

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Experimentelle Kardiologie

der Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie

Klinikdirektor: **Prof. Dr. Stefan Blankenberg**

Nitrierte Ölsäure verringert die Ausbildung von Arteriosklerose durch Inhibition der Schaumzellbildung und Synthese von Superoxiden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Andreas Thomas Franek

aus Beuthen, OS

Hamburg, 2013

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke

Es ist nicht genug zu wissen, man muss auch anwenden.

Es ist nicht genug zu wollen, man muss auch tun.

Johann Wolfgang v. Goethe

1. EINLEITUNG.....	6
1.1. Die Arteriosklerose.....	6
1.2. Prozess der Arteriosklerose	6
1.2.1. Aufbau eines Gefäßes	6
1.2.2. Prozess der Arteriosklerose auf der Gefäßebene	7
1.2.3. Die Arteriosklerose als Entzündungsprozess und die Rolle der Makrophagen	9
1.3. Nitroalkene.....	12
1.3.1. Aufbau und Vorkommen der Nitroalkene	12
1.3.2. Synthese von Nitroalkenen.....	13
1.3.3. Metabolisierung der Nitroalkene	15
1.3.4. Wirkung der Nitroalkene auf den Organismus	17
1.3.4.1. Nitroalkene verringern TNF α -Wirkung.....	18
1.3.4.2. Nitroalkene steigern die PPAR-Aktivität	19
1.3.4.3. LNO ₂ steigert die Expression der Heme Oxygenase 1 (HO-1).....	19
1.3.4.4. LNO ₂ verringert die Anlagerung von Blutplättchen	20
1.3.4.5. Nitroalkene verringern die Phosphorylierung von STAT-1	21
1.4. Superoxide.....	22
1.4.1. Aufbau, Vorkommen und Synthese der Superoxide	22
1.4.2. Wirkung von Superoxiden auf den Körper und den Entzündungsprozess	24
1.5. Zielsetzung der Doktorarbeit	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1. Material.....	26
2.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	26
2.1.1.1. Verwendete Reagenzien	26
2.1.1.2. Verwendete Antikörper	27
2.1.1.3. Verwendete Gerätschaften.....	27
2.1.2. Verwendetes Tiermaterial.....	28
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Zellbiologische Methoden	29
2.2.1.1. Allgemeine Zellkultur	29
2.2.1.2. Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM) aus Apo-E Mäusen	29
2.2.1.2.1. Herstellung von L-Zell-Zusatz	30
2.2.1.2.2. Gewinnung und Kultivierung von BMDM-Zellen	30
2.2.1.2.3. Versuche mit den BMDM-Zellen.....	31
2.2.1.3.1. Kultivierung von RAW-Zellen 264.7.....	33
2.2.1.3.2. Superoxidmessung mit RAW-Zellen	33
2.2.1.4.1. Isolation von Peritonealmakrophagen	35
2.2.1.5.1. Zellkammerzählung.....	35
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.2.1. Proteinbestimmung, Methode: BCA.....	36
2.2.2.1.1. Herstellung des RIPA-Puffers:	36
2.2.2.1.2. Proteinbestimmung:.....	37
2.2.2.2. Diskontinuierliche Gelelektrophorese	38
2.2.2.3. Western Blot	40

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.2.4. Blocken, Inkubation mit den Antikörpern und Entwicklung.....	41
2.2.2.5. Strippen der Membran	42
2.2.3. Tiermaterial	43
2.2.3.1. Anfertigung und Analyse von Kryoschnitten.....	43
2.2.4. Histochemische Verfahren.....	43
2.2.4.1. Oil-Red-O-Färbung bei Schnitten.....	43
3. ERGEBNISSE.....	46
3.1. Nitrierte Ölsäure verringert die Größe der arteriosklerotischen Plaques	46
3.2. Nitrierte Ölsäure verringert die Anreicherung von Lipiden in Peritonealmakrophagen	47
3.3. Nitrierte Ölsäure verringert die Anreicherung von Lipiden in BMDM-Zellen	49
3.4. Nitrierte Ölsäure verringert die Phosphorylierung von STAT-1.....	51
3.5. Nitrierte Ölsäure verringert die LPS-induzierte Superoxidproduktion.....	53
3.7. Nitrierte Ölsäure verringert die oxLDL-abhängige Superoxidproduktion	54
4. DISKUSSION.....	56
4.1. Einfluss auf die Größe von arteriosklerotischen Plaques	56
4.2 Einfluss von OA-NO ₂ auf die Schaumzellbildung	59
4.3 Nitrierte Ölsäure verringert die Superoxidproduktion in RAW-Makrophagen	63
4.4 Zusammenfassung und Zukunftsausblick.....	66
5. QUELLENVERZEICHNIS.....	67
5.1. Literaturverzeichnis	67
5.2. Abbildungsverzeichnis	80
5.3. Abkürzungsverzeichnis.....	81
6. PUBLIKATIONEN	83
7. DANKSAGUNG	84
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	85

1. Einleitung

1.1. Die Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist ein systemischer Prozess bei dem es zu Ablagerungen von Fetten, Thromben, Bindegewebe, glatter Muskulatur sowie von Calciumcarbonat in Gefäßwänden kommt. Es bilden sich sogenannte arteriosklerotische Plaques mit der Folge einer Gefäßverengung und einer damit einhergehenden Minderperfusion des versorgenden Gewebes. Arteriosklerose kann in jedem großen und kleinen arteriellen Gefäß des Körpers vorkommen und löst abhängig von der Lokalisation klassische Symptome und möglicherweise eine folgeschwere Veränderung für den Organismus aus. Zu den besonders häufigen Lokalisationen zählen die Aorta abdominalis, die Carotiden (A.carotis interna, A.carotis externa) mit der Folge eines Infarkts, die Koronararterien mit einem erhöhten Risiko für einen Myokardinfarkt sowie die Beinarterien mit der Folge einer pAVK (peripheren arteriellen Verschlusskrankheit). Nach Angaben des statistischen Bundesamtes bilden 2009 die ischämischen Herzerkrankungen und die akuten Myokardinfarkte zusammen mit 15,2% die Todesursache Nummer eins in Deutschland (DeStatis 2009). Arteriosklerose ist ursächlich verantwortlich für die Entstehung dieser Krankheiten und rückt somit in den Vordergrund der medizinischen Forschung.

1.2. Prozess der Arteriosklerose

1.2.1. Aufbau eines Gefäßes

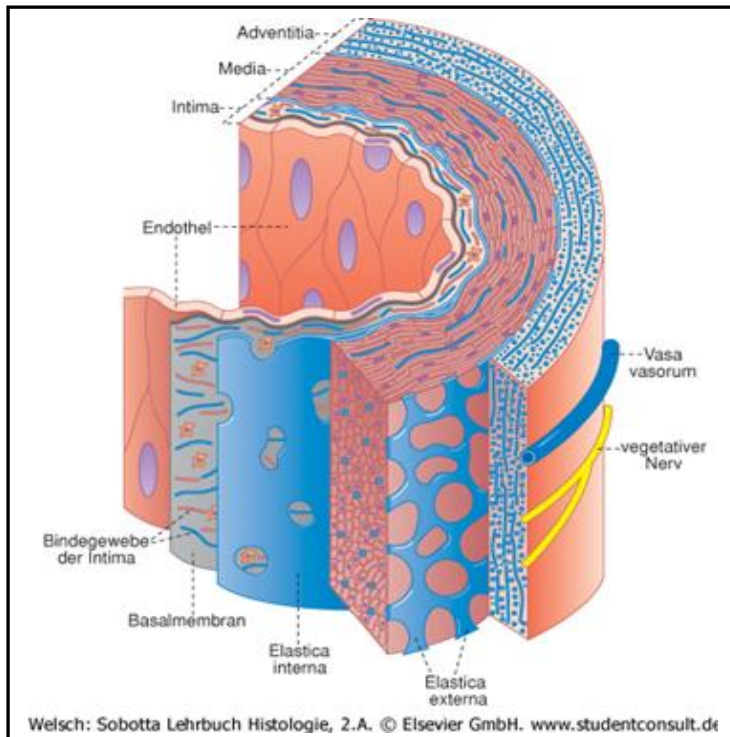


Abbildung 1.2.1: Aufbau eines arteriellen Gefäßes

Der komplexe Körper des Menschen ist auf den Transport von Nährstoffen, Signalmolekülen und Gasen zwischen den Geweben und Organen angewiesen (Carmeliet 2000). Hierzu dient ihm ein weit gespanntes, hochverzweigtes, röhrenförmiges Netzwerk das von Endothelzellen gebildet wird: Das Blutgefäßsystem. Arteriosklerose kann jedes kleine und große Gefäß im Organismus betreffen, wobei der Befall der kleinen Gefäße als Mikroangiopathie und der Befall von großen Gefäßen als Makroangiopathie bezeichnet wird.

Abbildung 1.2.1 zeigt den schematischen Aufbau einer mittelgroßen Arterie vom muskulären Typ. Die Wand besteht aus drei konzentrischen Schichten, der innersten Tunica interna (Intima), der muskulären Tunica media (Media) sowie der äußeren elastischen Tunica adventitia (Adventitia) (Jain 2003). Die Intima besteht aus einer innersten Endothelschicht mit Basallamina, einer locker gelagerten Bindegewebsschicht mit Fibroblasten sowie glatten Muskelzellen und dünnen Kollagenfasern. Die Intima wird von der Media durch eine dünne elastische Schicht getrennt, die *Elastica interna*. Die Media ist abhängig von dem Typ der Arterie entweder vorwiegend aus elastischen Fasern (elastischer Typ, z.B. Aorta) oder aus muskulären Fasern (muskulärer Typ) aufgebaut. Die Koronararterien gehören zum muskulären Typ und deswegen wird hier auf diesen Typ stärker eingegangen. Die Media besteht aus bis zu 30 konzentrisch angeordneten Schichten glatter Muskelzellen, die über gap junctions miteinander verbunden sind. Die Muskelzellen selbst sind oft von Kollagenfibrillen sowie Proteoglykanen umgeben. Die Trennschicht zwischen Media und Adventitia bildet auch hier ein Netz aus dünnen elastischen Fasern, die *Elastica externa*. Die Adventitia selbst bildet die äußere Hülle der Arterie und besteht aus kräftigen Kollagenfasern und elastischen Fasern, wobei sie dicker als die Media werden kann. Alle Arterien haben eine separate Gefäßversorgung (*Vasa vasorum*) sowie ein innervierendes vegetatives Nervenplexus (Welsch, Lehrbuch Histologie 2006).

1.2.2. Prozess der Arteriosklerose auf der Gefäßebene

Die Arteriosklerose ist ein chronischer und langwieriger Prozess, der bereits im frühen Alter beginnt (Napoli et al, 1997). Abbildung 1.2.2 zeigt die einzelnen Stadien der Arteriosklerose nach Stary. Stadium I der Arteriosklerose nach Stary ist ein Initialstadium. Es beginnt mit einer Endothelläsion, bei der die Barrierefunktion des Endothels aufgehoben wird. In diese Schäden können Monozyten sowie Lipide einwandern und es bilden sich erste Schaumzellen (foam cells) (Stary 1989, Stary et al. 1995, Stary 2000, Riede et al. 1989). Schaumzellen sind Monozyten, die sich zu Makrophagen umgewandelt und Fette aufgenommen haben. Diese Läsion kann bereits in der ersten Lebensdekade auftreten, bleibt jedoch klinisch stumm. Durch weitere Aufnahme von Lipiden aus dem Blut gibt es einen fließenden Übergang ins Stadium II, bei dem sogenannte „fatty streaks“ auftreten. Dabei wird das im Blut zirkulierende LDL in der Media der Gefäßwand zu oxLDL umgewandelt und von den dort befindlichen Makrophagen phagozytiert. Es resultieren daraus gelblich erhabene, streifenförmige Intimaherde (Stary 1989, Stary et al. 1995, Stary 2000). Stadium III nach Stary tritt erst ab der 3. Lebensdekade auf und ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines Lipidplaques. Hierbei lagern sich die Lipide im Extrazellularraum zwischen den Schaumzellen an und die eingewanderten glatten Muskelzellen und Fibroblasten fangen an verstärkt zu proliferieren (Stary et al. 1994; Stary et al. 1995). Bis hier ist noch eine Regression des Zustandes möglich, während ab Stadium IV keine Rückbildung zu erwarten ist (Stary 2000).

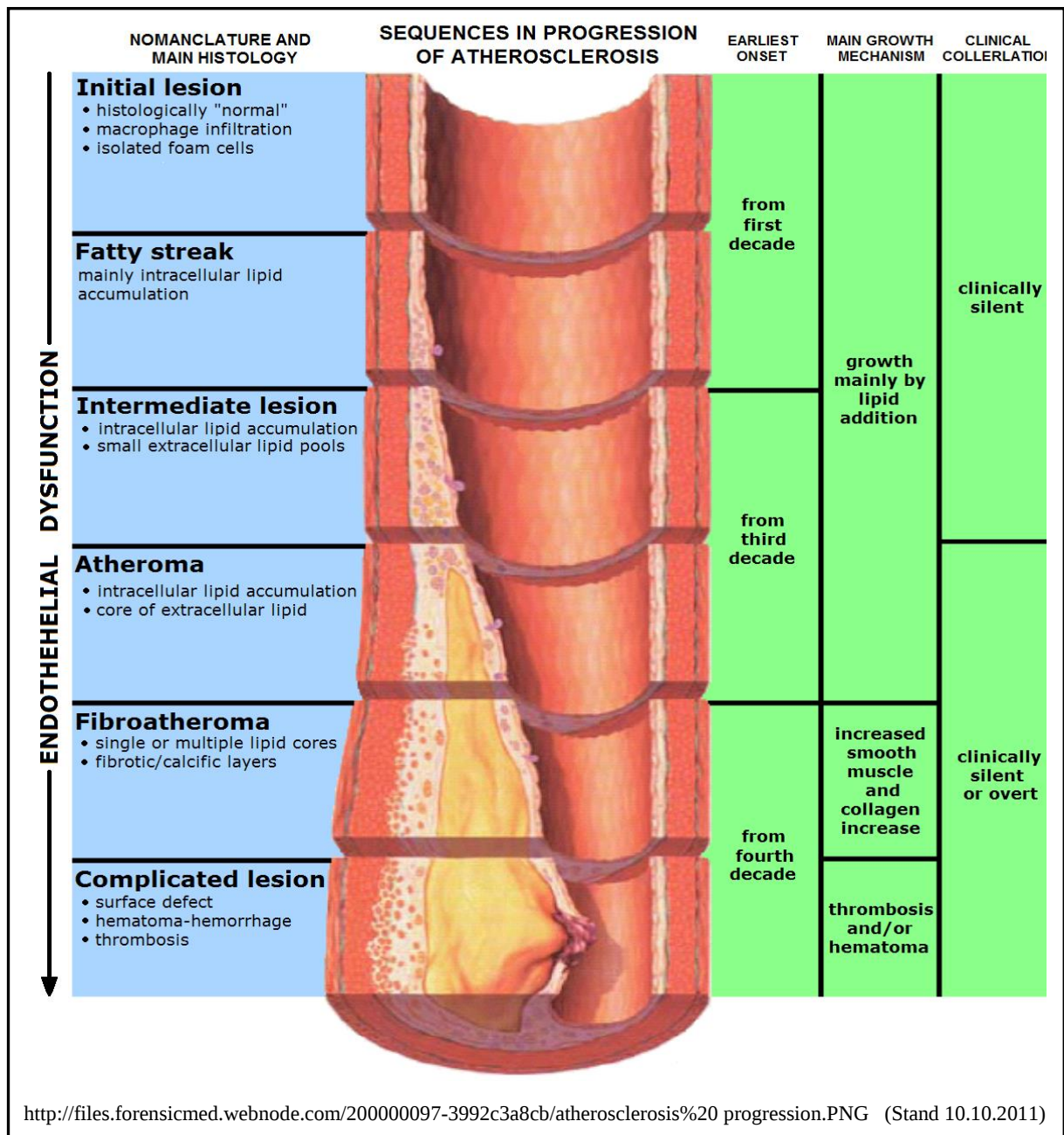


Abbildung 1.2.2 zeigt die Stadieneinteilung der Arteriosklerose nach Stary.

Stadium IV ist gekennzeichnet durch eine Nekrose der Makrophagen und ein Konfluation der Fette mit der Ausbildung eines flüssigen Lipidkerns (Stary et al. 1994; Stary et al. 1995). In diesem Lipidkern sind neben klassischen Fettsäuren auch Cholesterinkristalle vorhanden und es bildet sich ein mechanisch instabiles Atherom aus. Stadium V nach Stary ist das sog. Fibroatherom, bei dem eine dicke, kappenartige Bindegewebsschicht aus Kollegen in der Intima zu erkennen ist (cap-region) sowie eine vermehrter Kalzifizierung und eine starke Einwanderung von glatten Muskelzellen auftreten kann.

Dieses Stadium tritt überwiegend ab der vierten Lebensdekade auf und kann bereits durch eine Gefäßverengung klinisch in Erscheinung treten. In die arteriosklerotischen Plaques können mit der Zeit Gefäße einsprossen und somit können Einblutungen im Plaque entstehen (Sary et al. 1994; Sary et al. 1995). Es kommt der Übergang zu Stadium VI nach Sary, welches geprägt ist durch Fissuren, Plaqueblutungen, Plaquerupturen, non-okklusiven Thromben sowie Okklusivthromben (Sary 2000). Die Makrophagen und die Mediamyozyten können Matrixmetalloproteasen ausbilden, die die fibröse Plaquedecke aufweichen können. Dies führt zu einer Instabilität der Plaqueoberfläche mit der Gefahr von Rissen bei vermehrter mechanischer Beanspruchung und dem Entleeren von thrombogenem Material des Plaques in das Gefäßlumen. Stadium VII und Stadium VIII sind in Abbildung 1.2.2 nicht verzeichnet. Beide Stadien sind geprägt durch die Ausbildung eines Organisationsmusters, bei dem Myofibroblasten in der Gefäßwand eine starke Proliferation aufweisen. Die eingewanderten Zellen in der Intima gehen zu Grunde und es bildet sich in Stadium VII ein zellarmes Muster mit Verkalkungen aus und in Stadium VIII tritt eine Fibrosierung auf. In beiden Fällen sind die Plaques stabil, jedoch verursachen sie eine hochgradige Stenosierung des Gefäßes.

1.2.3. Die Arteriosklerose als Entzündungsprozess und die Rolle der Makrophagen

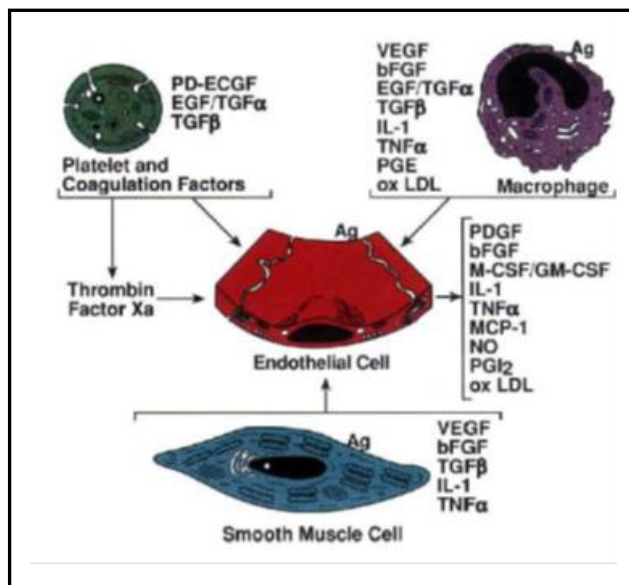


Abbildung 1.2.3.1: Zellen, Mediatoren und Zytokine welche die Ausbildung der Arteriosklerose beeinflussen; modifiziert nach

Zu der Entstehung der Arteriosklerose gibt es verschiedene Theorien. Die am weitesten erforschte und momentan favorisierte ist die „Response to injury“-Hypothese von Ross, die besagt, dass die Arteriosklerose durch eine Verletzung des Endothels und einer damit bedingten endothelialen Dysfunktion einhergeht (Ross et al. 1973, Ross 1986, Ross 1993). Die Verletzung kann dabei z.B. durch mechanische Scherkräfte, chemische Noxen, oxidiertes LDL, LPS, virale oder bakterielle Einflüsse hervorgerufen werden (Ross 1986). Eine derartige Schädigung bewirkt innerhalb des Endothels eine Entzündungsreaktion. Es wurde gezeigt, dass drei Prozesse an der

Entstehung der Arteriosklerose maßgebend beteiligt sind: (1) die Proliferation von glatten Muskelzellen, Makrophagen sowie weiteren Leukozyten, (2) die Ausbildung einer Bindegewebsstruktur bestehend aus Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Proteoglykanen, (3) die Anreicherung von Lipiden und von verestertem Cholesterin im Extrazellulärraum (Faggitto et al.

1984, Masuda et al. 1990). Bei diesen Prozessen spielt das Endothel mit diversen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen eine zentrale Rolle. Zu den Eigenschaften und Aufgaben des Endothels gehören die Darstellung einer nicht-thrombogenen Oberfläche, die Bildung einer Permeabilitätsschranke, die Regulation des vaskulären Tonus sowie Regulation, Synthetisieren, Sezernierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und Möglichkeit der Modifikation von Lipoproteinen (Oxidation), während diese in die Arterienwand transportiert werden (Gimbrone M.A. jr. 1976). Bei einer Schädigung des Endothels wird jedoch eine Entzündungskaskade in Gang gesetzt, die eine Einwanderung von Monozyten und anderen Leukozyten sowie auch die Proliferation von glatten Muskelzellen, Fibroblasten und die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen bewirkt (Ross 1986). In der Anfangsphase der Schädigung bilden die Endothelzellen auf ihrer Oberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle aus wie z.B. E-Selektine (endotheliale Selektine) und VCAM-1 (Bevilacqua M. P. 1993, Bevilacqua et al. 1994, Carlos et al. 1994, Springer T.A. 1990, Gimbrone et al 1990). Durch die E-Selektine werden Liganden auf den Leukozyten wie ESL-1 und das L-Selektin erkannt und eine Zell-Zell-Interaktion vermittelt (Bevilacqua M. P. 1993, Bevilacqua et al. 1994). Es folgt eine Anlagerung von Leukozyten aus dem Blut, insbesondere von Monozyten. Dies liegt an der Expression des β 1-Intergrin VLA-4, welcher nur von Monozyten und Lymphozyten erkannt wird, jedoch nicht von Granulozyten (Bevilacqua et al. 1994, Luscinskas et al. 1996). Nach der initialen Rolling-Phase kommt es auf dem Endothel zur Ausbildung von β 1- und β 2-Integrin, welches eine stärkere Bindung zwischen Leukozyt und Endothel bewirkt. Die Ausbildung von VCAM-1 und ICAM-1/2 fördert den stabilen Zusammenhalt zwischen Leukozyten und Endothel (Carlos et al. 1994, Luscinskas et al. 1996). Die Monozyten flachen auf dem Endothel ab und strecken Pseudopodien in die Interzellularverbindungen der Endothelzellen aus (Carlos et al. 1994). Weiterhin produzieren die Endothelzellen verschiedene proinflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin 1 (IL-1), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Monocyten chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), welche eine vermehrte Aktivierung der Leukozyten aus dem Blut bewirken (Raines et al. 1989, Old 1985, Libby et al 1989). Die Monozyten sezernieren Matrixmetalloproteasen, die die Bindegewebsstruktur des Endothels auflösen und somit ein Passieren ermöglichen (Crowther MA. 2005). Die aktivierten Monozyten sezernieren neben den oben genannten inflammatorischen Zytokinen auch den Monocytes-stimulating-Factor (M-CSF), der eine Monozytenproliferation, eine lokale Aktivierung von benachbarten Monozyten, sowie eine erhöhte Oxidierung von LDL zu oxLDL verursacht (Rosenfeld et al. 1990). Das oxLDL wirkt entzündungsfördernd, gewebsdestruktiv sowie chemotaktisch für andere Leukozyten. Die Monozyten differenzieren sich in der Passage der Endothelwand zu Makrophagen und sind nun in der Lage, Lipide aufzunehmen (Ylä-Herttuala et al. 1989). Zytokine und Mediatoren wie platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor 1 (IGF-1), transforming growth factor β (TGF β) verstärken die Proliferation von glatten Muskelzellen sowie von Fibroblasten (Klagsbrun et al. 1989, Folkman et al. 1988, Raines et al. 1992, Yayon et al. 1991).

Im Bereich des Endothelschadens lagern sich vermehrt diese Zellen an und beginnen lokal mit der Produktion von extrazellulärer Matrix wie z.B. von Proteoglykanen und Kollagenfasern.

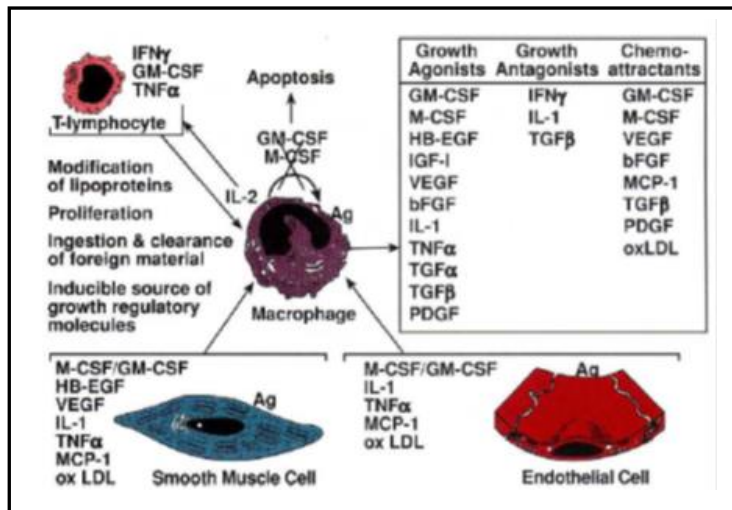


Abbildung 1.2.3.2: Einwirkung der verschiedenen Gewebe und Zellen auf die Makrophagen, Aufgaben der von den Makrophagen produzierten Mediatoren; modifiziert nach Russel Ross (1993), Nature 362, 801 - 809

Im Endothel werden gerinnungsfördernde Stoffe wie z.B. der von Willebrand-Faktor gespeichert, die bei einer Verletzung des Endothels freigesetzt werden und lokal eine Gerinnungsreaktion ausbilden. Dabei können von im Blut zirkulierenden Thrombozyten weitere gerinnungsfördernde Stoffe freigesetzt werden wie z.B. Thrombin und Faktor Xa, womit eine Gerinnungskaskade gestartet wird. Abbildung 1.2.3.1 zeigt einige von den verschiedenen Mediatoren und Zytokinen, welche auf das

Gefäßendothel wirken können und eine proinflammatorische Reaktion mit Gewebsproliferation und Leukozyteneinwanderung hervorrufen. Die differenzierten Makrophagen in der Gefäßwand, die die Intima durchdringen und sich in der Media festsetzen, bilden bestimmte Rezeptoren aus, sog. Scavenger Rezeptoren. Mit Hilfe dieser Rezeptoren sind sie in der Lage oxLDL aufzunehmen und dies zu speichern (Goldstein et al. 1979, Parthasarathy et al. 1989). Das oxLDL wirkt dabei proinflammatorisch und bewirkt die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6, TNFα (Quinn et al. 1987, Stopeck et al 1993, Leonard et al. 1990, Rajavashisth et al. 1990). Weiterhin initiiert oxLDL in den Makrophagen die Bildung von Superoxiden sowie von Radikalen, die weiteres LDL oxidieren können (Yun So Bae et al. 2009). Somit entsteht eine Kettenreaktion, die zu einer Progression der arteriosklerotischen Plaques führt. Abbildung 1.2.3.2 zeigt die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Makrophagen. Es ist deutlich erkennbar, dass viele der einflussnehmenden Mediatoren von den Makrophagen selbst gebildet werden können. Einige Mediatoren wie z.B. IL-1 und TGFβ können sowohl wachstumshemmend als auch wachstumsfördernd wirken. Glatten Muskelzellen in der Gefäßwand werden besonders durch PDGF, VEGF, TNFα, TGFβ zum Wachstum und zur Synthese von Proteoglykanen angeregt, ebenso wie kollagenproduzierende Fibroblasten (Ross et al. 1990, Libby et al. 1989, Shimokado et al. 1985, Libby et al. 1986). Dies bewirkt ein zunehmendes Wachstum des Plaques. Nach einer gewissen Wachstumsphase können die arteriosklerotischen Plaques die Vasa vasorum der Gefäße erreichen und dies führt zu einem hämorrhagischen Einbruch in die Plaqueregion (Berger et al. 1990, Falk et al. 1995, Stary et al. 2000).

Mit der Zeit werden vermehrt Lipide aus dem Blut aufgenommen und verestert. Insbesondere Cholesterin kann sich als Cholesterinkristalle ablagern und die Wand des Gefäßes verhärten. Die Nährstoffversorgung der Plaques verschlechtert sich mit zunehmender Größe und dies führt zu einer zentralen Nekrose mit zentraler Verflüssigung des Plaques (Bostrom et al 1995, Sary et al. 1995, Sary et al. 2000). Die untergegangenen Zellbestandteile können entweder von benachbarten Makrophagen phagozytiert werden oder konfluieren im Plaque.

1.3. Nitroalkene

1.3.1. Aufbau und Vorkommen der Nitroalkene

Nitroalkene sind ungesättigte Kohlenwasserstoffketten mit ein oder mehreren NO_2 -Gruppen. Dabei können sowohl die Länge des Moleküls als auch die Zahl der ungesättigten Bindungen variieren. Im Körper kommen Nitroalkene als ungesättigte Fettsäure mit verschiedenen Stickstoffresten in vielen Kompartimenten vor. Die am häufigsten vorkommenden und am besten untersuchten nitrierten Fettsäuren sind die nitrierte Linolsäure (18 C-Atome, 2 Doppelbindungen) und die nitrierte Ölsäure (18 C-Atome und 1 Doppelbindung). Abbildung 1.3.1.1 zeigt zwei Regioisomere der Ölsäure, nämlich die 9- und 10- Nitro-Ölsäure sowie zwei weitere mögliche häufig vorkommende Moleküle, die 9- und 10-hydroxid-Ölsäure (Freeman et al. 2008). Beide Regioisomere der nitrierten

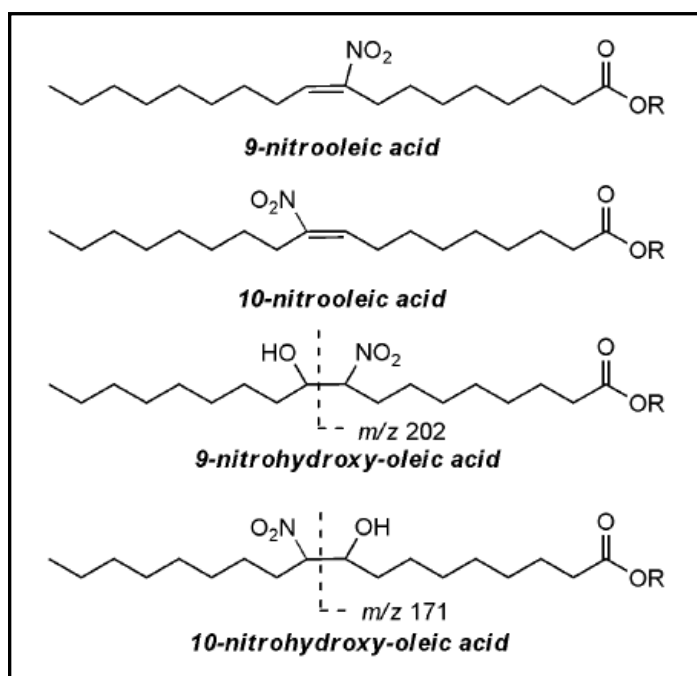


Abbildung 1.3.1.1 Strukturformel von 9- und 10- nitro- cis-Ölsäure und von 9- und 10-nitrohydroxid-Ölsäure, modifiziert nach B.A.Freeman (2008), JBC vol. 283 pp. 15515-15519

Ölsäure können in vitro synthetisiert werden und kommen im Nanomolbereich in vivo vor (Baker et al. 2005, Tsikas et al. 2011). Hydroxyl-Reste können in Folge von Reaktion mit H_2O auftreten und bilden ein häufiges Reaktionsprodukt der nitrierten Ölsäure, insbesondere im wässrigen Milieu (Balazy et al. 2001, Lima et al. 2002). Die Konzentration der nitrierten Ölsäure ist in jedem Kompartiment höher als die der nitrierten Linolsäure. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Linolsäure eine deutlich geringere Halbwertszeit besitzt als die Ölsäure, 4 Minuten im Vergleich zu ca. 30 Minuten (Baker et al. 2005, Rudolph V. et al. 2008).

Die Menge an freiem OA-NO₂ im Blutplasma ist im Vergleich zu LNO₂ ca. 8-mal so hoch, während jedoch ca. doppelt so viel verestert ist. Somit kann der Linolsäure eine erhöhte Tendenz zur Anlagerung an Plasmaproteine zugerechnet werden (Baker et al. 2005). Die Verhältnisse bei der Anlagerung an Erythrozyten sind bei beiden Fettsäuren ähnlich und im Urin unterscheiden sie sich auch nur geringfügig. Weiterhin wurde mit Hilfe von radioaktiv markierten Kohlenstoff- oder Wasserstoffatomen die unterschiedliche Verteilung der nitrierten Ölsäure auf die verschiedenen Gewebe sowie deren Aktivität und der Abbau untersucht (Rudolph V. et al. 2008). Dabei wurden die Werte mit Hilfe einer Massenspektrometrie ermittelt. Jedes Molekül zeigt einem seinen Aufbau und seiner Konformation entsprechendes spezielles Absorptionsmuster, welches ermittelt und quantifiziert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass 90 Minuten nach der Injektion von radioaktiv markierter OA-NO₂ die höchste spezifische Aktivität bezogen auf das Gewicht des Organs mit ca. 30% in den Muskeln und mit etwa 18% in der Leber war. Im Plasma waren 53% der nitrierten Ölsäure an Albumin gebunden und lediglich 6% in freier Form vorhanden. Der Rest ist mit weiteren Plamaproteinen, besonders mit Thiolen, Verbindungen eingegangen (Rudolph V. et al. 2008).

1.3.2. Synthese von Nitroalkenen

Der Mechanismus der Synthese von nitrierten Fettsäuren in vivo ist noch ungeklärt, jedoch gibt es eine Reihe von Thesen, welche verschiedene mögliche Reaktionen darstellen. Abbildung 1.3.2 (Trostchansky et al. 2008) zeigt mögliche Synthesewege für nitrierte Fettsäuren. Hierbei hängen die Reaktion von dem Sauerstoffangebot ab. Bei geringem Sauerstoffangebot laufen eine elektrophile oder radikalische Substitution ab. Der Beginn einer radikalischen Reaktion hängt jedoch von dem Vorhandensein eines •NO₂ - Radikals ab (Freeman et al 2008). Ein möglicher Synthesemechanismus von •NO₂ – Radikalen ist eine Peroxynitrit-abhängige Reaktion (Beckman et al. 1990, Radi et al. 1991). Hierbei gibt Peroxynitrit (ONOO⁻) im sauren Milieu •NO₂ – Radikale ab. Ein weiterer Reaktionsweg ist eine Peroxidase-katalysierte Oxidation von NO₂⁻ zu •NO₂. (Brennan et al. 2002, Eiserich et al. 1998, Castro et al. 2004). Eine Protonation von NO₂⁻ zu HNO₂ kann ebenfalls als Ergebnis reaktive •NO₂ – Radikale haben. Dabei Wird das HNO₂ mit Hilfe von H⁺ zu NO⁺ umgewandelt, welches mit einem weiteren Molekül NO₂⁻ zu N₂O₃ reagiert, von welchem sich ein •NO₂-Radikal abspaltet (Freeman et al. 2008). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist eine Oxidation von •NO. •NO ist ein lipophiles Gas welches die Zellmembranen durchdringen und sich im Zentrum von Lipoproteinen und Membranen ansammeln kann (Möller et al. 2005). Ein weiteres Gas mit guter Diffusionsfähigkeit ist O₂, welches das •NO zu •NO₂ – Radikalen oxidieren kann. Die letzte beschriebene Reaktion ist eine ionische Addition von NO₂⁺. Obwohl NO₂⁺ und N₂O₄ im wässrigen Milieu als sehr instabil gelten, kann bei Reaktion von Metallen mit ONOO⁻ das abgespaltene NO₂⁺ eine ionische, elektrophile Reaktion mit einer ungesättigten Fettsäure eingehen (Quijano et al. 2001).

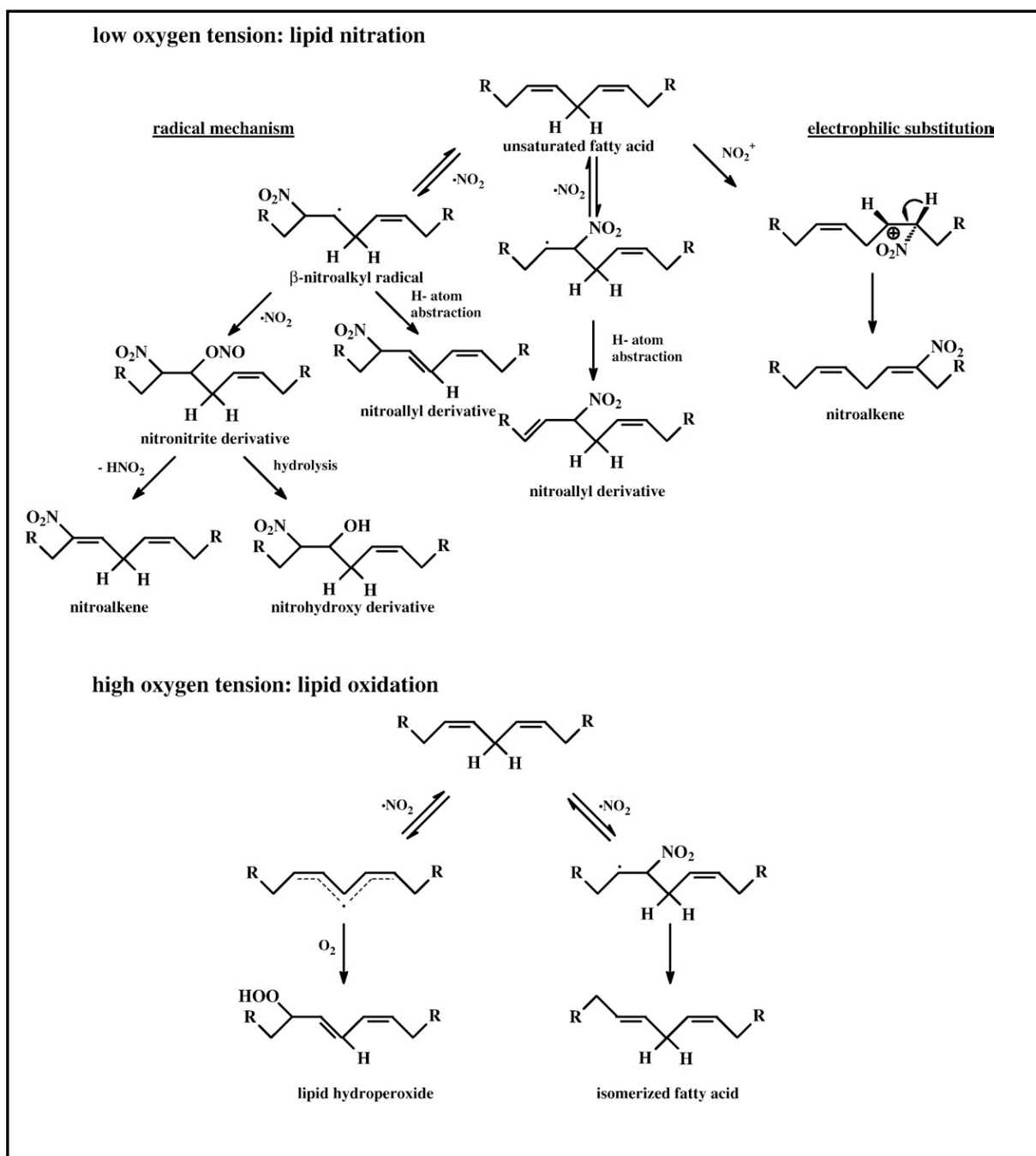


Abbildung 1.3.2. zeigt die verschiedenen Synthesewege für nitrierte Fettsäuren, hierbei laufen mögliche Prozesse unter geringem und hohem Sauerstoffangebot ab. Unter geringem Sauerstoffangebot kann eine radikalische oder eine elektrophile Substitution ablaufen. Bei hohem Sauerstoffangebot werden die Fettsäuren oxidiert, modifiziert nach A. Trostchansky (2008), Free Radical Biology & Medicine 44 pp. 0891-5849

Abbildung 1.3.2 (Trosthansky et al. 2008) zeigt bei geringem Sauerstoffangebot mehrere verschiedene Reaktionen. Zum einen liegt ein radikalischer Prozess vor, bei dem das aus den oben beschriebenen Reaktionen entstandene $\bullet\text{NO}_2$ sich an eine Doppelbindung einer Fettsäure anlagern kann (Gallon et al. 1994, Napolitano et al. 2000). Daraus entsteht ein β -nitroalkyl-Radikal, welches mit einem weiteren $\bullet\text{NO}_2$ zu einem Nitronitrit Derivat reagiert. Dieses kann nun entweder eine HNO_2 Gruppe abspalten und es bleibt ein Nitroalken übrig oder es geht eine Hydrolyse vonstatten, die als Edukt ein Nitrohydroxy-Derivat hat (O'Donnell et al. 2001). Wie bereits oben beschrieben, kann NO_2^- insbesondere im sauren Milieu zu $\bullet\text{NO}_2$ -Radikalen umgewandelt werden. Als geeignete Lokalisation für derartige Reaktion können auf Grund ihres sehr geringen pH-Wertes Phagozyten oder der Magenbereich in Betracht gezogen werden (Freeman et al. 2008). Ein weiterer möglicher Reaktionsprozess kann eine elektrophile Substitution mit einem NO_2^+ sein (O'Donnell et al. 1999, O'Donnell et al. 2001). Die ungesättigte Doppelbindung führt innerhalb des Moleküls zu einer negativen Partialladung, welche als Ziel für einen elektrophilen Angriff dienen kann. Unter Abspaltung eines Wasserstoffprotons kommt es zur Ausbildung eines Nitroalkens. Als Nebenprodukte bei Reaktion mit geringem Sauerstoffangebot können Nitroallyl-Derivate entstehen. Dies ist der Fall, wenn an Stelle einer Anlagerung eines weiteren $\bullet\text{NO}_2$ -Radikals sich ein Wasserstoffatom abspaltet. Bei hohem Sauerstoffangebot reagiert der molekulare Sauerstoff mit der Doppelbindung der Fettsäure und oxidiert sie. Dabei können entweder weitere Isomere der Fettsäure entstehen oder jedoch Lipide mit einer Hydroperoxid-Gruppe (Radi et al. 1991, Rubbo et al. 1994).

1.3.3. Metabolisierung der Nitroalkene

Nitrierte Fettsäuren durchlaufen verschiedene Prozesse im Organismus. Mit Hilfe von radioaktiv markierter nitrierter Ölsäure können einige Metabolisierungsmechanismen nachverfolgt werden (Rudolph V. et al. 2009). Innerhalb von 5 Minuten nach Injektion von OA- NO_2 tritt ein Sättigungsprozess von bis zu 60% der nitrierten Ölsäure auf, wobei sich nach 60 Minuten die Menge von gesättigten und ungesättigten angleicht (Rudolph V. et al. 2009). Die Auflösung einer energiereichen Doppelbindung bewirkt einen Verlust an elektrophilem Potential für das Molekül. Die Nitroalkene können eine reversible Michaelisreaktion mit verschiedenen Nukleophilen eingehen (Batthyany et al. 2006, Baker et al. 2007, Freeman et al. 2008). Zu den Reaktionspartnern zählen unter anderem Moleküle, die Cysteine und Thiole enthalten wie z.B. Gluthation. Die Auflösung der Doppelbindung ist eine Schutzreaktion des Organismus um reaktive Moleküle auszuschalten und läuft vermutlich enzymatisch ab (Rudolph V. et al. 2009). Außerdem sinkt die Konzentration der radioaktiv-markierten Ölsäure nach Injektion innerhalb von 15 Minuten im Blutplasma stark ab. Dies ist auf Umverteilungsprozesse der Fettsäure in verschiedene lipophile Kompartimente wie Zellmembranen zurückzuführen (Rudolph V. et al. 2009). Abbildung 1.3.3 (Rudolph V. et al. 2009) zeigt mögliche Formen der Metabolisierung der nitrierten Ölsäure.

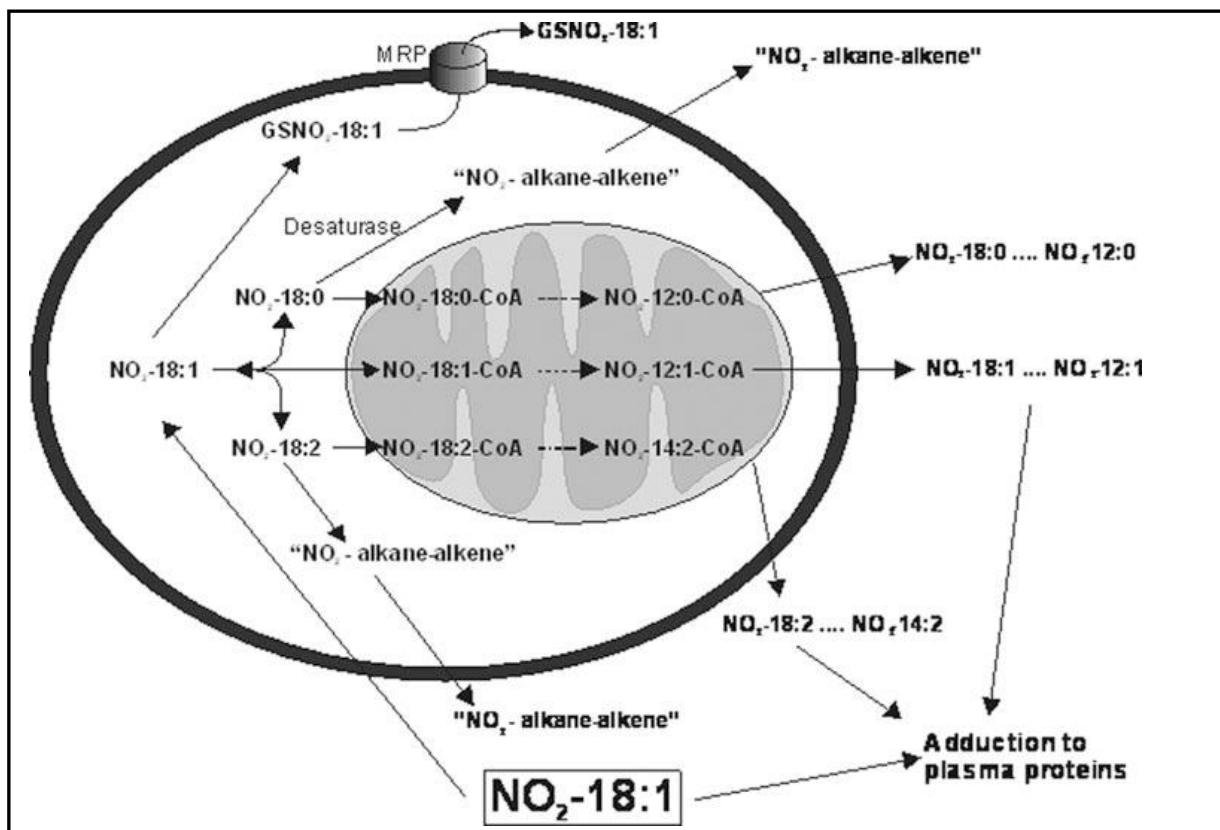


Abbildung 1.3.3 zeigt die verschiedenen Metabolisierungsprozess der nitrierten Ölsäure, modifiziert nach V.Rudolph (2009), JBC vol. 284, NO. 3, pp. 1461–1473

Hierbei wird unterschieden in intra- und extrazelluläre Prozesse. Intrazellulär können im OA-NO₂ durch Abspaltung von Wasserstoffionen weitere Doppelbindungen entstehen (NO₂-18:2) oder es kann durch Anlagerung von Wasserstoffionen zu einer vollkommenen Sättigung kommen (NO₂-18:0). Diese unterschiedlichen Moleküle können entweder aus den Zellen hinaus- oder jedoch in die Mitochondrien hineintransportiert werden. In den Mitochondrien werden die Fettsäuren durch β -Oxidation abgebaut, wobei 12-C-Atome lange Ketten entstehen. Die Ursache für einen unvollständigen Abbau liegt in der NO₂-Gruppe. Die Enzyme der β -Oxidation können diese Gruppe nicht abbauen oder umlagern und deshalb kommt die Reaktion an dem C-Atom, das die NO₂-Gruppe trägt, zum Erliegen (Rudolph V. et al. 2009). Nach Reaktionsabbruch werden die C-12-Ketten zusammen mit einem Coenzym A in den Extrazellulärraum transportiert, wo eine erhöhte Menge an C-12-Ketten nachgewiesen werden kann. Die Ketten können dabei eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen haben (keine, eine, zwei) (Rudolph V. et al. 2009). Ein weiterer Transportweg aus den Zellen ist die Reaktion mit Glutathion (GSH) (Baker et al. 2007, Freeman et al. 2008). Die NO₂-Gruppe reagiert hierbei mit der Schwefelgruppe des Glutathions und es entsteht ein Thiol. Mit Hilfe des „multiple drug resistance protein-1“ (MRP-1) kann diese Verbindung aus der Zelle transportiert werden.

Die aus den Zellen transportierten freien Fettsäuren können sich an Plasmaproteine reversibel anlagern, wobei die Menge an freien und gebundenen Fettsäuren in einem konstanten Verhältnis bleibt (Rudolph V. et al. 2009). Weiterhin können die Fettsäuren von Zellmembranen aufgenommen werden, was zu einer „Verflüssigung“ der Zellmembran führt und eine Verringerung ihrer Stabilität und Barrierefunktion mit sich bringt. 90 Minuten nach Injektion ist die Aktivität an radioaktivmarkierten Fettsäuren im Zellplasma auf 0,5% gesunken. Die Abbauvorgänge der nitrierten Fettsäuren laufen zum größten Teil in der Leber und in den Muskeln ab (Rudolph V. et al. 2009).

1.3.4. Wirkung der Nitroalkene auf den Organismus

Nitroalkene können im Organismus diverse Reaktionen und Prozesse beeinflussen. Insgesamt kann man den Nitroalkenen eine entzündungshemmende Wirkung zuschreiben, indem sie auf unterschiedlichste Weise in die Signalkaskade eingreifen. Dabei können nitrierte Fettsäuren eine direkte Interaktion mit Stoffen der inflammatorischen Signalkaskaden eingehen (Michael Addition) (Batthyany et al. 2006, Baker et al. 2007, Freeman et al. 2008). Hierbei reagieren die Nitroalkene durch ihren starken elektrophilen Charakter zusammen mit Nukleophilen zu reversiblen Verbindung (Baker LM et al. 2007). Die Stickstoffdioxid-Gruppe ist eine stark Elektronen ziehende Gruppe und bewirkt in Verbindung mit einer ungesättigten Fettsäure ein hohes elektrophiles Potential des Gesamt-moleküls (Asylin et al 2007). Für die Michael Addition ist ein spezifischer Molekülaufbau von Nöten, der bei Nitroalkenen gegeben ist (Arthur Michael 1887, Arthur Michael 1894). Hierbei dient das Nitroalken, welches ein ungesättigtes Carbonsäureamid ist, als Michael-Akzeptor. Zu geeigneten Michael-Donatoren zählen Amine, Thiole oder andere Carbonylverbindungen. Eine besondere Stellung nehmen hierbei Cystein- und Histidin-Aminosäuren ein, welche ebenfalls mit der nitrierten Ölsäure reversible Bindungen eingehen können (Baker LM et al. 2007). Es gibt eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren und Signalstoffen, die diese Aminosäuren enthalten und somit ein potentieller Reaktionspartner in einer Michael-Addition sein können und somit Zielstrukturen von OA-NO₂ sein können. Darunter zählen unter anderem die Untereinheiten p65 und p50 des NF-κB oder aber auch PPARγ (Schopfer et al. 2010; Cernunda et al. 2001; Baker LM et al 2007; Straus et al 2000). PPARγ ist unter anderem zuständig für eine gesteigerte Synthese von Glutathion und Hämoxigenase. Zudem zeigt sich ein hohes Reaktionspotential der Nitroalkene mit Glutathion (Baker LM et al. 2007). Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit dem Glutathion ist, dass die hohe Reaktionsbereitschaft unabhängig von einem Katalysator und zudem reversibel ist. Die Anlagerung von OA-NO₂ an die Cysteinreste von solchen Signalstoffen kann deren Eigenschaften alternieren und somit die Signalkaskade stören bzw. induzieren.

Abbildung 1.3.4.1 zeigt den Reaktionsmechanismus einer Michael-Addition. Im ersten Schritt lagert sich das Nukleophil an die Doppelbindung des OA-NO₂ an. Aufgrund der positiven Teilladung am Stickstoffatom werden die Elektronen zu diesem gezogen. Es liegt hier ein Überschuss an negativer Teilladung vor und somit läuft im zweiten Schritt eine Protonierung mit der Anlagerung eines Wasserstoffions ab. Weiterhin wurde untersucht, ob nitrierte Ölsäure Einflüsse auf den metabolischen Haushalt von ApoE-Mäusen besitzt (Rudolph TK et al. 2010). Sowohl Blutzuckerspiegel als auch die Konzentrationen der Lipoproteine zeigen jedoch keine signifikanten Änderungen zum Normalzustand unter Kontrollbedingungen (Rudolph TK et al. 2010).

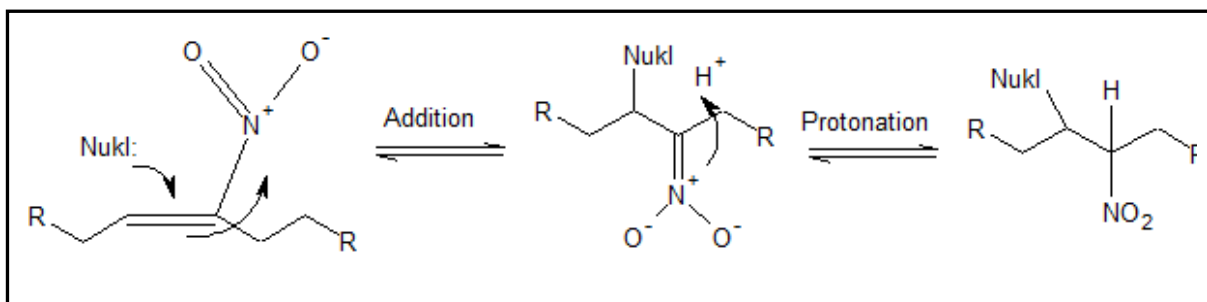


Abbildung 1.3.4.1: Ablauf einer Michael Addition

1.3.4.1. Nitroalkene verringern TNF α -Wirkung

TNF α ist Bestandteil einer Inflammationskaskade und kann im Rahmen von Entzündungsprozessen von Endothelzellen und Leukozyten (besonders von Monozyten/Makrophagen) gebildet werden (Glass et al. 2001). Es bewirkt eine vermehrte Ausschüttung an weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, INF γ . Weiterhin initiiert es die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und steigert die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber. TNF α ist verantwortlich für die Ausbildung der klassischen paracelsischen Entzündungsreaktion mit Rubor, Dolor, Calor, Tumor. Es spielt weiterhin auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 und somit ist es mitbeteiligt an der Migration von Leukozyten (Gosh et al. 1998). TNF α wirkt über einen intranukleären Mechanismus (Chen et al. 2002, Wajant et al. 2003). Das Zytokin wandert in den Zellkern, wo eine Homodimerisierung stattfindet und lagert sich an bestimmten Rezeptoren an, die eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktor NF κ B bewirken. Dieser ist verantwortlich für Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion sowie Regulation der Apoptose (Gosh et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass Nitroalkene, besonders das OA-NO₂, die TNF α abhängige Expression von NF κ B verringern (Hwang et al. 2009, T Cui et al. 2006). Weiterhin verringert OA-NO₂ die Ausbildung von den Adhäsionsmolekülen E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 (Hwang et al. 2009). Die Adhäsion von Monozyten/Makrophagen an TNF α stimulierten Endothelzellen nimmt nach Behandlung mit OA-NO₂ um 20-30% ab (Hwang et al. 2009).

Derartige Adhäsionsvorgänge spielen bei der Entwicklung der Arteriosklerose wie oben beschrieben eine zentrale Rolle. Die Ausbildung von weiteren TNF α induzierten Zytokinen (IL-6, IL-8, IL-12, INF γ , MCP-1, IP-10) kann durch die Behandlung mit OA-NO₂ um 40-60% gesenkt werden (Hwang et al. 2009).

1.3.4.2. Nitroalkene steigern die PPAR-Aktivität

Peroxisom-Proliferator-aktivierende Rezeptoren (PPAR) sind intrazelluläre Rezeptoren, welche nach Bindung eines Liganden mit einem Retinsäure-Rezeptor heterodimerisieren und in den Zellkern wandern. Dort binden sie an DNA-Abschnitte und initiieren die Transkription von spezifischen Genen. Es gibt drei Subtypen der Rezeptoren, PPAR α , PPAR γ , PPAR β/δ . PPAR α kommt vor allem in Leber, Herz und Skelettmuskel vor und ist dort verantwortlich für die Expression von Enzymen für die β -Oxidation. PPAR β/δ wird ubiquitär gebildet und ist verantwortlich für den Glukosestoffwechsel. PPAR γ wird hauptsächlich im Fettgewebe expremiert und reguliert den Glukoseuptake sowie die Adipozyten-Differenzierung aus Fibroblasten (Lee et al. 2002, Marx et al. 2004). In der Leber verringert PPAR γ die Glukoneogenese und aktiviert die Glykolyse. Weiterhin inhibiert PPAR γ die Expression von TNF α und verringert somit die inflammatorische Reaktion (Lee et al. 2002, Marx et al. 2004). PPAR γ wird auch in Makrophagen, Monozyten und glatten Muskelzellen gebildet und dient dort der Regulation des Lipidstoffwechsels, der Entzündungsreaktion und der Zellproliferation (Wang et al. 2002). Es wurde nachgewiesen, dass OA-NO₂ und LNO₂ starke Liganden der PPAR-Rezeptoren sind, insbesondere des PPAR γ (Baker et al. 2004, Schopfer et al. 2005, Baker et al. 2005). Dabei zeigt die nitrierte Ölsäure eine deutlich stärkere Aktivierung als die nitrierte Linolsäure (Baker et al. 2005). Dies ist darauf zurückzuführen, dass OA-NO₂ im wässrigen Milieu stabiler ist und vermutlich eine höhere Affinität zum Rezeptor besitzt (Baker et al. 2005).

1.3.4.3. LNO₂ steigert die Expression der Heme Oxygenase 1 (HO-1)

Die Hämoxygenase 1 (HO-1) ist ein Enzym, welches die funktionelle Gruppe des Hämoglobins, das Häm, zu Biliverdin, Eisen und Kohlenmonoxid abbaut (Abbildung 1.3.4.3) (Maines 1997). Die HO-1 ist ein induzierbares Enzym und kann durch viele verschiedene Stimuli aktiviert werden, hierzu zählen oxidativer Stress, VEGF, PDGF, TGF- β und verschiedene proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF α (Sassa 2004). Die Hämoxygenase 1 und das Stoffwechselprodukt Kohlenmonoxid wirken antiinflammatorisch, vasodilatatorisch, fördern die Neoangiogenese, verringern oxidativen Stress und hemmen die Apoptose (Brusko et al. 2005, Durante 2002, Nakao et al. 2005). Nitrierte Linolsäure steigert die Ausbildung von HO-1 auf mRNA-Ebene abhängig der Konzentration um das 70-fache und auf Protein-Ebene um das 15-fache (Wright et al. 2006).

LNO₂ gibt in wässrigem Milieu leicht Stickstoffmonooxid ab, welches auch die Expression von HO-1 steigert (Wright et al. 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die LNO₂-abhängige Aktivierung der HO-1 nur teilweise auf der Eigenschaft der nitrierten Linolsäure, NO abzugeben (Schopfer et al. 2005), beruht. Weiterhin steigert LNO₂ auch die Expression von HO-1 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Wright et al. 2006). Dies ist von großer Bedeutung für entzündliche Prozesse, die sich an Gefäßwänden abspielen, wie z.B. die Arteriosklerose. In der Tat wirkt sich eine hohe Aktivität von HO-1 positiv auf arteriosklerotische Prozesse aus (Duckers et al. 2001, Ishikawa et al. 2001)

1.3.4.4. LNO₂ verringert die Anlagerung von Blutplättchen

Die Blutgerinnungskaskade ist ein kompliziertes Zusammenspiel einer Reihe von Proteinen, Mediatoren und Oberflächenmarkern. Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems ist das Enzym Thrombin (Royle et al. 1987, Degen et al. 1987). Es besitzt eine Proteaseaktivität und spaltet das Fibrinogen in Fibrin, welches für die Vernetzung von Thrombozyten verantwortlich ist. Weiterhin aktiviert es weitere wichtige Faktoren der Gerinnungskaskade. LNO₂ verringert die Wirkung des Thrombins und hemmt die Aggregation von Thrombozyten, wobei es einen intrazellulären Anstieg von Calcium in Blutplättchen bewirkt und somit die Ausbildung von Gerinnungsproteinen (Coles et al. 2002). LNO₂ senkt den intrazellulären, Thombin-abhängigen Anstieg des Calciums um bis zu 85% des Ursprungswertes (Coles et al. 2002). Thrombin steigert weiterhin die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auf den Thrombozyten (Coles et al. 2002), welches von zentraler Bedeutung für die Aggregation und die Ausbildung eines Thrombus ist. LNO₂ hemmt auch hier den Effekt des Thrombins und verringert die P-Selektin Expression und somit die Plättchenaktivität. Hierbei wurde nachgewiesen, dass der LNO₂-Effekt unabhängig von der cGMP-Konzentration und somit auch nicht bedingt durch die NO-Freisetzung ist (Coles et al. 2002).

1.3.4.5. Nitroalkene verringern die Phosphorylierung von STAT-1 sowie die LPS-Wirkung auf den Entzündungsprozess in RAW-Makrophagen

Das Lipopolysaccharide (LPS) ist ein thermostabiler Bestandteil von Bakterienmembranen, welches beim Zerfall der Bakterien als Endotoxin abgegeben werden kann und in einem fremden Organismus als Mediator einer Entzündungsreaktion fungiert. Es besteht aus einem Lipidanteil, welcher reaktionsauslösend wirkt, aus einer Kernregion aus Zuckern sowie einem an die Kernregion angelagerten Polysaccharid. LPS induziert im Organismus eine Entzündungsreaktion indem es von Leukozyten mit Hilfe von Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt wird und indem es verschiedene inflammatorische Zytokine freisetzt, unter anderem IL-6, TNF α , MCP-1 (Kamezaki et al. 2004, McLoughlin et al. 2005). Der Großteil dieser Zytokine aktiviert eine spezifische Signalkaskade mit der es die Informationen an den Zellkern und an die DNA weiterleitet und somit die Synthese von Entzündungsproteinen auslöst. Abbildung 1.3.4.2 zeigt den Signalweg, den der Großteil der Zytokine aktiviert (mit Ausnahme von IL-1 und IL-8).

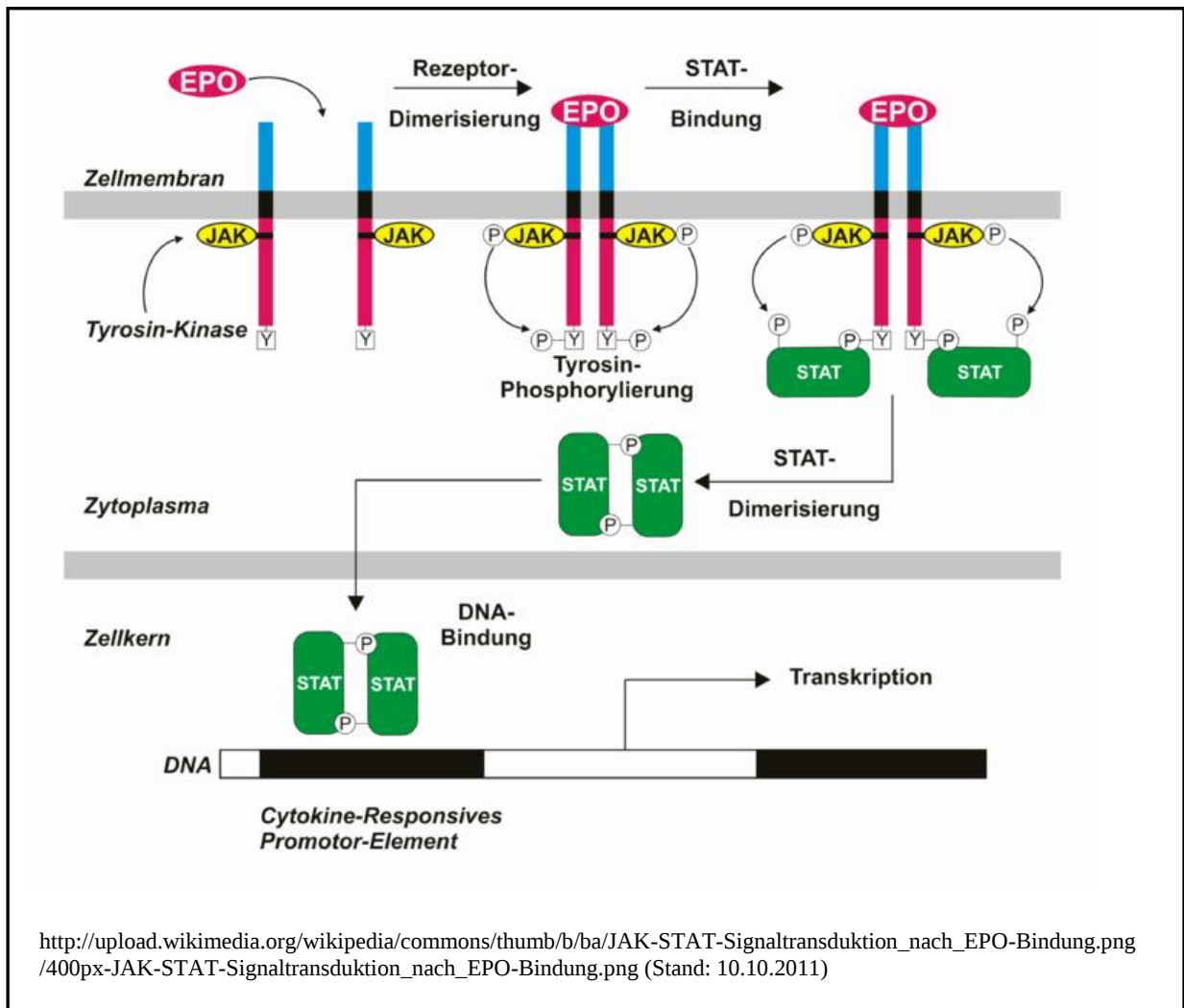


Abbildung 1.3.4.2 Signalweg einer Rezeptorassoziierten Tyrosinkinase (JAK-Kinase).

Hierbei gibt es verschiedene Rezeptoren, deren zytoplasmatischer Anteil mit einer Tyrosinkinase (Janus-Kinase; JAK) assoziiert ist. Die Rezeptoren dimerisieren und es findet eine Autophosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils sowie der Januskinasen statt. Diese Phosphatgruppen können von einer SH2-Domäne (Src-homology 2) eines Proteins erkannt und gebunden werden. Zu den Proteinen mit einer SH2-Domäne gehören die sogenannten STAT-Proteine (Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription). Diese Proteine binden sich an das phosphorylierte Tyrosin und werden selbst durch die Januskinase phosphoryliert. Die Verbindung löst sich und zwei phosphorylierte STAT-Proteine können nun dimerisieren. Sie durchdringen die Kernmembran und lagern sich an Enhancerabschnitten für Entzündungsproteine an. STAT-Proteine können von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{INF}\gamma$, LPS und oxLDL aktiviert werden und fördern die Aktivierung von Makrophagen und deren Umwandlung zu Schaumzellen (Sikorski et al. 2010, Sikorski et al. 2011). Die Nitroalkene OA-NO_2 und LNO_2 verringern die LPS induzierte Phosphorylierung von STAT in RAW-Makrophagen (Ichikawa et al. 2008). Weiterhin entwickeln Nitroalkene einen starken suppressiven Effekt auf die LPS-abhängige Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen IL-6, $\text{TNF}\alpha$, MCP-1 (Cui T et al. 2006, Ichikawa et al. 2008). In Anwesenheit von OA-NO_2 und LNO_2 ist die Menge an Zytokinen signifikant geringer als bei Kontrollbindungen nur mit LPS (Cui T et al. 2006). Fettsäuren ohne eine NO_2 -Gruppe dagegen haben keinen Einfluss auf die Zytokinmenge (Cui T et al. 2006). Ähnlich wie beim $\text{TNF}\alpha$ verringern die Nitroalkene die LPS-induzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ und somit die proinflammatorische Signalkaskade unterbrochen (Cui T et al. 2006).

1.4. Superoxide

1.4.1. Aufbau, Vorkommen und Synthese der Superoxide

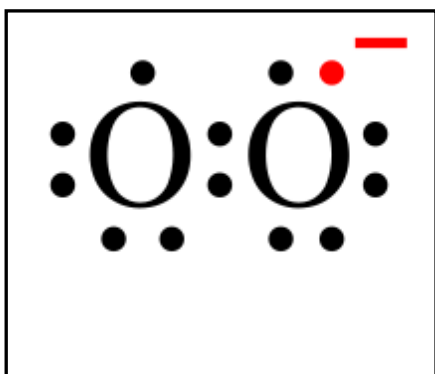


Abbildung 1.4.1.1 zeigt die Strukturformel eines Superoxids

Superoxide sind intrazellulär gebildete Moleküle und gehören zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Abbildung 1.4.1.1 zeigt die Strukturformel eines Superoxids. Der Elektronenüberschuss bewirkt, dass das Molekül insgesamt negativ geladen ist. Durch die negative Ladung besitzt das Superoxid eine hohe Reaktionsbereitschaft und eine hohe Affinität zu positiven Teilladungen anderer Moleküle (Duale Reihe Biochemie). ROS können in den Mitochondrien jeder Körperzelle entstehen, werden jedoch sofort von dem körpereigenen Enzym Superoxiddismutase (SOD) und der Katalase im Sinne des Selbstschutzes abgebaut (Duale Reihe Biochemie).

Die Superoxide entstehen als Nebenprodukt der Atmungskette und können die Mitochondrien durch Diffusion passieren und intrazellulär andere Enzyme, die Zellmembran oder sogar die DNA schädigen. Abbildung 1.4.1.2 zeigt die Synthese und den Abbau von ROS in den Mitochondrien. O_2^- kann als Nebenprodukt in Komplex I oder III der Atmungskette entstehen. Im Folgenden kann es verschiedene Reaktionswege einschlagen. Zum einen bleibt es in den Mitochondrien und wird dort von einer Mangan-assoziierten Superoxiddismutase (MnSOD) zu Wasserstoffperoxid abgebaut, welches dann von einer Katalase (CAT) zu Wasser und molekularem Sauerstoff gespalten wird. Alternativ kann das Wasserstoffperoxid von Glutathion oder von Thioredoxin gespalten werden oder jedoch mit Eisen (Fentonreaktion) zu einem OH-Radikal reagieren. Ein anderer Weg ist die Diffusion des Superoxids durch die innere (IMM) bzw. äußere Mitochondrienmembran (OMM), wo es anschließend von einer Kupfer- oder Zink-assoziierten SOD zu Wasserstoffperoxid abgebaut wird (siehe Abb. 1.4.1.).

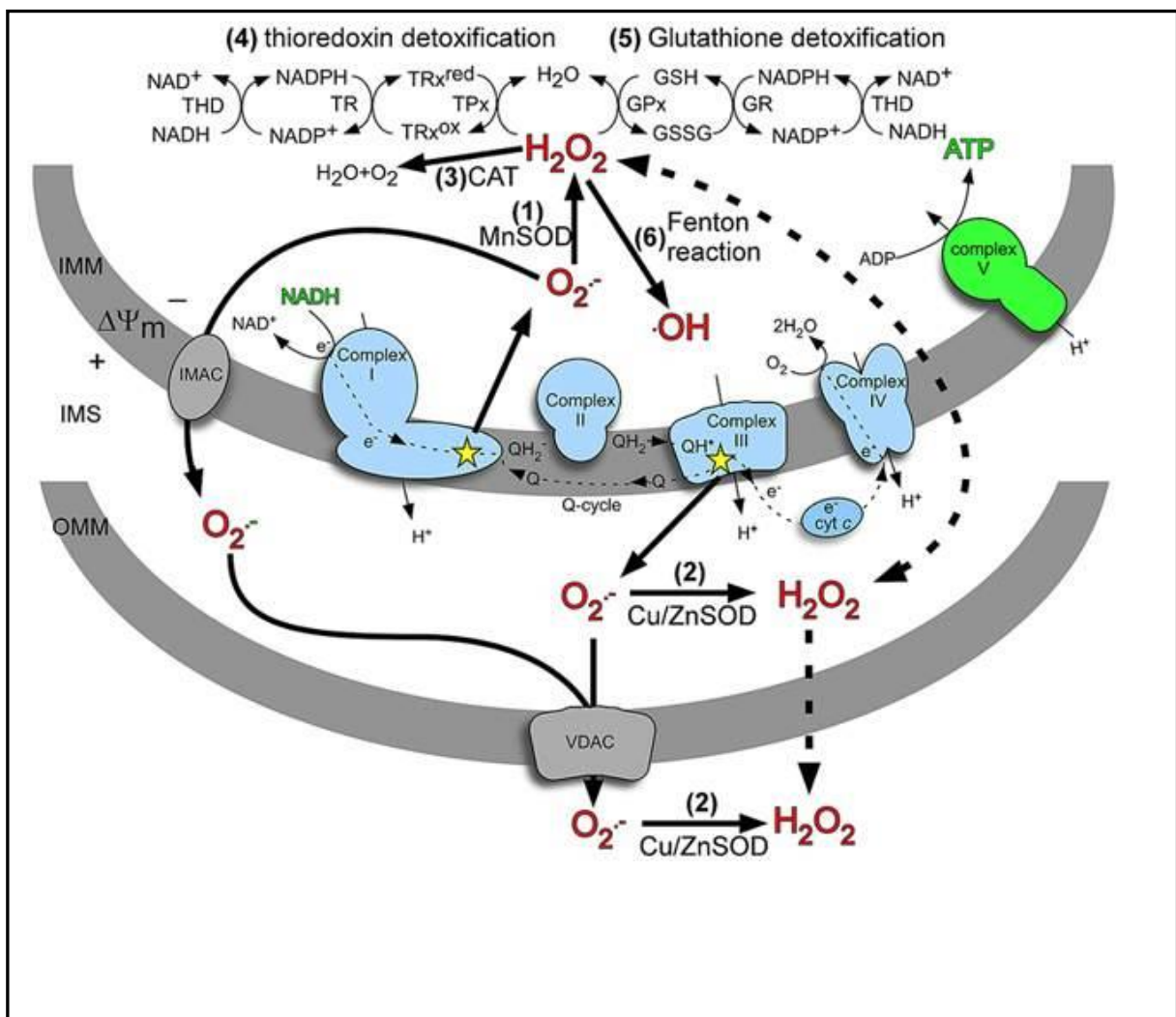


Abbildung 1.3.4.2 Signalweg einer Rezeptorassoziierten Tyrosinkinase (JAK-Kinase).

Superoxide werden im Zuge von Entzündungsprozessen oder Gewebeverletzungen von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen sezerniert (Bedard et al. 2007). Die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren wie die Zytokine IL-1, TNF α , oxLDL oder LPS (Park et al. 2006) kann in Leukozyten durch die Superoxide induziert werden. Dabei wird die Superoxidproduktion durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten, welche die vermehrte Expression und Aktivität der NADPH-Oxidase bewirken (Zhang et al. 2006, Park et al. 2004), angeregt. Die NADPH-Oxidase ist ein membrangebundener Enzymkomplex, welcher aus sechs Untereinheiten besteht und ist für die Superoxidproduktion verantwortlich. Hierbei ist die gp91-PHOX Untereinheit von besonderer Bedeutung, weil sie die katalytische Aktivität der NADPH-Oxidase bestimmt (Babior 2004, Griendling et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass die Superoxidproduktion bei Fehlen dieser Einheit drastisch abnimmt und auch nicht mehr mit Stimulantien wie z.B. oxLDL induziert werden kann (Bae et al. 2009). Ein sehr interessanter Induktor der NADPH-Oxidase für die Arteriosklerose ist oxidiertes LDL (oxLDL). Dieses steigert in Makrophagen die Bildung von Superoxiden (Bae et al. 2009). Dabei reagiert das oxLDL mit einem TLR-Rezeptor (Miller et al. 2003), welcher die gp91-PHOX Untereinheit der NADPH-Oxidase über eine komplexe Signalkaskade aktiviert (Zhang et al. 2006, Park et al. 2004). Dieser Aktivierung zur Folge ist die Menge an produzierten Superoxiden in arteriosklerotischen Plaques in Bereichen mit großer Makrophagenzahl signifikant erhöht (Sorescu et al. 2002). Heitzer et al. 2001 zeigte, dass arteriosklerotische Plaques eine geringere Stabilität aufweisen, je höher der oxidative Stress ist.

1.4.2. Wirkung von Superoxiden auf den Körper und Rolle für den Entzündungsprozess

Superoxide werden hauptsächlich bei Entzündungsprozessen sowie beim Eindringen von Fremdmaterial gebildet (Zhang et al. 2006, Park et al. 2004). Abhängig von dem Bildungsort können sie verschiedene Aufgaben übernehmen. Leukozyten bilden Superoxide zur Abwehr von Fremdorganismen wie Bakterien. Makrophagen phagozytieren diese Fremdorganismen und die Superoxide greifen Proteine, Zellmembran und DNA der fremden Zelle an und zerstören somit wichtige Zellstruktur und weisen ein hohes cytotoxisches Potential auf (Rhee 2006). Die Superoxide haben somit eine zentrale Rolle im Abwehrsystem des Körpers. Viele Bakterien jedoch besitzen in Form einer Superoxiddismutase (SOD) einen wirksamen Schutzmechanismus gegen diese Art von Angriff. Superoxide erhöhen darüber hinaus die Ausschüttung von weiteren proinflammatorischen Zytokine wie IL-1, IL-6, MCP-1 und wirken steigernd auf die Inflammation (Park et al. 2006, Bae et al. 2009).

Weiterhin können Superoxide, welche von Makrophagen im Zuge der arteriosklerotischen Entzündungsreaktion gebildet werden, LDL zu oxLDL umwandeln (Cathcart et al. 1989, Cathcart et al. 2004). Somit entsteht eine positive Rückkopplung auf den Reiz von schon gebildeten oxLDL, welches eine Induktion der NADPH-Oxidase bewirkt. ROS verstärken die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen und glatten Muskelzellen und spielen somit eine wichtige Rolle für die Migration von Makrophagen (Li et al. 2003, Vendrov et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Größe der arteriosklerotischen Plaques bei Knockout der NADPH-Oxidase in Mäusen signifikant abgenommen hat, jedoch nicht komplett verschwunden ist (Sorescu et al 2002, Vendrov et al. 2006). Superoxide sind somit maßgeblich beteiligt am Aufrechterhalten der Arteriosklerose (Vendrov et al. 2006). Weiterhin konnte eine vermehrte Menge an Superoxiden bei arterieller Hypertonie (Dikalova et al. 2005), kardialer Hyperthrophie (Bendall et al. 2002), endothelialer Dysfunktion (Guzik et al. 2000) und bei Thrombosen (Herkert et al. 2004) verzeichnet werden. Nitrierte Linolsäure wirkt inhibierend auf die Superoxidproduktion der Neutrophilen und die damit einhergehende inflammatorische Reaktion (Coles et al. 2002).

1.5. Zielsetzung der Doktorarbeit

Bisherige Studien haben gezeigt, dass Nitroalkene, ins Besondere die nitrierte Ölsäure, eine Vielzahl von verschiedenen entzündungshemmenden Effekten aufweisen. Sie verringern die Ausprägung von diversen proinflammatorischen Interleukinen. Außerdem können sie durch eine direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren Regulierungsprozesse in Zellen beeinflussen. Hier soll der Einfluss der nitrierten Ölsäure auf die Ausbildung der Arteriosklerose in ApoE-Knockoutmäusen untersucht werden. Zur Quantifizierung des arteriosklerotischen Prozesses wird die Größe der Arterioskleroseplaques mikroskopisch im Bereich der Taschenklappen der Aorta gemessen und es wird die Anreicherung von Lipiden in aus ApoE-Mäusen isolierten Knochenmarksmakrophagen mikroskopisch untersucht. Auf biochemischer Ebene wird der Einfluss von nitrierter Ölsäure auf die Phosphorylierung von STAT-1 in ApoE-Knochenmarksmakrophagen gemessen. Zudem soll der Effekt der nitrierten Ölsäure auf die Superoxidproduktion in RAW 246.7-Makrophagen mit Hilfe einer Cytochrom C abhängigen Photoabsorption gemessen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad zur „Analyse“. Wässrige Lösungen für Puffer wurden mit doppelt destillierten Wasser, welches über ein Milli-Q-Reinstwasser System (Integra UV Plus mit TOC) der Firma Membrapure entsalzt wurde, in Gefäßen angesetzt.

2.1.1.1. Verwendete Reagenzien

Tabelle 2.1: Verwendete Reagenzien

Acrylamid	Fötale bovines Serum (FBS)
Aqua	Femto
Avertin	Glycerol
Bromphenolblau	Glycin
Bicinchoninsäure (BCA)	Hämatoxylin-Eosin
Bovines Serum Albumin (BSA)	Isopropanol L-Glutamin 200mM
Cellstripper	Lipopolysaccharid (LPS) (2mg/mL)
Cytochrom	Magermilchpulver (blotting grade non-fat dry)
Deckmedium	Mercaptopethanol
Destilliertes Wasser	Methanol
Dulbecco`s Modified Essential Medium ohne	Natriumchlorid (NaCl)
Phenolrot (DMEM)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Dulbecco`s Modified Essential Medium mit	Nicht essentielle Aminosäuren
Phenolrot	Nitrierte Ölsäure (OA-NO ₂)
(DMEM)	Oil-Red-O-Pulver
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
Enzymatische Chemoluminescence (ECL)	Penicillin/Streptomycin (Penstrep)
Diethylen - Diamin – Tetraessigsäure (EDTA)	Ponceau S
Ethanol	

Ethidiumbromid (1mM)	Sodium Pyruvat
Propylen Glykol	Tris-buffered saline (TBS)
Proteinasen und Phosphatase – Inhibitor Cocktail	TEMED
oxidiertes Low Density Lipoprotein (oxLDL)	Triton X-100
Salzsäure	Trizma Base
Sodium deoxycholat	Tween 20

2.1.1.2. Verwendete Antikörper

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper

<u>Antikörper-Bezeichnung</u>	<u>Vertrieb</u>
Anti-STAT1	Cell-Signaling 9172L
Anti-Phospho-STAT1	Cell-Signaling 9171L
Anti-rabbit	Vector Laborating Anti-Rabbit-Peroxidase IgG
Anti-mouse	Vector Laborating Anti-Mouse-Peroxidase IgG
Anti- α -Aktinin	Sigma A5044

2.1.1.3. Verwendete Gerätschaften

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

<u>Gerät-Bezeichnung</u>	<u>Vertrieb</u>
Lichtmikroskop	Olympus CK2
Hochleistungslichtmikroskop	Leica DM IRE 2
Western Blot -Scanner	Microtec ScanMaker i900
Western Blot -Bearbeitungscomputer	Dell Optiplex 780
Western Blot -Membran	Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran
Extinktionsmessapparatur	Dynex-TechnologiesnMRX TC-Revelation
Entwicklungsmaschine für Western	AGFA Curix 60
Zentrifuge	Heraeus Instruments Labofuge 400R
Zellkultur - Board	Heraeus Instruments Lamen AIR Hur2448
Hochleistungszentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810R
Analysewaage	Cern 572

Blotting Paper	Biorad
Hyperfilm (Röntgenfilm)	Healthscore Amersham Hyperfilm MP
Magnetrührer	Ika MAG RCT
Schüttler	Heidolph Duomax 1030
pH-Meter	Schott pH-Meter CG840
Thermocycler	Eppendorf Thermomixer comfort
Brutschrank	Heraeus Instruments 5060 EK-CO2
Mikroskop-Kamera	Leica DC300F
Abzugswerkbank	TEC-ONOMIC AZ1500
Standheizer	Melag 306
Ofen	Heraeus Instruments Function Line
Multichannelpipette	Eppendorf Research-Pipettus
Ultraschall-Sonde	Bandelin UW2070
Mikrotom-Schneide-Apparatur	Leica CKM1900

2.1.2. Verwendetes Tiermaterial

ApoE-Knockoutmäuse besitzen einen genetischen Mangel für das Gen des Apolipoprotein E, welches ein wichtiger Bestandteil des Lipidstoffwechsels ist. Es wird in der Leber gebildet und transportiert Triglyzeride, fettlösliche Substanzen und Cholesterin im Blut. Der Knockout des Gens für das Apolipoprotein E bewirkt einen Anstieg des Triglyzerid- und Cholesterinspiegels und dies fördert die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques in Gefäßen. In Mäusen wird das Ausmaß der Arteriosklerose auf der Ebene der Taschenklappen der Aorta gemessen. Für unsere Versuche wurden männliche ApoE-Mäuse über 12 Wochen mit einer arteriogenen Diät gefüttert, welche 21% Fett und 1,25% Cholesterin (Harlan Teklan) enthielt. Diese Mäuse wurden mit nitrierter Ölsäure (8 mg/kg/Tag), mit Ölsäure (8 mg/kg/Tag) oder Vehikel (Polyethylen/Glykol/Ethanol) durch eine subkutan implantierte Mini-Pumpe behandelt (Alzet®, model 2004). Die Implantation der Mini-Pumpen erfolgte unter Isoflurannarkose. Die Pumpe lief insgesamt vier Wochen und wurde somit zweimal gewechselt. Postoperativ wurden die Tiere adäquat mit Buprenorphin analgesiert. Die Herstellung der nitrierten Ölsäure (OA-NO₂) erfolgte durch Nitroselenation, welche eine äquivalente Menge an 9-,10- Nitro-Oktadekanen-Regioisomeren ergab.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen fanden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturarbeitsbank des Typs TEC-ONOMIC AZ1500 statt. Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, in unbeschichteten Zellkulturflaschen (T25 bzw. T75 cm²) bzw. Petrischalen kultiviert.

2.2.1.2. Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM) aus Apo-E Mäusen

Knochenmarksmakrophagen/Monozyten sind native Zellen, welche noch kaum mit Fremdmaterial in Berührung gekommen sind. Im Vorfeld der Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen musste L-Zell-Zusatz hergestellt werden, welcher eine Reihe von Differenzierungsstoffen für BMDM-Zellen besitzt und somit ein wichtiger Bestandteil des BMDM-Mediums ist.

Verwendete Substanzen:

- Nicht-essentielle Aminosäuren 100X, Gibco, 11140 (1:100 Endverdünnung)
- Sodium Pyruvat 100 mM, Cellgro, 25000-Cl (1:100 Endverdünnung)
- L-Glutamin 200mM, Cellgro, 25005-Cl (1:100 Endverdünnung)
- Penicillin/Streptomycin 100X, Gibco, 15140 (1:100 Endverdünnung)
- Cellstriper, Cellgro, 25-056-Cl
- Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)

Verwendete Medien:

L-Zell Medium:	BMDM-Medium:
- 430mL DMEM	- 235mL DMEM
- 50mL FBS	- 100mL FBS
- 5mL L-Glutamin	- 150mL L-Zell Zusatz
- 5mL Nicht-essentielle Aminosäuren	- 5mL L-Glutamin
- 5mL Sodium Pyruvat	- 5mL Sodium Pyruvat
- <u>5ml of Penicillin/Streptomycin</u>	- <u>5ml of Penicillin/Streptomycin</u>
- Gesamt 500mL	- Gesamt 500mL

Versuchsmedium: - DMEM - 2mM L-Glutamin - 1mM Sodium Pyruvat - 20% FBS	Versuchsmedium ohne FBS: - DMEM - 2mM L-Glutamin - 1mM Sodium Pyruvat
Einfriermedium: - DMEM - 20% FBS - 10-15 % DMSO	Auftaumedium: - DMEM - 20 % FBS

2.2.1.2.1. Herstellung von L-Zell-Zusatz

L-Zellen sind eine Säugerzelllinie, die sich von Maus-Fibroblasten ableitet. Die Herstellung des L-Zell-Zusatzes erfolgte nach den oben genannten Bestandteilen. Anschließend wurden die L-Zellen aufgetaut und zusammen mit 10ml L-Zell-Medium in ein 50mL Tube überführt. Das Tube wurde bei 1000 Umdrehung für 3 Minuten zentrifugiert (Heraeus Instruments Labofuge 400R), das überstehende Medium wurde abgesogen und das Zellpellet wurde mit 10mL L-Zell-Medium aufgelöst und die Zellen wurden in eine 75 cm² Flasche mit einer Dichte von 1×10^6 gefüllt. Nach 1 bis 2 Tagen wurden sie mit Hilfe von 0,25% Trypsin bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten abgelöst und gesammelt. Nach Auszählung erfolgte die Aussaat mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen in 25mL Medium in einer 75 cm² Flasche für ca. 7 Tage, bis die Flasche komplett mit Zellen bewachsen war. Das L-Zell-Medium aus der Flasche wurde in einer Filtereinheit (0,22µm Filter) gesammelt und filtriert. Das gereinigte Medium wurde in entsprechende 50mL Tubes aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.2.1.2.2. Gewinnung und Kultivierung von BMDM-Zellen (Bone Marrow Derived Macrophages)

Die Gewinnung der BMDM- Zellen erfolgte aus Femur und Tibia einer Maus. Hierzu wurde die Maus zunächst mit Avertin (Tribromoethanol) anästhesiert und nach großzügiger Desinfektion mit 70%igem Ethanol erfolgte die komplette Entfernung der Haut. Die beiden Hinterläufe wurden durch Exartikulation aus der Hüfte und die Pfoten aus dem Sprunggelenk gelöst. Femur und Tibia wurden komplett von Muskeln und Bindegewebe gereinigt und die Knochen wurden in eine mit DMEM gefüllte, unbeschichtete Petrischale gelegt. Zur Gewinnung der Makrophagen aus dem Knochenmark wurde der Knochenkopf abgeschnitten und der Knochen mit 10mL DMEM und einer 21G1½ Kanüle durchspült, wobei das Knochenmark in einer neuen Petrischale aufgefangen wurde.

Die Zellen wurden in 50mL Tubes umgesetzt und bei 1000 Umdrehung über 5 Minuten zentrifugiert (Heraeus Instruments Labofuge 400R), der Überstand entfernt und das Pellet mit 10mL BMDM Medium aufgelöst. Anschließend erfolgte eine Zellzählung und eine Aussaat der Zellen auf vier 150mm x 15mm Petrischalen, wobei mindestens 10×10^6 Zellen in 20mL auf einer Petrischale sein mussten. Nach vier Tagen Inkubation wurde das Medium der Zellen ausgewechselt, wobei das alte Medium zuerst zentrifugiert und die Pellets gemeinsam in einer neuen Petrischale kultiviert wurden. Nach ca. 6 Tagen haben sich die Zellen ausreichend stark vermehrt und konnten mit Cellstripper (cellegro, 25-056-Cl) von der Petrischale gelöst und auf zwei neue Schalen aufgeteilt werden. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Saugpumpe entfernt und anschließend wurden 9mL Cellstripper auf die Petrischale gegeben und über 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Cellstripper mit den Zellen wurde in ein 50mL Tube überführt, welches 10mL Versuchsmedium enthielt (zu lange Einwirkzeit des Cellstrippers schadet den Zellen). Das Tube wurde bei 1000 Umdrehung über 3 Minuten zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen gezählt. Die Zellen konnten nun für Versuche benutzt oder weiter kultiviert werden. Aus zwei Oberschenkeln und zwei Schienbeinen konnten ca. $35\text{-}50 \times 10^6$ undifferenzierte Knochenmarkszellen extrahiert werden. Diese entwickelten sich am Tag 8 zu $50\text{-}80 \times 10^6$ ausdifferenzierten Makrophagen, welche bis Tag 30 benutzt werden konnten. Die BMDM-Zellen verdoppelten sich alle zwei Tage und bei Bedarf bestand die Möglichkeit die Zellen zwischen Tag 1 und Tag 19 in Aliquots von 10×10^6 Zellen/mL oder mehr einzufrieren. Der Vorgang des Einfrierens und des Auftauens ergibt einen Verlust von ca. 40 % der Zellen. Der Einfriervorgang wurde in einer Isopropanol-Dose durchgeführt und die Eppendorftubes in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen bei Raumtemperatur erwärmt und anschließend aus den Tubes in ein 50mL Tube überführt, welches 9mL warmes Auftaumedium enthielt. Anschließend wurde der Tube zentrifugiert (1000x, 3 min) und das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 20mL neuem Auftaumedium aufgelöst und auf einer Petrischale verteilt. Zellen, die sich durch diese Prozedur differenzierten, waren zu 95 % positiv für F4/80 und CD11b. Für Experimente wurden die Zellen in eine 6-Well-Plate umgesetzt: $1,6 \times 10^6$ Zellen/ Well. Nach zwei Tagen ergaben die Zellen ca. 50µg Protein.

2.2.1.2.3. Versuche mit den BMDM-Zellen

Die BMDM-Zellen wurden in 6-Well-Platten umgesetzt, wo sie für einen Tag mit BMDM-Medium inkubiert wurden. Das Medium wurde abgesaugt und durch Versuchsmedium ersetzt. Die Zellen wurden 4 Stunden mit diesem Medium geprimt welches anschließend durch die Testmedien ersetzt wurde. Die Testmedien betrugen insgesamt 1000µL und wurden nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde entfernt und die Proteine extrahiert. Die mit diesen Medien behandelten Zellen wurden im weiteren Verlauf für die Proteinbestimmung sowie für die Western Blots verwendet.

Zusammensetzung der Testmedien:

	Versuchsmedium		
	ohne FBS		
1) Kontrolle:	997µL	3µL Methanol	
2) LPS 1µg/mL:	90µL	10µL LPS	
3) oxLDL 100µg/mL:	964,3µL	35,7µL oxLDL	
4) oxLDL + 3µM OA-NO ₂ :	961,3µL	35,7µL oxLDL	3µL OA-NO ₂
5) oxLDL + 1µM OA-NO ₂ :	963,3µL	35,7µL oxLDL	1µL OA-NO ₂
6) LPS + 3µM OA-NO ₂ :	987µL	10µL LPS	3µL OA-NO ₂
	Versuchsmedium		
	ohne FBS		
1) Kontrolle:	997µL	3µL Methanol	
2) LPS 1µg/mL:	990µL	10µL LPS	
3) oxLDL 100µg/mL:	964,3µL	35,7µL oxLDL	
4) oxLDL + 3µM OA-NO ₂ :	961,3µL	35,7µL oxLDL	3µL OA-NO ₂
5) oxLDL + 1µM OA-NO ₂ :	963,3µL	35,7µL oxLDL	1µL OA-NO ₂
6) oxLDL + 0,5µM OA-NO ₂ :	963,8µL	35,7µL oxLDL	0,5µL OA-NO ₂
	Versuchsmedium		
	ohne FBS		
1) Kontrolle:	997µL	3µL Methanol	
2) LPS 1µg/mL:	990µL	10µL LPS	
3) oxLDL 100µg/mL:	964,3µL	35,7µL oxLDL	
4) oxLDL + 1µM OA-NO ₂ :	963,3µL	35,7µL oxLDL	1µL OA-NO ₂
5) oxLDL + 0,5µM OA-NO ₂ :	963,8µL	35,7µL oxLDL	0,5µL OA-NO ₂
6) oxLDL + 0,25µM OA-NO ₂ :	964,05µL	35,7µL oxLDL	0,25µL OA-NO ₂

2.2.1.3.1. Kultivierung von RAW-Zellen 264.7

RAW-Zellen 264.7 sind immortalisierte Peritonealmakrophagen, die über ein mäuseches transformiertes Leukämie-Tumor-Gen verfügen.

Verwendete Medien:

RAW-Zell-Wachstumsmedium:	Gefriermedium:
- DMEM ohne Phenolrot - 10% FBS (Fetalse bovines Serum) - 1mM L-Glutamin	- DMEM ohne Phenolrot - 10% FBS - 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) - 1 mM L-Glutamin

Die RAW-Zellen wurden in Microtubes gelagert und nach Auftauen bei Raumtemperatur wurde der Inhalt eines Tubes in 30mL RAW-Zell-Medium gelöst und dieses in eine 150mm x 15mm unbeschichtete Petrischale überführt. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend das Medium entfernt. Es wurden 10mL neues Medium hinzugefügt und die Zellen mit Hilfe eines Zellscrapers gelöst und anschließend gezählt. Sie wurden auf neue 150mm x 15mm Petrischalen mit 30mL Medium aufgeteilt, wobei eine Petrischale 1,25 x 10⁶ Zellen enthielt.

2.2.1.3.2. Superoxidmessung mit RAW-Zellen

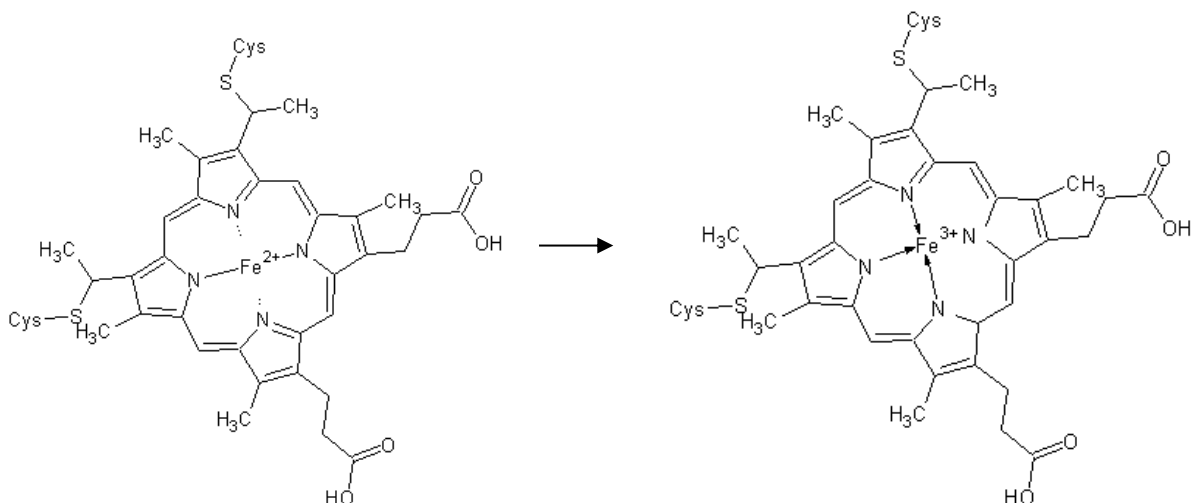
2.2.1.3.3.

Versuchsmedium für RAW-Zellen:	Eingesetzte Stoffe und Verdünnungen:
- DMEM - 1mM L-Glutamin	LPS – Stock: 2mg/mL OA-NO₂ – Stock: 1mMol/L oxLDL – Stock: 2800µg/mL

Cytochrom C ist ein 104 Aminosäuren langes Protein aus der Familie der Cytochrome, welches in den Mitochondrien vorkommt und eine wichtige Rolle bei der oxidativen Phosphorylierung als Elektronencarrier einnimmt. Das Cytochrom c besitzt als prosthetische Gruppe ein Häm c, welches über zwei Thioether-Brücken an zwei Cystein-Reste im Protein gebunden und für die rote Farbe des Cytochrom c verantwortlich ist. Das Cytochrom C reagiert mit Superoxiden und dabei ergibt sich eine Änderung der Extinktion bei 550nm.

METHODIK

Für Experimente wurden die Zellen in 6-Well-Platten überführt, wobei jedes Well 1,5 mL Wachstumsmedium zu je $1,2 \times 10^6$ Zellen enthielt. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 24 Stunden und am nächsten Tag wurden die Zellen für 2 Stunden mit dem Versuchsmedium behandelt. Danach wurden die Wells abhängig vom Versuchsaufbau mit den Testmedien befüllt. Anschließend wurden diese durch 900µL frisches Versuchsmedium ohne FBS (FBS kann die nitrierten Ölsäuren binden) ersetzt. Den 900µL Versuchsmedium wurden 100µL Cytochrom C beigelegt (Cytochrom C Konzentration 10µmol/L)



Strukturformel Häm C

oxidiertes Häm C

Zur Messung wurden 150µL aus jedem Tube in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Extinktion wurde bei 550nm gemessen (Dynex-TechnologiesnMRX TC-Revelation). Insgesamt betrug das Testmedium 1000µL pro Well und die Inkubationszeit 6 Stunden bei 37°C.

Versuche mit LPS und OA-NO₂ – Testmedien:

	Versuchsmedium	LPS	OA-NO ₂
		10 µg/mL	10µM
1) LPS 20 nanog/mL	998µL	2µL	0µL
2) LPS 20 nanog/mL	998µL	2µL	0µL
3) LPS 20 nanog/mL + 250nM OA-NO ₂	973µL	2µL	25µL
4) LPS 20 nanog/mL + 250nM OA-NO ₂	973µL	2µL	25µL
5) LPS 20 nanog/mL + 500nM OA-NO ₂	948µL	2µL	50µL
6) Kontrolle (nur Medium)	1000µL	0µL	0µL

	Versuchsmedium	oxLDL	OA-NO ₂	LPS
		2800µg/mL	10µM	10µg/mL
1) LPS 20 nanog/mL	998µL			2µL
2) control (just media)	1000µL			
3) oxLDL 200µg/mL	928,6µL	71,4µL		
4) oxLDL 200µg/mL	928,6µL	71,4µL		
5) oxLDL 200µg/mL + 250nM OA-NO ₂	903,6µL	71,4µL	25µL	
6) oxLDL 200µg/mL + 250nM OA-NO ₂	903,6µL	71,4µL	25µL	

2.2.1.4.1. Isolation von Peritonealmakrophagen

Männlichen Apo-E-Mäusen wurde Thioglykollat intraperitoneal injiziert, was eine inflammatorische Reaktion bewirkte und die Einwanderung von Makrophagen ins Peritoneum hervorrief. Nach drei Tagen konnten die Makrophagen aus dem Peritoneum isoliert werden. Hierfür wurden die Mäuse zuerst mit Avertin (Tribromoethanol) anästhesiert und mit Ethanol desinfiziert. Die Haut über dem Abdomen wurde eröffnet und es wurden vorsichtig 10mL DMEM in die Peritonealhöhle injiziert. Das DMEM wurde in der Peritonealhöhle verteilt und nach einer Latenzzeit von 5 Minuten wurde es aspiriert. Das Medium wurde zentrifugiert und das Pellet mit 10mL DMEM + 10%FBS gelöst und in einer Petrischale kultiviert. Die Mäuse wurden im Vorfeld einer speziellen fettigen Diät unterzogen, bei welcher eine Gruppe (n=4) mit nitrierter Ölsäure behandelt wurde, während die andere (n=4) als Kontrolle diente. Die Makrophagen wurden auf einer 6-Well-Platte mit 10%FBS/DMEM kultiviert und nachdem sich die Zellen angeheftet haben, mit Oil-red-O angefärbt. Anschließend konnte die Schaumzellbildung mikroskopisch (Olympus CK2) beurteilt werden.

2.2.1.5.1. Zellkammerzählung

Um die Zahl der in einer Suspension befindlichen Zellen zu bestimmen, wurden 10µL der Zellsuspension mit einer Pipette in eine Zählkammer überführt. Durch Auflegen eines Deckglases auf die zuvor angefeuchteten Träger und die in die Zählfelder eingravierten Linien ergibt sich ein definiertes Volumen, in dem die Lebendzellzahl durch Auszählung von 4 Großquadranten unter dem Lichtmikroskop (Olympus CK2) bestimmt werden kann.

Formel zur Berechnung der Zellzahl

$$n/4 * 10^4/\mu\text{L}$$

n → Gezählte Zellen in allen 4 Quadranten

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinbestimmung, Methode: BCA

2.2.2.1.1. Herstellung des RIPA-Puffers

RIPA Puffer

- 50mM Tris-HCl pH 7,4
- 150mM NaCl
- 1mM EDTA
- 1% Triton x-100
- 1% Sodium Deoxycholat
- 0,1% SDS
- Protease-Inhibitor
- Phosphatase-Inhibitor

Der RIPA Puffer wurde verwendet für die Extrahierung der Proteine nach der Durchführung von Experimenten. Die Gewinnung von Proteinen zur weiteren Analyse im Western Blot erfolgte aus in 6-Well-Platten kultivierten Zellen. Die Medien wurden abgesaugt und die Wells wurden mit 2mL PBS gewaschen um mögliche Rückstände von Testmedien zu entfernen. Jedes Well wurde mit 200µL RIPA Puffer gespült und der Puffer wurde zusammen mit den gelösten Zellen in Eppendorf-Tubes gefüllt. Der RIPA Puffer diente dazu, die Zellen von den Wells zu lösen und sie dabei teilweise zu zerstören, damit die Proteine das Zellinnere verlassen konnten. Da bei diesem Vorgang nicht alle Zellen zerstört werden konnten, wurden die Eppendorf-Tubes mit einer Ultraschallsonde (Bandelin electronic Sonoplus) drei Mal für 20 Sekunden behandelt. Diese sorgte für ein Zertrümmern der größeren Zell-und Proteinstrukturen. Anschließend wurden die Tubes bei 14000 Umdrehungen und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810R). Danach wurde der Überstand in neue Tubes pipettiert, wobei 15µL für die Proteinbestimmung abgezweigt wurden.

2.2.2.1.2. Proteinbestimmung

Das Prinzip der BCA-Proteinbestimmung nach Pierce ist, dass das unter alkalischen Bedingungen an der Peptidbindung entstandene Cu^+ mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Farbstoff umgesetzt wird. Die Farbintensität wird bei 562nm gemessen

Zur Vorbereitung wurde der Wärmeschrank auf 37°C angestellt (Heraeus Instruments Function Line). Weiterhin wurde eine BSA Standardverdünnungen hergestellt.

	Volumen Diluent	Volumen BSA	final BSA concentration
A	0	300 µL of Stock	2000 µg/mL
B	125	375 µL of Stock	1500 µg/mL
C	325	325 µL of Stock	1000 µg/mL
D	175	175 µL of B dilution	750 µg/mL
E	325	325 µL of C dilution	500 µg/mL
F	325	325 µL of E dilution	250 µg/mL
G	325	325 µL of F dilution	125 µg/mL
H	400	100 µL of G dilution	25 µg/mL
I	400	0	0 µg/mL

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert und die Proben 1:50 verdünnt. Es wurde ein Arbeitsreagenz hergestellt, welches zu 50 Teilen aus Reagenz A und zu 1 Teil aus Reagenz B besteht. Für eine 96-Well-Platte wurden 20mL Reagenz A und 400µL Reagenz B benötigt. Die Wells wurden mit 25µL Standard oder Untersuchungsmedium sowie mit 200mL Arbeitsreagenz mit Hilfe einer Multichannel-Pipette (Eppendorf Research-Pipettus) befüllt. Die 96-Well-Platte wurde verschlossen und 20 Sekunden lang geschüttelt. Die Platte wurde anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und dann in einen Kühltank zum Abkühlen über 10 Minuten gelegt. Danach wurde die Extinktion bei 570nm im Dynx-Plattenleser (Dynex-Technologies MRX TC-Revelation) gemessen.

2.2.2.2. Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Verwendete Puffer

10-fach SDS-Laufpuffer:		4-fach Laemmli: Insgesamt ein Volumen von 50 mL		
Tris	30,2g	Tris	250mM	1,97g
Glycin	144g	SDS	9,2%	4,6g
EDTA	7,44g	Glycerol	40%	20mL
SDS	6g	Bromphenolblau		0,1g
Wasser	1000mL			
Für eine 1-fache Verdünnung wurden 100mL des 10-fach Puffers mit 900mL destilliertem Wasser gemischt.		Vor dem Gebrauch wurden zu 900µL 4-fach Laemmli 100µL 1-molares DTT dazugegeben		

SDS-PAGE= Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von 0,1 % Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfat - SDS)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine und Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Normalerweise wandern Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Ladung abhängig zu den Polen. In diesem Fall jedoch bindet Natriumdodecylsulfat an die Proteine, denaturiert und negativiert sie. Somit sind alle Proteine Träger von nur negativen Ladungen. In einem geeigneten Puffersystem entsteht nun eine lineare Beziehung zwischen Molekulargewicht und elektrophoretischer Mobilität. Die Proteine wandern dabei in gleicher Richtung zur Anode. Für eine vollständige Lösung der Proteine und eine Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur ist eine Erhitzung auf 95°C notwendig. Dabei ist eine Auftrennung zwischen 10 und 200kDa möglich. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese arbeitet mit den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden verwendeten Gele. Das Glycinion des Laufpuffers liegt auf Grund der verschiedenen pH-Werte der Gele in unterschiedlichen Zustandsformern vor. Im Sammelgel liegt es wegen des niedrigen pH-Wertes des Gels als Zwitterion vor und läuft folglich sehr viel langsamer im Gel als die Proteine. Die Chloridionen des Tris-Puffers laufen dagegen auf Grund ihrer geringeren Größe und negativen Ladung sehr viel schneller als die Proteine. Auf diese Weise bilden beide Ionen zwei Lauffronten, zwischen denen sich auf Grund der elektrischen Aktivität eine Potentialdifferenz ausbildet und somit werden die Proteine zwischen beiden Fronten gehalten und verdichtet. Dies führt dazu, dass alle Proteine im Sammelgel gleich schnell laufen. Im Trenngel dagegen liegt das Glycinion wegen des höheren pH-Wertes negativ geladen vor. Jetzt läuft es schneller als die Proteine und überholt diese. Die Potentialdifferenz verschwindet und alle Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt.

Procedere:

Auf Grundlage einer Proteinbestimmung wurden gleiche Mengen Protein von jeder Probe in Eppendorf- Tubes gefüllt. Jedem Tube wurde zur Denaturierung 3-fach Laemmli 2 zu1 hinzugefügt (doppelt so viel Probe wie Laemmli). Das Gemisch wurde in einem Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort) 5 Minuten lang bei 95°C gekocht. Trenngel und Sammelgel wurden parallel vorbereitet und die notwendige Western –Blot -Apparatur wurde aufgebaut. Der Glasplattenspalt der Apparatur betrug 15mm. In diesen Raum wurde zuerst das Trenngel bis zur Kammhöhe gegossen und mit Isopropanol überschichtet, damit eine gerade Linie im Trenngel entstand. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min konnte das Isopropanol entfernt werden und das Trenngel wurde gut mit Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel eingefüllt und sogleich wurde ein Kamm mit der Dicke von 15mm eingesetzt, um somit die Taschen für die Proben zu schaffen. Zwischenzeitlich wurde der SDS-Laufpuffer angesetzt. Sobald das Sammelgel fest war, wurden die Glasplatten mit den Gelen in die Elektrophoresekammer eingespannt. Der Zwischenraum zwischen den Glasplatten wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Kämme wurden aus dem Sammelgel entfernt und die einzelnen Taschen wurden mit Laufpuffer gespült. Die Proben, der prestained (Page Ruler Lot 00043993) (10µL) und der unstained (Page Ruler Lot 00039958) (10µL) Marker wurden in die Taschen pipettiert. Zuerst wurde eine Spannung von 60 V angelegt, bis die Proben aus dem Sammelgel in das Trenngel gewandert waren. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Anhand der Banden der Marker konnte abgeschätzt werden, wie weit das gewünschte Protein gewandert war, welches bei einer Größe zwischen 85-100 kDa lag.

2.2.2.3. Western Blot

<u>Puffer und Gele:</u>					
Blotting-Puffer:					
Tris		3,03g			
Glycin		14,4g			
Methanol		200mL			
Destilliertes Wasser		800mL			
Der Blotting-Puffer musste immer frisch angesetzt werden und eiskalt sein					
Sammelgelpuffer 4-fach:			Trenngelpuffer 4-fach:		
Tris	0,5M	30,3g	Tris	1,5M	90,85g
EDTA		1,5g	EDTA		1,5 g
SDS		2g	SDS		2g
Dest. Wasser		500mL	Dest. Wasser		500mL
Zuerst wurde der pH des Sammelgels mit Salzsäure auf 6,8 eingestellt, bevor das SDS hinzugegeben wurde.			Zuerst wurde der pH des Trenngels mit Salzsäure auf 6,8 eingestellt, bevor das SDS hinzugegeben wurde.		
Sammelgel 4%			Trenngel 10%:		
Destilliertes Wasser		3,2mL	Destilliertes Wasser		4,8mL
Sammelgelpuffer		1,2mL	Trenngelpuffer		2,5mL
Acrylamid/Bis		0,5mL	Acrylamid/Bis		2,5mL
10% APS		50µL	10% APS		100µL
TEMED		5µL	TEMED		10µL

Procedere:

Während der Gelektrophorese wurde der Blotting-Puffer angesetzt und bei -20°C kühl gestellt. Der Western Blot diente dazu, die Proteine von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran) zu übertragen. Die Nitrocellulose-Membran muss vor Benutzung kurz in Methanol geschwenkt sowie anschließend mit Wasser gespült und mit Transferpuffer äquilibriert werden. Der Transfer auf die Membran wurde mit Hilfe eines Nass-Blot-Verfahrens durchgeführt.

Hierzu wurde ein elektrisches Feld erstellt, welches senkrecht zur Nitrocellulose-Membran war, wodurch die Proteine aus dem Gel in die Nitrozellulose-Membran wanderten. Der spezielle Western Blot Puffer enthielt 20% Methanol, damit das Gel während des Vorgangs nicht quellt. In einer separaten Schale wurde die Blotting-Einheit vorbereitet: 1. Schwamm, 2. Filterpapier (Biorad), 3. Membran, 4. Gel, 5. Filterpapier, 6. Schwamm. Es musste auf die richtige Zuordnung von Anode und Kathode geachtet werden, damit die Proteine in die richtige Richtung wanderten. Die Blotting-Kammer wurde mit Blotting-Puffer aufgefüllt und es wurden Kühlelemente und ein Rührstab hinzugegeben. Die Kammer wurde in eine Eiswanne gestellt und ein Rührmagnet (Ika MAG RCT) angeschaltet. Der Blotting-Vorgang dauerte bei 200mA 90 Minuten.

2.2.2.4. Blocken, Inkubation mit den Antikörpern und Entwicklung

<u>Verwendete Puffer:</u>				
Waschpuffer-TBS-T:			5%BSA (Rinder-Serum-Albumin)-Blockpuffer:	
10-fach TBS		100mL	BSA	5g
Dest. Wasser		900mL	TBS-T	100mL
Tween	0,1%	1mL		
5% Magermilch-Blockpuffer:				
Magermilchpulver		5g		
TBS-T		100mL		

Procedere:

Die Membran wurde aus der Blotting-Kammer entnommen, Gele und Filter wurden entsorgt und die Schwämme wurden mit destilliertem Wasser gesäubert. Die Banden der Membran wurden mit Ponceau S gefärbt, indem es an positiv geladene Aminogruppen der Proteine reversibel band. Die Banden des Markers wurden mit einem Bleistift nachgezogen und anschließend wurde die Membran mit Blockmedium entfärbt. Der Blockpuffer enthielt Proteine, welche sich an unbesetzte Bindungsstellen der Membran anlagerten und somit verhinderte das Blocken die Anlagerung der Antikörper an unspezifische Stellen. Die Folge eines fehlenden Blockens wäre, dass ein verfälschtes Bild entstünde. Als Blockmedium wurde Rinderserumalbumin (BSA) oder Magermilchpulver verwendet. Die Membran wurde ein Stunde lang auf einem Schüttler (Heidolph Duomax 1030) geblockt, wobei das Blockmedium alle 30 Minuten ausgewechselt wurde. Nach dem Blocken wurde die Membran mit dem Erstantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Erstantikörper wurden Anti-STAT-1 (Cell-Signaling 9172L) und Anti-Phospho-STAT-1 (Cell-Signaling 9171L) verwendet, wobei das Mengenverhältnis 1:1000 (10µL Antikörper auf 10mL Blockmedium) war.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit Blockmedium gewaschen, wobei das Medium alle 20 Minuten ausgewechselt wurde. Anschließend wurde sie mit dem Zweitantikörper (Peroxidase labeled Anti-Rabbit-IgG) bei einem Mengenverhältnis von 1:10000 (1µL Antikörper auf 10mL Blockmedium) für eine Stunde inkubiert. Die gelaufenen Banden konnten nur mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Stoffes sichtbar gemacht werden. Die Chemilumineszenzreaktion (ECL) ist eine nicht-radioaktive Methode, um die auf einer Membran immobilisierten spezifischen Antigene zu detektieren. Diese müssen dazu direkt oder indirekt an Peroxidase-markierte Antikörper gebunden sein. Das Prinzip dieser Reaktion besteht aus der Oxidation von Luminol in alkalischer Lösung, katalysiert durch Peroxidase und H_2O_2 . Dabei sendet das angeregte Luminolmolekül Licht einer Wellenlänge von 428nm aus. Diese Reaktion erreicht ihr Maximum nach 5-10 min mit einer Halbwertszeit von ungefähr 1 Stunde. Die Membran wurde mit 1mL Femto (ein weiteres Chemoluminiszenz) für 5 Minuten oder mit 1mL ECL für 1 Minute inkubiert, zur Abschirmung in eine Fotokassette gelegt und in die Dunkelkammer gebracht. Die Membran konnte nun mit Hilfe der Chemoluminiszenzreaktion einen Röntgenfilm (Healthscore Amersham Hyperfilm MP) schwärzen. Somit wurde das Bandenmuster von der Membran auf den Film transferiert und mit Hilfe einer Detektionsmaschine (AGFA Curix 60) entwickelt. Der fertig entwickelte Film wurde mit einem speziellen Scanner (Scan Maker i900 Mikrotek) eingelesen und es konnte dann mit dem Computerprogramms (Image J) die Intensität der Schwärzung ermittelt werden.

2.2.2.5. Strippen der Membran

<u>Verwendete Puffer:</u>	
Stripping Puffer I: - 0,2M Glycin in destilliertem Wasser - Molekulargewicht: 75,5g/mol - Einwaage: 15,01 g/L - pH auf 2,5	Stripping Puffer II: - 50mM Tris in destilliertem Wasser - Molekulargewicht 121,14mg/mol - Einwaage 6,06g/L - pH auf 7,5

Das Strippen einer Membran sorgte dafür, dass sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper von der Membran gelöst wurden. Die Proteine dagegen blieben auf der Membran erhalten und die Membran konnte mit einem neuen Primärantikörper behandelt werden.

Procedere:

Die Membran wurde bei Raumtemperatur zwei Mal für 20 Minuten in einem Schüttler (Heidolph Duomax 1030) mit dem Stripping Puffer I gewaschen. Danach wurde die Membran weitere zwei Mal für 20 Minuten mit dem Stripping Puffer II behandelt. Anschließend wurde sie für eine Minute mit TBS-T gewaschen, um Reste der Stripping Puffer zu entfernen und daraufhin konnte die sie mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

2.2.3. Tiermaterial

2.2.3.1. Anfertigung und Analyse von Kryoschnitten zur Beurteilung des Ausmaßes der Arteriosklerose

Die Maus wurde zunächst adäquat mit Avertin (Tribromoethanol) anästhesiert. Nach Eröffnung des Sternums und des Abdomens wurden die Lunge sowie die intraperitonealen Organe entfernt. Die Herzen wurden zusammen mit der kompletten Aorta vorerst in toto entnommen und anschließend wurde das basale Drittel des Herzens zusammen mit ca. 2mm der Aorta ascendens in eine Blockvorlage überführt. Die Vorlage wurde mit einem speziellen Gefriermedium (OCT) befüllt und sogleich in Flüssigstickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Blöcke mit einer speziellen Kryoschneidemaschine (Leica CKM1900) mit einem Mikrotom-Messer in 5µm dicke Schnitte geschnitten. Es wurden geeignete Objektträger (Assistent Super Frost/Plus Objektträger) zum Aufnehmen der Schnitte verwendet. Unter wiederholter Mikroskopkontrolle (Leica DM IRE 2) wurde versucht, die Taschenklappenebene und die sich dort befindlichen arteriosklerotischen Plaques darzustellen. Dabei wurden alle Schnitte im Bereich der Aortenklappe gesammelt und bei -20°C gelagert. Das Ausmaß der Arteriosklerose bei Mäusen wird nach der Größe der arteriosklerotischen Plaques im Bereich der Taschenklappen beurteilt.

2.2.4. Histochemische Verfahren

2.2.4.1. Oil-Red-O-Färbung bei Schnitten

Oil-Red-O-Lösung:

- 0,5g Oil-Red-O
- 100mL Propylen-Glykol

Die Oil-Red-O-Färbung ist eine spezielle Fettfärbung. Das Prinzip beruhte darin, dass der Farbstoff, welcher in Fetten besser löslich ist als in Alkohol, aus dem Propylen-Glykol in die mit Lipiden gefüllten Makrophagen wanderte. 0,5g Oil-Red-O-Pulver wurden in 100mL Propylen-Glykol gelöst und das Gemisch wurde unter kontinuierlichem Umrühren langsam mit Hilfe eines Heizers (Melag 306) auf 95°C erwärmt. Die Temperatur durfte dabei die 100°C Marke nicht erreichen, was die Stabilität des Farbstoffes gefährdet hätte. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur über Nacht abgekühlt und am Folgetag filtriert. Die Flasche wurde bei Raumtemperatur gelagert und zum Schutz vor Lichtexposition mit Folie abgedeckt. Die zu färbenden Objektträger wurden über Nacht in einem Ofen (Heraeus Instruments Function Line) bei 55-60°C gelagert und am nächsten Tag zuerst auf Raumtemperatur gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten bei leichter Schwenkbewegung in destilliertem Wasser angefeuchtet. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet und für eine weitere Nacht im Ofen bei 55-60°C gelagert. Dies diente zur Fixierung des Kryoschnittes am Objektträger. Am Folgetag wurden die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt und für 1 Minute in 100% Propylen-Glykol getaucht. Anschließend wurden sie für 4 Stunden in der Oil-Red-O-Lösung gefärbt. Zur Lösung von überschüssigem Oil-Red-O von den Objektträgern wurden sie 3 Mal für je 1 Minute in 85% Propylen-Glykol getaucht. Hierbei wurde für jeden Schritt frisches Propylen-Glykol verwendet. Die Schnitte wurden danach 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Fixierung und Schutz der Färbung wurde auf die Objektträger ein spezielles Deckmedium geträufelt (Dako Faramount Aqueous Mounting Media) und anschließend mit einer Deckplatte bedeckt. Die Schnitte wurden nun mit einem Mikroskop (Olympus CK2) begutachtet und bei einer 50x-fachen Vergrößerung fotografiert. Von jedem Tier wurden drei Schnitte untersucht. Die Fotos wurden auf einem Rechner gespeichert und die Größen konnten mit dem Programm Paint.NET ausgewertet werden.

2.2.4.2. Oil-Red-O-Färbung bei Zellen

Es wurden sowohl Peritoneal- als auch Knochenmarksmakrophagen untersucht. Die Zellen wurden aus der Petrischale in eine 6-Well-Platte umgesetzt. Zuvor wurde in die 6-Well-Platte eine kleine Plastikscheibe gelegt, auf der sich später die Zellen anheften sollten. Die Zellen in der 6-Well-Platte wurden zuerst mit entsprechenden Testmedien behandelt, diese Medien anschließend abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen für fünf Minuten mit 100% Propylen-Glykol beschichtet und danach wurde Oil-Red-O in die Wells gefüllt. Die Platte wurde für 20 Minuten in einen Ofen (Heraeus Instruments Function Line) bei 60°C gestellt. Sobald die Platten aus dem Ofen genommen wurden, wurde das Oil-Red-O durch 85% Propylen-Glykol für 5 Minuten ersetzt. Die Wells wurden anschließend zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, die Plastikscheiben aus den Wells vorsichtig entfernt sowie auf einem Objektträger mit Deckmedium fixiert. Nun konnten die

gefärbten Zellen auf den Plastikscheiben unter einem Mikroskop begutachtet werden. Dabei wurde vor allem auf die Anreicherung von rotem Farbstoff in den Makrophagen geachtet.

Testmedien:			
	Versuchsmedium		
	ohne FBS		
1) Kontrolle:	997µL	3µL Methanol	
2) oxLDL 100µg/mL:	964,3µL	35,7µL oxLDL	
3) oxLDL + 3µM OA-NO ₂ :	961,3µL	35,7µL oxLDL	3µL OA-NO ₂
4) oxLDL + 1µM OA-NO ₂ :	963,3µL	35,7µL oxLDL	1µL OA-NO ₂
5) oxLDL 100µg/mL:	964,3µL	35,7µL oxLDL	
6) oxLDL + 3µM OA-NO ₂ :	961,3µL	35,7µL oxLDL	3µL OA-NO ₂

Die Zellen aus den Wells 1-4 wurden nur mit Oil-Red-O gefärbt. Die Zellen in den Wells 5 und 6 wurden zusätzlich noch mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die Inkubationszeit der Testmedien betrug 1 Stunde.

2.2.4. Statistische Auswertung

Von allen Zellkulturexperimenten wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit unterschiedlich vielen Mess-/Zählerergebnissen durchgeführt. Als Ergebnis wurden das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung der gesamten Stichprobe (auf der Grundlage aller Ergebnisse aus allen Experimentreihen) bestimmt. Bei den Vergleichen der Stichproben wurde zuerst ein ANOVA Test herangezogen, der die Stichproben auf Signifikanz insgesamt prüfen sollte. Anschließend wurde als Post-Hoc-Test zur genaueren Untersuchung der Signifikanzen der Stichproben untereinander ein Bonferroni Test angewendet.

3. Ergebnisse

Alle Experimente wurden mit einem ANOVA-Test auf statistische Signifikanz hin untersucht. Die p-Werte werden mit einem post-hoc Bonferroni-Test ermittelt und bei den Diagrammen angegeben.

3.1. Nitrierte Ölsäure verringert die Größe der arteriosklerotischen Plaques

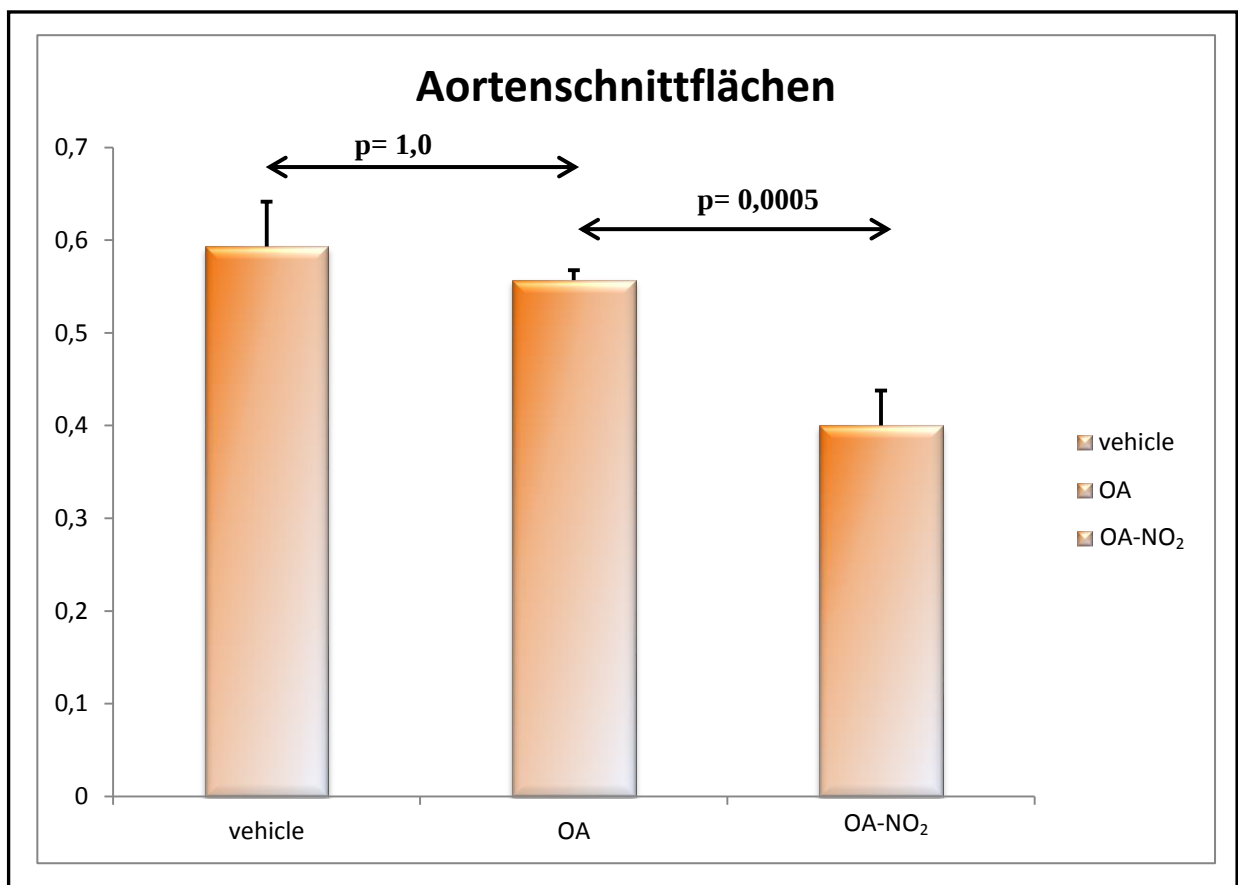


Abbildung 3.1.1: Größe der arteriosklerotischen Plaques auf Ebene der Taschenklappen in Abhängigkeit verschiedener Testmedien

Abbildung 3.1.1 zeigt die Abhängigkeit der arteriosklerotischen Plaques auf der Ebene der Taschenklappen bei ApoE-Mäusen von verschiedenen Testmedien (vehicle-PEG, OA und OA-NO₂). Hierbei werden die Mittelwerte miteinander verglichen und der Standardfehler angegeben. Der statistische Vergleich mit einer ANOVA ergibt eine allgemeine Signifikanz zwischen den einzelnen Gruppen ($p=0,001$). Hierbei zeigt sich mit Hilfe des Post-Hoc Tests zudem ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Ölsäure und nitrierter Ölsäure (OA-NO₂) von $p=0,005$.

Es ist weiterhin zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der Behandlung mit nativer Ölsäure gibt (OA), $p=1,0$. Unter der Behandlung mit OA sind die arteriosklerotischen Plaques durchschnittlich 1,39-fach so groß wie unter der Behandlung mit OA-NO₂. Im Vergleich zum Kontrollwert (vehicle) sind die Plaques 1,48-fach so groß wie unter OA-NO₂.

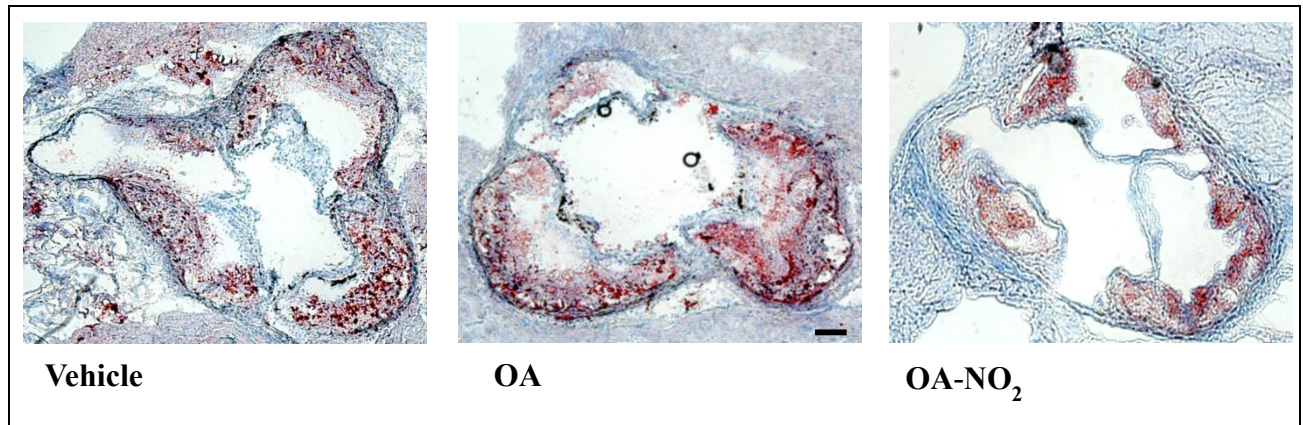


Abbildung 3.1.2: Mikroskopische Schnitte von Mäuse-Aorten auf Höhe der Taschenklappenebene

Abbildung 3.1.2 zeigt mikroskopische Schnitte von Mäuse-Aorten auf der Höhe der Taschenklappenebenen. Die Mäuse wurden im Vorfeld einer speziellen artherogenen Diät ausgesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die arteriosklerotischen Plaques (rot gefärbt mit Oil-Red-O-Stain) unter Behandlung mit OA größer sind als unter Behandlung mit OA-NO₂. Weiterhin ist erkennbar, dass zwischen OA- und Kontrollbehandlung (vehicle) kaum bzw. keine signifikanten Unterschiede in der Größe vorhanden sind (Bezug zu Abbildung 3.1.1)

3.2. Nitrierte Ölsäure verringert mikroskopisch die Anreicherung von Lipiden in Peritonealmakrophagen

Abbildung 3.2.1 ist eine mikroskopische Aufnahme von Peritonealmakrophagen, die mit Oil-Red-O gefärbt worden sind. Die Makrophagen wurden aus ApoE-Knockoutmäusen, welche mit verschiedenen Diäten im Vorfeld gefüttert wurden, extrahiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass unter dem Einfluss von OA-NO₂ die Menge an mit Lipiden gefüllten Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ist. Abbildung 3.2.2 zeigt die Schnitte in einer erhöhten Vergrößerung, 40-fach. Hier ist deutlich zu erkennen, dass ein großer Teil der Makrophagen unter Einfluss von OA-NO₂ überhaupt keine Lipidvakuolen hat, während beim vehicle ein großer Teil der Makrophagen Lipide aufgenommen hat.

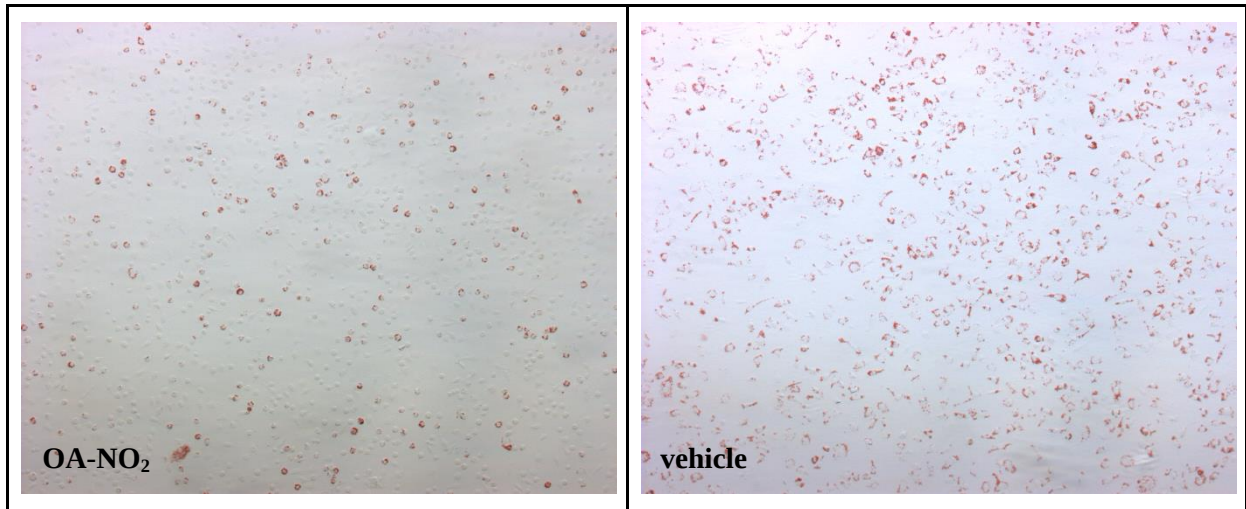


Abbildung 3.2.1: Mikroskopische Färbung von Peritonealmakrophagen, die mit OA-NO₂ oder mit normaler Nahrung behandelt wurden, 10-fache Vergrößerung

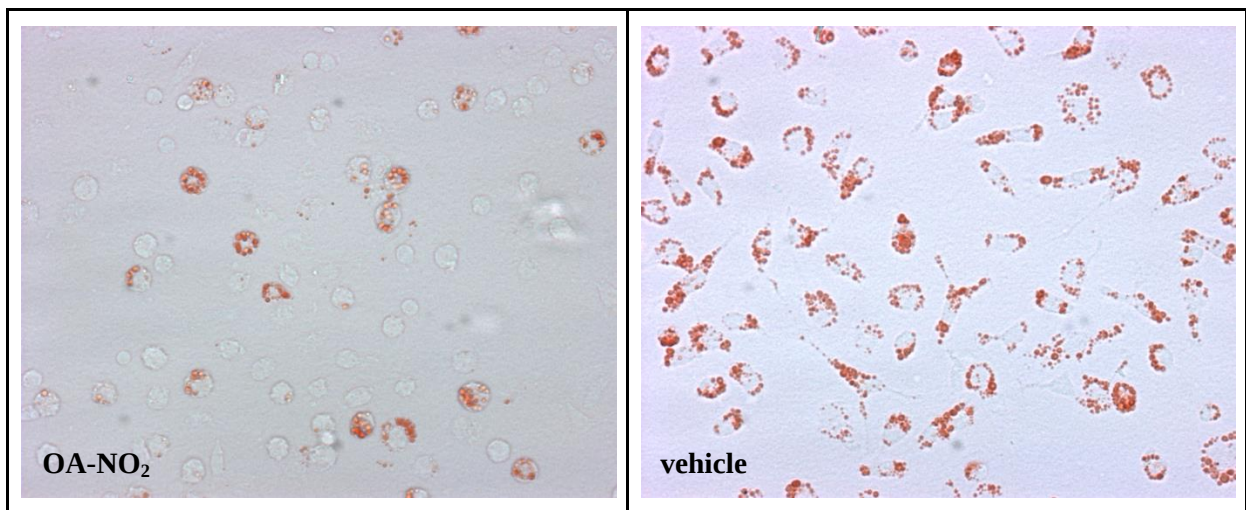


Abbildung 3.2.2: Mikroskopische Färbung von Peritonealmakrophagen, die mit OA-NO₂ oder mit normalem Medium behandelt wurden, 40-fache Vergrößerung

Weiterhin wird deutlich, dass die Zahl der Lipidvakuolen in den Makrophagen unter dem Einfluss von OA-NO₂ geringer ist als bei Kontrollbedingungen. Hier ist das Zytoplasma oftmals komplett mit Vakuolen gefüllt, die die restlichen Zellorganellen an den Rand der Zelle abdrängen.

3.3. Nitrierte Ölsäure verringert mikroskopisch die Anreicherung von Lipiden in Knochenmarksmakrophagen

Abbildung 3.3.1 zeigt mikroskopische Bilder von BMDM aus ApoE-Knockoutmäusen, die mit normalem Medium, oxLDL oder oxLDL + OA-NO₂ behandelt wurden. Die Makrophagen wurden mit Oil-Red-O angefärbt und anschließend fotografiert. Das vehicle dient hierbei als Kontrolle und die Behandlung mit oxLDL als Positivreaktion. Es ist zu erkennen, dass sowohl unter der Behandlung mit reinem Medium als auch mit oxLDL eine starke Aufnahme von Lipiden in die Zellen vorliegt. Hierbei ist die Bildung von Lipidvakuolen unter Einfluss von oxLDL stärker als bei normalem Medium. Auch die 40-fache Vergrößerung zeigt unter oxLDL Einfluss eine vermehrte Lipidaufnahme der Makrophagen als unter dem Einfluss von normalem Medium. Der Einfluss von OA-NO₂ verringert den Effekt des oxLDLs und die Makrophagen nehmen weniger Lipide auf. Dies kann man am besten im Vergleich der 10-fach vergrößerten Aufnahmen sehen. Zudem zeigt sich in der 40-fachen Vergrößerung, dass die Menge und Größe an Vakuolen unter dem Einfluss von OA-NO₂ im Vergleich zu den anderen Medien geringer ist.

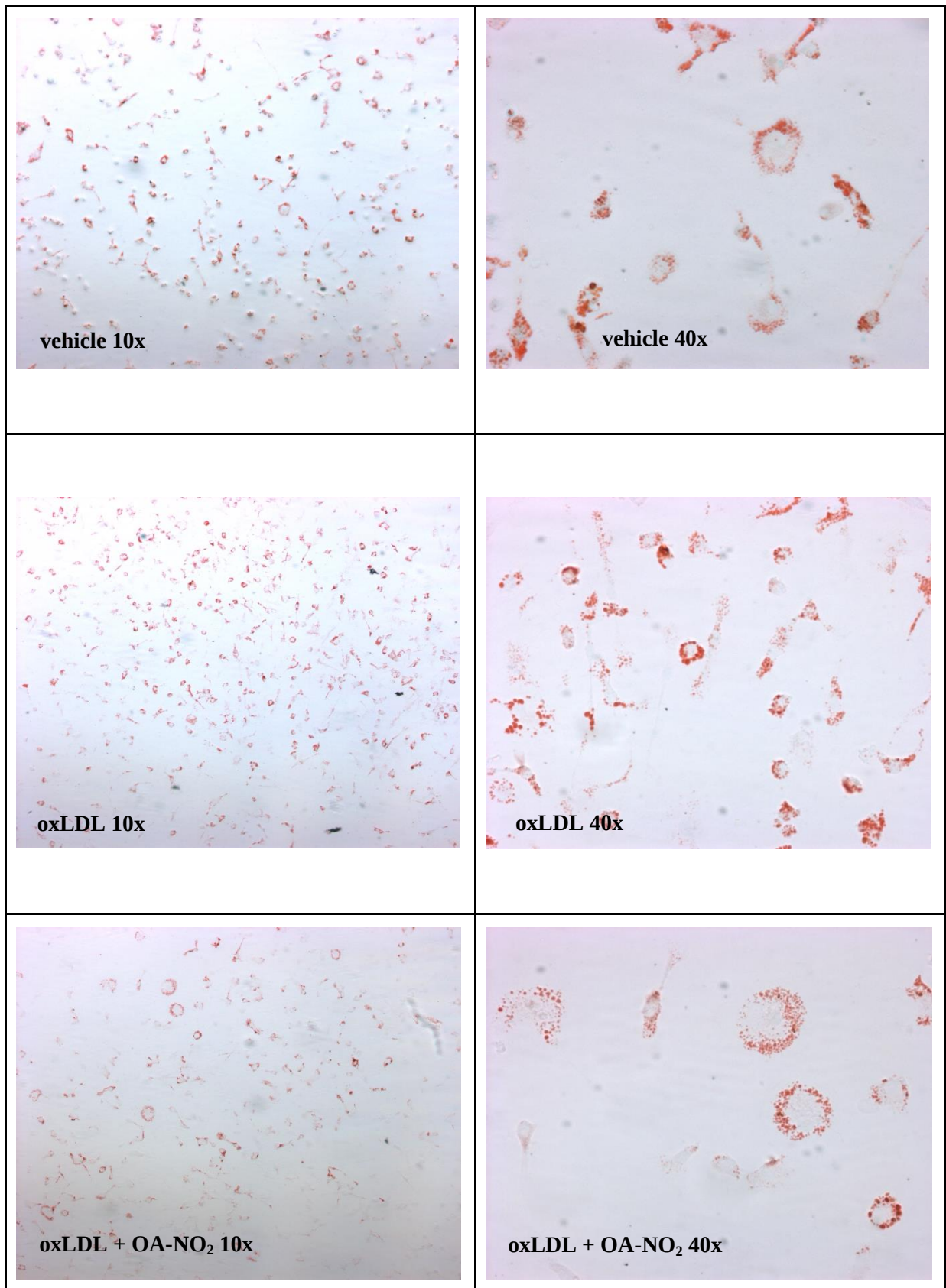


Abbildung 3.3.1: Mikroskopische Färbung mit Oil-Red-O von BMDM aus ApoE-Mäusen, die mit normalem Medium, oxLDL und oxLDL +OA-NO₂ behandelt wurden, 10- und 40-fache Vergrößerung

3.4. Nitrierte Ölsäure verringert die Phosphorylierung von STAT-1

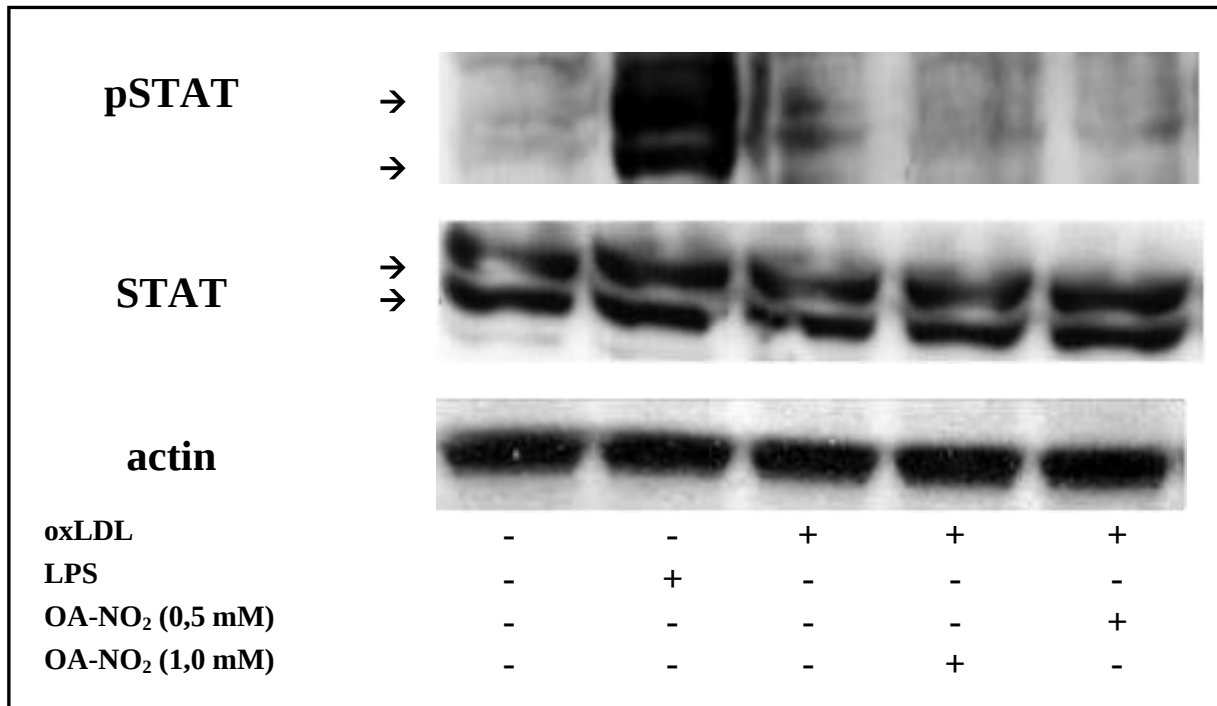


Abbildung 3.4.1: Bandenausbildung von pSTAT unter dem Einfluss von OA-NO₂ in Anwesenheit von oxLDL

Abbildung 3.4.1 zeigt Western Blots mit Bandenschwärzung abhängig von den eingesetzten Medien. STAT-1 sowie pSTAT-1 zeigen in einer Gelelektrophorese ein spezifisches Doppelbandenmuster, welches bei ca. 85 kDa liegt. Die Schwärzung der Bande ist proportional zu der Menge an pSTAT, STAT bzw. Actin. Das pSTAT dient als Marker für die Entzündungsreaktion während das unphosphorylierte STAT einen Grundwert angibt. Als Housekeeping bzw. Ladekontrolle wurde Actin benutzt. Im obersten Westernblot (pSTAT) liegen deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Testmedien vor. Unter dem Einfluss von LPS liegt die stärkste Bandenschwärzung und somit größte Menge an pSTAT im Vergleich aller Testgruppen vor. Dagegen zeigt sich bei den Testmedien mit oxLDL + OA-NO₂ lediglich eine deutlich geringere Schwärzung der Doppelbande, welche sich auf eine geringere Menge an pSTAT zurückführen lässt. Beim Einsatz von nur oxLDL liegt eine moderate Doppelbandenausbildung vor. Der mittlere Westernblot zeigt die Ausbildung von STAT unter dem Einfluss der Testmedien. Hier wird deutlich, dass die Schwärzung in allen Testmedien ähnlich ist. Der unterste Blot zeigt das Housekeeping mit Actin, welches als Ladekontrolle für alle Testmedien genutzt wird.

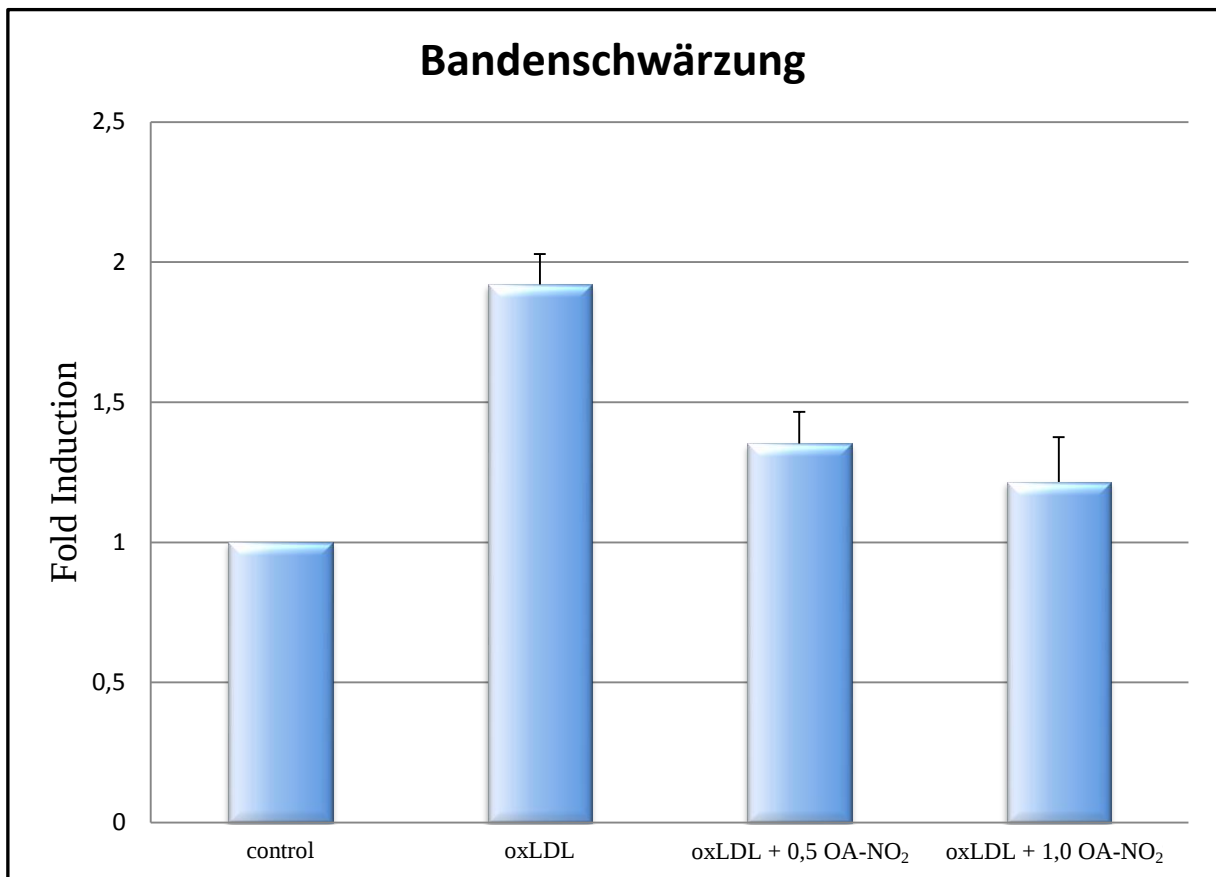


Abbildung 3.4.2: Verhältnis der Western Blot Bandenschwärzung für pSTAT/STAT abhängig von verschiedenen Testmedien

Abbildung 3.4.2 zeigt das Verhältnis der Bandenschwärzung für pSTAT in Abhängigkeit von den eingesetzten Testmedien. In dieser Abbildung wurde die Bandenschwärzung des Kontrollmediums als Bezugswert genutzt, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlich zu zeigen. Mit einer ANOVA wurde eine Signifikanz mit $\alpha < 0,05$ zwischen den Gruppen errechnet. Es ist zu erkennen, dass unter dem Einfluss oxLDL die Ausbildung von pSTAT im Vergleich zum Kontrollwert am stärksten ist, nämlich ca. doppelt so stark. Die Phosphorylierung von STAT ist bei Vorhandensein von OA-NO₂ zusammen mit oxLDL signifikant geringer als bei oxLDL alleine. Hier liegt lediglich eine 1,3-fache (bei 0,5mMol) und 1,15-fache (bei 1,0mMol) Erhöhung der STAT-Phosphorylierung und somit Bandenschwärzung vor. Es wird eine geringere Phosphorylierung von pSTAT bei der höheren OA-NO₂-Konzentration von 1,0mMol beobachtet als bei 0,5mMol OA-NO₂. Es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz für die zuletzt beschriebene Beobachtung.

3.5. Nitrierte Ölsäure verringert die LPS-induzierte Superoxidproduktion in RAW-Zellen

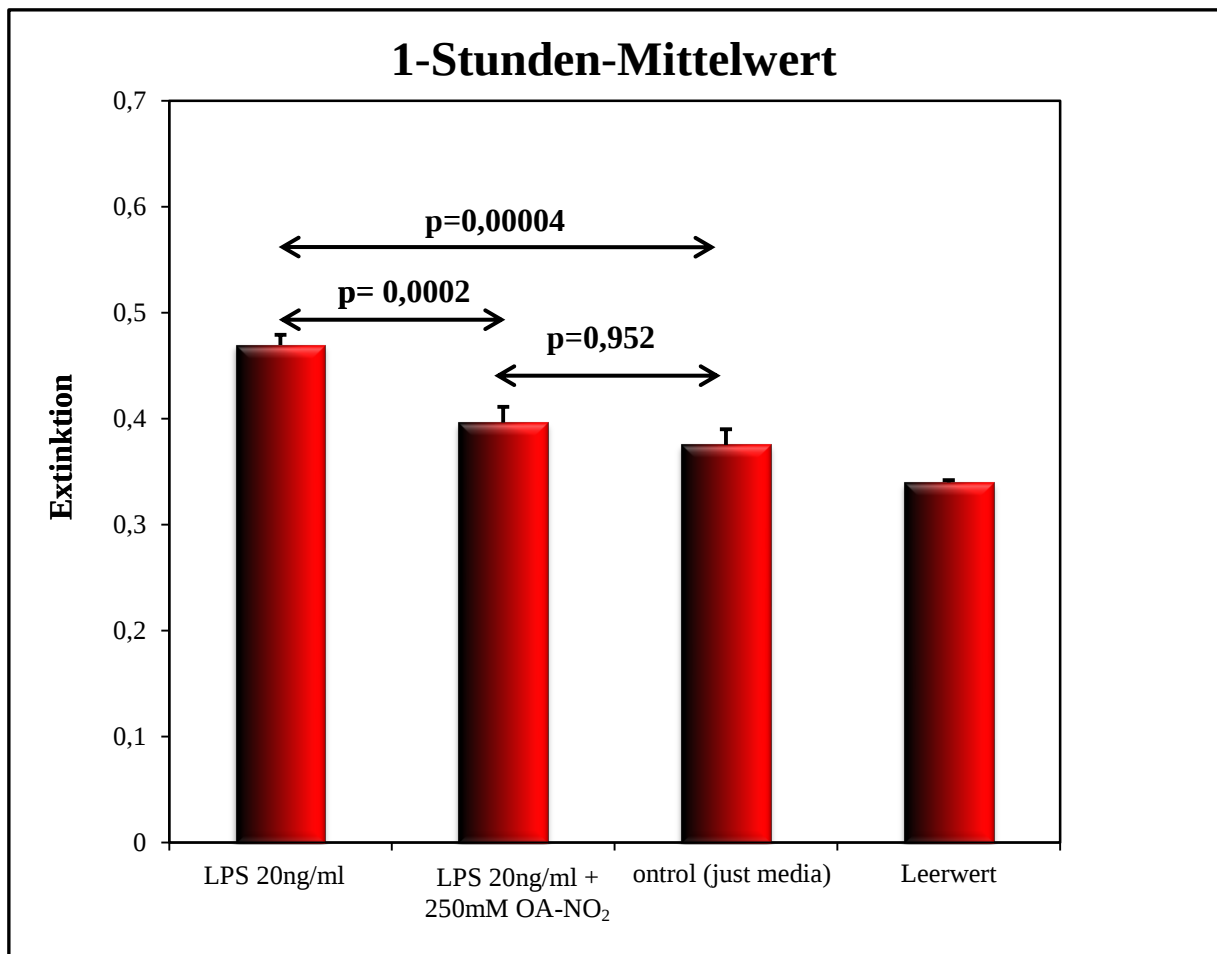


Abbildung 3.5.1: LPS und OA-NO₂ abhängige Superoxidproduktion, 1-Stunden-Mittelwerte

Abbildung 3.5.1 zeigt die superoxidbedingte Extinktion in Abhängigkeit von den eingesetzten Testmedien. Hierbei wurde der 1-Stunden-Mittelwert ermittelt sowie der Standardfehler angegeben. Ein ANOVA-Test zeigt, dass sich die Gesamtheit der Stichproben signifikant voneinander unterscheidet ($p=7 \times 10^{-07}$). Unter dem Einfluss von nur LPS ist erkennbar, dass eine signifikante Stimulation der Superoxidproduktion gegenüber dem Kontrollwert nur mit Medium ($p=0,00004$) vorhanden ist. LPS in Verbindung mit OA-NO₂ dagegen zeigt gegenüber der Kontrolle mit Medium keine signifikante Erhöhung der Superoxidproduktion ($p=0,952$). Es liegt zudem ein signifikanter Unterschied der Extinktion zwischen der Gruppe nur mit LPS und der Gruppe mit LPS + OA-NO₂ ($p=0,0002$) vor. Am Kontrollwert nur mit Medium wird deutlich, dass die Zellen bereits ohne jegliche Stimulation eine gewisse Menge an Superoxiden produzieren. Bei allen Stichproben ist zum Zeitpunkt 0 die Extinktion sehr ähnlich.

Unter dem Einfluss von LPS steigt die Extinktion um ca. das 0,5-fache innerhalb einer Stunde an. LPS zusammen mit OA-NO₂ dagegen bewirken im Zeitraum einer Stunde lediglich eine Steigerung um das 0,2-fache und somit eine deutlich geringere als bei LPS allein. Unter Kontrollbedingungen nur mit Medium zeigt sich ebenfalls eine leichte Steigerung der Extinktion um das ca. 0,15-fache, vergleichbar wie unter LPS und OA-NO₂.

3.7. Nitrierte Ölsäure verringert die oxLDL-abhängige Superoxidproduktion in RAW-Zellen

Abbildung 3.6.1 zeigt ebenfalls eine superoxidbedingte Extinktion abhängig von verschiedenen eingesetzten Testmedien. Auch hier wurde der 1-Stunden-Mittelwert ermittelt sowie der Standardfehler angegeben. Ein ANOVA-Test zeigte, dass sich die Gesamtheit der Stichproben signifikant voneinander unterscheidet ($p(\text{ANOVA}) = 8,354 \times 10^{-06}$).

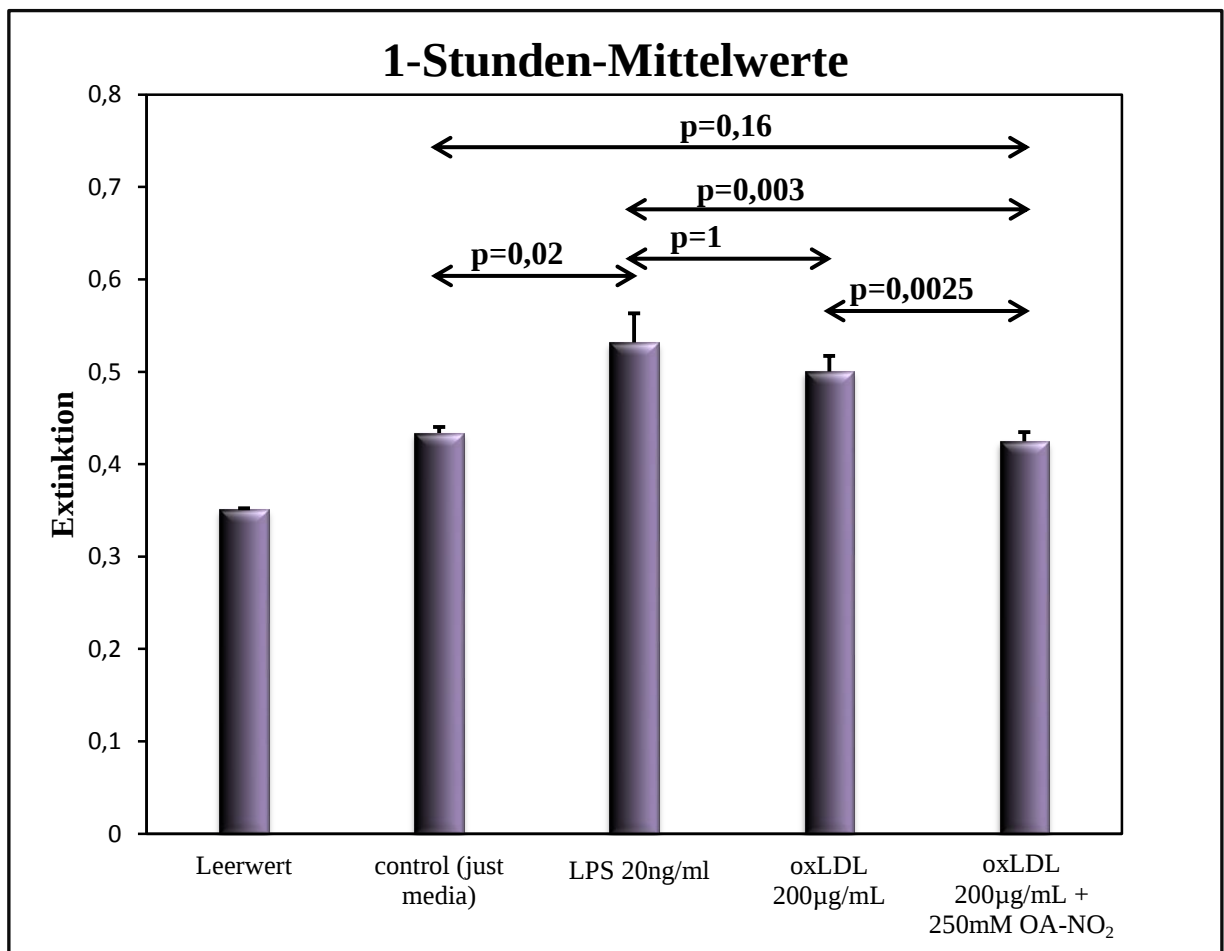


Abbildung 3.6.1: oxLDL, LPS und OA-NO₂- abhängige Produktion von Superoxiden, 1-Stunden-Mittelwerte

Hieraus wird deutlich, dass eine Behandlung mit LPS eine signifikante Erhöhung der Superoxid-Werte im Vergleich zur Kontrolle mit Medium hervorruft ($p=0,02$). oxLDL zeigt ebenfalls eine signifikante Induktion der Superoxidproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,048$). Zwischen LPS und oxLDL konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Extinktion erkannt werden ($p=1$). Ebenso zeigt OA-NO₂ in Kombination mit oxLDL keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,16$), jedoch besteht ein signifikanter Unterschied der Extinktionswerte zwischen oxLDL mit OA-NO₂ und oxLDL alleine ($p=0,0025$). Weiterhin liegt eine Signifikanz zwischen den Werten von LPS und von oxLDL mit OA-NO₂ ($p=0,003$) vor. Auch hier ist bei allen Stichproben zum Zeitpunkt 0 die Extinktion auf einem ähnlichen Niveau. Unter LPS-Wirkung ist der größte Anstieg der Extinktion zu verzeichnen, nämlich ungefähr um das 0,54-fache zum Ausgangswert. Einen ähnlichen Anstieg gibt es auch bei der Behandlung mit nur oxLDL (0,52-fache). Sowohl die Kontrolle mit Medium als auch die Behandlung mit oxLDL in Kombination mit OA-NO₂ bewirken eine Steigerung der Extinktion um das 0,28-fache. Im Leerwert ist auch ein leichter Anstieg der Extinktion zu verzeichnen, nämlich um das ca. 0,12-fache.

4. Diskussion

Diese Doktorarbeit hat gezeigt, dass nitrierte Ölsäure signifikant den arteriosklerotischen Prozess in ApoE-Knockoutmäusen sowie die Bildung von Superoxiden in RAW-Makrophagen verringert. Zudem reduziert OA-NO₂ die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen, was ebenfalls ein elementarer Teil des arteriosklerotischen Prozesses ist. Auf biochemischer Ebene verringert OA-NO₂ die Phosphorylierung von STAT-1, welches ein wichtiger Messenger in der Signalkaskade verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z.B. LPS, IL-1, ist. Darüber hinaus zeigt OA-NO₂ eine hemmende Wirkung auf die LPS- und oxLDL-abhängige Superoxidproduktion. Hierbei weist OA-NO₂ in der Gruppe der nitrierten Fettsäuren die höchste Stabilität gegenüber Oxidationsreaktionen und die höchste Konzentration sowie längste Halbwertszeit im Blutplasma (Rudolph V. et al. 2008) auf, wobei andere nitrierte Fettsäuren wie z.B. nitrierte Linolsäure ebenfalls entzündungshemmende Eigenschaften besitzen (Baker et al. 2005, Rudolph V. et al. 2008). Auf Grund dieser Vorteile von OA-NO₂ gegenüber anderen Nitroalkenen wurde es für unsere Versuchsreihe gewählt. Bis heute wurde ein Vielzahl von regulatorischen Transkriptionsfaktoren gefunden, welche eine entzündungsmodulatorische Wirkung aufweisen sowie Ziele von Nitroalkenen sind, wie z.B. NFκB (Cui T. et al. 2006, Villacorta et al. 2007). Die Wirkung der Nitroalkene erstreckt sich zudem auf eine Verringerung der Expression von Adhäsionsmolekülen, welche wichtig für Migrationsprozesse von Leukozyten sind (Hwang et al. 2009) und somit wird eine ebenfalls ein Bestandteil des arteriosklerotischen Prozesses gehemmt.

4.1. Einfluss auf die Größe von arteriosklerotischen Plaques im Bereich der Taschenklappen

Arteriosklerose ist ein Prozess, der alle Gefäße im Körper befallen kann. Mechanische oder chemische Noxen können das Endothel von Gefäßen schädigen und somit die natürliche Schutzbarriere zerstören. Im Zuge dieser Schädigung im Endothel können Leukozyten einwandern und eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen. Im weiteren Verlauf nehmen die eingewanderten Leukozyten, vor allem die Monozyten, Lipide aus dem Blutplasma auf und wandeln sich zu Schaumzellen um. Diese Läsionen wachsen mit der Zeit und können sich fibrotisch umwandeln, aufreißen und letztendlich das Gefäßlumen verschließen (Stary 1989, Stary et al. 1995, Stary 2000, Riede et al. 1989). Es ist jedoch schwierig das Ausmaß der Arteriosklerose im Körper zu quantifizieren, weil man hierzu jedes Gefäß untersuchen und die Größe der Plaques auswerten müsste. Stark arteriosklerotisch durchbaute Gebiete im Gefäßsystem sind diejenigen, in denen die höchste Blutströmung vorliegt (Ross et al. 1973).

Im Herzkreislaufsystem werden die höchsten Strömungsgeschwindigkeit und Turbulenzen im Bereich des Herzens und des Übergangs zur Aorta erreicht. In einer internationalen Regelung zur Quantifizierung der Arteriosklerose bei Mäusen wurde bestimmt, dass die Größe der arteriosklerotischen Plaques im Bereich der Taschenklappen bestimmt werden soll. Die Behandlung von Apo-E-Knockoutmäusen mit OA-NO₂ verringert signifikant die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques im Bereich der Taschenklappenebene (Abbildung 3.1.1). Die Abnahme der Arterioskleroseplaques unter der Behandlung mit OA-NO₂ im Vergleich zu normaler OA bzw. der Kontrollgruppe lässt auf antiarteriosklerotische Eigenschaften der nitrierten Ölsäure schließen. Hierbei ist ebenfalls zu beachten, dass reine Ölsäure keine Induktion der Arteriosklerosebildung mit sich bringt. In Abbildung 3.1.2 ist bereits mikroskopisch erkennbar, dass unter dem Einfluss von OA-NO₂ die Plaquegröße kleiner ist als in den beiden anderen Gruppen. Zudem ist hier ebenfalls erkennbar, dass unter dem Einfluss von OA keine eindeutig größeren Plaques entstehen als unter der Kontrollgruppe. Die Wirkung von OA-NO₂ lässt sich durch eine direkte Interaktion mit Hilfe einer Michael-Reaktion erklären, wobei die Anlagerung an vielen verschiedenen nukleophilen Molekülen erfolgen kann. Die Anlagerung ist jedoch reversibel und der funktionale Komplex bleibt lediglich über einen kurzen Zeitraum erhalten (ca. 1h nach Freeman et al.). Die Reaktion ist relativ unspezifisch, weil eine große Vielzahl von antiinflammatorischen Transkriptionsfaktoren elektrophile Zielgruppen besitzen. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass OA-NO₂ eine Vielzahl von Bestandteilen des arteriosklerotischen Prozesses beeinflusst und über diese antiarteriosklerotische Effekte hervorruft. Wichtige Teilschritte des arteriosklerotischen Prozesses sind die Einwanderung der Monozyten/Makrophagen in das Endothel und die Aufnahme von Lipiden, vor allem oxLDL, aus dem Blutserum. Die Einwanderung von den Leukozyten erfolgt unter Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie z.B. VCAM und ICAM, die eine Verknüpfung zwischen Endothel und Leukozytenoberfläche herstellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass OA-NO₂ die Ausprägung von diesen Adhäsionsmolekülen verringert und somit den Migrationsprozess der Leukozyten stört (T.K. Rudolph et al. 2010, Cui T. et al. 2006). Die Zahl, der an auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Adhäsionsmoleküle nimmt unter dem Einfluss von OA-NO₂ ab und verringert somit die Haftung der Zellen. Ein denkbarer zugrundliegender Mechanismus wäre eine Modifizierung von Transkriptionsfaktoren, die für die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen verantwortlich sind, durch direkte Einwirkung von OA-NO₂ über eine Michael-Addition. Folglich wären die proinflammatorischen Signalkaskaden im Zellkern der Leukozyten vermindert und letztendlich die Synthese von Adhäsionsmolekülen verringert. Hierbei wäre jedoch noch zu ergründen, in wie fern tatsächlich der OA-NO₂ in vivo eine Leukozytenmigration beeinflusst und ob und in welchem Maß dies eine Rolle für die Arteriosklerose spielt. In diesem Zusammenhang steht ebenfalls eine Regulierung des MCP-1 (Monocyte chemotactic protein -1) (Cui et al.2007). Dieser Faktor dient als Chemokin für Monozyten und fördert Aktivierung und Migration in das Entzündungsareal (T.K. Rudolph et al. 2010, Ugucioni et al. 1995).

Eine verringerte Aktivität würde einhergehen mit einer konsekutiven Verringerung der Monozytenmigration. Auf diese Weise würde OA-NO₂ die potentielle Zahl an lipidbeladenen Makrophagen im Bereich der Plaques reduzieren und somit die Menge an Schaumzellen beeinflussen. In Abbildung 3.2.1, 3.2.2 und 3.3.1 zeigt sich, dass unter dem Einfluss von OA-NO₂ die Ausbildung von Schaumzellen verringert wird. Diese Gegebenheit spricht dafür, dass OA-NO₂ Einfluss auf die Makrophagenaktivierung besitzt. MCP-1, genauso wie IL-1 und TNF α , ist zudem ein Bestandteil der Entzündungsreaktion und wird durch proinflammatorische Mediatoren wie LPS getriggert (Cui et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass OA-NO₂ die Aktivität dieser Mediatoren reduziert und somit die Entzündungsreaktion supprimiert (Cui et al. 2007). Der Einfluss von OA-NO₂ auf MCP-1 wurde ebenfalls im ApoE-Modell beobachtet (T.K. Rudolph et al. 2010). Die Aufrechterhaltung und Förderung der Entzündungskaskade sind weitere bedeutende Schritte im Entstehungsprozess der Arteriosklerose nach Ross. Proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 und TNF α werden von Endothelzellen im geschädigten Gefäßabschnitt produziert und bewirken eine Aktivierung von Leukozyten im Blut sowie die Ausschüttung von weiteren Wachstums- und Entzündungsfaktoren (Raines et al. 1989, Old 1985, Libby et al 1989), wobei die Signalkaskade der Inflammationsreaktion sehr komplex und vielfältig ist. Aufgrund der elektrophilen Eigenschaften ist die nitrierte Ölsäure in der Lage mit Cystein-Resten eines Moleküls eine Bindung einzugehen (Nitroalkylation, Batthyany et al. 2006). NF κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, welcher Bestandteil der Signalkaskade in der Aktivierung von vielen proinflammatorischen Zytokinen und somit auch an der Regulierung der Inflammationsreaktion beteiligt ist (Gosh et al. 1998), darunter zählen auch IL-1, MCP-1 und TNF α sowie Adhäsionsmoleküle wie VCAM- 1 (Gosh et al. 1998). NF κ B liegt inaktiv im Zytoplasma vor und wandert nach Phosphorylierung und Aktivierung in den Zellkern. Dabei besteht das aktivierte NF κ B aus einem Heterodimer (p65 und p50) (Gosh et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von NF κ B mit Hilfe von elektrophilen Substanzen durch eine Modifizierung an Cysteinresten verringert werden kann (Strauss et al. 2000). Gosh et al. 1998 haben gezeigt, dass OA-NO₂ die NF κ B Aktivität verringert, wobei eine Anlagerung des OA-NO₂ an die p65 Untereinheit des NF κ B erfolgt. Eine Blockierung dieses Transkriptionsfaktors führt zu einer Inhibierung der Inflammationsreaktion und letztendlich besteht somit die Vermutung, dass dies ebenfalls zu einer Verringerung der Arteriosklerose führt. Zudem reguliert NF κ B die Expression von Adhäsionsmolekülen. Es kann weiterhin spekuliert werden, dass der Effekt von OA-NO₂ auf die Adhäsionsmoleküle ebenfalls durch die Regulierung von NF κ B bedingt ist, was jedoch noch nicht konkret untersucht wurde. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Arterioskleroseprozesses ist die Einwanderung von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in den Plaquebereich sowie die erhöhte Produktion von Kollagen und Bindegewebe (Sary 1989, Sary et al. 1995, Sary 2000). Dadurch entstehen im Plaque verschiedene Veränderungen; zum einen nimmt die Größe und die damit einhergehende Einengung des Gefäßes zu, zum anderen wird der Plaque durch einen hohen Anteil an Bindegewebe stabiler gegenüber mechanischer Belastung sowie Traktionskräften (Strömung).

Nach TK. Rudolph et al. 2010 nimmt unter dem Einfluss von OA-NO₂ die Menge an glatten Muskelzellen sowie an Kollagen im Plaquebereich im Vergleich zu der Behandlung mit OA oder der Kontrollgruppe zu, womit der Plaque an Stabilität gewinnt und die Gefahr einer Ruptur abnimmt. Ein wichtiger Bestandteil des Metabolisierungsprozesses von Kollagen und anderem Bindegewebe sind Matrixmetalloproteasen. Diese Enzyme lösen die Bindegewebsstruktur der arteriosklerotischen Plaques und verringern somit seine Stabilität (Beckman et al. 1994, Gough et al. 2006). Bonacci et al. 2011 hat in einem ApoE Modell gezeigt, dass OA-NO₂ die Ausbildung von MMPs signifikant verringert. Die Regulierung findet dabei auf der Ebene der pro-MMPs sowie durch eine PPAR γ abhängige Reaktion statt. Die erhöhte Stabilität von arteriosklerotischen Plaques ist ein wichtiger protektiver Faktor vor einem akuten kompletten Gefäßverschluss, wie er z.B. bei einem akuten Myokardinfarkt beobachtet wird. Es konnte mit den Versuchen gezeigt werden, dass Mäuse, die vermehrt OA-NO₂ ausgesetzt werden, weniger Arteriosklerose ausprägen als die Kontrollgruppe oder als die Gruppe, die nur mit OA behandelt wurde. Jedoch ist noch unzureichend geklärt, welcher Schritt der Entscheidende in diesem Prozess ist und wie viel Einfluss jeder Prozess für sich auf die Entwicklung der Plaques hat. In Hinblick auf die Entzündungshypothese der Arteriosklerose nach Ross sowie die antiinflammatorische Wirksamkeit von Nitroalkenen, ist zu vermuten, dass die Inhibierung der Entzündungsreaktion eine Schlüsselrolle einnimmt, insbesondere die Reduktion von IL-1 und TNF α sowie von MCP-1. In dem Zusammenhang ist jedoch noch unzureichend geklärt, ob OA-NO₂ lediglich eine lokale Rolle im Bereich der Endothelschädigung einnimmt oder ob der antiinflammatorische Effekt auf den gesamten Organismus wirkt. In Hinblick auf eine gestörte Diapedese ist wichtig zu erfassen, ob OA-NO₂ mögliche negative Effekte auf den Organismus hat, wie z.B. eine gestörte T-Zell-Antwort.

4.2 Einfluss von OA-NO₂ auf die Schaumzellbildung

Leukozyten sind Zellen, die im Organismus die Aufgabe der Immunabwehr übernehmen und dabei in verschiedenen Geweben vorkommen, wie z.B. Blut, Milz und andere lymphatische Organe sowie im Knochenmark. Sie sind verantwortlich für die Abwehr gegen externe Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sowie spielen sie eine große Rolle bei der Destruktion von malignen Zellen. Die Leukozyten kann man in eine lymphatische und in eine myelotische Zelllinie aufteilen. Zur lymphatischen gehören die T- und B-Lymphozyten während zur myelotischen die Granulozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen sowie die Monozyten/Makrophagen gehören. Die Monozyten bilden 3-7% der Gesamtleukozyten und haben die Aufgabe körperfremdes Material zu phagozytieren sowie die erworbene Immunabwehr mittels Antigenpräsentation zu aktivieren. Die zirkulierenden Monozyten mit einer Größe von 5-20 μ m besitzen eine Lebensdauer von ca. 2-4 Tagen.

Sobald sie jedoch ins Gewebe einwandern und sich zu Makrophagen entwickeln, können sie dort Wochen überleben. Im Knochenmark entwickeln sich die Monozyten aus myelopoetischen Vorläuferzellen unter verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) oder M-CSF (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) und werden ins Blut sezerniert. Monozyten können durch geeignete Faktoren und Medien auch in vitro in Makrophagen umgewandelt werden. Die Monozyten/Makrophagen sind in der Lage, körperfremde und körpereigene Stoffe aufzunehmen und zu zerstören, wobei die Spanne von Bakterien und Pilze über Tumorzellen bis zu Metallen wie Eisen oder auch feste Kohlenstoffverbindungen reicht. Eine besondere Stellung nehmen die Makrophagen jedoch im Prozess der Arteriosklerose ein. Hierbei sind sie in der Lage, nach dem Einwandern in das Gefäßendothel oxLDL mit Hilfe von Scavenger Rezeptoren aufzunehmen. LDL wird weiterhin über den LDL-Rezeptor aufgenommen, welcher jedoch in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration von PPAR γ reguliert wird. Dabei wandeln sie sich zu Schaumzellen um und werden zu einem Bestandteil einer arteriosklerotischen Plaque und spielen somit eine wesentliche Rolle bei der Arteriosklerose. Um den direkten Effekt von OA-NO₂ auf die Lipidspeicherung in Makrophagen zu erfassen, wurden Peritoneal –und Knochenmarksmakrophagen aus Apo-E-Knockoutmäusen extrahiert und mit verschiedenen Testmedien behandelt. Es konnte gezeigt werden, OA-NO₂ mikroskopisch die Lipidspeicherung in Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen verringert, wie in den Abbildungen 3.2.1, 3.2.2 und 3.3.1 erkennbar ist. Hierbei nimmt sowohl die Menge an Lipiden in den einzelnen Makrophagen als auch die Makrophagen mit Lipidvakuolen ab. Hier ist weiterhin erkennbar, dass die Menge an lipid-beladenen Zellen unter dem Einfluss von OA in Bezug auf die Kontrollgruppe nicht sonderlich ansteigt. Ähnlich wie die Ergebnisse der Aortenschnitte, sprechen diese Ergebnisse ebenfalls dafür, dass reine Olsäure keine vermehrte Ausbildung von Schaumzellen bewirkt. Es gibt verschiedene Theorien wie genau die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen abläuft. Ein möglicher Ansatz sind Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen, welche in der Lage sind, konzentrationsunabhängig Lipide aufzunehmen und zu speichern. Es wurden bereits verschiedene Klassen von Scavenger-Rezeptoren identifiziert sowie deren Bedeutung für die Aufnahmen von oxLDL und Schaumzellbildung ergründet. Scavenger-Rezeptoren, die zur Klasse A gehören (SR-A), haben proarteriogene Eigenschaften und nehmen vermehrt oxLDL in die Makrophagen auf (Sakaguchi et al. 1998, Suzuki et al. 1997). Eine besondere Stellung nimmt weiterhin aus der Klasse B der Rezeptoren (SR-B) das proarteriogene CD36 ein, welches zusammen mit den SR-A für den Großteil der Lipidaufnahme in die Makrophagen zuständig ist (Wanaba et al. 1998). Hier könnte OA-NO₂ über eine Modifizierung der Transkriptionsfaktoren für die Scavenger-Rezeptoren wirken, diese herabregulieren und somit eine verringerte Anzahl von lipidbeladenen Makrophagen mit sich führen. Die Scavenger-Rezeptoren sind jedoch nicht für die gesamte Menge des aufgenommenen oxLDLs verantwortlich (Loughheed et al. 1996).

Ein weiterer Aufnahmemechanismus ist bedingt durch auf der Makrophagenoberfläche vorhandene Glykosaminoglykane (GAG) (Kaplan et al. 1998). Auch hier besteht theoretisch die Möglichkeit einer Modifizierung der GAGs durch das OA-NO₂ und somit Verringerung der Aufnahmen von oxLDL. In diesem Zusammenhang müsste jedoch geklärt werden, ob überhaupt und wie stark der Effekt der GAGs auf die Arteriosklerose ist. Die Umwandlung von Monozyten zu Makrophagen wird stimuliert durch M-CSF (macrophagen colony stimulating factor). oxLDL veranlasst die Sekretion von M-CSF aus Endothelzellen und somit ist es beteiligt an der Umwandlung von Monozyten zu Makrophagen (Rajavashisth et al. 1990). Weiterhin induziert das oxLDL inflammatorische Reaktionen innerhalb von Makrophagen und verstärkt die Ausschüttung von weiteren Interleukinen wie IL-1 und die Expression von Matrixmetalloproteasen. Die Aufrechterhaltung der Inflammationsreaktion sowie die vermehrte Aufnahme von oxLDL über Oberflächenrezeptoren sind für die Entstehung von Schaumzellen sowie die Anregung von weiteren Makrophagen von großer Bedeutung. Eine wichtige Stellung nimmt hierbei das sog. STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription -1) ein, welches ein Transkriptionsfaktor ist, der durch Phosphorylierung reguliert wird und anschließend in der Lage ist, mit einem weiteren Faktor zu dimerisieren. Im weiteren Verlauf wandert dieses Dimer in den Zellkern und reguliert die Transkription eines Zielgenes. Zu den Zytokinen, die den Jak/STAT-Pathway nutzen, gehören unter anderem INF γ , LPS und oxLDL (Sikorski et al. 2011). Signal Transducer and Activator of Transcription ist Bestandteil einer Signalkaskade, die an der Regulation von Entzündungsprozessen und somit an der Ausprägung und Erhaltung der Arteriosklerose beteiligt ist. Dabei gilt, je höher die Menge an phosphorylierten STAT-1 ist, desto größer ist der aktivierende Effekt auf die inflammatorische Reaktion. In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass OA-NO₂ die oxLDL-induzierte Phosphorylierung von STAT-1 verringert (Abbildung 3.4.1 und 3.4.2). Der deutlich Rückgang der Bandenschwärzung im Western Blot (Abbildung 3.4.2) unter dem Einfluss von OA-NO₂ spricht für eine geringere Menge an phosphorylierten STAT-1 und somit für eine Unterbrechung der inflammatorischen und proarteriosklerotischen Signalkaskade. Zudem zeigt sich, dass bereits bei einer eher niedrigeren Konzentration von OA-NO₂ eine starke Inhibierung vorliegt. Dies lässt vermuten, dass OA-NO₂ eine hohe inhibitorische Potenz auf STAT-1 aufweist. Vermutlich reicht bereits eine geringe Konzentration, um die Menge an pSTAT und somit den proarteriogenen Effekte signifikant zu verringern. Aus der Abbildung 3.4.1 lässt sich ableiten, dass LPS und oxLDL aufgrund der hohen Menge an pSTAT-1 starke aktivierende und somit proinflammatorische Eigenschaften aufweisen. Unter dem Einfluss von OA-NO₂ erfolgt eine signifikante Inhibierung der Wirkung von oxLDL. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus von OA-NO₂ kann in diesem Zusammenhang jedoch nur vermutet werden. Die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT-1 wird durch die Janus-Kinase durchgeführt. Ein möglicher Wirkmechanismus von OA-NO₂ kann eine direkte posttranslationale Modifizierung der Janus-Kinase oder seiner Transkriptionsfaktoren sein.

Dies würde auch zu den beobachteten Ergebnissen passen, in denen das OA-NO₂ die Menge an pSTAT signifikant verringert, jedoch bleiben die Mengen an nicht phosphorylierten STAT-1 in allen Gruppen relativ gleich, womit eine direkte Wirkung auf die Synthese von STAT-1 durch OA-NO₂ unwahrscheinlich ist (Abbildung 3.4.1). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die Aktivierung von STAT-1 unabhängig von der Janus-Kinase erfolgen kann, wobei der Mechanismus abhängig ist von Rezeptor- Tyrosin-Kinase wie z.B. EGF, IGF oder PDGF (Schapper et al. 1997). Dieser Umstand kann eine gewisse Restphosphorylierung von STAT-1 erklären, die unter der Behandlung mit OA-NO₂ auftritt. Die Unterbrechung der STAT-1 Signalkaskade hat auf die Eigenschaften von diversen proinflammatorischen Signalstoffen, wie z.B. LPS, INF γ und oxLDL Einfluss. In Hinblick auf LPS, wie bereits in der Einleitung erwähnt, verringern Nitroalkene die Synthese von weiteren proinflammatorischen Zytokinen IL-6, TNF α , MCP-1 (Cui T et al. 2006, Ichikawa et al. 2008). Das von den Zellen aufgenommene oxLDL wirkt direkt auf Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das NF κ B und steigert die DNA-Bindungsfähigkeit (Rajavashish et al. 1995). Es wurde zudem gezeigt, dass die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen teilweise unabhängig von den Scavenger-Rezeptoren ist (Manning-Tobin et al. 2009). Dabei wurde die Ausbildung der Arteriosklerose in Hinblick auf den Knockdown der Scavenger-Rezeptoren SR-A und CD36 untersucht. Diese beiden Rezeptoren sind maßgeblich an der Aufnahme von oxLDL in die Zellen beteiligt. Ein Knockdown dieser Rezeptoren, besonders des CD 36, bewirkt eine Verringerung der Ausprägung der Arteriosklerose in der Aorta descendens (Kuchibhotla et al. 2008). Dabei sind die arteriosklerotischen Plaques kleiner und stabiler, sowie entwickelt sich ein kleinerer Nekrosekern. Eine Interkalierung mit für die Rezeptorsynthese wichtigen Transkriptionsfaktoren könnte ebenfalls zu den möglichen Eigenschaften von OA-NO₂ gehören. Es hat sich in Hinblick auf die Formierung der Schaumzellen ergeben, dass Toll-Like-Rezeptoren auf den Makrophagen eine entscheidende Rolle spielen können (Nicolaou et al. 2010). Diese Rezeptoren sind beteiligt an der Ausbildung von sog. Lipidkörperchen in Makrophagen, welche verantwortlich sind für die oxLDL unabhängige Ausbildung von Schaumzellen (Nicolaou G et al. 2010). Lipidkörperchen können in verschiedensten Situation in Makrophagen gefunden werden, wie z.B. bei Entzündungsreaktionen, wo sie als Reservoir für Eikanoide fungieren, oder auch an chronischen Entzündungsprozessen (D`Avillae et al. 2008, Weibel et al. 2009).

Insgesamt haben die Versuche gezeigt, dass OA-NO₂ die oxLDL induzierte Schaumzellbildung mikroskopisch deutlich verringert. Es ist es schwierig zu sagen, an welcher Stelle genau OA-NO₂ in den Prozess eingreift, denn letzten Endes verhindert OA-NO₂ die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen bei oxLDL nicht vollständig. Hierbei ist zu beachten, dass oxLDL die Bildung von ROS intrazellulär steigert und somit auch andere Signalkaskaden wie z.B. den MAP-Kinase-Weg in Gang setzen kann (Ceècile et al. 1999). Aufgrund der komplexen Signalwege und möglichen Wechselwirkung war somit eine vollständige Inhibierung durch OA-NO₂ nicht zu erwarten.

Der Einfluss von OA-NO₂ auf die Entzündungsprozesse in den Makrophagen muss genauer analysiert werden, wobei insbesondere die Reaktionsschritte, welche mit der Aktivierung durch TLR verbunden sind, genauer evaluiert werden sollten. Obwohl dieser Reaktionsweg nicht direkt zur klassischen Theorie der Arteriosklerose nach Ross gehört, sind Erkenntnisse in diesem Bereich wichtig, um das komplette Potential der Nitroalkene zu erkennen und möglicherweise eine therapeutische Komponente zu gewinnen.

4.3 Nitrierte Ölsäure verringert die Superoxidproduktion in RAW-Makrophagen

Superoxide sind reaktive Sauerstoffverbindungen, welche aufgrund ihrer molekularen Struktur in der Lage sind, schnelle chemische Verbindungen einzugehen und hierbei vielfältige Effekte zu entfalten. Darunter zählen neben der Konformationsänderungen von Zellmembranen und Molekülen die Aktivierung von diversen Signalwegen (Rhee SG. 2006). Somit nehmen die Superoxide eine wichtige Rolle in der Inflammationsreaktion und der Abwehr von Fremdorganismen ein. Eine Reihe von Zellen ist in der Lage, Superoxide zu produzieren, dazu zählen Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten, wobei, wie bereits oben erwähnt, die Makrophagen für die Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques von großer Bedeutung sind. Die Superoxide werden zu einem großen Teil von der NADPH-Oxidase gebildet, welche durch die Aktivierung von TLR-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen reguliert wird (Kawai T et al. 2007). Die Aktivität und die Ausbildung der Superoxide hängen von der Anwesenheit von proinflammatorischen Mediatoren ab, wie z.B. LPS oder oxLDL (Park HS et al 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Superoxide im Bereich von arteriosklerotischen Plaques vermehrt vorkommen und die Entzündungsreaktion in diesem Bereich aufrechterhalten, wobei je größer ein arteriosklerotischer Plaque ist, desto größer ist auch die Menge an produzierten Superoxiden (Sorescu et al. 2002). Es stellt sich zudem die Frage, in wie fern die Eigenschaften von OA-NO₂ die Bildung sowie den Effekt der Superoxide modulieren können. Weiterhin verringern Superoxide die Stabilität der arteriosklerotischen Plaques und führen vermehrt zu akuten thrombembolischen Ereignissen (Heitzer et al. 2001). In den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass OA-NO₂ die LPS und oxLDL induzierte Superoxidproduktion signifikant verringert (Abbildung 3.5.1 und 3.61). LPS ist ein starker proinflammatorischer Mediator, der über eine TLR-abhängige Aktivierung eine vermehrte Produktion von Superoxiden bewirkt (Park et al 2004). Hierbei induziert LPS eine vermehrte Bildung von NF-κB und stimuliert somit zusammen mit den gebildeten Superoxiden die Synthese und Ausschüttung von weiteren Mediatoren wie z.B. IL-1, IL-6 und TNFα sowie die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Damit wird die Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwände erleichtert und der Prozess der Arteriosklerose beschleunigt. Zudem ist die NF-κB Aktivität zum Teil abhängig von der Menge an Superoxiden (Park et al. 2006).

Wie bereits oben erwähnt, verringert OA-NO₂ die LPS induzierte Aktivierung von NF-κB sowie die Bildung weiterer Zytokine. Jedoch konnte noch nicht eindeutig ein direkter Zusammenhang zwischen der OA-NO₂-bedingten Suppression von NF-κB und der Menge an Superoxiden gezeigt werden. Ein möglicher Mechanismus könnte die Blockierung von Transkriptionsfaktoren sein, welche durch die Aktivierung von TLR-Rezeptoren (insbesondere von TLR 4) vermehrt gebildet werden. Zudem steigern Nitroalkene die Expression von Hämoxxygenase um ein Vielfaches (Brusko et al. 2005, Durante 2002, Nakao et al. 2005). Die Hämoxxygenase besitzt ausgeprägte antioxidative Eigenschaften und verringert die Menge der Superoxide, indem sie diese vorzeitig abfängt und umwandelt. Ein direkter Zusammenhang zwischen der OA-NO₂ induzierten Hämoxxygenase und einer Verringerung der Superoxidproduktion bleibt jedoch vorerst spekulativ. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Regulation der Superoxid-Dismutase, die für den Abbau der Superoxide verantwortlich ist. OA-NO₂ könnte durch eine Modifizierung der Transkriptionsfaktoren einen positiven Effekt auf dieses Enzym haben. In den Ergebnissen zeigt sich zudem, dass die Superoxidproduktion in der OA-NO₂/LPS-Gruppe ähnlich hoch ist wie die in der Kontrollgruppe. Somit lässt sich vermuten, dass OA-NO₂ beinahe die komplette LPS-abhängige Produktion inhibiert. Neben dem LPS ist oxLDL ebenfalls ein potenter Induktor der Superoxidbildung. Es sammelt sich in den arteriosklerotischen Plaques an und lagert sich dabei an Makrophagen und Endothelzellen an, welche im Zuge dieser chronischen Entzündungsreaktion vermehrt Superoxide bilden (Yun et al. 2009), wobei der Mechanismus abhängig von einer TLR-4 abhängigen Stimulation von Nox2, einem Hauptbestandteil der NADPH-Oxidase, ist (Bae et al. 2009). Nox2 benötigt für eine erfolgreiche Aktivierung die Rekrutierung von Proteinkinase C, welche wiederum durch die Phospholipase C induziert wird (Bae et al. 2009). Das oxLDL induziert eine TLR-4 assoziierte Tyrosinkinase, welche die Phospholipase C phosphoryliert und sie damit aktiviert. Eine mögliche Wirkweise von OA-NO₂ könnte eine Veränderung des Enzymprofils sein. Dabei kann OA-NO₂ die Transkriptionsfaktoren eines dieser Enzyme modifizieren und damit die Signalkaskade unterbrechen. Coles et al 2002 haben gezeigt, dass LNO₂ die Superoxidproduktion innerhalb von Granulozyten verringern. Hierbei haben sie jedoch festgestellt, dass die Zusammensetzung und Menge der NADPH-Oxidase durch die Nitroalkene nicht direkt verändert wird. Zudem bewirkt oxLDL, wie bereits erwähnt, die Ausschüttung von weiteren proinflammatorischen Zytokinen (Bae et al. 2009), welche wiederum eine Steigerung der Superoxidproduktion im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion verursachen können. OA-NO₂ verringert hierbei die Ausprägung von verschiedenen Entzündungsmediatoren und hemmt damit die Superoxidproduktion. In den Ergebnissen zeigt sich, dass die oxLDL abhängige Superoxidproduktion unter dem Einfluss von OA-NO₂ sich auf dem gleichen Niveau bewegt, wie bei der Kontrollgruppe, jedoch ist sie deutlich höher als beim Leerwert (ohne Zellen). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass das OA-NO₂, die oxLDL induzierte Superoxidproduktion fast komplett inhibiert. Die Kontrollgruppe zeigt einen deutlichen Anstieg der Extinktion im Vergleich zum Leerwert.

Als mögliche Ursache könnte eine Grundproduktion an Superoxiden vorliegen, die sich auch mit OA-NO₂ nicht inhibieren lässt, wie im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der oxLDL/OA-NO₂ - Gruppe ersichtlich ist. Eine andere Ursache für die erhöhte Extinktion ist, dass Zellbestandteile bzw. andere Substanzen, die von den Zellen abgegeben werden und womöglich mit dem Cytochrom C reagieren, einen Anstieg der Extinktion bewirken. Im zeitlichen Verlauf von 1 Stunde zeigt sich beim Leerwert lediglich ein minimaler Anstieg der Extinktion, während bei der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied erkennbar wird. Dieser Verlauf zeigt sich sowohl in den LPS als auch in den oxLDL Versuchsreihen. In den Ergebnissen zeigte sich weiterhin, dass LPS und oxLDL die Superoxidproduktion in einem ähnlichen Verhältnis steigern. Somit kann vermutet werden, dass beide Entzündungsmediatoren eine ähnliche Potenz zur Induktion von Superoxiden besitzen. Hierbei ist zu untersuchen, in wie fern OA-NO₂ tatsächlich ein Effekt auf die Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen besitzt oder ob der Effekt erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Reaktionskaskade eintrifft. Insgesamt bleibt ungeklärt, welcher Prozess der Entscheidende für die Wirkung des OA-NO₂ auf die Superoxidproduktion ist. Jede Verringerung der Superoxidbildung hat zur Folge, dass die Inflamationsreaktion gebremst sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verringert wird. Coles et al 2002 haben gezeigt, dass LNO₂ die Superoxidproduktion innerhalb von Granulozyten verringern.

4.4 Zusammenfassung und Zukunftsausblick

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass nitrierte Ölsäure über verschiedene antiinflammatorische Eigenschaften verfügt und signifikant die Effekte von oxLDL und LPS auf den arteriosklerotischen Prozess verringert. Zudem reduziert OA-NO₂ die Superoxidproduktion, welche ebenfalls eine Komponente der Inflamationsreaktion ist. Der genaue Mechanismus der Inhibierung ist bis jetzt noch nicht bis ins Detail verstanden, wobei dieser vermutlich zu einem großen Teil von der posttranslationalen Modifikation von Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Jedoch um ein exaktes Wirkprofil zu erhalten, bedarf es weiterer Forschung insbesondere auf DNA Ebene sowie der genauen Identifizierung der Transkriptionsfaktoren, die Targets von OA-NO₂ sind. Insgesamt verhält sich OA-NO₂ im Körper wie ein Signalstoff, welcher in der Lage ist, durch eine reversible posttranslationelle Modifizierung von Transkriptionsfaktoren und anderen Botenstoffen temporärer Effekte zu erzielen. Zudem kommt OA-NO₂ im Körper selbst vor. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich ein großes Potential von OA-NO₂ ableiten, um in Zukunft für therapeutische Ziele eingesetzt zu werden. Dabei könnte die nitrierte Ölsäure als Bestandteil einer antiinflammatorischen Therapie zum Einsatz kommen oder auch bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung als Nahrungsergänzungsmittel an Stelle von normalen Fettsäuren eingesetzt werden. Neben den klassischen Schwierigkeiten wie Verträglichkeit, Kurzzeit – und Langzeitnebenwirkungen sowie Dosierung ist die Darreichungsform ein zentrales Problem. Nitroalkene sind hoch energetische Verbindungen und weisen im Körper lediglich eine kurze Halbwertszeit auf. In den Mäuseexperimenten wurde das Problem mit Hilfe einer Minipumpe umgangen, die kontinuierlich Nitroalkene abgegeben hat. Um einen therapeutischen Effekt zu erreichen, müsste eine stabile Konzentration über einen längeren Zeitraum im Organismus vorhanden sein. Zudem eignen sich Nitroalkene nicht zur Anwendung als Brat- und Speisefette, weil unter dem Energieeinfluss der Brathitze sofort die Nitrogruppe abgespalten wird und somit die eigentlichen Eigenschaften verloren gehen. Um festzustellen in wie fern die antiinflammatorischen Effekte der Nitroalkene als anti-arteriosklerotische Substanz geeignet sind, müssen im Vorfeld die Einflüsse auf weitere Bestandteile des Immunsystems, wie z.B. Lymphozyten und Antikörperbildung ergründet werden. Alternativ könnte eine Substanz eingesetzt werden, die im Körper selbst eine Bildung von Nitroalkenen anregt und eine bessere Handhabung aufweist, als die Nitroalkene selbst. Nitrierte Fettsäuren zeigen insgesamt großes theoretisches Potential, welches jedoch zuerst in eine praktische Anwendungsform gebracht werden muss.

5. Quellenverzeichnis

5.1. Literaturverzeichnis

- Arthur Michael (1887).** "Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren". *Journal für Praktische Chemie* 35 (1): 349–356
- Arthur Michael (1894).** "Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäther zu den Aethern ungesättigter Säuren". *Journal für Praktische Chemie* 49 (1): 20–29
- Anslyn, E. V., and Dougherty, D. A. (2006)** *Modern Physical Organic Chemistry*, University Science Books, Sausalito, CA
- Babior BM.** NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:42– 47.
- Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI.** Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res.* 2009 Jan 30;104(2):210-8, 21p following 218.
- Baker LM, Baker PR, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R, Freeman BA.** Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):31085-93.
- Baker PR, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LM, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA.** Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem.* 2005 Dec 23;280(51):42464-75.
- Baker PR, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA.** Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 10;101(32):11577-82
- Balazy, M., Iesaki, T., Park, J. L., Jiang, H., Kaminski, P. M., and Wolin, M. S.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 299, 611–619
- Ball RY, Stowers EC, Burton JH, et al.** Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995; 114:45–54.
- Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R., Duran, R., Baker, L. M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B. P., and Freeman, B. A.** *J. Biol. Chem.* (2006) 281, 20450–20463

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(4):1620-4.
- Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR.** Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994; 375:81– 88.
- Bedard K, Krause KH.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87: 245–313.
- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM.** Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 2002;105:293–296.
- Berger CA, Beeuwkes R:** Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 66:41G-43G, 1990.
- Bevilacqua, M. P.:** "Endothelial-leukocyte adhesion molecules." *Annual Review of Immunology* 11(1993): 767-804
- Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G., Cecconi, O.:** "Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease." *Annual Review of Medicine* 45(1994): 361-378
- Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, Rudolph TK, Rudolph V, Khoo NK, Kelley EE, Freeman BA.** Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *J Biol Chem.* 2011 May 6;286(18):16074-81.
- Bostrom K, Watson KE, Stanford WP, et al:** Atherosclerotic calcification: Relation to developmental osteogenesis. *Am J Cardiol* 75:88B-91B, 1995.
- Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusis AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL.** A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2002 May 17;277(20):17415-27.
- Brusko TM, Wasserfall CH, Agarwal A, Kapturczak MH, Atkinson MA.** An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5181-6
- C.K. Glass, J.L. Witztum.** Atherosclerosis: the road ahead, *Cell* 104 (2001) 503–516.
- Carlos, T. M., Harlan, J. M.:** "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." *Blood* (1994) 84 : 2068-2101

- Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95. Review.
- Castro L, Eiserich JP, Sweeney S, Radi R, Freeman BA.** Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. *Arch Biochem Biophys.* 2004 Jan 1;421(1):99-107.
- Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM 3rd.** Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol.* 1989;142:1963–1959.
- Cathcart MK.** Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:23–28.
- Cécile Mazieère*, Gulie Alimardani, Franc°oise Dantin, Franc°oise Dubois, Marie-Alix Conte, Jean-Claude Mazieère.** Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species *FEBS Letters* 448 (1999) 4952
- Cernuda-Morollón E, Pineda-Molina E, Cañada FJ, Pérez-Sala D.** 15-Deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF-kappaB-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit. *J Biol Chem.* 2001 Sep 21;276(38):35530-6. Epub 2001 Jul 20.
- Chen G, Goeddel DV.** "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science* (2002);296 (5573): 1634–5.
- Coles B, Bloodsworth A, Clark SR, Lewis MJ, Cross AR, Freeman BA, O'Donnell VB.** Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ Res.* 2002 Sep 6;91(5):375-81.
- Coles B, Bloodsworth A, Eiserich JP, Coffey MJ, McLoughlin RM, Giddings JC, Lewis MJ, Haslam RJ, Freeman BA, O'Donnell VB.** Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):5832-40.
- Crowther MA.** Pathogenesis of Atherosclerosis *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:436-41.
- Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PR, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP, Agarwal A, Freeman BA, Chen YE.** Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem.* 2006 281:35686–35698
- D'Avila H, Maya-Monteiroa CM, Bozza PT.** Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:1308–1315.

- Degen SJ, Davie EW.** "Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin". *Biochemistry* (September 1987) 26 (19): 6165–77.
- Dikalova A, Clempus R, Lassegue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK.** Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation*. 2005;112:2668 –2676
- Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, Clinton Webb R, Lee ME, Nabel GJ, Nabel EG.** Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med*. 2001 Jun;7(6):693-8.
- Durante W.** Carbon monoxide and bile pigments: surprising mediators of vascular function. *Vasc Med*. 2002 Aug;7(3):195-202.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A.** Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):393-7.
- Faggitto, A., Ross, R. &Harker, L.** *Arteriosclerosis* 4, 323-340 (1984)
- Faggitto, A., Ross, R.** *Arteriosclerosis* 4, 341-356 (1984)
- Falk E, Fernandez-Ortiz A:** Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 75:5B-11B, 1995.
- Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I.** A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *American Journal of Pathology*. 1988 Feb;130(2):393-400.
- Freeman BA, Baker PR, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A, d'Ischia M. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, et al:** Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. *Circulation* 82 (suppl II) :47-59, 1990.
- Funk JL, Feingold KR, Moser AH, et al.** Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis* 1993; 98:67–82.
- Gallon, A. A.; Pryor, W. A.** The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids* 29:171–176; 1994.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB.** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.

- Gimbrone MA Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI.** Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;598:77-85.
- Gimbrone MA Jr.** Culture of vascular endothelium. *Prog Hemost Thromb.* 1976;3:1-28.
- 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 Jan;76(1):333-7.
- Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW.** Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 2006;116:59–69.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494–501.
- Guzik TJ, West NE, Black E, et al.** Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 2000;86:E85–E90.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al.** Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:2673–2678
- Herkert O, Djordjevic T, BelAiba RS, Gorlach A.** Insights into the redox control of blood coagulation: role of vascular NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:765–776.
- Hwang J, Lee KE, Lim JY, Park SI.** Nitrated fatty acids prevent TNF α -stimulated inflammatory and atherogenic responses in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 2;387(4):633-40
- Ichikawa T, Zhang J, Chen K, Liu Y, Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA, Chen YE, Cui T.** Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: a critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):4086-94. Epub 2008 May 8.
- Ishikawa K, Sugawara D, Wang Xp, Suzuki K, Itabe H, Maruyama Y, Lusis AJ.** Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in ldl-receptor knockout mice. *Circ Res.* 2001 Mar 16;88(5):506-12.
- Jain RK.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93.
- Joachim Rassow, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann** „Duale Reihe Biochemie“ Thieme Stuttgart 2006
- Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Matsuda T, Nakayama K, Harada M.** The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *Int Immunol* 16:1173–1179 (2004)

- Kaplan M, Williams JK, Mandel H, Aviram M.** Role of macrophage glycosaminoglycans in the cellular catabolism of oxidized LDL by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:542–53.
- Kawai T, Akira S.** TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007;19:24 –32.
- Klagsbrun M, Edelman ER.** Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors. Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989 May-Jun;9(3):269-78.
- Krzysztof Sikorski, Stefan Chmielewski, Lukasz Przybyl, Uwe Heemann, Joanna Wesoly, Marcus Baumann and Hans A. R. Bluysen.** STAT1-mediated signal integration between IFN γ and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C1337-C1344, 2011. First published 23 February 2011
- Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, et al.** Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 2008; 78:185–196.
- Lee, C. H., and Evans, R. M.** *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 331–335 (2002)
- Leon ML, Zuckerman SH.** Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 2005;54:395–411
- Leonard EJ, Yoshimura T.** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 1990;11:97-101.
- Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF.** Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003;42:997–1003
- Libby P, Friedman GB, Salomon RN.** Cytokines as modulators of cell proliferation in fibrotic diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Oct;140(4):1114-7.
- Libby P, Friedman GB, Salomon RN.** Cytokines as modulators of cell proliferation in fibrotic diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Oct;140(4):1114-7.
- Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA .** Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol*. 1986 Aug;124(2):179-85.
- Lima, E. S., Di Mascio, P., Rubbo, H., and Abdalla, D. S.** *Biochemistry* 41, 10717–10722 (2002)
- Lougheed M, Steinbrecher UP.** Mechanisms of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol Chem* 1996; 271:11738–805

- Luscinskas, F. W., Gimbrone, M. A.:** "Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment." *Annual Review of Medicine* 47 : 413-421 (1996)
- Maines MD.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:517-54.
- Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, et al.** Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:19–26
- Marx, N., Duez, H., Fruchart, J. C., and Staels, B.** *Circ. Res.* 94, 1168–1178 (2004)
- Masuda, J. & Ross, R.** *Arteriosclerosis* 10, 164-177 (1990)
- Masuda, J. & Ross, R.** *Arteriosclerosis* 10, 178-187 (1990)
- McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA.** IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9589–9594 (2005)
- Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL.** Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2003;278:1561–1568.
- Möller M, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A.** Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2005 Mar 11;280(10):8850-4.
- Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB, Kimizuka K, Liu F, Bach FH, Billiar TR, Choi AM, Otterbein LE, Murase N.** Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant.* 2005 Feb;5(2):282-91.
- Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al.** Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-90.
- Napolitano, A.; Camera, E.; Picardo, M.; d'Ischia, M.** Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: formation and structural characterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy, and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1, 3-pentadiene products. *J. Org. Chem.* 65:4853–4860; 2000.
- Nicolaou G, Erridge C.** Toll-like receptor-dependent lipid body formation in macrophage foam cell formation. *Curr Opin Lipidol.* 2010 Oct;21(5):427-33.

- O'Donnell, V. B.; Eiserich, J. P.; Chumley, P. H.; Jablonsky, M. J.; Krishna, N. R.; Kirk, M.; Barnes, S.; Darley-USmar, V. M.; Freeman, B. A.** Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.* 12:83–92; 1999.
- O'Donnell, V. B.; Freeman, B. A.** Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ. Res.* 88:12–21; 2001.
- Old LJ.** Tumor necrosis factor (TNF). *Science.* 1985 Nov 8;230(4726):630-2
- Orbe J, Rodriguez JA, Arias R, Belzunce M, Nespereira B, Perez-Illarbe M, Roncal C, Paramo JA.** Antioxidant vitamins increase the collagen content and reduce MMP-1 in a porcine model of atherosclerosis: implications for plaque stabilization. *Atherosclerosis.* 2003;167:45-53
- Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS.** Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;72:447–455.
- Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS.** Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;173:3589–3593..
- Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D.** A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb;86(3):1046-50.
- Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, McCord JM, Freeman BA, Radi R.** Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J Biol Chem.* 2001 Apr 13;276(15):11631-8.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D.** Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2995-8.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA.** Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991 Mar 5;266(7):4244-50.
- Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A.** Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. biophys.* 288:481–487; 1991
- Raines EW, Dower SK, Ross R.** Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science.* 1989 Jan 20;243(4889):393-6.
- Raines EW, Ross R.** Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences. *J Cell Biol.* 1992 Jan;116(2):533-43.

- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al.** Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254-7.
- Rajavashish, T.B., Yamada, H. and Mishra, N.K.** (1995) *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 1591-1598.
- Rhee SG.** Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312:1882–1883.
- Riede, U., Schaefer, H. and Wehner, H.** *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag (1989)
- Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D.** Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol.* 1992 Feb;140(2):291-300.
- Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H.** Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science*. 1990 May 25;248(4958):1009-12.
- Ross, R.:** "The pathogenesis of atherosclerosis - an update." *New England Journal of Medicine* 314 : 488-500 (1986)
- Ross, R.:** "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* 362: 801-809(1993)
- Ross, R., Glomset, J. A.:** "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell." *Science* 180: 1332-1339 (1973)
- Ross, R., Raines, E. W., Bowen-Pope, D. F.:** "The biology of platelet-derived growth factor. " *Cell* 46 : 155-169 (1986)
- Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL.** "Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively". *Somat. Cell Mol. Genet.* 13 (3): 285–92 (May 1987)
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A.** Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269:26066–26075; 1994.
- Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, Franek A, Pekarova M, Khoo NK, Hasty AH, Baldus S, Freeman BA.** Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 May;30(5):938-45.

- Rudolph V, Schopfer FJ, Khoo NK, Rudolph TK, Cole MP, Woodcock SR, Bonacci G, Groeger AL, Golin-Bisello F, Chen CS, Baker PR, Freeman BA.** Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem.* 2009 Jan 16;284(3):1461-73
- Sakaguchi, H., Takeya, M., Suzuki, H., Hakamata, H., Kodama, T., Horiuchi, S., Gordon, S., van der Laan, L. J., Kraal, G., Ishibashi, S., Kitamura, N., Takahashi, K.** Role of macrophage Scavengerreceptors in diet-induced atherosclerosis in mice. (1998) *Lab. Invest.* 78, 423–434.
- Sassa S.** Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IXalpha, and carbon monoxide? *Antioxid Redox Signal.* 2004 Oct;6(5):819-24.
- Schaper, F., Siewert, E., Gomez-Lechon, M.J., Gatsios, P., Sachs, M., Birchmeier ., W., Heinrich, P.C. and Castell, J.** (1997) *FEBS Lett.* 405, 99^103.
- Schopfer FJ, Baker PR, Giles G, Chumley P, Batthyany C, Crawford J, Patel RP, Hogg N, Branchaud BP, Lancaster JR Jr, Freeman BA.** Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):19289-97.
- Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E., and Freeman, B. A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2340–2345 (2005)
- Schopfer FJ, Cole MP, Groeger AL, Chen CS, Khoo NK, Woodcock SR, Golin-Bisello F, Motanya UN, Li Y, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Rudolph TK, Rudolph V, Bonacci G, Baker PR, Xu HE, Batthyany CI, Chen YE, Hallis TM, Freeman BA** Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem.* 2010 Apr 16;285(16):12321-33.
- Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R.** A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell.* 1985 Nov;43(1):277-86.
- Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK.** Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation.* 2002 Mar 26;105(12):1429-35.
- Springer TA.** Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990 Aug 2;346(6283):425-34
- Stary, H.** Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 9 (Suppl.I), I19-I32. (1989).

- Stary, H.** Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions, An Update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 1177-1178. (2000).
- Stary, H., Chandler, A. and Glagov, S.** A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Arterioscl, Thromb.* 14, 840-856. (1994).
- Stary, H., Chandler, A., Dinsmore, R., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M., Schwartz, C., Wagner, W. and Wissler, R.** A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol.* 15, 1512-1531. (1995).
- Statistisches Bundesamt.** Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht (2009).
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK.** 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4844-9.
- Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP.** Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:17489-94.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Horiuchi, S., Takahashi, K., Kruijt, J.K., van Berkel, T. J. C., Steinbrecher, U. P., Ishibashi, S., Maeda, Gordon, S., Kodama, T.** A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. (1997) *Nature* 386, 292–296
- T. Cui, F.J. Schopfer, J. Zhang, K. Chen, T. Ichikawa, P.R. Baker, C. Batthyany, B.K. Chacko, X. Feng, R.P. Patel, A. Agarwal, B.A. Freeman, Y.E. Chen.** Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35686–35698.
- Tellides G, Tereb DA, Kirkiles-Smith NC, Kim RW, Wilson JH, Schechner JS, et al.** Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature* 2000;403:207–11.
- Tsikis D, Zoerner AA, Jordan J.** Oxidized and nitrated oleic acid in biological systems: Analysis by GC-MS/MS and LC-MS/MS, and biological significance. *Biochim Biophys Acta* . 2011, 2177-1665
- Trostchansky A, Rubbo H.** Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic Biol Med.* 2008 Jun 1;44(11):1887-96.

- Ulrich Welsch**, Lehrbuch Histologie, Sobotta 2006, 2. Auflage
- Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M.** Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol.* 1995 Jan;25(1):64-8.
- Vendrov AE, Hakim ZS, Madamanchi NR, Rojas M, Madamanchi C, Runge MS.** Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2714-21.
- Vendrov AE, Madamanchi NR, Hakim ZS, Rojas M, Runge MS.** Thrombin and NAD(P)H oxidase-mediated regulation of CD44 and BMP4-Id pathway in VSMC, restenosis, and atherosclerosis. *Circ Res.* 2006;98:1254–1263.
- Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen XL, Freeman BA, Chen YE, Cui T.** Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H770–H776.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P.** "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death Differ.* 10 (1): 45–65 (2003).
- Watanabe, K., Ohta, Y., Toba, K., Ogawa, Y., Hanawa, H., Hirokawa, Y., Kodama, M., Tanabe, N., Hirono, S., Ohkura, Y., Nakamura, Y., Kato, K., Aizawa, Y., Fuse, I., Miyajima, S., Kusano, Y., Nagamoto, T., Hasegawa, G., Naito, M.** Myocardial CD36 expression and fatty acid accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency. (1998) *Ann. Nucl. Med.* 12, 261–266
- Wang, N., Verna, L., Chen, N. G., Chen, J., Li, H., Forman, B. M., and Stemerman, M. B.** *J. Biol. Chem.* 277, 34176–34181 (2002).
- Weibel GL, Joshi MR, Wei C, et al.** 15(S)-Lipoxygenase-1 associates with neutral lipid droplets in macrophage foam cells: evidence of lipid droplet metabolism. *J Lipid Res* 2009; 50:2371–2376.
- Wright MM, Schopfer FJ, Baker PR, Vidyasagar V, Powell P, Chumley P, Iles KE, Freeman BA, Agarwal A.** Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 14;103(11):4299-304.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM.** Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991 Feb 22;64(4):841-8.
- Ye Q, Chen Y, Lei H, et al.** Inflammatory stress increases unmodified LDL uptake via LDL receptor: an alternative pathway for macrophage foam-cell formation. *Inflamm Res* 2009; 58:809–818.

- Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D.** Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989 Oct;84(4):1086-95.
- Yun Soo Bae, Jee Hyun Lee, Soo Ho Choi, Sunah Kim, Felicidad Almazan, Joseph L. Witztum and Yury I. Miller.** Macrophages Generate Reactive Oxygen Species in Response to Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein: Toll-Like Receptor 4_ and Spleen Tyrosine Kinase_Dependent Activation of NADPH Oxidase 2 *Circ. Res.* 2009;104;210-218
- Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L, Lee PJ.** Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest.* 2006;116:3050 –3059.

5.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.2.1 :** **Welsch Sobotta Lehrbuch Histologie 2.A.,** Seite 236 © 2011 Elsevier GmbH www.studentconsult.de
- Abbildung 1.2.2:** <http://files.forensicmed.webnode.com/200000097-3992c3a8cb/atherosclerosis%20progression.PNG> (Stand: 10.10.2011)
- Abbildung 1.2.3.1:** **RUSSEL ROSS (1993).** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, a review article. Nature 362, 801 - 809
- Abbildung 1.2.3.2:** **RUSSEL ROSS (1993).** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, a review article. Nature 362, 801 - 809
- Abbildung 1.3.1.1:** **BRUCE A. FREEMAN, PAUL R. S. BAKER, FRANCISCO J. SCHOPFER, STEVEN R. WOODCOCK, ALESSANDRA NAPOLITANO and MARCO D'ISCHIA (2008).** Nitrofatty acid formation and signaling. JBC vol. 283 pp. 15515-15519
- Abbildung 1.3.2:** **ANDRÉS TROSTCHANSKY, HOMERO RUBBO (2008).** Nitrated fatty acids: Mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. Free Radical Biology & Medicine 44 pp. 0891-5849, modifiziert nach Gallon et al. 1994, O'Donnell et al. 1999, O'Donnell et al. 2001
- Abbildung 1.3.3:** **VOLKER RUDOLPH, FRANCISCO J. SCHOPFER, NICHOLAS K. H. KHOO, TANJA K. RUDOLPH, MARSHA P. COLE, STEVEN R. WOODCOCK, GUSTAVO BONACCI, ALISON L. GROEGER, FRANCA GOLIN-BISELLO, CHEN-SHAN CHEN, PAUL R. S. BAKER, and BRUCE A. FREEMAN (2009).** Nitro-fatty Acid Metabolome: Saturation, Desaturation, β -Oxidation, and Protein Adduction. JBC vol. 284, NO. 3, pp. 1461–1473
- Abbildung 1.3.4.1:** Michael-Addition, nach der Vorlage von Laura M. S. Baker, Paul R. S. Baker, Franca Golin-Bisello, Francisco J. Schopfer, Mitchell Fink, Steven R. Woodcock, Bruce P. Branchaud, Rafael Radi, and Bruce A. Freeman Nitro-fatty Acid Reaction with Glutathione and Cysteine
- Abbildung 1.3.4.2:** http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/ba/JAK-STAT-Signaltransduktion_nach_EPO-Bindung.png/400px-JAK-STAT-Signaltransduktion_nach_EPO-Bindung.png (Stand: 10.10.2011)

Abbildung 1.4.1.2: **BATTY E, JENSEN K, FREEMONT P (2009).** PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Frontiers in Bioscience* vol. 14 pp. 1182-1196

5.3. Abkürzungsverzeichnis

ApoE	Apolipoprotein E	M-CSF	Monocytes stimulating factor
BCA	Bicinchoninsäure	M-CSF	macrophagen colony stimulating factor
bFGF	basic fibroblast growth factor	MMP	Matrixmetalloproteasen
BSA	Bovines Serum Albumin	MnSOD	Mangan-assoziierten Superoxiddismutase
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	mRNA	Messenger Ribonucleic acid
CAT	Katalase	MRP-1	multiple drug restitance proten-1
CD 36	Cluster of differentiation 36	NaCl	Natriumchlord
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat	NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
CoA	Coenzym A	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphate
DMEM	Dulbecco`s Modified Essential Medium ohne Phenolrot	NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cell
DMSO	Dimethylsulfooxid	NO2	Stickstoffdioxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	OA-NO2	Nitrierte Ölsäure
ECL	Enzymatische Chemoluminescence	OMM	Outer mitochondrial membrane
EDTA	Diethylen - Diamin – Tetraessigsäure	oxLDL	Oxidized low density Lipoprotein
EGF	Epithelial growth factor	pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
EPO	Erythropoetin	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
E-Selektin	Endotheliales Selektin	PDGF	platlet derived growth factor
ESL-1	Endothelial selectine ligand 1	Penstrep	Penicillin/Streptomycin
FBS	Fetales bovines Serum	PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor

QUELLEN

Foam cells	Schaumzellen	P-Selektin	Plättchen Selektin
GAG	Glycosamineglycanes	pSTAT	Phosphoryliertes STAT
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	ROS	Reactive oxygen species
GSH	Glutathion	SDS)	Natriumdodecylsulfat
HO-1	Hämoxygenase 1	SOD	Superoxiddismutase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	SR	Scavenger Receptor
IGF-1	insulin like growth factor 1	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
IL-x	Interleukin-x	TBS	Tris-buffered saline
IMM	Internal mitochondrial membrane	TGFβ	transforming growth factor β
INFγ	Interferon γ	TLR	Toll like receptor
INFγ	Interferon γ	TNFα	Tumornekrosefaktor α
JAK	Janus-Kinase	VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
Keap-1	Kelch-like ECP-associated protein-1	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
LDL	Low density lipoprotein	VLA-4	very late activation antigen 4
LNO2	Nitrierte Linolsäure		
LPS	Lipopolysaccharide		
MCP-1	Monocytes chemotactic protein 1		

6. Publikationen

Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, **Franek A**, Pekarova M, Khoo NK, Hasty AH, Baldus S, Freeman BA. *Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 May; 30(5):938-45.

7. Danksagung

Ich möchte diese Seite nutzen, um allen zu danken, die direkt oder indirekt an dem Erarbeiten dieser Doktorarbeit beteiligt waren.

In erster Linie möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Diese standen zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat an meiner Seite und halfen mir nicht nur bei der Ausarbeitung meiner Doktorarbeit, sondern auch viele wichtige Entscheidungen und Probleme in meinem Leben zu lösen.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Baldus bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Doktorarbeit am Institut für experimentelle Kardiologie an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Tanja Rudolph für die sehr interessante Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung sowie die Möglichkeit, mit meiner Arbeit ein Teil eines großen Forschungsprojektes und einer Publikation zu werden. Sie war zu jeder Zeit an meiner Seite und half mir, für alle Probleme, die bei der Durchführung der Doktorarbeit aufgetreten sind, eine adäquate Lösung zu finden.

Weiterer Dank gilt dem Laborteam der experimentellen Kardiologie, welches bei der technischen Durchführung der Versuche zu jeder Zeit mir eine große Stütze war.

Darüber hinaus danke ich Michaela Pekarova, die mir maßgeblich bei der Superoxidmessung geholfen hat.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: