UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Cardiovascular Research Center

Direktor: Prof. Dr. Stefan Blankenberg

Einfluss von nitrierten Fettsäuren auf die Angiogenese

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Laura Müller aus Krefeld

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.02.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Tanja Rudolph

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Edzard Schwedhelm

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: PD Dr. Andrea Horst

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitu	ing		6
	1.1 Ang	giog	enese	6
	1.1.1	Re	gulation der Angiogenese	8
	1.1.2	Ang	giogenese und Inflammation	11
	1.2 Nit	rierte	e Fettsäuren	12
	1.2.1	Bilo	dung	12
	1.2.2	Bio	logische Eigenschaften	14
	1.2.3	Zel	llsignalaktivitäten	15
	1.2.	3.1	cGMP-abhängige Vasorelaxation	15
	1.2.	3.2	Hemmung inflammatorischer Zellfunktionen	16
	1.2.	3.3	Steigerung der HO-1-Expression	16
	1.2.	3.4	Steigerung der eNOS-Expression	17
	1.2.	3.5	Hemmung von NF-κB	17
	1.2.	3.6	Aktivierung von PPAR	18
	1.2.	3.7	Aktivierung von Keap1/Nrf2	18
	1.2.	3.8	Hemmung des AT ₁ Rezeptors	19
	1.2.	3.9	Hemmung von STAT-1	19
2	Zielsetz	zung]	21
3	Materia	al un	d Methoden	22
	3.1 Ma	teria	al	22
	3.1.1	Tes	stsubstanz OA-NO ₂	22
	3.1.2	We	eitere Substanzen	22
	3.1.3	Ма	terial	23
	3.1.4	Put	ffer und Lösungen	
	3.1.5	Zel	llen	
	3.1.6	Zel	llkulturmedien	
	3.1.7	Ge	nexpressions-Assays	
	3.1.8	Re	aktionskits	25

	3.	1.9	Lab	orgeräte, Apparaturen und Software	25
	3.2	Me	thod	en	26
	3.2	2.1	Zell	kultur	26
		3.2.	1.1	Verwendete Zelllinien	26
		3.2.	1.2	Kultivierung der Zellen	26
	3.2	2.2	Scr	atch Assay	27
	3.	2.3	Tub	be Formation Assay	28
	3.	2.4	Spr	outing Assay (Sphäroidkultur Assay)	29
		3.2.	4.1	Herstellung von Methocel	30
		3.2.	4.2	Gewinnung von Collagen aus Rattenschwänzen	31
		3.2.	4.3	Versuchstag 1	32
		3.2.	4.4	Versuchstag 2	33
		3.2.	4.5	Versuchstag 3	33
	3.	2.5	RN	A-Analyse	34
		3.2.	5.1	Isolation von RNA aus der Zellkultur	34
		3.2.	5.2	Agarosegelelektrophorese	35
		3.2.	5.3	Reverse Transkription	36
		3.2.	5.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	36
	3.3	Sta	tistis	che Auswertung der experimentellen Arbeiten	39
4	Erg	jebn	isse		40
	4.1	De	r Ein	fluss von OA-NO ₂ auf die Migration von HUVECs im Scratch	
		As	say		40
	4.2	De	r Ein	fluss von OA-NO ₂ auf die unstimulierte	
		Ka	pillar	röhrchenbildung (Tube Formation) von HUVECs	41
	4.3	De	r Ein	fluss von OA-NO ₂ auf das Sprouting von HUVECs	42
	4.4	Qu	antita	ativer Nachweis von PTEN, HO-1, VEGF-A, VEGFR-1 und	
		VE	GFR	2-2 mittels qRT-PCR	44
5	Dis	kus	sion .		47
	5.1	OA	-NO	2 induziert die Angiogenese <i>in vitro</i>	47

	5.2	OA-NO ₂ induziert die Genexpression von HO-1 und VEGFR-1 51		
	5.3	Therapeutische Konsequenz	. 53	
	5.4	Limitationen der experimentellen Arbeit	. 55	
	5.5	Ausblick	. 56	
6	Zu	sammenfassung	. 57	
7	Su	mmary	. 58	
8	Ab	okürzungsverzeichnis 59		
9	Lite	eraturverzeichnis	. 64	
10	D	anksagung	. 74	
11	L	ebenslauf	. 75	
12	E	idesstattliche Versicherung		

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

Für das Leben aerober Organismen ist Sauerstoff von essentieller Bedeutung. Der Sauerstofftransport zu entfernten Organen kann bei primitiven Tieren, wie zum Beispiel dem Wurm Caenorhabditis elegans oder der Fruchtfliege Drosophila melanogaster direkt durch Diffusion des Gases durch den Körper erfolgen. In entwickelten Spezies, wie dem Menschen, verteilt ein vaskuläres Netzwerk Sauerstoff im Blut zu entfernten Zellen (Carmeliet, 2005). Dieses Gefäßnetzwerk entwickelt sich während der Embryogenese in drei Schritten: der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Arteriogenese. In der Vaskulogenese organisieren sich endotheliale Vorläuferzellen, sogenannte Angioblasten, zu einem primitiven vaskulären Labyrinth aus schmalen Kapillaren. Während der darauffolgenden Angiogenese dehnt sich der vaskuläre Plexus durch Gefäßaussprossung stark aus und es entwickelt sich ein sehr gut organisiertes Netzwerk aus größeren Gefäßen, die sich zu kleineren verästeln. Schließlich werden entstehende Endothelzellkanäle während der Arteriogenese durch Perizyten und glatte Muskelzellen bedeckt, was zur Stärkung der Gefäßstruktur führt und eine Regulierung der Gefäßperfusion ermöglicht (Carmeliet, 2005). Im adulten Organismus ist die Ausbildung des Gefäßnetzwerkes in der Regel abgeschlossen und die meisten Blutgefäße befinden sich im Ruhezustand. Die Angiogenese kommt hier lediglich in den Ovarien während des Menstruationszyklus und in der Plazenta während der Schwangerschaft vor. Dennoch behalten Endothelzellen ihre besondere Fähigkeit, sich schnell als Antwort auf einen physiologischen Stimulus, wie zum Beispiel eine Hypoxie, teilen zu können. So wird die Angiogenese beispielweise während der Wundheilung erneut aktiviert (Carmeliet, 2003).

Die Regulation der Angiogenese unterliegt Stimulatoren und Inhibitoren, die sich im gesunden Organismus in der Regel im Gleichgewicht befinden. Ein dauerhaftes Ungleichgewicht der angiogenen Faktoren stellt einen wichtigen Pathomechanismus zahlreicher Krankheiten dar (Carmeliet, 2005). So ist ein Überwiegen an Stimulatoren typischerweise bei malignen Tumoren oder entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Arthritis zu beobachten, während eine unzureichende Aktivierung der Angiogenese etwa an der Entstehung einer Myokardischämie oder Präeklampsie beteiligt ist (Carmeliet, 2005). Insgesamt sind über 70 Krankheiten in der Literatur beschrieben, die mit einer fehlregulierten Angiogenese assoziiert sind. So würden schätzungsweise mehr als 500 Millionen Menschen weltweit von einer angiogenen Therapie profitieren (Carmeliet, 2005).

Die Angiogenese ist definiert als das Wachstum von kleinen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Carmeliet, 2005). Dieser Prozess verläuft in mehreren Schritten. Er beginnt mit einer durch NO-vermittelten Vasodilatation und verstärkten endothelialen Permeabilität (vgl. Abb. 1A), die normalerweise durch Angiopoietin-1 (Ang-1), einen Liganden des endothelialen Tie-2-Rezeptors, verhindert wird. Ang-2, ein weiteres Mitglied der Angiopoietin-Familie, bewirkt den Verlust der interendothelialen Zellkontakte und das Aufbrechen der subendothelialen Zellschicht (glatte Muskelzellen in großen Gefäßen, Perizyten in kleinen Gefäßen und Kardiomyozyten im Herzen) und der Matrix. Die extrazelluläre Matrix wird durch eine Reihe von Proteinasen, darunter vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), abgebaut. Bei diesem Vorgang werden Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und insulin-like growth factor-1 (IGF-1) aus der Matrix freigesetzt (vgl. Abb. 1B), welche die Endothelzellen zur Proliferation und Migration anregen (Carmeliet, 2000, Conway et al., 2001), (vgl. Abb. 1C). Schließlich bildet sich ein neuer Endothelzellkanal, der mit Muskelzellen und extrazellulärer Matrix bedeckt ist (vgl. Abb. 1D).

7



Abbildung 1: Schritte der Angiogenese. (A) •NO vermittelt die Vasodilatation und erhöht die Gefäßpermeabilität, MMPs aus der extrazellulären Matrix (B) unterstützen die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, (C) wodurch die Proliferation und Migration der Endothelzellen gefördert wird, (D) Auflagerungen von Muskelzellen und extrazellulärer Matrix auf die neue Endothelzellschicht vervollständigen das neue Gefäß (Arnold, H (2010) Die Bedeutung des Oxidativen Stresses für die Signalwege des Thromboxan A₂-Rezeptors. Chemisch-naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Hamburg).

1.1.1 Regulation der Angiogenese

Die Angiogenese wird über zahlreiche molekulare Mechanismen reguliert. So können sowohl extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren oder genetische Veränderungen wie die Aktivierung von Onkogenen oder die Mutation von Tumorsuppressorgenen angiogene Effekte vermitteln (Carmeliet, 2000, Folkman, 1995). Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten angiogenen Faktoren VEGF, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) und Hämoxygenase-1 (HO-1) näher erläutert werden:

VEGF:

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein sezerniertes, dimeres Glykoprotein. In Säugetieren besteht die VEGF-Familie aus VEGF-A, -B, -C, -D, -E und *placental growth factor* (PGF). Dabei nimmt VEGF-A eine Schlüsselrolle in der Vaskulogenese und der Angiogenese ein. Genetische Studien zeigten, dass sowohl homozygote als auch heterozygote VEGF-A-Gen-*knockout*-Mäuse aufgrund ihrer Defekte im Gefäßsystem im embryonalen Stadium sterben (Carmeliet et al., 1996, Ferrara et al., 1996). Es gibt fünf humane VEGF-A-Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen:

VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 und VEGF-A206. Von diesen dominieren bezüglich Menge und biologischer Aktivität die Formen VEGF-A121, VEGF-A165 und VEGF-A189 (Olsson et al., 2006, Shibuya, 2008). VEGF-A165 wurde im experimentellen Teil dieser Arbeit verwendet und wird daher im Folgenden vereinfacht VEGF genannt. Die Mitglieder der VEGF-Familie binden an drei Rezeptortyrosinkinasen (RTKs): VEGFR-1 (fms like-tyrosine kinase (Flt)-1), VEGFR-2 (kinase domain region (KDR)/fetal liver kinase-1 (Flk-1)) und VEGFR-3 (Flt-4) (Neufeld et al., 1999, Ferrara und Davis-Smyth, 1997). VEGF-A bindet sowohl an VEGFR-1 als auch an VEGFR-2, VEGF-B und PGF binden nur an VEGFR-1. Sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 vermitteln proangiogene Effekte. VEGFR-2 spielt dabei die entscheidende Rolle, da es die Migration, die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von Endothelzellen sowie die Permeabilität und die Dilatation von Gefäßen reguliert (Cebe-Suarez et al., 2006). VEGF-C und -D binden hauptsächlich an VEGFR-3 und stimulieren auf diesem Weg die Lymphangiogenese (Shibuya, 2008).

Für die Regulierung von VEGF ist der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor-1 α (HIF-1 α) von zentraler Bedeutung. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert in den Zellkern, wo er an *hypoxia response elements* (HREs) zahlreicher Zielgene bindet, unter anderem an das HRE des VEGF-Promoters, woraufhin die VEGF-Genexpression heraufreguliert wird. Darüber hinaus induziert HIF-1 α weitere wichtige Gene der Angiogenese wie zum Beispiel die Gene der Angiopoietine, der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und der HO-1 (Maxwell et al., 1997, Ema et al., 1997, Millauer et al., 1993, Ockaili et al., 2005).

PTEN:

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) wurde erstmals im Jahre 1997 als Tumorsuppressorgen identifiziert. Das PTEN-Gen kodiert für eine 3-Phosphatase. Diese hydrolisiert Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2). PIP3 ist ein wichtiger *second messenger* und kann über den Proteinkinase B-Signalweg (PKB/AKT-Signalweg) unter anderem die HIF-1- und VEGF-Genexpression stimulieren, was zu einer Aktivierung der Angiogenese führt (Jiang und Liu, 2009, Jiang et al., 2001, Zhong et al., 2000). PTEN unterbindet diesen proangiogenen Einfluss, indem es PIP3 hydrolisiert. Zum Beispiel führte der Einsatz von PTEN *in vitro* zu einer Hemmung des VEGF-induzierten vaskulären *Sprouting* (Aussprossen von kapillarähnlichen Strukturen in der Sphäroidkultur) und der VEGF-induzierten endothelialen *Tube Formation* (kapillarähnliche Röhrchenbildung) (Huang und Kontos, 2002). Ein Verlust von PTEN in Endothelzellen von Mäusen verstärkte die Angiogenese *in vivo* (Hamada et al., 2005).

Die Regulierung von PTEN auf der Transkriptionsebene kann über eine Bindung an den PTEN-Promoter erfolgen. Dabei regulieren zum Beispiel early growth response protein 1 (EGR1), Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor y (PPARy), Protein p53 und activating transcription factor 2 (ATF2) die Genexpression von PTEN herauf (Patel et al., 2001, Shen et al., 2006, Stambolic et al., 2001), während transforming growth factor-ß (TGF-ß), nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells (NF-kB) und Jun diese herunterregulieren (Hettinger et al., 2007, Mahimainathan et al., 2006, Xia et al., 2007). Auf der Ebene der Translation führt die Bindung einiger microRNAs wie zum Beispiel miR-21, miR-19a, und miR-214 an den 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) zu einer Hemmung der Genexpression des Tumorsuppressors (Meng et al., 2007, Pezzolesi et al., 2008, Yang et al., 2008). Posttranslational kann die Aktivität von PTEN unter anderem über eine Phosphorylierung, Acetylierung oder Oxidation reguliert werden (Gericke et al., 2006, Ikenoue et al., 2008, Leslie, 2006, Planchon et al., 2008, Tamguney und Stokoe, 2007).

HO-1:

Die Hämoxygenase (HO) ist ein Enzym, das den limitierenden Schritt im Abbau von Häm zu Eisen, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin katalysiert. Biliverdin wird anschließend durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgewandelt. Es liegen zwei Isoformen des Enzyms vor, HO-1 und HO-2. Beide Isoformen werden in den meisten Geweben in niedrigen Mengen exprimiert. HO-2 wird konstitutiv exprimiert, während die Bildung von HO-1 unter bestimmten Bedingungen induziert werden kann. In den letzten Jahren hat sich das Forschungsinteresse von der metabolischen Bedeutung der HO zu ihrer Funktion als Signalmediator verlagert. In zahlreichen Experimenten konnten antiinflammatorische, antioxidative und antiapoptische Signaleigenschaften für das Enzym belegt werden (Dulak et al., 2008). Jüngere Studien demonstrierten darüber hinaus proangiogene Effekte für die HO, die sie über ihren gasförmigen Metaboliten CO vermittelt. CO induziert die Bildung proangiogener Faktoren wie zum Beispiel von VEGF, Interleukin-8 (IL-8) und *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) und reduziert die Bildung antiangiogener Faktoren wie etwa von *soluble fms-like tyrosine kinase 1*-Rezeptor (sFLT1, löslicher VEGFR-1) und *soluble endoglin* (sEng). Daraus resultiert eine gesteigerte Endothelzellproliferation und -migration und eine verminderte Apoptose von Endothelzellen (Jozkowicz et al., 2002, Dulak et al., 2002, Dulak et al., 2008).

Eine gesteigerte Synthese des HO-1-Proteins stellt eine Antwort auf Stress in biologischen Organismen dar. Zu den Stimulatoren der HO-1-Genexpression gehören daher Faktoren, die unter oxidativem Stress und bei Inflammation entstehen. Dazu zählen unter anderem Häm, Hypoxie, Ischämie, NO, UV-Strahlung, Schwermetalle, Schubspannung, Endotoxin und proinflammatorische Zytokine (Otterbein und Choi, 2000, Ryter et al., 2002). Auch nitrierte Fettsäuren (NO₂-FAs) wurden kürzlich als potente HO-1-Induktoren identifiziert (vgl. *Abschnitt 1.2.3.3*). Die Regulierung der HO-1 findet typischerweise auf der Transkriptionsebene statt.

1.1.2 Angiogenese und Inflammation

Das gemeinsame Auftreten einer verstärkten Angiogenese und einer gesteigerten Inflammation charakterisieren zahlreiche Krankheiten wie etwa Atherosklerose, Diabetes mellitus oder Arthritis. Aktuelle Studienergebnisse weisen darauf hin, dass beide Prozesse auch auf molekularer Ebene miteinander verknüpft sind (Fiedler et al., 2006, Ushio-Fukai, 2006). So konnte zum Beispiel für Angiopoietin, einen bekannten Regulator der Angiogenese, ein Einfluss auf Entzündungsprozesse nachgewiesen werden. Dabei scheint Ang-1 eine inflammatorische Antwort abzuschwächen, während Ang-2 diese verstärkt. Beide Signalwege verlaufen über den Tyrosinkinaserezeptor Tie-2, der von Endothelzellen exprimiert wird (Fiedler et al., 2006). Ein weiteres Beispiel stellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar, die bei Entzündungsprozessen entstehen und als Marker von oxidativem Stress

gelten. In niedrigen Konzentrationen können ROS proangiogene Effekte vermitteln, was als sogenanntes "*redox signalling*" bezeichnet wird (Roy et al., 2006, Tojo et al., 2005). In hohen Konzentrationen wirken ROS allerdings zytotoxisch und tragen zur Entstehung zahlreicher Krankheiten wie etwa Atherosklerose und Diabetes mellitus bei (Ushio-Fukai, 2006).

1.2 Nitrierte Fettsäuren

Nitrierte Fettsäuren (NO₂-FAs) sind Nebenprodukte oxidativer Reaktionen zwischen ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) mit Stickstoffmonoxid (•NO)- und Nitrit (NO₂⁻)-Derivaten. NO₂-FAs wurden erstmals in Modellstudien über durch Luftverschmutzung induzierte Oxidation von Lipiden beschrieben, in denen Lipide hohen Konzentrationen von Stickstoffdioxid (•NO₂) ausgesetzt waren (Finlayson-Pitts et al., 1987, Gallon und Pryor, 1993). Zunächst untersuchte man ihre Rolle lediglich in NO-abhängigen Redoxreaktionen. Weitergehende Studien zeigten darüber hinaus auch NO-unabhängige Signalaktivitäten für diese Substanzklasse und identifizierten sie als antiinflammatorische Signalmediatoren (Freeman et al., 2008). Daher unterscheiden sich NO₂-FAs in ihrer Funktion von vielen oxidierten Lipiden, die vorwiegend proinflammatorische Reaktionen vermitteln (Baker et al., 2009). Endogen vorkommende nitrierte Fettsäuren gehören entweder zur Gruppe der Nitroalkene oder der Nitrohydroxyderivate (Nitroalkene).

1.2.1 Bildung

Die Nitrierung von Fettsäuren erfolgt durch Reaktion von ungesättigten Fettsäuren mit •NO, von •NO abstammenden Stickoxiden (zum Beispiel Stickstoffdioxid (•NO₂) oder Peroxynitrit (ONOO⁻)) und von Sauerstoff (O₂) abstammenden inflammatorischen Mediatoren (zum Beispiel Superoxid (O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Lipidperoxylradikal (LOO•)) (Freeman et al., 2008). Ungesättigte Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure (LA) und Ölsäure (OA) sind wichtige Angriffspunkte für •NO und seine Derivate, da sie zum einen in großen Mengen im menschlichen Körper vorkommen und zum anderen Doppelbindungen besitzen, die durch •NO₂ über homolytische und heterolytische Reaktionen angegriffen werden können. Neben den Doppelbindungen stellen bisallyle Methylzentren weitere reaktive Bindungsstellen in ungesättigten Fettsäuren dar (Freeman et al., 2008). Es sind verschiedene Nitrierungsmechanismen für ungesättigte Fettsäuren beschrieben, zum Beispiel die homolytische Addition von •NO₂ (vgl. *Abb. 2*) und die elektrophile Substitution durch Addition von Nitrit (NO₂⁻) (Thomas et al., 1982, O'Donnell et al., 1999, O'Donnell und Freeman, 2001). Die Entstehungsmechanismen *in vivo* sind bislang noch nicht vollständig verstanden.

•NO₂ kann sowohl die Nitrierung als auch die Oxidation von Lipiden begünstigen. Welche der beiden Reaktionen dominiert, hängt vom metabolischen Zustand der Zelle ab. So überwiegt zum Beispiel bei niedriger O₂-Konzentration und hydrophobem Milieu die Nitrierung, bei hoher O₂-Konzentration und hydrophilem Milieu die Oxidation (Freeman et al., 2008), (vgl. Abb. 2). Darüber hinaus spielen •NO-Konzentration, Bildungsort Konzentrationen von Zielmolekülen, und lokale Katalysatoren und Scavengern eine wichtige Rolle (Schopfer et al., 2003). Typischerweise treten Nitrierungen während inflammatorischem oder metabolischem Stress in Mikroumgebungen auf, wie etwa in den Intermembranräumen von Mitochondrien, dem niedrigen pH-Milieu des Verdauungstraktes, in aktivierten Makrophagen und neutrophilenreichen Arealen. Daher ist lokal von höheren als den im Plasma gesunder Menschen gemessenen pikomolaren Konzentrationen auszugehen (Tsikas et al., 2009, Rudolph et al., 2010b).



Abbildung 2: Nitrierung und Oxidation von ungesättigten Fettsäuren. Im ersten Schritt bindet •NO₂ an die Doppelbindungen von Alkenen und es entstehen ß-Nitroalkyl-Radikale. In hydrophobem Milieu können die ß-Nitroalkylradikale durch •NO und seine Derivate angegriffen werden, was zur Bildung von Nitro(•NO)- oder Nitrit(NO₂-)-Zwischenprodukten führt. Diese Zwischenprodukte können durch Abgabe von Hydrogennitrit (HNO₂) zur Bildung von Nitroalkenen oder durch Hydrolyse zur Bildung von Nitroalkoholen (Nitrohydroxyderivaten) führen. In wässrigem Milieu ist die Löslichkeit von •NO gering und es überwiegen Lipidperoxidationen (modifiziert nach Freeman et al., J Biol Chem. 2008).

1.2.2 Biologische Eigenschaften

NO₂-FAs wurden zunächst als endogenes NO-Reservoir betrachtet. Diese Annahme bestätigte sich durch den Nachweis NO-abhängiger Zellsignalaktivitäten dieser Substanzklasse, wie zum Beispiel der Vermittlung NO-abhängiger Vasodilatation durch Nitro-Linolsäure (LNO₂) (Lima et al., 2005, Lim et al., 2002). Weiterführende Studien charakterisierten NO₂-FAs als pluripotente Signalmediatoren, die ihre Zellsignalaktivitäten über ihre elektrophilen Eigenschaften auch NO-unabhängig vermitteln (Freeman et al., 2008). Anhand von HPLC- und MS-Analysen konnte gezeigt werden, dass NO₂-FAs potente Elektrophile sind, die sowohl mit Glutathion (GSH) als auch mit Cys-, Lys- und His-Resten von Proteinen Nitroalkylierungen eingehen (Khoo et al., 2010). Auf diese Weise bewirken NO₂-FAs posttranslationale Proteinmodifikationen, die die Struktur, die Funktion und die subzelluläre Verteilung von Proteinen beeinflussen können (Batthyany et al., 2006). Bemerkenswert ist, dass es sich bei der Nitroalkylierung um eine reversible Reaktion handelt. Es ist bekannt, dass irreversible posttranslationale Proteinmodifikationen durch Elektrophile zu einer Schädigung und zu einem Funktionsverlust des Proteins führen (Rudolph und Freeman, 2009). Daher ist eine reversible Proteinmodifikation durch NO₂-FAs ein Hinweis darauf, dass die Substanzklasse eine geringe bzw. keine Zytotoxizität besitzt und sie ihre Effekte über einen geregelten Signalweg vermittelt. Die Bindung an die p65-Untereinheit von Nfk-B (Baker et al., 2005, Rudolph et al., 2010b), die S-Alkylierung von wichtigen Thiolen von Keap-1 (Baker et al., 2007) oder die S-Alkylierung von PPARy an Cys285 sind Beispiele für elektrophile Reaktionen von NO₂-FAs (Balazy et al., 2001), (vgl. Abschnitt 1.2.3).

1.2.3 Zellsignalaktivitäten

1.2.3.1 cGMP-abhängige Vasorelaxation

•NO und seine Derivate regulieren den Gefäßtonus. Auch LNO₂ bewirkt eine •NO-abhängige, cGMP-vermittelte Vasorelaxation, wenn es auf präkonstringierte Gefäßringe von Rattenaorten gegeben wird (Lima et al., 2005, Lim et al., 2002). Allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus der NO-Freisetzung aus NO₂-FAs *in vivo* nicht vollständig geklärt. Zwar sind ein Zerfall von NO₂-FAs und eine anschließende NO-Freisetzung über die sogenannte Nef-Reaktion bekannt, diese Reaktion findet aber nur in wässrigem Milieu statt (Lima et al., 2005, Schopfer et al., 2005). Unter hydrophoben, das heißt biologisch relevanten Bedingungen (bei Vorliegen von unter anderem Plasmalipoproteinen, Membranen, Proteinen und Thiolen mit niedrigem Molekulargewicht) werden NO₂-FAs stabilisiert und die Nef-Reaktion wird gehemmt (Schopfer et al., 2005).

1.2.3.2 Hemmung inflammatorischer Zellfunktionen

NO₂-FAs heben die Aktivierung vieler inflammatorischer Zelltypen über •NOunabhängige Mechanismen auf. Sie inhibieren die Plättchenaggregation und die Aktivierung von Neutrophilen (Coles et al., 2002a, Coles et al., 2002b). Über eine Suppression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (VCAM-1) bewirken sie eine Abnahme des Monozyten-Rollens entlang des Endothels und der anschließenden Monozyten-Adhäsion am Endothel (Cui et al., 2006).

1.2.3.3 Steigerung der HO-1-Expression

Im Jahre 2006 konnte erstmals gezeigt werden, dass Nitroalkene die mRNA-Expression und die Proteinbildung von HO-1 in humanen Aortenendothelzellen erhöhen (Wright et al., 2006). Diese Ergebnisse konnten Cole et al. anhand von in vitro- und in vivo-Experimenten bestätigen (Cole et al., 2009). In ihrer Studie führte die Inkubation von glatten Muskelzellen aus Rattenaorten (rat aortic smooth muscle cells, RASMCs) mit OA-NO2 (50-1000 nmol/l) über 2 h zu einem dosisabhängigen Anstieg der HO-1mRNA. Western-Blot-Analysen zeigten eine erhöhte Expression des HO-1-Proteins als Antwort auf OA-NO₂ (100-1000 nmol/l) nach 24 h. Die exogene Applikation von OA-NO₂ steigerte die HO-1-Enzymaktivität im Lebergewebe von Mäusen und induzierte die HO-1-Expression im Gefäßsystem von Mäusen signifikant (Cole et al., 2009). Bei einem Tiermodell, bei dem die linke A. femoralis communis durch einen Führungsdraht endoluminal verletzt und die Mäuse anschließend über 21 Tage mit Vehikel, Ölsäure (OA, 2 mg/kg pro Tag) oder Nitro-Ölsäure (OA-NO₂, 2 mg/kg pro Tag) über osmotische Minipumpen behandelt wurden, zeigten OA-NO₂-behandelte Mäuse eine wesentlich stärkere Expression von HO-1 in der Gefäßwand als Mäuse, die mit OA oder Vehikel behandelt wurden. Dabei bewirkte die Heraufregulierung von HO-1 im Rahmen der Femoralarterienverletzung eine Abschwächung der Neointimaformation (Cole et al., 2009). Die HO-1-Induktion durch NO₂-FAs scheint sowohl Nrf2-abhängig als auch -unabhängig vermittelt zu sein (Wright et al., 2009).

1.2.3.4 Steigerung der eNOS-Expression

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist eine von drei Isoformen der NO-Synthase (eNOS, neuronale (n)NOS und induzierbare (i)NOS), die die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. nNOS und eNOS werden konstitutiv exprimiert (nNOS vorwiegend in Nervenzellen und eNOS vor allem in Endothelzellen) und daher auch als konstitutive NOS bezeichnet (cNOS). Die Regulierung von eNOS kann auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene erfolgen und zu einer zwei- bis dreifachen Veränderung der NO-Synthese führen. Khoo et al. konnten zeigen, dass OA-NO₂ die eNOS-Expression und die NO-Freisetzung in kultivierten Endothelzellen erhöht und diesen Effekt vermutlich über eine Phosphorylierung von eNOS an Ser1179 vermittelt (Khoo et al., 2010).

1.2.3.5 Hemmung von NF-κB

Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells (NF-kB) ist ein Transkriptionsfaktor, der aus fünf verschiedenen Untereinheiten besteht (p50, p52, p65, p100 und p105). NF-κB spielt in der Regulation der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose eine sehr wichtige Rolle. Biologische Elektrophile wie zum Beispiel NO₂-FAs unterdrücken die Transaktivierung von NF-kB und beeinflussen somit inflammatorische Signalwege (Freeman et al., 2008), (vgl. Abb. 3). NO₂-FAs bewirken eine posttranslationale Alkylierung der p65-Untereinheit von NF-kB, woraufhin diese nicht mehr an die Promoterregion von Genen binden kann. Dies führt zu einer Hemmung des Tumornekrosefaktors-α (TNF-α) und der Lipopolysaccharid-induzierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen und Endothelzellen (Cui et al., 2006). Rudolph et al. konnten mithilfe eines Mausmodells zeigen, dass die exogene Applikation von NO₂-FAs während einer ischämischen Episode die Größe eines Myokardinfarktes reduziert und die linksventrikuläre Herzfunktion erhält. Diese protektiven Effekte werden zum Teil über die Hemmung der p65-Untereinheit von NF-kB und die daraus resultierende lokale und systemische Herunterregulierung proinflammatorischer Signalwege vermittelt (Rudolph et al., 2010b).

1.2.3.6 Aktivierung von PPAR

Bei Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) handelt es sich um intrazelluläre Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflussen. Sie sind an der Regulation von Glukosehomöostase, Fettstoffwechsel und Entzündungsprozessen beteiligt. Man unterscheidet drei Rezeptorisoformen (α , β/δ , y). NO₂-FAs sind stabile Agonisten an PPARy und in geringerem Maße an PPARa und PPARo (Schopfer et al., 2005, Itoh et al., 2008), (vgl. Abb. 3). PPARy wird von vielen Zellen exprimiert, dazu zählen unter anderem Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Adipozyten. Nach Bindung von lipophilen Liganden bildet PPARy ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor, welches an PPAR response elements (PPREs) bindet und über diese die Transkription von Zielgenen reguliert (Freeman et al., 2008). NO₂-FAs aktivieren PPARy über eine kovalente Bindung an Cys285-Reste der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors (Li et al., 2008). Native Fettsäuren, Prostaglandinmetabolite und oxidierte Fettsäurederivate aktivieren ebenfalls PPARa, δ und γ . Allerdings tun sie dies in unphysiologischen Konzentrationen von über 50 µM (Forman et al., 1995, Yu et al., 1995, Nagy et al., 1998), während NO₂-FAs bereits in physiologischen nanomolaren Konzentrationen als partielle PPARy-Agonisten agieren (Schopfer et al., 2005).

1.2.3.7 Aktivierung von Keap1/Nrf2

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der wichtige antioxidative Signale in der Zelle vermittelt. Normalerweise wird die Nrf2-abhängige Transkription durch das Suppressorprotein *kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) unterdrückt. Stresssignalmoleküle, wie zum Beispiel ROS oder Elektrophile, können an Cysteinreste von Keap1 binden, diese oxidieren oder alkylieren und eine Konformationsänderung des Proteins bewirken. Daraufhin wird Nrf2 freigegeben und transloziert in den Nukleus, wo es an das *cis-acting DNA regulatory antioxidant response element* (ARE, auch bezeichnet als *electrophile response element* (EpRE)) bindet und die Nrf2-abhängige Gentranskription aktiviert. Studien zeigten, dass NO₂-FAs ihre antiinflammatorischen Zellsignalaktivitäten zum Teil über Nrf2 vermitteln (vgl. *Abb. 3*). So induzieren NO₂-FAs Nrf2-abhängig zum

Beispiel die Expression der Gene für HO-1, für Enzyme der Glutathionsynthese und der Superoxid-Dismutase (Kansanen et al., 2009) und hemmen über diesen Mechanismus die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) (Villacorta et al., 2007).

1.2.3.8 Hemmung des AT₁ Rezeptors

Die Bindung von Angiotensin-II an den AT₁ Rezeptor ist ein zentraler Mechanismus bei der Regulierung des Blutdrucks sowie des Wasser- und Salzhaushalts im menschlichen Organismus (Touyz, 2003). Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass die exogene Gabe von OA-NO₂ die Angiotensin-II-vermittelte Hypertonie signifikant reduziert und die mesenteriale Vasokonstriktion hemmt. Diese Effekte vermittelt OA-NO₂ über eine elektrophile kovalente Interaktion mit dem AT₁ Rezeptor, woraufhin G-Proteingekoppelte Effekte wie etwa die Aktivierung von Inositoltriphosphat (IP₃) und die damit verbundene Ca²⁺-Freisetzung verhindert werden (Zhang et al., 2010), (vgl. *Abb. 3*).

1.2.3.9 Hemmung von STAT-1

Die *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr und bei Entzündungsreaktionen. Als potente antiinflammatorische Signalmediatoren induzieren NO₂-FAs die MAPK Phosphatase-1 (MKP-1)-Expression, was zu einer Hemmung des proinflammatorischen STAT-1-Signalwegs in Makrophagen führt (Ichikawa et al., 2008), (vgl. *Abb. 3*). Eine verminderte Phosphorylierung von STAT-1 konnte unter anderem als ein wichtiger Signalmechanismus in der NO₂-FA-vermittelten Reduktion von Atherosklerose in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen identifiziert werden (Rudolph et al., 2010a).



Abbildung 3: Schematische Darstellung zellulärer Signalkaskaden in Abhängigkeit nitrierter Fettsäuren. NO₂-FA vermittelt seine antiinflammatorischen Effekte unter anderem über eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PPAR und Nrf2 sowie über eine Hemmung von NF- κ B, STAT-1 und des AT₁ Rezeptors (modifiziert nach Geisler et al., Biochim Biophys Acta. 2012).

2 Zielsetzung

Die physiologische Rolle von NO₂-FAs ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Aktuelle Studienergebnisse belegen eine protektive Wirkung dieser Substanzklasse im kardiovaskulären System. Diese Effekte werden zum Teil über antiinflammatorische Zellsignalaktivitäten der Substanzklasse vermittelt. Weitere Signalfähigkeiten von NO₂-FAs können, insbesondere aufgrund ihrer elektrophilen Eigenschaften, angenommen werden. In einer jüngeren Studie von Rudolph et al. konnte gezeigt werden, dass NO₂-FAs im postischämischem revaskularisiertem Myokard endogen gebildet werden und ihre exogene Applikation unter diesen Bedingungen zu einer reduzierten Infarktgröße und einer erhaltenen linksventrikulären Funktion führt (Rudolph et al., 2010b). Da es als Antwort auf ischämische Ereignisse typischerweise zu einer Stimulation der Angiogenese kommt, ist es vorstellbar, dass auch NO₂-FAs einen Einfluss auf die Angiogenese haben und über diesen zum Teil ihre kardioprotektiven Effekte vermitteln. Diese Überlegung führt zu den zwei folgenden Arbeitshypothesen:

- 1. Haben nitrierte Fettsäuren einen Einfluss auf wichtige Schritte der Angiogenese *in vitro*?
- 2. Wenn Ja, über welche molekularen Signalwege könnte diese Wirkung in der Zelle vermittelt werden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Testsubstanz OA-NO2

Die verwendete Nitro-Ölsäure (OA-NO₂) wurde von der Arbeitsgruppe Rudolph TK et al. hergestellt. OA-NO₂ enthielt eine äquimolare Verteilung der zwei Regioisomere 9- und 10-Nitro-Octadec-9-ensäure mit folgenden Strukturformeln:

9-NO2-OA (9-Nitroölsäure)



10-NO₂-OA (10-Nitroölsäure)



3.1.2 <u>Weitere Substanzen</u>

Substanz	Hersteller	
5% Trypsin, Trypsin-EDTA 10x	GIBCO Invitrogen, Darmstadt	
6x Orange DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	
Agarose, Ultra Pure [™]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH,	
	Unterschleißheim	
Basement Membrane, Growth	BD Biosciences, USA	
Factor Reduced (GFR)		
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	München	
Chloroform (≥99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	München	
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,	
	München	
EDTA (1% in H_2O)	Fluka Chemie GmbH, Steinheim	
Essigsäure (100%)	Merck KGaA, Darmstadt	
EtOH (>99,9%)	Merck KGaA, Darmstadt	

Isopropanol (≥99,8%)	Merck KGaA, Darmstadt
KCI	Merck KGaA, Darmstadt
МеОН	Merck KGaA, Darmstadt
Methylcellulose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
OA (>99%)	Nu-Chek Prep, Inc.,
	Minnesota, USA
PBS, Dulbecco, Pulver (w/o Ca ²⁺ /MG ²⁺)	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
PBS, Dulbecco, 1x Lösung (+Ca ²⁺ /MG ²⁺)	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
PFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PFA, Pulver, 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
RNAzol [®] B	WAK-Chemie Medical,
	Steinbach/TS
Tris/Trizma [®] Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
	München
Tris-HCI	Promega, Madison, USA
VEGF-165 <i>human, recombinant</i> (E.coli)	PromoKine GmbH, Heidelberg

3.1.3 Material

Bezeichnung	Hersteller
Einfrierröhrchen,Cryo.s [™] 2 ml	Greiner-Bio One GmbH,
	Frickenhausen
Falcon/Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Isopropanol-Einfrierbox	Nalgene, USA
Neubauer Zählkammer	Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim
Pasteur Pipetten	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim
PCR-Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Petrischale, quadratisch	Greiner-Bio One GmbH,
	Frickenhausen
Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierhelfer, accu-jet [®]	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reaktionsgefäße, Eppendorf Safe	Eppendorf AG, Hamburg
LOCK 0,5, 1,5, 2 ml	
Reaktionsgefäße, Multiply [®] -µStripPro	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
0,1 ml PCR 8er-Kette	
Serologische Pipetten 1, 2, 5, 10, 25	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ml	
Suspensionszellkulturplatte, 24-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zellkulturplatten, 6-, 24-, 48-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifu-	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
ge, Polycarbonat, TL-100 (11x34 mm)	

3.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,1%ige Essigsäure	500 µl Eisessig ad 500 ml Aqua ad iniectabilia
Laufpuffer	100 ml (25 mM) 10x Tris-Glycin Puffer, 5 ml (0,1%) SDS 20%; ad 1 l Millipore- Wasser
TAE-Puffer, 1x	40 mM Tris/Trizma [®] Base, 1mM EDTA; pH 8

3.1.5 <u>Zellen</u>

Produktbezeichnung	Hersteller
HUVECs, C-12205 (Lot.1012101)	PromoCell, Heidelberg

3.1.6 Zellkulturmedien

Produktbezeichnung	Hersteller
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Basal Medium MV	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium MV	PromoCell, Heidelberg
FCS (heat-inactivated)	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Gelatin 2% solution Type B from	SIGMA GmbH, Steinheim
bovine	
Medium 199, 10x	SIGMA GmbH, Steinheim

3.1.7 <u>Genexpressions-Assays</u>

Primer	ID	Hersteller
Fms-related tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)	Hs01052936_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydro- genase (GAPDH)	Hs99999905_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

Heme oxygenase (decycling) 1 (HO-1)	Hs00157965_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Kinase insert domain receptor (VEGFR-2)	Hs00176676_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Phosphatase and tensin homolog (PTEN)	Hs00829813_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)	Hs00900055_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt

3.1.8 Reaktionskits

Produktbezeichnung	Hersteller
2x TaqMan [®] Universal PCR Master	Applied Biosystems Inc.,
Mix	Foster City, USA
RevertAid [™] H Minus First Strand	Fermentas GmbH,
cDNA Synthesis Kit	St. Leon-Rot

3.1.9 Laborgeräte, Apparaturen und Software

Software	Hersteller
AxioVision Release 4.6.3	Carl Zeiss Microscopy GmbH,
	Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.,
	San Diego, USA
NanoDrop	PEQLAB, Biotechnologie GmbH,
	Erlangen
TaqMan SDS 2.2	Applied Biosystems Deutschland
	GmbH, Darmstadt
ZEN 2009 Light Edition	Carl Zeiss Microscopy GmbH,
	Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Endothelzellkultur wurden humane, primäre Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) von der Firma PromoCell aus Heidelberg verwendet. Die Gewinnung erfolgte gemäß den geltenden Bestimmungen (Übereinkommen zum Schutz der Menschenrechte und der Menschenwürde im Hinblick auf die Anwendung von Biologie und Medizin: Übereinkommen über Menschenrechte und Biomedizin, 1997; Human Tissue Acta, 2004; Deklaration von Helsinki, 1964). Die Endothelzellen wurden kryokonserviert geliefert. Sie befanden sich nach dem Auftauen in Passage 1, nach Kultivierung und *Splitten* ("Aufteilen") in Passage 2, in der sie aliquotiert und anschließend kryokonserviert wurden. So konnte vor Beginn einer Experimentenreihe jeweils ein Kryovial aufgetaut werden. Als Kulturmedium diente *endothelial cell growth medium* (EGM, Fa. PromoCell), in dessen Supplement-Mix unter anderem 2% FCS und Wachstumsfaktoren enthalten sind.

3.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in 25 cm²- oder 75 cm²-Zellkulturflaschen oder in 6-Well-Platten kultiviert. Es wurden beschichtete Flaschen für adhärente Zellen verwendet, die für die Primärzellen mit 0,1%iger Gelatine bedeckt wurden. Dazu wurde der Flaschenboden der 25 cm²-Flasche mit 1,5 ml und der Flaschenboden der 75 cm²-Flasche mit 2,5 ml 0,1%iger Gelatine vollständig beschichtet und für 30 min im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine mit einer Glaspipette abgesaugt und die primären Endothelzellen ausgesät. Das Medium wurde alle 48 h gewechselt. Der Zustand und das Wachstum der Zellen wurden täglich mithilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5-1:6 gesplittet, das heißt auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Das *Splitten* verlief in mehreren Schritten: 1. Absaugen des Zellkulturmediums, 2. Waschen der Endothelzellen mit 1x PBS (ohne Ca^{2+/}Mg²⁺ für Endothelzellen), 3. Inkubation mit 50 μ l/cm² 1x Trypsin bei Raumtemperatur und Ablösen der Zellen von der Flasche durch leichtes Klopfen, 4. Stoppen der Enzymaktivität durch Zugabe einer Stopplösung (Wachstumsmedium mit 10% FCS), 5. Überführen der Zellsuspension in ein Falcon und Zentrifugieren bei 220x g für 4 min bei Raumtemperatur, 6. Absaugen des Überstandes mit einer Glaspipette, 7. Resuspension des Zellpellets in frischem Medium, 8. Verteilen der Zellsuspension auf die vorbereiteten Zellkulturflaschen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37 °C.

Für den *Tube Formation-* und *Sprouting Assay* wurde eine Konfluenz der Endothelzellen von 70-80%, für den *Scratch Assay* von 90% angestrebt. Die Zellzahl wurde vor Beginn der Versuche mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Fa. Hecht) bestimmt. Dafür wurde mit einer Eppendorfpipette ein Tropfen der Zellsuspension zwischen Deckglas und Kammer gegeben. Anschließend wurden vier quadratische Felder unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellkonzentration der Suspension ergab sich wie folgt: Zellzahl x 104/4 = n Zellen/ml.

Zum Einfrieren wurden die pelletierten Zellen in 500 µl des entsprechenden Mediums auf Eis resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde tropfenweise 500 µl eisgekühltes Einfriermedium (20% Medium, 60% FCS und 20% DMSO) gegeben. Die Zellen (106 Zellen/ml) wurden langsam durch Senkung der Temperatur um 1 °C/min in einem Isopropanol-Einfriergefäß (Fa. Nalgene) bei 80 °C eingefroren und nach 48 h zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad bis nur noch ein kleiner Eisrest vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in 10 ml des vorgewärmten Mediums aufgenommen und direkt ausplattiert. Nach 16 bis 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.2 Scratch Assay

Der *Scratch Assay* ist ein zweidimensionaler (2D) *in vitro Assay*, mit dessen Hilfe die Endothelzellmigration und damit ein wichtiger Schritt im Prozess der Angiogenese untersucht werden kann. Die Versuchsmethode basiert auf dem Erzeugen eines *Scratch* ("Kratzwunde") in einer konfluenten Zellschicht. Vom Rand des *Scratch* wandern die Zellen in Richtung der freien Fläche, um diese durch Ausbildung neuer Zell-Zell-Kontakte wieder zu schließen.

Die Endothelzellen wurden zunächst in 6-Well-Platten kultiviert bis sie eine Konfluenz von 90% erreichten. Anschließend wurden sie über Nacht auf Hungermedium (Basalmedium mit 2,5% FCS und 1% Pen/Strep) gesetzt. Es folgte das "Zerkratzen" der Zellschicht mithilfe einer sterilen Pipettenspitze, wobei eine zellfreie Fläche entstand. Dabei wurde mit möglichst gleichmäßigem Druck und gleichbleibender Geschwindigkeit in vertikale Richtung gekratzt. Durch Waschen mit 1 ml Wachstumsmedium konnten die Zellüberreste entfernt und die Seiten geglättet werden. Anschließend wurden die Testsubstanzen (OA-NO₂: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM; OA-NO₂+VEGF (10 ng/ml): 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM) in 0,2% igem EGM (EGM enthält 0,2% FCS) angesetzt und auf die Zellen gegeben. Die basale Migration wurde durch 0,1% iges MeOH dargestellt, die stimulierte Migration durch VEGF (10 ng/ml). Es wurden 3 Well pro Bedingung pipettiert. Es folgte die fotografische Dokumentation mithilfe eines IX-71 Mikroskops von der Firma Olympus. Anschließend wurden die 6-Well-Platten bei 37 °C und 5% CO2 über 18 h inkubiert und erneut abfotografiert. Um zu beiden Zeitpunkten dieselben Ausschnitte auf der Platte zu fotografieren, waren zuvor Referenzpunkte mit einem wasserfesten Stift markiert worden. Die Auswertung der Fotos erfolgte am PC mithilfe der Photoshop CS3 Extended Software. Es wurde die Distanz zwischen den beiden Rändern eines Scratch an drei Punkten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Stunde 0 und 18) gemessen und der Mittelwert der Messungen eines Zeitpunktes berechnet. Die prozentuale Angabe bezog die bedeckte Fläche nach 18 h auf die bedeckte Fläche zum Zeitpunkt 0.

3.2.3 <u>Tube Formation Assay</u>

Der *Tube Formation Assay* repräsentiert neben der Migration auch die Differenzierung von Endothelzellen und ermöglicht im Vergleich mit dem *Scratch Assay* eine komplexere Abbildung der Angiogenese. Durch Ausplattieren von Endothelzellen auf eine Schicht Gelmatrix (meist Collagen, Fibrin oder Matrigel) wird die Anhaftung, Migration und Differenzierung der Endothelzellen in *Tubes* ("kapillarähnliche Strukturen") stimuliert (Lawley und Kubota, 1989, Kanzawa et al., 1993). In dem für diese Arbeit durchgeführten Experiment wurde Matrigel (ein Gemisch aus extrazellulären Proteinen und Basalmembranproteinen aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom) eingesetzt, da sich diese Matrix besonders gut zur Darstellung der Röhrchenbildung eignet. Dabei wurde ein um Wachstumsfaktoren reduziertes Matrigel verwendet, um eine Überstimulation von Endothelzellen zu vermeiden. Es handelt sich bei dieser Versuchsmethode um einen zweidimensionalen *Assay*, da die Endothelzellen auf dem Matrigel ausplattiert werden und damit in einer Ebene *Tubes* bilden.

Im ersten Schritt wurde das Matrigel (BD Biosciences) bei 4 °C auf Eis über Nacht aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl Matrigel pro Well in eine 48-Well-Platte pipettiert und für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für den Versuch vorbereitet. Dafür wurden sie zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, anschließend wurden 3 ml Trypsin (0,25%) hinzugegeben und 2 ml direkt wieder abpipettiert. Nach Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium, wurde die Zellsuspension in ein Falcon überführt und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (Fa. Hecht, vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Es wurde eine Zellzahl von 100.000 Zellen/ml angestrebt. Anschließend wurden 300 µl Zellsuspension pro Well in eine 48-Well-Platte pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Medium vorsichtig, möglichst ohne Berührung des Matrigels, abpipettiert und 30 µl pro Well der zuvor in 2%igem EGM (EGM enthält 2%FCS) angesetzten Testsubstanzen (OA-NO₂: 100 nM, 500 nM, 1000 nM; OA: 1000 nM) und Kontrolllösungen (Negativkontrolle: 0,1%iges MeOH; Positivkontrolle: VEGF 10 ng/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte die Auswertung durch Abfotografieren und Analysieren am PC mittels der Photoshop CS3 Extended Software. Die Längen eines Tubes wurden gemessen, die Verzweigungspunkte eines Tubes gezählt und jeweils als Mittelwert ± SEM bezogen auf die basale Tube Formation unter 0,1%igem MeOH ausgedrückt.

3.2.4 Sprouting Assay (Sphäroidkultur Assay)

Korff und Augustin führten 1998 den Sphäroidkultur Assay ein. Die Sphäroide werden aus Endothelzellkonglomeraten definierter Zellzahl generiert und anschließend in ein Collagengel eingebettet und dort stimuliert. In der äußeren Schicht der Sphäroide bilden sich Zell-Zell-Kontakte aus, wodurch sie vor Apoptose geschützt und für Wachstumsfaktoren empfänglich werden. Die übrigen Zellen sterben nach kurzer Zeit ab (Korff und Augustin, 1998), (vgl. *Abb. 4*). Auf einen angiogenen Stimulus hin bilden die Sphäroide durch Migration, Elongation und Proliferation *Sprouts* ("Aussprossungen"), welche ein kapillarähnliches Aussehen zeigen und im Querschnitt ein Lumen aufweisen (Korff und Augustin, 1999). Es handelt sich hier um einen dreidimensionalen (3D) *Assay*, der die Vorgänge der Angiogenese sehr gut *in vitro* imitiert.



Abbildung 4: Modell der Endothelzellorganisation und -differenzierung in dreidimensionalen Sphäroiden (modifiziert nach Korff et al., J Cell Biol. 1998).

3.2.4.1 Herstellung von Methocel

Es wurden 6 g Methylcellulose abgewogen, in eine 500 ml Schraubflasche gegeben und nach Zugabe eines Rührfisches autoklaviert. Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Aus einer 500 ml

Flasche *endothelial cell basal medium* (Basalmedium, Fa. PromoCell) wurden 250 ml in eine autoklavierte Flasche überführt und im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Die restlichen 250 ml Basalmedium wurden in einen Wärmeschrank gestellt. Das 60 °C warme Medium wurde zur Methylcellulose gegeben. Mithilfe eines Magnetrührers wurde anschließend für 20 min bei Raumtemperatur gerührt und nach Zugabe des übrigen Basalmediums über Nacht bei 4 °C weitergerührt. Am darauffolgenden Tag wurde das Methocel in 50 ml Falcons aliquotiert und für 4 h bei 4 °C und 4.000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.4.2 Gewinnung von Collagen aus Rattenschwänzen

In den ersten Versuchen stellte sich heraus, dass das kommerziell erhältliche Collagen für das Aussprossen der Endothelzellen nicht ausreichend konzentriert war. Daher wurde Collagen aus Rattenschwänzen frisch gewonnen. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde eine 500 ml Schraubflasche mit 0,1% iger Essigsäure gefüllt, ein Rührfisch hinzugegeben und diese Flüssigkeit anschließend autoklaviert. Dann wurden Rattenschwänze aufgetaut, die zuvor bei -80 °C eingefroren waren. Dazu wurden 2-3 Rattenschwänze für etwa 20 min in ein autoklaviertes 500 ml Becherglas mit 70%igem EtOH gelegt. Anschließend wurden sie in eine 10 cm-Petrischale überführt, wo sie mithilfe einer sterilen Pinzette und Schere gehäutet wurden. Durch Brechen der Wirbel, beginnend an der Schwanzspitze, konnten die einzelnen Collagenfäden entfernt und in ein weiteres 500 ml Becherglas mit 70% igem EtOH gebracht werden. Mithilfe einer Pinzette wurden die Collagenfäden auf eine Petrischale gelegt, für etwa 1 h getrocknet und anschließend in eine 500 ml Schraubflasche mit 0,1%iger Essigsäure und Rührfisch (autoklaviert) gegeben. Auf einem Magnetrührer wurde das Collagen/Essigsäure-Gemisch über mehrere Tage bei 4 °C gerührt, anschließend in Zentrifugenbecher aliquotiert und für 3 h bei 4.500 rpm zentrifugiert. Das gelöste Collagen befand sich nun im Überstand und wurde in 50 ml Falcons aliquotiert. Die Collagenstocklösung wurde bei 4 °C gelagert.

3.2.4.3 Versuchstag 1

Herstellung der Sphäroide: Als Grundlage für die Herstellung der Sphäroide diente die "hanging drop"-Methode mit HUVECs (Korff und Augustin, 1998). Bei einer Konfluenz von 70-80% in der Zellkulturflasche, wurden die Endothelzellen mit 1x PBS (ohne Ca^{2+/}Mg²⁺) gewaschen, anschließend trypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Es wurden 20.000 Zellen pro Well benötigt, da 400 Zellen pro Sphäroid und 50 Sphäroide pro Well berechnet wurden. Es wurde eine 24-Well-Platte verwendet und die Mengenangaben für 30 Well berechnet. Im Folgenden werden die Mengen pro Well angegeben. In einem 50 ml Falcon wurden 250 µl Methocel vorgelegt, die Zellsuspension hinzugegeben und mit Wachstumsmedium auf 1,25 ml aufgefüllt. Anschließend wurde alles mit einer 10 ml Pipette vorsichtig gemischt, möglichst ohne Luftblasen entstehen zu lassen. Der Inhalt des Falcons wurde in ein Flüssigkeitsreservoir überführt und mithilfe einer 12-Kanalpipette wurden 25 µl Tropfen in guadratische Petrischalen pipettiert. Es wurden Petrischalen verwendet, die nicht für die Kultivierung von Zellen beschichtet waren. Schließlich wurden die Petrischalen umgedreht (hanging drops) und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Vorbereitung von Methocel und Collagen: Methocel und Collagen wurden einen Tag vor Einbetten der Sphäroide vorbereitet, damit die Substanzen bei ihrem Einsatz klar und frei von Luftblasen waren. Die benötigte Menge Methocel wurde mit 20% FCS angesetzt und gemischt. Die Collagenstocklösung wurde kräftig geschüttelt und die Geschwindigkeit beim Aufsteigen der Luftblasen beurteilt. Stiegen die Luftblasen im Falcon schnell auf, musste die Stocklösung nicht verdünnt werden. War jedoch eine langsame Bewegung der Luftblasen zu beobachten, wurde tropfenweise 0,1%ige sterile Essigsäure hinzugegeben, bis ein schneller Aufstieg erreicht war. Diese Schritte wurden steril und auf Eis durchgeführt und die Lösungen anschließend zurück in den Kühlschrank (+ 4 °C) gestellt.

3.2.4.4 Versuchstag 2

Einbetten der Sphäroide und Durchführung des Versuches: Im ersten Schritt wurden ein 50 ml Falcon, 10x Medium 199 (Fa. Sigma), 0,2 N NaOH, Methocel/FCS und Collagen (vgl. Abschnitt 3.2.4.3) auf Eis gestellt. Es wurden 500 µl Collagen pro Well in das Falcon gegeben und mit 62,5 µl 10x Medium 199 pro Well vorsichtig vermischt, möglichst ohne Bildung von Luftblasen. Anschließend wurden die Petrischalen aus dem Brutschrank geholt, umgedreht und die Sphäroidbildung unter dem Elektronenmikroskop überprüft. Dann wurden die Sphäroide mit warmem 1x PBS (ohne Ca^{2+/}Mg²⁺) von den Petrischalen gewaschen und in ein 50 ml Falcon (nicht auf Eis!) überführt. Um die Sphäroide bei diesem Vorgang nicht zu zerstören, wurde mindestens eine 10 ml Pipette verwendet. Nach Zentrifugieren bei 1000 rpm für 5 min, wurde der Überstand fast vollständig abgesaugt und das Sphäroidpellet in 500 µl Methocel/FCS pro Well resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Neutralisierung des bereits mit 10x Medium 199 versetzten Collagens durch tropfenweise Zugabe von 0,2 N NaOH. Die Neutralisierung war bei einem Farbumschlag zu Gelb/Orange eingetreten. Nun musste sehr zügig gearbeitet werden, da das neutralisierte Collagen begann sich zu verfestigen. Es wurden 500 µl neutralisiertes Collagen pro Well zur Sphäroidsuspension gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dieser vermischt. Ein ml pro Well wurde in eine 24-Well-Platte gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO2 für 30 min inkubiert. Währenddessen wurden die Testlösungen (OA-NO2: 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2500 nM; OA 100 nM) und die Kontrolllösungen (Negativkontrolle: 0,1%iges EtOH; Positivkontrolle: VEGF 20ng/ml) in zehnfacher Konzentration in Basalmedium angesetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden 100 µl der jeweiligen Test- bzw. Kontrolllösung pro Well gleichmäßig mithilfe einer Eppendorfpipette auf dem Collagengel verteilt. Es wurden drei Well pro Bedingung pipettiert. Es folgte schließlich die Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank.

3.2.4.5 Versuchstag 3

Abstoppen des Versuches: Der Assay wurde durch Zugabe von 500 µl pro Well 10%iger PFA-Lösung gestoppt. Die Platte konnte im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop mit Kamera und anschließend am PC. Es wurden drei Sphäroide pro Well 20x-vergrößert abfotografiert und im Anschluss mithilfe der *ZEN 2009 Light Edition-Software* (Fa. Zeiss) analysiert. Es wurden alle Sproutlängen eines Sphäroids addiert und als Mittelwert ± SEM bezogen auf das basale *Sprouting* unter 0,1%igem EtOH ausgedrückt.

3.2.5 RNA-Analyse

3.2.5.1 Isolation von RNA aus der Zellkultur

Der Einfluss von OA-NO₂ wurde auf die Expression von folgenden proangiogenen Zielgenen in HUVECs untersucht: PTEN, HO-1, VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2. Dafür wurden die Zellen zunächst in 6-Well-Platten kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte die weitere Kultivierung in Hungermedium (Basalmedium mit 2,5% FCS und 1% Pen/Strep) für 12 h. Daraufhin wurden die HUVECs mit den Testlösungen OA-NO2 0,5 µM, 2,5 µM und 10 µM für 6 h inkubiert. Für die Analysen der PTEN- und der HO-1-Genexpression wurden zusätzlich OA 0,5 µM, 2,5 µM und 10 µM eingesetzt. Als Negativkontrolle diente 0,1% iges EtOH. Nach der Stimulation folgte die Isolierung der Gesamt-RNA, die nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers WAK-Chemie Medical mittels RNAzol[®] B durchgeführt wurde. Alle Vorgänge erfolgten unter dem Abzug, mit Handschuhen und autoklavierten Gegenständen und die RNA wurde stets auf Eis gelagert. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Platte auf Eis gelegt und 800 µl eiskaltes RNAzol[®] B pro Well auf die Zellen gegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgelöst, in ein 2 ml Eppendorfgefäß auf Eis überführt und die Lösung für 30 sek gevortext. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und erneutes Vortexen für 30 sek. Danach war eine 15-minütige Inkubationszeit auf Eis vorgesehen, gefolgt von 15-minütigem Zentrifugieren bei 12.000x g und 4 °C. In der Zwischenzeit wurde ein weiteres Eppendorfgefäß mit 1 ml gekühltem Isopropanol vorbereitet und auf Eis gelagert. Nach dem Zentrifugieren wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abpipettiert und in das vorbereitete Eppendorfgefäße mit Isopropanol überführt. Nach kurzem Vortexen folgte im nächsten Schritt das

Ausfällen der RNA bei -20 °C über mindestens 1 h. Anschließend wurde bei 1200x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die präzipitierte RNA befand sich nun als weißes Pellet auf dem Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 200 µl höchst reinem 70% igem EtOH gewaschen, gründlich gevortext und für 10 min bei 1200x g und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren von EtOH, wurde das Eppendorfgefäß umgedreht und mit einem Wattestäbchen ausgewischt. Dann wurde das Pellet für 1-2 min im umgedrehten Eppendorfgefäß mit geöffnetem Deckel getrocknet und die RNA in 20-25 µl freiem DEPC-Wasser wieder aufgenommen. Anschließend wurde sowohl die Konzentration als auch die Qualität der RNA bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. ThermoScientific). Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die RNA wurde bei einem OD260/OD280-Quotienten von 1,8-2,1 als rein angesehen. Die Qualität wurde durch ein 1% iges Agarosegel (vgl. Abschnitt 3.2.5.2) bestimmt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte in der Tiefkühltruhe bei -80 °C.

3.2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Die gewonnene RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein 1%iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer verwendet. An das Agarosegel wurde eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die RNA durch das Gel bewegt wird, hängt vor allem von der Molekülgröße, der Konformation der RNA, der Agarosekonzentration und der Höhe der angelegten Spannung ab. Als Molekulargewichtsmarker wurde der *6x Orange DNA Loading Dye* (Fa. Fermentas) verwendet. Durch Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, welches in die RNA interkaliert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird, wurden die RNA-Banden sichtbar gemacht und mit den *ChemiGenius2 Bio Imaging Systems* (Fa. Syngene) abfoto-grafiert. Bei intakter RNA wurden zwei Banden im Gel sichtbar: die 28S rRNA-Untereinheit und die 18S rRNA-Untereinheit, wobei die obere Bande etwa doppelt so stark ausgeprägt war.

3.2.5.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mithilfe des *RevertAid*TM *H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fa. Fermentas). Zur Vorbereitung wurden folgende Schritte auf Eis durchgeführt: 1. Ansatz: Herstellung eines Master Mix aus 4 µl *5x Reaction Buffer* (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT; pH 8,3), 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µl), 2 µl *dNTP Mix* (10 mM) und 1 µl *RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl), 2. Ansatz: 1 µg Gesamt-RNA und 1 µl *Random Hexamer-Primer* (100 µM) wurden mit DEPC-Wasser zu 12 µl ergänzt. Anschließend wurde der erste Ansatz zum zweiten hinzugegeben und das Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl wurde gevortext und zentrifugiert. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Reverse Transkriptase (-RT-Probe) als Kontrolle angefertigt. Die Reverse Transkription erfolgte bei folgendem Temperaturschema:

Temperatur	Dauer
25 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	5 min

Tabelle 1: Temperaturprogramm der Reversen Transkription

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert und eine zusätzliche Probe ohne RT als Kontrolle mitgeführt.

3.2.5.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR basiert auf dem Prinzip der klassischen Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die klassische PCR stellt eine Standardmethode der Molekularbiologie dar und dient der Vervielfältigung definierter DNA-Bereiche (Mullis und Faloona, 1987). Benötigt werden die zu vervielfältigende DNA (sogenannte Matrize oder *Template*), sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer (vgl. *Abschnitt 3.1.7*), eine thermostabile DNA Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung. Eine
PCR besteht in der Regel aus 25-35 Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Schritte beinhaltet: 1. Denaturierung: Mit Erhitzen der DNA auf 94-96 °C wird der DNA-Doppelstrang durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken gespalten, 2. *Annealing*: Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige *Template*-DNA, 3. Elongation: Anlagerung der Polymerase an das 3'-Ende des Primers und Verlängerung durch Auffüllen mit freien Nukleotiden. Am Ende des zweiten Zyklus stehen erstmals Produkte der gewünschten Länge zur Verfügung. Zu diesem Zeitpunkt tritt die Synthese der *Template*-DNA in ihre exponentielle Phase ein. Diese Phase wird durch die Akkumulation von Produkten der PCR (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) gehemmt und führt dazu, dass Produktfragmente miteinander hybridisieren, Substrate zunehmend verbraucht und die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört werden.

	Temperatur	Dauer	
	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Annealing	62 °C (-0,2 °C bei jedem Zyklus)	30 sek	20 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sek	
Denaturierung	94 °C	30 sek	
Annealing	58 °C	30 sek	15 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sek	
	72 °C	7 min	
	cooling dow	<i>n</i> auf 4 °C	

Tabelle 2:	Temperaturprogramm	der l	PCR
------------	--------------------	-------	-----

Die qRT-PCR verbindet die klassische PCR mit der Quantifizierung der bei jedem Zyklus entstehenden DNA. Bei dieser Methode werden Fluoreszenzfarbstoffe benutzt, die sich in die DNA einlagern (interkalieren). Dadurch steigt die Fluoreszenz dieser Farbstoffe an. Dies bedeutet also, dass die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Die Fluoreszenz-Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur in der exponentiellen Phase der PCR eine korrekte Quantifizierung möglich ist, da während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen vorherrschen. Um die Spezifität der gRT-PCR zu verbessern, wurden sogenannte Fluoreszenz- bzw. Förster-Resonanz-Energietransfer-Sonden (FRET-Sonden) verwendet. Dabei gibt ein Donor-Fluorochrom, das durch eine Lichtquelle angeregt wird, seine Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom ab. Wenn sich nun Akzeptor und Donor voneinander entfernen, nimmt der FRET ab. Gleichzeitig nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab und das Signal des Donors nimmt zu. Man unterscheidet verschiedene FRET-Sonden. In dem für diese Arbeit durchgeführten Experiment wurden spezifische TaqMan[®]-Sonden verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit einem Donor(Reporter)-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Akzeptor ("dark guencher"), der die Fluoreszenz unterdrückt, markiert sind. Während der PCR bindet die TagMan-Sonde® zwischen dem forward- und reverse-Primer und wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold[®]) während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Reporter voneinander. Die Folge ist eine steigende Reporter-Fluoreszenz, die gemessen werden kann.

Im sogenannten *pre-designed TaqMan*® *Gene Expression Assay* bietet die Fa. Applied Biosystems die benötigten Bestandteile für die qRT-PCR validiert an (Sonde/Probe, *forward-* und *reverse-*Primer). Um einen relativen Mengenvergleich durchführen zu können (relative Quantifizierung) wurde ein externer Standard, ein sogenanntes Referenzgen (*housekeeping gene*), mitgemessen. Dazu diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Zusätzlich enthielt der verwendete 2*x TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (Fa. Applied Biosystems) eine passive Referenz (ROXTM). Die Vorbereitung der qRT-PCR begann mit der Verdünnung der cDNA-Proben. Jede Probe wurde im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Es folgte die Herstellung eines Master Mix. Für jede Probe wurden 10 µl 2*x TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (Fa. Applied Biosystems), 6 µl Wasser und 1 µl des entsprechenden *TaqMan*[®] *Gene Expression Assays* (Fa. Applied Biosystems) berechnet. Der Master Mix wurde gevortext, kurz zentrifugiert und 8 µl pro Well in eine 384-Well Multiply[®] PCR-Platte (Fa. Sarstedt) pipettiert. Danach wurden 2 µl der verdünnten cDNA hinzugefügt. Jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Negativkontrolle angesetzt, in der die cDNA durch Apothekenwasser ersetzt wurde. Die genannten Schritte erfolgten auf Eis. Nach Versiegelung der PCR-Platte mithilfe einer Folie, wurde die Platte bei 750 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend begann der eigentliche Vorgang der qRT-PCR, wobei die Amplifizierung der entsprechenden Genabschnitte nach folgendem Temperaturschema erfolgte:

	Temperatur	Dauer		
	50 °C	2 min		
	95 °C	10 min		
Denaturierung	95 °C	15 sek	40 Zyklen	
Annealing	60 °C	1 min		

Tabelle 3: Temperaturprogramm der qRT-PCR

Die Auswertung erfolgte mithilfe der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software* (Version 2.2.). Die Berechnung der relativen Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ cT-Methode durchgeführt.

3.3 Statistische Auswertung der experimentellen Arbeiten

Die Analysen wurden mit der *GraphPad Prism Software Version 5* durchgeführt. Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert ± SEM dargestellt. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen erfolgte mittels zweiseitigem T-Test, für Variablen mit mehr als zwei Gruppen mittels *One-Way ANOVA* und anschließendem *Bonferroni post-hoc* Test. Für alle Analysen wurde ein p-Wert <0,05 als Kriterium für statistische Signifikanz gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von OA-NO₂ auf die Migration von HUVECs im Scratch Assay

Im Scratch Assay wurde der Einfluss von OA-NO₂ (0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM) auf die unstimulierte- und die VEGF-stimulierte Migration von HUVECs untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.2). Als Kontrolle (Negativkontrolle) diente 0,1% iges MeOH, als Positivkontrolle VEGF (10 ng/ml) (VEGF 51±6% vs. Kontrolle 15±4%; p<0,01; vgl. Abb. 5). Der Einsatz von OA-NO₂ 0,1 mM und OA-NO₂ 0.5 mM steigerte die Migration um etwa den Faktor 2.5 gegenüber der Kontrolle (OA-NO₂ 0,1 mM 35±2%, OA-NO₂ 0,5 mM 37±2%; p<0,01 vs. Kontrolle; vgl. Abb. 5). OA-NO₂ 1 mM hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Einwanderung von HUVECs (OA-NO₂ 1mM 26±2%; n.s. vs. Kontrolle; vgl. Abb. 5). In der VEGF-stimulierten Migration führte der Einsatz von OA-NO₂ (0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM) zu signifikanten promigrativen Effekten (VEGF+OA-NO₂ 0,1 mM 61±3%, VEGF+OA-NO₂ 0,5 mM 55±3%; p<0,001 vs. Kontrolle; VEGF+OA-NO₂ 1mM 52±4%; p<0,001 vs. Kontrolle; vgl. Abb. 5). Diese waren signifikant stärker als die Effekte von OA-NO₂ 0,1 mM und 0,5 mM in der unstimulierten Migration (VEGF+OA-NO₂ 0,1 mM 61±3% vs. OA-NO2 0,1 mM 35±2%, VEGF+OA-NO2 0,5 mM 55±3% vs. OA-NO2 0,5 mM 37±2%; p<0,01; vgl. Abb. 5).



Abbildung 5: Effekt von OA-NO₂ auf die unstimulierte und die VEGF-stimulierte Migration von HUVECs. OA-NO₂ 0,1 mM und 0,5 mM induzierten die Einwanderung der Endothelzellen, OA-NO₂ 1 mM zeigte kein signifikantes Ergebnis. In der VEGF-stimulierten Migration führte der Einsatz von OA-NO₂ (0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM) zu signifikanten promigrativen Effekten, welche die Effekte von OA-NO₂ (0,1 mM und 0,5 mM) in der unstimulierten Migration übertrafen; (n=5-6; ***, p<0,001 vs. Kontrolle, ^{\$§}, p<0,01 vs. OA-NO₂ 0,1 mM bzw. OA-NO₂ 0,5 mM).

4.2 Der Einfluss von OA-NO₂ auf die unstimulierte Kapillarröhrchenbildung (*Tube Formation*) von HUVECs

Mit dem folgenden *Assay* wurde die Wirkung von OA-NO₂ auf die Ausbildung von Kapillarröhrchen (*Tube Formation*) bei HUVECs untersucht. Als Kontrolle (Negativkontrolle) diente 0,1%iges MeOH, als Positivkontrolle VEGF (10 ng/ml). Als Testsubstanzen wurden OA-NO₂ (100 nM, 500 nM, 1000 nM) und OA (1000 nM) eingesetzt. Die Anzahl der Verzweigungen und die Längen der *Tubes* wurden im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Da VEGF keinen signifikanten Effekt auf die Tubelänge hatte (VEGF 113±7% vs. Kontrolle 100±7%; n.s.), ist dieser Aspekt hier nicht dargestellt. Die Anzahl der Tubeverzweigungen erhöhte sich unter dem Einfluss von VEGF signifikant (VEGF 200±15% vs. Kontrolle 100±12%; p<0,001; vgl. *Abb. 6*). Der Einsatz der Testlösungen OA-NO₂ 500 nM und 1000 nM führte zu einem signifikanten Anstieg der Tubeverzweigungen um den Faktor 2-3 (OA-NO₂ 500 nM 185±17%; p<0,011 vs. Kontrolle; OA-NO₂ 1000 nM 285±20%; p<0,001 vs.

Kontrolle; vgl. *Abb.* 6). Der Effekt von OA-NO₂ 1000 nM übertraf sogar den Effekt der Positivkontrolle VEGF (OA-NO₂ 1000 nM 285±20% vs. VEGF 200±15%, p<0,01; vgl. *Abb.* 6). Der Einsatz von OA-NO₂ 100 nM führte zu keinem signifikanten Ergebnis (OA-NO₂ 100 nM 140±10%; n.s. vs. Kontrolle; vgl. *Abb.* 6). Auch die native Ölsäure (OA 1000 nM) hatte keinen bedeutenden Einfluss auf die Anzahl der Verzweigungen (OA 1000 nM 98±18%; n.s. vs. Kontrolle; vgl. *Abb.* 6).



Abbildung 6: Effekt von OA-NO₂ (100 nM, 500 nM, 1000 nM) und OA (1000 nM) auf die *Tube Formation* von HUVECs. OA-NO₂ 500 nM und 1000 nM erhöhten die Anzahl der Tubeverzweigungen signifikant gegenüber der Kontrolle, OA-NO₂ 1000 nM auch gegenüber VEGF. OA-NO₂ 100 nM und OA 1000 nM zeigten keinen signifikanten Effekt auf die *Tube Formation*; (n=5-6; ***, p<0,001 vs. Kontrolle, **, p<0,01 vs. Kontrolle; ##, p<0,01 vs. VEGF).

4.3 Der Einfluss von OA-NO₂ auf das Sprouting von HUVECs

Im *Sprouting Assay* wurde die Wirkung von OA-NO₂ auf das dreidimensionale Aussprossen von HUVECs untersucht. OA-NO₂ kam in folgenden Konzentrationen zum Einsatz: 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM und 2500 nM. Als Kontrolle (Negativkontrolle) diente 0,1%iges EtOH, als Positivkontrolle VEGF (20 ng/ml). VEGF erhöhte das Aussprossen der Endothelzellen signifikant gegenüber der Kontrolle (VEGF 328±20% vs. Kontrolle 100±9%; p<0,001; vgl. *Abb.* 7). Der Einsatz der Testsubstanz OA-NO₂ in einer Konzentration von 50 nM und 100 nM bewirkte einen Anstieg der *Sprouts* um etwa den Faktor 2 (OA-NO₂ 50 nM 223±29%; p<0,001 vs. Kontrolle, OA-NO₂ 100 nM 188±24%; p<0,05 vs. Kontrolle; vgl. *Abb.* 7). Beim Einsatz höherer Testkonzentrationen (500 nM, 1000 nM und 2500 nM) zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt, das heißt je höher die eingesetzte Konzentration von OA-NO₂ war, umso stärker präsentierte sich auch das *Sprouting* der HUVECs (OA-NO₂ 500 nM 261±27%, OA-NO₂ 1000 nM 325±10%, OA-NO₂ 2500 nM 441±43%; p<0,001 vs. Kontrolle; vgl. *Abb.* 7). Der Einsatz von OA-NO₂ in niedrigen Konzentrationen 5 nM und 10 nM sowie von OA-NO₂ 250 nM hatte keinen Einfluss auf das *Sprouting*. OA 100 nM 394±58% vs. Kontrolle 100±9%; p<0,001; vgl. *Abb.* 7).



Abbildung 7: Effekt von OA-NO₂ (5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2500 nM) auf das Aussprossen von HUVECs. In den Konzentrationen 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1000 nM und 2500 nM induzierte OA-NO₂ das *Sprouting* signifikant; (n=9-45; ***, p<0,001 vs. Kontrolle, *, p<0,05 vs. Kontrolle).

4.4 Quantitativer Nachweis von PTEN, HO-1, VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 mittels qRT-PCR

Die Wirkung von OA-NO₂ (0,5 μ M, 2,5 μ M, 10 μ M) auf die Genexpression von PTEN, HO-1, VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 wurde mittels qRT-PCR in HUVECs untersucht (vgl. *Abschnitt 3.2.5*). Als Kontrolle diente 0,1% iges EtOH. Die Genexpression von PTEN und HO-1 wurde zusätzlich unter Einfluss von OA (0,5 μ M, 2,5 μ M und 10 μ M) untersucht. Sowohl OA-NO₂ als auch OA hatten keinen signifikanten Effekt auf die Expression von PTEN (vgl. *Abb. 8*A). Das HO-1-Gen wurde unter Einfluss von OA-NO₂ 2,5 μ M um etwa das 12,5-fache (***, p<0,001 vs. Kontrolle; vgl. *Abb. 8*B) und unter Einfluss von OA-NO₂ 10 μ M um etwa das 5-fache (**, p<0,01 vs. Kontrolle; vgl. *Abb. 8*B) heraufreguliert. OA hatte keinen Effekt auf die Genexpression von HO-1. OA-NO₂ bewirkte keine signifikante Veränderung in der Genexpression von VEGF-A (vgl. *Abb. 8*C) und VEGFR-2 (vgl. *Abb. 8*E). Die Genexpression von VEGFR-1 war unter dem Einfluss von OA-NO₂ 2,5 μ M um etwa das 2-fache erhöht, unter OA-NO₂ 0,5 μ M und 10 μ M zeigte sich kein signifikanter Effekt (vgl. *Abb. 8*D).

Α





С





Abbildung 8: Quantitativer Nachweis der Genexpression von (A) PTEN und (B) HO-1 unter Einfluss von OA-NO₂ und OA (0,5 μ M, 2,5 μ M und 10 μ M) und für (C) VEGF-A, (D) VEGFR-1 und (E) VEGFR-2 unter Einfluss von OA-NO₂ (0,5 μ M, 2,5 μ M und 10 μ M) in HUVECs mittels qRT-PCR; (n=3; ***, p<0,001 vs. Kontrolle,**, p<0,01 vs. Kontrolle).

5 Diskussion

Die erhobenen Daten zeigen einen stimulierenden Einfluss von OA-NO₂ auf wichtige Schritte der Angiogenese *in vitro*. Damit weist die hier vorgelegte Arbeit auf eine unbekannte Signaleigenschaft von NO₂-FAs im Gefäßsystem hin und unterstreicht ihre potentielle Bedeutung als protektive Signalmediatoren im kardiovaskulären System. Außerdem demonstriert die Arbeit eine Heraufregulierung der Genexpression von HO-1 und VEGFR-1 durch OA-NO₂ und zeigt damit mögliche Signalwege auf, über welche die Substanzklasse ihre proangiogenen Effekte vermitteln könnte.

5.1 OA-NO₂ induziert die Angiogenese *in vitro*

Die Angiogenese ist definiert als das Wachstum von kleinen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Carmeliet und Jain, 2000). Im gesunden adulten Organismus ist der Prozess aufgrund eines Gleichgewichts zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren in der Regel nicht aktiv, kann aber durch einen physiologischen Stimulus wie etwa eine Hypoxie schnell induziert werden und fördert dann zum Beispiel die Wundheilung. Eine dauerhafte Störung dieses Gleichgewichts geht mit zahlreichen Krankheiten einher. Eine verstärkte Aktivierung der Angiogenese ist beispielsweise ein Merkmal maligner Tumore, eine verminderte Aktivierung liegt typischerweise bei Myokardischämie oder Präeklampsie vor (Carmeliet, 2005), (vgl. *Abschnitt 1.1*).

In der vorliegenden Arbeit wurden drei etablierte Angiogenese Assays (Scratch Assay, Tube Formation Assay und Sprouting Assay) eingesetzt, die verschiedene Phasen der Angiogenese abbilden (vgl. Abschnitt 3.2.1). Der Einsatz von OA-NO₂ führte in allen drei Versuchsmethoden zu signifikanten proangiogenen Effekten.

Im Scratch Assay stimulierte OA-NO₂ die Migration von HUVECs (vgl. *Abschnitt 4.1*). Diese Wirkung war unter dem Einfluss von OA-NO₂ in den Konzentrationen 0,1 mM und 0,5 mM nachweisbar. Der Einsatz von OA-NO₂ 1 mM hatte keinen signifikanten Effekt auf die Einwanderung der Endothelzellen in die freie Fläche. Dieser Wirkungsverlust könnte in einer möglichen Zytotoxizität von OA-NO₂ in hohen Konzentrationen begründet liegen. In der VEGF-stimulierten Migration führte der Einsatz von

47

OA-NO₂ 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM zu einem signifikanten Ergebnis. Dabei übertrafen die promigrativen Effekte von VEGF+OA-NO₂ (0,1 mM und 0,5 mM) die Effekte von OA-NO₂ (0,1 mM und 0,5 mM) in der unstimulierten Migration. Somit weisen die Daten darauf hin, dass die Ergebnisse in der VEGF-stimulierten Migration primär auf die Wirkung von VEGF zurückzuführen sind. Außerdem scheint eine Zytotoxizität von OA-NO₂ 1 mM nun unwahrscheinlich, da man diese auch bei einem gemeinsamen Einsatz mit VEGF erwarten würde.

Neben der promigrativen Wirkung hatte OA-NO₂ einen stimulierenden Einfluss auf die Differenzierung von HUVECs, welche mithilfe des *Tube Formation-* und *Sprouting Assays* untersucht wurde. Dabei wurden nanomolare Konzentrationen getestet, die sich den zu erwartenden physiologischen Konzentrationen unter inflammatorischen Bedingungen annähern (vgl. *Abschnitt 1.2.1*).

Im 2D-Tube Formation Assay erhöhte OA-NO₂ 500 nM und 1000 nM die Verzweigungspunkte von Kapillarröhrchen signifikant um das Zwei- bis Dreifache. Die Wirkung von OA-NO₂ 1000 nM war sogar signifikant stärker als die der Positivkontrolle VEGF. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass OA-NO₂ über eine Potenzierung von VEGF-Effekten proangiogen wirkt. Dagegen sprechen die Daten des Scratch Assays, die keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung von VEGF und der von VEGF+OA-NO₂ zeigen. Bei einer Potenzierung von VEGF-Effekten durch OA-NO₂ ware eine signifikante Wirkungssteigerung von VEGF+OA-NO₂ im Vergleich zu VEGF zu erwarten. Es ist aber auch vorstellbar, dass OA-NO₂ konzentrationsabhängig zu einer Potenzierung von VEGF-Effekten führt. Ein anderer Erklärungsansatz liegt in einem Signalweg, der nicht oder nur zum Teil über VEGF vermittelt wird. Dabei ist zum Beispiel eine Beteiligung von HO-1 möglich, da HO-1 proangiogene Effekte besitzt (vgl. Abschnitt 1.2.3.3) und ihre Heraufregulierung durch OA-NO₂ in dieser Arbeit demonstriert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.4). Der Einsatz von OA-NO₂ 100 nM hatte keinen Effekt auf die Tube Formation. Hiermit bestätigt sich eine bereits im Scratch Assay beobachtete konzentrationsabhängige Wirkung von OA-NO₂. Jedoch scheint nicht nur eine sehr hohe Konzentration (1mM im Scratch Assay),

48

sondern auch eine niedrigere Konzentration (100 nM im *Tube Formation Assay*) unwirksam zu sein. Als weitere Testsubstanz im *Tube Formation Assay* wurde die native Ölsäure (OA 1000 nM) verwendet, die die Verzweigung der *Tubes* nicht beeinflusste. Dieses Ergebnis stimmt mit experimentellen Daten anderer Studien überein, in denen typische Effekte von nitrierten Fettsäuren nicht durch native Fettsäuren erzielt werden konnten (Rudnicki et al., 2011, Rudolph et al., 2010b). Dies unterstreicht die besonderen Eigenschaften von NO₂-FAs, sowohl über NO als auch über ihre Elektrophilie Signale zu vermitteln (vgl. *Abschnitt 1.2.3*).

Im 3D-*Sprouting* Assay induzierte OA-NO₂ das kapillarähnliche Aussprossen von Sphäroiden und damit einen Prozess, der die komplexe Angiogenese sehr gut *in vitro* imitiert. Das *Sprouting* begann unter dem Einsatz von OA-NO₂ 50 nM, nahm unter 100 nM ab und stieg mit dem Einsatz von OA-NO₂ 500 nM, 1000 nM und 2500 nM konzentrationsabhängig an. Der Einsatz niedriger nanomolarer Konzentrationen (5 nM und 10 nM) sowie von OA-NO₂ 250 nM hatte keinen relevanten Einfluss auf das Aussprossen der Sphäroide. Auch hier zeigt sich also eine proangiogene Wirkung von OA-NO₂ in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Entgegen der Annahme führte im Sphäroidkultur *Assay* der Einsatz von nativer Ölsäure (OA 100 nM) zur Ausbildung kapillarähnlicher Aussprossungen.

Zusammenfassend zeigt die vorgelegte Arbeit, dass OA-NO₂ einen proangiogenen Einfluss *in vitro* besitzt. Dieser Effekt war in einem bestimmten Konzentrationsbereich (50 nM bis 0,5 mM) vorhanden. Hervorzuheben ist die starke proangiogene Wirkung von OA-NO₂ 1000 nM, die im *Tube Formation Assay* sogar den Effekt von VEGF übertraf, welcher zu den potentesten proangiogenen Faktoren zählt (vgl. *Abschnitt 1.1.1*). Beim Einsatz von OA-NO₂ 100 nM (im *Tube Formation Assay*) und OA-NO₂ 250 nM (im *Sprouting Assay*) blieb die Wirkung jedoch aus. OA-NO₂ 100 nM wurde ebenfalls im Sprouting Assay getestet, hier führte sein Einsatz allerdings zu einem signifikanten Ergebnis. Diese Heterogenität lässt sich eventuell auf einen schnellen Zerfall von OA-NO₂ zurückführen, da bislang noch wenig über die Stabilität der Substanzklasse in der Zellkultur bekannt ist (Mitschke et al., 2007). Eine weitere Ursache für die Inhomogenität der Ergebnisse kann hier in der unterschiedlichen Verfügbarkeit von OA-NO₂ in den Testmedien liegen. OA-NO₂ ist im Serum an Proteine gebunden und steht damit nicht mehr als Wirksubstanz zur Verfügung (Rudolph et al., 2009). Daher ist der Serumanteil in den verwendeten Testmedien für die Interpretation der experimentellen Daten von Bedeutung: im *Scratch Assay* enthielt das Wachstumsmedium 0,2% FCS, im *Tube Formation Assay* 2% FCS. Im *Sprouting Assay* wurde serumfreies Basalmedium verwendet. Daher ist davon auszugehen, dass im *Tube Formation Assay* ein größerer Anteil der Testsubstanz in gebundener Form vorlag als im *Sprouting Assay*. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass OA-NO₂ 100 nM im Tube *Formation Assay* keine Wirkung zeigte.

Die physiologischen Konzentrationen von NO₂-FAs im Plasma gesunder Menschen wurden im pikomolaren Bereich gemessen (Tsikas et al., 2009). Da Nitrierungen aber vor allem unter inflammatorischen Bedingungen in Mikroumgebungen auftreten, ist von höheren Konzentrationen für diese Substanzklasse auszugehen (vgl. Abschnitt 1.2.1). Daher orientierte sich die Auswahl der Testkonzentrationen in dieser Arbeit an einer Studie von Rudolph et al., in der die de novo-Bildung von NO2-FAs unter oxidativinflammatorischen Bedingungen untersucht wurde (Rudolph et al., 2009). Dafür wurde durch Ligation der linken Koronararterie (LCA) eine 30-minütige Ischämie am Mäusemyokard provoziert. Anschließend folgte eine 30-minütige Reperfusionsphase. Dieser Prozess führte zu einer de novo-Bildung von OA-NO₂ in einer Konzentration von 9,5±4.7 nmol/l und von trans-LNO₂ in einer Konzentration von 17,3±4,7 nmol/l im Myokardgewebe der Mäuse (Rudolph et al., 2010b). In der vorliegenden Arbeit führten vergleichbare Testkonzentrationen (5 nM und 10 nM) allerdings nicht zu proangiogenen Effekten. Eine signifikante Wirkung war hier erst unter dem Einfluss von OA-NO₂ 50 nM zu beobachten. Somit bleibt an dieser Stelle unklar, ob physiologische Konzentrationen dieser Substanzklasse die Angiogenese stimulieren können. Da jedoch ein therapeutischer Nutzen aus dem Einsatz von NO2-FAs resultieren könnte, ist auch die Wirkung höherer Konzentrationen von großem Interesse (vgl. Abschnitt 5.3).

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis OA-NO₂-vermittelter proangiogener Effekte wird durch Ergebnisse einer aktuellen Studie bestätigt (Rudnicki et al., 2011). In dieser konnte mithilfe von *in vitro* (*Scratch Assay*)-, *ex vivo* (Aortenring *Assay*)- und *in vivo* (*CAM Assay*)-Experimenten gezeigt werden, dass NO_2 -FAs Angiogenese stimulieren. Als Testsubstanzen wurden OA-NO₂ und LNO_2 in einer Konzentration von jeweils 10 µM verwendet.

5.2 OA-NO₂ induziert die Genexpression von HO-1 und VEGFR-1

Auf der Suche nach einem Signalweg, über den OA-NO₂ seine proangiogenen Effekte vermittelt, wurde der Einfluss von OA-NO₂ (0,5 μ M, 2,5 μ M und 10 μ M) auf die Expression von wichtigen an der Regulation der Angiogenese beteiligten Genen (PTEN, HO-1, VEGFR-A, VEGFR-1 und VEGFR-2) mittels qRT-PCR in HUVECs untersucht. Die vorliegenden Daten zeigen eine Heraufregulierung der HO-1- und VEGFR-1-Genexpression (vgl. *Abschnitt 4.4*).

Die Genexpression von HO-1 wurde durch OA-NO₂ 2,5 μ M und 10 μ M induziert. Dabei hatte OA-NO₂ 2,5 μ M den stärksten Effekt. Bemerkenswert ist, dass der Einsatz von OA-NO₂ in derselben Konzentration im *Sprouting Assay* zur stärksten proangiogenen Antwort führte (vgl. *Abschnitt 4.3*). Sowohl der *Sprouting Assay* als auch die qRT-PCR wurden mit HUVECs durchgeführt. Somit könnten die vorliegenden Daten als Hinweis auf eine HO-1-vermittelte Stimulation der Angiogenese durch OA-NO₂ gedeutet werden. Diese Hypothese sollte in weiterführenden Experimenten geprüft werden. Dafür würde sich zum Beispiel der Einsatz von HO-1-*knockout*-Zellen in Angiogenese *Assays* eignen. Eine Heraufregulierung der HO-1-Genexpression durch NO₂-FAs wurde auch in anderen Studien beobachtet. Die Substanzklasse bewirkte sowohl *in vitro* in Endothelzellen als auch *in vivo* in der Gefäßwand von Mäusen eine Induktion der HO-1-Genexpression (Wright et al., 2006, Cole et al., 2009).

Die Genexpression von VEGFR-1 wurde unter dem Einfluss von OA-NO₂ 2,5 µM heraufreguliert. VEGFR-1 und VEGFR-2 vermitteln über ihren zentralen Liganden VEGF-A wichtige proangiogene Effekte. Überraschenderweise zeigte OA-NO₂ in der vorliegenden Arbeit eine Wirkung auf VEGFR-1, jedoch keinen Einfluss auf die Genexpression von VEGF-A und VEGFR-2. Daher stellt sich an dieser Stelle die Frage nach alternativen Aktivierungswegen von VEGFR-1. In der Literatur sind VEGF-B und PGF als weitere Liganden des Rezeptors beschrieben (Shibuya, 2008). Darüber hinaus ist

eine direkte Induktion von VEGFR-1 durch OA-NO₂ denkbar. Aber auch eine Beteiligung von VEGF-A sollte allein aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, da eine Heraufregulierung der VEGF-A-Genexpression durch NO₂-FAs kürzlich demonstriert werden konnte (Rudnicki et al., 2011). Dabei verwendete Rudnicki et al. die gleiche Methode, Testsubstanz, Konzentration der Testsubstanz und Zelllinie wie die hier vorgelegte Arbeit. Allerdings unterschieden sich die Experimente in der Inkubationszeit der Testsubstanz. In der hier durchgeführten qRT-PCR betrug die Inkubationszeit 6 h, in der Studie von Rudnicki et al. 4 h. Unter geeigneten Bedingungen sollte also von einer VEGF-Induktion durch NO₂-FAs ausgegangen werden.

Die Annahme, dass HO-1, VEGF-A und VEGFR-1 an der Vermittlung proangiogener Effekte von OA-NO₂ beteiligt sind, macht folgende Signalwege denkbar: 1. Ein NO-unabhängiger Signalweg: OA-NO₂ induziert HO-1, welche über ihren Metaboliten CO die Bildung proangiogener Faktoren stimuliert, unter anderem die Bildung von VEGF (Kim et al., 2011). VEGF könnte schließlich über VEGFR-1 einen Einfluss auf die Angiogenese haben. 2. Ein NO-abhängiger Signalweg: OA-NO₂ könnte über eine Freisetzung von NO zur Stimulation von HO-1 und VEGF führen. Außerdem kann NO selbst proangiogene Effekte vermitteln (Fukumura et al., 2006).

Ein NO-abhängiger Signalweg wurde bereits durch Rudnicki et al. *in vitro* untersucht und bestätigt. Ihre Studienergebnisse zeigen, dass NO₂-FAs NO- und HIF-1 α -abhängig Angiogenese stimulieren. Der außerdem erbrachte Nachweis der VEGF-A-Induktion durch NO₂-FAs war ebenfalls NO- und HIF-1 α -abhängig (Rudnicki et al., 2011). Zusammenfassend machen diese Daten folgenden Signalweg wahrscheinlich: NO₂-FAs setzen NO frei, das wiederum HIF-1 α aktiviert und darüber VEGF induziert. VEGF stimuliert schließlich die Angiogenese. Die Ergebnisse von Rudnicki et al. schließen aber nicht aus, dass auch HO-1 an der Vermittlung NO-abhängiger proangiogener Effekte durch NO₂-FAs beteiligt ist, da HIF-1 α neben VEGF auch HO-1 induzieren kann (Ockaili et al., 2005), (vgl. *Abschnitt 1.1.1*). Zudem ist es vorstellbar, dass NO₂-FAs direkt über NO proangiogen wirken. In der Literatur ist beschrieben, dass NO über S-Nitrosylierung und/oder cGMP zu verminderter Apoptose, gesteigerter Proliferation und Migration von Endothelzellen führt (Pyriochou et al., 2007, Ziche und Morbidelli, 2009). Hinweise für einen NO-abhängigen Signalweg *in vitro* müssen jedoch zur kritischen Frage nach dem Freisetzungsmechanismus von NO durch NO₂-FAs *in vivo* führen, da dieser bislang noch unklar ist (vgl. *Abschnitt 1.2.3.1*).

5.3 Therapeutische Konsequenz

Der hier erbrachte Nachweis von proangiogenen Effekten für OA-NO₂ unterstreicht den potentiellen therapeutischen Nutzen dieser Substanzklasse.

Die Angiogenese als ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt weckte zunächst das Interesse der Forschung auf dem Gebiet der Onkologie. Antiangiogene Ansätze mit dem Ziel, das Wachstum von Blutgefäßen in malignen Tumoren und Augenerkrankungen zu hemmen, führten zur Zulassung von VEGF(Rezeptor)-Inhibitoren (Crawford und Ferrara, 2009b). Diese zeigten bisher leider nicht den erhofften Erfolg, da die Tumore unter anderem Resistenzen entwickelten oder gegenüber den Medikamenten unempfindlich waren (Crawford und Ferrara, 2009a). Dem antiangiogenen steht ein proangiogener Therapieansatz gegenüber, der bei ischämischen Krankheiten wie zum Beispiel der Koronaren Herzkrankheit (KHK) von großem Nutzen sein könnte (Takeshita et al., 1994). Die systemische oder lokale Applikation proangiogener Faktoren in Form von Protein- oder Gentransfer wird als "therapeutische Angiogenese" bezeichnet und zeigte bereits in vielen Tierversuchen vielversprechende Ergebnisse. So führte etwa die Überexpression von VEGF-A im Myokard adulter Mäusen zu einer signifikanten Zunahme von Koronararterien (Lee und Smits, 2002). Die klinischen Studienergebnisse sind bisher allerdings enttäuschend (Henry et al., 2000, Losordo et al., 2002, Simons et al., 2002, Syed et al., 2004). Als eine mögliche Ursache hierfür wird eine mangelnde Effizienz einer Monotherapie mit proangiogenen Faktoren im menschlichen Organismus diskutiert. Eine Erfolg versprechende Alternative bietet unter anderem die Anwendung von Kombinationstherapien, das heißt zum Beispiel die Gabe mehrerer proangiogener Faktoren oder eine kombinierte Stammzell- und Gentherapie (Syed et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit präsentiert OA-NO₂ als einen starken proangiogenen Signalmediator, der im *Tube Formation Assay* in einer Konzentration von 1000 nM sogar einen signifikanten Effekt gegenüber der Positivkontrolle VEGF erzielte (vgl. *Abschnitt 4.2*). Eine Substanzklasse wie die nitrierten Fettsäuren, die sowohl antiinflammatorische (vgl. *Abschnitt 1.2*) als auch proangiogene Signaleigenschaften vereint, ist von großem therapeutischem Interesse, da eine Dysregulation von Angiogenese und Inflammation in der Entstehung vieler Krankheiten eine zentrale Rolle spielt (vgl. *Abschnitt 1.1.2*). Ein möglicher Nutzen von NO₂-FAs soll im Folgenden am Beispiel der KHK verdeutlicht werden:

Die KHK stellt die häufigste Todesursache in den Industrieländern dar (Syed et al., 2004). Ihre Therapie beinhaltet in fortgeschrittenen Stadien zwei wesentliche Ansätze, zum einen die chirurgische Versorgung durch das Anlegen koronarer Bypässe und zum anderen die perkutane koronare Intervention (percutaneous coronary intervention, PCI). Mit Einführung der primären PCI kam es zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität (Caines et al., 2004). Allerdings sind etwa 10% der Patienten aufgrund von diffusen oder komplizierten Läsionen für diese Maßnahme nicht geeignet (Syed et al., 2004). Zusätzlich zeigen 30-60% der Patienten trotz erfolgreich durchgeführter PCI ein sogenanntes "no-reflow"-Phänomen. Darunter versteht man eine unzureichende Perfusion des Myokards nach akutem Myokardinfarkt trotz wiederhergestellter Durchgängigkeit der epikardialen Gefäße (van der Laan et al., 2009). Dieser Zustand ist mit einem ungünstigen linksventrikulären "remodeling" ("Umbau") und Herzversagen assoziiert. Der Grund für dieses Phänomen scheint eine Dysfunktion der Mikrozirkulation zu sein, die unter anderem durch Gewebeödeme, Vasokonstriktion, Anschwellen von Endothelzellen, Inflammation, Infiltration durch Neutrophile und Embolisierung von atheromatösen und thrombotischen Ablagerungen entsteht (Hirata et al., 1990, Ma et al., 1993, Maier et al., 2005, Sheridan et al., 1996, Kotani et al., 2002). Die KHK, insbesondere das Auftreten eines "no-reflow"-Phänomens, stellt einen möglichen therapeutischen Einsatzbereich für NO₂-FAs dar. Dabei könnte diese Substanzklasse zum einen durch ihre antiinflammatorischen Signaleigenschaften wie zum Beispiel die Hemmung der Plättchenaggregation, die Hemmung der Neutrophilenaktivierung oder die Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen (Coles et al., 2002a, Coles et al.,

2002b) und zum anderen durch ihre in dieser Arbeit demonstrierten proangiogenen Eigenschaften einen therapeutischen Nutzen haben.

5.4 Limitationen der experimentellen Arbeit

Die Darstellung eines so komplexen Prozesses wie der Angiogenese ist *in vitro* nur begrenzt möglich. Die Angiogenese setzt sich aus vielen einzelnen Schritten zusammen, dazu zählen unter anderem die Migration, die Proliferation und die Differenzierung von Endothelzellen. Da ein einzelner in *vitro Assay* in der Regel nur einen Ausschnitt des Gesamtprozesses erfassen kann, ist seine Aussagekraft limitiert. In der hier vorgelegten Arbeit wurde durch die Anwendung von drei verschiedenen Versuchsmethoden versucht, eine möglichst umfassende Abbildung der Angiogenese zu erhalten. Die Migration findet zu Beginn der Angiogenese statt, wenn die Endothelzellen nach Durchbrechen der Zellmembran in Richtung des perivaskulären Stromas wandern. Dieser Schritt wurde mithilfe des *Scratch Assays* untersucht. Im Anschluss bilden die Endothelzellen neue Endothelzellkanäle aus. Hierbei spielt die Endothelzelldifferenzierung eine entscheidende Rolle, die mithilfe des 2D-*Tube Formation-* und 3D-*Sprouting Assays* simuliert wird.

Eine weitere Limitation in der Darstellung der Angiogenese *in vitro* ist die fehlende physiologische Umgebung. Für die Aktivierung der Angiogenese spielen neben den Endothelzellen auch weitere Zellen, wie etwa glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten, die extrazelluläre Matrix und/oder Basalmembran und das zirkulierende Blut eine zentrale Rolle (Staton et al., 2009).

Außerdem muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass in den Experimenten Substanzen zum Einsatz kommen bzw. Faktoren entstehen können, die neben der eigentlichen Testsubstanz einen Einfluss auf die Migration haben können. Im *Scratch Assay* werden Endothelzellen durch das Freikratzen der konfluenten Zellschicht verletzt, wodurch es zur Freisetzung möglicher angiogener Faktoren kommen kann (Auerbach et al., 1991, Cai et al., 2000). In den Endothelzelldifferenzierungs-*Assays* hat die Auswahl der Matrix, in der die Endothelzellen eingebettet werden, einen Einfluss auf das Ergebnis (Madri and Williams, 1983). Meist kommen Collagen, Fibrin oder Matrigel zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde im *Tube Formation* Assay Matrigel verwendet, welches vor allem zur Röhrchenbildung und weniger zur Proliferation der Endothelzellen führt (Madri und Williams, 1983). Um eine Überstimulation der Endothelzellen zu vermeiden, war das Matrigel reduziert an Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Für den *Sprouting Assay* wurde Collagen Typ I aus Rattenschwänzen gewonnen, da es sich in unserer Arbeitsgruppe für diese Methode bereits bewährt hatte. Der Einsatz dieses Collagentyps unterstützt überwiegend die Endothelzellproliferation (Madri und Williams, 1983).

5.5 Ausblick

Im vorangegangenen Abschnitt der Arbeit wurde darauf hingewiesen, dass die Darstellung der Angiogenese *in vitro* nur begrenzt möglich ist. Es gibt Beispiele von Testsubstanzen, die *in vitro*, aber nicht *in vivo* proangiogen wirken und umgekehrt (Liekens et al., 2001). Daher sollten die vorliegenden Ergebnisse durch weiterführende Experimente *in vivo* validiert werden. Erste Daten wurden von Rudnicki et al. erhoben und zeigen eine Stimulation der Neovaskularisierung durch LNO_2 (10 µM) und $OA-NO_2$ (10 µM) *in vivo* (Rudnicki et al., 2011). Als Versuchsmethode wurde der *CAM Assay* ausgewählt, bei dem die Chorioallantois-Membran (CAM) zur Untersuchung angiogener Substanzen dient. Da die CAM selbst jedoch sehr gut vaskularisiert ist, ist die Unterscheidung zwischen neuen und bereits existierenden Kapillaren schwierig. Als ein weiteres *in vivo* Experiment würde sich daher der *Corneal Angiogenesis Assay* anbieten, da die Kornea als einziges Gewebe im Körper keine Gefäße besitzt (Staton et al., 2009).

In dieser Arbeit zeigte OA-NO₂ 1000 nM die stärkste proangiogene Wirkung und übertraf dabei sogar die Potenz von VEGF. Daher ist es von besonderem Interesse diese Konzentration in weiterführenden Experimenten zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Das Forschungsinteresse dieser Arbeit galt dem Einfluss von NO₂-FAs auf die Angiogenese. Aktuelle Studienergebnisse charakterisieren die Substanzklasse als pluripotente Signalmediatoren, die unter oxidativ-inflammatorischen Bedingungen endogen gebildet werden und zur Resolution von Entzündung im kardiovaskulären Kompartiment beitragen können (vgl. *Abschnitt 1.2*). Da die Inflammation sehr eng mit dem Prozess der Angiogenese verknüpft ist (vgl. *Abschnitt 1.1.2*), entwickelte sich die hier vorgelegte Arbeitshypothese.

Die erhobenen Daten dieser Arbeit zeigen, dass OA-NO₂ wichtige Schritte der Angiogenese *in vitro* stimuliert. Die proangiogene Wirkung war in einem Konzentrationsbereich von 50 nM bis 0,5 mM zu beobachten. Dabei erzielte die Testsubstanz in hohen nanomolaren Konzentrationen die stärksten Effekte, der Einsatz von OA-NO₂ 1000 nM im *Tube Formation Assay* übertraf sogar die Wirkung des potenten proangiogenen Faktors VEGF. In der qRT-PCR führte der Einsatz von OA-NO₂ zu einer Heraufregulierung der Genexpression des HO-1- und VEGR-1-Gens. Sowohl HO-1 als auch VEGFR-1 sind an der Vermittlung proangiogener Signale beteiligt (vgl. *Abschnitt 1.1.1*). Daher ist es wahrscheinlich, dass OA-NO₂ unter anderem über diese Faktoren die Angiogenese stimuliert. Die Expression der Gene von VEGF-A, VEGFR-2 und PTEN, welche ebenfalls an der Regulation der Angiogenese beteiligt sind, standen dagegen nicht unter dem Einfluss von OA-NO₂.

Die hier vorgelegte Arbeit weist auf eine neue physiologische Rolle von NO₂-FAs im Gefäßsystem hin und trägt somit zur weiteren Charakterisierung dieser Substanzklasse bei. Ihre besonderen Signaleigenschaften wecken die Hoffnung auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von NO₂-FAs bei der Resolution ischämisch-inflammatorischer Prozesse, wie es hier am Beispiel der KHK veranschaulicht wurde.

7 Summary

Nitro-Fatty Acids (NO₂-FAs) are a class of signalling lipid mediators. Due to their electrophilic qualities they can mediate pluripotent activities, mainly inhibiting inflammatory signalling. Recent studies have shown a protective role for this species in the cardiovascular compartment, which gave cause for investigating its role in angiogenesis. Herein, we provide experimental evidence for proangiogenic qualities of OA-NO₂. In three different *in vitro* angiogenesis assays, OA-NO₂ provoked a stimulation of important steps of angiogenesis in HUVECs. Furthermore we investigated the impact of OA-NO₂ on the expression of genes, which are involved in the stimulation of angiogenesis by using qRT-PCR in HUVECs. The results show an upregulation of HO-1- and VEGFR-1-gene expression, but no significant impact on the regulation of gene expression of VEGF-A, VEGFR-2 and PTEN. As HO-1 and VEGFR-1 are associated with angiogenesis, its upregulation could be in part responsible for the proangiogenic effect of NO₂-FAs.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	Mikromol
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ang-1	Angiopoitien-1
Ang-2	Angiopoitien-2
ARE/EpRE	Antioxidant/Electrophile response element
AT ₁	Angiotensin 1
ATF2	Activating transcription factor 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CAM	Chorioallantois-Membran
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	Endothelial cell growth medium
EGR1	Early growth regulated protein 1
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fetal calf serum
Flk-1	Fetal liver kinase-1
Flt	Fms like-tyrosine kinase
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
h	Stunde
Н	Wasserstoffatom
HCI	Chlorwasserstoff
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor-1α
His	Histidin
HNO ₂	Hydrogennitrit
НО	Hämoxygenase
H ₂ O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HPLC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HRE	Hypoxia response element
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-8	Interleukin-8
iNOS	induzierbare NO-Synthase

IP ₃	Inositoltriphosphat
KCI	Kaliumchlorid
KDR	Kinase domain region
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
kg	Kilogramm
I	Liter
LA	Linolsäure
LCA	Linke Koronararterie
LNO ₂	Nitro-Linolsäure
L00•	Lipidperoxylradikal
Lys	Lysin
М	Molar
MeOH	Methanol
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miR	micro-RNA
MKP-1	MAPK Phosphatase-1
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
N	Normalität
NaOH	Natriumhydroxid
NF-ĸB	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nNOS	neuronale NO-Synthase

•NO	Stickstoffmonoxid
•NO ₂	Stickstoffdioxid
NO_2^-	Nitrition
NO ₂ -FA	Nitrierte Fettsäure
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OA	Ölsäure
OA-NO ₂	Nitro-Ölsäure
OD	Optische Dichte
ONOO ⁻	Peroxynitrit
р	probability, Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Percutaneous coronary intervention
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGF	Placental growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
РКВ	Proteinkinase B
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
PPRE	PPAR response element
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
RASMC	Rat aortic smooth muscle cell

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Tranksriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S	Svedberg
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler
sEng	soluble endoglin
Ser	Serin
sFLT-1	soluble fms-like tyrosine kinase 1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF-ß	Transforming growth factor-ß
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VS.	versus
VSMC	Vascular smooth muscle cell

9 Literaturverzeichnis

- AUERBACH, R., AUERBACH, W. & POLAKOWSKI, I. 1991. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther*, 51, 1-11.
- BAKER, L. M., BAKER, P. R., GOLIN-BISELLO, F., SCHOPFER, F. J., FINK, M., WOODCOCK, S. R., BRANCHAUD, B. P., RADI, R. & FREEMAN, B. A. 2007. Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem*, 282, 31085-93.
- BAKER, P. R., LIN, Y., SCHOPFER, F. J., WOODCOCK, S. R., GROEGER, A. L., BATTHYANY, C., SWEENEY, S., LONG, M. H., ILES, K. E., BAKER, L. M., BRANCHAUD, B. P., CHEN, Y. E. & FREEMAN, B. A. 2005. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*, 280, 42464-75.
- BAKER, P. R., SCHOPFER, F. J., O'DONNELL, V. B. & FREEMAN, B. A. 2009. Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med*, 46, 989-1003.
- BALAZY, M., IESAKI, T., PARK, J. L., JIANG, H., KAMINSKI, P. M. & WOLIN, M. S. 2001. Vicinal nitrohydroxyeicosatrienoic acids: vasodilator lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 299, 611-9.
- BATTHYANY, C., SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R., DURAN, R., BAKER, L. M., HUANG, Y., CERVENANSKY, C., BRANCHAUD, B. P. & FREEMAN, B. A. 2006. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem*, 281, 20450-63.
- CAI, G., LIAN, J., SHAPIRO, S. S. & BEACHAM, D. A. 2000. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. *Methods Cell Sci*, 22, 107-14.
- CAINES, A. E., MASSAD, M. G., KPODONU, J., REBEIZ, A. G., EVANS, A. & GEHA, A. S. 2004. Outcomes of coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention and medical therapy for multivessel disease with and without left ventricular dysfunction. *Cardiology*, 101, 21-8.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-95.
- CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med,* 9, 653-60.
- CARMELIET, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438, 932-6.
- CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEYT, S., KIECKENS,
 L., GERTSENSTEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL,
 K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L.,
 COLLEN, D., RISAU, W. & NAGY, A. 1996. Abnormal blood vessel

development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-9.

- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CEBE-SUAREZ, S., ZEHNDER-FJALLMAN, A. & BALLMER-HOFER, K. 2006. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*, 63, 601-15.
- COLE, M. P., RUDOLPH, T. K., KHOO, N. K., MOTANYA, U. N., GOLIN-BISELLO, F., WERTZ, J. W., SCHOPFER, F. J., RUDOLPH, V., WOODCOCK, S. R., BOLISETTY, S., ALI, M. S., ZHANG, J., CHEN, Y. E., AGARWAL, A., FREEMAN, B. A. & BAUER, P. M. 2009. Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res*, 105, 965-72.
- COLES, B., BLOODSWORTH, A., CLARK, S. R., LEWIS, M. J., CROSS, A. R., FREEMAN, B. A. & O'DONNELL, V. B. 2002a. Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ Res*, 91, 375-81.
- COLES, B., BLOODSWORTH, A., EISERICH, J. P., COFFEY, M. J., MCLOUGHLIN, R. M., GIDDINGS, J. C., LEWIS, M. J., HASLAM, R. J., FREEMAN, B. A. & O'DONNELL, V. B. 2002b. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. J Biol Chem, 277, 5832-40.
- CONWAY, E. M., COLLEN, D. & CARMELIET, P. 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, 49, 507-21.
- CRAWFORD, Y. & FERRARA, N. 2009a. Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 624-30.
- CRAWFORD, Y. & FERRARA, N. 2009b. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res*, 335, 261-9.
- CUI, T., SCHOPFER, F. J., ZHANG, J., CHEN, K., ICHIKAWA, T., BAKER, P. R., BATTHYANY, C., CHACKO, B. K., FENG, X., PATEL, R. P., AGARWAL, A., FREEMAN, B. A. & CHEN, Y. E. 2006. Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem*, 281, 35686-98.
- DULAK, J., DESHANE, J., JOZKOWICZ, A. & AGARWAL, A. 2008. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation*, 117, 231-41.
- DULAK, J., JOZKOWICZ, A., FORESTI, R., KASZA, A., FRICK, M., HUK, I., GREEN, C. J., PACHINGER, O., WEIDINGER, F. & MOTTERLINI, R. 2002. Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*, 4, 229-40.

- EMA, M., TAYA, S., YOKOTANI, N., SOGAWA, K., MATSUDA, Y. & FUJII-KURIYAMA, Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4273-8.
- FERRARA, N., CARVER-MOORE, K., CHEN, H., DOWD, M., LU, L., O'SHEA, K. S., POWELL-BRAXTON, L., HILLAN, K. J. & MOORE, M. W. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439-42.
- FERRARA, N. & DAVIS-SMYTH, T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev,* 18, 4-25.
- FIEDLER, U., REISS, Y., SCHARPFENECKER, M., GRUNOW, V., KOIDL, S., THURSTON, G., GALE, N. W., WITZENRATH, M., ROSSEAU, S., SUTTORP, N., SOBKE, A., HERRMANN, M., PREISSNER, K. T., VAJKOCZY, P. & AUGUSTIN, H. G. 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*, 12, 235-9.
- FINLAYSON-PITTS, B. J., SWEETMAN, L. L. & WEISSBART, B. 1987. A Fourier transform infrared spectrometry study of the reactions of phosphatidylcholines with gaseous N2O5 and NO2. *Toxicol Appl Pharmacol,* 89, 438-48.
- FOLKMAN, J. 1995. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*, 333, 1757-63.
- FORMAN, B. M., TONTONOZ, P., CHEN, J., BRUN, R. P., SPIEGELMAN, B. M. & EVANS, R. M. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, 83, 803-12.
- FREEMAN, B. A., BAKER, P. R., SCHOPFER, F. J., WOODCOCK, S. R., NAPOLITANO, A. & D'ISCHIA, M. 2008. Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem*, 283, 15515-9.
- FUKUMURA, D., KASHIWAGI, S. & JAIN, R. K. 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 6, 521-34.
- GALLON, A. A. & PRYOR, W. A. 1993. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linolenate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids*, 28, 125-33.
- GERICKE, A., MUNSON, M. & ROSS, A. H. 2006. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene*, 374, 1-9.
- HAMADA, K., SASAKI, T., KONI, P. A., NATSUI, M., KISHIMOTO, H., SASAKI, J., YAJIMA, N., HORIE, Y., HASEGAWA, G., NAITO, M., MIYAZAKI, J., SUDA, T., ITOH, H., NAKAO, K., MAK, T. W., NAKANO, T. & SUZUKI, A. 2005. The PTEN/PI3K pathway governs normal vascular development and tumor angiogenesis. *Genes Dev*, 19, 2054-65.
- HENRY, G. D., BYRNE, R., HUNYH, T. T., ABRAHAM, V., ANNEX, B. H., HAGEN, P. O. & DONATUCCI, C. F. 2000. Intracavernosal injections of

vascular endothelial growth factor protects endothelial dependent corpora cavernosal smooth muscle relaxation in the hypercholesterolemic rabbit: a preliminary study. *Int J Impot Res,* 12, 334-9.

- HETTINGER, K., VIKHANSKAYA, F., POH, M. K., LEE, M. K., DE BELLE, I., ZHANG, J. T., REDDY, S. A. & SABAPATHY, K. 2007. c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ*, 14, 218-29.
- HIRATA, K., MATSUDA, Y., AKITA, H., YOKOYAMA, M. & FUKUZAKI, H. 1990. Myocardial ischaemia induced by endothelin in the intact rabbit: angiographic analysis. *Cardiovasc Res*, 24, 879-83.
- HUANG, J. & KONTOS, C. D. 2002. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 277, 10760-6.
- ICHIKAWA, T., ZHANG, J., CHEN, K., LIU, Y., SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R., FREEMAN, B. A., CHEN, Y. E. & CUI, T. 2008. Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: a critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology*, 149, 4086-94.
- IKENOUE, T., INOKI, K., ZHAO, B. & GUAN, K. L. 2008. PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res,* 68, 6908-12.
- ITOH, T., FAIRALL, L., AMIN, K., INABA, Y., SZANTO, A., BALINT, B. L., NAGY, L., YAMAMOTO, K. & SCHWABE, J. W. 2008. Structural basis for the activation of PPARgamma by oxidized fatty acids. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 924-31.
- JIANG, B. H., JIANG, G., ZHENG, J. Z., LU, Z., HUNTER, T. & VOGT, P. K. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxiainducible factor 1. *Cell Growth Differ*, 12, 363-9.
- JIANG, B. H. & LIU, L. Z. 2009. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res*, 102, 19-65.
- JOZKOWICZ, A., HUK, I., NIGISCH, A., WEIGEL, G., WEIDINGER, F. & DULAK, J. 2002. Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*, 4, 577-85.
- KANSANEN, E., JYRKKANEN, H. K., VOLGER, O. L., LEINONEN, H., KIVELA, A. M., HAKKINEN, S. K., WOODCOCK, S. R., SCHOPFER, F. J., HORREVOETS, A. J., YLA-HERTTUALA, S., FREEMAN, B. A. & LEVONEN, A. L. 2009. Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem*, 284, 33233-41.
- KANZAWA, S., ENDO, H. & SHIOYA, N. 1993. Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann Plast Surg*, 30, 244-51.
- KHOO, N. K., RUDOLPH, V., COLE, M. P., GOLIN-BISELLO, F., SCHOPFER, F. J., WOODCOCK, S. R., BATTHYANY, C. & FREEMAN, B. A. 2010. Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and

heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med*, 48, 230-9.

- KIM, Y. M., PAE, H. O., PARK, J. E., LEE, Y. C., WOO, J. M., KIM, N. H., CHOI, Y. K., LEE, B. S., KIM, S. R. & CHUNG, H. T. 2011. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 14, 137-67.
- KORFF, T. & AUGUSTIN, H. G. 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol*, 143, 1341-52.
- KORFF, T. & AUGUSTIN, H. G. 1999. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci*, 112 (Pt 19), 3249-58.
- KOTANI, J., NANTO, S., MINTZ, G. S., KITAKAZE, M., OHARA, T., MOROZUMI, T., NAGATA, S. & HORI, M. 2002. Plaque gruel of atheromatous coronary lesion may contribute to the no-reflow phenomenon in patients with acute coronary syndrome. *Circulation*, 106, 1672-7.
- LAWLEY, T. J. & KUBOTA, Y. 1989. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J Invest Dermatol,* 93, 59S-61S.
- LEE, C. H. & SMITS, P. C. 2002. Vascular growth factors for coronary angiogenesis. *J Interv Cardiol*, 15, 511-8.
- LESLIE, N. R. 2006. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1765-74.
- LI, Y., ZHANG, J., SCHOPFER, F. J., MARTYNOWSKI, D., GARCIA-BARRIO, M. T., KOVACH, A., SUINO-POWELL, K., BAKER, P. R., FREEMAN, B. A., CHEN, Y. E. & XU, H. E. 2008. Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 865-7.
- LIEKENS, S., DE CLERCQ, E. & NEYTS, J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 61, 253-70.
- LIM, D. G., SWEENEY, S., BLOODSWORTH, A., WHITE, C. R., CHUMLEY, P. H., KRISHNA, N. R., SCHOPFER, F., O'DONNELL, V. B., EISERICH, J. P. & FREEMAN, B. A. 2002. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15941-6.
- LIMA, E. S., BONINI, M. G., AUGUSTO, O., BARBEIRO, H. V., SOUZA, H. P. & ABDALLA, D. S. 2005. Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radic Biol Med*, 39, 532-9.
- LOSORDO, D. W., VALE, P. R., HENDEL, R. C., MILLIKEN, C. E., FORTUIN, F. D., CUMMINGS, N., SCHATZ, R. A., ASAHARA, T., ISNER, J. M. & KUNTZ, R. E. 2002. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 105, 2012-8.

- MA, X. L., WEYRICH, A. S., LEFER, D. J. & LEFER, A. M. 1993. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*, 72, 403-12.
- MADRI, J. A. & WILLIAMS, S. K. 1983. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol*, 97, 153-65.
- MAHIMAINATHAN, L., DAS, F., VENKATESAN, B. & CHOUDHURY, G. G. 2006. Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by downregulation of the tumor suppressor PTEN. *Diabetes*, 55, 2115-25.
- MAIER, W., ALTWEGG, L. A., CORTI, R., GAY, S., HERSBERGER, M., MALY, F. E., SUTSCH, G., ROFFI, M., NEIDHART, M., EBERLI, F. R., TANNER, F. C., GOBBI, S., VON ECKARDSTEIN, A. & LUSCHER, T. F. 2005. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation*, 111, 1355-61.
- MAXWELL, P. H., DACHS, G. U., GLEADLE, J. M., NICHOLLS, L. G., HARRIS, A. L., STRATFORD, I. J., HANKINSON, O., PUGH, C. W. & RATCLIFFE, P. J. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8104-9.
- MENG, F., HENSON, R., WEHBE-JANEK, H., GHOSHAL, K., JACOB, S. T. & PATEL, T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133, 647-58.
- MILLAUER, B., WIZIGMANN-VOOS, S., SCHNURCH, H., MARTINEZ, R., MOLLER, N. P., RISAU, W. & ULLRICH, A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72, 835-46.
- MITSCHKE, A., GUTZKI, F. M. & TSIKAS, D. 2007. 9- and 10-Nitro-oleic acid do not interfere with the GC-MS quantitative determination of nitrite and nitrate in biological fluids when measured as their pentafluorobenzyl derivatives. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 851, 287-91.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- NAGY, L., TONTONOZ, P., ALVAREZ, J. G., CHEN, H. & EVANS, R. M. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, 93, 229-40.
- NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S. & POLTORAK, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13, 9-22.
- O'DONNELL, V. B., EISERICH, J. P., CHUMLEY, P. H., JABLONSKY, M. J., KRISHNA, N. R., KIRK, M., BARNES, S., DARLEY-USMAR, V. M. & FREEMAN, B. A. 1999. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxidederived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol*, 12, 83-92.

- O'DONNELL, V. B. & FREEMAN, B. A. 2001. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res*, 88, 12-21.
- OCKAILI, R., NATARAJAN, R., SALLOUM, F., FISHER, B. J., JONES, D., FOWLER, A. A., 3RD & KUKREJA, R. C. 2005. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H542-8.
- OLSSON, A. K., DIMBERG, A., KREUGER, J. & CLAESSON-WELSH, L. 2006. VEGF receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 359-71.
- OTTERBEIN, L. E. & CHOI, A. M. 2000. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1029-37.
- PATEL, L., PASS, I., COXON, P., DOWNES, C. P., SMITH, S. A. & MACPHEE, C. H. 2001. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*, 11, 764-8.
- PEZZOLESI, M. G., PLATZER, P., WAITE, K. A. & ENG, C. 2008. Differential expression of PTEN-targeting microRNAs miR-19a and miR-21 in Cowden syndrome. *Am J Hum Genet,* 82, 1141-9.
- PLANCHON, S. M., WAITE, K. A. & ENG, C. 2008. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci*, 121, 249-53.
- PYRIOCHOU, A., VASSILAKOPOULOS, T., ZHOU, Z. & PAPAPETROPOULOS, A. 2007. cGMP-dependent and -independent angiogenesis-related properties of nitric oxide. *Life Sci*, 81, 1549-54.
- ROY, S., KHANNA, S., NALLU, K., HUNT, T. K. & SEN, C. K. 2006. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther,* 13, 211-20.
- RUDNICKI, M., FAINE, L. A., DEHNE, N., NAMGALADZE, D., FERDERBAR, S., WEINLICH, R., AMARANTE-MENDES, G. P., YAN, C. Y., KRIEGER, J. E., BRUNE, B. & ABDALLA, D. S. 2011. Hypoxia inducible factor-dependent regulation of angiogenesis by nitro-fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1360-7.
- RUDOLPH, T. K. & FREEMAN, B. A. 2009. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal*, 2, re7.
- RUDOLPH, T. K., RUDOLPH, V., EDREIRA, M. M., COLE, M. P., BONACCI, G., SCHOPFER, F. J., WOODCOCK, S. R., FRANEK, A., PEKAROVA, M., KHOO, N. K., HASTY, A. H., BALDUS, S. & FREEMAN, B. A. 2010a. Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 938-45.
- RUDOLPH, V., RUDOLPH, T. K., SCHOPFER, F. J., BONACCI, G., WOODCOCK, S. R., COLE, M. P., BAKER, P. R., RAMANI, R. & FREEMAN, B. A. 2010b. Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 85, 155-66.

- RUDOLPH, V., SCHOPFER, F. J., KHOO, N. K., RUDOLPH, T. K., COLE, M. P., WOODCOCK, S. R., BONACCI, G., GROEGER, A. L., GOLIN-BISELLO, F., CHEN, C. S., BAKER, P. R. & FREEMAN, B. A. 2009. Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem*, 284, 1461-73.
- RYTER, S. W., OTTERBEIN, L. E., MORSE, D. & CHOI, A. M. 2002. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*, 234-235, 249-63.
- SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R. & FREEMAN, B. A. 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci*, 28, 646-54.
- SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R., GILES, G., CHUMLEY, P., BATTHYANY, C., CRAWFORD, J., PATEL, R. P., HOGG, N., BRANCHAUD, B. P., LANCASTER, J. R., JR. & FREEMAN, B. A. 2005. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling. Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *J Biol Chem*, 280, 19289-97.
- SHEN, Y. H., ZHANG, L., GAN, Y., WANG, X., WANG, J., LEMAIRE, S. A., COSELLI, J. S. & WANG, X. L. 2006. Up-regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) mediates p38 MAPK stress signal-induced inhibition of insulin signaling. A crosstalk between stress signaling and insulin signaling in resistin-treated human endothelial cells. *J Biol Chem*, 281, 7727-36.
- SHERIDAN, F. M., COLE, P. G. & RAMAGE, D. 1996. Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model. *Circulation*, 93, 1784-7.
- SHIBUYA, M. 2008. Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep*, 41, 278-86.
- SIMONS, M., ANNEX, B. H., LAHAM, R. J., KLEIMAN, N., HENRY, T., DAUERMAN, H., UDELSON, J. E., GERVINO, E. V., PIKE, M., WHITEHOUSE, M. J., MOON, T. & CHRONOS, N. A. 2002. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*, 105, 788-93.
- STAMBOLIC, V., MACPHERSON, D., SAS, D., LIN, Y., SNOW, B., JANG, Y., BENCHIMOL, S. & MAK, T. W. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8, 317-25.
- STATON, C. A., REED, M. W. & BROWN, N. J. 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol,* 90, 195-221.
- SYED, I. S., SANBORN, T. A. & ROSENGART, T. K. 2004. Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass. *Cardiology*, 101, 131-43.
- TAKESHITA, S., ZHENG, L. P., BROGI, E., KEARNEY, M., PU, L. Q., BUNTING, S., FERRARA, N., SYMES, J. F. & ISNER, J. M. 1994. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular

endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93, 662-70.

- TAMGUNEY, T. & STOKOE, D. 2007. New insights into PTEN. J Cell Sci, 120, 4071-9.
- THOMAS, M. J., MEHL, K. S. & PRYOR, W. A. 1982. The role of superoxide in xanthine oxidase-induced autooxidation of linoleic acid. *J Biol Chem*, 257, 8343-7.
- TOJO, T., USHIO-FUKAI, M., YAMAOKA-TOJO, M., IKEDA, S., PATRUSHEV, N. & ALEXANDER, R. W. 2005. Role of gp91phox (Nox2)containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*, 111, 2347-55.
- TOUYZ, R. M. 2003. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 5, 155-64.
- TSIKAS, D., ZOERNER, A. A., MITSCHKE, A. & GUTZKI, F. M. 2009. Nitrofatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids*, 44, 855-65.
- USHIO-FUKAI, M. 2006. Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*, 71, 226-35.
- VAN DER LAAN, A. M., PIEK, J. J. & VAN ROYEN, N. 2009. Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat Rev Cardiol*, 6, 515-23.
- VILLACORTA, L., ZHANG, J., GARCIA-BARRIO, M. T., CHEN, X. L., FREEMAN, B. A., CHEN, Y. E. & CUI, T. 2007. Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293, H770-6.
- WRIGHT, M. M., KIM, J., HOCK, T. D., LEITINGER, N., FREEMAN, B. A. & AGARWAL, A. 2009. Human haem oxygenase-1 induction by nitro-linoleic acid is mediated by cAMP, AP-1 and E-box response element interactions. *Biochem J*, 422, 353-61.
- WRIGHT, M. M., SCHOPFER, F. J., BAKER, P. R., VIDYASAGAR, V., POWELL, P., CHUMLEY, P., ILES, K. E., FREEMAN, B. A. & AGARWAL, A. 2006. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4299-304.
- XIA, D., SRINIVAS, H., AHN, Y. H., SETHI, G., SHENG, X., YUNG, W. K., XIA, Q., CHIAO, P. J., KIM, H., BROWN, P. H., WISTUBA, II, AGGARWAL, B. B. & KURIE, J. M. 2007. Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. J Biol Chem, 282, 3507-19.
- YANG, H., KONG, W., HE, L., ZHAO, J. J., O'DONNELL, J. D., WANG, J., WENHAM, R. M., COPPOLA, D., KRUK, P. A., NICOSIA, S. V. & CHENG, J. Q. 2008. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*, 68, 425-33.
- YU, K., BAYONA, W., KALLEN, C. B., HARDING, H. P., RAVERA, C. P., MCMAHON, G., BROWN, M. & LAZAR, M. A. 1995. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem*, 270, 23975-83.
- ZHANG, J., VILLACORTA, L., CHANG, L., FAN, Z., HAMBLIN, M., ZHU, T., CHEN, C. S., COLE, M. P., SCHOPFER, F. J., DENG, C. X., GARCIA-BARRIO, M. T., FENG, Y. H., FREEMAN, B. A. & CHEN, Y. E. 2010. Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res*, 107, 540-8.
- ZHONG, H., CHILES, K., FELDSER, D., LAUGHNER, E., HANRAHAN, C., GEORGESCU, M. M., SIMONS, J. W. & SEMENZA, G. L. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60, 1541-5.
- ZICHE, M. & MORBIDELLI, L. 2009. Molecular regulation of tumour angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw*, 20, 164-70.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Baldus danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut des Universitären Herzzentrums Hamburg, Cardiovascular Research Center.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Tanja Rudolph für die Überlassung des Themas und die hervorragende und geduldige wissenschaftliche Betreuung.

Mein spezieller Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm für die Aufnahme in seinen Arbeitsbereich Klinische Pharmakologie am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und die hervorragende Unterstützung durch ihn und seine Mitarbeiter/innen. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. Henrike Arnold für ihre Einführung in die Zellkultur und ihre geduldige Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen Lebensweg ermöglicht haben und mir immer zur Seite standen. Außerdem danke ich meinen Geschwistern und Freunden für ihre aufmunternden Worte.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: