

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
Abteilung Angiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

---

# Die Wirkung von Niacin und Nicotinamid auf Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques

---

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Markus Fendler  
aus Oldenburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schober, PD Dr. Michael Lehrke

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Jan Peter Kuhlencordt

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Atherosklerose . . . . .	1
1.1.1	Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2	Entstehung atherosklerotischer Läsionen . . . . .	1
1.2	Die Bedeutung von oxidativem und nitrosativem Stress . . . . .	5
1.2.1	Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) . . . . .	5
1.2.2	Reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies (RNOS) . . . . .	7
1.3	Niacin und Nicotinamid . . . . .	9
1.4	Zielsetzung . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>13</b>
2.1	Technische Geräte . . . . .	13
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	14
2.3	Reagenzien . . . . .	14
2.4	Software . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Zellkultur . . . . .	17
3.1.1	Kultivieren . . . . .	17
3.1.2	Einfrieren . . . . .	17
3.1.3	Auftauen . . . . .	17
3.1.4	Splitten . . . . .	17
3.1.5	Mikroskopie . . . . .	18
3.2	Stimulation . . . . .	18
3.3	Migration . . . . .	18
3.3.1	Prinzip . . . . .	18
3.3.2	Tag I . . . . .	19
3.3.3	Tag II . . . . .	20
3.3.4	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	20
3.3.5	Statistische Auswertung . . . . .	20

---

3.4	Molekulargenetische Analysen . . . . .	20
3.4.1	RNA-Isolation . . . . .	20
3.4.2	cDNA-Synthese . . . . .	21
3.4.3	Qualitative PCR . . . . .	21
3.4.4	Gelelektrophorese . . . . .	23
3.4.5	Quantitative Real-Time-PCR . . . . .	23
3.5	Durchflusszytometrie . . . . .	24
3.5.1	Prinzip . . . . .	24
3.5.2	FACS . . . . .	25
3.6	Statistische Analysen . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
4.1	Ausschluss eines Effekts von Ethanol auf die Makrophagenmigration . .	27
4.2	Bedeutung von ROS für Makrophagenmigration . . . . .	28
4.2.1	Auswirkung von Sin-1 auf Makrophagenmigration . . . . .	28
4.2.2	Auswirkung von 15(s)-HPETE auf Makrophagenmigration . . .	30
4.3	Bedeutung von Niacin und Nicotinamid für Makrophagenmigration . .	32
4.3.1	Auswirkung auf Migration . . . . .	32
4.3.2	Auswirkung auf iNOS-Expression . . . . .	36
4.3.3	Auswirkung auf Apoptose . . . . .	38
4.4	Rolle von Antioxidantien . . . . .	39
4.4.1	Auswirkung von Trolox auf Makrophagenmigration . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>55</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>56</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Rolle von Makrophagen in der Atherogenese . . . . .	3
1.2	Rolle von oxLDL in der Atherogenese . . . . .	4
1.3	Bildung von ROS . . . . .	8
1.4	Niacin und Nicotinamid . . . . .	9
1.5	Effekte von Niacin auf Zellen in atheroklerotischen Plaques . . . . .	10
3.1	Boyden Chamber Assay . . . . .	19
4.1	Einfluss von Ethanol auf die Makrophagenmigration . . . . .	28
4.2	Migration mit Linsidomin (Sin-1) . . . . .	29
4.3	Ergebnisse der Migration mit Linsidomin (Sin-1) . . . . .	30
4.4	Ergebnisse der Migration mit 15(s)-HPETE . . . . .	31
4.5	Ergebnisse der Migration mit Niacin und Nicotinamid ohne Zugabe anderer Stimulanzen . . . . .	33
4.6	Migration mit oxLDL und Niacin und Nicotinamid . . . . .	34
4.7	Ergebnisse der Migration mit oxLDL und Niacin/Nicotinamid . . . . .	36
4.8	Qualitative PCR . . . . .	37
4.9	Real-Time-PCR mit der Kernversuchsanordnung . . . . .	38
4.10	Durchflusszytometrie mit PI- und Annexin-V-Färbung . . . . .	39
4.11	Migration mit oxLDL und Trolox . . . . .	40
4.12	Ergebnisse der Migration mit oxLDL und Trolox . . . . .	41



# Tabellenverzeichnis

3.1	Mastermix für die qualitative PCR . . . . .	22
3.2	Primersequenzen von iNOS und $\beta$ -Actin . . . . .	22
3.3	Protokoll der qualitativen iNOS-PCR . . . . .	23
3.4	Mastermix für die quantitative RT-PCR . . . . .	24
4.1	Versuchsaufbau für die Migration mit Linsidomin (Sin-1) . . . . .	29
4.2	Versuchsaufbau für die Migration mit 15(s)-HPETE . . . . .	31
4.3	Versuchsaufbau für den Kontrollversuch . . . . .	32
4.4	Versuchsanordnung des Kernversuchs . . . . .	34
4.5	Versuchsanordnung für die Migration mit Trolox . . . . .	40



# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

### 1.1.1 Epidemiologie

Durch den medizinischen Fortschritt und die damit einhergehende Alterung der Bevölkerung kam es im vergangenen Jahrhundert zu einer Verschiebung der Todesursachen von übertragbaren zu nicht-übertragbaren Erkrankungen. Atherosklerose und die daraus resultierenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen seitdem in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar [Lim et al., 2012, Lozano et al., 2012].

Diverse Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes Mellitus, Adipositas, Alter u.v.m. führen in betroffenen Gefäßabschnitten zu Stenosen, schlimmstenfalls zu Verschlüssen oder, im Falle einer Aneurysmabildung, zu Rupturen. Durch die zunächst meist unbemerkte Progression der chronisch-entzündlichen Prozesse in der Gefäßwand kommt es zu folgenreichen Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, Niereninsuffizienz, Aneurysmen und peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Kommt es zu einer Destabilisierung der Plaquekappe, droht eine Plaqueruptur mit der Gefahr von akut lebensbedrohlichen thrombembolischen Komplikationen wie Myokardinfarkt und zerebralen Ischämien [Yao et al., 2013].

Laut einer Statistik des Global Health Observatory der WHO starben im Jahr 2008 ca. 17 Millionen Menschen an den Folgen von Atherosklerose, wobei Männer stets häufiger betroffen sind als Frauen [World Health Organization, 2011].

Auch zukünftig ist zu erwarten, dass Infektionskrankheiten nicht nur in der westlichen Hemisphäre, sondern weltweit für weniger Todesfälle verantwortlich sein werden. Die Folgen der Atherosklerose hingegen werden sozioökonomisch weiterhin eine wachsende Rolle spielen und die Todesursachenstatistik anführen [Mathers Loncar, 2006].

### 1.1.2 Entstehung atherosklerotischer Läsionen

Die Atherosklerose ist eine progrediente Systemerkrankung der arteriellen Gefäßwände, die durch eine Einlagerung von Lipiden, Entzündungszellen und fibröser extrazellulärer Matrix (EZM) in die Intima mittlerer und großer Arterien charakterisiert ist.

Bei der Entstehung der Atherosklerose hat sich die *response-to-injury*-Hypothese durchgesetzt, die besagt, dass die endotheliale Dysfunktion bei der Auslösung atherosklerotischer Läsionen eine entscheidende Rolle spielt [Ross Glomset, 1976]. Diese endotheliale Dysfunktion wird durch o.g. Risikofaktoren und nicht-laminare Strömungsverhältnisse und die daraus resultierenden Scherkräfte verursacht, wie sie an Bifurkationen und Kaliberveränderungen von Gefäßen anzutreffen sind [Gimbrone Jr., 1999].

Die Fähigkeit des Endothels, Stickstoffmonoxid (NO) zu produzieren, das eine Vasodilatation herbeiführt und sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) hemmt, ist herabgesetzt [Lusis, 2000]. Zudem erhöht sich in Gebieten dysfunktionalen Endothels die Gefäßpermeabilität, was zu einer vermehrten Infiltration von LDL in das Subendothel führt [Gimbrone Jr., 1999]. Diese an Apolipoprotein-B gekoppelten Lipoproteine werden daraufhin in der Intima retiniert und akkumulieren [Skalen et al., 2002]. Lokale aktivierte vasculäre Zellen können über verschiedene Signalwege, wie den 12/15-Lipoxygenase- [Cyrus et al., 1999] [Steinberg, 1999], den Myeloperoxidase- [Carr et al., 2000] und den Nicotinamiddinukleotidphosphat-Signalweg (NADPH-Signalweg) [Navab et al., 2004], das akkumulierte LDL in der subendothelialen Matrix oxidieren. Das oxidierte LDL (oxLDL) trägt zu einer Endothelzellaktivierung bei [Furnkranz et al., 2005], welche wiederum proinflammatorische Zytokine, wie das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), und Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Selektine, *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), exprimieren [Lusis, 2000].

Der begonnene inflammatorische Prozess wird nun durch eine Thrombozytenaggregation unterhalten: An Stellen der Endothelzellläsionen wird u.a. das EZM-Protein von-Willebrand-Faktor (vWF) exponiert, woran die Blutplättchen mit ihrem Adhäsions-Rezeptor-Glykoprotein GPIb/IX/V binden. Nach stabiler Adhäsion und Interaktion mit weiteren Thrombozyten über eine Vielzahl von Rezeptoren und Liganden sezernieren die nunmehr aktivierten Blutplättchen eine Reihe proinflammatorischer Substanzen, darunter *Cluster of Differentiation-40-Ligand* (CD40L), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und *platelet derived growth factor* (PDGF) [Gawaz et al., 2000, Collins Cybulsky, 2001, Ruggeri, 2002, Gawaz et al., 2005].

Durch die voranschreitende Entzündung und diverse Chemokine, wie *chemokine ligand-5* (CCL-5 = RANTES: *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*) und MCP-1, kommt es zu einer Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten aus der Blutbahn [Conti DiGiacchino, 2001, von Hundelshausen et al., 2005]. Diese binden zunächst locker über P- und E-Selektine und haften daraufhin fest über Adhäsionsmoleküle (VLA-4 (very late antigen-4), VCAM-1 und ICAM-1) der Endothelzelloberfläche

an [Hwang et al., 1997, Dong et al., 1998, Luscis, 2000]. Ein Gradient des im Subendothel gebildeten MCP-1 führt schließlich zu einer Migration (siehe auch Abb. 1.1) der Monozyten über das Endothel in die Intima [Gu et al., 1998, Hansson, 2005].

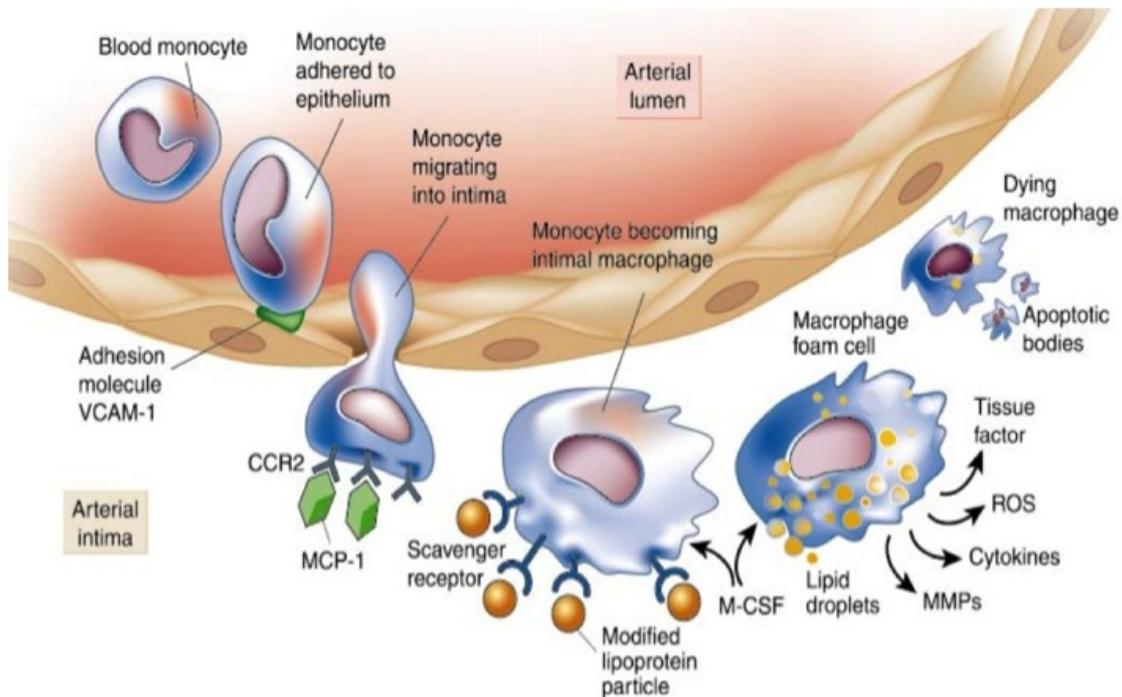


Abbildung 1.1: **Rolle von Makrophagen in der Atherogenese:** Über Chemokine ange lockt werden Monozyten aus der Blutbahn rekrutiert. Diese binden fest an Adhäsionsmoleküle (u.a. VCAM-1) und migrieren entlang eines MCP-1-Gradienten durch das Endothel. In der Intima werden die Monozyten mittels M-CSF zu Proliferation und Ausdifferenzierung zu Makrophagen angeregt und phagozytieren oxidativ modifiziertes LDL über verschiedene Scavenger-Rezeptoren. Die entstehenden Schaumzellen produzieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie proinflammatorische Zytokine und unterhalten den Entzündungsprozess damit weiter. Schließlich gehen sie zugrunde, wodurch wiederum neue Makrophagen ange lockt werden – ein Teufelskreis. [Aus: Libby P, 2002]

Das in den Endothelzellen gebildete Zytokin M-CSF regt die Monozyten zur Proliferation und zur Differenzierung zu Makrophagen an. Diese exprimieren an ihrer Oberfläche u.a. die Scavenger-Rezeptoren SR-A (*scavenger receptor-A*) und Cluster of Differentiation 36 (CD36), welche die Aufnahme von oxLDL vermitteln [Podrez et al., 2000, Manning-Tobin et al., 2009]. Da die Phagozytose von oxLDL durch die Makrophagen keiner negativen Rückkopplung unterliegt, entstehen mit Lipiden und Cholesterin überladene Makrophagen, sog. Schaumzellen (siehe Abb. 1.2), die für die früheste Form der atherosklerotischen Läsion, den *“fatty streaks“*, charakteristisch sind [Ross, 1999].

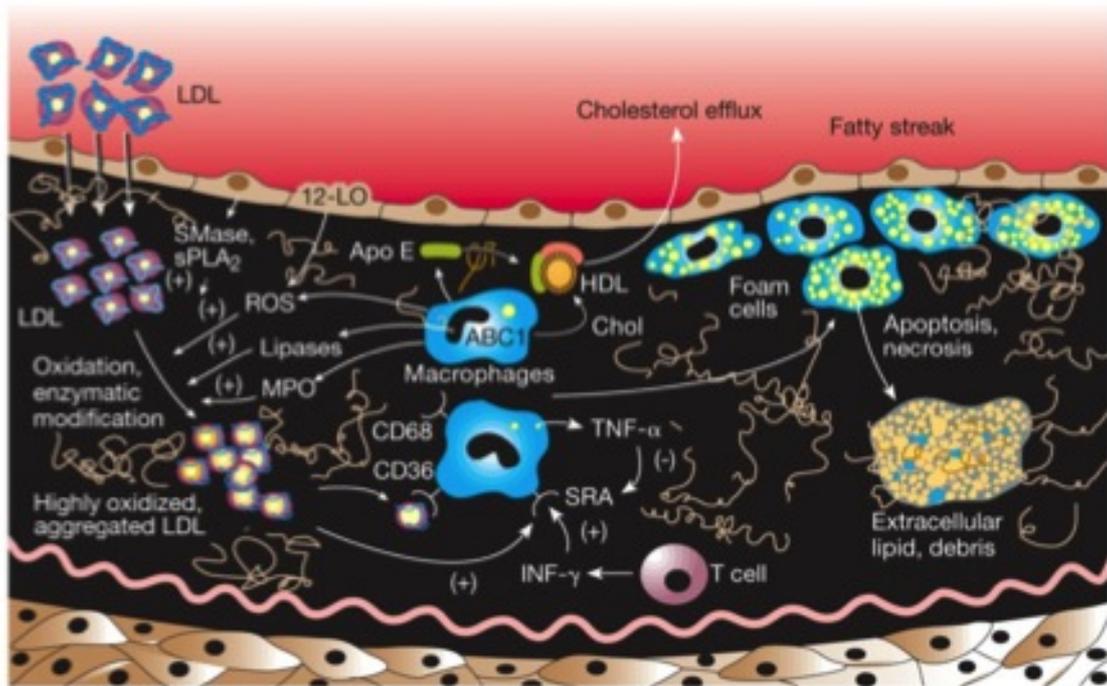


Abbildung 1.2: **Rolle von oxLDL in der Atherogenese:** LDL infiltriert die Intima und wird durch reaktive ROS und verschiedene Signalwege, darunter der Myeloperoxidase-Signalweg (MPO), oxidativ verändert. Dieses oxLDL wird von Makrophagen u.a. über CD-36 und SR-A phagozytiert. Die entstehenden Schaumzellen können in gewissem Maße Apolipoprotein E sezernieren, das einen Teil des exzessiv aufgenommenen Cholesterins exportiert. Dennoch gehen die Schaumzellen mehrheitlich zugrunde und es entsteht eine wachsende Menge extrazellulärer Lipide und Detritus – das „necrotic core“. [Aus Lusis AJ, 2000]

Während Makrophagen, die Pathogene internalisiert haben, in der Regel in regionale Lymphknoten emigrieren, stehen Schaumzellen aufgrund einer FAK-vermittelten (*focal adhesion kinase*) Aktinpolymerisation unter einem Migrationsarrest: sie sind unfähig, den atherosklerotischen Plaque zu verlassen [Angeli et al., 2004, Park et al., 2009, Park et al., 2012].

Diverse Zytokine, v.a. das von den Thrombozyten ausgeschüttete PDGF und der *transforming growth factor-β* (TGF-β), bewirken eine Aktivierung glatter Muskelzellen der Media, die daraufhin in die intimale Läsion einwandern, proliferieren und in großem Maße extrazelluläre Matrixkomponenten (v.a. Kollagene, Glykoproteine) bilden [Libby, 2002].

Zwei Faktoren tragen nunmehr zu einem Wachstum des atherosklerotischen Plaques und der Bildung einer „fibrösen Kappe“ bei: Zum einen die Einwanderung glatter Muskelzellen in die Intima und ihre vermehrte Produktion von EZM, zum anderen die allmählich absterbenden Schaumzellen, die ihren Inhalt freigeben und in einer Art Teu-

felskreis weitere Makrophagen anlocken. Unter der bindegewebigen Kappe entsteht ein lipidreicher Kern, das sog. "*necrotic core*" (Abb. 1.2). Während der Plaque zunächst in Richtung Adventitia wächst, wird mit zunehmender Größe und Kalzifizierung das Lumen des betroffenen Gefäßes eingeengt und bei Plaqueruptur ggf. sogar thrombotisch verschlossen [Proudfoot et al., 1998, Lusis, 2000].

Ein weiterer möglicher Grund für eine schnelle Progression eines Plaques ist das Einreißen neu gebildeter Mikrogefäße im Plaque mit einer konsekutiven Einblutung, die jedoch klinisch inapparent verlaufen kann [de Boer et al., 1999].

## 1.2 Die Bedeutung von oxidativem und nitrosativem Stress

Als oxidativen Stress bezeichnet man eine Dysbalance zwischen oxidierenden und reduzierenden Substanzen mit Überwiegen der Oxidantien und vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Gu et al., 2013]. Dagegen wird unter nitrosativem Stress eine Stoffwechsellage verstanden, bei der analog vermehrt reaktive Stickstoffspezies (RNS) gebildet werden. Er gilt als Sonderform des oxidativen Stresses und wird in Literatur oft nicht separat genannt, da oxidativer Stress meist mit nitrosativem Stress einhergeht. Auch in dieser Arbeit wird der Einfachheit halber nur der Begriff „oxidativer Stress“ und entsprechend ROS verwendet, auch wenn gleichermaßen „nitrosativer Stress“ und RNS gemeint sind.

Oxidativer Stress spielt eine Schlüsselrolle bei der Alterung des Menschen und bei nahezu sämtlichen degenerativen Erkrankungen, darunter auch Atherosklerose [Ngo et al., 2013]. Ihm steht ein Netzwerk antioxidativer Mechanismen im Körper entgegen, das unter physiologischen Bedingungen ROS abfängt und unschädlich macht. Zu den sog. Antioxidantien zählen sowohl Enzyme wie Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion, Glutathion-Peroxidase und Katalase, als auch alimentäre Antioxidantien, zu welchen Vitamin C und E und Glutathion-Vorläuferstufen zählen [Cuzzocrea et al., 2001].

Kommt es allerdings zu einer chronisch erhöhten ROS-Produktion oder gelingt es den Regulationsmechanismen aus anderen Gründen nicht mehr, die Wirkung der reaktiven Spezies zu kompensieren, spricht man von oxidativem Stress.

### 1.2.1 Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS)

Gegen Ende der 80er Jahre wurde der *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) von Furchgott und Moncada als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert. Im menschlichen Organismus entsteht NO aus der Aminosäure L-Arginin und  $O_2$ . Diese reagieren zu NO und Citrullin unter katalytischer Wirkung von NO-Synthasen und NADPH als Co-Substrat (Abb. 3, S. 8). Da NO nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von

Neuronen, Makrophagen, Fibroblasten und vielen anderen Zellen synthetisiert wird, lassen sich analog mehrere Isoformen dieses Enzyms identifizieren [Forstermann, 1994, Forstermann Sessa, 2012]:

Zu den konstitutiv exprimierten Isoformen (cNOS) zählt man die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III) und die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), welche beide calciumabhängig exprimiert werden. Eine dritte Isoform, die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II), wird unter physiologischen Bedingungen nicht, bzw. nur in minimalen Mengen exprimiert. Im Rahmen einer Immunantwort wird die Expression der calciumunabhängigen iNOS unter dem Einfluss von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), von Scherkräften oder durch Hypoxie induziert [Nathan Xie, 1994, Bogdan, 2001, Ozawa et al., 2004].

Während die eNOS geringe Mengen an NO produziert, das in den arteriellen Gefäßen Funktionen wie Vasodilatation und Thrombozytenaggregationshemmung erfüllt, katalysiert die iNOS die Bildung weit höherer NO-Konzentrationen (nanomolarer statt picomolarer Bereich). Diese hohen Konzentrationen an NO wirken über verschiedene Mechanismen zytotoxisch und dienen dadurch dem Abtöten intrazellulärer Pathogene [Widdison et al., 2007], wobei eine Schädigung gesunder Zellen in der Umgebung in Kauf genommen wird.

Bis heute ist unklar, welche Bedeutung die NO-Synthasen in der Atherogenese spielen: Einerseits wird angenommen, dass eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO eine Schlüsselrolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielt, andererseits weiß man, dass eine stark erhöhte NO-Produktion (z.B. durch iNOS-Expression) das Fortschreiten der Atherosklerose begünstigt. Neben einer verminderten eNOS-Expression, die wiederum zu einer verminderten NO-Synthese führt, reagiert bereits synthetisiertes NO mit O $_2$  $\cdot$  zu Peroxynitrit. Zudem bildet die eNOS selbst ROS, wenn ein Mangel an Ko-Substraten wie L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin vorliegt. So trägt die eNOS unter bestimmten Bedingungen selbst zur Entstehung von oxidativem Stress bei, obwohl sie physiologischerweise durch eine moderate NO-Produktion eine anti-atherogene Funktion ausübt [Cai Harrison, 2000].

Die stark erhöhte NO-Synthese durch die inflammatorisch induzierte iNOS-Expression führt ihrerseits zu einer vermehrten Bildung von Peroxynitrit, was die Atherogenese gleichermaßen fördert [Chauhan et al., 2003].

Es steht fest, dass die NO-Synthasen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Progression von Atherosklerose spielen.

### 1.2.2 Reaktive Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies (RNOS)

Unter reaktiven Stickstoff- bzw. Sauerstoffspezies (reactive nitrogen oxide species) fasst man sowohl reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als auch reaktive Stickstoffspezies (RNS) zusammen.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen physiologischerweise im Körper, u.a. in Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung oder in Entzündungszellen, um Erreger abzutöten. In geringen Konzentrationen spielen ROS auch eine Rolle als Signalmoleküle, während höhere Konzentrationen dieser chemisch aggressiven Sauerstoffmetabolite Zellschädigungen hervorrufen können [Lum Roebuck, 2001], indem sie Proteine, Lipide und DNA oxidieren.

Zu den ROS gehören freie Radikale als auch stabile Moleküle (Auswahl):

- $O_2^{\cdot-}$       Hyperoxid-Anion (früher: Superoxid-Anion)
- $OH^{\cdot}$         Hydroxyl-Radikal
- $ROO^{\cdot}$        Peroxylradikal
- $RO^{\cdot}$         Alkoxyradikal von Lipiden
- $H_2O_2$       Wasserstoffperoxid
- $ROOH$       Hydroperoxid

Zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS) zählt man u.a.  $NO^{\cdot}$  und Peroxynitrit ( $^-$ ), wobei letzteres eine hochreaktive Spezies darstellt, die zu den schädigsten biologischen Verbindungen überhaupt zählt [Nash et al., 2012].

Durch das freie Elektron besitzt  $NO^{\cdot}$  Radikalcharakter und reagiert v.a. in oxidativer Umgebung mit  $O_2^{\cdot-}$  zu Peroxynitrit (Abb. 1.3). Es wird also in Umgebungen gebildet, wo sowohl  $NO$ , als auch  $O_2^{\cdot-}$  in großen Mengen entstehen. Dies ist v.a. unter proinflammatorischen Bedingungen der Fall, was die Funktion von  $ONOO^-$  als Zellgift erklärt [Kim et al., 2001].

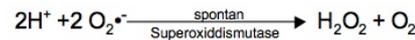
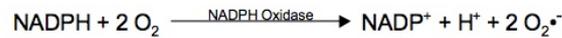
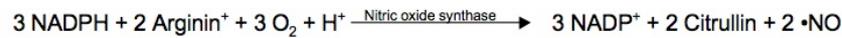


Abbildung 1.3: **Bildung von ROS:** NO wird unter katalytischer Wirkung von NOS aus Arginin synthetisiert. Es reagiert mit  $\text{O}_2^{\cdot -}$  zu Peroxynitrit. [Aus Formann HJ Torres M, 2001]

Bislang wurde bereits bei einer Fülle von Erkrankungen eine Beteiligung von ROS nachgewiesen. Auch in der Atherosklerose spielen sie eine entscheidende Rolle:

Im Zentrum steht hier die Oxidierung von LDL zu oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL), das über Scavenger-Rezeptoren, neben SR-A und CD36 auch vom *lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1* (LOX-1), von Makrophagen internalisiert wird [Steinbrecher et al., 1984]. ROS besitzt die Fähigkeit, die Expression von LOX-1 zu induzieren. Umgekehrt produzieren Zellen, an deren LOX-1 oxLDL gebunden ist, vermehrt ROS – es besteht ein positiver Feedback-Mechanismus [Cominacini et al., 2000, Gu et al., 2013].

Eine Sonderstellung nimmt das Hydroperoxid-Anion ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) ein: Neben seiner Reaktion mit NO zu  $\text{ONOO}^-$  kann es die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) in den Endothelzellen induzieren [Aoki et al., 1997, Chiu et al., 1997, Tummala et al., 2000], die den Monozyten aus der Blutbahn die Anheftung an das Endothel ermöglichen und damit eine Schlüsselrolle in der Entstehung atherosklerotischer Plaques spielen. Ein weiterer Effekt von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  und des daraus durch Disproportionierung entstehenden  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist die Aktivierung der Myosin-Kinase, die wiederum das Myosin in den Endothelzellen phosphoryliert und deren Kontraktilität steigert. Durch die gesteigerte Permeabilität des Endothels können nun mehr Monozyten in das Subendothel einwandern und die Atherosklerose wird verstärkt [Garcia et al., 1995, Liu Sundqvist, 1995, Zhao Davis, 1998, Lagrange et al., 1999, Wood et al., 2000].

### 1.3 Niacin und Nicotinamid

Die Nicotinsäure (Niacin) ist ein wasserlösliches Vitamin aus dem B-Komplex, früher auch als Vitamin B3 bekannt. Das Amid der Nicotinsäure wird als Nicotinsäureamid oder Nicotinamid bezeichnet (Abb. 1.4). Um Verwechslungen zu vermeiden wird die Nicotinsäure in dieser Arbeit als Niacin, das Amid als Nicotinamid bezeichnet.

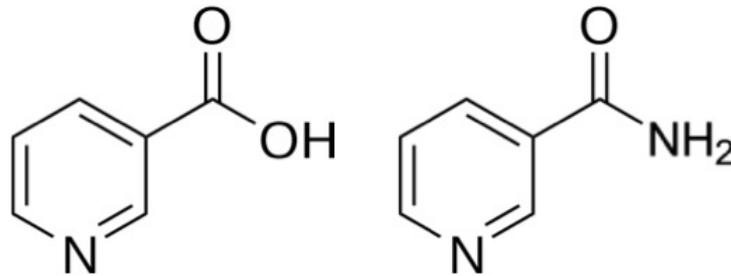


Abbildung 1.4: **Niacin (links) und Nicotinamid (rechts)**: Im Zentrum steht bei beiden Molekülen ein Pyridinring, an dem beim Niacin eine Carboxygruppe, beim Nicotinamid eine Carbamoylgruppe hängt.

In den 40er Jahren wurde die biochemische und physiologische Wirksamkeit dieser Moleküle entdeckt (Wooley, 1947): Als Bestandteil der Co-Enzyme Nicotinamiddinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und  $\text{NADP}^+$  (reduzierte Form:  $\text{NADH}$  und  $\text{NADPH}$ ) sind sie in Form von Redoxreaktionen in nahezu sämtliche Stoffwechselprozesse des menschlichen Organismus eingebunden. Des Weiteren spielt der  $\text{NADPH}$ -Weg eine wichtige Rolle in der Oxidierung von LDL in atherosklerotischen Plaques (s. 1.1.2).

Bald nach der Erkenntnis der physiologischen Wirksamkeit fand v.a. Niacin einen Platz in der Pharmazie: Es wurde in pharmakologischen Dosierungen bei Hyperlipidämie zur Senkung von VLDL, LDL und Lp(a) (Lipoprotein a) verwendet und zeichnet sich unter den Lipidsenkern durch eine starke (bis zu 25%ige) Erhöhung des HDL-Cholesterins aus [Altschul et al., 1955, Villines et al., 2012].

Die Senkung der Lipoproteine mit geringer Dichte beruht auf der Interaktion von Niacin und GPR109A (*G-protein-coupled receptor 109A*), einem von zwei Niacinrezeptoren des menschlichen Organismus (auch: *niacin receptor 1*,  $\text{HCA}_2$ ). Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor findet sich vor allem in Adipozyten und hemmt über einen cAMP-Signalweg (cAMP = Zyklisches Adenosinmonophosphat) die Hormon-sensitive Lipase (HSL). Durch weniger freie Fettsäuren im Blut fehlt der Leber Substrat für die Triglyceridsynthese, wodurch wiederum ein geringerer Spiegel „schlechter“ Lipoproteine („non-HDL-cholesterol“) resultiert [Carlson, 1963, Soga et al., 2003, Tunaru et al., 2003, Zhang et al., 2005, van der Hoorn et al., 2008, Kuhnast et al., 2013].

Der Effekt des HDL-Anstiegs ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Van der Hoorn

et al. zeigten 2008 allerdings, dass die Senkung der Expression von Cholesterinester-Transferprotein (CETP) eine entscheidende Rolle spielt: CETP überträgt Cholesterinester von HDL auf (V)LDL und wirkt somit pro-atherogen. Es kommt zu einer erhöhten Lipidierung von Apolipoprotein-A1 (ApoA1) und zu erhöhten HDL-Spiegeln [van der Hoorn et al., 2008].

Obwohl Niacin somit die Fähigkeit hat, zwei unabhängige Risikofaktoren für Atherosklerose zu beeinflussen (hohes LDL, tiefes HDL), lagen bis vor Kurzem keine Endpunktstudien vor, die eine Senkung kardiovaskulärer Ereignisse oder der Sterblichkeit belegen. Erst 2013 wurde eine Meta-Analyse veröffentlicht, die belegt, dass Niacin die Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse senkt und zudem suggeriert, dass diese Senkung nicht nur auf dem Lipidprofil-modifizierendem Effekt beruht, sondern ihm auch andere Mechanismen zugrunde liegen [Lavigne Karas, 2013].

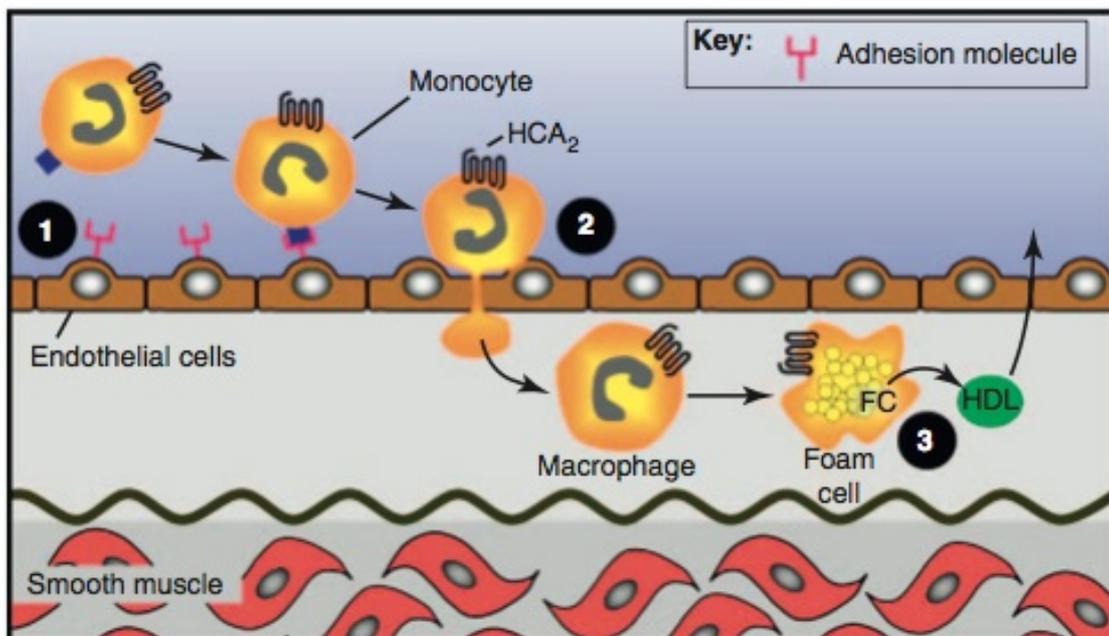


Abbildung 1.5: **Effekte von Niacin auf Zellen in atherosklerotischen Plaques:** (1) Niacin inhibiert die Expression von VCAM-1 (Adhäsionsmolekül) und MCP-1. Durch Bindung an den Niacin-Rezeptor HCA<sub>2</sub> (GPR109A) hat Niacin sowohl einen Effekt (2) auf das Migrationsverhalten als auch (3) auf den Cholesterin-Export von Schaumzellen. [Aus Lukasowa M, 2011]

Diese antiatherogenen Effekte sind derzeit Mittelpunkt der Niacin-Forschung: Holzhauser et al. berichteten 2011, dass Niacin die Entzündungsreaktion in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques hemmt [Holzhauser et al., 2011]. Zudem kann Niacin die endotheliale Funktion verbessern, was, wie in 1.1.2 beschrieben, der Ausgangspunkt

für Atherogenese ist, und die Expression u.a. von VCAM-1 (Abb. 1.5) und MCP-1 herabsetzen [Wu et al., 2010, Wu et al., 2012]. Die Fähigkeit über den Einbau von ABCA 1 und ABCG 1 A (*ATP binding cassette transporter A und G*) in die Zellmembran von Makrophagen bzw. Schaumzellen ermöglicht zudem einen umgekehrten Cholesteroltransport aus den Zellen (Abb. 1.5) heraus [Lukasova et al., 2011]. Durch Bindung an ApoA1 entsteht HDL, das das Cholesterin wiederum zur Leber transportiert.

Bemerkenswert ist, dass sich der von Lavigne et al. propagierte Nutzen einer Niacin-Therapie vor allem in Studien mit einer Niacin-Monotherapie und Placebo als Kontrolle zeigt. Die umstrittene AIM-HIGH-Studie (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes), die einen zusätzlichen Nutzen von Niacin in Kombination mit Statinen in Frage stellt [Michos et al., 2012], wurde jüngst durch die HPS2-THRIVE-Studie (Heart Protection Study 2 Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events) untermauert (HPS Thrive Collaborative Group, 2013). Diese stellte fest, dass eine Kombination von Statinen mit Niacin im Vergleich zu einer Statin-Monotherapie keine Reduktion des Risikos schwerwiegender kardiovaskulärer Ereignisse brachte. Hingegen war die Inzidenz schwerwiegender nichttödlicher Nebenwirkungen signifikant höher. In der Konsequenz wurde das Präparat Tredaptive<sup>®</sup> (das mittlerweile einzige Niacin-haltige Medikament in Deutschland) Anfang 2013 vom Markt genommen.

Obwohl Nicotinamid als direktes Derivat von Niacin gleichsam in eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen eingebunden ist, nimmt es in der derzeitigen Forschung und in der Pharmakologie nur eine Nebenrolle ein. Anders als Niacin hat es keine Lipidprofil-modifizierende Wirkung [Jaconello, 1992] und wird lediglich als apothekenpflichtig vertrieben. Derzeit werden u.a. Anwendungsmöglichkeiten in der Prävention/Therapie von Alzheimer-Demenz und aktinischer Keratose geprüft [Green et al., 2008, Surjana et al., 2012].

## 1.4 Zielsetzung

Patienten mit Atherosklerose haben ein stark erhöhtes Risiko, an kardiovaskulären Ereignissen zu versterben. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung und Progression dieser systemischen Gefäßkrankheit ist die Dys- und Hyperlipoproteinämie.

Aus diesem Grund erhalten Risikopatienten eine Lipid-modifizierende Therapie mit Statinen. Diese Cholesterinsynthese-Hemmer gehören zur Standardmedikation in der Behandlung von Herz-Kreislaufferkrankungen und führen zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse um bis zu 25-45% [Blumenthal Michos, 2009]. Dennoch bleibt ein nicht unerhebliches Risiko für die Patienten bestehen und mit der Kombination von

Statinen mit anderen Wirkstoffgruppen wird versucht, dieses Restrisiko zu minimieren.

Niacin hat sich bislang als „Fettsenker“ der besonderen Art einen Namen gemacht. In den letzten Jahren häufen sich jedoch die Hinweise, dass das Vitamin aus dem B-Komplex noch weitere anti-atherogene Effekte besitzt, die nicht auf der Veränderung des Lipidprofils beruhen.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Niacin oder das bislang eher wenig untersuchte Derivat Nicotinamid einen Effekt auf den durch oxLDL verursachten Migrationsarrest in Schaumzellen haben. Im Zentrum stehen dabei Migrationsversuche mit Makrophagen, die im Vorfeld mit den zu untersuchenden Substanzen stimuliert wurden. Daneben werden durchflusszytometrische und molekulargenetische Analysen durchgeführt, die mögliche Effekte erklären sollen.

Dieser neue Ansatz kann dazu beitragen, die Atherogenese besser zu erklären und gleichzeitig einen neuartigen Weg aufzeigen, wie Atherosklerose in einem gewissen Umfang medikamentös rückgängig gemacht werden kann.

## 2 Material

### 2.1 Technische Geräte

Hera Safe 12 Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Primo Vert Mikroskop	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Vortex Genie 2 <sup>T</sup> M	Bender & Hobein AG
Reamix 2789	Assistent
GS-6KR Centrifuge	Beckman
UV-160-Spectrophotometer	Shimadzu
Centrifuge 5402	Eppendorf
Mini Centrifuge	Nippon Genetics GmbH
Heizbad 51702	Heidolph
Flex Cycler Monoblock 96G	analytikjena
Power PAC 300	Bio-Rad
Wasserbad	memmert
2540EL-Autoklav	tuttnauer
U40-Trockner	memmert
Desinfektor G7735	Miele
Abzug	Küttermann
InGeniusL	Syngene
AE 240	Metter
Industry 6100g/0,1g	Sartorius
Quantitative PCR System Mx3000	Stratagene
FACScan Calibur	BD Biosciences
pH-Meter	InoLab
Easypet	eppendorf
Vacunsafe	INTEGRA Biosciences
Pipetten	eppendorf

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Tubes	eppendorf
15 ml Tubes	Cellstar
50 ml Tubes	Cellstar
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Corning, Cellstar
6-well- und 24-well-Platten	Nunclon, Corning
6,5mm Transwell <sup>®</sup> Inserts (5,0 µm)	Corning
0,22 µm-Filter	Falcon
Pipettenspitzen	eppendorf
Objektträger	Thermo Scientific
Deckgläser	Menzel-Gläser
8 Tube PCR-Thermo-Stripes	Thermo-Scientific

## 2.3 Reagenzien

RAW 264.7 cells	Cell Line Service
RPMI 2640 Zellkulturmedium	Gibco
PBS	Gibco
Fetal bovine serum	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
0,05%-Trypsin-EDTA	Gibco
DAPI Mounting Medium	Vector
100% DMSO	Finnzymes
Methanol	EMSURE
Ethanol	EMSURE
Isopropanol	EMSURE
Albumin	Sigma
Nicotinamid	Sigma
Nicotinic Acid	Sigma
Trolox	Sigma
sin-1	Sigma
Chloroform	Sigma
TriFast peqGOLD	peqlab
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad
EVA Green PCR Master Mix	BioRad
10x Taq-Buffer with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fermentas

---

25 mM MgCl <sub>2</sub>	Fermentas
Taq DNA Polymerase 500 u	Fermentas
dNTP Mix 10 mM	Fermentas
GelStar Nucleic Acid Gel Stain	Lonza
DNA Loading Dye	Fermentas (Thermo Scientific)
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Fermentas (Thermo Scientific)
MCP-1	Sigma
Low-density Lipoprotein (LDL)	Applichem
FITC Apoptosis Detection Kit II	BD Biosciences
FITC Anti-CD36 antibody	Abcam
APC-F4/80	eBioscience
Rat IgG 2a control APC	eBioscience
Dil-oxLDL	Kalen Biomedical
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck
Boric Acid	Sigma
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma

## 2.4 Software

SPSS v17.0	IBM
Microsoft Word für Mac v14.0.0	Microsoft
Microsoft Excel für Mac v14.0.0	Microsoft
Image-Pro Plus v4.5.0.19	Media Cybernetics, Inc.
FlowJo v7.6.1	Tree Star
MxPro QPCR Software v4.01	Stratagene



# 3 Methoden

## 3.1 Zellkultur

### 3.1.1 Kultivieren

Für die Versuche dienten Makrophagen der murinen Zelllinie RAW 264.7 (hier: „RAW-Zellen“). Diese Zellen wurden von Cell Line Service bezogen und meist mit einer Passage von 32 oder 33 geliefert. Bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die RAW-Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit RPMI-1640-Zellkulturmedium inkubiert, das mit 10% fetalem Rinderserum, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war. Ein Mediumwechsel erfolgte alle ein bis zwei Tage, wobei das im RPMI-Medium enthaltene Phenolrot als pH-Indikator diente.

Die Zellen wurden nach der 40. Passage verworfen, das Medium mindestens alle zehn Tage neu angesetzt. Alle o.g. Zusätze lagerten bei -20°C und -80°C.

### 3.1.2 Einfrieren

Für längere Lagerung der RAW-Zellen wurden diese gespült, abzentrifugiert und mit RPMI-Medium, 20% FBS und 10% DMSO eingefroren. Zunächst lagerte die Zelllösung für eine Stunde bei 4°C, daraufhin eine Stunde bei -20°C und schließlich über Nacht bei -80°C. Bei Bedarf konnten die Zellen daraufhin in flüssigen Stickstoff überführt werden, ohne die Kühlkette zu unterbrechen.

### 3.1.3 Auftauen

Bei Bedarf wurden gefrorene RAW-Zellen dem Kühlaggregat entnommen und unmittelbar im Wärmebad auf 37°C aufgewärmt. Die aufgetauten Zellen wurden unverzüglich abzentrifugiert und das DMSO-enhaltende Serum abgenommen. Das Zellpellet konnte anschließend in neuem DMSO-freiem Serum wie in 3.1.1 beschrieben kultiviert werden.

### 3.1.4 Splitten

Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage gesplittet. Dazu wurden sie mit PBS gespült und mit Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst. Durch Abzentrifugieren

fugation der Zellsuspension mit serumhaltigem Medium entstand ein Zellpellet, dessen Überstand verworfen wurde. Daraufhin konnten die Zellen entweder in neue Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Medium oder je nach Bedarf auch in Sixwell-Platten überführt werden, wobei jede Kammer mit  $10^5$  Zellen bestückt wurde. Dazu wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und unter Berücksichtigung der Verdünnung die zu entnehmende Menge berechnet.

### 3.1.5 Mikroskopie

Die Überwachung des Zellzustands erfolgte lichtmikroskopisch. Dafür, und auch für das Auszählen der Neubauer-Zählkammern, wurde ein Primo Vert Mikroskop von Zeiss mit einem 10er-Objektiv verwendet.

## 3.2 Stimulation

Für die Versuche wurden die Zellen vor oder zu Beginn der Experimente mit verschiedenen Reagenzien stimuliert, wobei immer eine nicht stimulierte Kammer der Sixwell-Platte als Kontrolle diente (Baseline). Um Bias in der Durchführung zu vermeiden, erfolgte die Stimulation grundsätzlich durch eine Person, die nicht am weiteren Versuchsablauf beteiligt war (Verblindung).

## 3.3 Migration

### 3.3.1 Prinzip

Die Migration der Zellen wurde in einer „modified Boyden Chamber“ simuliert und gemessen. Dieses System beruht auf einer Mikroporenmembran, die eine Kammer einer Sixwell-Platte in ein oberes und ein unteres Kompartiment aufteilt (siehe Abb. 3.1). Die Poren dieser Membraninserts sind mit  $5,0 \mu\text{m}$  groß genug, um RAW-Zellen eine aktive Transmigration zu ermöglichen. Die RAW-Zellen wurden in konstanten Konzentrationen in serumhaltiges Medium in das obere Kompartiment pipettiert, wobei das untere Kompartiment serumfreies Medium enthielt. Um einen Migrationsanreiz zu setzen, wurde dem serumfreien Medium im unteren Kompartiment ein Chemotaktikum zugesetzt. Hierzu diente MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) in einer Konzentration von  $10 \text{ ng/ml}$ .

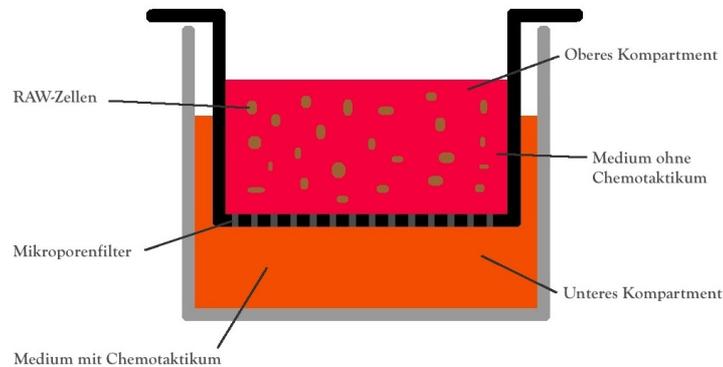


Abbildung 3.1: **Boyden Chamber Assay:** Die stimulierten RAW-Zellen wurden in serumhaltigen Medium in das obere Kompartiment pipettiert, während das untere Kompartiment serumfreies Medium und MCP-1 als Chemotaktikum enthielt. Nach Inkubation über einen definierten Zeitraum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte die Färbung und Auswertung des Mikroporenfilters (Durchmesser 6,5 mm, Porengröße 5,0 µm)

Um die Effekte von verschiedenen Substanzen auf die Makrophagenmigration zu testen, wurden die Zellen wie in 3.2 beschrieben vor oder zu Experimentbeginn mit der entsprechenden Substanz (ko)stimuliert.

### 3.3.2 Tag I

Für die Migrationsversuche wurden die Zellen in den Sixwells zunächst auf gleichmäßiges und ausreichendes Wachstum kontrolliert. Daraufhin wurden die Sixwells zweimal mit 3 ml PBS gespült und die Zellen mit der Pipette vorsichtig vom Kunststoff gelöst. Die Suspensionen wurden in Falcon-Tubes überführt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in serumfreiem Medium gelöst und die Zellkonzentration dieser Suspension mit Neubauer-Zählkammern ermittelt. Daraufhin wurden von jeder ursprünglichen Kammer der Sixwells jeweils 50.000 Zellen in ein Eppendorf-Cup überführt und mit serumfreiem Medium auf 500 µl aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 µl auf die Oberseite der Inserts gegeben, und dabei darauf geachtet, dass keine Blasen entstehen.

In einer 24-Well-Platte wurden in sechs der Kammern 600 µl serumhaltiges Medium vorgelegt. Dieses Medium wurde mit 10 ng/ml MCP-1 versetzt. Die Inserts wurden in die vorbereiteten Kammern der 24-Well-Platte gesetzt und diese daraufhin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für einen definierten Zeitraum inkubiert.

### 3.3.3 Tag II

Nach 16 h wurden die Inserts aus der 24-Well-Platte genommen, und die Zellsuspension des oberen Kompartiments mit einer Pipette abgenommen. Die Inserts wurden zweimal vorsichtig in PBS gespült und die Zellen an der Unterseite der Membran für acht Minuten in Methanol fixiert. Die Membranen der Inserts wurden mit einem Skalpell gelöst, auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen DAPI Mounting Medium (Vector) angefärbt. Schließlich wurden sie mit einem Deckgläschen abgedeckt und diese mit Eukitt<sup>®</sup> fixiert.

### 3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Objektträger mit den Membranen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurden von jedem Objektträger vier Bilder mit einem 10er-Objektiv gemacht und die Zellzahl mit der Software Image-Pro Plus ausgezählt. Die ermittelten Werte wurden für jede Membran gemittelt.

### 3.3.5 Statistische Auswertung

Im Rahmen des Versuchsaufbaus und der -durchführung variierten die Zellzahlen auf den Membranen zwischen den einzelnen Versuchen teils erheblich, sodass ein Migrationsindex errechnet wurde, um die Versuche miteinander vergleichbar zu machen. Dazu wurden die pro Versuch erhaltenen Werte jeweils durch die Anzahl der migrierten Zellen der Baseline-Kammer geteilt. Die Baseline-Kammer nahm somit immer den Wert 1 an, während sich eine Zunahme der Migration in Werten  $>1$  und eine Hemmung der Migration in Werten  $<1$  widerspiegelte.

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten wurden die Versuche stets mehrfach durchgeführt. Da es sich immer um verbundene Stichproben handelte, diente ein t-Test für gepaarte Stichproben zur Berechnung der p-Werte.

## 3.4 Molekulargenetische Analysen

### 3.4.1 RNA-Isolation

Um die RNA der RAW-Zellen zu isolieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und zweimal gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trifast-Lösung von peq-GOLD pro Kammer lysiert. Durch Mehrmaliges Auf- und Abziehen der Suspension mit einer Pipette wurde die Lyse unterstützt. Das in Eppendorf-Cups überführte Zelllysate wurde noch fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Nukleoprote-

inkomplexe komplett dissoziieren zu lassen. Dann wurden 0,2 µl Chloroform zugefügt, die Proben gründlich geschüttelt und 10 Minuten bei 4°C gelagert.

Nach einer fünfminütigen Zentrifugation mit 12.000 g bei ebenfalls 4°C bildeten sich drei Phasen (von oben nach unten: RNA, DNA, Proteine). Die wässrige obere Phase wurde in neue Cups überführt und 0.5 ml Isopropanol zugegeben. Diese Proben wurden für 10 Minuten bei 4°C gelagert und anschließend wiederum bei 4°C mit 12.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das am Boden entstehende gelartige Pellet wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser bei 55°C gelöst.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte am Photometer.

### 3.4.2 cDNA-Synthese

Die isolierte und gereinigte RNA wurde direkt in die stabilere cDNA umgeschrieben. Dazu diente der iScript-cDNA-Synthese-Kit von BioRad und 1 µg der RNA-Proben (Vorgehen gemäß Herstellerprotokoll).

### 3.4.3 Qualitative PCR

Mit der cDNA wurde je nach Fragestellung und zur Vorbereitung der qRT-PCR eine qualitative PCR durchgeführt. Dazu wurden die Reagenzien der Tabelle 3.1 als Mastermix (MM) vorgelegt, wobei die instabile Taq-Polymerase erst zum Ende zugegeben wurde. Von dem entstandenen MM wurden jeweils 22,5 µl in PCR-Tubes überführt und mit 1 µl der verschiedenen cDNA-Proben versetzt. Schließlich wurden jeweils 1,5 µl des Co-Enzyms MgCl<sub>2</sub> zugegeben und die PCR in dem Flexcycler Monoblock 96G mit dem Protokoll aus Tabelle 3.3 durchgeführt.

Untersucht wurde die iNOS-Expression der stimulierten und nicht-stimulierten Zellen. Als konstitutiv-exprimiertes Gen (*housekeeping gene*) diente β-Actin. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Mastermix (MM) für die qualitative PCR. Die Mengenangaben wurden mit der Anzahl der Proben multipliziert und in einem Eppendorf-Cup gemischt. Die Taq-Polymerase wurde am Ende zugegeben.

Reagenz	Menge pro Probe [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	16,8
Taq Polymerase Buffer	2,5
dNTP Mix	1
fPrimer	1
rPrimer	1
Taq Polymerase	0,2

Tabelle 3.2: Primersequenzen des zu untersuchenden Gens (iNOS) und von  $\beta$ -Actin. Die Schmelztemperatur  $T_M$  wurde auf Basis der enthaltenen Nukleotide berechnet.

Gen	Primer	Sequenz	$T_M$
iNOS	Forward	5'-GCCACCAACAATGGCAACAT-3'	68,2°C
	Reverse	5'-CGATGCACAACCTGGGTGAAC-3'	67,0°C
$\beta$ -Actin	Forward	5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGG-3'	84,0°C
	Reverse	5'-GGGAGGAAGAGGATGCGGCAGTGG-3'	77,9°C

Tabelle 3.3: Protokoll für die qualitative PCR der INOS-Expression. c steht für Cycle – dieser wurde 34 mal durchgeführt.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [mm:ss]
1	95,0	02:00
2c	95,0	00:30
3c	60,0	00:30
4c	72,0	00:20
5	95,0	00:30
6	60,0	00:30
7	72,0	05:00
8	4,0	unendlich

#### 3.4.4 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der qualitativen PCR wurde ein 2%iges Agarose-Gel angefertigt und mit 2 µl GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) versetzt. In dieses Gel wurden die Proben der PCR gemischt, mit 5 µl DNA Loading Dye gegeben und eine Elektrophorese bei 200 V für 40 Minuten durchgeführt. Für die DNA-Leiter wurden 2 µl DNA Loading Dye mit 2 µl Gene Ruler 100bp DNA Ladder (Fermentas) und 10 µl DEPC-Water gemischt. Anschließend wurde das Gel in einer InGeniusL-UV-Kammer (Syngene) abfotografiert und ausgewertet.

#### 3.4.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitativen PCR-Analysen erfolgten an einem Mx3000P Real-Time-Cycler, wobei EVA Green als Master Mix diente (Tab. 3.4). Der Mastermix wurde wegen der Anfälligkeit der RT-PCR auf RNAsen mit besonders behandelten Pipettenspitzen an einem RNase freien Arbeitsplatz hergestellt.

Tabelle 3.4: Mastermix (MM) für die quantitative Real-Time-PCR. Die Mengenangaben wurden mit der Anzahl der Proben multipliziert und in einem RNase freien Eppendorf-Cup gemischt. Die cDNA wurde am Ende zu den jeweiligen Cups hinzugefügt.

Reagenz	Menge pro Probe [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	3
EVA-Green	6
fPrimer	0,5
rPrimer	0,5
cDNA	2

Von diesem Mastermix wurden jeweils 10  $\mu$ l in die verschiedenen PCR-Tubes überführt. Um Pipettierungenauigkeiten zu minimieren wurden pro Probe jeweils zwei PCR-Tubes verwendet.

Die relativen Konzentrationsunterschiede wurden mit einer komparativen Ct-Methode bestimmt, die von der Mx3000P-Software automatisch durchgeführt wurde. Dabei wurde der Wert der Baseline-Zellen als Kalibrator benutzt, wodurch sie automatisch den Wert 1 annahmen. Die Werte der  $\beta$ -Actin-Expression dienten als Normierung anhand welcher die Unterschiede der iNOS-Expression der RAW-Zellen berechnet wurden. Erhöhte Expression spiegelte sich demnach in Werten  $>1$  dar, während erniedrigte Expression Werte  $<1$  annahm.

Die verwendeten Primer sind Kapitel 3.4.3 zu entnehmen.

## 3.5 Durchflusszytometrie

### 3.5.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie (engl. "flow cytometry" oder „fluorescence activated cell sorting, FACS“) ist ein Verfahren, das es ermöglicht Zellen und Zelleigenschaften anhand von Zelloberflächenmolekülen oder intrazellulären Strukturen zu identifizieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen einzeln hintereinander an einem fokussierten Laser vorbeigeführt, wobei Streulicht oder Fluoreszenzsignale ausgewertet werden.

Da nur wenige Zellen von sich aus fluoreszierendes Licht emittieren, besteht die Möglichkeit, diese vorher direkt oder indirekt mit Fluorochromen-gekoppelten Antikörpern zu markieren. Die Fluorochrome auf der Zelle werden durch den monochromen Laserstrahl angeregt und leuchten dadurch in einem charakteristischen Spektrum. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der markierten Antigene.

### 3.5.2 FACS

Im Vorfeld wurden die RAW-Zellen zweimal mit PBS gespült.

Um zu überprüfen, ob behandelte Zellen vermehrt durch Apoptose zugrunde gehen, wurden jeweils  $10^5$  Zellen jeder Kammer mit Binding Buffer, FITC-Annexin V und PI für 15 Minuten im Dunkeln (Raumtemperatur) inkubiert und anschließend im FACScan Calibur getestet.

Die Expression von murinen, makrophagenspezifischen Oberflächenrezeptoren (CD36 und F4/80) vor und nach Behandlung der Zellen wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden  $10^5$  RAW-Zellen jeweils 60 Minuten im Dunkeln mit Binding Buffer und APC-F4/80-Antikörpern (APC = Allophycocyanin) bzw. FITC-CD36-Antikörpern (FITC = Fluoresceinisothiocyanat) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und die Fluoreszenzintensität im FACScan Calibur getestet.

Um die Abhängigkeit der oxLDL-Aufnahme von der Behandlung der Zellen zu untersuchen, wurden diese analog zur Stimulation im Kernversuch (s. Kap. 4.3.1) mit  $30\mu\text{g/ml}$  Dil-oxLDL und Niacin bzw. Nicotinamid über 24 Stunden stimuliert. Die oxLDL-Aufnahme korrelierte hier mit der Fluoreszenzintensität der Zellen, welche mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde.

## 3.6 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS 17.0 verwendet. Mit sämtlichen Ergebnissen wurden t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt und ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ausschluss eines Effekts von Ethanol auf die Makrophagenmigration

Einige verwendete Chemikalien wurden in Pulverform geliefert und aus technischen Gründen in Ethanol gelöst. Um auszuschließen, dass Ethanol die Migration auch ohne Zugabe anderer Stimulanzen beeinflusst, wurden die RAW-Zellen in einem Vorversuch mit zwei verschiedenen Konzentrationen reinen Ethanols behandelt und unmittelbar eine Migration durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen richteten sich dabei nach den jeweils höchstens eingesetzten Mengen an Ethanol (Dichte: 0,79 g/ml; MW: 46,07 g/mol) als Lösungsmittel:

3,36  $\mu\text{l}$  entsprechen auf 500  $\mu\text{l}$  ca. 0,11 M

7,45  $\mu\text{l}$  entsprechen auf 500  $\mu\text{l}$  ca. 0,25 M

Der Effekt von 3,36  $\mu\text{l}$  Ethanol wurde für Migrationsversuche von kürzerer Dauer zusätzlich auch für fünf Stunden bestimmt.

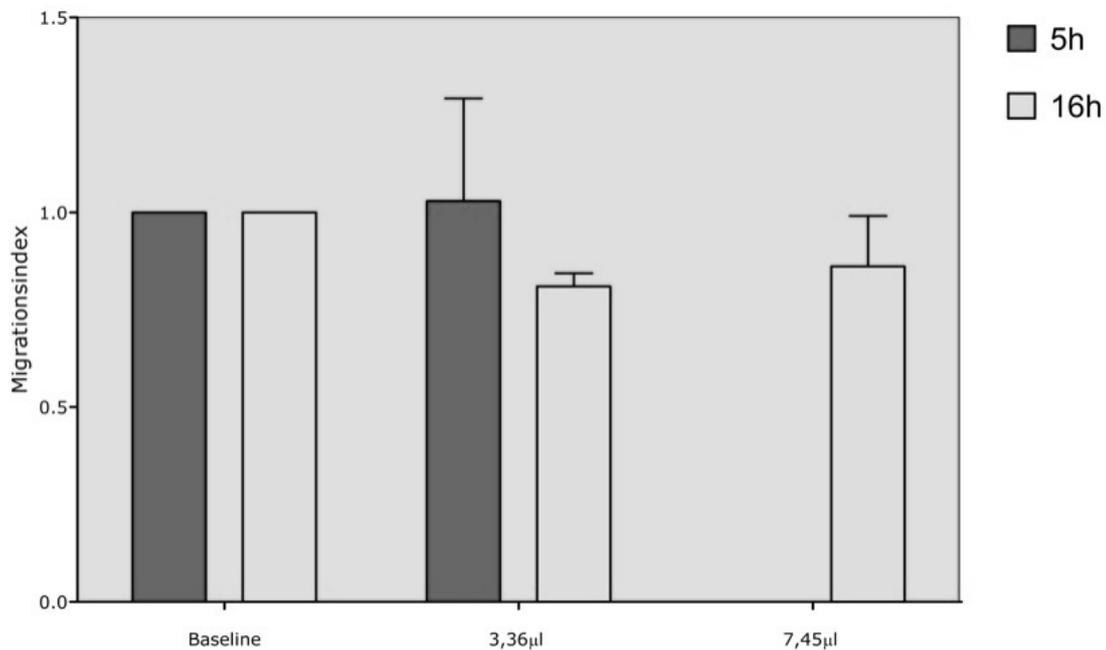


Abbildung 4.1: **Einfluss von Ethanol auf die Makrophagenmigration:** Die verwendeten Konzentrationen haben sowohl nach 5h als auch nach 16h keinen relevanten Einfluss auf die Migration. Eine Kontrolle von 7,45 µl Ethanol für 5h wurde nicht benötigt.

Nach 5h Migration mit einer Zugabe von 3,36 µl Ethanol ergab sich mit einem Migrationsindex von  $1,03 \pm 0,19$  kein signifikanter Unterschied zur Baseline Kammer ( $p = 0,796$ ). Nach 16h mit der gleichen Menge an Ethanol beträgt der Migrationsindex nur noch  $0,83 \pm 0,05$ . Dieser Wert ist dabei mit  $p = 0,008$  signifikant.

Erhöht man das Ethanol-Volumen auf 7,45 µl und führt eine Migration mit demselben Versuchsaufbau durch (ebenfalls 16h), lässt sich wiederum ein mit  $0,88 \pm 0,11$  anzugebener nicht signifikanter ( $p = 0,119$ ) Rückgang der Migration beobachten ( $n=3$ ).

Da diese Abnahmen aber nur sehr gering sind und bei gleichem Versuchsaufbau und höherer Ethanol-Konzentration keine signifikante Hemmung der Migration beobachtet wurde, wird die Beeinflussung der Migration durch diese Substanz in den weiteren Versuchen als allenfalls marginal angenommen und nicht weiter berücksichtigt.

## 4.2 Bedeutung von ROS für Makrophagenmigration

### 4.2.1 Auswirkung von Sin-1 auf Makrophagenmigration

Linsidomin (Sin-1), das Derivat von Molsidomin, fungiert als Stickstoffmonoxid- und Peroxynitritdonor. Um den Effekt von Sin-1 auf die Migration der RAW-Zellen zu

testen, und somit den Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies näher zu untersuchen, wurde es in einer Ethanol-basierten Lösung mit den Zellen inkubiert (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Versuchsaufbau für die Migration mit Linsidomin (Sin-1): Die Baseline-Kammer diente in jedem Versuch als Kontrollgruppe und liegt hier übersichtshalber immer auf Position 1.

Kammer	Reagenz	Konzentration
1	- (Baseline)	-
2	Sin-1	0,3mM

Anschließend erfolgte eine Migration über 16 Stunden. Die Ergebnisse der Migration werden in Abb. 4.2 und 4.3 aufgeführt.

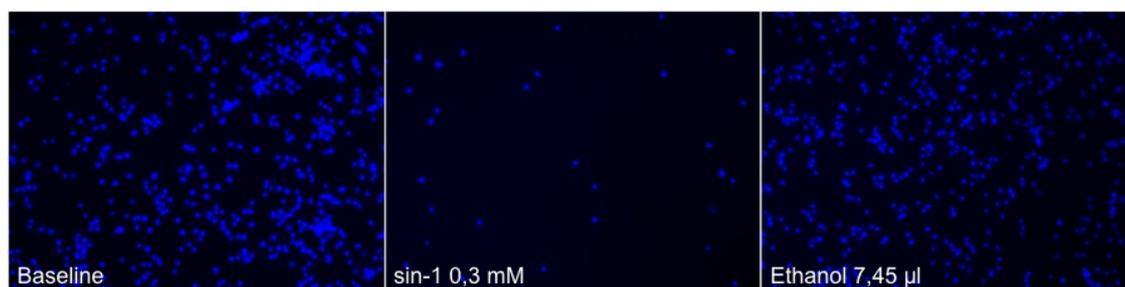


Abbildung 4.2: **Migration mit Linsidomin (Sin-1)**: Als Lösungsmittel dienten 7,45  $\mu$ l Ethanol. Zur Kontrolle wird parallel eine Migration mit reinem Ethanol der gleichen Menge durchgeführt.

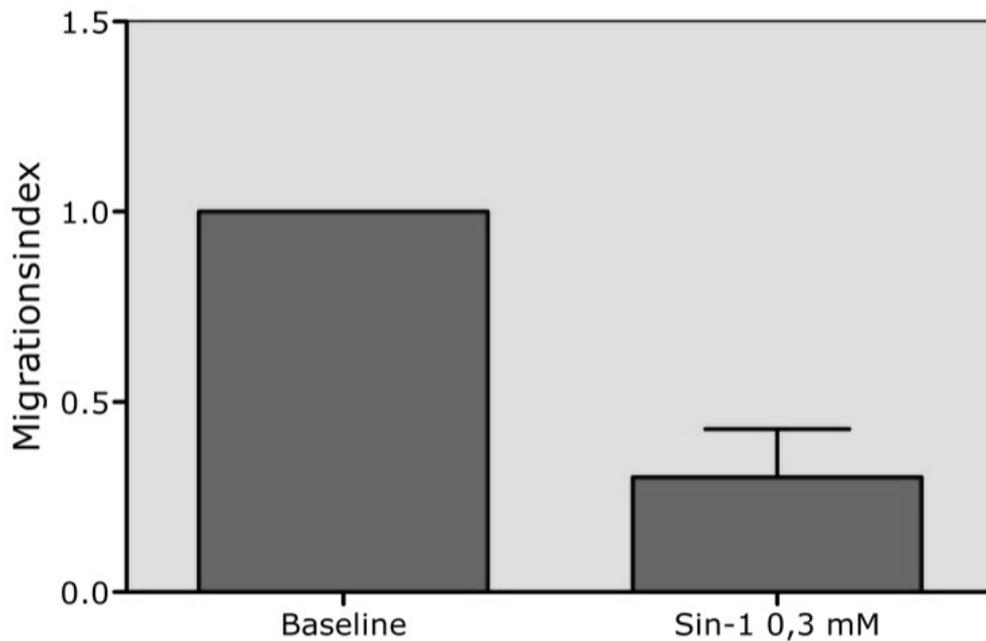


Abbildung 4.3: **Ergebnisse der Migration mit Linsidomin (Sin-1)**: Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Migration der RAW-Zellen nach Stimulation mit dem NO-Donor.

Es zeigte sich, dass die RAW-Zellen unter einer Stimulation mit 0,3mM Linsidomin signifikant weniger migrieren, als nicht-stimulierte Zellen ( $0,30 \pm 0,25$ ,  $p = 0,012$ ,  $n = 4$ ). Ein möglicher Einfluss des Lösungsmittels Ethanol ( $7,45 \mu\text{l}$ ) wurde in 4.1 ausgeschlossen.

#### 4.2.2 Auswirkung von 15(s)-HPETE auf Makrophagenmigration

Des Weiteren wurde der Einfluss des Arachidonsäuremetabolits 15(s)-HPETE auf die Migration untersucht. Auch hier diente Ethanol als Lösungsmittel im Versuchsaufbau (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Versuchsaufbau für die Migration mit 15(s)-HPETE

Kammer	Reagenz	Konzentration
1	- (Baseline)	-
2	15(s)-HPETE	0,05 $\mu$ M
3	15(s)-HPETE	0,1 $\mu$ M
4	15(s)-HPETE	1 $\mu$ M
5	15(s)-HPETE	5 $\mu$ M

Die Ergebnisse der durchgeführten Migration zeigt Abbildung 4.4.

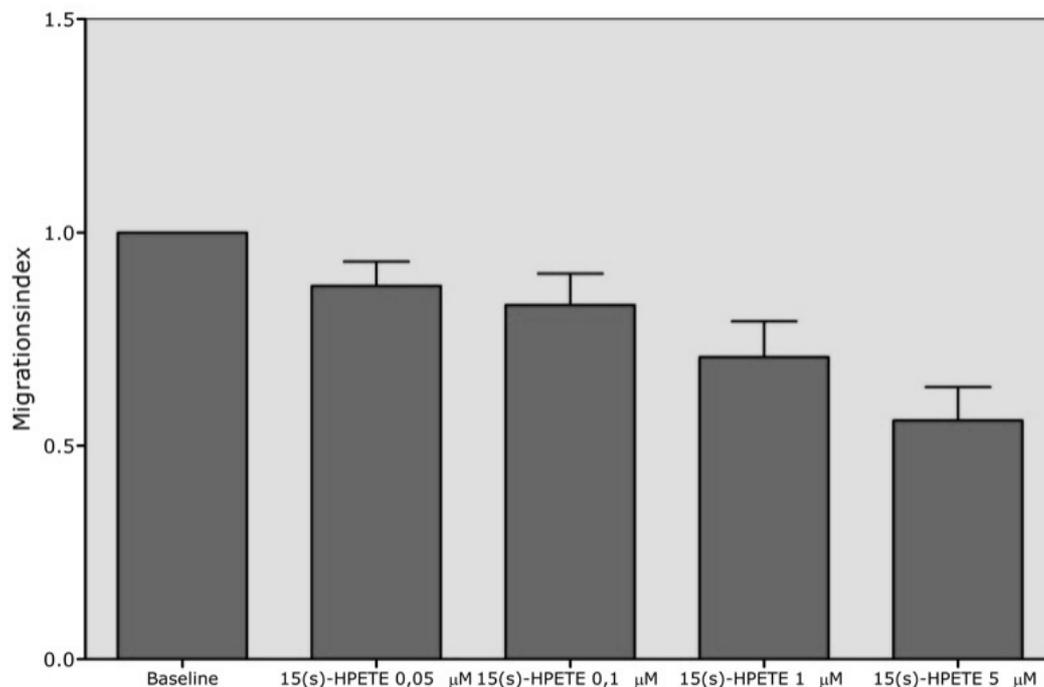


Abbildung 4.4: **Ergebnisse der Migration mit 15(s)-HPETE:** Je höher die Konzentration des Arachidonsäuremetabolits, desto stärker wurde die Migration gehemmt.

Unter einer Stimulation mit dem Lipidhydroperoxid 15(s)-HPETE wurde die Migration der RAW-Zellen zum Teil signifikant gesenkt ( $n = 10$ ). Während die Migration mit einer Konzentration von 0,05  $\mu$ M nur auf  $0,87 \pm 1,8$  absank ( $p = 0,055$ ), war die Hemmung der Migration ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M mit p-Werten unter 0,05 signifikant:

0,1 $\mu\text{M}$ :	$0,83 \pm 0,23$ ; $p = 0,046$
1 $\mu\text{M}$ :	$0,71 \pm 0,26$ ; $p = 0,007$
5 $\mu\text{M}$ :	$0,56 \pm 0,25$ ; $p = 0,000$

Je höher die Konzentration von 15(s)-HPETE, desto stärker war die Inhibition der Makrophagenmigration. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  15(s)-HPETE wurde eine maximale Menge von 3,36  $\mu\text{l}$  Ethanol verwendet. Auch für diese Konzentration erfolgte in 4.1 ein Ausschluss eines Ethanol-Effektes.

### 4.3 Bedeutung von Niacin und Nicotinamid für Makrophagenmigration

#### 4.3.1 Auswirkung auf Migration

Zunächst wurde untersucht, ob Niacin und Nicotinamid ohne Zugabe anderer Substanzen einen migrationsmodifizierenden Effekt auf die RAW-Zellen haben. Dazu wurden sie in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden mit den Zellen inkubiert, worauf eine 16-stündige Migration erfolgte.

Die verwendeten Konzentrationen zeigt Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3: Versuchsaufbau für den Kontrollversuch

Kammer	Reagenz	Konzentration
1	- (Baseline)	-
2	Niacin	10 $\mu\text{M}$
3	Niacin	100 $\mu\text{M}$
4	Niacin	1mM
5	Nicotinamid	1mM
6	Nicotinamid	3mM

Die Ergebnisse dieses Kontrollversuchs stellt Abbildung 4.5 dar.

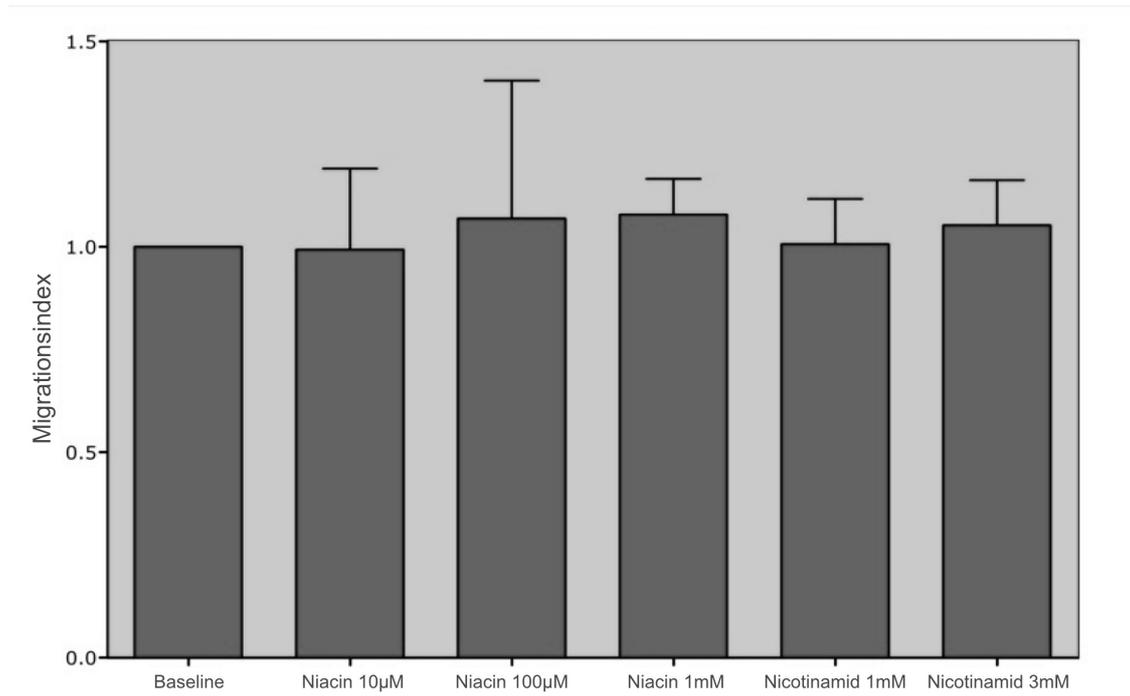


Abbildung 4.5: **Ergebnisse der Migration mit Niacin und Nicotinamid ohne Zugabe anderer Stimulanzen:** Der Kontrollversuch zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Im Kontrollversuch ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen feststellen. Die Migrationsindizes schwankten zwischen 0,99 und 1,08 und die p-Werte zwischen den getesteten Gruppen erreichten keine Signifikanz ( $n = 6$ ).

Ein migrationsmodifizierender Effekt von Niacin-/Nicotinamidlösungen auf nicht anderweitig stimulierte RAW-Zellen wurde hiermit ausgeschlossen. Zudem kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass das verwendete Lösungsmittel PBS ebenfalls keinen Einfluss auf die Migration der Makrophagen hat.

Um die Auswirkung dieser Vitamine auf einen Migrationsarrest zu untersuchen, musste dieser zunächst durch oxLDL herbeigeführt werden. Anschließend wurden die genannten Substanzen zugesetzt und getestet, ob sie den Migrationsarrest aufheben können.

Das Stimulationsmuster dieses Versuches stellt Tabelle 4.4 dar, wobei die verwendeten Konzentrationen aus Vorversuchen festgelegt wurden.

Tabelle 4.4: Versuchsanordnung des Kernversuchs

Kammer	Reagenz	Konzentration
1	- (Baseline)	-
2	oxLDL	100µg/ml
3	oxLDL Niacin	100µg/ml 100µM
4	oxLDL Niacin	100µg/ml 1mM
5	oxLDL Nicotinamid	100µg/ml 1mM
6	oxLDL Nicotinamid	100µg/ml 3mM

Mit der vorliegenden Versuchsanordnung wurde eine Migration über 16 Stunden durchgeführt, deren Ergebnisse Abb. 4.6 und 4.7 zeigen.

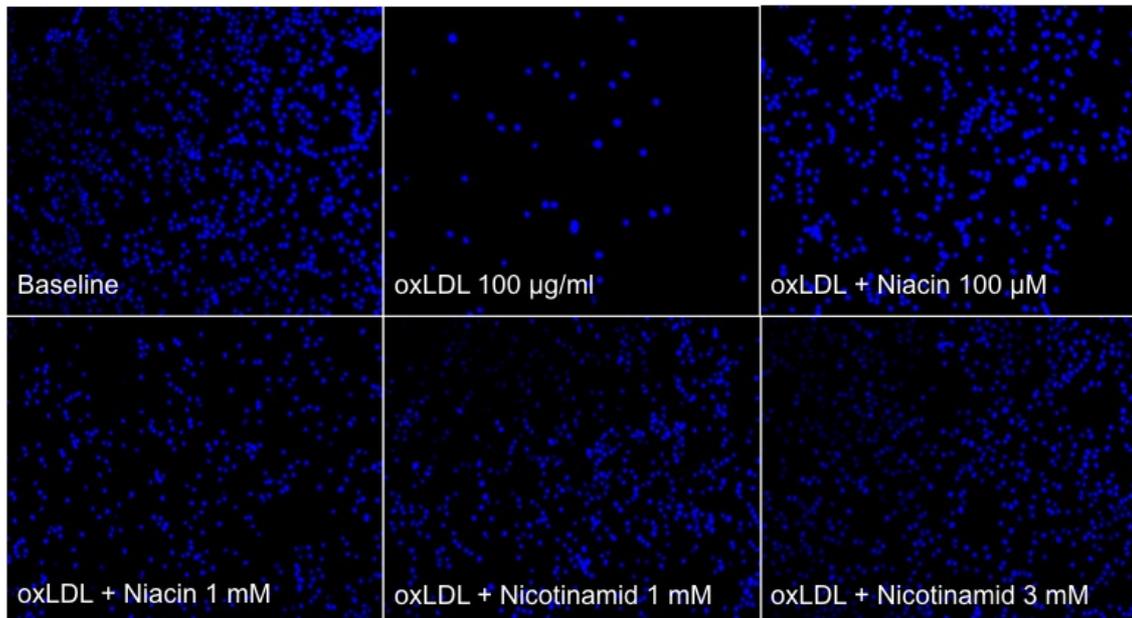


Abbildung 4.6: **Migration mit oxLDL und Niacin und Nicotinamid:** Niacin und sein Derivat Nicotinamid hoben den Migrationsarrest unter oxLDL auf.

Es zeigte sich der erwartete Migrationsarrest unter einer Stimulation der Zellen mit 100  $\mu\text{g/ml}$  oxLDL ( $0,59 \pm 0,45$ ,  $p = 0,003$ ,  $n = 16$ ). Auffallend war, dass die Zellen bei gleichzeitiger Stimulation von oxLDL mit Niacin offenbar stärker migrieren als bei alleiniger Stimulation mit oxLDL. Gleiches zeigte sich bei Ko-Stimulation der Zellen mit oxLDL und Nicotinamid, wogegen kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Kammer 1) und den Kammern 3 bis 6 vorlag ( $p > 0,05$ ).

Nahezu sämtliche Unterschiede in den Migrationsindizes zwischen Kammer 2 und den restlichen Kammern waren bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  statistisch relevant.

SPSS liefert für den t-Test für gepaarte Stichproben folgende Werte: Vergleich von Kammer 2 (Migrationsindex =  $0,59 \pm 0,45$ ) zu ...

... Kammer 1: Migrationsindex = 1,	$p = 0,003$
... Kammer 3: Migrationsindex = $0,90 \pm 0,31$ ,	$p = 0,055$
... Kammer 4: Migrationsindex = $0,99 \pm 0,41$ ,	$p = 0,014$
... Kammer 5: Migrationsindex = $0,91 \pm 0,34$ ,	$p = 0,017$
... Kammer 6: Migrationsindex = $1,09 \pm 0,50$ ,	$p = 0,009$

Da für PBS als verwendetes Lösungsmittel selbst keine migrationsmodifizierenden Effekte anzunehmen sind (s.a. Abb. 4.5), ist der gemessene Effekt auf Niacin und Nicotinamid zurückzuführen.

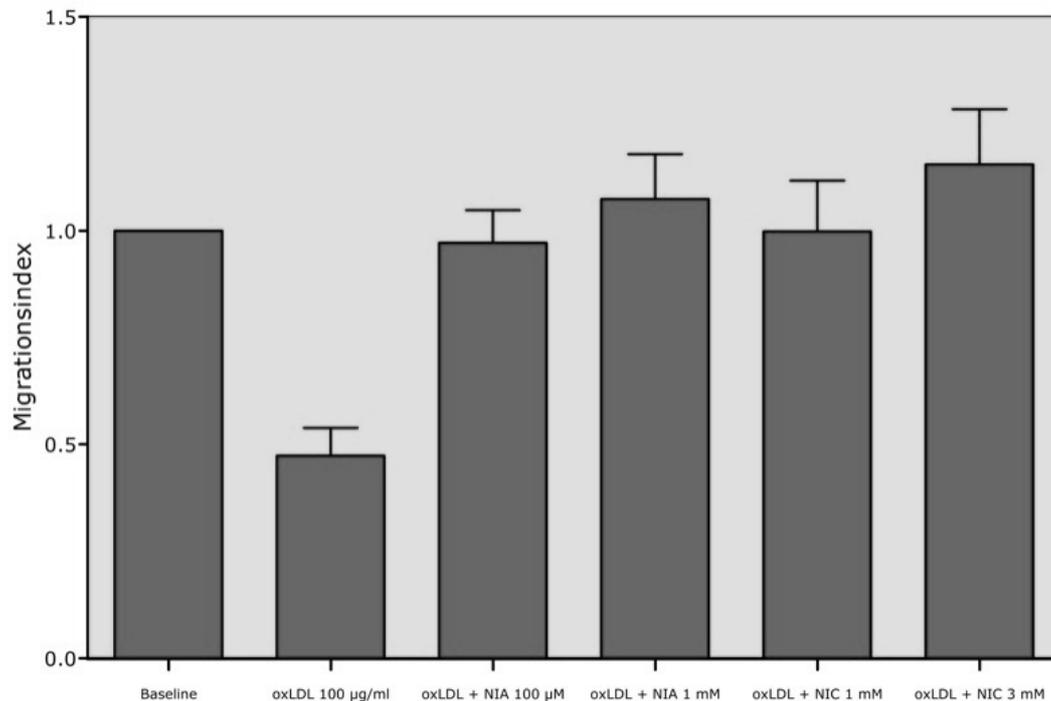


Abbildung 4.7: **Ergebnisse der Migration mit oxLDL und Niacin/Nicotinamid:** Unter Ko-Stimulation von oxLDL mit Niacin oder Nicotinamid nahm die Migration im Gegensatz zu nur mit oxLDL stimulierten Zellen zu.

### 4.3.2 Auswirkung auf iNOS-Expression

Da die iNOS-Expression eine wichtige Rolle in der Entstehung atherosklerotischer Plaques spielt, wurde diese unter Behandlung mit oxLDL und Niacin/Nicotinamid getestet.

Dazu wurden die RAW-Zellen zunächst über 24 h stimuliert (Tabelle 4.4) und anschließend eine qualitative PCR durchgeführt, um die Induktion der iNOS-Expression zu dokumentieren.

Wie Abbildung 4.8 zeigt, ist eine iNOS-Expression in den nicht-stimulierten Zellen (Baseline-Kammer) nicht nachweisbar. Die RAW-Zellen, die mit oxLDL stimuliert wurden (Kammer 2) zeigen hingegen eine deutliche iNOS-Expression. Auch die restlichen Kammern (oxLDL + Niacin/Nicotinamid) weisen eine Expression des iNOS-Gens auf. Ein technisches Versagen der PCR in der Baseline-Kammer ist durch die Amplifikation des  $\beta$ -Actin-Gens ausgeschlossen.

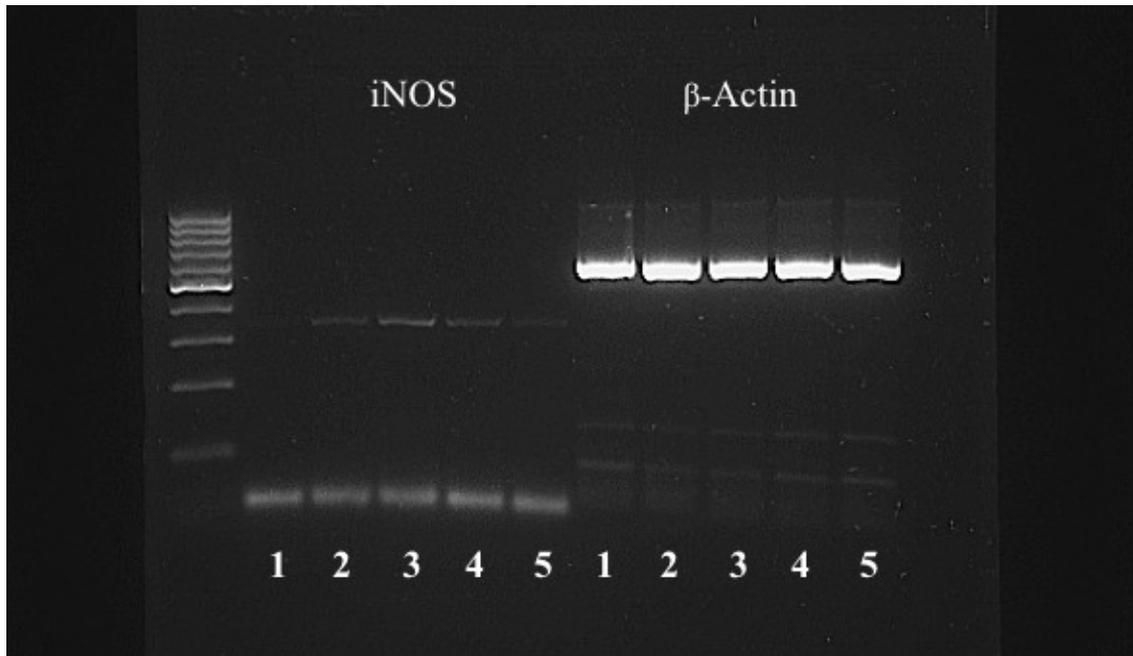


Abbildung 4.8: **Qualitative PCR:**  $\beta$ -Actin ist in allen Kammern nachweisbar. Eine iNOS-Expression lässt sich sicher in den Kammern 2-5 nachweisen.

Um einen differenzierteren Effekt des Niacins und des Nicotinamids auf die iNOS-Expression nachzuweisen, wurde zudem eine quantitative RT-PCR mit denselben Primern durchgeführt. Hier fand wiederum die ursprüngliche Versuchsanordnung von Tabelle 4.4 Anwendung. Die Ergebnisse des insgesamt fünf mal durchgeführten Versuchs sind Abbildung 4.9 zu entnehmen.

Bei Stimulation der RAW-Zellen mit oxLDL nahm die iNOS-Expression signifikant zu ( $3,04 \pm 0,67$ ,  $p = 0,002$ ). Bei Ko-Stimulation mit den Vitaminen zeigten sich folgende Expressionswerte:

Vergleich von Kammer 2 (Expressionsindex =  $3,04 \pm 0,67$ ) zu ...

... Kammer 3: Expressionsindex =  $1,73 \pm 1,04$ ,  $p = 0,096$

... Kammer 4: Expressionsindex =  $2,08 \pm 1,07$ ,  $p = 0,129$

... Kammer 5: Expressionsindex =  $1,65 \pm 0,61$ ,  $p = 0,034$

... Kammer 6: Expressionsindex =  $1,96 \pm 1,05$ ,  $p = 0,145$

Niacin und Nicotinamid hemmen demnach den durch oxLDL-getriggerten iNOS-Expressionsanstieg in allen Kammern. Mit der vorliegenden Anzahl an Versuchen konnte zwar keine Signifikanz zwischen allen Gruppen erreicht werden, dennoch geben sie einen Eindruck eines möglicherweise hemmenden Effektes von sowohl Niacin als auch

Nicotinamid auf die iNOS-Expression.

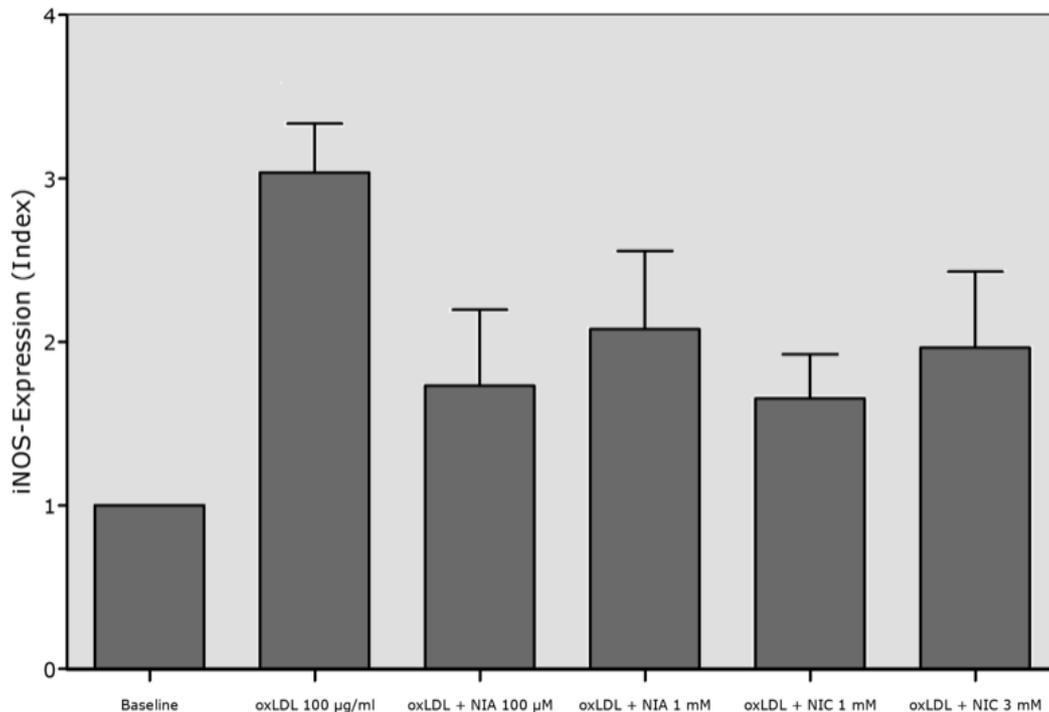


Abbildung 4.9: **Real-Time-PCR mit der Kernversuchsanordnung:** Es zeigt sich ein leichter aber nicht statistisch signifikanter Rückgang der iNOS-Expression bei Ko-Stimulation mit Niacin und Nicotinamid (n=5)

### 4.3.3 Auswirkung auf Apoptose

Um einen pro-apoptotischen Effekt von Niacin oder Nicotinamid auf die RAW-Zellen auszuschließen, wurden diese mit Annexin V und Propidiumiodid markiert.

Annexin V ist ein Protein, das an Phosphatidylserin bindet, welches wiederum an der Innenseite der Plasmamembran vitaler Zellen vorkommt und nur bei Apoptose an die Außenseite der Zellmembran transloziert. [Vermes et al., 1995]

Propidiumiodid (PI) ist ein Nukleinsäureinterkalator, der Zellmembranen viabler Zellen nicht durchdringen kann, im Rahmen einer Nekrose aber die intrazelluläre DNA färbt. [Lecoeur, 2002]

Eine Doppelfärbung mit Annexin V und PI im Sinne einer Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung erlaubt eine Unterscheidung von toten (doppelt gefärbt), apoptotischen (Annexin-V-gefärbt) und nekrotischen Zellen (PI-gefärbt).

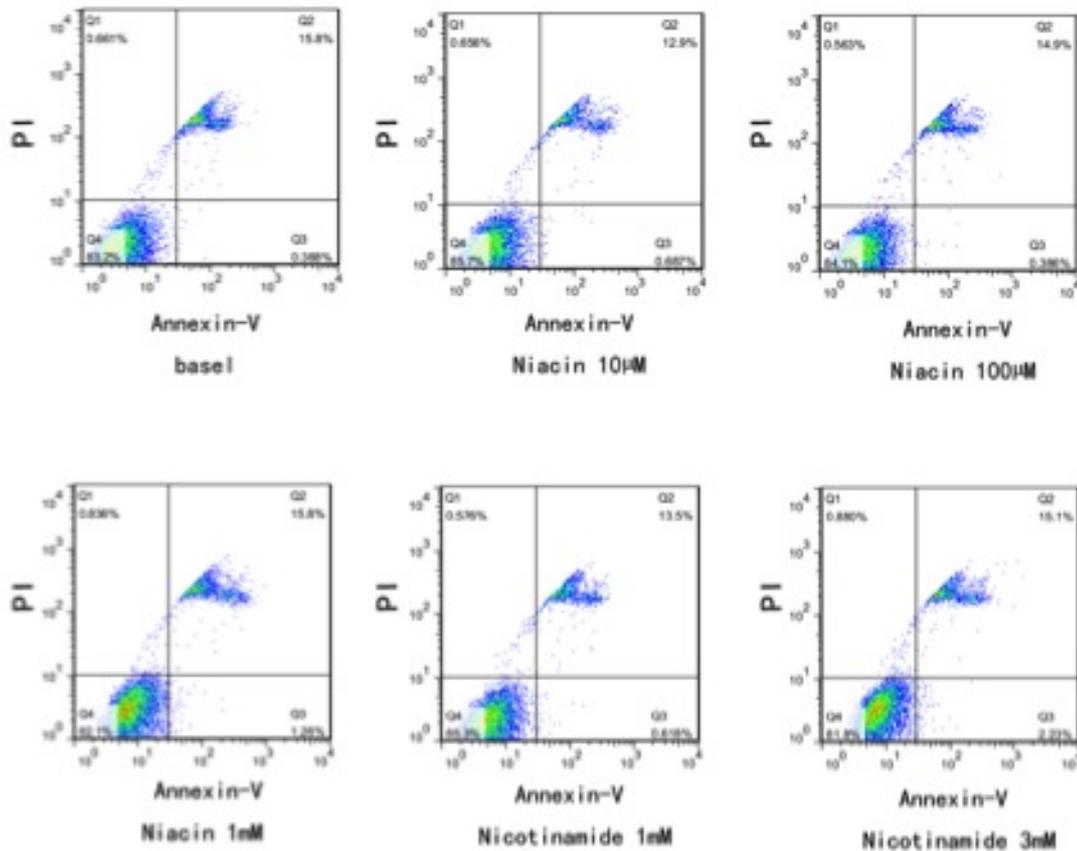


Abbildung 4.10: **Durchflusszytometrie mit PI- und Annexin-V-Färbung:** Die Behandlung der RAW-Zellen mit oxLDL, Niacin und Nicotinamid hat keinen Effekt auf Apoptose oder Nekrose der Zellen.

Abbildung 4.10 zeigt, dass weder die Apoptose noch die Nekrose durch die Stimulation der RAW-Zellen mit den Substanzen des Kernversuchs beeinflusst werden. Der Anteil der vitalen Zellen lag in allen Kammern durchgehend bei 82-87%. Eine Veränderung der gezählten Zellzahlen im Migrationsversuch ist also nicht auf einen Unterschied im Zelltod zurückzuführen.

## 4.4 Rolle von Antioxidantien

### 4.4.1 Auswirkung von Trolox auf Makrophagenmigration

Das wasserlösliche Vitamin-E-Derivat Trolox wirkt antioxidativ und wird deswegen ebenfalls auf einen Effekt auf die Migration der mit oxLDL beladenen Makrophagen

untersucht. Hierzu wurden, wie im Kernversuch auch, Zellen zunächst nur mit oxLDL behandelt. In einer weiteren Kammer wurde dem oxLDL zusätzlich eine definierte Menge Trolox beigefügt. Anschließend erfolgte ein Migrationsversuch über 16 Stunden.

Tabelle 4.5: Versuchsanordnung für die Migration mit Trolox

Kammer	Reagenz	Konzentration
1	- (Baseline)	-
2	oxLDL	100µg/ml
3	oxLDL	100µg/ml
	Trolox	133µM

Die Ergebnisse des Migrationsversuches stellen Abb. 4.11 und 4.12 dar.

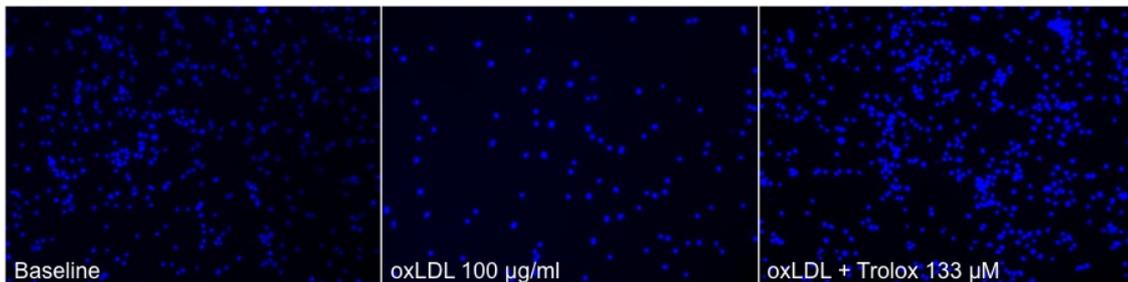


Abbildung 4.11: **Migration mit oxLDL und Trolox:** Unter Stimulation mit dem Vitamin-E-Derivat Trolox wurde die migrationshemmende Wirkung von oxLDL aufgehoben

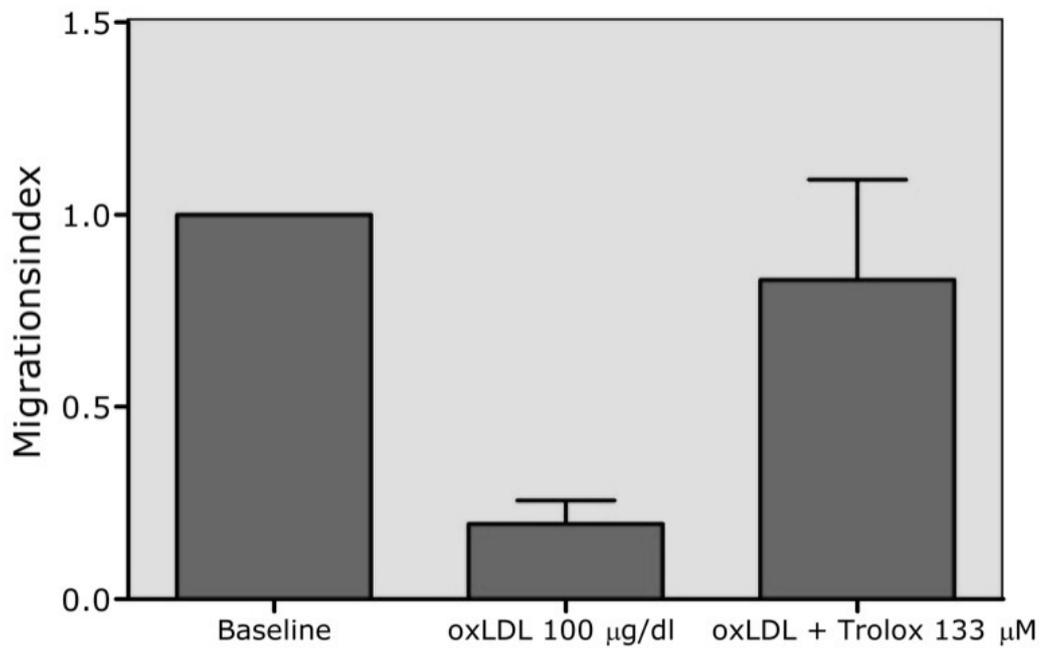


Abbildung 4.12: **Ergebnisse der Migration mit oxLDL und Trolox:** Unter Kostimulation von oxLDL mit Trolox nahm die Migration der RAW-Zellen im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit oxLDL wieder zu

Wiederum zeigte sich der signifikante Rückgang der Migration unter einer Stimulation mit oxLDL (Migrationsindex  $0,20 \pm 0,15$ ,  $p < 0,01$ ). Bei zusätzlicher Stimulation der RAW-Zellen mit 133 M Trolox nahm die Migration wieder signifikant zu: Migrationsindex  $0,83 \pm 0,64$ ,  $p = 0,053$ . Insgesamt führte die Troloxadgabe zu einer kompletten Aufhebung der Migrationshemmung durch oxLDL.



## 5 Diskussion

Die genaue Untersuchung von Teilprozessen in der Atherogenese in vivo gestaltet sich angesichts der Komplexität des menschlichen oder tierischen Organismus als schwierig, da eine kontrollierte Veränderung nur eines Parameters in einem Experiment nahezu unmöglich ist. Durch eine Reduktion der biologischen Komplexität eignen sich Zellkulturversuche mit Zelllinien in besonderer Weise für die Durchführung von Versuchen im Rahmen der Atheroskleroseforschung. Die Makrophagen der Linie RAW 264.7 haben sich in einer Vielzahl von Fragestellungen als Untersuchungsobjekt bewährt und wurden in der aktuellen Literatur bereits oft für die Bearbeitung ähnlicher Fragestellungen in vitro herangezogen.

In dieser Arbeit wurden die RAW-Zellen kultiviert und nach Inkubation mit verschiedenen chemischen und biochemischen Substanzen die Auswirkung auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob Niacin und/oder Nicotinamid die Migrationsfähigkeit der Makrophagen beeinflussen können.

Konkret werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welchen Effekt haben Niacin und Nicotinamid auf den durch oxLDL verursachten Migrationsarrest? Gibt es einen Unterschied in der Wirkung von Niacin oder Nicotinamid?
- Wodurch ist dieser Effekt zu erklären? Wie sieht ein möglicher Signalweg aus, auf den die Vitamine Einfluss nehmen? Welche Rolle spielen Antioxidantien, Peroxynitrit und iNOS?
- Wie fügen sich die Erkenntnisse in die aktuelle Literatur? Welche Konsequenzen ergeben sich daraus?

*Welchen Effekt haben Niacin und Nicotinamid auf den durch oxLDL verursachten Migrationsarrest? Gibt es einen Unterschied in der Wirkung von Niacin oder Nicotinamid?*

Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist komplex und bis heute noch nicht abschließend verstanden. Als wichtiger Meilenstein in der Entstehung atherosklerotischer Plaques gilt die Oxidation von LDL zu oxLDL.

Das oxLDL bewirkt bei den Schaumzellen eine Lokomotionshemmung, sodass sie den Plaque nicht mehr verlassen können und zudem die stattfindende lokale Entzündungsreaktion verstärken. Dieser Migrationsarrest beruht nach bisherigen Erkenntnissen auf einer anhaltenden FAK-Phosphorylierung, was zu einer vermehrten Aktinpolymerisation führt [Angeli et al., 2004, Park et al., 2012]. Eine Wiederherstellung der Lokomotion der Makrophagen ist damit eine Schlüsselaufgabe, durch die eine Regression der Atherosklerose erreicht werden könnte.

Seit 2003 ist bekannt, dass sich Niacin neben dem Lipidprofil-modifizierendem Effekt noch über andere Mechanismen günstig auf atherosklerotisch veränderte Gefäße auswirkt [Rosenson, 2003, Ganji et al., 2009]. Zu diesen Mechanismen werden auch Effekte auf die Zellmobilisierung von Endothelialen Vorläuferzellen (EPC) gezählt. So untersuchten Huang et al. die Auswirkung von Niacin auf EPC-Mobilisierung an diabetischen Mäusen. Hier zeigten an Diabetes erkrankte Mäuse ohne Behandlung mit Niacin eine signifikant geringere EPC-Mobilisierung als solche, die zuvor mit 40mg/kg Niacin pro Tag behandelt wurden [Huang et al., 2012].

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass Niacin und Nicotinamid Substanzen darstellen, die einen Einfluss auf die Zellmobilität (in diesem Fall von hämatologischen Zellen) und den oben beschriebenen Migrationsarrest haben können: In den Migrationsversuchen wurden die RAW-Zellen in verschiedene Gruppen aufgeteilt, darunter nicht stimulierte Zellen als Kontrolle, mit oxLDL stimulierte Zellen und sowohl mit oxLDL als auch mit Niacin/Nicotinamid stimulierte Zellen. Mit der oxLDL-Stimulation konnte der bereits bekannte Migrationsarrest reproduziert werden: Zellen migrierten signifikant weniger. Fügte man dem oxLDL allerdings zusätzlich Niacin oder Nicotinamid hinzu, wurde der Migrationsarrest wieder aufgehoben, wobei sowohl die Konzentrationen 100 $\mu$ M und 1mM Niacin, als auch 1mM und 3mM Nicotinamid wirksam waren. Der Migrationsindex, der für die Baseline-Kammer als 1 festgelegt wurde, konnte mit Werten zwischen 0,9 und 1,1 nahezu vollständig wiederhergestellt werden.

Bemerkenswert ist, dass Nicotinamid, als bisher nur wenig in der Atheroskleroseforschung untersuchte Substanz, einen gleich starken, ggf. sogar etwas stärkeren Effekt als Niacin aufweist.

Ohne vorherige Stimulation mit oxLDL haben Niacin und Nicotinamid keinen Effekt auf die Migration von RAW-Zellen. Die Migrationsindizes liegen durchgehend zwischen 1,0 und 1,1.

2014 veröffentlichte Daten unseres Labors beschreiben zudem Migrationsversuche mit Knochenmarkszellen (KM-Zellen) aus Wildtyp- und iNOS-Knockout-Mäusen. Nach Isolation und Kultivierung der KM-Zellen wurden diese entsprechend dem in 3.3 beschriebenen Vorgehen einer Migration unter Stimulation mit nicht oxidiertem LDL (nLDL), oxLDL und Niacin/Nicotinamid zugeführt. Die Stimulation mit nLDL diente dabei als Negativkontrolle: Nicht oxidiertes LDL sollte keinen Einfluss auf die Lokomotion der Knochenmarkszellen haben. Mit den KM-Zellen der Wildtyp-Mäuse konnten die in dieser Arbeit dargestellten Daten reproduziert werden: Unter Stimulation mit oxLDL nahm die Migration der Zellen signifikant ab und bei Ko-Stimulation mit 1mM Niacin bzw. 1mM Nicotinamid nahm die Migration wieder signifikant zu. Bei den iNOS-Knockout-Mäusen hingegen wurden die Migrationsindizes weder durch oxLDL noch durch Niacin oder Nicotinamid beeinflusst [Huang et al., 2014]. Auch bei diesen Versuchen deutet sich an, dass Nicotinamid einen möglicherweise etwas stärkeren Effekt auf die Aufhebung des Migrationsarrestes hat, als Niacin. Diese Beobachtung hat in den durchgeführten Versuchen allerdings bislang keine Signifikanz erreicht. Die oben beschriebenen Beobachtungen decken sich mit ähnlichen Erkenntnissen aus 2004: Hier untersuchten Du et al. die Auswirkung von Niacin auf die iNOS-Expression in Mäusen nach Behandlung mit Siliciumoxid - ein Auslöser für oxidativen Stress. Bei Vorbehandlung mit Niacin fiel die iNOS-Expression nach Siliciumoxid-Gabe deutlich geringer aus, als in der Kontrollgruppe [Du et al., 2004]. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung von iNOS in der Entstehung der Atherosklerose sowie den Effekt von Niacin auf die Induktion dieses Enzyms.

*Wodurch ist dieser Effekt zu erklären? Wie sieht ein möglicher Signalweg aus, auf den die Vitamine Einfluss nehmen? Welche Rolle spielen Antioxidation, Peroxynitrit und iNOS?*

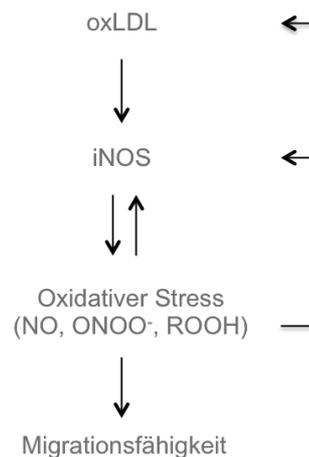
Um den oder die Wirkungsweise(n) von Niacin und Nicotinamid auf diesen Prozess der Atherogenese zu verstehen, müssen zunächst die in vitro beteiligten Vorgänge und Strukturen und ihre Rolle auf die Migration identifiziert werden. Dazu wurden neben den Vitaminen auch Migrationsversuche mit dem Arachidonsäuremetabolit 15(s)-HPETE, mit dem NO- und Peroxynitrit-Donor Linsidomin (sin-1) und mit dem Antioxidans Trolox durchgeführt.

15(s)-HPETE entsteht an Orten hoher Belastung mit oxidativem Stress. Es wird über

den 15-Lipoxygenaseweg aus Arachidonsäure synthetisiert und gilt als Indikator für oxidativen Stress [Rao et al., 1996]. Zudem wirkt es über komplexe molekulargenetische Mechanismen selbst proatherogen. Diese Substanz hatte in den hier durchgeführten Migrationsversuchen einen hemmenden Effekt auf die Lokomotion der RAW-Zellen, was die wichtige Rolle von oxidativem Stress in der Atherogenese unterstreicht.

Linsidomin, ein potenter ONOO<sup>-</sup>-Donor, vermochte es, in den durchgeführten Versuchen die Migration ebenfalls signifikant zu hemmen. Dies wiederum unterstreicht die Bedeutung und den direkten Effekt reaktiver Sauerstoffspezies, insbesondere ONOO<sup>-</sup>, auf Makrophagen.

Expressions-Analysen zeigten zudem, dass RAW-Zellen unter Stimulation mit oxLDL eine signifikant höhere iNOS-Expression aufwiesen, als solche, die nicht stimuliert wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit vorangegangenen Versuchen und rückt iNOS weiter in den Fokus der Atherogenese [Kuhlencordt et al., 2001, Gu et al., 2013].



Fasst man die bisherigen Erkenntnisse zusammen, ergibt sich folgende Signalkaskade: oxLDL führt zu einer gesteigerten iNOS-Expression in den RAW-Zellen, was wiederum zu einer gesteigerten NO-Synthese und damit zu vermehrtem Vorliegen von oxidativem Stress führt. Dieser führt seinerseits zu einem herabgesetzten Migrationsverhalten von Makrophagen (s. 1.2.2), sowie vermutlich auch zu einer verstärkten Oxidation von bislang nicht-modifiziertem LDL. Hierbei kann folglich von einem positiven Feedback-Mechanismus ausgegangen werden: Das den oxidativen Stress repräsentierende Peroxynitrit führt selbst, neben vielen anderen Stoffen, nachgewiesenermaßen zu einer Erhöhung der iNOS-Expression und verstärkt damit die hier zugrunde gelegte Signalkaskade [Cooke Davidge, 2002].

Diesen Pfad zugrunde legend, scheinen iNOS-Expression und der durch das Enzym vermittelte oxidative Stress die zentrale Ursache für den Migrationsarrest der Makro-

phagen in unseren Versuchen zu sein. Deshalb wurden ebenfalls Migrationsversuche mit dem Antioxidans Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin-E-Derivat, durchgeführt, was die Migrationsfähigkeit der RAW-Zellen nach Inkubation mit oxLDL wiederherstellte. Als Ursache für diesen Effekt ist eine direkte antioxidative Wirkung des Trolox' auf oxLDL und/oder auch indirekt über die ROS denkbar, so ist Trolox als Radikalfänger und Antioxidans bereits länger bekannt [Alberto et al., 2013]. In beiden Fällen untermauert das Ergebnis die Bedeutung von oxidativem Stress in unserem Modellversuch.

Niacin und Nicotinamid können in diesem Pfad auf jeder Stufe ansetzen. Dabei sind mehrere Wirkungen genauso möglich, wie eine isolierte Wirkung der Stoffe, oder unterschiedliche für beide Substanzen.

Denkbar ist eine Modifikation des oxidierten LDLs zu einem Produkt, das keinen negativen Einfluss auf die Migration hat. So ist zum Beispiel eine Reduktion von oxLDL zu nLDL naheliegend. Genauso könnten die Vitamine direkt oder indirekt Einfluss auf die Genexpression von iNOS nehmen und so, oder über Translationsmodifikationen, eine Amplifikation und Neusynthese des Enzyms verhindern. Des Weiteren kann auch ein Effekt auf ROS die Migration beeinflussen. So ist es möglich, dass die Vitamine ihre Synthese hemmen oder die Zellen zum beschleunigten Abbau anregen.

Außerhalb dieser Kaskade kann es auch möglich sein, dass Niacin und Nicotinamid lediglich die Aufnahme von oxLDL über bislang unbekannte Mechanismen hemmen und somit die RAW-Zellen vor den Auswirkungen des modifizierten Lipoproteins bewahren.

In einem im Dezember 2014 veröffentlichten Paper unseres Labors wurden RAW-Zellen auf das Aufnahmeverhalten von oxLDL untersucht. Die Bedingungen der Zellkultur und die Zelllinie waren dabei identisch zu Kapitel 3.1. Dabei wurde mit Fluorochrom fluoreszenzmarkiertes Dil-oxLDL mit den RAW-Zellen inkubiert und die Aufnahme des oxLDLs über eine Durchflusszytometrie quantifiziert [Huang et al., 2014].

RAW-Zellen nahmen unter den beschriebenen Konditionen deutliche Mengen an oxLDL auf, wobei Niacin in keiner getesteten Konzentration (100  $\mu$ M und 1 mM) einen Einfluss auf die Inkorporation der Lipide hatte. Nicotinamid (1 mM und 3 mM) hatte lediglich in der höheren Konzentration einen signifikanten, aber nur leichten Effekt auf den oxLDL-Gehalt der Makrophagen. Der Effekt von Niacin und Nicotinamid auf die Migration wird durch eine Beeinflussung des oxLDL-Gehalts der Zellen also nicht erklärt.

Als nächste Stufe in der beschriebenen Kaskade wurde das iNOS-Gen untersucht: Hier zeigte sich zunächst eine Zunahme der Expression bei einer oxLDL-Stimulation. Bei Ko-Inkubation mit den untersuchten Vitaminen zeigte sich ein signifikanter Rückgang der iNOS-Expression durch Niacin und Nicotinamid [Huang et al., 2014].

Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass die iNOS eine zentrale Rolle im Migrati-

onsarrest der Schaumzellen spielt. Eine Erhöhung der Expression durch oxidierte Lipoproteine mit konsekutiv vermehrter NO-Synthese könnte über die Produktion weiterer reaktiver Sauerstoffspezies die Lokomotion der Makrophagen im atherosklerotischen Plaque beeinflussen. Dies würde bedeuten, dass nach oxLDL-Stimulation vermehrt Stickstoffmonoxid sowie Peroxynitrit und Superoxide nachweisbar sein sollten.

Diese Hypothese wurde durch ergänzende Versuche unseres Labors 2014 untersucht: Mit Hilfe von Elektronen-spinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) wurden intrazelluläre Superoxid- und NO-Konzentrationen bestimmt, zwei wichtige Vertreter für oxidativen Stress.

Die ESR-Spektroskopie macht sich das Radikalverhalten der ROS zunutze: Durch die selektive Absorption elektromagnetischer Wellen werden ungepaarte Elektronen im Magnetfeld auf unterschiedliche Energieniveaus übertragen. Dabei ist das Absorptionsverhalten dieser Elektronen eine Größe des Spins und es entsteht ein Absorptionsspektrum mit einem charakteristischen Peak. Durch Flächenintegration lässt sich daraus die Konzentration der Radikale berechnen.

Bei der Messung der intrazellulären NO-Produktion mittels ESR zeichnete sich ab, dass sich diese bei Stimulation mit oxLDL signifikant erhöht. Bei Stimulation mit nLDL konnte dieser Effekt nicht erreicht werden. Eine Kostimulation mit Niacin bzw. Nicotinamid führte trotz erniedrigter iNOS-Expression nicht zu einem Rückgang in der NO-Synthese: mit oxLDL stimulierte Zellen wiesen auch bei Ko-Inkubation mit Niacin bzw. Nicotinamid erhöhte intrazelluläre NO-Produktion auf. Gemäß der Reaktionsgleichung in Abb. 3 reagiert dieses NO mit Superoxid zu Peroxynitrit. Folglich, und in Übereinstimmung mit dem Massenwirkungsgesetz bei (bio)chemischen Gleichgewichtsreaktionen, nimmt nach Stimulation mit oxLDL die intrazelluläre Konzentration von Superoxid ab. Auch dies konnte in einem Versuch unseres Labors reproduziert werden: Mittels ESR wurden intrazelluläre Superoxidkonzentrationen in RAW-Zellen gemessen. Bei Inkubation mit oxLDL ließ sich eine signifikante Abnahme der Superoxidkonzentration nachweisen [Huang et al., 2014].

In einem weiteren Versuch unseres Labors, wurde Nitrotyrosin, ein Indikator für Peroxynitrit, ebenfalls intrazellulär mittels Western-Blot bestimmt. Die Quantifizierung der Bandenintensität zeigte, dass eine Stimulation mit nLDL keine Auswirkungen auf das Vorliegen von Nitrotyrosin hat. Wurden die Zellen hingegen mit oxLDL stimuliert, stieg das untersuchte Nitrotyrosin signifikant an. Gab man neben dem oxLDL noch Niacin bzw. Nicotinamid hinzu fiel der Anstieg deutlich geringer aus [Huang et al., 2014].

Extrazellulär konnten wir die Peroxynitritkonzentration auch direkt mittels ESR bestimmen. Hier stieg die Konzentration unter Inkubation mit oxLD (nicht jedoch

unter Inkubation mit nLDL) signifikant an. Bei Ko-Inkubation von oxLDL mit Niacin bzw. Nicotinamid konnte dieser Anstieg nicht beobachtet werden [Huang et al., 2014].

Aus den oben beschriebenen ergänzenden Versuchen unseres Labors, ergibt sich ein einheitliches Bild über die Auswirkung von oxidiertem LDL auf die Situation der reaktiven Sauerstoffspezies in den RAW-Zellen: Das oxLDL führt über eine gesteigerte iNOS-Expression zu vermehrt vorliegendem NO. Dieses reagiert mit Superoxiden zu Peroxynitrit, welches folglich sowohl intra- als auch extrazellulär vermehrt vorliegt.

Unter der Annahme, dass Peroxynitrit über einen (in)direkten FAK-vermittelten Weg die Zellmotilität und damit das Migrationsverhalten der Makrophagen beeinflusst, stellt sich die Frage, wo in dieser Kaskade die Vitamine Niacin und Nicotinamid ansetzen, um die Migration zu beeinflussen. Ein Effekt dieser Vitamine auf die oxLDL-Aufnahme wurde hier bereits ausgeschlossen. Der nachgewiesene Effekt auf die iNOS-Expression ist zwar nachgewiesen, erklärt jedoch den Effekt auf das Migrationsverhalten nicht hinreichend, da die Synthese von NO auch unter Kostimulation mit den Vitaminen nicht wesentlich abnimmt.

Spätestens auf der Ebene des Peroxynitrits wurde nun allerdings ein signifikanter Effekt des Niacins und des Nicotinamids beschrieben. Als plausible Erklärung kommt ein Mechanismus in Frage, der bislang noch nicht untersucht wurde: Sowohl Niacin als auch Nicotinamid sind in menschlichen und tierischen Organismen Substrate für die Synthese von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und vor allem von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) [Revollo et al., 2004]. Diese Moleküle haben ein Redoxpotential von -320 mV und zählen damit zu den stärksten Antioxidantien, die Zellen herstellen können. Während NAD seine Funktion vor allem im Katabolismus ausübt, findet man NADP überwiegend als Ko-Enzym der Glutathion-Reduktase. Dieses Enzym reduziert das Glutathiondisulfid (GSSG) zu einem der wichtigsten Antioxidantien fast aller Zellen des menschlichen Körpers: Glutathion (GSH) [Kirsch de Groot, 2001]. Dieses Tripeptid schützt zelluläre Makromoleküle wie Lipide, Proteine und DNA vor freien Radikalen (z.B. Peroxynitrit), indem es diese durch Elektronenübertragung in einer Redoxreaktion unschädlich macht. Dabei werden zwei Glutathion-Moleküle zu GSSG oxidiert, was wiederum unter Mitwirkung von NADP zu GSH reduziert werden muss [Schafer Buettner, 2001]. Es kann folglich angenommen werden, dass bei Vorliegen freier Radikale vermehrt GSSG unter Verbrauch von GSH anfällt.

Wir ergänzten unsere Versuchsreihe also um die Konzentrationsbestimmungen der Enzyme GSSG und GSH mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*HPLC*, ein Chromatographieverfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung u.a. polarer und unpolarer organischer Verbindungen in allen Molekulargewichtsbereichen). Die Konzentrationen von GSSG und GSH wurden bestimmt und miteinander ins Verhält-

nis gesetzt. Die Ergebnisse stellen den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und GSH anschaulich dar: Bei Stimulation der RAW-Zellen mit oxLDL fällt wie oben ausgeführt vermehrt Peroxynitrit an. Wird gleichzeitig Niacin bzw. Nicotinamid kostimuliert, nimmt der Quotient wiederum ab. Folgende Hypothese lässt sich aus dieser Beobachtung aufstellen: Das vermehrt anfallende Peroxynitrit wird durch Gluthation-Peroxidase unter Oxidation von GSH neutralisiert [Sies et al., 1997], wodurch vermehrt GSSG anfällt - der Quotient GSSG/GSH steigt. Die Wirkung des Niacins bzw. des Nicotinamids erklärt sich möglicherweise durch eine vermehrte NADP-Synthese. Dieses führt zu einer schnelleren Reduktion des GSSG zu GSH und ermöglicht dadurch eine effektivere Neutralisierung des Peroxynitrits. Diese Hypothese wird durch die gemessenen GSSG/GSH-Quotienten gestützt.

Ob nun die Effekte beider Vitamine auf demselben Mechanismus beruhen, oder ob sie unterschiedliche Ansatzpunkte in der unterstellten Signalkaskade haben, konnte bislang nicht untersucht werden. Auch ist weiter unklar auf welchem Weg sie die iNOS-Expression nach einer oxLDL-Stimulation hemmen. Dies wird sicherlich Gegenstand weiterführender Forschung.

*Wie fügen sich die Erkenntnisse in die aktuelle Literatur? Welche Konsequenzen ergeben sich daraus?*

Der Effekt von oxidiertem LDL auf die Lokomotion von Makrophagen wurde, wie eingangs erwähnt, bereits von anderen Autoren beschrieben (Angeli et al., 2004; Park et al., 2009; Park et al., 2012). Auch die günstigen Effekte von Niacin auf das Lipidprofil des menschlichen Organismus und andere antiatherogenen Effekte wurden mehrfach untersucht (siehe 1.3). Der Effekt auf mit oxLDL oder anderen Cholesterinen behandelte Makrophagen fand bis jetzt allerdings nur begrenzt Eingang in die Atheroskleroseforschung.

Lukasova et al. berichteten 2011 von einem gesteigerten Cholesterinefflux aus Makrophagen unter Behandlung von WT-Mäusen mit Niacin im Gegensatz zu GPR109A-knockout-Mäusen (Lukasova et al., 2011). Dieser Erkenntnis widerspricht Chai et al., nachdem festgestellt wurde, dass der GPR109A-Rezeptor bei Makrophagen, die zu Schaumzellen transformieren, herunterreguliert wird. Folglich habe Niacin keinen Effekt auf den Cholesterinefflux (Chai et al., 2013). Unsere Versuche zum oxLDL-Gehalt in damit inkubierten RAW-Zellen stimmen mit diesen Ergebnissen überein.

Der migrationsfördernde Effekt von Niacin und Nicotinamid auf Schaumzellen beruht unserer Erkenntnis nach auf einer bislang nicht näher untersuchten Hemmung des oxidativen Stresses mithilfe des zelleigenen Antioxidans Glutathion, dessen Reduktion

unter enzymatischer Mitwirkung des NADP gelingt.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Strukturen auf ihre antioxidativen Eigenschaften untersucht. Unter anderem wurde der Effekt des pflanzlichen Farbstoff Celastrol auf atherosklerotische Vorgänge *in vitro* und *in vivo* berichtet (Gu et al., 2013; Zhu et al., 2014). Zu Niacin und vor allem zu Nicotinamid wurden bislang nur wenige Studien in Hinblick auf antioxidative Wirkung und den Einfluss auf das Glutathion-System veröffentlicht. In diesem Zusammenhang ist allerdings auf eine Studie von Ganji et al. aus dem Jahre 2009 hinzuweisen: Dort wurde beschrieben, dass Niacin die Produktion von ROS, VCAM-1, MCP-1 und den TNF-alpha-Signalweg in Endothelzellen der menschlichen Aorta signifikant hemmt. Zudem wurden erhöhte NADP-Werte und ein vermehrtes Vorliegen von reduziertem GSH nachgewiesen (Ganji et al., 2009).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Zusammenhänge lassen sich gut mit diesen Erkenntnissen vereinbaren und legen nahe, dass Niacin neben seinen lipidmodifizierenden Eigenschaften auch über andere Wege die Atherosklerose günstig beeinflussen kann.

Zwar konnten die genauen Auswirkungen der Vitamine Niacin und Nicotinamid auf das GSH/GSSG-System und deren Effektkaskade auf ROS in dieser Arbeit nicht identifiziert werden, jedoch legen die hier zusammengefassten Erkenntnisse ein sehr viel breiteres Wirkspektrum der Vitamine nahe, als bislang angenommen. Vor allem aber beweisen sie zum wiederholten Male die Bedeutung oxidativer Belastung auf die Atherogenese.

Gegenstand weiterer Forschung ist der Zusammenhang von oxidiertem Low-density-Lipoprotein, Peroxynitrit und anderen reaktiven Sauerstoffspezies und der Phosphorylierung der Focal Adhesion Kinase. Zudem ist es denkbar, dass die bislang schmale Indikation für Niacin (bzw. die fehlende Indikation für Nicotinamid) bei Fettstoffwechselstörungen bei weiteren Nachweisen für deren antioxidativen Eigenschaften im menschlichen Organismus auf andere Fachbereiche der Medizin ausgeweitet wird. In diesem Zusammenhang kann man durchaus erwarten, dass Niacin eine erneute Zulassung in Deutschland erfährt. Eine Durchführungsverordnung der Europäischen Kommission deutet bereits in diese Richtung: So wurden am 04. Juli 2013 Niacin und Nicotinamid als Zusatzstoffe in Futtermitteln für alle Tierarten auf unbestimmte Zeit zugelassen.



## 6 Zusammenfassung

Die gesundheitlichen Konsequenzen und die sozioökonomischen Folgen der Atherosklerose sind immens und werden auch in den kommenden Jahren viele Ressourcen binden. Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, die pathophysiologischen Vorgänge dieser krankhaften Gefäßveränderungen abschließend zu beschreiben. Ebenso fehlen medikamentöse Ansatzpunkte die Formation atherosklerotischer Plaques wirksam zu verhindern oder bereits sklerotisch veränderte Gefäßabschnitte in ihren Ausgangszustand zurückzuführen.

Bei der Atherogenese spielt der durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Migrationsarrest der mit oxLDL (oxidierte Form des Low-density Lipoproteins) beladenen Makrophagen im atherosklerotischen Plaque eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit das B<sub>3</sub>-Vitamin Niacin und sein Derivat Nicotinamid die durch oxidativen Stress verursachte Hemmung der Migration von Makrophagen beeinflusst.

Hierzu wurden die Auswirkungen von Niacin und Nicotinamid sowie anderer Antioxidantien auf die Migration von Zellen der Zelllinie RAW264.7 untersucht, nachdem diese vorher mit oxLDL behandelt wurden. Die Migration wurde durch ein Boyden-Chamber-Prinzip simuliert und die migrierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie gezählt. Zudem wurde der Einfluss von oxLDL und Niacin/Nicotinamid auf iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) mittels Real-Time PCR untersucht.

Unter Stimulation mit oxLDL konnte die bereits in der Literatur beschriebene Migrationshemmung nachvollzogen werden. So lag der Migrationsindex nach Stimulation mit oxLDL lediglich bei 0,59 (Zellen ohne Behandlung: 1). Bei Ko-Stimulation von oxLDL mit Niacin oder Nicotinamid konnte der Migrationsindex auf Werte zwischen 0,9 und 1,09 angehoben werden. Die Ergebnisse waren bei nahezu allen getesteten Konzentrationen signifikant. Ähnliche Ergebnisse konnten mit dem Antioxidans Trolox beobachtet werden.

Die Untersuchung der iNOS unter den gleichen Stimulationsbedingungen ergab, dass die Expression bei Behandlung mit oxLDL signifikant ansteigt und unter Ko-Stimulation mit den Vitaminen wiederum sinkt. Letztere Beobachtung erreichte in dieser Arbeit jedoch keine Signifikanz.

Die Beobachtungen zeigen, dass es sowohl mit Niacin als auch mit Nicotinamid möglich ist, den oxLDL-vermittelten Migrationsarrest von Makrophagen aufzuheben

und die Expression von iNOS zu senken. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse mit dem Antioxidans Trolox liegt die Vermutung nahe, dass der durch oxLDL verursachte oxidative Stress in Form von Stickstoffmonoxid und anderen daraus resultierenden reaktiven Sauerstoffverbindungen eine wesentliche Rolle in der Migration von Makrophagen einnehmen. Weitergehende Versuche unseres Labors deuten eine mögliche Erklärung dieser beobachteten Zusammenhänge an: Das im menschlichen Organismus antioxidativ wirkende Tripeptid Glutathion konnte bei Stimulation nach oben beschriebenen Schema mit Niacin bzw. Nicotinamid vermehrt in seiner reduzierten (antioxidativ wirkenden) Form nachgewiesen werden. Schließlich benötigt es zur Reduzierung das Ko-Enzym NADP (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat), ein Molekül auf Basis des Niacins.

Es ist denkbar, dass Niacin oder sei Derivat Nicotinamid nach weiteren Belegen über ihre antioxidative Wirkung unter einem neuen pharmakologischen Gesichtspunkt betrachtet werden und sich ggf. neben der Atherosklerose noch andere Indikationsstellungen ergeben.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Die Wirkung von Niacin und Nicotinamid auf Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Fendler, Markus



# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Peter J. Kuhlencordt  
für das Überlassen des Themas  
und seine Unterstützung und konstruktive Kritik.

Für die Übernahme des Referates danke ich  
Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann.

Insbesondere möchte ich mich bei Hua Huang und Pirkko Kölle  
bedanken, die mir mit viel Engagement bei meiner  
experimentellen Arbeit geholfen haben.

Ich danke weiterhin meiner Familie,  
die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich bei dieser Arbeit  
in vieler Hinsicht unterstützt hat.



## Literaturverzeichnis

- [Alberto et al., 2013] **Alberto ME, Russo N, et al.** (2013) A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment., *Physical chemistry chemical physics*, 15(July 2015):4642–50, ISSN 1463-9084.
- [Altschul et al., 1955] **Altschul R, Hoffer A, et al.** (1955) Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man, *Arch Biochem Biophys*, 54(2):558–559.
- [Angeli et al., 2004] **Angeli V, Llodra J, et al.** (2004) Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization, *Immunity*, 21(4):561–574.
- [Aoki et al., 1997] **Aoki T, Suzuki Y, et al.** (1997) Effect of antioxidants on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells, *Adv Exp Med Biol*, 411:503–511.
- [Blumenthal Michos, 2009] **Blumenthal RS, Michos ED** (2009) The HALTS trial—halting atherosclerosis or halted too early?, *N Engl J Med*, 361(22):2178–2180.
- [de Boer et al., 1999] **de Boer OJ, van der Wal AC, et al.** (1999) Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?, *Cardiovasc Res*, 41(2):443–449.
- [Bogdan, 2001] **Bogdan C** (2001) Nitric oxide and the immune response, *Nat Immunol*, 2(10):907–916.
- [Cai Harrison, 2000] **Cai H, Harrison DG** (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress, *Circ Res*, 87(10):840–844.
- [Carlson, 1963] **Carlson LA** (1963) Studies on the effect of nicotinic acid on catecholamine stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro, *Acta Med Scand*, 173:719–722.
- [Carr et al., 2000] **Carr AC, McCall MR, et al.** (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(7):1716–1723.

- [Chauhan et al., 2003] **Chauhan SD, Seggara G, et al.** (2003) Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice, *FASEB J*, 17(6):773–775.
- [Chiu et al., 1997] **Chiu JJ, Wung BS, et al.** (1997) Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(12):3570–3577.
- [Collins Cybulsky, 2001] **Collins T, Cybulsky MI** (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?, *J Clin Invest*, 107(3):255–264.
- [Cominacini et al., 2000] **Cominacini L, Pasini AF, et al.** (2000) Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species, *J Biol Chem*, 275(17):12633–12638.
- [Conti DiGioacchino, 2001] **Conti P, DiGioacchino M** (2001) MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation, *Allergy Asthma Proc*, 22(3):133–137.
- [Cooke Davidge, 2002] **Cooke CL, Davidge ST** (2002) Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(2):C395–402.
- [Cuzzocrea et al., 2001] **Cuzzocrea S, Riley DP, et al.** (2001) Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury, *Pharmacol Rev*, 53(1):135–159.
- [Cyrus et al., 1999] **Cyrus T, Witztum JL, et al.** (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice, *J Clin Invest*, 103(11):1597–1604.
- [Dong et al., 1998] **Dong ZM, Chapman SM, et al.** (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis, *J Clin Invest*, 102(1):145–152.
- [Du et al., 2004] **Du Hk, Wang Sx, et al.** (2004) [Effect of niacin on nitric oxide synthase expression in rat lung exposed to silica]., *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine], 38(3):186–189, ISSN 0253-9624 (Print).
- [Forstermann, 1994] **Forstermann U** (1994) Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases, *Arzneimittelforschung*, 44(3A):402–407.

- [Forstermann Sessa, 2012] **Forstermann U, Sessa WC** (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur Heart J*, 33(7):829–37, 837a–837d.
- [Furnkranz et al., 2005] **Furnkranz A, Schober A, et al.** (2005) Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(3):633–638.
- [Ganji et al., 2009] **Ganji SH, Qin S, et al.** (2009) Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells, *Atherosclerosis*, 202(1):68–75.
- [Garcia et al., 1995] **Garcia JG, Davis HW, et al.** (1995) Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation, *J Cell Physiol*, 163(3):510–522.
- [Gawaz et al., 2000] **Gawaz M, Ruf A, et al.** (2000) Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors, *Thromb Haemost*, 83(6):915–922.
- [Gawaz et al., 2005] **Gawaz M, Langer H, et al.** (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis, *J Clin Invest*, 115(12):3378–3384.
- [Gimbrone Jr., 1999] **Gimbrone Jr MA** (1999) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis, *Thromb Haemost*, 82(2):722–726.
- [Green et al., 2008] **Green KN, Steffan JS, et al.** (2008) Nicotinamide restores cognition in Alzheimer’s disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau, *J Neurosci*, 28(45):11500–11510.
- [Gu et al., 1998] **Gu L, Okada Y, et al.** (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice, *Mol Cell*, 2(2):275–281.
- [Gu et al., 2013] **Gu L, Bai W, et al.** (2013) Celastrol prevents atherosclerosis via inhibiting LOX-1 and oxidative stress, *PLoS One*, 8(6):e65477.
- [Hansson, 2005] **Hansson GK** (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N Engl J Med*, 352(16):1685–1695.
- [Holzhauser et al., 2011] **Holzhauser E, Albrecht C, et al.** (2011) Nicotinic acid has anti-atherogenic and anti-inflammatory properties on advanced atherosclerotic

- lesions independent of its lipid-modifying capabilities, *J Cardiovasc Pharmacol*, 57(4):447–454.
- [van der Hoorn et al., 2008] **van der Hoorn JW, de Haan W, et al.** (2008) Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE\*3Leiden.CETP mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11):2016–2022.
- [Huang et al., 2014] **Huang H, Koelle P, et al.** (2014) Niacin Reverses Migratory Macrophage Foam Cell Arrest Mediated by oxLDL In Vitro, *PLoS One*, 9(12):e114643.
- [Huang et al., 2012] **Huang PH, Lin CP, et al.** (2012) Niacin improves ischemia-induced neovascularization in diabetic mice by enhancement of endothelial progenitor cell functions independent of changes in plasma lipids, *Angiogenesis*, 3:377–389, ISSN 09696970.
- [von Hundelshausen et al., 2005] **von Hundelshausen P, Koenen RR, et al.** (2005) Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium, *Blood*, 105(3):924–930.
- [Hwang et al., 1997] **Hwang SJ, Ballantyne CM, et al.** (1997) Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study, *Circulation*, 96(12):4219–4225.
- [Jaconello, 1992] **Jaconello P** (1992) Niacin versus niacinamide, *CMAJ*, 147(7):990.
- [Kim et al., 2001] **Kim PK, Zamora R, et al.** (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, *Int Immunopharmacol*, 1(8):1421–1441.
- [Kirsch de Groot, 2001] **Kirsch M, de Groot H** (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant?, *FASEB J.*, 15:1569–1574, ISSN 15306860.
- [Kuhlencordt et al., 2001] **Kuhlencordt PJ, Chen J, et al.** (2001) Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice, *Circulation*, 103(25):3099–3104.
- [Kuhnast et al., 2013] **Kuhnast S, Louwe MC, et al.** (2013) Niacin Reduces Atherosclerosis Development in APOE\*3Leiden.CETP Mice Mainly by Reducing NonHDL-Cholesterol, *PLoS One*, 8(6):e66467.

- [Lagrange et al., 1999] **Lagrange P, Romero IA, et al.** (1999) Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier, *Free Radic Biol Med*, 27(5-6):667–672.
- [Lavigne Karas, 2013] **Lavigne PM, Karas RH** (2013) The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression, *J Am Coll Cardiol*, 61(4):440–446.
- [Lecoeur, 2002] **Lecoeur H** (2002) Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases, *Exp Cell Res*, 277(1):1–14.
- [Libby, 2002] **Libby P** (2002) Inflammation in atherosclerosis, *Nature*, 420(6917):868–874.
- [Lim et al., 2012] **Lim SS, Vos T, et al.** (2012) A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*, 380(9859):2224–2260.
- [Liu Sundqvist, 1995] **Liu SM, Sundqvist T** (1995) Effects of hydrogen peroxide and phorbol myristate acetate on endothelial transport and F-actin distribution, *Exp Cell Res*, 217(1):1–7.
- [Lozano et al., 2012] **Lozano R, Naghavi M, et al.** (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet*, 380(9859):2095–2128.
- [Lukasova et al., 2011] **Lukasova M, Malaval C, et al.** (2011) Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells, *J Clin Invest*, 121(3):1163–1173.
- [Lum Roebuck, 2001] **Lum H, Roebuck KA** (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction, *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(4):C719–41.
- [Lusis, 2000] **Lusis AJ** (2000) Atherosclerosis, *Nature*, 407(6801):233–241.
- [Manning-Tobin et al., 2009] **Manning-Tobin JJ, Moore KJ, et al.** (2009) Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(1):19–26.

- [Mathers Loncar, 2006] **Mathers CD, Loncar D** (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030, *PLoS Med*, 3(11):e442.
- [Michos et al., 2012] **Michos ED, Sibley CT, et al.** (2012) Niacin and statin combination therapy for atherosclerosis regression and prevention of cardiovascular disease events: reconciling the AIM-HIGH (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Ou, *J Am Coll Cardiol*, 59(23):2058–2064.
- [Nash et al., 2012] **Nash KM, Rockenbauer A, et al.** (2012) Reactive nitrogen species reactivities with nitrones: theoretical and experimental studies, *Chem Res Toxicol*, 25(8):1581–1597.
- [Nathan Xie, 1994] **Nathan C, Xie QW** (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, *Cell*, 78(6):915–918.
- [Navab et al., 2004] **Navab M, Ananthramaiah GM, et al.** (2004) The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL, *J Lipid Res*, 45(6):993–1007.
- [Ngo et al., 2013] **Ngo JK, Pomatto LC, et al.** (2013) Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging, *Redox Biol*, 1(1):258–264.
- [Ozawa et al., 2004] **Ozawa N, Shichiri M, et al.** (2004) Laminar shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium, *Hypertens Res*, 27(2):93–99.
- [Park et al., 2009] **Park YM, Febbraio M, et al.** (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima, *J Clin Invest*, 119(1):136–145.
- [Park et al., 2012] **Park YM, Drazba JA, et al.** (2012) Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion, *Mol Biol Cell*, 23(16):3057–3068.
- [Podrez et al., 2000] **Podrez EA, Febbraio M, et al.** (2000) Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species, *J Clin Invest*, 105(8):1095–1108.
- [Proudfoot et al., 1998] **Proudfoot D, Skepper JN, et al.** (1998) Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein

- and low levels of osteopontin expression, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(3):379–388.
- [Rao et al., 1996] **Rao GN, Glasgow WC, et al.** (1996) Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity, *J Biol Chem*, 271(44):27760–27764.
- [Revollo et al., 2004] **Revollo JR, Grimm Aa, et al.** (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells, *Journal of Biological Chemistry*, 279(49):50754–50763, ISSN 00219258.
- [Rosenson, 2003] **Rosenson RS** (2003) Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid, *Atherosclerosis*, 171:87–96, ISSN 00219150.
- [Ross, 1999] **Ross R** (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease, *N Engl J Med*, 340(2):115–126.
- [Ross Glomset, 1976] **Ross R, Glomset JA** (1976) The pathogenesis of atherosclerosis, *N Engl J Med*, 295(7):369–377.
- [Ruggeri, 2002] **Ruggeri ZM** (2002) Platelets in atherothrombosis, *Nat Med*, 8(11):1227–1234.
- [Schafer Buettner, 2001] **Schafer FQ, Buettner GR** (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11):1191–1212, ISSN 08915849.
- [Sies et al., 1997] **Sies H, Sharov VS, et al.** (1997) Glutathione Peroxidase Protects against Peroxynitrite-mediated Oxidations, *The Journal of biological chemistry*, 272(44):27812–27817, ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- [Skalen et al., 2002] **Skalen K, Gustafsson M, et al.** (2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis, *Nature*, 417(6890):750–754.
- [Soga et al., 2003] **Soga T, Kamohara M, et al.** (2003) Molecular identification of nicotinic acid receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 303(1):364–369.
- [Steinberg, 1999] **Steinberg D** (1999) At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis, *J Clin Invest*, 103(11):1487–1488.
- [Steinbrecher et al., 1984] **Steinbrecher UP, Parthasarathy S, et al.** (1984) Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation

- and degradation of low density lipoprotein phospholipids, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(12):3883–3887.
- [Surjana et al., 2012] **Surjana D, Halliday GM, et al.** (2012) Oral nicotinamide reduces actinic keratoses in phase II double-blinded randomized controlled trials, *J Invest Dermatol*, 132(5):1497–1500.
- [Tummala et al., 2000] **Tummala PE, Chen XL, et al.** (2000) NF- kappa B independent suppression of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 gene expression by inhibition of flavin binding proteins and superoxide production, *J Mol Cell Cardiol*, 32(8):1499–1508.
- [Tunaru et al., 2003] **Tunaru S, Kero J, et al.** (2003) PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect, *Nat Med*, 9(3):352–355.
- [Vermes et al., 1995] **Vermes I, Haanen C, et al.** (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods*, 184(1):39–51.
- [Villines et al., 2012] **Villines TC, Kim AS, et al.** (2012) Niacin: the evidence, clinical use, and future directions, *Curr Atheroscler Rep*, 14(1):49–59.
- [Widdison et al., 2007] **Widdison S, Ashley GR, et al.** (2007) Characterisation of bovine inducible nitric oxide synthase, *Vet Immunol Immunopathol*, 117(3-4):302–309.
- [Wood et al., 2000] **Wood JG, Johnson JS, et al.** (2000) Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats, *J Appl Physiol*, 89(4):1561–1568.
- [World Health Organization, 2011] **World Health Organization**, Global status report on noncommunicable diseases 2010, 1, WHO, 2011, ISBN ISBN 978 92 4 156422 9.
- [Wu et al., 2010] **Wu BJ, Yan L, et al.** (2010) Evidence that niacin inhibits acute vascular inflammation and improves endothelial dysfunction independent of changes in plasma lipids, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(5):968–975.
- [Wu et al., 2012] **Wu BJ, Chen K, et al.** (2012) Niacin inhibits vascular inflammation via the induction of heme oxygenase-1, *Circulation*, 125(1):150–158.
- [Yao et al., 2013] **Yao L, Heuser-Baker J, et al.** (2013) Bone marrow endothelial progenitors in atherosclerotic plaque resolution, *Organogenesis*, 9(1):29–33.

- 
- [Zhang et al., 2005] **Zhang Y, Schmidt RJ, et al.** (2005) Niacin mediates lipolysis in adipose tissue through its G-protein coupled receptor HM74A, *Biochem Biophys Res Commun*, 334(2):729–732.
- [Zhao Davis, 1998] **Zhao Y, Davis HW** (1998) Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells, *J Cell Physiol*, 174(3):370–379.