

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen)  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

# **Nachweis des über den Thromboxanrezeptor vermittelten Effekts von Isoprostanen auf die Angiogenese durch lentiviralen Knockdown**

Dissertation

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

vorgelegt von

Raihana Taheri  
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. J. Heeren

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Oxidativer Stress.....	6
1.1.1	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	7
1.2	Isoprostane .....	8
1.2.1	Mechanismus der Bildung von Isoprostanen .....	8
1.2.2	F <sub>2</sub> -Isoprostane und ihr Prototyp 8-iso-PGF <sub>2α</sub> .....	9
1.2.3	Bedeutung von Isoprostanen als Marker von oxidativem Stress.....	10
1.2.4	Bedeutung von Isoprostanen als Mediatoren von oxidativem Stress .....	12
1.3	Der Thromboxanrezeptor (TBXA2R).....	13
1.3.1	Aufbau und Verteilung des TBXA2R .....	14
1.3.2	Signaltransduktionswege des TBXA2R .....	15
1.4	RNA-Interferenz (RNAi) .....	17
1.5	Lentiviraler Gentransfer.....	19
1.5.1	Lentivirale Gene und ihre Proteine.....	20
1.5.2	Herstellung replikationsinkompetenter Lentiviren.....	20
1.6	Fragestellung .....	22
<b>2</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>24</b>
2.1	Substanzen und Kits .....	24
2.2	Verbrauchsmaterialien .....	27
2.3	Geräte.....	28
2.4	Zellen und Zellkultur.....	30
2.5	Puffer und Lösungen.....	31
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.1	PCR .....	37
3.1.1	Primer .....	37
3.1.2	PCR-Programm .....	38
3.1.3	Gelelektrophorese.....	38
3.2	Quantitative Messung von RNA .....	39
3.2.1	mRNA-Isolierung aus Zellen .....	39
3.2.2	Reverse Transkription der präparierten RNA .....	40
3.2.3	Real-Time-PCR.....	40
3.3	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen .....	42
3.3.1	Transformation.....	42
3.3.2	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Minipräp) .....	43
3.3.3	Restriktionsanalyse.....	43

3.3.4	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxipräp)	44
3.4	Zellkultur	44
3.4.1	Endothel- und HEK-Zellen	44
3.4.2	Einfrieren von Zellen (Kryokultur)	45
3.4.3	Transfektion von Zellen	46
3.5	Knockdown des Thromboxanrezeptors mit shRNA	46
3.5.1	Auswahl einer geeigneten shRNA Sequenz	46
3.5.2	Generierung lentiviraler Überstände zur Transduktion von Endothelzellen	47
3.5.3	Transduktion von Endothelzellen	48
3.5.4	Vektorkarten, der für die Lentivirus Produktion verwendeten Plasmide	49
3.6	Generierung einer stabilen, den TBXA2-Rezeptorsubtyp $\alpha$ exprimierenden Zelllinie	51
3.6.1	Transfektion von HEK 293 Zellen	51
3.6.2	Selektion mit Geneticin	51
3.7	Western Blot	53
3.7.1	Proteingewinnung	53
3.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford	53
3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
3.7.4	Probenvorbereitung	55
3.7.5	Blotten der Proteine auf Nitrocellulosemembran	55
3.7.6	Proteinmembranfärbung mit Ponceau S	56
3.7.7	Blocken der Membran	56
3.7.8	Immunfärbung der Membran	56
3.8	Migration und Kapillarröhrenbildung	57
3.8.1	Durchführung des Migrations-Assays	57
3.8.2	Durchführung des Matrigel Tube Formation Assays	58
3.9	Statistische Analyse	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1.1	Identifikation des TBXA2R auf mRNA Ebene und der TBXA2R-Subtypen in HDMECs	60
4.1.2	Nachweis des lentiviralen Knockdowns des TBXA2-Rezeptors auf mRNA-Ebene	60
4.1.3	Nachweis des lentiviralen Knockdown des TBXA2-Rezeptors auf Proteinebene	61
4.2	Effekte von 8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> nach lentiviralem Knockdown des TBXA2R	62
4.2.1	Effekte von 8-iso-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> und dem TBXA2-Rezeptorantagonist SQ 29548 auf die VEGF-induzierte Kapillarröhrenbildung von unbehandelten HCAECs	62

4.2.2	Effekte von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> auf die Kapillarröhrenbildung nach lentiviraler Transduktion mit shRNA gegen den TBXA2R .....	63
4.2.3	Effekte von TBXA2R-Antagonisten auf die durch 8-iso-PGF <sub>2α</sub> reduzierte VEGF-induzierte Migration von HDMECs .....	65
4.2.4	Effekte von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> auf die Migration nach lentiviraler Transduktion mit shRNA gegen den TBXA2R .....	66
4.3	Generierung einer stabilen, den TBXA2-Rezeptorsubtyp α exprimierenden Zelllinie .....	67
4.3.1	Nachweis des α Subtypes des TBXA2-Rezeptorse auf mRNA- und Proteinebene.....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
5.1.1	Einfluss von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> auf die VEGF- induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung <i>in vitro</i> .....	70
5.1.2	Einfluss von 8-iso-PGF <sub>2α</sub> auf die VEGF-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung nach lentiviralem Knockdown des TBXA2R .....	72
5.1.3	Bedeutung des anti-angiogenen Signalwegs von Isoprostanen über den TBXA2R .....	73
5.1.4	Bedeutung der beiden TBXA2-Rezeptorsubtypen – Etablierung einer stabilen, den Subtyp α exprimierenden Zelllinie.....	75
5.1.5	Therapeutische Bedeutung des über den TBXA2R-vermittelten anti-angiogenen Effekt von Isoprostanen.....	76
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b> Fehler! Textmarke nicht definiert.	
<b>10</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>100</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Oxidativer Stress

Eine Dysbalance zwischen in der Zelle ablaufenden oxidativen und antioxidativen Prozessen zu Gunsten der oxidativen, führt zu einer Stoffwechselsituation, die man als oxidativen Stress bezeichnet. Oxidativer Stress ist in die Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen involviert, beispielsweise von kardiovaskulären Erkrankungen wie der Arteriosklerose und der Koronaren Herzkrankheit (KHK) (1), (2). Dabei wird die Oxidation von low-density-lipoproteins (LDL) im Endothel als initialer Auslöser der endothelialen Plaquebildung gesehen, was den engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen zeigt. Auch in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2 (3), der Hypercholesterinämie (4) und der Adipositas (5), alle Risikofaktoren für die KHK, ist oxidativer Stress beteiligt. Desweiteren spielt das vermehrte Auftreten von oxidativem Stress in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankung wie Morbus Alzheimer und auch bei pulmonalen Erkrankungen, wie beim Asthma bronchiale (6), eine Rolle. Um den kausalen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Pathogenese von diversen Erkrankungen aufdecken und das Ausmaß von oxidativem Stress *in vivo* abschätzen zu können, bedarf es Biomarkern, die stabile Endprodukte des oxidativen Stresses darstellen und einer nicht-invasiven Analytik zugänglich sind. Hier haben sich F<sub>2</sub>-Isoprostane, eine Substanzgruppe mit Prostaglandin-ähnlicher Struktur, als zuverlässige Marker erwiesen (7).

Als Mediatoren von oxidativem Stress und damit von potentiell oxidativem Schaden, werden reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) angesehen. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen in aeroben Organismen während physiologischer zellulärer Vorgänge. ROS können mit Lipiden, Proteine und DNA reagieren und diese schädigen (8). Die Zelle besitzt zur Abwehr

des oxidativen Schadens verschiedene antioxidative Mechanismen, die auf unterschiedliche Weise reaktive Sauerstoffspezies abfangen und damit die unkontrollierte Oxidation von Biomolekülen verhindern (9).

### **1.1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Zu den ROS gehören das Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $HO^{\cdot}$ ), die als Zwischenprodukte durch sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser entstehen. Die ROS sind potentiell zytotoxisch und können mit allen Biomolekülen reagieren und damit Zellschädigungen verursachen, wobei das Hydroxyl-Radikal das reaktionsfreudigste Radikal darstellt. Zwei zelluläre Enzyme, die Superoxid-Dismutase und die Katalase, sind in der Lage, den Abbau der entstandenen Produkte zu katalysieren. Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Bildung von molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid aus einem Superoxid-Anion. Die Katalase begünstigt die weitere Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Neben endogenen können ROS auch durch exogene Faktoren entstehen, zum Beispiel durch Metallionen wie Eisen und Kupfer, durch Zytostatika wie Bleomycin und Anthracycline, bei denen die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Therapie erwünscht ist. Des Weiteren auch durch Strahlenexposition und durch inhalative Noxen wie  $NO_2$  bei Rauchern. Neben pathophysiologischen Funktionen der ROS, sind auch zahlreiche physiologische Funktionen bekannt. ROS werden beispielsweise zur Bakterienabwehr (respiratory burst) von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produziert. Sie stellen darüberhinaus Kontrollproteine bei einigen enzymatischen Reaktionen dar, wie z.B. bei Cytochrom  $P_{450}$  und den Cyloxygenasen (10). Für ROS konnte gezeigt werden, dass sie an der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) beteiligt sind, und insbesondere für das Wasserstoffperoxid konnte eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B (nuclear factor) und das AP-1 (aktivierte Protein-1), nachgewiesen werden (11).

## 1.2 Isoprostane

Isoprostane sind eine Substanzgruppe mit Prostaglandin-ähnlicher Struktur, die unabhängig von der Aktivität der Cyclooxygenase (COX) durch radikal-induzierte Peroxidation von Arachidonsäure entsteht. Bereits 1966 konnte Nugteren die Bildung von Verbindungen mit Prostaglandin-ähnlicher Struktur durch Autooxidation von ungesättigten Fettsäuren *in vitro* zeigen (14). Erst 1990 gelang es Morrow und Roberts, die nicht-enzymatische Bildung von Verbindungen mit PGF<sub>2</sub>-ähnlicher Struktur *in vivo* nachzuweisen, wodurch ein Marker für die von der COX-unabhängig stattfindenden *in vivo*-Lipidperoxidation gefunden wurde (15).

### 1.2.1 Mechanismus der Bildung von Isoprostanen

Im ersten Schritt in der Entstehung von Isoprostanen, erfolgt die Abstraktion eines H-Atoms der Arachidonsäure durch freie Radikale. Dadurch entstehen drei Arachidonylradikale, die zu vier bizyklischen Endoperoxiden mit PGH<sub>2</sub>-ähnlicher Struktur zyklisieren. Diese Endoperoxide werden zu vier F<sub>2</sub>-Isoprostanregioisomeren (8-F<sub>2</sub>-Isoprostan, 5-F<sub>2</sub>-Isoprostan, 15-F<sub>2</sub>-Isoprostan, 12-F<sub>2</sub>-Isoprostan) reduziert, zu denen es jeweils theoretisch acht racemische Diastereomere gibt. So sind 64 F<sub>2</sub>-Isoprostane denkbar. F<sub>2</sub>-Isoprostane haben ihre Bezeichnung durch ihre Isomerie zu Prostaglandin F<sub>2</sub> erhalten. Im Gegensatz zu den durch die COX gebildeten Prostanoiden, werden F<sub>2</sub>-Isoprostane *in situ* an Phospholipide gebunden gebildet und anschließend durch Hydrolyse, höchstwahrscheinlich durch die Phospholipase A<sub>2</sub>, freigesetzt (16).

Neben der Bildung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen, ist auch die Bildung von D- und E-Ring Isoprostanen aus dem PGH<sub>2</sub>-ähnlichem Endoperoxid durch Umlagerung *in vivo* bekannt (17). D- und E-Ring-Isoprostane bilden durch Dehydratisierung weitere Untergruppen, die A<sub>2</sub>- und J<sub>2</sub>-Isoprostane (18). Eine weitere Klasse der Isoprostane sind Isothromboxane, die entsprechend der Bildung von F<sub>2</sub>/D<sub>2</sub> und E<sub>2</sub>-



Isoprostanen, durch Umlagerung der bicyklischen Endoperoxide entstehen (19). Die Oxidation von der im zentralen Nervensystem wichtigen ungesättigten Fettsäure Docosahexasäure führt zur Bildung von Isoprostan-ähnlichen Verbindungen, den sogenannten Neuroprostanen. Hierzu zählen  $F_4$ -Isoprostane,  $D_4/E_4$ -Isoprostane (20), (21).

### 1.2.2 $F_2$ -Isoprostane und ihr Prototyp 8-iso-PGF $_{2\alpha}$

$F_2$ -Isoprostane stellen spezifische Produkte der Lipidperoxidation dar und haben sich als zuverlässige Marker und Mediatoren des oxidativen Stresses erwiesen (22), (23). Dazu haben unterschiedliche Eigenschaften der  $F_2$ -Isoprostane beigetragen. Neben ihrer chemischen Stabilität sind sie spezifische, *in vivo* gebildete Produkte der Lipidperoxidation.  $F_2$ -Isoprostane konnten in allen untersuchten Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden und stehen durch ihre Ausscheidung im Urin einer nicht-invasiven Messung zur Verfügung. Des Weiteren wird ihre Bildung nicht vom Lipidgehalt der Diät beeinflusst (24). Unter den  $F_2$ -Isoprostanen, nimmt das 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  eine besondere Stellung ein (Abbildung 1.1); es ist das bisher am besten charakterisierte Isoprostan. Seine Hauptmetaboliten im menschlichen Urin sind 2,3-dinor-8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF $_{2\alpha}$ . Sie entstehen durch  $\beta$ -Oxidation und anschließende Reduktion der  $\Delta^5$ -Doppelbindung (25). In Analogie zum 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  der  $F_2$ -Isoprostane ist 8-iso-PGE $_2$  das bisher am besten charakterisierte  $E_2$ -Isoprostan (Abbildung 1.1).



**Abb. 1.1** Chemische Strukturformeln von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  und 8-iso-PGE $_2$ .

Isoprostane finden sich im Blutplasma in freier und an Phospholipide veresterter Form. Freie Isoprostane werden in der Niere filtriert und mit dem Urin ausgeschieden. Die Referenzmethode zur Quantifizierung von Isoprostanen ist die GC-MS (26). Sie ermöglicht im NICI- (negative ion chemical ionization) Modus eine zuverlässige Messung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> bis zu einer Detektionsgrenze von 5 pg/ml (27). Da die Massenspektrometrie eine kostenintensive und zeitaufwendige analytische Methode ist, wurden Immunoassays zur Messung von Isoprostanen entwickelt, wie der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzymimmunoassay (EIA). Vergleichende Studien für die Messung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in Urinproben zeigen eine Korrelation zwischen EIA und GC-MS von  $r=0,63$  und  $r=0,86$  (26), (27). Die mit EIA gemessenen Werte liegen jedoch durchweg über denjenigen, die mit GC-MS gemessen wurden und zeigen sowohl einen proportionalen als auch einen konstanten Fehler.

### **1.2.3 Bedeutung von Isoprostanen als Marker von oxidativem Stress**

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden, konnte eine erhöhte Konzentration von F<sub>2</sub>-Isoprostanen im Blut oder Urin der Patienten gemessen werden. Auch für Risikofaktoren der KHK wie Diabetes (3), Adipositas (5), Hypertonus (28), Hypercholesterinämie (29) und Nikotinabusus (30) konnten erhöhte 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentrationen nachgewiesen werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer Fall-Kontroll-Studie an Patienten mit KHK zeigen, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein unabhängiger Risikomarker für die KHK ist (31). Zudem steigt die 8-iso-PGF<sub>2α</sub> Konzentration im Urin der Patienten mit dem Schweregrad der Erkrankung an (32). Auch für Patienten mit anderen Erkrankungen zeigt sich ein solcher Zusammenhang. So sind F<sub>2</sub>-Isoprostane bereits im frühen Stadium der Demenz im Liquor nachweisbar (32) und korrelieren mit dem Schweregrad und der Progression der Alzheimer-Erkrankung (33). Auch bei Lungenerkrankungen wie Asthma (34), zystischer Fibrose (35) und der chronischen obstruktiven Lungenerkrankung

(COPD) (36), korreliert die gemessene 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-Konzentration in der Ausatemluft mit dem Schweregrad der Entzündung. Bei der Herzinsuffizienz korreliert die Konzentration von perikardialen F<sub>2</sub>-Isoprostanen mit ihrem funktionellen Schweregrad und ist assoziiert mit der Ventrikeldilatation. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von oxidativem Stress im Remodelling der Ventrikel und der Progression der Herzinsuffizienz hin (124).

### ***Kardiovaskuläre Erkrankungen***

Arteriosklerose	(37)
Ischämischer-/Reperfusionsschaden	(38), (39)
Koronare Herzkrankheit	(40)
Herzinsuffizienz	(41)
Renovaskuläre Erkrankungen	(42)

### ***Lungenerkrankungen***

Asthma	(34)
COPD	(43)
Zystische Fibrose	(35)
Interstitielle Lungenerkrankung	(44)
Akuter Lungenschaden/ARDS	(45)

### ***Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen***

Rauchen	(46)
Hypercholesterinämie	(47)
Diabetes	(3)
Hyperhomocystinämie	(48)
Männliches Geschlecht	(49)
Adipositas	(5)

### ***Neurologische Erkrankungen***

Morbus Alzheimer	(33), (50)
Morbus Huntington	(51)
Multiple Sklerose	(52)
Creutzfeld-Jacob	(53)

### ***Renale Erkrankungen***

Hämodialyse	(54)
Nierenschaden, induziert durch Rhabdomyolyse	(55)
<b>Lebererkrankungen</b>	
Alkohol-toxische Lebererkrankung	(56), (57)
Hepatorenales Syndrom	(58)
Primär biliäre Zirrhose	(59)
Lebertransplantation	(60)
<b>Andere</b>	
Sklerodermie	(61)
Osteoporose	(33)
Morbus Crohn	(62)

**Tabelle 1** Zusammenstellung von Erkrankungen, bei denen entsprechend der Messung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen vermehrter oxidativer Stress vorkommt.

#### 1.2.4 Bedeutung von Isoprostanen als Mediatoren von oxidativem Stress

Die biologischen Effekte von Isoprostanen weisen darauf hin, dass sie neben ihrer Rolle als Biomarker für oxidativen Stress *in vivo*, eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von oxidativem Schaden und den damit assoziierten Erkrankungen haben. In der Gruppe der F<sub>2</sub>-Isoprostane ist über die biologische Aktivität von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> am meisten bekannt. In zahlreichen Gefäßbettsystemen wie den Pulmonalarterien (15), Koronararterien (63), retinalen Gefäßen (64), in der Portalvene (65), cerebralen Arteriolen (66) und den Nierengefäßen (67), zeigt das 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen konzentrationsabhängigen vasokonstriktori-schen Effekt. Auch sein Hauptmetabolit 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-PGF<sub>2α</sub> zeigt vasokonstriktorische Wirkung auf retinale und cerebrale Kapillaren (68).

Weitere biologische Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> weisen auf eine Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose hin. Dazu gehört, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die Thrombozytenaktivierung fördert (69), die Mitogenese von vaskulären glatten

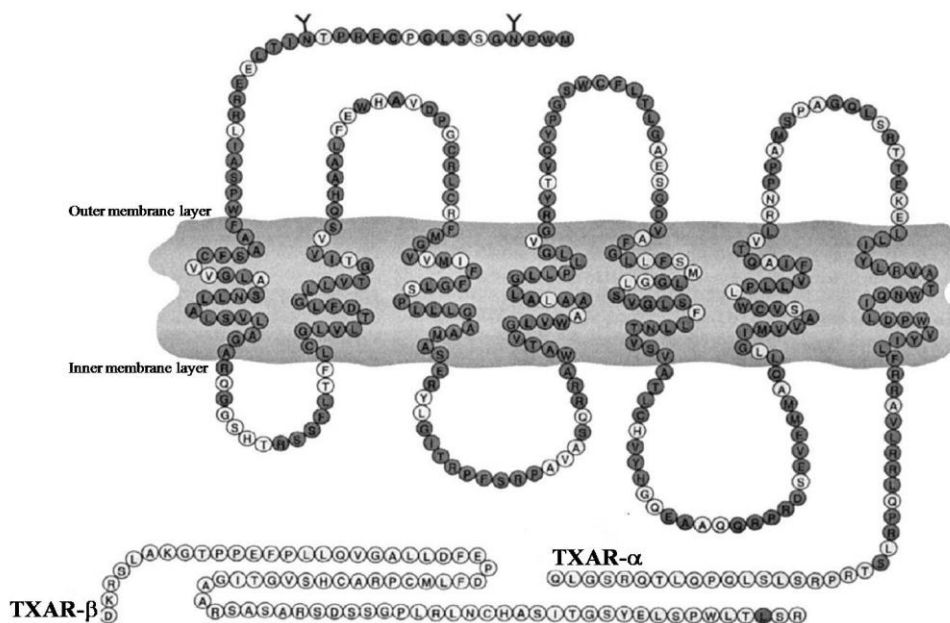
Muskelzellen induziert (70) und die Bindung von Neutrophilen an oxidativ modifizierte LDL stimuliert (71). Zu den initialen Schritten in der Entstehung der Arteriosklerose gehört die Monozytenadhäsion an Endothelzellen, die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> stimuliert wird (72). Im atherosklerotischen Tiermodell der LDL-Rezeptor(-/-)-Maus und der ApoE(-/-)-Maus verursachte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> eine Zunahme der atherosklerotischen Plaques (73). Interessanter Weise finden sich auch in menschlichen atherosklerotischen Plaques hohe Konzentrationen von an Phospholipide veresterten Isoprostanen (37). Die genannten biologischen Effekte der Isoprostane werfen die Frage nach ihrem genauen Wirkungsmechanismus auf.

### **1.3 Der Thromboxanrezeptor (TBXA2R)**

Der genaue Wirkungsmechanismus der Isoprostane ist bisher nicht vollständig bekannt. Lange Zeit dominierte die Vorstellung von einem eigenen Isoprostan-Rezeptor (74), (75). Dagegen spricht, dass der vasokonstriktorische Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> durch den Thromboxanrezeptorantagonisten SQ 29548 aufgehoben werden kann (76), (77). Darüber hinaus zeigt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> keinen vasokonstriktorischen und auch keinen co-stimulatorischen Effekt auf die Plättchenaggregation in der TBXA2R(-/-)-Maus (78). Der physiologische Agonist des TBXA2R ist das Thromboxan A<sub>2</sub>, welches eine HWZ von 30 Sekunden hat. Es ist ein starker Induktor der Plättchenaggregation, wirkt vasokonstriktorisch und hat einen mitogenen Effekt auf vaskuläre glatte Muskelzellen (79). Des Weiteren stimuliert es die Freisetzung von Prostacyclin (80), welches gegensinnig zum Thromboxan A<sub>2</sub> wirkt. In einer Reihe von kardiovaskulären Störungen, wie z.B. beim Myokardinfarkt (81), der instabilen Angina (82), der ischämischen Herzkrankheit (83) und beim schwangerschaftsinduzierten Hypertonus (84) aber auch in der Neovaskularisation (85) und in der Metastasierung von Tumorzellen (86) ist das Thromboxan A<sub>2</sub> involviert.

### 1.3.1 Aufbau und Verteilung des TBXA2R

Der TBXA2R gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und spielt eine bedeutende Rolle in der vaskulären Hämostase. Analysen der mRNA-Expression in unterschiedlichen Organen, haben gezeigt, dass der TBXA2R im Thymus, in der Milz und Plazenta exprimiert wird, des Weiteren in etwas geringerem Ausmaß in der Lunge, Niere, im Uterus, Herzen und Gehirn (87). Das für den TBXA2R codierende Gen ist auf Chromosom 19p13.3 lokalisiert und hat eine Größe von 15 kb. Das Gen besteht aus drei Exons und wird von zwei Introns unterbrochen (88). Es existieren zwei Isoformen, TBXA2R- $\alpha$  und - $\beta$ , die durch alternatives Splicing des Exons 3 entstehen (88), (89), (90). Der TBXA2R, der ursprünglich aus humaner Plazenta-DNA kloniert wurde, wird als TBXA2R- $\alpha$  bezeichnet, während der aus humanen Endothelzellen klonierte TBXA2R, als Subtyp  $\beta$  bezeichnet wird. Die beiden Isoformen sind identisch in ihrer aus 328 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Domäne, unterscheiden sich jedoch in ihrer zytoplasmatischen Domäne, die bei TBXA2R- $\alpha$  aus 15 Aminosäuren und bei TBXA2R- $\beta$  aus 75 Aminosäuren besteht (Abbildung 1.2).



**Abb. 1.2** Organisation der beiden Isoformen des TBXA2R ( nach Kinsella BT, 2001, (123))

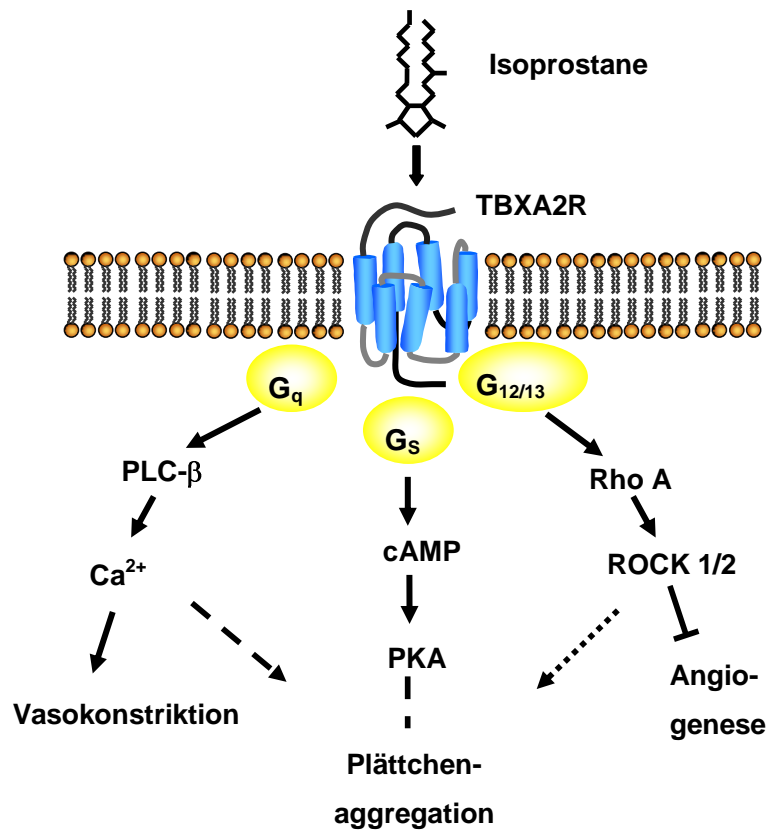
Die Untersuchung der Expression der beiden Isoformen in unterschiedlichen humanen Zell- und Gewebetypen ergab, dass die TBXA2R- $\alpha$  Expression in nahezu allen Zell- und Gewebetypen ähnlich war, während große Unterschiede in der Expression des TBXA2R- $\beta$  festgestellt wurden (91). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die zweite extrazelluläre Aminosäureschlinge (loop) für die Ligandenbindung entscheidend ist (92). Von dieser nimmt man an, dass sie in beiden Isoformen identisch ist, so dass Unterschiede in der Funktion der TBXA2R- Isoformen auf das C-terminale Ende zurückgeführt werden. Die beiden Isoformen des TBXA2R sind bisher nur für den Menschen beschrieben. In Ratten und Mäusen kommt es nicht zu einem alternativen Splicing des TBXA2R, die Sequenz des exprimierten TBXA2R ist der des humanen TBXA2R- $\alpha$  sehr ähnlich. Dies legt die Vermutung nahe, dass der TBXA2R- $\alpha$  Subtyp für fundamentale Zellfunktionen verantwortlich ist, während TBXA2R- $\beta$  möglicherweise zusätzliche Funktionen übernimmt. Die vaskuläre Überexpression des  $\beta$ -Subtypen in Mäusen führt während der Schwangerschaft zu intrauteriner Minderperfusion und Wachstumsretardierung des Nachwuchses (93). Welche physiologische oder pathophysiologische Rolle die Unterscheidung der beiden Isoformen beim Menschen hat, ist noch weitgehend unbekannt.

### **1.3.2 Signaltransduktionswege des TBXA2R**

Als G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist der TBXA2R an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt. So werden unterschiedliche zelluläre Ziele und Mechanismen wie das Zytoskelett, die Zelladhäsion, die Zellmotilität, nukleäre Transkriptionsfaktoren, das Zellüberleben und die Zellapoptose durch den TBXA2R reguliert (94). Für alle  $G_{\alpha}$ -Protein-Subtypen ist bisher eine Interaktion mit dem TBXA2R nachgewiesen. Die Kopplung mit  $G_q$  führt über Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  zur Bildung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG). Anschließend kommt es zur Calcium-Freisetzung aus dem En-

doplasmatichen Retikulum und zur Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) (Abbildung 1.3). Dieser Signalweg ist vermutlich für die vasokonstriktiven Eigenschaften der Isoprostane mitverantwortlich. Die Kopplung des TBXA2R an  $G_s$  erhöht die intrazelluläre Konzentration des zyklischen AMP (cAMP) und führt damit zu einer Aktivierung der Protein-Kinase A (PKA). Demgegenüber bewirkt eine Kopplung an  $G_i$  den gegenteiligen Effekt. Als dritter wichtiger Signalweg koppelt der TBXA2R an  $G_{12/13}$  und führt zur Aktivierung von Rho. Rho spielt eine wichtige Rolle in der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, der Zellmotilität und der Zellproliferation. Die Aktivierung dieses Signalweges ist vermutlich für die anti-angiogenen Effekte der Isoprostane verantwortlich, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Bei der Kopplung des TBXA2R an die verschiedenen  $G_\alpha$ -Subtypen kommt es immer auch zur Freisetzung der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins. Eine Aktivierung der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C und der p44/p22 MAP (Mitogen-aktivierten Protein)-Kinase, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellmotilität, der Zellproliferation und der Zellapoptose spielt und auch als ERK-1/2 (extra-regulated protein kinase 1/2) bezeichnet wird. Es ist davon auszugehen, dass die G-Protein-Kopplung der beiden TBXA2R-Isoformen und damit auch ihre Signaltransduktionswege unterschiedlich sind (95).





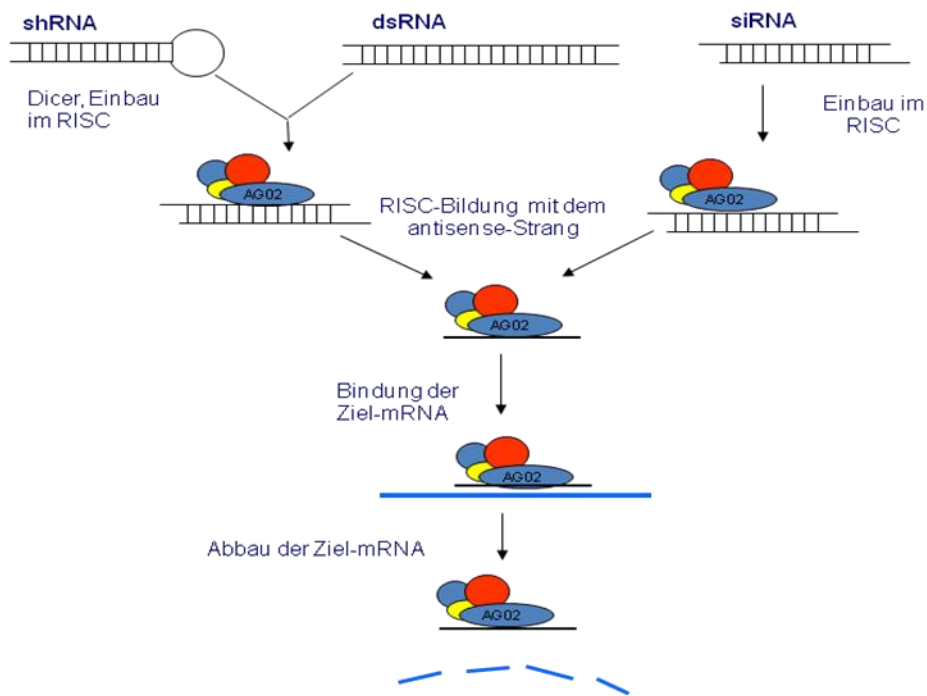
**Abb. 1.3** G-Protein gekoppelter Thromboxanrezeptor und mögliche Signaltransduktionswege

## 1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi) zur spezifischen Genregulation ist ein weit verbreitetes Phänomen in der Natur und wird als molekularbiologisches Werkzeug mit zunehmendem therapeutischem Potential genutzt (Medizin-Nobelpreis 2006 für Andrew Fire und Craig Mello). Die RNAi wird als evolutionärer Abwehrmechanismus von Viren verstanden und ist an der Steuerung der Genexpression von zahlreichen zellulären Differenzierungsprozessen beteiligt. Trigger der RNAi sind doppelsträngige RNA-Duplexe, die endogenen Ursprung, in Form von kleinen nicht-codierenden micro-RNAs (miRNAs) sein können oder

exogenen Ursprungs in Form von small interfering RNAs (siRNA), short hairpin RNA (shRNA) oder RNA-Viren.

Das Prinzip der RNAi basiert auf dem Mechanismus, dass durch komplementäre Bindung an einer Ziel-mRNA und anschließender enzymatischer Spaltung dessen Abbau resultiert. Zum entsprechenden Genprodukt wird dann nicht mehr oder nur noch in geringerem Ausmaß ribosomal translatiert. Dabei sind siRNAs kurze doppelsträngige RNA-Oligonukleotide mit einer Größe von 21-23 bp und werden entweder direkt in die Zelle eingebracht oder entstehen durch enzymatische Spaltung aus längerer doppelsträngiger RNA oder shRNA. Die enzymatische Spaltung erfolgt durch das Enzym Dicer, einer Endonuklease vom RNase-III-Typ. Nach der enzymatischen Spaltung haben die RNA-Oligonukleotide an ihrem 3`Ende einen Überhang aus zwei Nukleotiden und am 5`Ende eine Phosphatgruppe. Als nächstes bindet die siRNA an einen RNA-Proteinkomplex, dem RNA-induced silencing complex (RISC). Im aktivierten RISC werden die beiden Stränge der siRNA getrennt, der sense-Strang wird verworfen und abgebaut, während der antisense-Strang im RISC inkorporiert bleibt und als Matrize zur Bindung der Ziel-mRNA dient. Der RISC besteht aus verschiedenen Proteinen, wobei das Kernelement von Argonaut-Proteinen gebildet wird, die zwei konservierte Domänen besitzen, die PAZ und Piwi-Domäne. Die PAZ-Domäne ist für die Bindung der siRNA/miRNA verantwortlich während die Piwi-Domäne, die der RNaseH sehr ähnlich ist, die Spaltung der Ziel-mRNA katalysiert. Der nun im aktivierten RISC inkorporierte Antisense-Strang bindet die Ziel-mRNA, die komplementär zum Antisensestrang sein muss. 10 bis 11 Nukleotide oberhalb des 5`Endes des Antisense-Strangs wird die gebundene mRNA gespalten und degradiert. Die Bindung zwischen Antisensestrang und Ziel-mRNA ist sehr spezifisch (96).



**Abb. 1.4** Schematische Darstellung der durch siRNA getriggerten RNA-Interferenz (nach Rana , 2007, modifiziert (96))

Plasmid- und virale Vektoren werden zur Transfektion bzw. Transduktion von Zellen mit siRNA genutzt. Für eine stabile, d.h. über einen beliebigen Zeitraum bestehende, Inhibition eines Gens in Zellen haben sich retrovirale Vektoren als effizient erwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden lentivirale Vektoren zur Transduktion von Zellen mit shRNA verwendet.

## 1.5 Lentiviraler Gentransfer

Lentivirale Vektoren ermöglichen die stabile Integration von fremdem genetischen Material in eukaryontische Zellen. Dabei spricht man von lentiviraler Transduktion der Zellen mit einem Fremdgen, um diesen Vorgang von einer viralen Infektion zu differenzieren. Lentiviren gehören in die Gruppe der Retroviren, ihr bekanntester Vertreter ist das Humane Immundefizienzvirus (HIV). Der

entscheidende Vorteil von lentiviralen Vektoren gegenüber anderen Vektoren, beispielsweise dem Murinen Leukämievirus, das zur Gruppe der Retroviren gehört, ist die Eigenschaft der Lentiviren, dass sich auch nicht-teilende, langsam teilende Zellen oder Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, transduzieren lassen (97). Somit sind lentivirale Vektoren auf Basis des HIV effiziente Vehikel für den stabilen Gentransfer (98), (99) .

### **1.5.1 Lentivirale Gene und ihre Proteine**

Für die Replikation von Lentiviren sind verschiedene Komponenten notwendig. Die hierfür kodierenden Gene sind im lentiviralen Genom von Kontrollsequenzen flankiert, den long terminal repeats (LTR), die für die Expression viraler Gene essentiell sind. Das gag- (Gruppenspezifisches Antigen) Gen kodiert für die inneren Strukturproteine des Viruskerns, das pol-Gen für die Protease, die reverse Transkriptase und Integrase und das env- (envelope) Gen für die viralen Glykoproteine. Zusätzlich zu diesen drei Genen gibt es zahlreiche akzessorische Gene (nef, vif, vpu, vpr) und zwei regulatorische Gene, das tat- und das rev-Gen, die im Replikationszyklus eine wichtige Rolle spielen. Das durch das tat-Gen kodierte regulatorische tat-Protein führt zu einer verstärkten Transkription und das rev- (regulator of expression of the virion) Protein bindet an eine als rev responsive element (RRE) bezeichnete Sequenz im env-Gen und kontrolliert die Expression viraler Gene auf posttranskriptioneller Ebene.

### **1.5.2 Herstellung replikationsinkompetenter Lentiviren**

Für den viralen Gentransfer werden replikationsinkompetente Lentiviren verwendet, um eine unkontrollierte Ausbreitung der Viren zu verhindern. Replikationsinkompetente Viren können Zielzellen transduzieren, sind aber nicht in der Lage, sich in der transduzierten Zelle zu vermehren, weil sie selbst keine

viralen Proteine produzieren können. Diese Eigenschaft haben die replikationsinkompetenten Lentiviren z.B. dadurch verloren, dass sie die hierfür benötigten Verpackungsgene nicht mehr kodieren.

Für die Herstellung von replikationsinkompetenten Lentiviren werden mindestens zwei Komponenten benötigt, zum einen die genetische Information für die strukturellen Proteine und Enzyme und zum anderen das zu transduzierende Gen. Die Gene werden auf verschiedene Plasmide verteilt, um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination und damit der eventuellen Bildung replikationskompetenter Lentiviren zu verringern. Es gibt für die Produktion von replikationsinkompetenten Lentiviren Verpackungsplasmide, die die Gene für gag, pol, env und rev enthalten. Hinzu kommt das Transferplasmid mit dem zu transduzierenden Gen. Durch die simultane Transfektion (Co-Transfektion) der Plasmide in HEK293T Zellen werden replikationsinkompetente Lentiviren produziert. Um das Wirtsspektrum replikationsinkompetenter Lentiviren zu erweitern, wird ein als Pseudotypisierung bezeichneter Mechanismus genutzt, der auch natürlicherweise in Lentiviren vorkommt und sich dadurch auszeichnet, dass diese in der Lage sind, Hüllproteine anderer Viren zu verwenden. So wird zur Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) benutzt. Die Pseudotypisierung führt neben dem erweiterten Wirtsspektrum zu stabileren Lentiviren, wodurch eine Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation ermöglicht wird (100). Für die Herstellung lentiviraler Vektorsysteme wird meist der Promotor des Cytomegalie Virus (CMV) verwendet.

Es gibt drei Generationen lentiviraler Verpackungssysteme. Die erste Generation der lentiviralen Vektoren besteht aus zwei Verpackungsplasmiden und dem Transferplasmid, wobei eines der Verpackungsplasmide alle Gene des ursprünglichen lentiviralen Genoms enthält, bis auf das env-Gen, das sich auf einem zweiten Verpackungsplasmid befindet (99).

Auch die zweite Generation lentiviraler Vektorsysteme besteht aus drei Plasmiden. Hier wurden vier Gene, die für akzessorische Proteine kodieren, eliminiert. Nur noch das tat- und rev-Gen sind als akzessorische Gene auf dem Verpackungsplasmid enthalten, gemeinsam mit den Genen für gag und pol (101).

Das env-Gen befindet sich, wie in der ersten Generation, auf einem weiteren Verpackungsplasmid.

Die dritte und modernste Generation lentiviraler Vektorsysteme besteht aus vier Plasmiden. Hierzu wurde das rev-Gen auf einem zusätzlichen Plasmid untergebracht. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Transduktion von Endothelzellen mit shRNA ein lentivirales Vektorsystem der zweiten Generation verwendet.

## 1.6 Fragestellung

Isoprostane stellen spezifische Marker von oxidativem Stress *in vivo* dar. Es wurde gezeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ein unabhängiger Marker für die KHK ist. Des Weiteren nimmt man an, dass Isoprostane in hypoxischem Myokard akkumulieren (102). Die vorhandenen Kenntnisse über Isoprostane weisen auf eine aktive Rolle in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen hin. Im hypoxischen Myokard von Patienten mit KHK spielt die Angiogenese, die Gefäßneubildung, eine wichtige Rolle, da die Bildung von kollateralen Gefäßen die Perfusion des hypoxischen Myokardgewebes ermöglicht (103). Die einzelnen Abläufe in der Angiogenese werden von verschiedenen Wachstumsfaktoren, u.a. dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), reguliert. Ergebnisse von Gao et al. und Asthon et al. weisen darauf hin, dass synthetische Agonisten des TBXA2R entscheidende Schritte in der Angiogenese inhibieren (95), (104). Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, welchen Einfluss Isoprostane auf die Angiogenese haben und ob diese über den TBXA2R vermittelt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf verschiedene Schritte der Angiogenese in humanen Endothelzellen zu untersuchen. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob die Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf verschiedene Schritte der durch VEGF-induzierten Angiogenese über den TBXA2R vermittelt wird.

Folgende Fragestellungen sollten hierfür beantwortet werden:

- Welche Effekte übt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die VEGF-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung, zwei entscheidende Schritte in der Angiogenese von humanen Endothelzellen, aus?
- Lassen sich diese Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> durch einen siRNA-induzierten Knockdown des TBXA2R antagonisieren?

Für den Knockdown des TBXA2R wurde das Prinzip der RNA-Interferenz mit shRNA angewendet. Hierbei wurde die shRNA mit Hilfe eines Lentivirus in die Endothelzellen eingeschleust.

## 2 Materialien

### 2.1 Substanzen und Kits

Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarosepulver	Invitrogen (San Diego, USA)
Albumin Fraktion V, Pulver Bovine (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Antikörper (rabbit anti-human, polyklonal) TBXA2R	Lifespan Biosciences (MI, USA)
Antikörper (donkey anti-rabbit IgG)	Dianova (Hamburg)
Ammoniumacetat	Fluka (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Bio Rad Laboratories (Hercules, USA)
Ampicillin-Trihydrat	Serva (Heidelberg)
Aqua ad iniectabilia	Baxter (Unterschleissheim)
Bam HI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Bis-Acrylamid, 40%	Bio Rad (Hercules, USA)
BM 567	Cayman Chemical Europe (Tallin, Estland).
Bradford Reagenz	BioRad (München)
BSTFA-N,O-bis(Trimethylsilyl)- triflouracetamid	Pierce (Rockford, USA)
Kalسيومchlorid	Caeb (Hilden)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)



DEPC-Wasser	Roth (Karlsruhe)
N, N-Diisopropylethylamin	Sigma GmbH (Steinheim)
<i>E.coli</i> DH10B	Invitrogen (San Diego, USA)
ECL Western Blotting Substrate	Amersham Bioscience (Freiburg)
Endofree Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethidiumbromid (Ethidiumbromid wird als karzinogen und mutagen eingestuft)	Fluka (Deisenhofen)
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Geneticin (G 418 Sulfat)	GIBCO (Eggenstein)
Giemsa Lösung	Dade Behring (Marburg)
HIV-1 p24 Antigen ELISA	Zeptomatrix Corp. (Buffalo, USA)
8-Isoprostan-Affinitätssäulen	Cayman Chemical (Michigan, USA)
8-iso-PGF <sub>2α</sub>	Cayman Chemical Europe (Tallin, Estland).
ICI 192,605	Cayman Chemical Europe (Tallin, Estland)
Kaliumchlorid	Caeb (Hilden)
Kaliumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Kollagen Typ 1	Cohesion (Palo Alto, USA)
6x Loading Dye	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

Lysozym	SIGMA GmbH (Steinheim)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Sigma GmbH (Steinheim)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
Nonidet P 40	SIGMA GmbH (Steinheim)
O`GeneRuler™ 50bp DNA- Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Ponceau Rot	Sigma GmbH (Steinheim)
PolyFect Transfektion Reagenz	Qiagen (Hilden)
Proteinstandard	Bio Rad (Hercules, USA)
2,3,4,5,6- Pentafluorbenzyl Bromid	SIGMA GmbH (Steinheim)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Rubidiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Streptomycin	Invitrogen (San Diego, USA)
Serum (anti-goat)	Dianova (Hamburg)
SQ 29548	Cayman Chemical Europe (Tallin, Estland)
Natrium Dodecyl Sulfat	SIGMA GmbH (Steinheim)
Tango Puffer	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Taqman Genexpression Assay Kit TXA2R	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Taqman Genexpression Assay Kit GAPDH	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Taqman universal PCR MasterMix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck (Darmstadt)

NdeI	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Trichloressigsäure	Fluka (Deutschland)
Triple Master PCR System	Eppendorf (Hamburg)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris base, 99,9%)	SIGMA GmbH (Steinheim)
Triton X	Merck (Deutschland)
Restriktionsenzyme BamH1 und Nde1	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNAzol	Bio Rad (Hercules, USA)
Tween 20	SIGMA GmbH (Steinheim)
TRC shRNA	Open Biosystems (Huntsville, USA)
rHu VEGF	PromoKine (Heidelberg)
U-46119	Cayman Chemical Europe (Tallin, Estland).
Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Whatman-Papier	Whatman (Kent, UK)
Wasser, doppelt destilliert (Aqua bidest)	Wasseraufbereitungsanlage Millipore (Schwalbach)

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße (1.5 / 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Falconröhrchen (15 / 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm)	Qualilab (Bruchsal)
Gummischaber (Cell Scraper)	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten (10x4x45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)

Nitrocellulosemembran	Whatman (Kent, UK)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Rührspatel	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten, Kunststoff (1/2/5/10 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
10 cm Schalen	Sarstedt (Nümbrecht)
6-well-Schale	Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman-Papier	Whatman (Kent, UK)

### 2.3 Geräte

Analysewaage	Sartorius (Göttingen)
Autoklav	H+P (Oberschleißheim)
Accu-jet Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg)
96-well-Boyden chamber	Neuro Probe (Gaithersburg, USA)
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
ChemiGenius2 Bioimaging System	Syngene (Cambridge, UK)
Digitalwaage	Sartorius (Göttingen)
Eismaschine	Scotsman (Vernon Hills, USA)
Evaporator, Turbo Vap LV	Zymark (Hopkinton, USA)
Glasplatten	BioRad (Hercules, USA)
Gelkammer	BioRad (Hercules, USA)
Gaschromatograph-Massenspektrometer	Varian (Palo Alto, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen)

Kühltruhe (-80°C)	Kyrotec (Hamburg)
Laufkammer	BioRad (Hamburg)
Mini Protean System Kamm (0,7 mm)	BioRad (Hamburg)
Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss (Göttingen)
Mikroskop, Axioskop 2	Zeiss (Göttingen)
Thermal Cycler	Eppendorf (Hamburg)
Photometer Smart Spec 3000	Biorad (München)
Pipetten, 0.5–10µl / 10–100µl / 100–1000µl / 1000–5000µl	Eppendorf (Hamburg)
Polycarbonatfilter	Neuro Probe (Gaithersburg, USA)
Sicherheitswerkbank, HeraSafe S2	Heraeus (Hanau)
Smartspec 3000	BioRad (Hercules, USA)
Thermomixer compact 436	Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock	Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, Frankreich)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
TaqMan 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Voltmeter	Bio Rad (Hercules, USA)
Vortexer, Reax Top	Heidolph (Kelheim)
Spectrophotometer	NanoDrop (Wilmington, USA)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Billerica, USA)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge, Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)
-------------------------	----------------------

## 2.4 Zellen und Zellkultur

Basal Endothelial medium	PromoCell (Heidelberg)
DH10B Zellen	Invitrogen (San Diego, USA)
DMEM mit Glutamax	Gibco (Karlsruhe)
Einfrierröhrchen	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Fetal bovine serum (FBS)	Invitrogen (Grand Island, USA)
Gelatine	SIGMA GmbH (Steinheim)
HEK	QBiogene (Heidelberg)
HEK 293 T	Heinrich Pette Institut (Hamburg)
Humane Koronare Arterielle Endothelzellen	PromoCell (Heidelberg)
Humane Dermale Microvaskuläre Endothelzellen	PromoCell (Heidelberg)
Matrigel	BD Biosciences (Bedford, USA)
Trypsin	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)
Phosphate buffered saline (138 mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O)	Biochrom AG (Berlin)
Zellkulturflaschen (T25,T75)	Sarstedt (Nümbrecht)

## 2.5 Puffer und Lösungen

### Ampicillin Stammlösung 50 mg/ml:

2500 mg Ampicillin – Trihydrat in 25 ml Aqua bidest,  
2,5 ml NaOH 10 M,  
25 ml Aqua bidest hinzufügen,  
pH-Wert Einstellung bei 8,6.

### Glycerolstock:

0,15 ml Glycerol (100%) in Reaktionsgefäße vorlegen und autoklavieren,  
0,85 ml der Bakterienkultur hinzufügen,  
für 20 Sekunden in flüssigen Stickstoff geben und anschließend bei -80°C lagern.

### Lämmli-puffer:

50% Glycerin	20 ml	
Bromphenolblau	20 mg	mit Aqua bidest zu 40 ml auffüllen.

### Laufpuffer:

10x Tris-Glycin Puffer	100 ml	
20% SDS	5 ml	mit Aqua bidest zu 1000 ml auffüllen.

### LB-Medium:

Bacto-Tryptone	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	10 g	in 1000 ml Aqua bidest lösen.

LB-Agar:

Tryptone	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	10 g	
Agar	15 g	in 1000 ml Aqua bidest aufnehmen und in 10 cm <sup>2</sup> Schalen gießen.

Lower Tris pH 8,8:

Tris (1,5 M)	18,17 g	
20% SDS	2 ml	mit Aqua bidest zu 100 ml auffüllen.

Lysispuffer:

Triton X 100	0,5%
Nonidet P 40	0,5%
Tris pH 7,5	10 mM
KCL	2,5 mM
NaCl	150 mM
b-Glycerolphosphat	30 mM
NaF	50 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM

Protease-Inhibitor Mix 0,1% wird kurz vor der Proteingewinnung hinzugegeben.

Lysozym (10 mg/ml):

10 mg Lysozym in 1 ml Aqua bidest lösen. Nach steriler Filtration bei -20 °C lagern.



Ponceau- Lösung:

Ponceau S	26 mM	
Trichloressigsäure	30 mM	in wässriger Lösung.

Probenpuffer:

50% Glycerin	2 ml	
20% SDS	1,5 ml	
Upper Tris	1,25 ml	
Mercapthoethanol	0,5 ml	mit Aqua bidest zu 10 ml auffüllen.

RF 1 Puffer:

RbCl	100 mM	
MnCl <sub>2</sub>	5 mM	
Kaliumacetat	30 mM	
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	
Glycerin	15 %	pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, bei 4 °C lagern.

RF 2 Puffer:

MOPS	10 mM	
RbCl	10 mM	
CaCl <sub>2</sub>	75 mM	
Glycerin	15 %	pH 6,8 mit 1 M KOH einstellen.

Sammelgel 4%:

Aqua bidest	2,44 ml
Acrylamid (4,3 M)	530 µl
Upper Tris	1 ml
TEMED	4 µl
Ammoniumpersulfat (0,44 M)	30 µl

Säulenpuffer:

Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ )	17,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	3,22 g
Natriumchlorid (NaCl)	29,2 g
Natriumacid ( $NaN_3$ )	0,5 g
	in 1000 ml Aqua bidest lösen.

STET- Puffer:

Saccharose	8%
Triton X100	5%
EDTA	50 mM
Tris-HCl	50 mM in wässriger Lösung, pH 8,0.

1x TAE- Puffer :

Tris- HCL	2 M	
Essigsäure	1 M	
Essigsäure	0,1 M	in wässriger Lösung, pH 8.

Transferpuffer:

10x Tris-Glycin Puffer	100 ml	
Methanol	200 ml	mit Aqua bidest zu 1000 ml auffüllen.

Tris-Glycin Puffer 10x:

Tris (25 mM)	30 g	
Glycin (0,2 M)	144 g	mit Aqua bidest zu 1000 ml auffüllen, pH 8,3.

Trenngel 10%:

50% Glycerin/Aqua bidest	6,2 ml
Acrylamid	3,1 ml
Lower Tris	3,16 ml
TEMED	6 µl
10% Ammoniumpersulfat	64 µl

Upper Tris pH 6,8:

Tris (0,5 M)	6,06 g	
20% SDS	2 ml	mit Aqua bidest zu 100 ml auffüllen.

TBS 10x:

Tris (0,2 M)	42,2 g	
NaCl (1,37 M)	80 g	mit Aqua bidest zu 100 ml auffüllen, pH 7,6.

TBS- t:

Tween 20	1 ml	mit 10x TBS zu 10 ml auffüllen.
----------	------	---------------------------------

## 3 Methoden

### 3.1 PCR

#### 3.1.1 Primer

Folgende Primer wurden zur Detektion der mRNA der beiden Splicevarianten des TBXA2R gewählt: Als forward-Primer 5`GTGTTGGCTGCCCCTTCT3` (MWG Biotech, Ebersberg, Exon 2) für beide Varianten, als reward-Primer 5`GCGCTCGTCCACTTCCTAC3` zum Nachweis vom Subtyp TBXA2R- $\alpha$  (Intron zwischen Exon 3 und 4) und als zweiter reward-Primer 5`CAAATTCAGGGTCAAAGAGCA3` zum Nachweis von TBXA2R- $\beta$  (MWG Biotech, Ebersberg, Exon 4). Die zu erwartenden cDNA-Fragmente für TBXA2R- $\alpha$  und TBXA2R- $\beta$  haben eine Größe von 285 bp bzw. 385 bp. Es wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

#### Master Mix 1

Aqua ad iniectabilia: 7  $\mu$ l

Primer forward (0,5 pmol/ $\mu$ L): 1,25  $\mu$ l

Primer reward (0,5 pmol/ $\mu$ L): 1,25  $\mu$ l

#### Master Mix 2

10x Tuning Puffer: 2,5  $\mu$ l

dNTPs (2,5 mM): 2,5  $\mu$ l

Triple Master Enzyme Mix : 0,2  $\mu$ l

Aqua ad iniectabilia: 11,3  $\mu$ l

8  $\mu$ l aus Master Mix 1 wurden in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und von jeder DNA-Probe wurden 10 ng hinzupipettiert. 15  $\mu$ l aus Master Mix 2 wurden hinzugeben und nach kurzer Zentrifugation wurde das PCR-Programm gestartet.

### 3.1.2 PCR-Programm

Zunächst wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 94 °C erhitzt, dann folgten 20 Zyklen mit folgenden Temperaturen:

- 30 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung),
- 30 Sekunden bei 62 °C im ersten Zyklus und in jedem weiteren Zyklus 0,2 °C Temperaturabfall (Annealing),
- 30 Sekunden bei 72 °C (Elongation).

Danach erfolgten 15 weitere Zyklen mit folgenden Temperaturen:

- 30 Sekunden bei 94 °C (Denaturierung),
- 30 Sekunden bei 58 °C (Annealing)
- 30 Sekunden bei 72 °C (Elongation)

Als letzter Schritt wurde für 7 Minuten auf 72 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Kühlung bei 4 °C. Zur Überprüfung der PCR wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 3.1.3 Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 1-1,5 %-ige Agarose-Gele angefertigt. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarosepulver mit TAE-Puffer zum Kochen gebracht und damit vollständig gelöst. Nachdem die Agaroselösung abgekühlt war (handwarm), wurde Ethidiumbromid (0,03 %) hinzugefügt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und fluoresziert unter UV-Strahlung, so dass DNA detektiert werden kann. Die Agaroselösung wurde in eine Gelkammer gegossen, in die zuvor ein Taschenkamm eingesetzt wurde. Nach 15 Minuten war das Gel ausgehärtet. Anschließend wurde das Gel in die mit TAE als Laufpuffer gefüllte Gelkammer überführt. Die Taschen des Gels wurden mit den entsprechenden DNA-Proben befüllt. Die

Proben mussten zuvor mit 3 µl Ladungspuffer (Loading Dye) vermischt werden. Zusätzlich wurde ein Marker (O`GeneRuler™ 50bp DNA-Ladder, O`Gene Ruler, Fermentas) aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten Fragmente zu bestimmen. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 80 Volt. Anschließend wurden die fluoreszierenden DNA-Fragmente unter einer UV-Lampe detektiert und photographiert.

## **3.2 Quantitative Messung von RNA**

### **3.2.1 mRNA-Isolierung aus Zellen**

Die mRNA-Isolierung wurde aus 6-Well Platten durchgeführt. Dazu wurde die Platte zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden 600 µl RNAzol auf jede Schale gegeben und anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schalenoberfläche abkratzt. Die Zellsuspension eines jeden Wells wurde in 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäße, die 200 µl eisgekühltes Chloroform enthielten, überführt. Nach dem Vortexen wurden die Proben für 15 Minuten auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 4 °C und 12000 g für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand von etwa 200 µl wurde abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt, welches 600 µl eiskaltes Isopropanol enthielt. Die Proben wurden danach für mindestens eine Stunde bei -20 °C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 4 °C und 12000 g für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 60 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen.

Erneut wurden die Proben bei 4 °C und 12000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen. Es erfolgt im Anschluss die photometrische Konzentrationsbestimmung der mRNA bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Die Intaktheit der mRNA wurde mit einem 1 %-igen

Agarosegel nachgewiesen. Bei intakter RNA wurden zwei Banden im Gel sichtbar. Die obere Bande stellt die 28S rRNA Untereinheit dar, während die untere Bande die 18S rRNA Einheit repräsentiert.

### **3.2.2 Reverse Transkription der präparierten RNA**

Nach der RNA-Isolierung wurden von jeder Probe 2 µg RNA nach Herstellerangaben mit „Omniscript“ (Qiagen) im Thermocycler in cDNA umgeschrieben.

### **3.2.3 Real-Time-PCR**

Die Real-Time-PCR ist grundsätzlich aufgebaut wie eine normale PCR, wobei zusätzlich zu dem Primerpaar als ein weiteres Oligonukleotid eine Sonde zugefügt wird. Diese ist komplementär zur nachzuweisenden DNA-Sequenz und liegt zwischen den Primerbindungsstellen. Am 5` Ende ist die Sonde mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszenzderivat) markiert, am 3` Ende befindet sich ein Quencher-Farbstoff (Rhodaminderivat). Bei Intaktheit der Sonde, wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus bindet die Sonde an den Matrizenstrang und die Taq-Polymerase synthetisiert den fehlenden Strang. Die Taq-Polymerase hat eine 5`-3` Exonukleaseaktivität, die eine Hydrolyse der Sonde bewirkt. Infolgedessen werden der Reporter- und Quencher-Farbstoff getrennt, so dass das Fluoreszenz-Signal nicht mehr unterdrückt wird. So lässt sich mit der Real-Time-PCR die Genexpression über das sich verstärkende Fluoreszenz-Signal quantifizieren. Das hier angewendete Auswertungsverfahren ist die delta delta C<sub>T</sub>- Methode. Der C<sub>T</sub>-Wert misst die Anzahl von Zyklen, die notwendig ist, bis das Reporter-Fluoreszenz-Signal eine bestimmte Schwelle überschritten hat.



Zur Detektion der mRNA des TBXA2R wurde der Expressionsassay Hs00169054\_m1 (Applied Biosystems) verwendet. Die eingesetzte cDNA war das Produkt der vorhergegangenen reversen Transkription. Da die Effizienz der reversen Transkription unterschiedlich ist, kann man die Proben nur miteinander vergleichen, wenn man ein zweites Gen, das sogenannte Housekeeping Gen, welches vom Zielgen unabhängig ist, amplifiziert. Hier wurde GAPDH als Housekeeping Gen verwendet (Hs99999905\_m1). Für jedes Gen wurde ein Master Mix angesetzt, bestehend aus 4 µl Universal PCR Master Mix, 0,5 µl Taqman Genexpression Assay Kit und 3,5 µl Aqua ad iniectabilia für jedes Well. Aus den C<sub>T</sub>-Werten beider Gene wird dann ein Quotient gebildet. Der Master Mix wurde kurz zentrifugiert und 8 µl wurden in jedes Well pipettiert. Die cDNA ist das Produkt der vorhergegangenen reversen Transkription. Pro Reaktionsansatz von insgesamt 10 µl wurde 1 µl der cDNA Lösung eingesetzt. Anschließend wurde das Real-Time-PCR Programm bei folgenden Temperaturen gestartet:

**Temperaturprogramm:**

2 Minuten 50 °C

10 Minuten 95 °C

40 Zyklen

Denaturierungstemperatur: 15 Sekunden bei 95 °C

Annealing-Temperatur: 1 Minute bei 60 °C

Die Realtime-PCR wurde mit einem TaqMan (7900HT Sequence Detection System) von Applied Biosystems durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SDS 2.1 von Applied Biosystems.

### 3.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen zeigen keine natürlichen Resistenzen und werden daher mit Rubidiumchlorid behandelt. Das Rubidiumchlorid verringert die Abstoßung zwischen negativ geladener DNA und Zellmembran. Dazu wurden 150 ml LB-Medium (Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien) mit Streptomycin versetzt und mit *E. coli* vom DH10B-Typ angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 bei 37 °C kultiviert. Die Kultur wurde anschließend für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 1000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 16,7 ml kaltem RF 1 Puffer resuspendiert und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 g und 4 °C für 15 Minuten wurde das Zellpellet in 4 ml kaltem RF 2 Puffer resuspendiert und wiederum für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.1 Transformation

Für die Transformation wurde die Hitzeschock-Methode verwendet, bei der Poren in der Membran der Bakterien zur Aufnahme der DNA entstehen. Dazu wurden 100 µl der chemisch kompetenten *E. coli*-Kultur vom DH10B-Typ auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µl des Plasmids (0,03 µg/µl) der Bakteriensuspension zugefügt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt um die Poren zur Plasmidaufnahme zu öffnen. Danach wurden die Bakterien für drei Minuten auf Eis gestellt, so dass die Poren sich verschloßen. 300 µl vorgewärmtes LB-Medium wurden dem Transformationsansatz zugesetzt. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte das Ausstreichen der Bakterien auf Agaroseplatten, die das entsprechende Selektionsme-

dium mit Penicillin enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 16 Stunden waren Kolonien resistenter Bakterien zu sehen.

### **3.3.2 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Minipräp)**

Mit sterilen Pipettenspitzen wurde je eine Bakterienkolonie gepickt und mit 3 ml LB-Medium und Selektionsantibiotikum im Kulturröhrchen im Schüttelinkubator kultiviert. Nach 16 Stunden bei 37 °C wurde die Präparation der Plasmid DNA in kleinem Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 1,5 ml der Bakterienkulturen in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für eine Minute bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 500 µl STET- Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Lysozym (10 mg/ml) wurden die Eppendorfgefäße mehrfach invertiert und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 95 °C für 90 Sekunden auf dem Thermomixer inkubiert und für fünf Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit einem Tupfer vorsichtig entfernt. Nach Zugabe von 50 µl Ammoniumacetat und 500 µl Isopropanol wurden die Proben invertiert und die Plasmid DNA durch 10 Minuten Zentrifugation bei 13000 x g und 4 °C präzipitiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet nach Lufttrocknung in 20 µl Aqua ad iniectionem aufgenommen. Es erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration bei 260 nm im Spektrometer und anschließend wurden die Klone durch einen Restriktionsverdau verifiziert.

### **3.3.3 Restriktionsanalyse**

Zur Verifizierung des DNA-Plasmides erfolgte ein Verdau mit Restriktionsenzymen. Das pLKO.1-Plasmid hat eine Größe von 7084 bp und die enthaltene shRNA ist von den Schnittstellen der Enzyme BamH1 und Nde1 flankiert. Für die Restriktionsanalyse wurde ein Master Mix angesetzt. Pro Ansatz wurden 2,5

µl Tango Puffer, 1500 IU BamH1, 1500 IU Enzym Nde1, 300 µg cDNA zusammenpipettiert und mit entsprechender Menge Aqua ad iniectabilia zu 25 µl pro Ansatz aufgefüllt. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Danach konnten die beiden entstandenen DNA-Fragmente mit einer Größe von 6238 bp und 794 bp im Agarosegel aufgetrennt werden.

### **3.3.4 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxipräp)**

Um die DNA in großem Maßstab aufzureinigen, wurden am Vorabend 250 ml LB-Medium mit 1 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Für das pLKO.1-Plasmid wurde zusätzlich das Selektionsantibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 50 mg/ml hinzugefügt. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die Schüttelkultur für 15 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde mit dem „Endofree Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

## **3.4 Zellkultur**

### **3.4.1 Endothel- und HEK-Zellen**

Humane koronare arterielle Endothelzellen (HCAEC) und Humane dermale microvaskuläre Endothelzellen (HDMEC) wurden von humanen Spendern kryokonserviert geliefert (Promocell, Heidelberg). Zellen der vierten bis siebten Passage wurden für die Experimente genutzt, um sicher zu gehen, dass die Zellen ihre charakteristischen Eigenschaften nicht verlieren. Als Medium wurde Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV, EGM, Promocell, Heidelberg) verwendet, welches Vitamin C, Hydrokortison, Gentamicin, Amphotericin B, Fetal bovine Serum (FBS) und verschiedene Wachstumsfaktoren enthielt.

Human embryonic Kidney Cells 293 (HEK) Zellen sind eine human Zelllinie, die aus der Transformation von menschlichen embryonalen Nierenzellen mit DNA-Teilen des Adenovirus 5 entstanden ist. HEK-Zellen wachsen adhären und sind einfach zu kultivieren und transfezieren. Das Medium, DMEM mit Glutamax, wurde alle drei Tage gewechselt. Eine besondere Variante der HEK-Zellen sind die 293T-Zellen. Es handelt sich um humane embryonale Nierenzellen, die stabil das große SV40 T-Antigen exprimieren (Du Bridge et al. 1987.) Dadurch kommt es zur Replikation der Plasmide, die den SV40-Replikationsursprung (ori) tragen. Dies führt zu einer stärkeren Expression der auf diesen Plasmiden kodierten mRNA und Proteine.

Die Zellen wurden in 25- oder 75-cm<sup>2</sup> Kulturschalen oder in 6-Well Platten kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 70-80% passagiert. Dazu wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 %iger Trypsinlösung trypsinisiert. Für HEK-Zellen wurde PBS mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> verwendet. Die Enzymaktivität wurde durch Hinzufügen von Medium bzw. im Falle der HCAECs und HDMECs mit Stopplösung, bestehend aus Wachstumsmedium und 10% FCS, nach dem Ablösen der Zellen beendet. Danach wurde die Zellsuspension im Falle der HEK-Zellen für 5 Minuten bei 200 g und im Falle der HCAECs und HDMECs für 5 Minuten bei 220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen oder -flaschen verteilt. Um die Zelladhäsion sicherzustellen, mussten die Kulturschalen oder -flaschen für HCAECs und HDMECs zuvor mit Gelatine beschichtet werden. Dazu wurden sie bei 37 °C für 30 Minuten mit 0,2 %iger Gelatine inkubiert. Nach Absaugen der überflüssigen Gelatine wurde die Zellsuspension hinzugegeben.

### **3.4.2 Einfrieren von Zellen (Kryokultur)**

Zur Konservierung der Zellen wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen aus 25 cm<sup>2</sup> Flaschen pelletiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml Medium mit 10

% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, Dänemark) überführt. In einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox wurden die Zellen langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und konnten nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

### **3.4.3 Transfektion von Zellen**

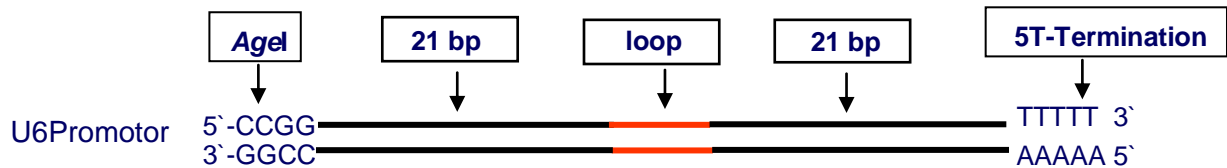
Die Transfektion von HEK293 Zellen zur Expression von Plasmid-DNA in Zielzellen wurde mit dem „Polyfect Transfection Reagent“ von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **3.5 Knockdown des Thromboxanrezeptors mit shRNA**

### **3.5.1 Auswahl einer geeigneten shRNA Sequenz**

Die shRNA zur Herunterregulation der Genexpression des Thromboxanrezeptors hatte folgende Basensequenz: 5'-CCGG CTGC CGTC TCTG TCGC TTCA TCTC GAGA TGAA GCGA CAGA GACG GCAG TTTT T-3'. Die shRNA zur unspezifischen Herunterregulation der Genexpression (scrambled shRNA) hatte folgende Basensequenz: 5'-CCGG CCTAA GGTT AAGT CGCC CTCG CTCG AGCG AGGG CGAC TTAAC CTTA GGTT TTT-3'. Der Aufbau der shRNA ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Als Vektorsystem für die shRNA wurde der pLKO.1-Vektor von Open Biosystems gewählt.

## Organisation der shRNA



**Abb.3.1** Aufbau der shRNA

### 3.5.2 Generierung lentiviraler Überstände zur Transduktion von Endothelzellen

Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurde das retrovirale replikationsinkompetente 2-Vektorensystem von Open Biosystems verwendet. Dabei wurden drei Vektoren eingesetzt. Das Plasmid psPAX2, das die Proteine gag, pol und rev exprimiert. Das Plasmid pMD2.G zur Expression des Hüllproteins VSV.G und das Plasmid pLKO.1, von dem drei Varianten eingesetzt wurden. Je nachdem welche Sequenz in dem Vektor integriert war, wurde die shRNA zum Knock-down des Thromboxanrezeptors exprimiert, eine sogenannte non-target (scrambled) Sequenz, die keinen Effekt auf die Genexpression humaner Gene zeigen sollte und eine Sequenz zur Expression von GFP (Green Fluoreszenz Protein) zur Erfolgskontrolle der Transduktion der Zielzellen.

$10^6$  HEK 293T Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion in eine  $10\text{ cm}^2$ -Kulturschale ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 6 ml frisches Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums ersetzt.

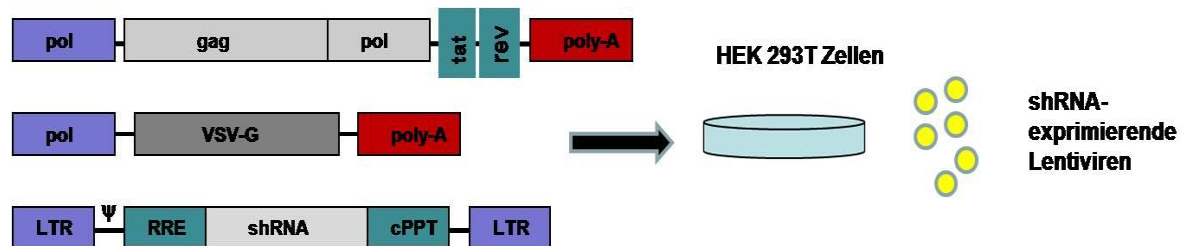
Folgendes Transfektionsgemisch wurde hergestellt:

5  $\mu\text{g}$  psPAX2 (gag, pol, rev)

2  $\mu\text{g}$  pMD2.G (VSV.G)

5  $\mu\text{g}$  Ziel Plasmid-DNA (pLKO.1 shRNA, pLKO non target, pLKO GFP)

Die Plasmide wurden in 750 µl Medium ohne Zusätze gelöst. 30 µl Polyfect-Transfektionsgemisch wurden hinzugefügt. Es erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen aufgetragen und die Zellen wurden für drei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium auf 10 ml aufgefüllt.



**Abb. 3.2** Produktion von shRNA-exprimierenden Lentiviren: LTR - long terminal repeat, RRE - rev responsive element, cPPT - zentraler Polypurintrakt,  $\Psi$ -Verpackungssignal

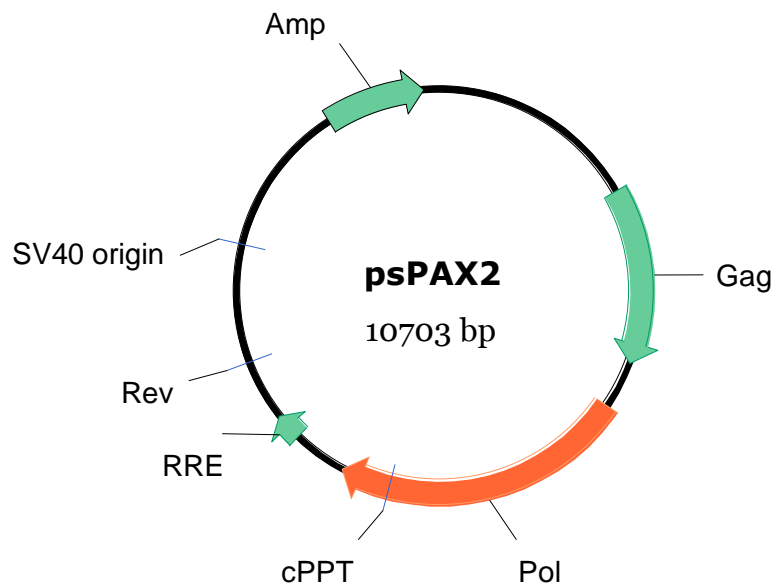
### 3.5.3 Transduktion von Endothelzellen

48 Stunden nach der Transfektion der HEK 293T Zellen wurde der erste viruspartikelhaltige Überstand abgenommen, der nächste Überstand weitere 24 Stunden später. Um Zelltrümmer zu beseitigen, wurden die Überstände steril filtriert (Porengröße 0,45 µm). Danach wurde der Überstand mit Endothelzellmedium im Verhältnis 1:1 verdünnt und für die Transduktion der Endothelzellen verwendet. Zunächst erfolgte die Transduktion mit dem 48-Stunden-Überstand für 24 Stunden, dann wurde das Medium durch den 72-Stunden-Überstand ersetzt und für zwei weitere Tage inkubiert. Über diesen Zeitraum wurde der Vektor zum Knockdown des TBXA2R in die Endothelzellen integriert. Der Erfolg des Knockdown des TBXA2R wurde auf der Ebene der Expression von mRNA,

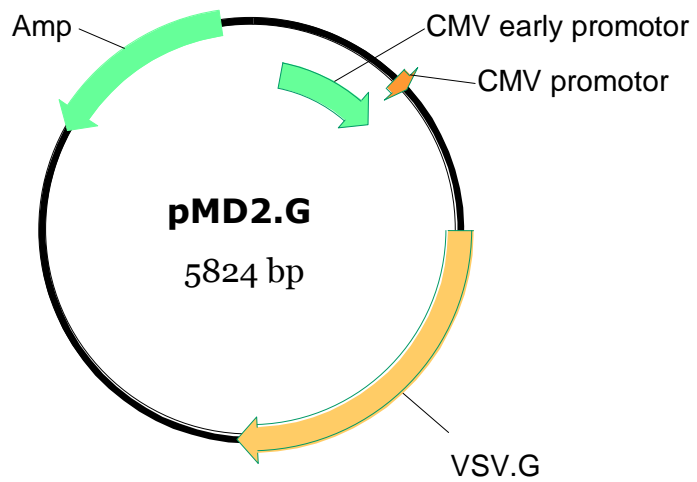


Proteinen und mit funktionellen Assays (Kapillarröhrenbildung und Migrations-Assays) nachgewiesen.

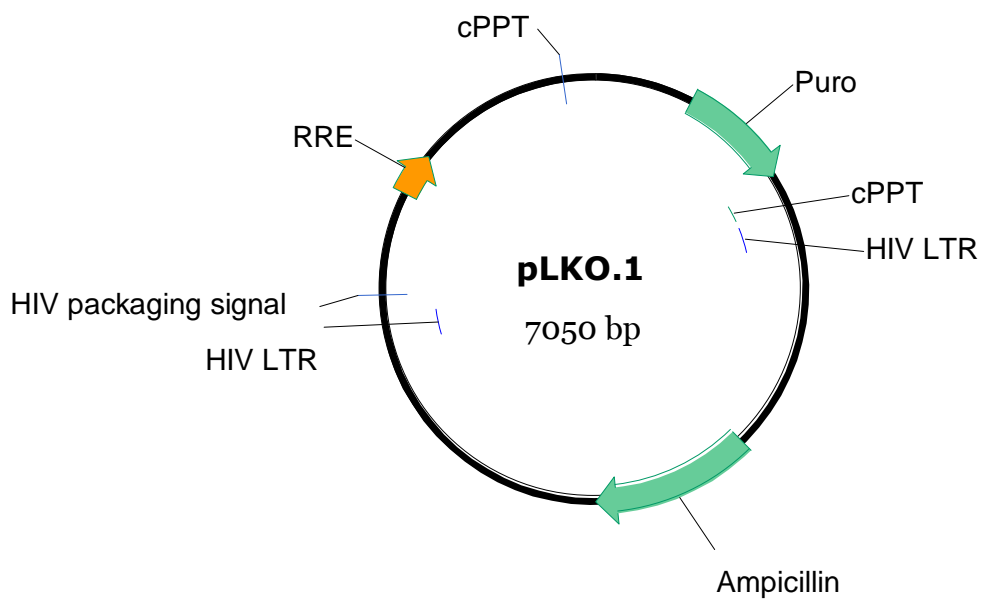
### 3.5.4 Vektorkarten, der für die Lentivirus Produktion verwendeten Plasmide



**Abb. 3.3** Vektorkarte des Plasmids psPAX2 zur Expression der Proteine gag, pol und rev



**Abb. 3.4** Vektorkarte des Plasmids pMD2.G zur Expression des Hüllproteins VSV.G



**Abb. 3.5** Vektorkarte des Plasmids pLKO.1

## **3.6 Generierung einer stabilen, den TBXA2-Rezeptorsubtyp $\alpha$ exprimierenden Zelllinie**

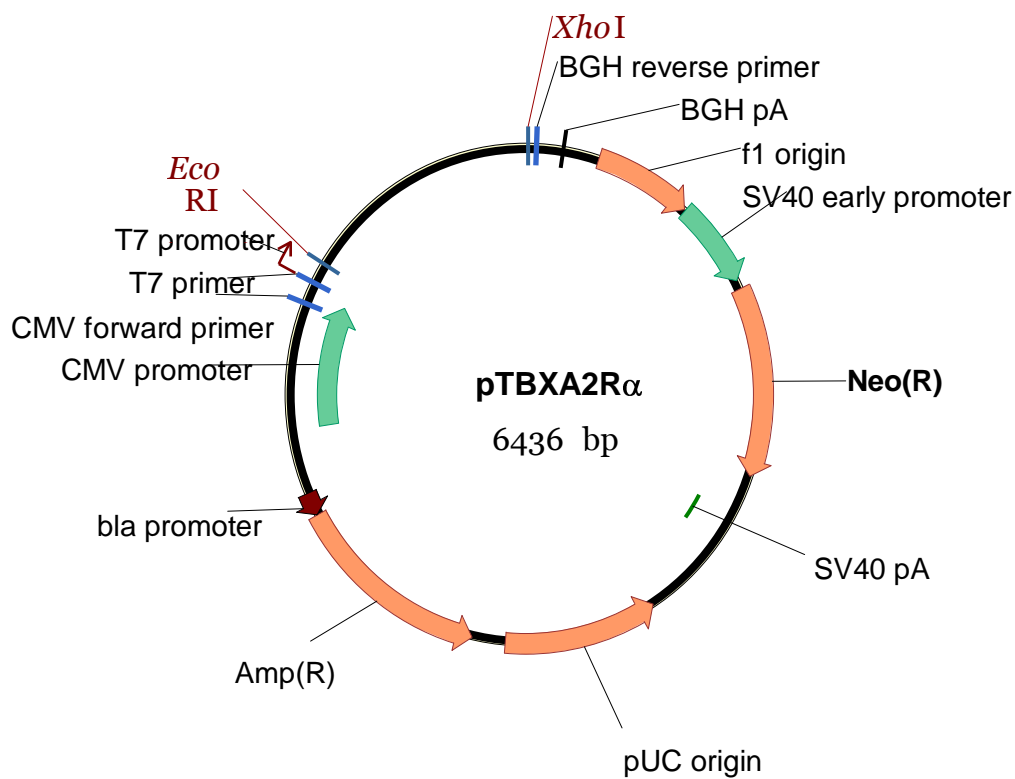
### **3.6.1 Transfektion von HEK 293 Zellen**

Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie wurden ein Tag vor der Transfektion HEK 293 Zellen ausplattiert, so dass am Tag der Transfektion eine Zelldichte von 80-90 % vorlag. Die Transfektion des Plasmids zur Überexpression von Subtyp  $\alpha$  erfolgte mit dem Polyfect Transfection Reagent von Qiagen, dabei wurden 2  $\mu\text{g}$  des Plasmids für die Transfektion verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet und die Transfektionseffizienz wurde anhand der GFP-Expression unter UV- Licht ermittelt.

### **3.6.2 Selektion mit Geneticin**

Zur Generierung einer stabilen Zelllinie, ist es notwendig nur die Zellen zu kultivieren, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben. Das Plasmid (Katalognr. TXA2R00000, UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA) enthält eine Neomycinresistenz, so dass als Selektionsantibiotikum das Aminoglykosid Antibiotikum Geneticin verwendet wurde. Die cDNA-Sequenz zur Expression des Subtyp  $\alpha$  liegt zwischen den Schnittstellen EcoRI und XhoI. Um die letale Dosis für untransfizierte HEK Zellen zu ermitteln, wurde eine „Killkurve“ mit nicht-transfizierten HEK Zellen und steigender Geneticinkonzentration erstellt. Dies erfolgte in einer 6- well Platte, wobei ein well der 6-well Platte ohne Antibiotikum als Kontrolle diente. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt und nach sechs Tagen wurde die letale Dosis von 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  festgestellt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde den Zellen geneticinhaltiges Medium mit einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hinzugefügt. Nach vier Tagen war die nicht transfizierte Kontrollschale zellfrei, während in den transfizierten Schalen einzelne Zellen dem Selektionsdruck standhalten konnten. Nach etwa 7 Tagen began-

nen sich einzelne Klone zu bilden, d.h. eine Gruppe von Zellen, die durch Teilung einer Zelle hervorgegangen und damit genetisch identisch sind. Um die einzelnen Klone weiter zu kultivieren wurden einige Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in eine Petrischale überführt, in der der Selektionsdruck für drei weitere Wochen aufrechterhalten wurde. Die Überexpression des TBXA2-Rezeptorsubtyp  $\alpha$  wurde mithilfe der Realtime PCR und Western Blot nachgewiesen.



**Abb. 3.6** Vektorkarte des Rezeptorsubtyp- $\alpha$  exprimierenden Plasmids

## 3.7 Western Blot

### 3.7.1 Proteingewinnung

Die Zellen wurden vor der Proteingewinnung mit kaltem PBS gewaschen. Zur Proteinisolierung wurde Lysispuffer eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber zerkleinert und die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 g für 5 Minuten und 0 °C zentrifugiert. Die Proteine wurden sofort bei –80 °C eingefroren.

### 3.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford besteht darin, dass es durch die Komplexbildung vom Bradford-Reagenz mit Proteinen zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums vom Bradford-Reagenz von 465 nm zu 595 nm kommt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Proteinbestimmung erfolgte in Doppelwerten. Zunächst wurde eine Standardreihe mit einem Proteinstandard (BSA) angelegt. Dazu wurden 10 mg des Proteinstandards in 2,9 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Proteinkonzentration betrug dann 3,45 mg/ml. Für die Messung wurde der Standard 1:10 mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Es wurden 7 Standardwerte und der Leerwert nach folgendem Schema angelegt:

Erwartete Proteinkonzentration	0 µg/ml	1,725 µg/ml	3,45 µg/ml	6,9 µg/ml	10,35 µg/ml	13,8 µg/ml	17,25 µg/ml	20,7 µg/ml
Standard 1:10 verdünnt	0	5 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl
Aqua ad iniectabilia	800 µl	795 µl	790 µl	780 µl	770 µl	760 µl	750 µl	740 µl
Bradford-Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Die zu messenden Proben wurden vorher 1:10 verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der verdünnten Proben zu 800 µl Aqua ad iniectabilia gegeben und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Alle Proben und die Standardreihe wurden in die Photometerküvetten pipettiert und mit einem Plastikspatel gut durchmischt. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die Messung bei 595 nm im Photometer Smart Spec 3000 (Biorad, Hercules, USA). Die Berechnung der Proteinkonzentration der Probe (µg/µl) erfolgt nach Gleichung 1.

$$\text{Konz.}_{\text{Probe}}(\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \text{Messwert}(\mu\text{g} / \text{ml}) \times \frac{\text{Verdünnung}^{-1}}{10} (\text{ml} / \mu\text{l})$$

**Gleichung 1** Berechnung der Proteinkonzentration

### 3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch das Prinzip der Gelelektrophorese werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel entsteht durch radikalische Polymerisation von Acrylamid. Ammoniumpersulfat liefert die freien Radikale und TEMED wirkt hier als Katalysator. Das Gel besteht aus zwei Komponenten, der untere Anteil ist das Trenngel und der obere Teil das Sammelgel. Vor Beladung des Gels wurden die Proben mit SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt und denaturiert. Dies stellt sicher, dass alle Proteine gleichmäßig negativ geladen sind und die Trennung nur noch von der Molekülgröße abhängig ist und nicht von der Eigenladung der Proteine. Da das Protein von Interesse ein Molekulargewicht von 41 kDa hat, wurden hier 10 %-ige Trenngele benutzt. Die Polymerisation beginnt nach Zugaben von Ammoniumpersulfat und TEMED, so dass nur kurz gerührt und anschließend die Lösung zügig in die vorbereitete Gelkammer gegossen wurde. Um das Austrocknen zu verhindern, wurde das Gel mit destilliertem Wasser beschichtet. Nach einstündiger Polymerisation wurde das Wasser ab-

gegossen und die Kammer mit dem Sammelgel befüllt, in das ein 10-Taschen Kamm eingesetzt wurde.

#### **3.7.4 Probenvorbereitung**

Alle Proben wurden auf Eis aufgetaut. Jeder Probe wurde 1 µl Lämmli-puffer und 5 µl Probenpuffer zugesetzt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung erhitzt. Für die Gelelektrophorese wurde eine mit kaltem Laufpuffer gefüllte Laufkammer verwendet. Die Geltaschen wurden mit 20 µg Proteinmenge beladen. Eine der Taschen wurde mit einem Proteinstandard befüllt, der zur Größenbeurteilung der aufgetrennten Proteine diente. Für 30 Minuten wurde das Gel bei einer Spannung von 50 V laufen gelassen und die darauf folgenden zwei Stunden bei 150 V.

#### **3.7.5 Blotten der Proteine auf Nitrocellulosemembran**

Vor dem Transfer der Proteine von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran, wurden die benötigten Materialien zunächst in Transferpuffer für 15 Minuten equilibriert. Auf einen Schwamm wurden drei Filterpapiere gelegt. Darauf folgten das Gel und anschließend die Nitrocellulosemembran und drei weitere Filterpapiere. Der Transfer-Stapel wurde mit einem weiteren Schwamm abgeschlossen und in die Blotkammer eingesetzt. Die Blotkammer wurde mit kaltem Transferpuffer befüllt, ein Kühlakku wurde zusätzlich eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 300 mA für zwei Stunden, wobei nach einer Stunde der Kühlakku erneuert wurde.

### **3.7.6 Proteinmembranfärbung mit Ponceau S**

Zur Anfärbung der Proteine auf der Blot-Membran wurde eine reversible Protein-Färbung mit dem Farbstoff Ponceau S durchgeführt. Dies erlaubt zum einen eine Überprüfung, ob der Transfer der Proteine auf die Membran funktioniert hat und zum anderen, ob die gleichen Proteinmengen eingesetzt wurden. Hierzu wurde die Blot-Membran 10 Minuten mit Ponceau-Lösung inkubiert und anschließend drei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Fotoaufnahme der Membran mit dem ChemiGenius2 Bioimaging System wurde die Membran mit TBS-tween Puffer gewaschen, um das Ponceau von der Membran zu entfernen. Anschließend folgte das Blocken der Membran.

### **3.7.7 Blocken der Membran**

Unspezifische Bindungsstellen auf der Blot-Membran wurden mit einer Lösung aus 5 % Milchpulver und 2 % BSA in 0,1 % TBS-tween Puffer geblockt. Dazu wurde die Blot-Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.7.8 Immunfärbung der Membran**

Um den Thromboxanrezeptor im Western Blot nachzuweisen, wurde die Membran über Nacht mit dem 1. Antikörper inkubiert (polyklonal, rabbit IgG, Lifespan), der 1:500 in TBS-tween und 1 % Milchpulver verdünnt wurde. Anschließend wurde die Membran drei Mal für jeweils 15 Minuten mit TBS-tween gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem peroxidase-konjugierten 2. Antikörper (donkey anti-rabbit IgG, Dianova, Hamburg), der im Verhältnis 1:100000 in TBS-tween gelöst wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut für 20 Minuten mit TBS-tween gewaschen. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift für 10



Minuten mit 1xTBS. Für die Lumineszenzreaktion wurde ECLdura (Western Blotting Substrate, Amersham Bioscience) verwendet. Das Oxidationsmittel und die Luminollösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran wurde damit für drei Minuten benetzt. Von der mit Klarsichtfolie bedeckten Membran wurde ein Foto mit dem ChemiGenius2 Bioimaging System (Syngene, Cambridge, UK) gemacht. Die Belichtungszeit lag zwischen 30 Sekunden und 15 Minuten. Die erwartete Proteingröße für den Thromboxanrezeptor liegt bei 41 kDa.

## **3.8 Migration und Kapillarröhrenbildung**

### **3.8.1 Durchführung des Migrations-Assays**

Der Migrations-Assay wurde mit einer speziellen 96-well Kammer, der Boyden Chamber, durchgeführt. Diese Apparatur besteht aus zwei Kammern, die durch einen Filter voneinander getrennt sind. In die untere Kammer der Boyden Chamber werden chemotaktisch aktive Substanzen gegeben und in der oberen Kammer befinden sich die Zellen. Je nach Substanzeigenschaften werden die Zellen angeregt entlang des chemotaktischen Gradienten von der oberen Kammer nach unten durch den Filter hindurch auf die raue Seite des Filters zu migrieren. Dabei bleiben die migrierten Zellen an der rauhen Seite des Filters haften.

Die eingesetzten Substanzen, VEGF (50 ng/ml), 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l), U 46119 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) sowie die drei TBXA<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten SQ 29548 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l), BM 567 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) und ICI 192605 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) wurden in basalem Endothelzellmedium (ohne FCS und Wachstumsfaktoren, jedoch mit 0,1 % BSA) gelöst und möglichst blasenfrei in die Wells der unteren Kammer pipettiert, so dass ein leicht konvex gewölbter Flüssigkeits-Meniskus zu sehen war. Auf die untere Kammer wurde ein Polykarbonatfilter (Porengröße 8 µm) platziert. Die raue Seite des Filters wurde zur unteren Kammer gerichtet. Der

Filter wurde zuvor über Nacht mit Kollagen Typ 1 (100 µg/ml), gelöst in 2 mmol/l Essigsäure, beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen.

Für die Migrationsversuche wurden HDMECs verwendet. Sie wurde vor dem Versuch mit basalem Endothelzellmedium (0,1 % BSA) über Nacht inkubiert.  $2 \times 10^4$  Zellen wurden in 50 µl basalem Endothelzellmedium (0,1 % BSA) in die Wells der oberen Kammer der Boyden Chamber pipettiert und anschließend erfolgte die Inkubation für fünf Stunden bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde der Filter abgenommen und die Zellen wurden für 15 Minuten mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung nach Giemsa (Eosin färbte die Kerne purpurrot und Methylenblau das Cytoplasma blau). Zellen, die nicht migrierten, wurden mit einem Wattestäbchen von der glatten Seite des Filters entfernt und der Filter wurde in der Sterilwerkbank getrocknet. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop unter der 400-fach Vergrößerung in sechs zufällig ausgewählten Abschnitten ausgezählt. Die Migration wurde in Prozent zur basalen Zellmigration angegeben.

### **3.8.2 Durchführung des Matrigel Tube Formation Assays**

Im Tube Formation Assay stellt das Matrigel die Basalmembranmatrix dar, in der Endothelzellen Gefäßtubuli ausbilden. Zur Durchführung des Tube Formation Assays wurde eine 48-well-Platte verwendet. Das Matrigel wurde über Nacht auf Eis zum Auftauen gebracht (4 °C). 100 µl Matrigel wurden für ein Well verwendet. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C zur Verfestigung des Gels, währenddessen wurden die Zellen vorbereitet. Hierzu wurden  $5 \times 10^4$  HCAECs in basalem Endothelzellmedium mit 1 % FCS in jedes Well gegeben. Zur Adhäsion der Zellen wurden diese für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Testsubstanzen, gelöst in basalem Endothelzellmedium (1% FCS), den Zellen hinzugefügt. Als Kontrolle wurde Medium mit 0,1 % Ethanol und VEGF (20 ng/ml) mit 0,1 % Ethanol verwendet. VEGF diente als Positivkontrolle und wurde allen weiteren Ansätzen zugesetzt. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l), U 46119 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) wurden als Thromboxan A<sub>2</sub> Agonist getes-

tet, SQ 29548 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) und BM 567 ( $3 \times 10^{-5}$  mol/l) als TBXA2R-Antagonisten. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Von jedem Well wurden vier Fotos gemacht und die Länge der Tubes wurde mit der 40-fach Vergrößerung der Zeiss Axiovision Software bemessen und in mm/mm<sup>2</sup> angegeben.

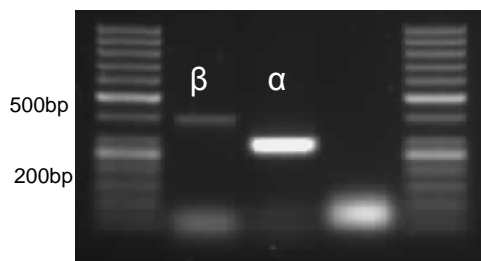
### **3.9 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mit Graph-Pad Prism 4.0 durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem 1-way ANOVA, gefolgt vom Fischer Signifikanztest. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1.1 Identifikation des TBXA2R auf mRNA Ebene und der TBXA2R-Subtypen in HDMECs

Die PCR wurde wie in Abschnitt 3.1 beschrieben durchgeführt, um die mRNA der beiden TBXA2R-Subtypen nachzuweisen. Sowohl TBXA2R- $\alpha$  mit einer Größe von 285 bp als auch - $\beta$  mit einer Größe von 385 bp konnten in HDMECs nachgewiesen werden.

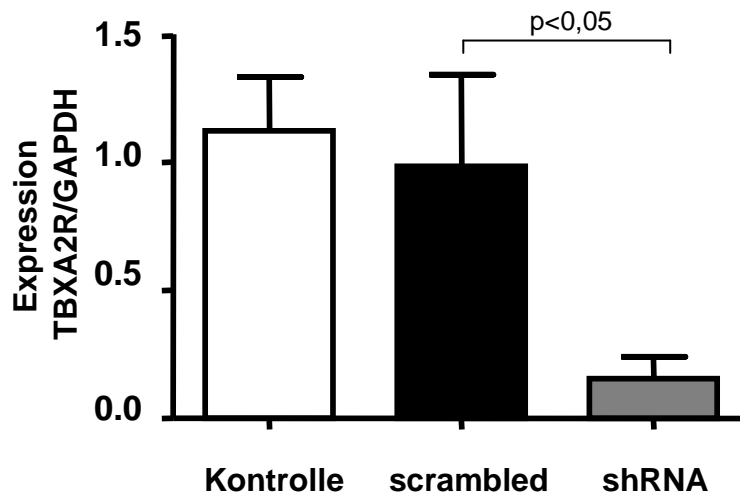


**Abb. 4.1** Expression von TBXA2R- $\alpha$  und - $\beta$  mRNA in HDMECs, im dritten Abschnitt des Gels befindet sich Aqua ad iniectabilia als Negativkontrolle.

### 4.1.2 Nachweis des lentiviralen Knockdowns des TBXA2-Rezeptors auf mRNA-Ebene

Um den Knockdown des Thromboxanrezeptors nachzuweisen, wurde eine Realtime-PCR mit mRNA aus unbehandelten HDMECs, nach lentiviraler Transduktion mit scrambled-shRNA und shRNA gegen den TBXA2-Rezeptor durchgeführt. 48 Stunden nach der Transduktion wurde die mRNA aus den Zellen isoliert und die Realtime-PCR durchgeführt.

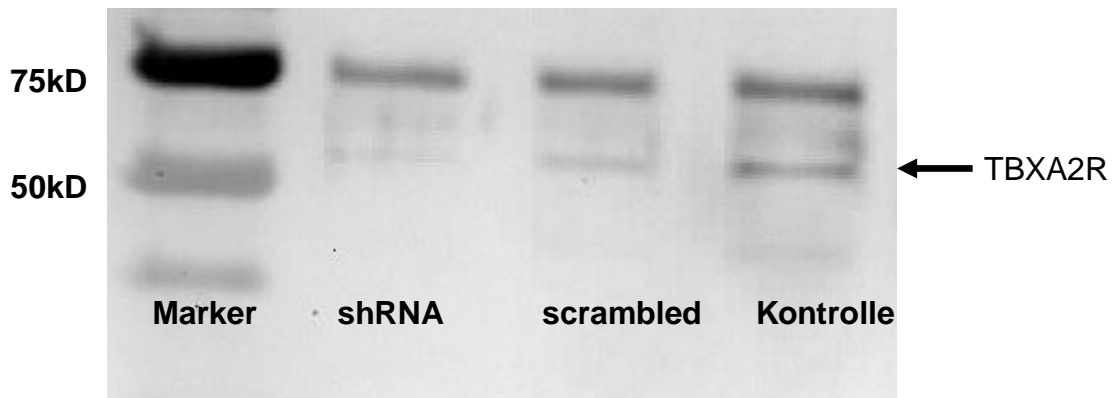
Diese zeigte, dass die scrambled-shRNA verglichen zur Kontrolle keinen Effekt auf die mRNA-Expression des TBXA2-Rezeptors hatte. Die gegen den TBXA2-Rezeptors gerichtet shRNA, führte zu einer signifikanten Runterregulation ( $p < 0,05$ ) der mRNA-Expression verglichen zur scrambled-Sequenz und zur Kontrolle.



**Abb. 4.2** Analyse der mRNA-Expression (normalisiert zur GAPDH-Expression) von unbehandelten Zellen, nach lentiviraler Transduktion mit scrambled-shRNA und shRNA gegen TBXA2-Rezeptor. Mittelwerte  $\pm$ SD,  $n=8$ .

#### 4.1.3 Nachweis des lentiviralen Knockdown des TBXA2-Rezeptors auf Proteinebene

Um auch auf Proteinebene die Herunterregulation des TBXA2-Rezeptors nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit Proteinen aus unbehandelten HCAECs, nach lentiviraler Transduktion mit scrambled-shRNA und gegen den TBXA2-Rezeptor gerichtete shRNA durchgeführt. Der Western Blot erfolgte nach 72-stündiger lentiviraler Inkubation. Der Western Blot zeigte eindeutig die Herunterregulation des Thromboxanrezeptors nach Transduktion mit shRNA gegen den TBXA2R.

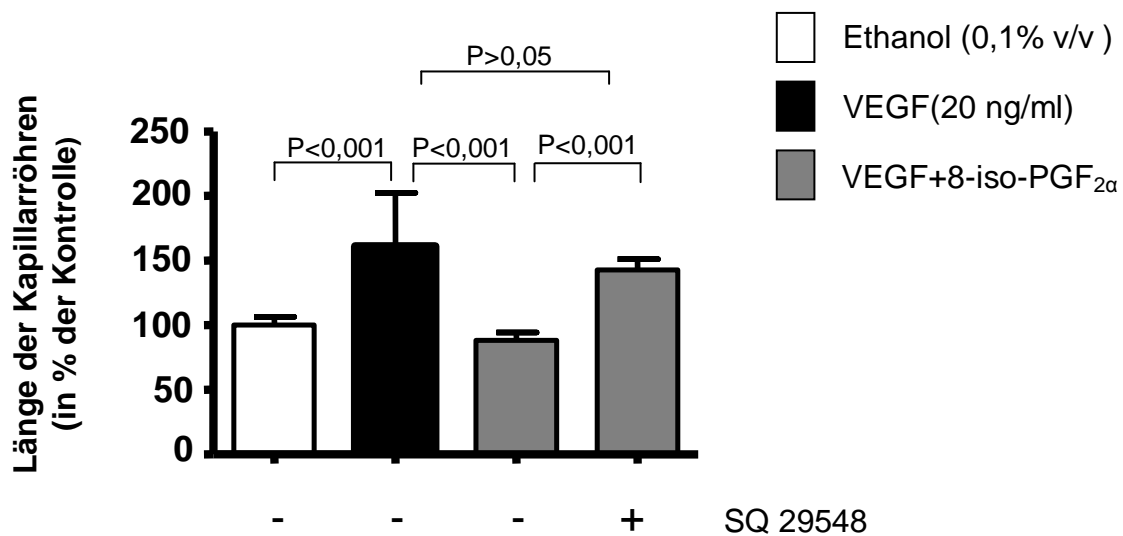


**Abb. 4.3** Analyse der Proteinexpression in HCAECs nach lentiviraler Transduktion mit scrambled-shRNA und shRNA gegen TBXA2-Rezeptor.

## 4.2 Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> nach lentiviralem Knockdown des TBXA2R

### 4.2.1 Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und dem TBXA2-Rezeptorantagonist SQ 29548 auf die VEGF-induzierte Kapillarröhrenbildung von unbehandelten HCAECs

Der Tube Formation Assay, der mit HCAECs durchgeführt wurde, zeigte eine signifikante Zunahme der Kapillarröhrenbildung durch VEGF verglichen zur Kontrolle. Die VEGF-induzierte Stimulation wurde durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> gehemmt ( $p < 0,001$ ). Der hemmende Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wurde durch den TBXA2-Rezeptor Antagonisten SQ 29548 aufgehoben.

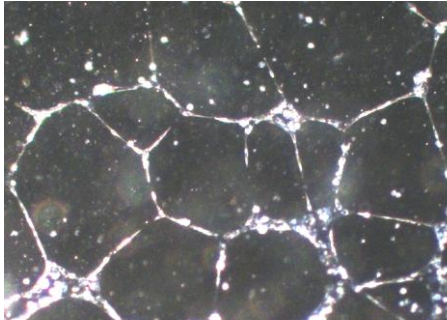


**Abb. 4.4** Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und dem TBXA2-Rezeptorantagonist SQ 29548 auf die VEGF-induzierte Kapillarröhrenbildung in HCAECs. Mittelwerte ±SD, n=8.

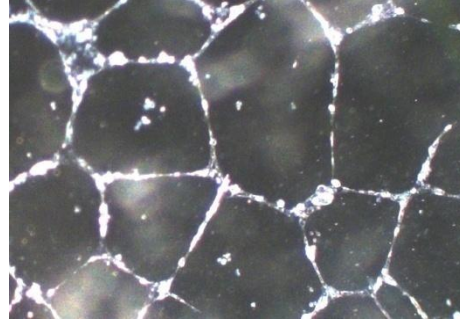
#### 4.2.2 Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Kapillarröhrenbildung nach lentiviraler Transduktion mit shRNA gegen den TBXA2R

Der Tube Formation Assay wurde mit HCAECs durchgeführt, die 48 Stunden mit der shRNA gegen den TBXA2-Rezeptor und der scrambled-shRNA transduziert waren. Die Kapillarröhren wurden 24 Stunden nach der Transduktion mit der 40x Vergrößerung des Zeiss Axiovision Mikroskops fotografiert. Abbildungen 4.5 und 4.6 zeigen die Kapillarröhren von shRNA transduzierten HCAECs mit einer durch VEGF induzierten Zunahme der Kapillarröhrenbildung. Die Kapillarröhrenbildung, der mit scrambled-shRNA transduzierten Zellen, wurde signifikant durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> gehemmt (Abbildungen 4.7 und 4.9). Dies zeigt, dass die scrambled-shRNA keinen Effekt auf den Signalweg des TBXA2R hatte, so dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> weiterhin über den TBXA2R seinen hemmenden Effekt auf die Kapillarröhrenbildung entfalten konnte. Nach Herunterregulation des TBXA2R konnte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> keinen Effekt mehr auf die Kapillarröhrenbildung

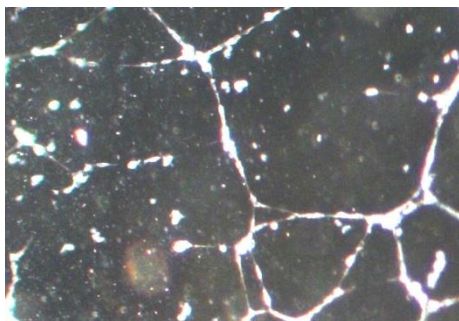
ausüben (Abbildungen 4.8 und 4.9). Dies zeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> seinen hemmenden Effekt auf die Kapillarröhrenbildung über eine Aktivierung des TBXA2-Rezeptors auslöst.



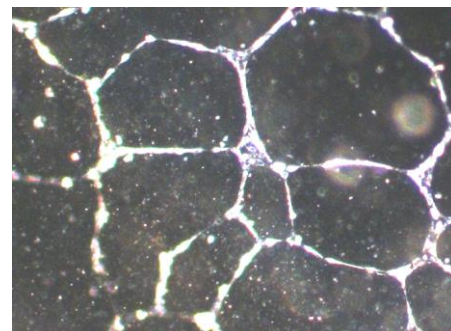
**Abb. 4.5** Transduzierte Zellen:  
Kontrolle



**Abb. 4.6** Transduzierte Zellen:  
mit VEGF

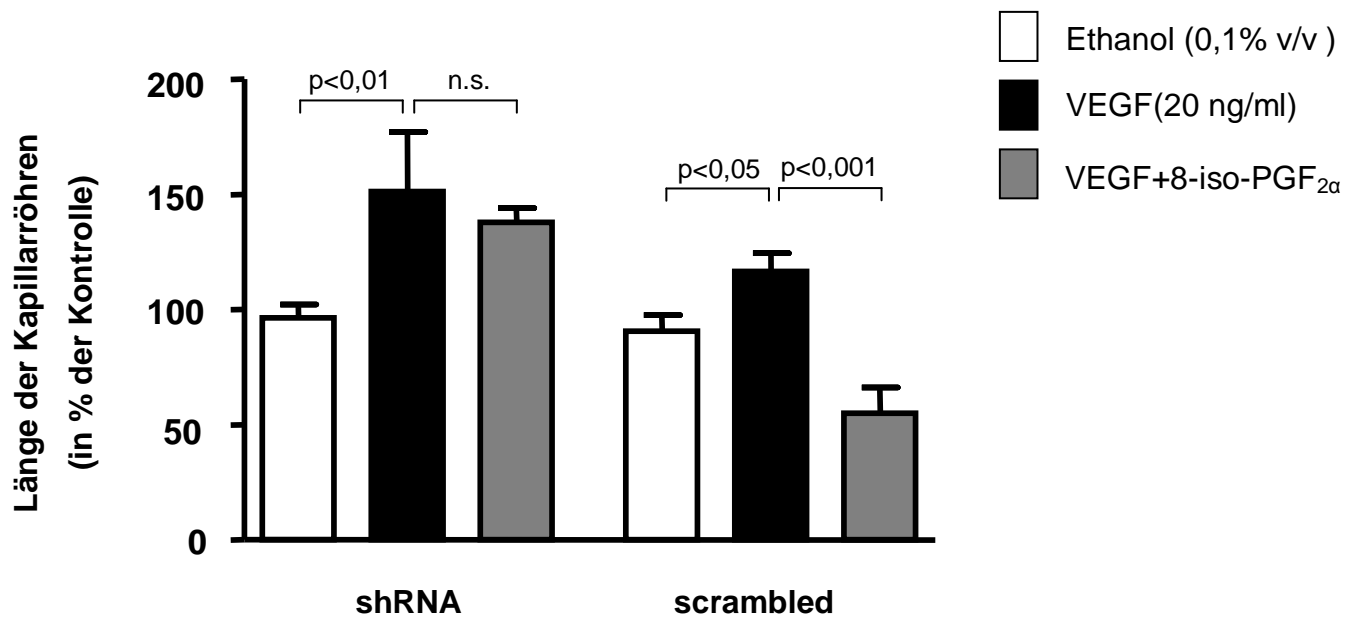


**Abb. 4.7** Unbehandelte Zellen:  
VEGF + 8-iso-PGF<sub>2α</sub>



**Abb. 4.8** Transduzierten Zellen:  
VEGF+8-iso-PGF<sub>2α</sub>

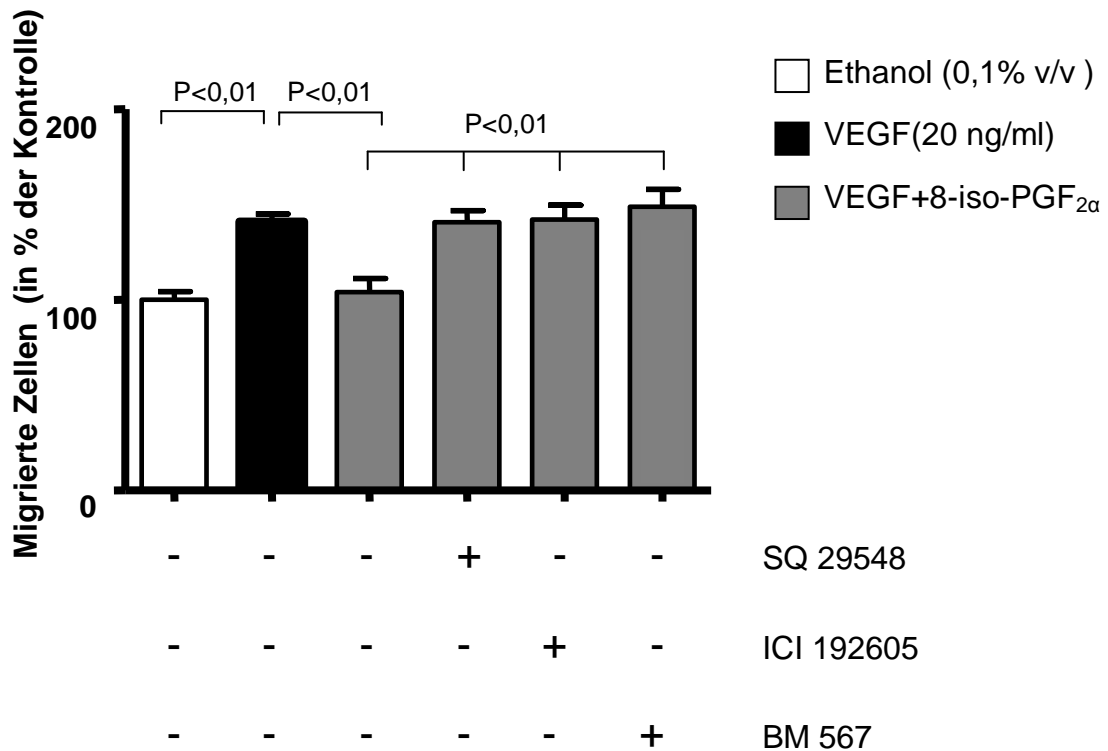




**Abb. 4.9** Effekt der shRNA induzierten Runterregulation des TBXA2-Rezeptors auf die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> induzierte Hemmung der Kapillarröhrenbildung. Mittelwerte ±SD, n=8.

#### 4.2.3 Effekte von TBXA2R-Antagonisten auf die durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub> reduzierte VEGF-induzierte Migration von HDMECs

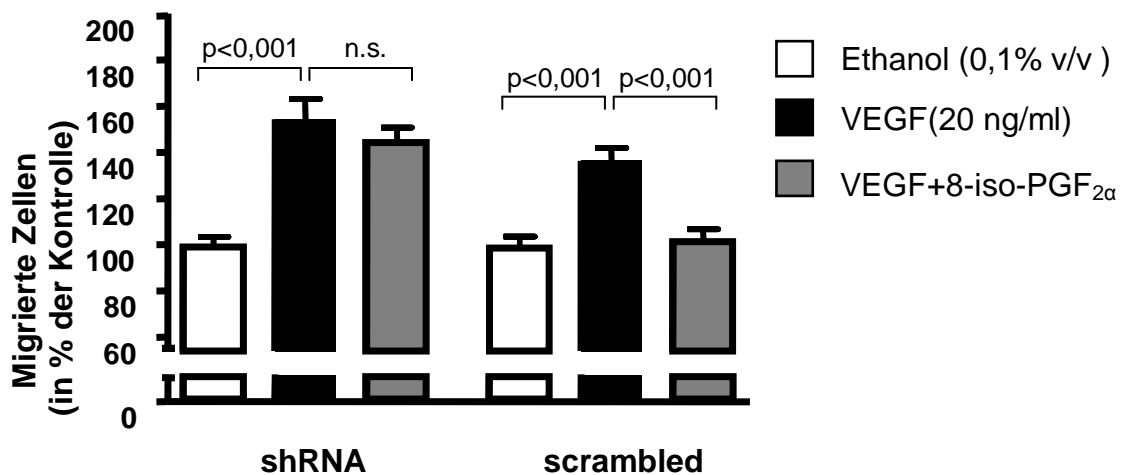
Der Migrationsassay, der mit HDMECs durchgeführt wurde, zeigte wie der Tube Formation Assay eine signifikante Zunahme ( $p < 0,01$ ) der Zellmigration durch VEGF, verglichen mit der Kontrolle. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> hemmt die VEGF-induzierte Stimulation ( $p < 0,01$ ). Der hemmende Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> wird durch den TBXA2-Rezeptor Antagonisten SQ 29548 vollständig aufgehoben, sowie durch zwei weitere TBXA2-Rezeptorantagonisten ICI 192605 und BM 567.



**Abb. 4.10** Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> und den TBXA2-Rezeptorantagonist SQ-29548, ICI 192605 und BM 567 auf die VEGF-induzierte Zellmigration von HDMECs. Mittelwerte ±SD, n=12.

#### 4.2.4 Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Migration nach lentiviraler Transduktion mit shRNA gegen den TBXA2R

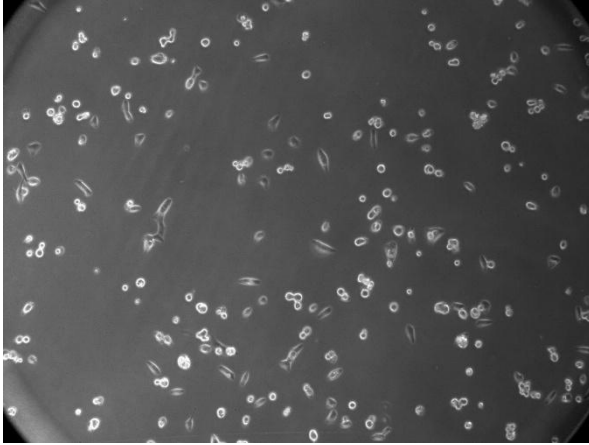
In den durchgeführten Migrations Assays konnte gezeigt werden, dass die shRNA-induzierte Herunterregulation der TBXA2R-Expression zu einer Antagonisierung des hemmenden Effekts von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Migration von HDMECs (p<0,001) führt. Dies zeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über eine Aktivierung des TBXA2R auf die Migration von HDMECs wirkt. In den mit der scrambled-shRNA transduzierten Zellen, zeigte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> weiterhin einen hemmenden Effekt auf die Zellmigration.



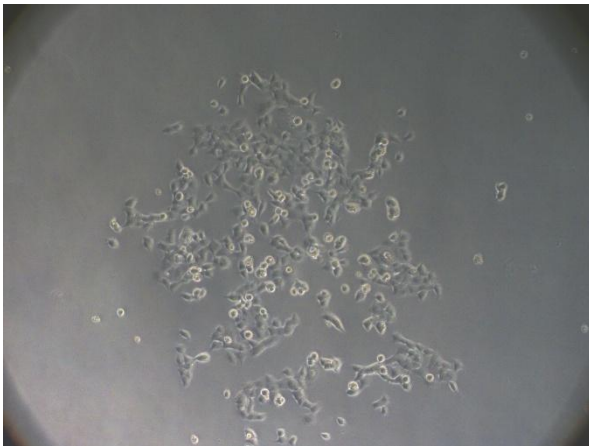
**Abb. 4.11** Effekt des shRNA induzierten Knockdowns auf die 8-iso-PGF<sub>2α</sub> induzierte Hemmung der Zellmigration von HDMECs. Mittelwerte  $\pm$ SD, n=12.

### 4.3 Generierung einer stabilen, den TBXA2-Rezeptorsubtyp $\alpha$ exprimierenden Zelllinie

Damit bei zukünftigen Experimenten der Effekt der Isoprostane auf den  $\alpha$ -Subtyp des TBXA<sub>2</sub>R untersucht werden kann, wurde eine Zelllinie generiert, die den Subtyp  $\alpha$  überexprimiert. Eine solche Zelllinie sollte zudem eine einfache Testmöglichkeit für subtypspezifische shRNA Sequenzen darstellen. Für die Generierung einer solchen Zelllinie wurden HEK 293 Zellen verwendet, die mit einem Plasmid zur Überexpression von Subtyp  $\alpha$  transfiziert wurden. 48 Stunden nach der Transfektion, wurde das geneticinhaltige Selektionsmedium (1 mg/ml) hinzugegeben. Nach drei Tagen war der größte Teil der Zellen verstorben (Abb. 4.12), die das Plasmid nicht stabil in das Genom integriert hatten. Nach insgesamt sieben Tagen waren einzelne Zellkolonien sichtbar (Abb. 4.13), die dem Selektionsdruck standhalten konnten.



**Abb. 4.12** Transfizierte HEK 293 Zellen nach dreitägiger Selektion mit Geneticin in einer Konzentration von 1 mg/ml.

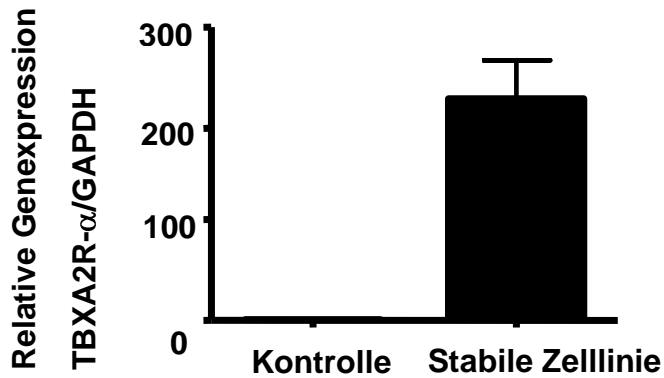


**Abb. 4.13** Transfizierte HEK 293 Zellkolonien nach siebentägiger Selektion mit Geneticin in einer Konzentration von 1 mg/ml.

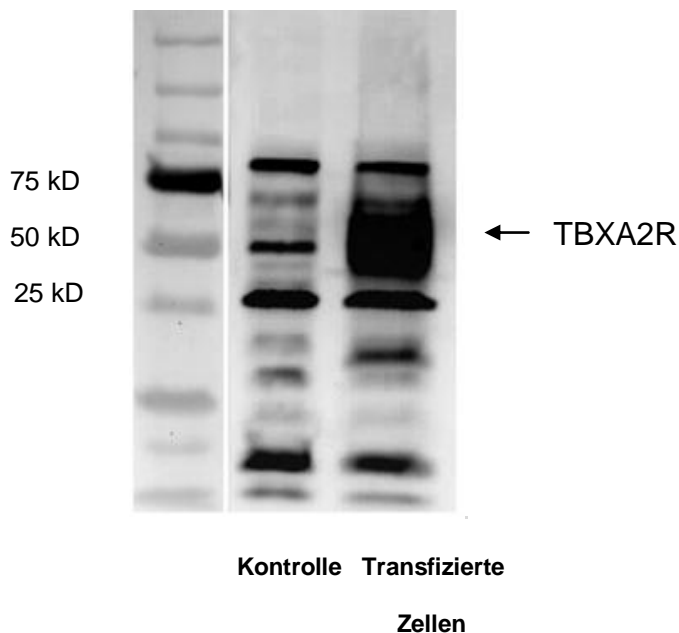
#### **4.3.1 Nachweis des $\alpha$ Subtypes des TBXA2-Rezeptorse auf mRNA- und Proteinebene**

Um die stabile Überexpression von TBXA2R-Subtyp  $\alpha$  in transfizierten HEK 293 Zellen nachzuweisen, wurden Realtime-PCR und Western Blot-Analysen 30 Tage nach der Transfektion durchgeführt. Die quantitative PCR zur Detektion der mRNA des TBXA2R erfolgte ohne eine Differenzierung zwischen den

Subtypen. Der spezifische Nachweis des TBXA2R- $\alpha$  erfolgte im Western Blot mit einem subtypenspezifischen Antikörper (Lifespan Biosciences, MI, USA). In der Realtime-PCR konnte eine eindeutige Überexpression gezeigt werden (Abb. 4.14), die sich auch auf Proteinebene im Western Blot bestätigen ließ (Abb. 4.15).



**Abb. 4.14** Nachweis der erfolgreichen Überexpression von Subtyp  $\alpha$  in transfizierten HEK 293 Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen in der Realtime-PCR, Mittelwerte  $\pm$ SD angegeben, n=9.



**4.15** Nachweis der Überexpression von Subtyp  $\alpha$  (Proteingröße von 50 kD) in HEK 293 Zellen im Western Blot.

## 5 Diskussion

Isoprostane sind endogen gebildete Produkte der Lipidperoxidation und haben sich als zuverlässige Marker zur Messung von oxidativem Stress *in vivo* erwiesen. In der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankungen wird eine aktive Rolle der Isoprostane angenommen. Bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit, wo es zu vermehrtem oxidativen Stress und Bildung von Isoprostanen kommt, spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle, um die Sauerstoffversorgung des hypoxischen Myokards zu gewährleisten. Wird die Angiogenese gehemmt, führt dies zu einer unausreichenden Versorgung des ischämischen Myokards mit konsekutivem Zelluntergang. Welchen Einfluss Isoprostane auf die Angiogenese von Endothelzellen haben und über welchen Rezeptor dieser vermittelt wird, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Dazu wurde untersucht, welchen Effekt 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf wichtige Schritte der VEGF-stimulierten Angiogenese hat und ob dieser über den TBXA2R vermittelt wird. Hierzu wurde die TBXA2R-Expression in humanen Endothelzellen mit Hilfe von shRNA herunterreguliert und die Effekte von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die VEGF-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung untersucht.

### 5.1.1 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die VEGF-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung *in vitro*

VEGF ist ein Wachstumsfaktor der an wichtigen Mechanismen der Angiogenese beteiligt ist (105). Im Serum von Patienten nach Myokardinfarkt ist seine Konzentration zwischen Tag 3 und 28 nach dem Infarkt erhöht, was die Neovaskularisation des Myokards fördert (105). Gleichzeitig entstehen im geschädigten Myokard, insbesondere während der Reperfusion nach Myokardinfarkt, größere Mengen an Isoprostanen (39), (106). Eine weitere wichtige vaskuläre

Quelle für Isoprostane sind vulnerable Plaques, so zeigen Patienten mit instabiler Angina sowohl in atherosklerotischen Plaques als auch im Blut erhöhte Isoprostankonzentrationen (107), (108). Wie die Abb. 4.4 zeigt, hat 8-iso-PGF<sub>2α</sub> einen hemmenden Effekt auf die VEGF-stimulierte Kapillarröhrenbildung von HCAECs. Dieser anti-angiogene Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> kann durch den TBXA2R-Antagonisten SQ 29548 aufgehoben werden (Abb. 4.4), was zeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> seinen inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese über den TBXA2R vermittelt. Weitere eingesetzte synthetische TBXA2R-Antagonisten wie ICI 192605 und BM 567 zeigten denselben Effekt auf die Migration von HDMECs wie SQ 29548 (Abb. 4.10), was den Signalweg über den TBXA2R bestätigt. Somit könnten Isoprostane wichtige Gegenspieler des VEGF bei der Angiogenese sein. Insbesondere bei Patienten mit instabiler Angina oder frischem Myokardinfarkt könnten Isoprostane die wichtige Rekapillarisation von minderperfundiertem Gewebe verhindern.

Ashton et al. haben gezeigt, dass IBOP und U46619, beides synthetische Liganden des TBXA2R, die Kapillarröhrenbildung von Endothelzellen aus humaner Nabelschnurvene (HUVEC) und die Migration über Stimulierung des TBXA2R hemmen (95). Damit wurde die Bedeutung einer TBXA2R-Aktivierung für die Hemmung der Angiogenese aufgezeigt. Die Experimente von Mueed et al. zeigten, dass der vasokonstriktorische Effekt von Isoprostanen auf die Arteria radialis, der für den Verschluss von arteriellen Bypässen von Bedeutung sein kann, über Stimulierung des TBXA2R vermittelt wird (109).

In Übereinstimmung mit diesen Kenntnissen hat die pharmakologische Antagonisierung des TBXA2R gezeigt, dass der anti-angiogene Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über den TBXA2R vermittelt wird. Die Gruppe von Brault et al. konnte zeigen, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> Thromboxan A<sub>2</sub>-abhängig zum Zelltod von mikrovaskulären endothelialen Zellen führt (110). Um herauszufinden, ob die Hemmung der VEGF-stimulierten Angiogenese aus einer durch 8-iso-PGF<sub>2α</sub>-induzierten Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> resultiert, wurde in unserer Arbeitsgruppe der spezifische Thromboxan A<sub>2</sub> Synthase Inhibitor Ozagrel im Migrationsassay eingesetzt, mit dem Ergebnis, dass keine Beeinträchtigung des inhibitorischen Effekts von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> festzustellen war (111). Daraus konnte geschlussfol-

gert werden, dass der inhibitorische Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> nicht Thromboxan A<sub>2</sub>-abhängig und ausschließlich auf 8-iso-PGF<sub>2α</sub> selber zurückzuführen ist.

### **5.1.2 Einfluss von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die VEGF-induzierte Migration und Kapillarröhrenbildung nach lentiviralem Knockdown des TBXA2R**

Neben der pharmakologischen Antagonisierung des TBXA2R, zeigte auch der lentivirale Knockdown des TBXA2R eine Aufhebung des inhibitorischen Effekts von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> auf die Kapillarröhrenbildung von HCAECs und die Migration von HDMECs (Abb. 4.5 und 4.11). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der anti-angiogene Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> über den TBXA2R vermittelt wird. In den Endothelzellen, die mit einer scrambled-Sequenz transduziert wurden, zeigte 8-iso-PGF<sub>2α</sub> im Vergleich zur Kontrolle einen ähnlich starken inhibitorischen Effekt auf die Kapillarröhrenbildung und die Migration. Dies zeigt, dass die Aufhebung des inhibitorischen Effekts von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in den mit einer shRNA-transduzierten Endothelzellen nicht auf unspezifische Effekte des lentiviralen Konstrukts zurückzuführen ist, sondern ausschließlich auf der Herunterregulation des Rezeptors beruht.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Ashton et al., Gao et al. und Pal et al., dass anti-angiogene Effekte auf Endothelzellen über den TBXA2R vermittelt werden (95), (104), (112). Im Gegensatz dazu beschreibt die Gruppe von Nie et al., dass die Aktivierung des TBXA2R einen pro-angiogenen Effekt hat (113). Sie zeigten, dass der TBXA2R-Agonist U-46619 zu einer Stimulierung der Migration von HUVEC führt, während höhere Konzentrationen von U-46619 eine Hemmung bewirken. Dieser biphasische Effekt auf die Migration von Endothelzellen wird auf die Desensitivierung des TBXA2R zurückgeführt, bei der es durch permanente Anwesenheit eines Liganden zu einem Abbruch des Signaltransduktionsweges kommt (114), (115).

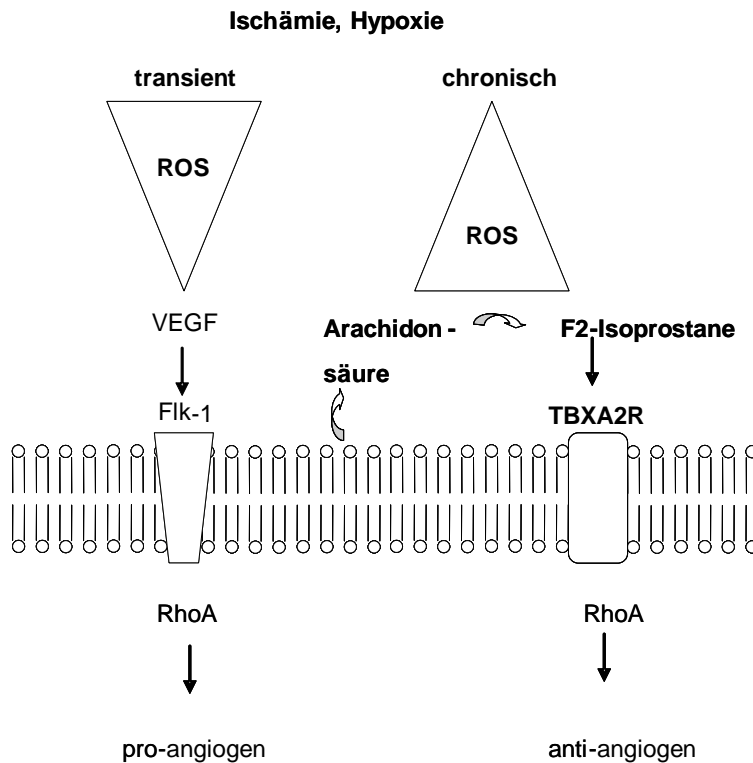
Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, ein endogen gebildetes Produkt der Lipidperoxidation, wichtige Schritte der Angiogenese über den



TBXA2R hemmt. Dieser Zusammenhang ist wichtig bei Krankheitszuständen, bei denen vermehrt oxidativer Stress und Isoprostane vorkommen, wie im ischämischen Myokard bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit. Im ischämischen Myokard fördert VEGF die Bildung von kollateralen Gefäßen zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung. Unsere Versuche haben gezeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die VEGF-stimulierte Migration und Kapillarröhrenbildung von Endothelzellen über den TBXA2R inhibiert. Darüberhinaus wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass 8-iso-PGF<sub>2α</sub> die VEGF-induzierte kardiale Gefäßneusprossung im *in vitro* Modell und auch die Angiogenese *in vivo* im Chorioallantois Membran Assay (CAM) inhibiert (111). Dies legt nahe, dass Isoprostane an der Rarefizierung von Gefäßen, zu der es bei Koronarer Herzkrankheit kommt, über eine Aktivierung des TBXA2R mitwirken.

### **5.1.3 Bedeutung des anti-angiogenen Signalwegs von Isoprostanen über den TBXA2R**

Kardiovaskuläre Erkrankungen und das Auftreten von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Arteriosklerose, Diabetes und Hypertonus sind mit oxidativem Stress und durch das Auftreten von ROS gekennzeichnet. ROS können sowohl pro- als auch anti-angiogen wirken. Ihre komplexe Rolle, die sie bei der Entstehung von kardiovaskulärem Schaden tragen, ist noch nicht vollständig verstanden. Angenommen wird, dass eine geringe ROS-Bildung, wie sie bei klinischen Zuständen wie einer transienten Ischämie und Hypoxie vorkommt, die Angiogenese stimuliert. Eine hohe ROS-Konzentration dagegen, wie sie bei fortgeschrittenen Stadien von kardiovaskulären Erkrankungen auftritt, führt zu oxidativem Stress, Apoptose und Zelluntergang (116). Hohe ROS-Konzentrationen führen zur Bildung von Isoprostanen, die wie gezeigt wichtige Schritte der Angiogenese hemmen. Unsere Ergebnisse belegen, dass der anti-angiogene Effekt von Isoprostanen über den TBXA2R vermittelt wird. Dieser über den TBXA2R-vermittelte Signalweg ist vermutlich ein wichtiger Mechanismus, über den ROS hemmend auf die Angiogenese wirken.



**Abb. 5.1** ROS-regulierte pro- und anti-angiogene Signalwege während kardiovaskulärer Erkrankungen (Sauer und Wartenberg, modifiziert (125)), FLK-1 (VEGFR-2).

Der TBXA2R gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Es ist bekannt, das  $G_{12/13}$  die GTPase Rho aktivieren kann, die für die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten verantwortlich ist (117), (118). Wikström et al. konnten zeigen, dass eine Aktivierung des TBXA2R zu einer persistierenden Aktivierung von Rho mit Depolymerisation von F-Aktin führt (119) und damit die Bildung von fokalen Adhäsionskontakten und die Zellmigration reduziert. In Übereinstimmung damit, haben Versuche in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die durch Isoprostane induzierte Hemmung der VEGF-stimulierten Migration und Kapillarröhrenbildung auf einer über den TBXA2R vermittelten persistierenden Rho-Aktivierung beruht (107). Demgegenüber führte VEGF nur zu einer transienten Aktivierung von Rho (111).

#### 5.1.4 Bedeutung der beiden TBXA2-Rezeptorsubtypen – Etablierung einer stabilen, den Subtyp $\alpha$ exprimierenden Zelllinie

Humane Endothelzellen exprimieren zwei Isoformen des TBXA2R, Rezeptorsubtyp  $\alpha$  und  $\beta$ . Die beiden Subtypen unterscheiden sich in ihrem Signaltransduktionsweg und weisen ein unterschiedliches Expressionsmuster in einer Vielzahl von Zell- und Gewebetypen auf (91). Die Bedeutung der beiden Isoformen für die VEGF-induzierte Migration und Angiogenese ist nicht ausreichend geklärt. Ergebnisse von Asthon et al. haben gezeigt, dass die Expression des Rezeptorsubtyps  $\beta$  für eine Reduktion der VEGF-stimulierten Angiogenese durch TBXA2R-Liganden notwendig ist (95). Ergebnisse aus transfizierten Humanen Endothelzellen aus der *Vena umbilicalis* (HUVEC), die entweder den Subtyp  $\alpha$  oder  $\beta$  überexprimierten, zeigen, dass für eine durch den TBXA2R-Liganden IBOP vermittelte Hemmung der Migration und Kapillarröhrenbildung die Expression von Subtyp  $\beta$ , aber nicht von  $\alpha$  erforderlich war. Um herauszufinden welcher Subtyp für den Signalweg von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  verantwortlich ist, wurde eine den Rezeptorsubtyp  $\alpha$  überexprimierende Zelllinie generiert, mit dem Ziel eine geeignete shRNA-Sequenz zu finden, die spezifisch gegen den Subtyp  $\alpha$  gerichtet ist. Die erfolgreiche Überexpression wurde mit Hilfe der Realtime-PCR und Western Blots bestätigt. Das Ergebnis der Realtime PCR zeigte eine deutliche Überexpression des Rezeptorsubtyps  $\alpha$  um 224 % im Vergleich zu nicht-transfizierten HEK Zellen (Abb. 4.14), was sich in einem deutlichen Signal im Western Blot bei einer Proteingröße von 50 kD widerspiegelt (Abb. 4.15). Die Überexpression des Subtyp  $\beta$  ist in weiteren Experimenten geplant. Entsprechend des durchgeführten unspezifischen lentiviralen Knock-downs des TBXA2R, soll mit einer geeigneten shRNA in Zukunft nur der Rezeptorsubtyp  $\alpha$  oder  $\beta$  herunterreguliert werden. Würde sich in Übereinstimmung mit den Daten von Asthon et al., der Rezeptorsubtyp  $\beta$  für den Wirkungsweg von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  auf die Angiogenese zeigen, könnte ein spezifischer Rezeptorsubtyp-Antagonist die Isoprostan-induzierte Hemmung der Angiogenese blockieren und damit die anti-angiogene Wirkung von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  aufheben, was

therapeutische Bedeutung hätte, beispielsweise bei der Behandlung der myokardialen Ischämie.

Unsere Arbeitsgruppe und andere konnten zeigen, dass Isoprostane neben der Hemmung der Angiogenese in der Lage sind, eine Induktion der Apoptose von Endothelzellen zu bewirken (120). Apoptose von Endothelzellen ist ein weiterer Pathomechanismus der Gefäßrarefizierung (104). Ergebnisse von Ashton et al. haben gezeigt, dass eine Stimulierung der beiden TBXA2R-Subtypen durch den TBXA2R-Liganden IBOP in beiden Fällen zu einer Apoptose von Endothelzellen führt, allerdings unterscheiden sich die beiden Subtypen in ihrem Signaltransduktionsweg (121). Beide Subtypen beeinflussen den cAMP-Spiegel. Rezeptorsubtyp  $\alpha$  ist mit einem  $G_s$ -Protein gekoppelt und führt zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels, während Rezeptorsubtyp  $\beta$  über ein  $G_i$ -Protein zu einer Abnahme führt. Die Ergebnisse von Ashton et al. lassen annehmen, dass die Veränderung des cAMP-Spiegels bei Rezeptorsubtyp  $\beta$  eine Rolle für die Induktion der Apoptose, jedoch nicht bei Rezeptorsubtyp  $\alpha$ , spielt. Basierend auf diesem Wissen, könnten in Zukunft lentiviral-transduzierte HDMECs oder HCAECs mit herunterregulierter Expression des Rezeptorsubtyp  $\alpha$  genutzt werden, um herauszufinden, ob die Isoprostan-induzierte Apoptose über beide Subtypen vermittelt wird und welche Signalwege dafür genutzt werden.

### **5.1.5 Therapeutische Bedeutung des über den TBXA2R-vermittelten anti-angiogenen Effekt von Isoprostanen**

In dieser Arbeit konnte durch lentiviralen Knockdown des TBXA2R gezeigt werden, dass der anti-angiogene Effekt von 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  auf die VEGF-induzierte Kapillarröhrenbildung und Migration über eine Aktivierung des TBXA2R vermittelt wird. Dies könnte von wichtiger klinischer Bedeutung für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sein. Hier kommt es bei fortgeschrittenem Krankheitsstadium durch vermehrten oxidativen Stress zur Bildung von bioreaktiven Isoprostanen, die einen hemmenden Effekt auf die Revaskularisierung von

hypoxischem Gewebe ausüben und damit die kardiovaskuläre Regeneration reduzieren. Isoprostane akkumulieren im hypoxischen Myokard und führen zu einer Rarefizierung von vaskulären Strukturen, die zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung benötigt werden.

Ziel in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen sollte somit eine Förderung der Revaskularisierung sein. Hier stellt der TBXA<sub>2</sub>R einen wichtigen therapeutischen Angriffspunkt dar, um den über ihn vermittelten anti-angiogenen Effekt von Isoprostanen aufzuheben und eine Regeneration des myokardialen Gewebes zu ermöglichen. Der synthetische TBXA<sub>2</sub>R-Antagonist SQ 29548 konnte den anti-angiogenen Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> aufheben, so dass eine spezifische Antagonisierung des TBXA<sub>2</sub>R eine geeignete Möglichkeit zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankung darstellen würde. Einen weitverbreiteten Einsatz zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen findet Acetylsalicylsäure (ASS), welches über Hemmung der COX zu einer verminderten Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese und TBXA<sub>2</sub>R-Aktivierung führt. In der Behandlung und Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen hat sich ASS als effizient erwiesen. Da ein spezifischer TBXA<sub>2</sub>R-Antagonist sowohl die Anlagerung von Thromboxan A<sub>2</sub> als auch von Isoprostanen blockiert, müsste dieser potentiell effektiver in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen sein. Er würde gleichzeitig pro-angiogen und anti-thrombogen wirken. Ein spezifischer TBXA<sub>2</sub>R-Antagonist hätte gegenüber ASS keine oder zumindest geringere gastrointestinale Nebenwirkungen. Ridogrel ist ein kombinierter Thromboxan A<sub>2</sub> Synthase-Inhibitor und TBXA<sub>2</sub>R-Antagonist. Hinsichtlich seiner potentiellen pro-angiogenen Wirkung gibt es keine Studien, so dass es hier interessant wäre herauszufinden, ob der anti-angiogene Effekt von Isoprostanen aufgehoben werden würde und ob sich sein Einsatz zur Förderung der Revaskularisierung bei kardiovaskulären Erkrankungen eignet.

Hinsichtlich der Existenz der beiden Isoformen des TBXA<sub>2</sub>R wäre eine weitere Möglichkeit der Behandlung, die isolierte Antagonisierung derjenigen Isoform, die in die Angiogenese involviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptorsubtyp β für eine Hemmung der VEGF-induzierten Migration benötigt wird, nicht jedoch Rezeptorsubtyp α. Würde sich in Übereinstimmung damit

zeigen, dass der anti-angiogene Effekt von 8-iso-PGF<sub>2α</sub> nur über einen der beiden Isoformen vermittelt wird, könnte ein Subtyp-spezifischer Antagonist eingesetzt werden. Eine Antagonisierung des Rezeptorsubtyps β hätte den Vorteil, dass die Hämostase nicht beeinträchtigt würde. Ist jedoch eine Thrombozytenaggregationshemmung erforderlich, würde sich der Einsatz eines β-selektiven Antagonisten nicht eignen, da auf Thrombozyten nur der Rezeptorsubtyp α zu finden ist (122).

## 6 Zusammenfassung

Isoprostane werden durch radikalische Lipidperoxidation der Arachidonsäure unabhängig von der Cyclooxygenase (COX) gebildet. Die Isoprostane haben sich als zuverlässige Marker des oxidativen Stresses erwiesen, wobei ein Isoprostan, 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, ein unabhängiger Risikomarker für die koronare Herzkrankheit (KHK) ist. Die Isoprostane sind strukturell den Prostaglandinen ähnlich und zeigen wie diese biologische Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Isoprostane die VEGF-stimulierte Migration und Kapillarröhrenbildung von verschiedenen humanen Endothelzellen hemmen. Durch spezifische Antagonisten des Thromboxanrezeptors (TBXA<sub>2</sub>R) und durch *short hairpin*-RNA induzierten Knockdown des TBXA<sub>2</sub>R ließen sich diese biologischen Effekte der Isoprostane aufheben.

Dies bedeutet, dass Isoprostane über eine Aktivierung des TBXA<sub>2</sub>R einen inhibitorischen Effekt auf wichtige Schritte der Angiogenese ausüben. Durch die Kenntnis des Rezeptors, über den Isoprostane inhibitorisch auf die Angiogenese wirken, eröffnet sich die Möglichkeit, durch Blockierung des Rezeptors, die antiangiogene Wirkung aufzuheben und so eine Revaskularisierung zu stimulieren. Dies ist für Krankheitszustände, wie die KHK, wo es zu vermehrtem Auftreten von oxidativem Stress und vermehrter Bildung von Isoprostanen kommt, von großer klinischer Bedeutung.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

### Vorsätze für SI-Einheiten

k kilo ( $10^3$ )

c centi ( $10^{-2}$ )

m milli ( $10^{-3}$ )

$\mu$  mikro ( $10^{-6}$ )

n nano ( $10^{-9}$ )

p pico ( $10^{-12}$ )

A Ampere

ASS Acetylsalicylsäure

Amp Ampicillin

BSA Bovines Serum Albumin

bp Basenpaare

°C Grad Celsius

CAM Chorioallantois Membran

cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat

cDNA copy Desoxyribonucleinsäure

COX Cyclooxygenase

COPD chronische obstruktive Lungenerkrankung

CMV Zytomegalie Virus

cPPT zentraler Polypurin- Trakt

C<sub>T</sub> Schwellenzyklus



DAG	Diacylglycerin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EIA	Enzymimmunoassay
env	Gen der Hüllproteine (envelope)
ERK	extra-regulated protein kinase
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,8 m/s <sup>2</sup> )
gag	gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatograph- Massenspektrometer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCAEC	Humane koronare arterielle Endothelzelle
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzelle
HEK	Humane embryonale Nierenzelle
HIV	Humane Immundefizienzvirus
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen Endothelzelle
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
Ig	Immunglobulin
IU	Internationale Einheiten

KHK	Koronare Herzkrankheit
LTR	Long Terminal Repeat
LB-Medium	Luria Bertani Medium
l	Liter
m	meter
M	Molar
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
miRNA	Micro Ribonucleinsäure
n	Anzahl
n.s	nicht signifikant
Neo	Neomycin
OD	optische Dichte
%	Prozent
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pol	Polymerase
Puro	Puromycin
rev	regulator of expression of the virion
RIA	Radioimmunoassay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	Ribonucleinsäure Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	Ribosomale Ribonucleinsäure

RRE	rev responsive element
siRNA	small interfering RNA
shRNA	short hairpin RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
TBXA2R	Thromboxanrezeptor
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TAE	Tris-Acetat Ethylendiamintetraacetat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumengehalt in Prozent
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus

## 8 Literaturverzeichnis

1. Heinecke JW. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 1998;141:1-15.
2. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:1815-1826.
3. Devaraj S, Hirany SV, Burk RF, Jialal I. Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F(2)-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clin. Chem.* 2001;47:1974-1979.
4. Reilly MP, Praticò D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:2822-2828.
5. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:434-439.
6. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 1990;9:235-243.
7. Morrow JD. The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab. Rev.* 2000;32:377-385.
8. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 1995;611-31.
9. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997;82:291-295.
10. Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.* 1993;32:71-110.

11. Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 1993;290:297-308.
12. Nugteren DH, Van Dorp DA, Bergström S, Hamberg M, Samuelsson B. Absolute configuration of the prostaglandins. *Nature* 1966;212:38-39.
13. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87:9383-9387.
14. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89:10721-10725.
15. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid Res.* 1997;36:1-21.
16. Chen Y, Morrow JD, Roberts LJ. Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J. Biol. Chem.* 1999;274:10863-10868.
17. Morrow JD, Awad JA, Wu A, Zackert WE, Daniel VC, Roberts LJ. Nonenzymatic free radical-catalyzed generation of thromboxane-like compounds (isothromboxanes) in vivo. *J. Biol. Chem.* 1996;271:23185-23190.
18. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, Dettbarn WD, Morrow JD. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J. Biol. Chem.* 1998;273:13605-13612.
19. Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Anggård E, Halliwell B. F4-isoprostanes: a novel class of prostanoids formed during peroxidation of docosahexaenoic acid (DHA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;242:338-344.
20. Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nat Protoc* 2007;2:221-226.

21. Praticò D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999;147:1-10.
22. Richelle M, Turini ME, Guidoux R, Tavazzi I, Métairon S, Fay LB. Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett.* 1999;459:259-262.
23. Roberts LJ, Moore KP, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-iso-prostaglandin F2alpha in humans. *J. Biol. Chem.* 1996;271:20617-20620.
24. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2000;28:505-513.
25. Schwedhelm E, Böger RH. Application of gas chromatography-mass spectrometry for analysis of isoprostanes: their role in cardiovascular disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003;41:1552-1561.
26. Bessard J, Cracowski JL, Stanke-Labesque F, Bessard G. Determination of isoprostaglandin F2alpha type III in human urine by gas chromatography-electronic impact mass spectrometry. Comparison with enzyme immunoassay. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2001;754:333-343.
27. Proudfoot J, Barden A, Mori TA, Burke V, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB. Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1999;272:209-215.
28. Wang Z, Ciabattoni G, Créminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995;275:94-100.
29. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, Cipollone F, Bon GB, Ciabattoni G, Patrono C. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:3230-3235.
30. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:1198-1203.

31. Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brümmer J, Gutzki F, Berger J, Frölich JC, Böger RH. Urinary 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* 2004;109:843-848.
32. Montine TJ, Sidell KR, Crews BC, Markesbery WR, Marnett LJ, Roberts LJ, Morrow JD. Elevated CSF prostaglandin E<sub>2</sub> levels in patients with probable AD. *Neurology* 1999;53:1495-1498.
33. Praticò D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF<sub>2</sub>α-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann. Neurol.* 2000;48:809-812.
34. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999;160:216-220.
35. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Corradi M, van Rensen L, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55:205-209.
36. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000;162:1175-1177.
37. Praticò D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, Maclouf J, Violi F, FitzGerald GA. Localization of distinct F<sub>2</sub>-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2028-2034.
38. Reilly MP, Delanty N, Roy L, Rokach J, Callaghan PO, Crean P, Lawson JA, FitzGerald GA. Increased formation of the isoprostanes IPF<sub>2</sub>α-I and 8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub>α in acute coronary angioplasty: evidence for oxidant stress during coronary reperfusion in humans. *Circulation* 1997;96:3314-3320.

39. Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Lawson JA, McCarthy JF, Wood AE, Ohnishi ST, Fitzgerald DJ, FitzGerald GA. 8-epi PGF<sub>2</sub> alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation* 1997;95:2492-2499.
40. Vassalle C, Botto N, Andreassi MG, Berti S, Biagini A. Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coron. Artery Dis.* 2003;14:213-218.
41. Cracowski JL, Tremel F, Marpeau C, Baguet JP, Stanke-Labesque F, Mallion JM, Bessard G. Increased formation of F(2)-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart* 2000;84:439-440.
42. Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Morganti A, Patrono C. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002;106:2800-2805.
43. Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F<sub>2</sub>alpha-III, an index of oxidant stress. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158:1709-1714.
44. Montuschi P, Ciabattini G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, Barnes PJ. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998;158:1524-1527.
45. Carpenter CT, Price PV, Christman BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest* 1998;114:1653-1659.
46. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:1198-1203.
47. Reilly MP, Praticò D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA. Increased formation of distinct F<sub>2</sub> isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:2822-2828.



48. Davì G, Di Minno G, Coppola A, Andria G, Cerbone AM, Madonna P, Tufano A, Falco A, Marchesani P, Ciabattini G, Patrono C. Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. *Circulation* 2001;104:1124-1128.
49. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, Tamai H, Takeshita A. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:438-442.
50. Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33:620-626.
51. Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkowicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, Zackert WE, Roberts LJ, Morrow JD. Cerebrospinal fluid F2-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology* 1999;52:1104-1105.
52. Mattsson N, Haghighi S, Andersen O, Yao Y, Rosengren L, Blennow K, Praticò D, Zetterberg H. Elevated cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels indicating oxidative stress in healthy siblings of multiple sclerosis patients. *Neurosci. Lett.* 2007;414:233-236.
53. Greco A, Minghetti L, Levi G. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 2000;25:1357-1364.
54. Ikizler TA, Morrow JD, Roberts LJ, Evanson JA, Becker B, Hakim RM, Shyr Y, Himmelfarb J. Plasma F2-isoprostane levels are elevated in chronic hemodialysis patients. *Clin. Nephrol.* 2002;58:190-197.
55. Holt S, Reeder B, Wilson M, Harvey S, Morrow JD, Roberts LJ, Moore K. Increased lipid peroxidation in patients with rhabdomyolysis. *Lancet* 1999;353:1241.
56. Meagher EA, Barry OP, Burke A, Lucey MR, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J. Clin. Invest.* 1999;104:805-813.

57. Pratico D, Iuliano L, Basili S, Ferro D, Camastra C, Cordova C, FitzGerald GA, Violi F. Enhanced lipid peroxidation in hepatic cirrhosis. *J. Investig. Med.* 1998;46:51-57.
58. Morrow JD, Moore KP, Awad JA, Ravenscraft MD, Marini G, Badr KF, Williams R, Roberts LJ. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *J Lipid Mediat* 1993;6:417-420.
59. Aboutwerat A, Pemberton PW, Smith A, Burrows PC, McMahon RFT, Jain SK, Warnes TW. Oxidant stress is a significant feature of primary biliary cirrhosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;1637:142-150.
60. Burke A, FitzGerald GA, Lucey MR. A prospective analysis of oxidative stress and liver transplantation. *Transplantation* 2002;74:217-221.
61. Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1146-1150.
62. Cracowski J, Bonaz B, Bessard G, Bessard J, Anglade C, Fournet J. Increased urinary F2-isoprostanes in patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2002;97:99-103.
63. Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *Br. J. Pharmacol.* 1996;119:1276-1280.
64. Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hasséssian H, Asselin P, Lachapelle P, Almazan G, Varma DR, Morrow JD, Roberts LJ, Chemtob S. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F2 alpha on retinal vessels. *Am. J. Physiol.* 1998;274:R1406-1416.
65. Marley R, Harry D, Anand R, Fernando B, Davies S, Moore K. 8-Isoprostaglandin F2 alpha, a product of lipid peroxidation, increases portal pressure in normal and cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1997;112:208-213.
66. Hou X, Gobeil F, Peri K, Speranza G, Marrache AM, Lachapelle P, Roberts J, Varma DR, Chemtob S, Ellis EF. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke* 2000;31:516-525.

67. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J. Clin. Invest.* 1992;90:136-141.
68. Hou X, Roberts LJ, Taber DF, Morrow JD, Kanai K, Gobeil F, Beauchamp MH, Bernier SG, Lepage G, Varma DR, Chemtob S. 2,3-Dinor-5,6-dihydro-15-F(2t)-isoprostane: a bioactive prostanoid metabolite. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001;281:R391-400.
69. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:2309-2315.
70. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J. Clin. Invest.* 1992;90:136-141.
71. Fontana L, Giagulli C, Cominacini L, Pasini AF, Minuz P, Lechi A, Sala A, Laudanna C. Beta2 integrin-dependent neutrophil adhesion induced by minimally modified low-density lipoproteins is mainly mediated by F2-isoprostanes. *Circulation* 2002;106:2434-2441.
72. Leitinger N, Huber J, Rizza C, Mechtcheriakova D, Bochkov V, Koshelnick Y, Berliner JA, Binder BR. The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *FASEB J.* 2001;15:1254-1256.
73. Tang M, Cyrus T, Yao Y, Vocun L, Praticò D. Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F2alpha-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2005;112:2867-2874.
74. Longmire AW, Roberts LJ, Morrow JD. Actions of the E2-isoprostane, 8-ISO-PGE2, on the platelet thromboxane/endoperoxide receptor in humans and rats: additional evidence for the existence of a unique isoprostane receptor. *Prostaglandins* 1994;48:247-256.

75. Fukunaga M, Yura T, Grygorczyk R, Badr KF. Evidence for the distinct nature of F2-isoprostane receptors from those of thromboxane A2. *Am. J. Physiol.* 1997;272:F477-483.
76. Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ. The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 1992;44:155-163.
77. Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF2 alpha, in rabbit lung in situ. *Am. J. Physiol.* 1992;263:H660-663.
78. Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA. Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2alpha)-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo. *Circulation* 2000;101:2833-2840.
79. Dorn GW, Becker MW, Davis MG. Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 1992;267:24897-24905.
80. Hunt JA, Merritt JE, MacDermot J, Keen M. Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 1992;43:1747-1752.
81. Oates JA, FitzGerald GA, Branch RA, Jackson EK, Knapp HR, Roberts LJ. Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A2 formation (2). *N. Engl. J. Med.* 1988;319:761-767.
82. Neri Serneri GG, Modesti PA, Fortini A, Abbate R, Lombardi A, Gensini GF. Reduction in prostacyclin platelet receptors in active spontaneous angina. *Lancet* 1984;2:838-841.
83. Kahn NN, Mueller HS, Sinha AK. Impaired prostaglandin E1/I2 receptor activity of human blood platelets in acute ischemic heart disease. *Circ. Res.* 1990;66:932-940.
84. Fitzgerald DJ, Rocki W, Murray R, Mayo G, FitzGerald GA. Thromboxane A2 synthesis in pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1990;335:751-754.

85. Michel F, Silvestre J, Waeckel L, Corda S, Verbeuren T, Vilaine JP, Clergue M, Duriez M, Levy BI. Thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor activation mediates angiotensin II-induced postischemic neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26:488-493.
86. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV. Thromboxane A<sub>2</sub> regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;267:245-251.
87. Namba T, Sugimoto Y, Hirata M, Hayashi Y, Honda A, Watabe A, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor: cDNA cloning, expression and northern blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;184:1197-1203.
88. Nüsing RM, Hirata M, Kakizuka A, Eki T, Ozawa K, Narumiya S. Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor gene. *J. Biol. Chem.* 1993;268:25253-25259.
89. Hirata M, Hayashi Y, Ushikubi F, Yokota Y, Kageyama R, Nakanishi S, Narumiya S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *Nature* 1991;349:617-620.
90. Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC, Ware JA. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:7011.
91. Miggin SM, Kinsella BT. Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor (TP) alpha and beta isoforms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998;1425:543-559.
92. Turek JW, Halmos T, Sullivan NL, Antonakis K, Le Breton GC. Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A<sub>2</sub> receptor protein. *J. Biol. Chem.* 2002;277:16791-16797.
93. Rocca B, Loeb AL, Strauss JF, Vezza R, Habib A, Li H, FitzGerald GA. Directed vascular expression of the thromboxane A<sub>2</sub> receptor results in intrauterine growth retardation. *Nat. Med.* 2000;6:219-221.

94. Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 2008;118:18-35.
95. Ashton AW, Ware JA. Thromboxane A2 receptor signaling inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation and migration. *Circ. Res.* 2004;95:372-379.
96. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:23-36.
97. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1994;68:510-516.
98. Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* 1997;71:6641-6649.
99. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;272:263-267.
100. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:8033-8037.
101. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* 1997;15:871-875.
102. Fukuda K, Davies SS, Nakajima T, Ong B, Kupersmidt S, Fessel J, Amarnath V, Anderson ME, Boyden PA, Viswanathan PC, Roberts LJ, Balser JR. Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circ. Res.* 2005;97:1262-1269.
103. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ. Res.* 1996;79:911-919.

104. Gao Y, Yokota R, Tang S, Ashton AW, Ware JA. Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). *Circ. Res.* 2000;87:739-745.
105. Ferrara N, Bunting S. Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1996;5:35-44.
106. Kijima Y, Hashimura K, Matsu-ura Y, Kato Y, Yasuda T, Ueda T, Orita Y, Fukunaga M. Transcardiac 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) generation from acute myocardial infarction heart: insight into abrupt reperfusion and oxidant stress. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2001;64:161-166.
107. Nishibe A, Kijima Y, Fukunaga M, Nishiwaki N, Sakai T, Nakagawa Y, Hata T. Increased isoprostane content in coronary plaques obtained from vulnerable patients. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2008;78:257-263.
108. Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davì G, Cuccurullo F, Patrono C. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 2000;102:1007-1013.
109. Mueed I, Tazzeo T, Liu C, Pertens E, Zhang Y, Cybulski I, Semelhago L, Noora J, Lamy A, Teoh K, Chu V, Janssen LJ. Isoprostanes constrict human radial artery by stimulation of thromboxane receptors, Ca<sup>2+</sup> release, and RhoA activation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008;135:131-138.
110. Brault S, Martinez-Bermudez AK, Marrache AM, Gobeil F, Hou X, Beauchamp M, Quiniou C, Almazan G, Lachance C, Roberts J, Varma DR, Chemtob S. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Isoprostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury. *Stroke* 2003;34:776-782.
111. Benndorf RA, Schwedhelm E, Gnann A, Taheri R, Kom G, Didié M, Steenpass A, Ergün S, Böger RH. Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ. Res.* 2008;103:1037-1046.

112. Pal S, Wu J, Murray JK, Gellman SH, Wozniak MA, Keely PJ, Boyer ME, Gomez TM, Hasso SM, Fallon JF, Bresnick EH. An antiangiogenic neurokinin-B/thromboxane A2 regulatory axis. *J. Cell Biol.* 2006;174:1047-1058.
113. Nie D, Guo Y, Yang D, Tang Y, Chen Y, Wang M, Zacharek A, Qiao Y, Che M, Honn KV. Thromboxane A2 receptors in prostate carcinoma: expression and its role in regulating cell motility via small GTPase Rho. *Cancer Res.* 2008;68:115-121.
114. Kelley-Hickie LP, O'Keeffe MB, Reid HM, Kinsella BT. Homologous desensitization of signalling by the alpha (alpha) isoform of the human thromboxane A2 receptor: a specific role for nitric oxide signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1773:970-989.
115. Kelley-Hickie LP, Kinsella BT. Homologous desensitization of signalling by the beta (beta) isoform of the human thromboxane A2 receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006;1761:1114-1131.
116. Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik A. NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 2009;11:791-810.
117. Suzuki N, Hajicek N, Kozasa T. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals* 2009;17:55-70.
118. Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J. Cell. Sci.* 2007;120:3491-3499.
119. Wikström K, Kavanagh DJ, Reid HM, Kinsella BT. Differential regulation of RhoA-mediated signaling by the TPalpha and TPbeta isoforms of the human thromboxane A2 receptor: independent modulation of TPalpha signaling by prostacyclin and nitric oxide. *Cell. Signal.* 2008;20:1497-1512.
120. Simoni J, Simoni G, Griswold JA, Moeller JF, Tsikouris JP, Khanna A, Roongsritong C, Wesson DE. Role of free hemoglobin in 8-iso prostaglandin F2-alpha synthesis in chronic renal failure and its impact on CD163-Hb scavenger receptor and on coronary artery endothelium. *ASAIO J.* 2006;52:652-661.
121. Gao Y, Yokota R, Tang S, Ashton AW, Ware JA. Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). *Circ. Res.* 2000;87:739-745.



122. Habib A, FitzGerald GA, Maclouf J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J. Biol. Chem.* 1999;274:2645-2651.
123. Kinsella BT. Thromboxane A<sub>2</sub> signalling in humans: a 'tail' of two receptors. *Biochem Soc Trans.* 2001;29:641-654.
124. Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation.* 1998;97:1536-1539.
125. Sauer H, Wartenberg M. Circulating isoprostanes: gate keepers in the route from oxidative stress to vascular dysfunction. *Circ Res.* 2008;103:907-909.



## 9 Publikationen

Benndorf RA, Schwedhelm E, Gnann A, Taheri R, Kom G, Didié M, Steenpass A, Ergün S, Böger RH. Isoprostanen inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis. *Circ. Res.* 2008;103:1037-1046

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

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

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

Unterschrift: .....

## 11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. T. Eschenhagen für die Möglichkeit, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie diese Doktorarbeit durchzuführen.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Böger für die Aufnahme in seinen Arbeitsbereich und die umfassende Art der Betreuung.

Des Weiteren danke ich besonders Herrn Dr. Edzard Schwedhelm für die Hilfe bei der Planung der Experimente und für die stets motivierenden und hilfreichen Gespräche.

Frau Dorothee Atzler danke ich für die großartige Hilfsbereitschaft.

Auch Frau Anna Steenpaß, Frau Mariola Kastner und Frau Cornelia Woermann danke ich herzlich für die Unterstützung bei allen das Labor betreffenden Fragen.

Weiterhin möchte ich allen nichtgenannten Mitgliedern des Instituts, insbesondere dem Arbeitsbereich Klinische Pharmakologie, für die ständige Hilfsbereitschaft und den stets freundlichen Umgang danken.

Meiner Familie danke ich besonders für die jederzeit uneingeschränkte Unterstützung.