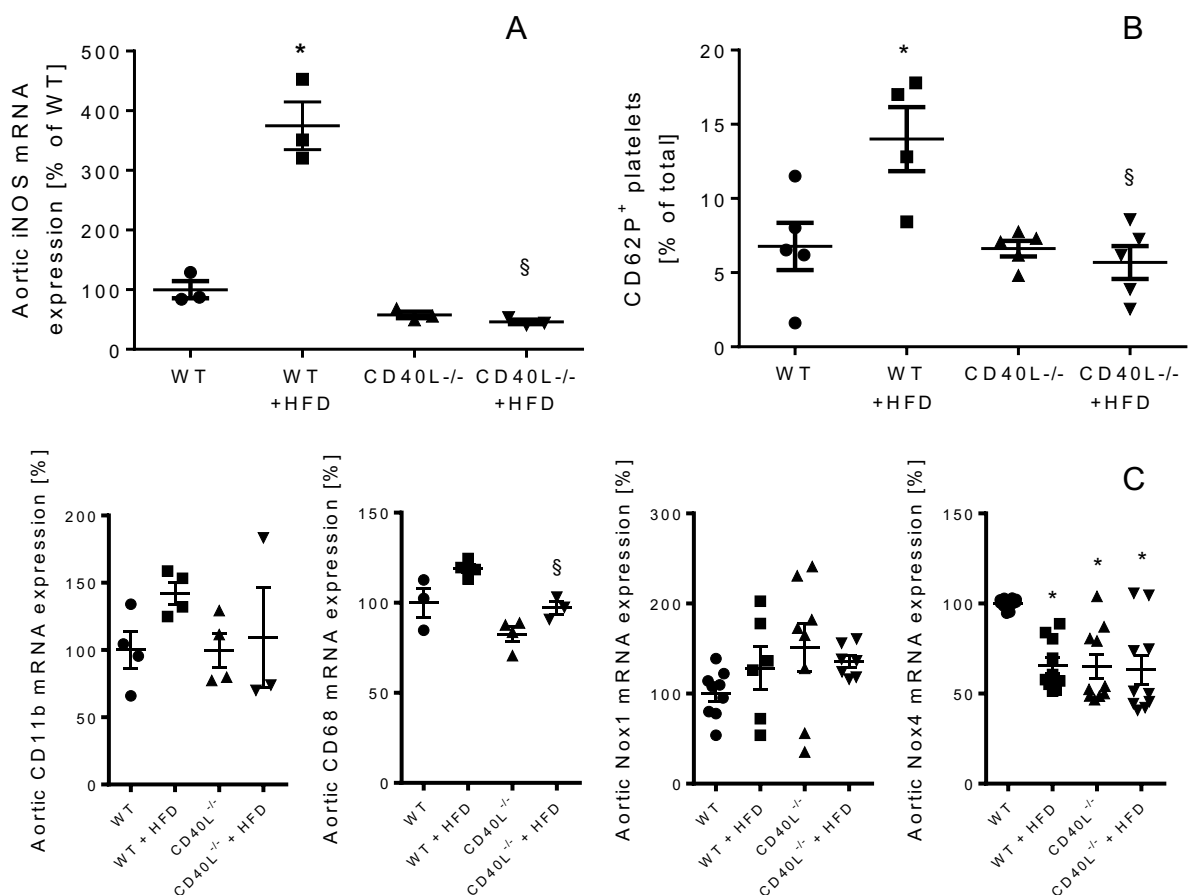


Abbildung 23: Untersuchung der Marker für Entzündung und Thrombozytenaktivität zum Effekt der CD40L-Defizienz bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.

iNOS-Expression wurde mittels qRT-PCR in der Aorta (A), der Anteil der aktiven CD62-positiven Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie (B) und die Expression von CD11b, CD68, Nox1 und Nox4 mittels qRT-PCR in der Aorta (C) ermittelt. Repräsentative FACS Plots finden sich in Anhang 1. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; n=3-4 (A), 4-5 (B), 3-4 (CD11b und CD68) und 6-10 (Nox1 and Nox4) (C); * p<0,05 vs. WT; § p<0,05 vs. WT+HFD.

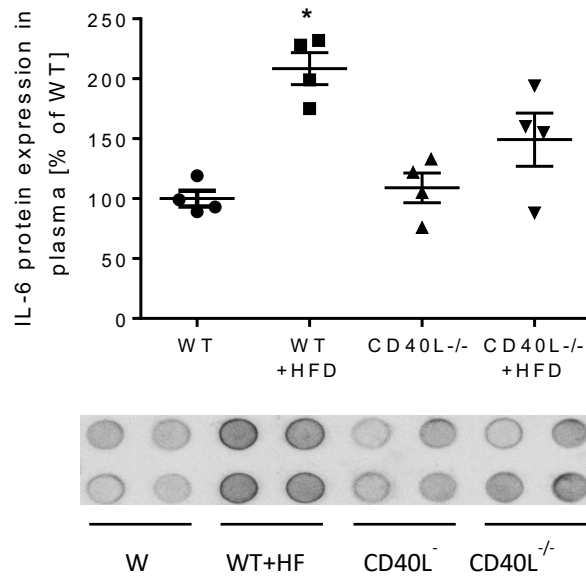


Abbildung 24: IL-6 Expression und Effekt der CD40L-Defizienz bei HFD-induzierter Hyperlipidämie.

Die IL-6-Expression im Plasma wurde durch Dot-Blotting ermittelt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; n=4; * p<0,05 vs. WT.

7.4 Adipöse Patienten zeigen eine erhöhte Genexpression für Indikatoren der vaskulären Entzündung und einen Anstieg des sCD40L-Spiegel im Serum

Die nCounter-Analyse zeigte eine erhöhte mRNA-Expression der Entzündungsmediatoren im Aortengewebe der adipösen Patienten im Vergleich zu den nicht-übergewichtigen Patienten (Abbildung 25-A). Diese Gewebeproben wurden auch mittels PCR untersucht. Das Ergebnis bestätigte vor allem die höchste Hoch-Regulation für *CD40L*, *IL-6*, *IFN γ* , *NOX-1*, *VCAM-1* und *ICAM-1*. Interessanterweise war *NOX-4* mRNA-Expression im Gegensatz dazu reduziert (Abbildung 25-B). Im Serum der adipösen Patienten war eine signifikante Erhöhung des sCD40L-Spiegels im Vergleich zu den nicht-übergewichtigen Patienten zu sehen, während *IL-6* und *RANTES* nur einen tendenziellen Anstieg der Expression in diesen Patienten zeigten, wie mittels ELISA gemessen (Abbildung 26).

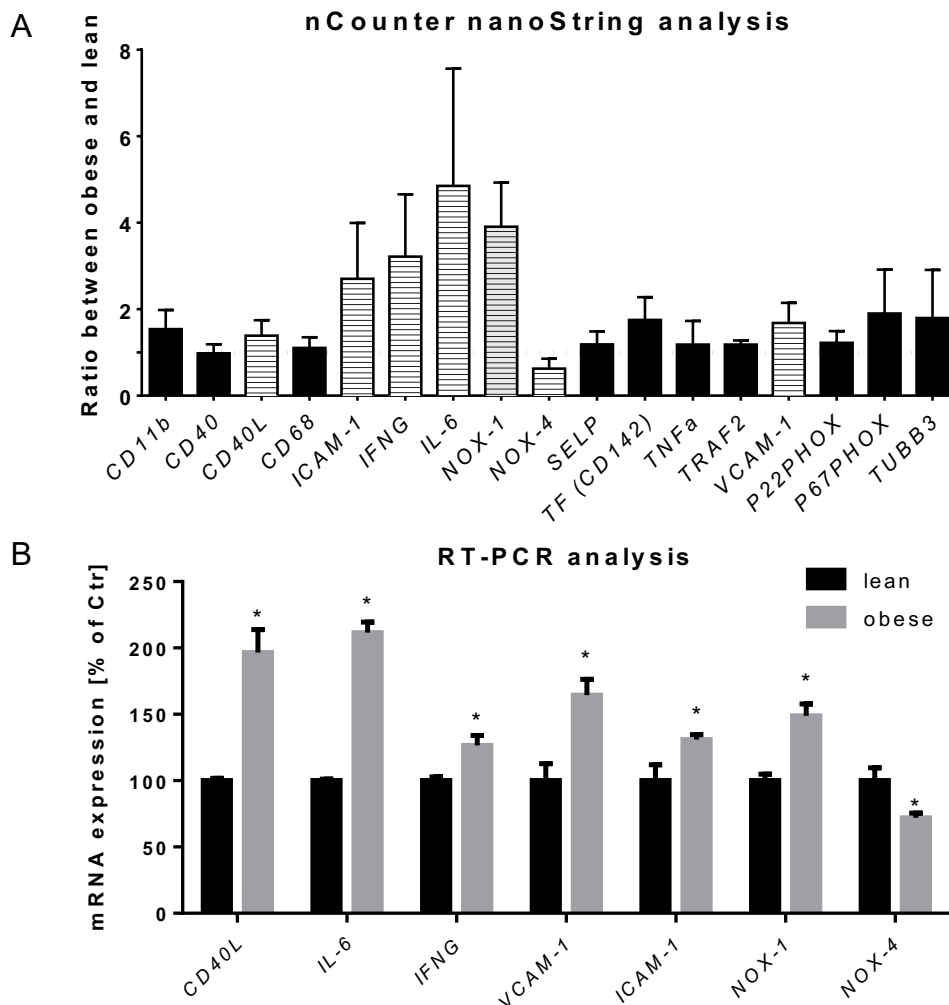


Abbildung 25: Gen-Expression in Humanproben von normal- und übergewichtigen Patienten. Differenzielles Genexpressionsprofil wurde mittels nCounter Elements Technology (nanoString) ermittelt. Gestrichelte Säulen zeigen die Gene, die mittels RT-PCR verifiziert wurden (A). Das durch RT-PCR-ermittelte Expressionsmuster der Gene: *CD40L*, *IL-6*, *IFNG*, *VCAM-1*, *ICAM-1*, *NOX-1*, und *NOX-4* (B). Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; n= 10 Patienten pro Gruppe (A) und 3 gepoolte Proben von 10 Patienten pro Gruppe (B). *p < 0.05 vs. Lean (Normgewichtige mit BMI<25).

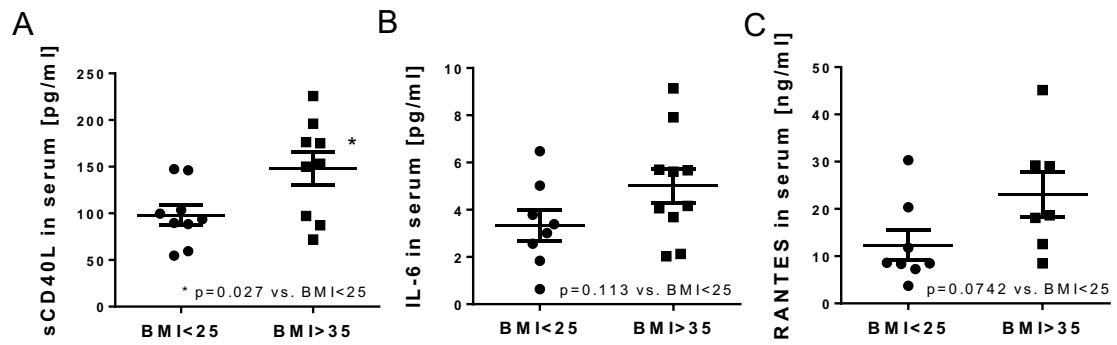


Abbildung 26: Protein-Expression von Entzündungsmarkern in Humanproben von normal- und übergewichtigen Patienten.

ELISA-Analyse der Expression von sCD40L (A), IL-6 (B), and RANTES (C) im Serum der Patienten. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; n= 9 (A), 8–10 (B), und 7–8 (C) Proben pro Gruppe. *p < 0.05 vs. WT.

8 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, eine direkte Beziehung zwischen CD40Ligand und den vaskulären Komplikationen der Adipositas-assoziierten Hyperlipidämie nachzuweisen. Die Entwicklung dieser Komplikationen ist ein multifaktorielles Geschehen. Hierbei greifen unterschiedlichste Mechanismen ineinander, die in allen Kompartimenten der beteiligten Zellen lokalisiert sind. Dabei bleibt das Geschehen nicht auf einen Zelltyp beschränkt; die Zellen der Gefäßwand, Endothelzellen, Glattmuskelzellen und Leukozyten spielen die Hauptrollen dieses Zusammenspiels. In einer früheren Studie des Labors für Molekulare Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz- AG. Prof. Daiber wurde bereits der Einfluss von CD40Ligand-Defizienz auf die pathophysiologische Gefäßveränderung im Rahmen der Hypertonie untersucht, die mit oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion einhergehen. Eine Beteiligung des CD40L konnte hier eindeutig belegt werden ⁽¹⁵⁷⁾. Wie in der Abbildung 27 zusammengefasst, hat die CD40L-Defizienz einen protektiven Effekt auf die durch ATII-induzierten Hypertonie-Folgen, insbesondere in Bezug auf Endothelaktivierung, Rekrutierung der inflammatorischen Zellen und Thrombozytenaktivierung ⁽¹⁵⁷⁾.

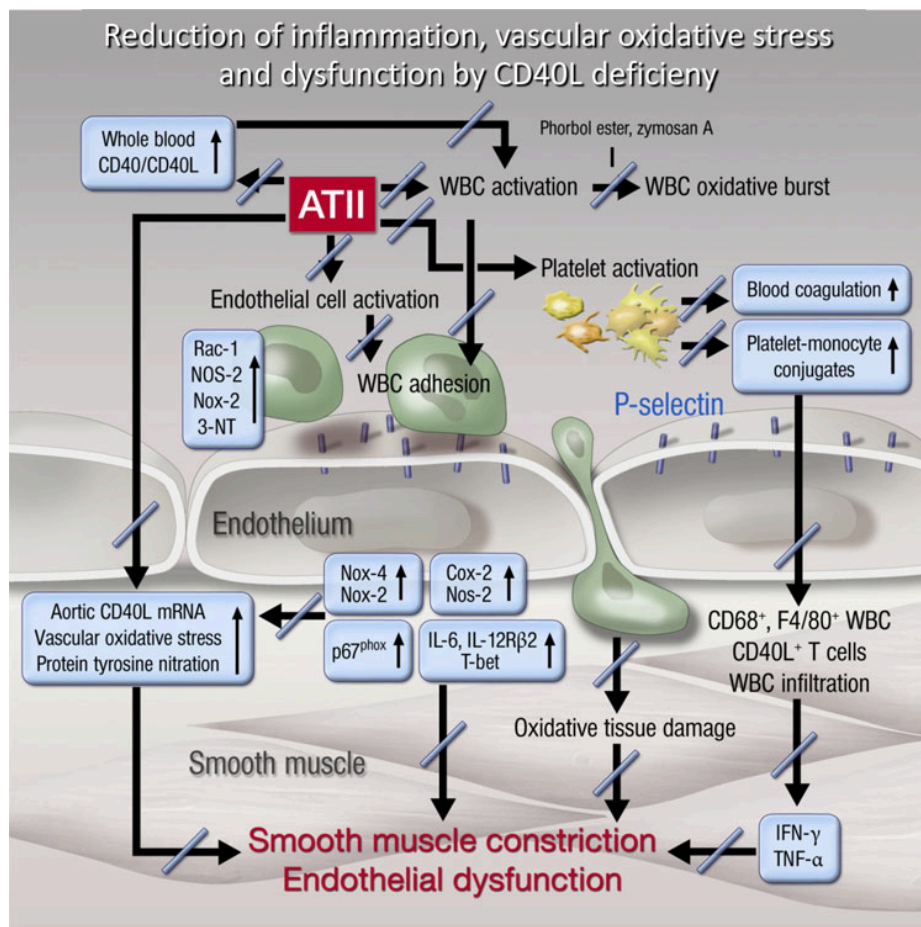


Abbildung 27: CD40L-Defizienz und ATII-induzierten Hypertonie-Folgen. Übernommen aus (157).

In der vorliegenden Arbeit konnte der protektive Effekt der CD40L-Defizienz auf diese Mechanismen im Rahmen der Adipositas nachgewiesen werden. Im Folgenden sollen die Wirkungen des CD40L-Defizienz auf die Gewichts- und Lipidprofilveränderung, endotheliale Funktion, den oxidativen Stress und vaskuläre Entzündungsprozesse bei Adipositas in Mäusen diskutiert werden.

8.1 Gewichts- und Lipidprofilveränderungen

In dieser Arbeit wurde ein mit fettreicher Diät behandeltes Maus-Modell als das in-vivo Adipositasmodell ausgewählt. Der signifikante Anstieg des Gewichts und der signifikant erhöhte Gesamtcholesterin- und LDL-Spiegel im Serum bei den mit HFD behandelten Tieren, stimmen mit dem klinischen Bild der Adipositas überein (s. Abb.18).

CD40L spielt eine entscheidende Rolle in der Auslösung und Entwicklung des chronischen niedergradigen Entzündungszustandes in dem adipösen Gewebe und somit ist er in der Entwicklung der mit Adipositas-verbundenen metabolischen Komplikationen maßgeblich involviert. Studien zeigen, dass eine genetische CD40L-Defizienz, sowie eine Behandlung mit neutralisierenden α CD40L-Antikörpern die Entwicklung der Inflammation in dem adipösen Gewebe verhindern und die Adipositas-induzierten metabolischen Störungen verbessern ⁽¹¹⁷⁾. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Tatsache (s. Abb. 18 sowie Abb. 23-26).

Der Anstieg der Fettsäurefreisetzung von Adipozyten im adipösen Zustand führt zum Anstieg der zirkulierenden Fettsäuren und Fetteinlagerung in der Leber. Dies hat die Produktion von pathologisch großen TG-reichen ApoB-Partikeln (Chylomikrone, VLDL, LDL und IDL) zur Folge. Diese Partikel enthalten im Vergleich zu den physiologisch normalen ApoB-Partikeln einen größeren Anteil von TG im Kern und eine erhöhte Anzahl von ApoC-III-Molekülen auf der Oberfläche. Im physiologischen Zustand aktivieren die ApoC-II-Moleküle, die ebenfalls auf der Oberfläche von Lipoproteinen vorkommen, die Lipoproteinlipase (LPL) auf den Endothelzellen der Kapillargefäße. LPL stimuliert einerseits die Hydrolyse von TG, andererseits die Freisetzung der Fettsäuren aus den Lipoproteinen und ihre Aufnahme durch das periphere Gewebe. Im pathophysiologischen Zustand verhindert jedoch ApoC-III die Aktivierung von LPL durch den ApoC-II und demzufolge die Fettsäurefreisetzung aus den Lipoproteinen. Außerdem beeinträchtigt das ApoC-III-Molekül die VLDL-Bindung an LDLr und LRP und somit seinen Abbau. VLDL zirkuliert dann für eine längere Zeit

im Blut. Die verlängerte Zirkulationszeit bietet dem TG-Cholesterin-Austausch zwischen ApoB-Partikeln und HDL (ApoA-Partikel) eine größere Chance. Die anfänglich TG-reichen ApoB-Partikel werden folglich zusätzlich mit Cholesterin angereichert. Der TG-reiche Kern der atherogenen Partikel ist außerdem für die Hydrolyse durch hepatische Lipase anfällig und begünstigt auf diese Weise die Bildung eines weiteren pathologischen Partikels: small dense LDL. Small dense LDL kann leicht oxidiert und ohne Vermittlung des LDL-Rezeptors, wie zum Beispiel von Makrophagen in der Arterienwand, eliminiert werden, was dieses Molekül stark atherogen macht (Abbildung 28).

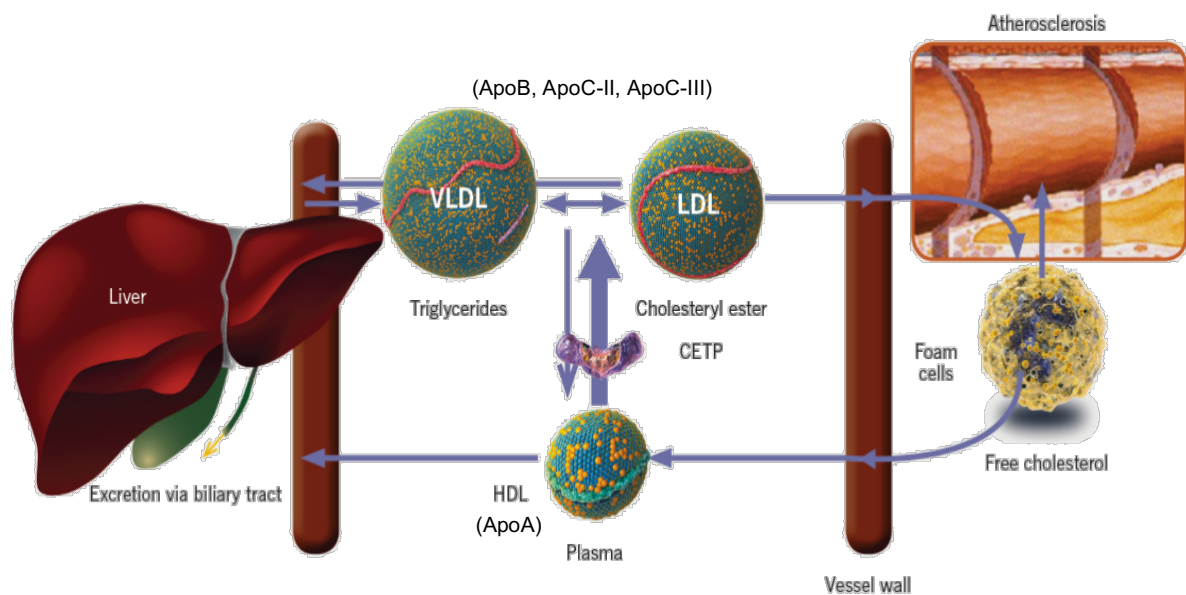


Abbildung 28: Lipoprotein Metabolismus. *Übernommen aus (158)*

Die Lipidstoffwechselstörung in Rahmen der Adipositas führt im menschlichen Körper zu einem erniedrigten HDL-Wert. Die Abnahme des HDL-Wertes bei Menschen kann sowohl unabhängig vom Anstieg der TG-reichen ApoB-Partikel als auch assoziiert damit eintreten. Der Anstieg der ApoB-Remnants erleichtert den CETP (Cholesterinester-Transferprotein)-vermittelten Austausch von Triglyzeriden und Cholesterin zwischen den ApoB- und HDL-Partikeln. Die Lipidzusammensetzung des Kerns in HDL-Moleküle verändert sich somit zugunsten der TG. Die TG werden der hepatischen Lipase ausgesetzt und die HDL-Moleküle verlieren an Größe. Dies erleichtert ihren Abbau und die HDL-Konzentration im Serum sinkt. So kommt es zu einem verminderten reversen Cholesterintransport von der arteriellen Gefäßwand und zu der atherogenen Wirkung durch die HDL-Abnahme.

Der HDL-Stoffwechsel in Maus unterscheidet sich von dem menschlichen Lipidmetabolismus unter anderem in dem Punkt, dass das aktive CETP in Maus nicht

exprimiert wird ⁽¹⁵⁹⁾. Daher ist der adipöse Stoffwechselzustand in Maus im Gegensatz zu dem in Menschen mit einem Anstieg der HDL-Konzentration in Serum assoziiert, was mit unseren Ergebnissen (s. Abb. 18-F) in Übereinstimmung steht.

8.2 Endotheliale Funktion und oxidativer Stress

In vielen bereits veröffentlichten Studien stellt die Endothelfunktion ein entscheidendes Charakteristikum des Frühstadiums kardiovaskulärer Krankheiten wie der Atherosklerose dar. Daneben ist bekannt, dass Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie, in aller Regel mit einer Endotheldysfunktion vergesellschaftet sind ⁽¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾. In der vorliegenden Studie wurde die Dilatation isolierter Aortenringe ex vivo nach Zugabe von Acetylcholin (ACh) für die Bestimmung der Endothelfunktion genutzt. Eine abgeschwächte Relaxation in der Wildtypgruppe nach der Behandlung mit HFD wies hierbei auf eine pathologische Veränderung der Endothelfunktion hin (s. Abb. 19), welche bei CD40L-Defizienz nicht detektiert werden konnte.

Die endothelabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholin ist eher von pharmakologischem als physiologischem Interesse. Periphere Blutgefäße sind nicht durch den cholinergen Parasympathikus innerviert. Andere Stimuli wie Scherstress, Bradykinin und Histamin führen im experimentellen Versuch zu einer NO-Freisetzung aus dem Endothel ^(163, 164). Bei Acetylcholingabe kann es bei einem geschädigten Endothel zu einer sogenannten paradoxen Vasokonstriktion kommen. Dabei ist das Endothel nicht in der Lage, auf Acetylcholinstimulus ausreichend NO zu generieren, welches der Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen durch Stimulierung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors der motorischen Endplatte entgegenwirkt. Zudem kann Acetylcholin direkt an den glattmuskulären muskarinergen Rezeptoren binden und dort eine Konstriktion auslösen. Normalerweise würde Acetylcholin in der Endothelzelle Calcium-vermittelt eine eNOS-Aktivierung auslösen und damit zur Relaxation führen ^(137, 165). Die paradoxe Vasokonstriktion der Koronarien wird als verlässlicher klinischer Test im Katheterlabor eingesetzt, um stenotische Bereiche zu identifizieren und besitzt hohe prognostische Bedeutung ⁽¹⁶⁶⁾.

In der Entstehung der Endotheldysfunktion spielt der oxidative Stress eine entscheidende Rolle. Durch diese Situation liegt eine gesteigerte Anzahl freier Radikale vor, von denen insbesondere Superoxidanionen sehr schnell mit NO

reagieren können, die damit das freie NO inaktivieren und eine Endotheldysfunktion auslösen können. Der Dilatator NO kann also durch erhöhte Konzentrationen von Superoxidanionen abgefangen werden, wodurch einerseits die protektiven Eigenschaften per se vernichtet werden, andererseits zusätzlich ein noch potenteres Oxidanz, Peroxynitrit (ONOO⁻), gebildet wird. Peroxynitrit geht durch seine chemischen Eigenschaften besonders mit Häm- und Hämthiolat (P450)-haltigen und mit Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen Reaktionen ein, die meist an ihren Tyrosinresten nitriert bzw. an ihren Cystein-Thiolen bzw. Fe-S-Strukturen oxidiert und damit inaktiviert werden ^(160, 167-169). Beispiele für diese Reaktionen stellen die Prostazyklinsynthase ⁽¹⁷⁰⁾ und die Mangan-Superoxiddismutase ⁽¹⁷¹⁾ dar, die beide durch die genannte Reaktion inaktiviert werden und somit ihre protektiven Funktionen verlieren.

Die endotheliale NO-Synthase nimmt im Zusammenhang des oxidativen Stresses eine Sonderstellung ein. Bei Oxidation des Cofaktors BH₄ oder durch Oxidation des Zink-Thiolat-Clusters verliert dieses Enzym nicht nur die protektiven Eigenschaften der NO-Produktion, sondern es kommt zu einer Entkopplung, wodurch durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff zusätzliches Superoxid gebildet wird ⁽⁵⁴⁾. Die NO-Bioverfügbarkeit wird somit durch zwei unabhängige Mechanismen unterbrochen, einerseits wird die basale Verfügbarkeit von NO durch die Reaktion mit Superoxid stark eingeschränkt und andererseits die NO-Produktion durch die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase unterbunden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der Indikatoren für den vaskulären oxidativen Stress nach der Behandlung der Tiere mit HFD festgestellt werden, die durch CD40L^{-/-}-Defizienz verbessert wurde.

Die Superoxiddetektion in DHE Fluoreszenzuntersuchungen ergab eine erhöhte Produktion der ROS in der Wildtyp-Gruppe nach der Behandlung mit der HFD, was mit einer Entkoppelung der eNOS vereinbar wäre. Durch die metabolischen Veränderungen bei der adipösen Stoffwechselkrankheit, kommt es unter anderem zur Aktivierung der Proteinkinase C, die wiederum die NADPH-Oxidase mit sukzessiver Superoxidproduktion zur Folge hat. CD40L-Defizienz normalisiert dabei die Superoxidfärbung signifikant (s. Abb. 21).

Eine andere Methode zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies basiert auf Messungen mit Chemilumineszenz-Farbstoffen wie Luminol, Luzigenin und L-012. Die jeweiligen reaktiven Spezies oxidieren dabei die Luminol-Derivate, wobei Energie in Form von Photonen (Lichtblitze) emittiert wird, die mit Hilfe eines

Luminometers detektiert werden konnten. Dieser Assay basiert auf einer ursprünglich von Gyllenhammar 1987 aufgearbeiteten Methode zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies⁽¹⁷²⁾. Dabei ist von Bedeutung, dass die Konzentration insbesondere von Luzigenin so niedrig wie möglich gehalten wird, um ein artifizielles Signal, bedingt durch das sogenannte „redox cycling“, zu verhindern. Hierbei hat sich eine Lucigenin-Konzentration von 5 µM bewährt⁽¹⁴⁵⁾. Eine direkte Messung der NADPH-Oxidase Aktivität wurde im Herzgewebe vorgenommen. Als membranständiger Multienzymkomplex gilt die NADPH-Oxidase als eine der Hauptquellen des oxidativen Stresses. Es wurden isolierte Herz-Membranfraktionen in dem Assay eingesetzt, um eine Abschwächung des Chemilumineszenzsignals, insbesondere durch zytosolische antioxidativ wirksame Moleküle oder Enzymsysteme wie Ascorbinsäure oder Superoxiddismutase, zu vermeiden und um die entsprechenden ROS-Quellen isoliert betrachten zu können.

Die Messung der mRNA Expression der phagozytären NADPH Oxidase Untereinheit NOX-2 und seiner regulatorischen Untereinheit p47^{phox}, zeigte eine signifikante Hochregulation in mit HFD-behandelten Wildtyptieren, was auf eine erhöhte vaskuläre Superoxidproduktion hinwies. Wie es früher berichtet wurde, spielen p47^{phox}-abhängige NADPH-Oxidase-Aktivität und sekundäre Superoxidbildung eine zentrale Rolle bei vaskulärer Dysfunktion⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾. Wie in Abbildung 22 gezeigt wurde, wurde der genannte Effekt durch CD40L-Defizienz erheblich abgeschwächt, was zu einem verminderten oxidativen Stress und einer besseren endothelialen Funktion führte.

Die deutlich erhöhte NOX-2-Expression präsentiert außerdem einen guten Link zwischen der vaskulären Inflammation und vaskulärer Dysfunktion in diesem HFD-induzierten Adipositasmodell.

8.3 Vaskuläre Entzündungsprozesse

Da der enorme Anstieg der NOX-2 mRNA-Expression möglicherweise Ausdruck einer Infiltration von Immunzellen ist und damit auf eine erhöhte vaskuläre Inflammationsreaktion hinweist, wurde die Expression verschiedener Markerproteine bzw. -gene der vaskulären Inflammation, unter anderem CD40L, iNOS und IL-6 bei Mäusen und sCD40L, iNOS, IL-6, IFNG, ICAM-1 und VCAM-1 in humanen Proben, untersucht⁽¹⁷⁶⁻¹⁸⁰⁾.

iNOS, induzierbare NO-Synthase, ist eine Isoform der NO-Synthase. Diese NOS-

Isoform wird von Makrophagen und anderen Immunzellen in hohem Maße exprimiert und rein transkriptionell reguliert ^(161, 181). Die physiologische Funktion der iNOS-abhängigen NO-Produktion in Makrophagen ist die zytotoxische Wirkung auf Mikroorganismen. Unter Bedingungen von zellulärem Stress kommt es zu einer Expressionssteigerung der iNOS, die 100–1000fach mehr NO als die beiden physiologischen, konstitutiv exprimierten Isoformen, eNOS und nNOS, produzieren kann ^(55, 181). Parallel zur Aktivierung der NADPH-Oxidasen, die Superoxidradikale produzieren, kann die gleichzeitige Induktion der iNOS zur Einbringung großer Mengen NO in das System führen. Durch die rasche Inaktivierung von NO durch die Reaktion mit Superoxidanionen werden große Mengen Peroxynitrit gebildet, welches ein viel potenteres Oxidanz als Superoxid darstellt und die Funktion von Proteinen z.B. durch Nitrierung von Aminosäuren modulieren kann ^(160, 167). Besonders die Inaktivierung der löslichen Guanylatzyklase, die essentiell ist für die NO-vermittelte glattmuskuläre Relaxation, und die Nitrierung/Inaktivierung der Prostazyklinsynthase, die vasoaktives Prostazyklin synthetisiert, forcieren die Endotheldysfunktion ^(169, 170). VCAM-1 stellt als Adhäsionsmolekül an der Zelloberfläche ein Verbindungspol für zirkulierende, mononukleäre Leukozyten her, um die Rekrutierung dieser Zellen in die arterielle Intima zu vermitteln ⁽¹⁸²⁻¹⁸⁴⁾. Unter normalen, physiologischen Bedingungen wird VCAM-1 nicht exprimiert, erst proinflammatorische Signale induzieren die Expression dieses Adhäsionsmoleküls, vor allem in Bereichen von vaskulären Verletzungen oder in atherosklerotischen Plaques ^(185, 186). Eine Induktion der Entzündungsparameter war nach der Behandlung mit HFD in Wildtyptieren zu beobachten und wurde durch CD40L-Defizienz abgemildert.

Die in Abbildung 23 und 24 dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD40L-Defizienz nicht nur die Expression von vaskulären inflammatorischen Parametern, z.B. VCAM-1 und iNOS, sondern auch die Entzündungsmediatoren und ihre Rezeptoren, wie IL-6 und $\text{INF}\gamma$, herunterreguliert; somit ist die CD40L-Defizienz mit einer protektiven Auswirkung auf die Entwicklung der Atherosklerose bei Adipositas assoziiert.

Das Ergebnis aus den Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie deutet zudem darauf hin, dass CD40L-Defizienz den Anteil der P-Selektin-positiven aktivierten Thrombozyten reduziert und somit antithrombotisch und antiaggregatorisch wirkt. P-Selektin (CD62P) ist in inaktiven Thrombozyten in der Membran der α -Granula gespeichert und wird im Rahmen der Thrombozytenaktivierung auf die Zellmembran verlagert. P-Selektin spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aggregation

der Thrombozyten im Bereich der vaskulären Verletzung. Es ist außerdem bekannt, dass der Expressionsgrad des P-Selektin in Thrombozyten bei Erkrankungen, die mit arterieller Thrombose assoziiert sind, sowie KHK, akutem Myokardinfarkt, Schlaganfall und pAVK erhöht ist.

8.4 Expressionsmuster für Indikatoren der vaskulären Entzündung und sCD40L-Serumspiegel in adipösen Patienten

Während die angewendete Methode zur Induktion der Adipositas im Mausmodell gut etabliert ist und eine hohe Effektivität besitzt, ist es nur schwer abzuschätzen, ob die erzielten murinen Ergebnisse auf menschliche Patienten übertragbar sind. Aus diesem Grund wurde die CD40L Expression in humanem Gewebe und Serum Proben untersucht und nach gemeinsamen Genexpressionsmustern zwischen adipösen Mäusen und Patienten gesucht. Obwohl die niedrige Anzahl der Individuen in den Patientengruppen die statistische Aussagekraft der Ergebnisse stark einschränkt, zeigen unsere Ergebnisse eine ausgeprägte Tendenz für zunehmende Entzündungsmarker und Indikatoren des oxidativen Stresses in adipösen Patienten; dieses Expressionsprofil zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster gleicher Indikatoren im Mausmodell.

Es ist bekannt, dass Adipositas in Menschen mit einem veränderten Expressionsgrad verschiedener Entzündungsmarker wie C-reaktives Protein, TNF, IL-6, IL-1b, und MCP-1 verbunden ist ^(187, 188). Die Untersuchungsergebnisse der Humanproben in Rahmen der vorliegenden Studie bestätigen diese Tatsache und zeigen außerdem einen erhöhten Expressionsgrad von sCD40L im Serum der adipösen Individuen. Ob der erhöhte sCD40L-Serumspiegel in direkter Beziehung mit kardiovaskulären Ereignissen steht, wurde bis jetzt noch nicht geklärt. Obwohl viele unabhängige Studien eine Korrelation zwischen sCD40L und kardiovaskulären Erkrankungen und ihren Komplikationen, wie instabile Angina pectoris ⁽¹⁸⁹⁾, Restenose nach einer Stent-Implantation ⁽¹²⁸⁾, Hypertonie ⁽¹⁹⁰⁾, akutes Koronarsyndrom ⁽¹⁹¹⁾ und pulmonale Hypertonie ⁽¹⁹²⁾ zeigen konnten, wurde dieses durch andere Studien bestritten ⁽¹³¹⁾. sCD40L korreliert zwar eindeutig mit anderen Entzündungsmarkern, stellt aber keinen direkten Risiko-indikator für Schlaganfall und Myokardinfarkt dar ⁽¹⁹³⁾. Ein erhöhter sCD40L-Serumspiegel wurde ebenfalls bei Typ 2 Diabetes mellitus Patienten

nachgewiesen, jedoch ohne eine prädiktive Validität für die Gesamtmortalität oder kardiovaskuläre Ereignisse in dieser Patientengruppe zu zeigen ⁽¹⁹⁴⁾. Eine aktuelle Metaanalyse zeigt, während ein erhöhter IL-6 Expressionslevel unter anderen inflammatorischen Zytokinen (z.B. Matrix Metalloproteinase-9, IL-18 und TNF- α) den größten Risikoquotienten von 1,37 für KHK darstellt, weist sCD40L mit einem Risikoquotienten von 1,01 fast keinen direkten Effekt auf ⁽¹⁹⁵⁾.

Obwohl die genaue Wirkungsweise der Interaktion von CD40L mit seinen biologischen Zielmolekülen im Rahmen der Atherosklerose noch unvollständig geklärt ist, sind drei unterschiedliche Wirkungswege für die Beteiligung des CD40L in dieser Gefäßerkrankung bekannt:

- Da die Rezeptoren von CD40L in Endothelzellen und glatten Muskelzellen in großem Ausmaß exprimiert werden ⁽⁹⁷⁾, ist CD40L dazu fähig, *die Produktion von ROS* ^(97, 196), *Chemokine und Zytokine*, und *die Expression von Zelladhäsionsmolekülen*, wie VCAM-1, ICAM-1 ⁽¹⁹⁷⁾ und E-Selectin anzuregen ⁽¹⁹⁸⁾.
- CD40L ist in der Lage die *Immunzellen zu aktivieren*, die vom entzündeten Endothel parakrin sowie autokrin rekrutiert werden, und somit *die Sekretion von pro-inflammatorischen Chemokinen*, wie MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES ⁽¹⁹⁹⁾, zu verursachen. CD40L trägt daher zur Bildung und Progression von atherosklerotischen Läsionen bei. Außerdem kann die Rekrutierung der Makrophagen als ein weiterer schädlicher Effekt von CD40L angesehen werden, denn diese Zellen sind an der ROS-Bildung in der atherosklerotischen Läsion beteiligt ⁽²⁰⁰⁾.
- *Die Endothel-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten* führt zur Hoch-Regulation von CD40L-Expression in diesen Zellen und dadurch zur Adhäsion von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten an dem aktivierten Endothel. Dies führt wiederum zur Freisetzung von inflammatorischen und prokoagulatorischen Faktoren durch Thrombozyten ^(197, 201).

Etwa 90% der sCD40L-Moleküle im Blut werden von den aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Außerdem ist es klar, dass die Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie der vaskulären Entzündung spielen ⁽²⁰²⁾. Daher kann angenommen werden, dass die Adipositas-induzierte vaskuläre Entzündung und Dysfunktion, durch von den Thrombozyten freigesetzten sCD40L vermittelt werden.

Der signifikant erhöhte sCD40L Serumspiegel in adipösen Patienten stellt vermutlich einen guten Ansatzpunkt für weitere klinische Studien zur Untersuchung der Rolle des CD40-CD40L-Signalweges bei Adipositas assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen dar.

Basierend auf diesen Erkenntnissen mögen CD40L und seine nachgeschalteten Signalwege einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Therapie der Adipositas bedingten metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen präsentieren – vor allem da hier im Mausmodell auch eine deutliche Gewichtsreduktion in CD40L-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte und damit eine kausale Therapie möglich wäre. Allerdings ist eine systematische Therapie mit direkten CD40L antagonistischen Antikörpern ist allerdings mit schweren Komplikationen wie Beeinträchtigung der Hämostase und abgeschwächtem Immunsystem assoziiert ^(203, 204). Eine selektive Antagonisierung des CD40-CD40L-Weges in spezifischen Zellen (z.B. nur vaskuläre Zellen, keine Thrombozyten oder Immunzellen) könnte jedoch einen möglichen Ansatz zur Vermeidung dieser pathophysiologischen Nebenwirkungen darstellen. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine positive Wirkung der pharmakologischen Inhibition von CD40/TRAF6 in mit HFD behandelten Mäusen ⁽²⁰⁵⁾ sowie bei einem Diabetes mellitus Maus-Modell (db/db) nachgewiesen ⁽¹⁴⁹⁾. Lutgens et al. zeigten, dass Mutationen der CD40L-CD40-TRAF6-Bindungsstelle an CD40-Molekülen selektiv die CD40L-Aktivität beim Prozess der Atherosklerose beeinflussen können; während eine Unterbrechung des CD40-TRAF2/3/5 Signalweges keine signifikante Wirkung zeigt ⁽²⁰⁶⁾.

8.5 Alternatives Tiermodell des metabolischen Syndroms mit T2DM und pharmakologischer Ansatz zur Hemmung des CD40/CD40L Signalwegs

Aufgrund der gerade beschriebenen schwerwiegenden Nebenwirkungen einer systemischen CD40L antagonistischen Therapie wurde in einem weiteren Teilprojekt, welches sich an meine Doktorarbeit angeschlossen hat, übergewichtige Mäuse mit T2DM (db/db Mäuse) mit einem TRAF6-Inhibitor behandelt ⁽¹⁴⁹⁾. TRAF6 ist ein Target, das sich unterhalb der CD40/CD40L Signalkaskade befindet und offensichtlich eher die Wirkungen von CD40L im Gewebe verbreitet. Durch TRAF6 Hemmung können offensichtlich die atherosklerotischen Wirkungen von CD40L

unterbunden werden, ohne ein Auftreten der schwerwiegenden Nebenwirkungen wie unkontrollierbare Blutungen oder Immundefekte einer systemischen CD40L Antagonisierung in Kauf nehmen zu müssen. Wie in Abbildung 29 dargestellt wurde, führte die TRAF6-Inhibitor Therapie in den db/db-Mäusen zu einer nur marginalen Gewichtsreduktion und Verringerung des Diabetes-Parameters HbA1c. Dagegen wurde die Endothelfunktion durch TRAF6-Inhibition tendenziell verbessert, die Aktivierung von Leukozyten im Vollblut ging zurück und der oxidative Stress in der Gefäßwand und im Serum wurde nahezu normalisiert. Der Inflammationsmarker IL-1 β wurde ebenfalls signifikant reduziert. Die in db/db-Mäusen tendenziell verringerten Expressionen von antioxidativen Schutzenzymen wie Glutathionperoxidase-1, Superoxiddismutase-1 und Katalase wurden durch TRAF6-Inhibition erhöht (nicht gezeigt) ⁽¹⁴⁹⁾. Dagegen lagen die NOX-2 Expression und der AGE/RAGE Signalweg in db/db-Mäusen erhöht bzw. aktiviert vor und wurden durch TRAF6-Inhibition normalisiert.

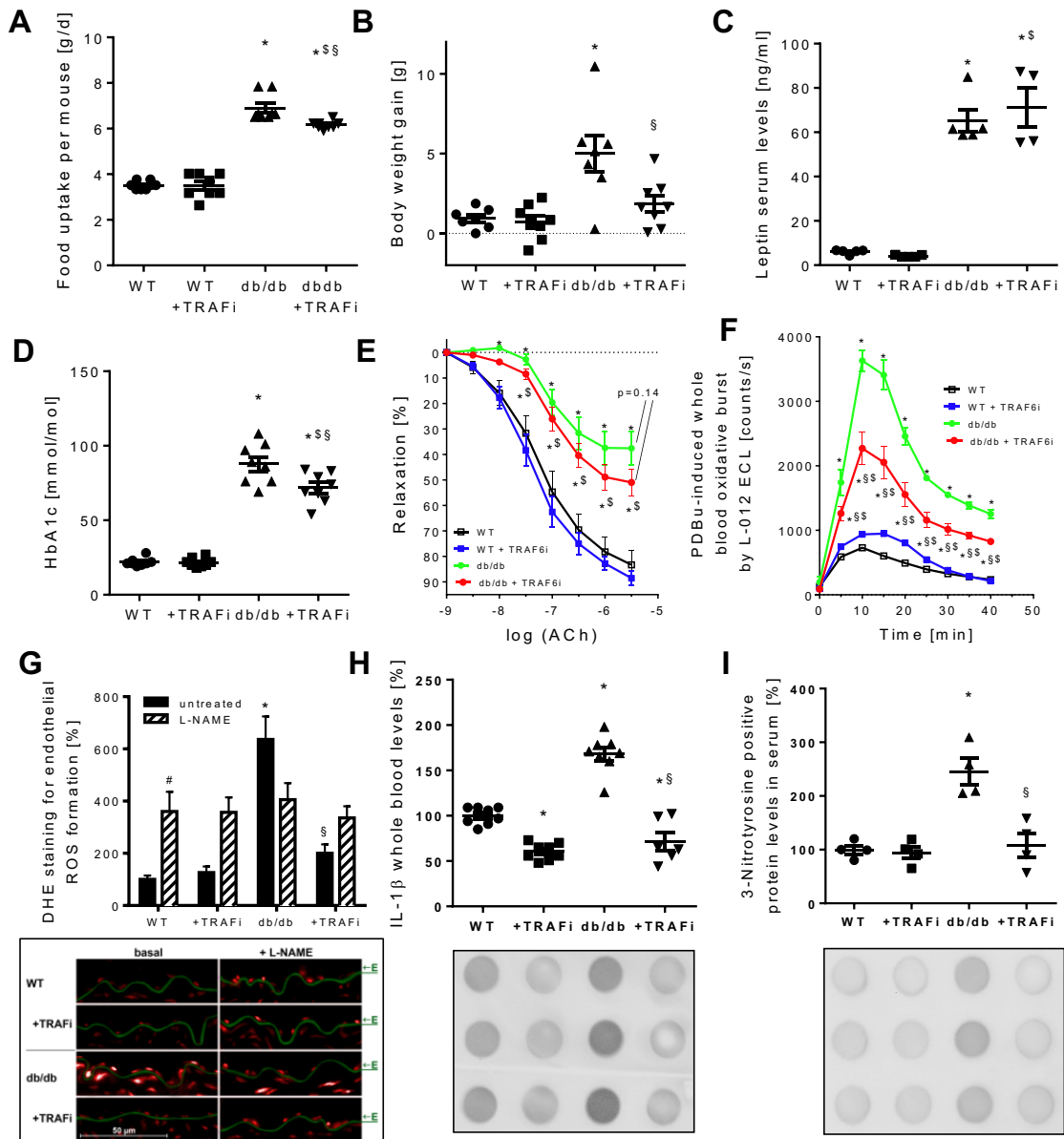


Abbildung 29: Medikamentöse Hemmung von CD40/TRAF6 verbessert die Gefäßfunktion und reduziert den oxidativen Stress und Entzündung in db/db Mäusen.

Nahrungsaufnahme (A), Gewicht (B), Leptin-Spiegel im Serum (C) und HbA1c-Blutwert (D) wurden nach der 2-wöchigen Behandlung mit CD40/TRAF6-Inhibitor ermittelt. ACh-abhängige Vasodilatation der mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorbehandelten Aortenringe (E). Zeitverlauf des Phorbol ester (PDBu, 10 μM)-induzierten Bursts im Blut, ermittelt mittels L012 (100 μM) ECL (F). Endotheliale ROS-Bildung in Aortengewebe, ermittelt durch DHE (1 μM)-Färbung der Kyrostabschnitte und inhibitorischer Effekt vom eNOS-Inhibitor L-NAME (0,5 mM) (G). Entzündungsparameter IL-1 β (H) und Indikatoren des oxidativen Stresses 3NT-positive Proteine (I).

Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm SEM; n= 4-8 Messungen oder gepoolte Proben von 8 Mäusen/Gruppe (A-D), 6-8 (E), 5 (F), 8 (G), 6-8 (H), und 6-8 (4 Proben, teilweise gepoolte Proben von 2 Mäusen) (I) Tiere pro Gruppe. *p < 0.05 vs. WT; §P < 0.05 vs. db/db; \$P < 0.05 vs. WT+CD40/TRAF6i; #P < 0.05 vs. Entsprechende Gruppe ohne L-NAME. Übernommen aus (149).

9 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Befunde der vorangegangenen Studien. Zusätzlich gelang es neue Gesichtspunkte zu erlangen, die zu der molekularen Pathophysiologie in den Gefäßen bei Hyperlipidämie/Adipositas beitragen. Hier konnten neue Erkenntnisse zur Rolle des CD40-Liganden und seiner genetischen Defizienz gewonnen werden. Diese Studie liefert detailreiche Beobachtungen zur Entstehung des vaskulären oxidativen Stresses, der endothelialen Dysfunktion, der vaskulären Entzündung und Thrombozytenaktivierung bei Hyperlipidämie/Adipositas, die wiederum bei der Entwicklung der Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen auf, dass CD40L-Defizienz diese pathologischen Mechanismen positiv beeinflusst.

Zudem wird hier gezeigt, dass Adipositas in Menschen mit einem erhöhten sCD40L-Serumspiegel und einer verstärkten Expression der vaskulären pro-inflammatorischen Gene assoziiert ist.

Auf dieser Basis mag CD40-CD40L-Interaktion und sein Signalweg ein neues vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Fettstoffwechselstörungen und ihre Komplikationen repräsentieren, welche eine Hauptursache der atherothrombotischen, kardiovaskulären Erkrankungen wie Schlaganfall und Myokardinfarkt sind.

Da CD40L und CD40 nicht nur von Thrombozyten und Leukozyten, sondern auch von Endothelzellen und den glatten Muskelzellen exprimiert werden, bleibt herauszufinden, ob bei einer CD40L-Defizienz/Inhibition in adipösen Tieren/Individuen lediglich die CD40L-Freisetzung aus Thrombozyten und die Gegenaktivierung der zirkulierenden Immunzellen ausbleibt, oder durch die CD40L-Defizienz/Inhibition die Entzündungskaskade in Gefäßzellen unterbrochen wird; wobei diese Entzündungskaskade kann sowohl durch den CD40-CD40L-Signalweg von infiltrierten Immunzellen ausgelöst werden, als auch durch direkte Aktivierung von vaskulärem CD40 durch von Thrombozyten stammendem CD40L.

10 Literaturverzeichnis

1. Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *AHA Nutrition Committee. Circulation.* 1998;97(21):2099-100.
2. de Groot PCM, Dieben SWM, Helmerhorst FM, Dekkers OM, Romijn JA. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update.* 2011;17(4):495-500.
3. Bogers RP, Bemelmans WJ, Hoogenveen RT, Boshuizen HC, Woodward M, Knekt P, et al. Association of overweight with increased risk of coronary heart disease partly independent of blood pressure and cholesterol levels: a meta-analysis of 21 cohort studies including more than 300 000 persons. *Archives of internal medicine.* 2007;167(16):1720-8.
4. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health.* 2009;9(1):88.
5. Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *American heart journal.* 2008;156(1):13-22.
6. Gnacińska M, Małgorzewicz S, Stojek M, Łysiak-Szydłowska W, Sworczak K. Role of adipokines in complications related to obesity. A review. *Advances in Medical Sciences (De Gruyter Open).* 2009;54(2).
7. Symons JD, Abel ED. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev Endocr Metab Disord.* 2013;14(1):59-68.
8. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(6):399-409.
9. Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014;28(2):169-76.
10. Ellulu MS, Khaza'ai H, Rahmat A, Patimah I, Abed Y. Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults. *International Journal of Cardiology.* 2016;215:318-24.
11. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
12. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3579-94.
13. Wenzel P, Kossmann S, Munzel T, Daiber A. Redox regulation of cardiovascular inflammation - Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:48-60.
14. Organisation WH. Country profiles on nutrition, physical activity and obesity in the 53 WHO European Region Member States. Methodology and summary 2013 [
15. WHO. Noncommunicable diseases-Obesity-Data and statistics 2014 [Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>.
16. WHO. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. 2000.
17. Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, Abate N, Aronne LJ, Brown WV, et al. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol.* 2013;7(4):304-83.
18. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93(1):359-404.
19. Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Olszanecka-Glinianowicz M, Zurawski A. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity. *Int J Obesity.* 2000;24(11):1392-5.
20. Sirico F, Bianco A, D'Alicandro G, Castaldo C, Montagnani S, Spera R, et al. Effects of Physical Exercise on Adiponectin, Leptin, and Inflammatory Markers in Childhood Obesity: Systematic Review and Meta-Analysis. *Child Obes.* 2018.

21. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1819-24.
22. Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med.* 1992;152(1):56-64.
23. Nomura K. [Cardiovascular event in elderly patients with diabetes mellitus]. *Nihon Rinsho.* 2013;71(11):1954-9.
24. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247(3):349-58.
25. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 1998;101(12):2658-64.
26. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.
27. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
28. Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL. Inflammatory mechanisms. *Br Med Bull.* 2001;59:55-68.
29. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5134-8.
30. 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(18):8264-8.
31. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(11):1897-908.
32. Syverson D. *Theorien zur Pathogenese der Arteriosklerose: Universitätsmedizin Berlin*; 2013.
33. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145(1):33-43.
34. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(1):333-7.
35. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-61.
36. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis.* 1986;6(5):505-10.
37. Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1982;113(2):261-6.
38. Mok MY, Lau CS. The burden and measurement of cardiovascular disease in SSc. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(7):430-4.
39. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985;311(1152):617-31.
40. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
41. Daiber A, Ullrich V. Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit: Radikalchemie im Organismus. *Chemie in unserer Zeit.* 2002;36(6):366-75.
42. Daiber A, Münzel T. Vaskulärer oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion, Mögliche Ansatzpunkte für eine Therapie mit AT1-Rezeptorblockern. *KrankenhausPharmazie.* 2007;28(8):313-22.

43. Daiber A, Oelze M, Daub S, Steven S, Schuff A, Kröller-Schön S, et al. Vascular Redox Signaling, Redox Switches in Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS Uncoupling), and Endothelial Dysfunction. 2014. p. 1177-211.
44. Daiber AB, M. Enzyme Inhibition by Peroxynitrite-Mediated Tyrosine Nitration and Thiol Oxidation. *Current Enzyme Inhibition* 2007;3(2).
45. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(3):217-26.
46. Kreuzer J, Brandes RP. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research*. 2005;65(1):16-27.
47. Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2517-33.
48. Jha JC, Watson AMD, Mathew G, de Vos LC, Jandeleit-Dahm K. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(10):981-90.
49. Carvalho DP, Dupuy C. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *European thyroid journal*. 2013;2(3):160-7.
50. Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2005;360(1464):2301-8.
51. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*. 2004;555(Pt 3):589-606.
52. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1451-64.
53. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *British journal of pharmacology*. 2017;174(12):1670-89.
54. 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(8):1551-7.
55. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78(6):915-8.
56. Bringold U, Ghafourifar P, Richter C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release. *Free radical biology & medicine*. 2000;29(3-4):343-8.
57. Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1982;401:1-8.
58. Griffith TM, Edwards DH, Lewis MJ, Newby AC, Henderson AH. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature*. 1984;308(5960):645-7.
59. Herman AG, Claeys M, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin production by rabbit aorta, pericardium, pleura, peritoneum and dura mater. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1978;236(2):303-4.
60. Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium 1993. V18-V25 p.
61. Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):923-39.
62. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
63. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(6):338-49.
64. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
65. Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 2002;109(6):817-26.
66. 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(25):22546-54.
67. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, et al. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(11):6823-6.

68. Paulie S, Koho H, Ben-Aissa H, Hansson Y, Lundblad ML, Perlmann P. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. II. Identification of the cellular target structures by immunoprecipitation and SDS-PAGE analysis. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;17(3):173-9.
69. Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jonsdottir I, Hansson Y, Lundblad ML, et al. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother.* 1984;17(3):165-72.
70. Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 1985;20(1):23-8.
71. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(12):4494-8.
72. Hirohata S, Jelinek DF, Lipsky PE. T cell-dependent activation of B cell proliferation and differentiation by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J Immunol.* 1988;140(11):3736-44.
73. Bartlett WC, Michael A, McCann J, Yuan D, Claassen E, Noelle RJ. Cognate interactions between helper T cells and B cells. II. Dissection of cognate help by using a class II-restricted, antigen-specific, IL-2-dependent helper T cell clone. *J Immunol.* 1989;143(6):1745-54.
74. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature.* 1992;357(6373):80-2.
75. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med.* 1992;175(4):1091-101.
76. Graf D, Korthauer U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA. Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol.* 1992;22(12):3191-4.
77. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, et al. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J.* 1992;11(12):4313-21.
78. Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(14):6550-4.
79. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. *J Exp Med.* 1993;178(5):1567-75.
80. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(1):4-43.
81. Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghonaïm A, Soresina AR, Loubser M, et al. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12614-9.
82. Tung CH, Lu MC, Lai NS, Wu SF. Tumor necrosis factor-alpha blockade treatment decreased CD154 (CD40-ligand) expression in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183726.
83. Giunta B, Rezai-Zadeh K, Tan J. Impact of the CD40-CD40L dyad in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(2):149-55.
84. Kim KJ, Baek IW, Yoon CH, Kim WU, Cho CS. Elevated levels of soluble CD40 ligand are associated with antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2017;35(5):823-30.
85. Carayanniotis G, Masters SR, Noelle RJ. Suppression of murine thyroiditis via blockade of the CD40-CD40L interaction. *Immunology.* 1997;90(3):421-6.
86. Mysliwiec J, Oklota M, Nikolajuk A, Waligorski D, Gorska M. Serum CD40/CD40L system in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis related to soluble Fas, FasL and humoral markers of autoimmune response. *Immunol Invest.* 2007;36(3):247-57.

87. Perazzio SF, Soeiro-Pereira PV, Dos Santos VC, de Brito MV, Salu B, Oliva MLV, et al. Soluble CD40L is associated with increased oxidative burst and neutrophil extracellular trap release in Behcet's disease. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):235.
88. Shimizu K, Schonbeck U, Mach F, Libby P, Mitchell RN. Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J Immunol.* 2000;165(6):3506-18.
89. Jinchuan Y, Zonggui W, Jinming C, Li L, Xiantao K. Upregulation of CD40-CD40 ligand system in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 2004;339(1-2):85-90.
90. Laman JD, de Smet BJ, Schoneveld A, van Meurs M. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Immunol Today.* 1997;18(6):272-7.
91. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature.* 1998;394(6689):200-3.
92. Yuan M, Fu H, Ren L, Wang H, Guo W. Soluble CD40 ligand promotes macrophage foam cell formation in the etiology of atherosclerosis. *Cardiology.* 2015;131(1):1-12.
93. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *Biofactors.* 2009;35(6):474-83.
94. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci.* 1998;23(2):74-9.
95. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* 2000;67(1):2-17.
96. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391(6667):591-4.
97. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1931-6.
98. Chen Y, Chen J, Xiong Y, Da Q, Xu Y, Jiang X, et al. Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(1):106-17.
99. Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, Baum D, Crow MK, Lederman S, et al. Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol.* 1995;58(2):209-16.
100. Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M, Ranuncoli A, Oliveira M, Wagner JL, et al. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):8132-7.
101. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. CD40/CD40 homodimers are required for CD40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of B7.2 by human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(9):7799-806.
102. Werneburg BG, Zoog SJ, Dang TT, Kehry MR, Crute JJ. Molecular characterization of CD40 signaling intermediates. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43334-42.
103. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair. *Adv Immunol.* 1996;61:1-77.
104. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(5):654-9.
105. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997;385(6618):729-33.
106. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhardt W, Carter HL, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* 1997;385(6618):733-6.
107. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya J Med Sci.* 2011;73(3-4):69-78.
108. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol.* 1997;159(12):5782-5.

109. Danese S, Fiocchi C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease. *Crit Rev Immunol*. 2005;25(2):103-21.
110. Zhang Y, Cao HJ, Graf B, Meekins H, Smith TJ, Phipps RP. CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol*. 1998;160(3):1053-7.
111. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*. 2003;92(9):1041-8.
112. Danese S, de la Motte C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol*. 2004;172(4):2011-5.
113. Seijkens T, Kusters P, Chatzigeorgiou A, Chavakis T, Lutgens E. Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? *Diabetes*. 2014;63(12):3982-91.
114. Poggi M, Jager J, Paulmyer-Lacroix O, Peiretti F, Gremeaux T, Verdier M, et al. The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia*. 2009;52(6):1152-63.
115. Seijkens T, Kusters P, Engel D, Lutgens E. CD40-CD40L: linking pancreatic, adipose tissue and vascular inflammation in type 2 diabetes and its complications. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10(2):115-22.
116. Missiou A, Wolf D, Platzer I, Ernst S, Walter C, Rudolf P, et al. CD40L induces inflammation and adipogenesis in adipose cells--a potential link between metabolic and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2010;103(4):788-96.
117. Poggi M, Engel D, Christ A, Beckers L, Wijnands E, Boon L, et al. CD40L deficiency ameliorates adipose tissue inflammation and metabolic manifestations of obesity in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2251-60.
118. Klein D, Timoneri F, Ichii H, Ricordi C, Pastori RL. CD40 activation in human pancreatic islets and ductal cells. *Diabetologia*. 2008;51(10):1853-61.
119. Li H, Lelliott C, Hakansson P, Ploj K, Tuneld A, Verolin-Johansson M, et al. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 2008;57(12):1704-10.
120. Gerdes N, Zirlik A. Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation - tipping the balance in atherosclerosis? *Thromb Haemost*. 2011;106(5):804-13.
121. Lutgens E, Daemen MJ. CD40-CD40L interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(1):27-32.
122. Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 2001;89(12):1092-103.
123. Schonbeck U, Mach F, Bonnefoy JY, Loppnow H, Flad HD, Libby P. Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J Biol Chem*. 1997;272(31):19569-74.
124. Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, et al. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;104(20):2395-400.
125. Kopp CW, Steiner S, Nasel C, Seidinger D, Mlekusch I, Lang W, et al. Abciximab reduces monocyte tissue factor in carotid angioplasty and stenting. *Stroke*. 2003;34(11):2560-7.
126. Sanguigni V, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Nadia T, Saliola M, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(1):35-42.
127. Cipollone F, Chiarelli F, Davi G, Ferri C, Desideri G, Fazia M, et al. Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia*. 2005;48(6):1216-24.
128. Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, et al. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*. 2003;108(22):2776-82.
129. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1104-11.

130. Ferroni P, Guagnano MT, Falco A, Paoletti V, Manigrasso MR, Michetti N, et al. Association of low-grade inflammation and platelet activation in patients with hypertension with microalbuminuria. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(6):449-55.
131. Pamukcu B, Lip GYH, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. *Annals of Medicine*. 2011;43(5):331-40.
132. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*. 2001;104(19):2266-8.
133. Steven S, Oelze M, Hanf A, Kroller-Schon S, Kashani F, Roohani S, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox biology*. 2017;13:370-85.
134. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-23.
135. Kroller-Schon S, Daiber A, Schulz E. Modulation of Vascular Function by AMPK: Assessment of NO Bioavailability and Surrogates of Oxidative Stress. *Methods Mol Biol*. 2018;1732:495-506.
136. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*. 1995;95(1):187-94.
137. Angus JA, Cocks TM, McPherson GA, Broughton A. The acetylcholine paradox: a constrictor of human small coronary arteries even in the presence of endothelium. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1991;18(1):33-6.
138. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*. 2004;142(2):231-55.
139. Dikalov S, Griending KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007;49(4):717-27.
140. Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, Hink U, et al. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. *Hypertension*. 2006;48(4):677-84.
141. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(1):101-11.
142. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
143. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972;48(2):422-7.
144. Omar HA, Cherry PD, Mortelliti MP, Burke-Wolin T, Wolin MS. Inhibition of coronary artery superoxide dismutase attenuates endothelium-dependent and -independent nitrovasodilator relaxation. *Circ Res*. 1991;69(3):601-8.
145. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, et al. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254(2):319-24.
146. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res*. 1999;84(10):1203-11.
147. Vladimirov YA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry Biokhimiia*. 2009;74(13):1545-66.
148. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
149. Steven S, Dib M, Hausding M, Kashani F, Oelze M, Kroller-Schon S, et al. CD40L controls obesity-associated vascular inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in high fat diet-treated and db/db mice. *Cardiovascular Research*. 2018;114(2):312-23.

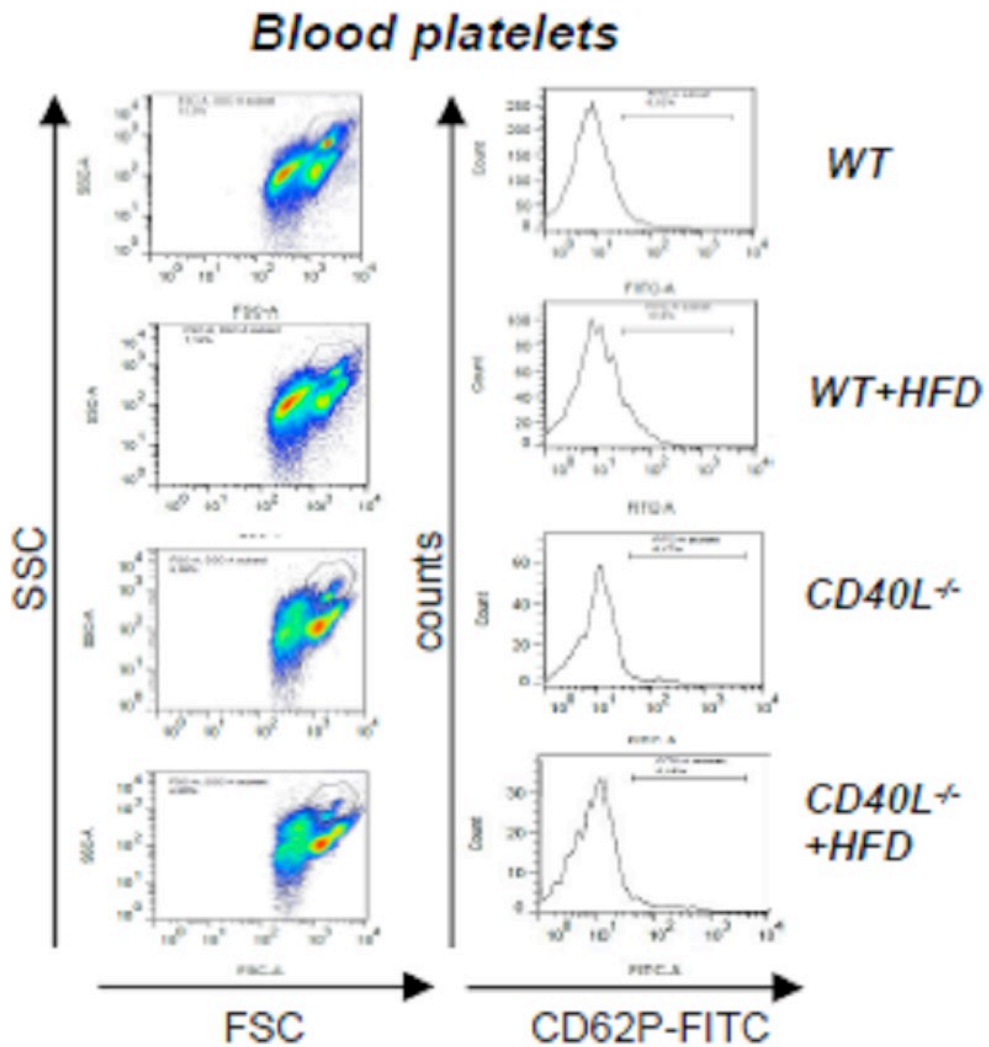
150. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
151. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [Available from: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07s03.html>].
152. Western Transfer Protocol.
153. Giarola V. Expression study of Ls11-24 a dehydration induced gene in *Lindernia subracemosa* (Linderniaceae) 2008.
154. Bio-Dot and Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus [Available from: <http://www.bio-rad.com/de-de/product/bio-dot-bio-dot-sf-microfiltration-apparatus?ID=d986e28f-4a82-4c13-8ce1-3eae9bb4fdbb>].
155. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(4):365-79.
156. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):317-25.
157. Hausding M, Jurk K, Daub S, Kroller-Schon S, Stein J, Schwenk M, et al. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(6):386.
158. Begg A, Findlay I. Targeting residual risk: a new approach to treating CVD? *Br J Cardiol*. 2014;21:108–12.
159. Hogarth CA, Roy A, Ebert DL. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003;135(2):219-29.
160. Daiber A, Bachschmid M, Beckman JS, Munzel T, Ullrich V. The impact of metal catalysis on protein tyrosine nitration by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;317(3):873-81.
161. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
162. Mollnau H, Schulz E, Daiber A, Baldus S, Oelze M, August M, et al. Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):615-21.
163. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(1):R1-12.
164. Levine YC, Li GK, Michel T. Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK → Rac1 → Akt → endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem*. 2007;282(28):20351-64.
165. Schachinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation*. 1995;92(8):2087-94.
166. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
167. Daiber A, Ullrich V. Peroxynitrite reactions with heme and heme-thiolate (P450) proteins. *Methods Enzymol*. 2002;359:379-89.
168. Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*. 1998;356(1):1-11.
169. Zou M, Yesilkaya A, Ullrich V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug Metab Rev*. 1999;31(2):343-9.
170. Zou M, Martin C, Ullrich V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol Chem*. 1997;378(7):707-13.
171. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(21):11853-8.
172. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods*. 1987;97(2):209-13.

173. Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, et al. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002;40(4):511-5.
174. Morawietz H. Endothelial NADPH oxidases: friends or foes? *Basic Research in Cardiology*. 2011;106(4):521-5.
175. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Research in Cardiology*. 2011;106(5):735-47.
176. Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem*. 2005;280(51):42026-35.
177. Guastadisegni MC, Lonoce A, Impera L, Albano F, D'Addabbo P, Caruso S, et al. Bone marrow ectopic expression of a non-coding RNA in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with a novel t(2;11)(q11.2;p15.1) translocation. *Mol Cancer*. 2008;7:80.
178. Panagopoulos AT, Lancellotti CL, Veiga JC, de Aguiar PH, Colquhoun A. Expression of cell adhesion proteins and proteins related to angiogenesis and fatty acid metabolism in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol*. 2008;89(1):73-87.
179. Portillo JA, Van Grol J, Zheng L, Okenka G, Gentil K, Garland A, et al. CD40 mediates retinal inflammation and neurovascular degeneration. *J Immunol*. 2008;181(12):8719-26.
180. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res*. 2009;69(9):4001-9.
181. Morris SM, Jr., Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 1):E829-39.
182. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*. 1999;85(2):199-207.
183. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394(6696):894-7.
184. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251(4995):788-91.
185. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, et al. Vascular Cell-Adhesion Molecule-1 Is Expressed in Human Coronary Atherosclerotic Plaques - Implications for the Mode of Progression of Advanced Coronary Atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;92(2):945-51.
186. Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int J Clin Pract*. 2007;61(4):697-701.
187. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2009;6(6):399-409.
188. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Jama-J Am Med Assoc*. 1999;282(22):2131-5.
189. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina - Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1999;100(6):614-20.
190. Ferroni P, Guagnano MT, Falco A, Paoletti V, Manigrasso MR, Michetti N, et al. Association of low-grade inflammation and platelet activation in patients with hypertension with microalbuminuria. *Clin Sci*. 2008;114(5-6):449-55.
191. Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Zeiher AM. Pregnancy-associated plasma protein-A and acute coronary syndromes: Cause or consequence? - Reply. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(8):1584-5.
192. Damas JK, Otterdal K, Yndestad A, Aass H, Solum NO, Froland SS, et al. Soluble CD40 ligand in pulmonary arterial hypertension: Possible pathogenic role of interaction between platelets and endothelial cells. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(5):503a-a.

193. Jefferis BJ, Whincup PH, Welsh P, Wannamethee SG, Rumley A, Lawlor DA, et al. Prospective study of circulating soluble CD40 ligand concentrations and the incidence of cardiovascular disease in a nested prospective case-control study of older men and women. *J Thromb Haemost.* 2011;9(8):1452-9.
194. Vandenberg M, Boers GHJ, Franken DG, Blom HJ, Vankamp GJ, Jakobs C, et al. Hyperhomocysteinaemia and Endothelial Dysfunction Young-Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease. *Eur J Clin Invest.* 1995;25(3):176-81.
195. Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35(9):578-U35.
196. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, et al. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol.* 2008;172(4):1141-52.
197. Davis B, Zou MH. CD40 ligand-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in vivo. *Circulation.* 2005;112(14):2184-92.
198. Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. CD154/CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells: consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):715-20.
199. 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(2):396-9.
200. Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, et al. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation.* 2011;124(12):1370-81.
201. Lievens D, Zernecke A, Seijkens T, Soehnlein O, Beckers L, Munnix IC, et al. Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood.* 2010;116(20):4317-27.
202. Projahn D, Koenen RR. Platelets: key players in vascular inflammation. *J Leukocyte Biol.* 2012;92(6):1167-75.
203. Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med.* 2000;6(2):114-.
204. Andre P, Prasad KSS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta(3) integrin-dependent mechanism. *Nat Med.* 2002;8(3):247-52.
205. Chatzigeorgiou A, Seijkens T, Zarzycka B, Engel D, Poggi M, van den Berg S, et al. Blocking CD40-TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(7):2686-91.
206. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Wijnands E, Soehnlein O, Zernecke A, et al. Deficient CD40-TRAF6 signaling in leukocytes prevents atherosclerosis by skewing the immune response toward an antiinflammatory profile. *Journal of Experimental Medicine.* 2010;207(2):391-404.

11 Anhang

Anhang 1: Die grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse-
resultanten von CD62P positiven Thrombozyten. Repräsentative FACS Plots für N=4
pro Gruppe.



Anhang 2: Liste der Targetgen-spezifischen Proben und der Referenzgene, die für die nCounter Elements Technology (nanoString Technologies) Messungen verwendet wurden, und ihre entsprechenden Sequenzen.

Target Gene	Probe (A & B)	Accession number	Sequence (5'>3')
TNF	Pro be A	NM_000594.2:1010_T0	CAGGCCACACATTCCTGAATCCCAGGTTTCGAAGTGGTGGTCTTGGTTGCTCCTCAAGACCTAAAGC
	Pro be B	NM_000594.2:1010_Pro beB	GACAGCGTGACCTTGTTTCA CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTTCTGGAGGCCCCAGTTTGAATTTCTTAGTGGTTGCCAGCA CTTCACTGTG
NOX-4	Pro be A	NM_016931.4:938_T00	AGGGTGGGTATCTAAATTAGTTTGATACTTCAGCAGCCCTCCTGAAAACATCAAAAGACGCCTATCTT CCAGTTTGATCGGAAACT
	Pro be B	NM_016931.4:938_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGGTAAAGGAAATATTCTGAGAGCTGGTTCGGTTAAGACTGA TGCAGCCGGG
P22PH OX (CYBA)	Pro be A	NM_000101.2:100_T00	AAAGTACCACCTGGGTGAAGCGCCAGCTGTGGCCACGATGCCAAATTTGGTTTTACTCCCCCTCGAT TATGCGGAGT
	Pro be B	NM_000101.2:100_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCAGCAGGCACACAAAACACGCCCCGCCACAATGGAGTAGG CACC
NOX-1	Pro be A	NM_001271815.1:736_T009	TTTGACCCCGGACAAATCCACCAATGCCGTGAATCCCTAAGCCAAAGGATACAACAGCCACTTTTT TTCCAAATTTGCAAGAGCC
	Pro be B	NM_001271815.1:736_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAAAAAGACTCTGCACACTTCCGAGGATGACTCTCATTTCATG CTCTCCTCTG
VCAM-1	Pro be A	NM_001078.3:2535_T0	GGACATAGATGGGCATTTCTTTCCCAAGTTCAATACATTCAGGGAAGTCTGCTTCCCTTCTGTGTTT CAGCTACAAAATTAGAAAC
	Pro be B	NM_001078.3:2535_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTACTGTCTTCCAGGCAGCAAGTTTTACTTTGACTTCTTGCT CACAGCAAG
ICAM-1	Pro be A	NM_000201.2:2253_T0	TAAGTCTGTGGGCTCAGCATACCCCAATAGGCAGCAAGTTTCAGCTGGTCAAGACTTGCATGA GGACCCGCAAAATTCCT
	Pro be B	NM_000201.2:2253_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTTGTGTTTGTATGCTACACATGTCTATGGAGGGCCACT TCTTCTG
P67PH OX (NCF2)	Pro be A	NM_000433.3:1004_T0	TGGAGCTCTCTTTTGTCTCAGGCACAAAACCCAAAATAGCACACGGTGAGCCCGCAGACCTGCAA TATCAAAAGTTAAGCGCGT
	Pro be B	NM_000433.3:1004_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGTTATCATTGCCCTTCTTCAAGACAAAAGACAATGTTCCCT GGCATGACC
TRAF2	Pro be A	NM_021138.3:1325_T0	GGTTATTCTGGTCGAGCAGCATTAAAGTCCACCTTCTGGTTGAAGGGCCACCCAAAACCTGGAGAGAG AAGTGAAGACGATTAACCCA

	Pro be B	NM_021138.3:1325_Pr obeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAAAAAGGATGAAGTCACGTCGGGCCCTGAAGGCGTCAAT CACGTGCTCCC
<i>IL-6</i>	Pro be A	NM_000600.1:220_T02 4	CCTTCTCAGGGCTGAGATGCCGTGAGGATGTACCGAATTTGTTGTCCACATTTGGAATGATGT GTACTGGGAATAAGACGACG
	Pro be B	NM_000600.1:220_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTGCTTTTCCACACATGTTACTCTTGT TACATGTCT
<i>CD11B (ITGA M)</i>	Pro be A	NM_000632.3:515_T02 6	TCAATCAAGAAGGCAATGTCACATATCCTCTTGAGGACACCCCTCGGAGGGCCCTTGACGTAGATTGC TATCAGGTTACGATGACTGC
	Pro be B	NM_000632.3:515_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAAACTCCTTCATCCGCCGAAAGTCAATGTGGGATGATGCT ACCAGAGCCA
<i>SELP</i>	Pro be A	NM_003005.2:1295_T0 28	GCACAGCGGAAGCTACAGTTGGTGTCTACTGAAACCGCTCTCAAGGATGGCTTGGAGGAGTTGA TAGTGGTAAACAACATTAGC
	Pro be B	NM_003005.2:1295_Pr beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCAAGTTATCACACCCGAACTATATCGGCTCCTCTCAGCAT GAAACCTTCA
<i>CD68</i>	Pro be A	NM_001251.2:1140_T0 30	GAGGCCAAGAAGGATCAGGCCGATGATGAGAGGCCAGCAAGATGGACCAGCAAGAAGGAGTATG GAACTTATAGCAAGAGAG
	Pro be B	NM_001251.2:1140_Pr beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGATGGCGTCTCCGGATGATGCAGAAAGCAATAAGCACC AGGGCGAG
<i>IFNG</i>	Pro be A	NM_000619.2:970_T03 4	CTGGCTCAGATTGCAGGCATATTTCAAACCCGGCAGTAAGTAGTATCCGATCTTTCATAACG GACAAACTGAACGGGCCATT
	Pro be B	NM_000619.2:970_Pro beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCATCAGGGTCACCTGACACATTCAAAGTTCTGTCTGACATGC CATTAAAGCA
<i>TF (CD142)</i>	Pro be A	NM_001993.3:1030_T0 36	AACAGTGCTTCCCTTATGAAACATTCAGTGGGGAGTCTCCCTCCAGCTCCATTCGCAACCCATGT GAAGTAATGTGAGCGTACTT
	Pro be B	NM_001993.3:1030_Pr beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCTTTAAAAGTTCTCGGTCCACAGTGCAAATATAGCAATTTG CAGTAGCTCC
<i>CD40</i>	Pro be A	NM_001250.4:1265_T0 38	ACTATCACAAACAAATGCTGCAATGGGCATCTGTGTATATGGCTTCCCTGGGCCCTGAATCAATAGAA CAATATCAGTTATGGCGGTG
	Pro be B	NM_001250.4:1265_Pr beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTATTTAGCCAGTCTCCTGTGATGGACAGTTAAGCAGCTT CCAGTTGTTC
<i>CD40L</i>	Pro be A	NM_000074.2:1225_T0 40	AGCTGAGGCTCCCCATTTCCCTTCTGCATCTTCACTGATAAATCAAATGCCCGTCTCAGATGAGT GGGTTAATCAATCAAGTATG
	Pro be B	NM_000074.2:1225_Pr beB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCCCTCCAAACAAGGCCATAGGAAACCCAGAGTCAACCAT AACTGAATGTG

TUBB3	Probe A	NM_006086.2:1537_T047	ACGTGGCCTAGGTGGGAGGACGAGGCCATAAATACTGCAGGAGGGGCTAGCCCCAGATCCTACGAGATGAGCTACGTAACCTA
	Probe B	NM_006086.2:1537_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTAAAACCGTCAGGCCCTGGAGCTGCAATAAAGACACAGAGACAGGAGCAGCTCAC

Reference Gene	Probe (A & B)	Accession number	Sequence (5'>3')
HPRT	Probe A	NM_000194.1:240_T042	TGAGCACACAGAGGGCTACAAATGTGATGGCCCTCCCATCTCCTTCATCACACGTTAAACCAGATTATGTATGGACGGCGCAATAGATA
	Probe B	NM_000194.1:240_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGTCTTGTATGTAATCCAGCAGGTCAGCAAAAGAAATTTATAGCCCCCT
GAPDH	Probe A	NM_008084.2:521_T043	GTCATGAGCCCCCTCCACAATGCCAAAGTTGTCATGGATGACCTTGGCCCATACGAAAATTTGAGCAAGCAATTGAAGGCTTAGA
	Probe B	NM_008084.2:521_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGTCTTCTGGTGGCAGTGGCATGGACTGTGATTTCTGCTGACTTAGCACCTGTTAAACAACCTTTCCAGAAACAACACTATCAGCTAATAGG
TBP	Probe A	NM_003194.4:1191_T044	GTCGGCTCAACAGTGTATCC
	Probe B	NM_003194.4:1191_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTCTTCCCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGATGTTTTTCAAATGCTTCATAA
ACTB	Probe A	NM_001101.3:1062_T045	CCGCCGATCCACACCGGAGTACTTGGCTCAGGAGGAGCAATGATCTTTGATCTATCAATTCGTGACCCCGATCATCCAGTCCAGAA
	Probe B	NM_001101.3:1062_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCATCTGATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACACGCGAGGCCAGGATGGAG
ACTN	Probe A	NM_001130004.1:447_T046	GGCCATCCCGGAAGTCCCTCTTCGATGTTCTCGATCTGCTTAGGCCCAAAAACGACCTTAATGGTCA
	Probe B	NM_001130004.1:447_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCACCTGAGATGACCTCCAGCAGCAGCATGAGCTTCA
TRAF6	Probe A	NM_145803.2:1574_T021	GCATTGTGTGGACAAAAAGGGATATAGTTTGCACACGGCTGAGCAGTCTCTGAGGCTGTTAAGCTGTAGCAACTCTTCCACGA
	Probe B	NM_145803.2:1574_ProbeB	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGGAAGGCCAAAGGGAGGTGGCTGTCATATTCTCCTT

12 Danksagung

Vor allen danke ich Direktor des Zentrums für Kardiologie 1 der Universitätsmedizin Mainz, für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie - Zentrum für Kardiologie 1 der Universitätsmedizin Mainz, die mir neben Labor und Gerätschaften auch ihr außerordentliches methodisches Wissen während der gesamten Zeit zur Verfügung gestellt haben.

13 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Fatemeh Kashani
E-Mail: fatemehkashani_91@yahoo.com
Geburtsdatum: 07.05.1991
Geburtsort: Mashhad-Iran
Familienstand: ledig

Schulische und universitäre Ausbildung

06/2009 Allgemeine Hochschulreife im Iran
Abschluss: iranisches Abitur, Note 1,0

09/2010-07/2011 Internationales Studienkolleg der Universität Mainz
Abschluss: deutsches Abitur, Note 1,2

10/2011-05/2018 Studium der Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0 (Herbst 2013)
- Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 3,0 (Frühjahr 2017)
- 1. Tertial des Praktischen Jahres: HNO, Universitätsklinikum Frankfurt
- 2. Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie, GKM-Kemperhof Koblenz
- 3. Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin, GKM-Kemperhof Koblenz
- Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0 (Frühjahr 2018)

Seit 07/2018 Facharztausbildung für Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde, Klinikum der Universität München (LMU)

Praktika und Nebenerwerbstätigkeiten

02/2014-03/2014 Famulatur, Gynäkologische Praxis Heidari, Ennepetal

08/2014-09/2014 Famulatur, Innere Medizin, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

02/2015-03/2015 Famulatur, Kardiologie und Angiologie, II Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz

08/2016-09/2016 Famulatur, Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Cetin Kirmizitas

09/2016-10/2016 Famulatur, HNO-Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz

09/2011-06/2013 Biologie-Lehrerin, Iranisches Gymnasium Frankfurt

01/2012-02/2015 Krankenpflegehelferin, Medizinische Einrichtungen der Chirurgie und Neurochirurgie der Universitätsmedizin Mainz

11/2013-04/2017 Wissenschaftliche Hilfskraft, II. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz

05/2015-09/2017 Studentische Aushilfe, HNO-Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz

Auszeichnungen und Stipendien

1. Platz in der nationalen Junioren-Mathematik-Olympiade, Iran 2004

1. Platz und Goldmedaille der 11. Nationalen Biologie-Olympiade, Iran 2008

Silbermedaille der 20. Internationalen Biologie-Olympiade, Japan 2009

Promotionsstipendium der Robert Müller Stiftung 2014

Förderungsstipendium der Ferdinand und Charlotte-Schimmelpfennig-Stiftung 2016-2017

Publikationen

- Mikhed Y, Fahrer J, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Welschof P, Zinßius E, Stamm P, **Kashani F**, Roohani S, Kress JM, Ullmann E, Tran LP, Schulz E, Epe B, Kaina B, Münzel T, Daiber A. Nitroglycerin induces DNA damage and vascular cell death in the setting of nitrate tolerance. *Basic Res Cardiol.* 2016

- Steven S, Dib M, Roohani S, **Kashani F**, Münzel T, Daiber A. Time Response of Oxidative/Nitrosative Stress and Inflammation in LPS-Induced Endotoxaemia-A Comparative Study of Mice and Rats. *Int J Mol Sci.* 2017

- Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, **Kashani F**, Roohani S, Welschof P, Kopp M, Gödtel-Armbrust U, Xia N, Li H, Schulz E, Lackner KJ, Wojnowski L, Bottari SP, Wenzel P, Mayoux E, Münzel T, Daiber A. The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol.* 2017

- Steven S, Jurk K, Kopp M, Kröller-Schön S, Mikhed Y, Schwierczek K, Roohani S, **Kashani F**, Oelze M, Klein T, Tokalov S, Danckwardt S, Strand S, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice. *Br J Pharmacol.* 2017

- Steven S, Dib M, Hausding M, **Kashani F**, Oelze M, Kröller-Schön S, Hanf A, Daub S, Roohani S, Gramlich Y, Lutgens E, Schulz E, Becker C, Lackner KJ, Kleinert H, Knosalla C, Niesler B, Wild PS, Münzel T, Daiber A. CD40L controls obesity-associated vascular inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in high fat diet-treated and db/db mice. *Cardiovasc Res.* 2018

- Steven S, Oelze M, Hausding M, Roohani S, **Kashani F**, Kröller-Schön S, Helmstädter J, Jansen T, Baum C, Iglarz M, Schulz E, Münzel T, Daiber A. The Endothelin Receptor Antagonist Macitentan Improves Isosorbide-5-Mononitrate (ISMN) and Isosorbide Dinitrate (ISDN) Induced Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Vascular Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2018

- **Kashani F**, Haubner F. Rhinorrhea. *MMW Fortschr Med.* 2019 May;161(8):48-49.

- **Kashani F**, Schrötlmair F, Canis M, Haubner F. An unusual finding in the tumor follow up care. *Laryngorhinootologie.* 2019 Aug;98(8):568-570.

Tagungsabstracts

- Steven S, Oelze M, Roohani S, **Kashani F**, Hausding F, Kröller-Schoen S, Schulz E, Münzel T, Daiber A. Suppression of endothelin-1 signaling by macitentan improves isosorbide-5-mononitrate (ISMN) and isosorbide dinitrate (ISDN) induced endothelial dysfunction, oxidative stress and vascular inflammation. *European Heart Journal, Volume 38.* 2017