

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Isoprostane, Phytprostane, Nitroölsäuren und Eiöl als Modulatoren der
Genexpression: Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und
Atherosklerose**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Medizin

an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Jutta Heinz

aus Köln

Hamburg im September 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.12.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. E. Schwedhelm

*Wer A sagt muss nicht B sagen.
Er kann auch erkennen, dass A falsch war.*

(Berthold Brecht)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Atherosklerose	7
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren.....	7
1.1.2	Arterientypen, Aufbau der Arterienwand und Funktion des Endothels	9
1.1.3	Oxidativer Stress und Atherogenese	11
1.1.4	Besonderheit des oxLDLs.....	13
1.2	Signalwege	14
1.2.1	AP-1 (<i>activator-protein 1</i>).....	14
1.2.2	CREB (<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>).....	14
1.2.3	HIF-1 (<i>hypoxia-inducible factor 1</i>).....	15
1.2.4	NFAT (<i>nuclear factor of activated T-cells</i>).....	16
1.2.5	NFκB (<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)	17
1.2.6	VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>).....	17
1.3	Isoprostane.....	18
1.3.1	Definition und Geschichte der Isoprostan-Entdeckung.....	18
1.3.2	Entstehungsmechanismus der Isoprostane.....	19
1.3.3	Nomenklatur der Isoprostane	20
1.3.4	Biologische Aktivität von Isoprostanen und klinische Bedeutung	21
1.4	Phytoprostane.....	23
1.4.1	Phytoprostane in Pflanzen.....	23
1.4.2	Nomenklatur der Phytoprostane	24
1.4.3	Phytoprostane in der menschlichen Nahrung und die Bedeutung für den Menschen	24
1.5	Nitroölsäuren	25
1.6	Eiöl.....	26
2	Fragestellung	28
3	Material und Methoden	29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Untersuchungsmaterial	29
3.1.2	Geräte	31

3.1.3	Gebrauchsgegenstände	32
3.1.4	Chemikalien	33
3.1.5	Zellkulturmedien.....	34
3.1.6	Kits.....	34
3.1.7	Software.....	35
3.1.8	Lösungen	35
3.1.9	Genexpressions-Assays.....	36
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	Zelllinien und Zellkultur	37
3.2.2	Transduktion	40
3.2.3	Stimulation der Zellkultur	42
3.3	Stimulation mit Testsubstanzen.....	43
3.3.2	Oligodeoxynucleotide (ODNs)	46
3.3.3	Luciferase-Assay.....	46
3.3.4	Quantitative PCR.....	47
3.3.5	Statistische Auswertung	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Der AP-1-Transkriptionsfaktor und Zielgene	51
4.2	Der CREB-Transkriptionsfaktor und Zielgene.....	53
4.3	Der HIF-1-Transkriptionsfaktor und Zielgene	58
4.4	Der NFAT-Transkriptionsfaktor und Zielgene	62
4.5	Eiöl und Spirit of Charismon.....	65
4.6	Der NFκB-Transkriptionsfaktor und Zielgene.....	68
4.7	Oligodeoxynucleotide (ODNs).....	79
5	Diskussion	82
5.1	Einfluss der Isoprostane 8-iso-PGD ₂ , 8-iso-PGE ₂ , ent-1 und AG113A auf die Genexpression.....	83
5.1.1	Isoprostan 8-iso-PGD ₂	83
5.1.2	Isoprostan 8-iso-PGE ₂	86
5.1.3	Isoprostan ent-1.....	87
5.1.4	Isoprostan AG113A	87

5.2	Phytoprostane	87
5.3	Eiöl und Spirit of Charismon	89
5.4	Nitroölsäuren und Ölsäuren	91
5.5	Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1	92
5.6	VEGFR-1 und VEGFR-2 auf dem NFAT-Signalweg	92
5.7	ODNs und Validierung der Versuche	93
5.8	Bezug zur Atherosklerose	94
6	Zusammenfassung und Ausblick	95
6.1	Zusammenfassung	95
6.2	Ausblick	96
7	Literaturverzeichnis	98
8	Anhang	119
8.1	Abkürzungen	119
8.2	Tabellenverzeichnis	124
8.3	Abbildungsverzeichnis	125
8.4	Strukturformeln der verwendeten Substanzen	127
8.4.1	Prostaglandine	127
8.4.2	A ₂ -Isoprostan	127
8.4.3	D ₂ -Isoprostan	127
8.4.4	E ₂ -Isoprostan	128
8.4.5	F ₂ -Isoprostane	128
8.4.6	B ₁ -Phytoprostane	129
8.4.7	E ₁ -Phytoprostane	129
8.4.8	F ₁ -Phytoprostane	130
8.4.9	Nitroölsäuren	132
9	Erklärung	133
10	Danksagung	134
11	Lebenslauf	135

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren

Arteriosklerose und Atherosklerose sind im Volksmund zwei häufig fälschlicherweise synonym genutzte Begriffe. Laut Definition der *world health organisation* (WHO) ist Arteriosklerose ein Sammelbegriff für primär nicht-entzündliche Arterienerkrankungen, die eine Verdickung und einen Elastizitätsverlust der Gefäßwand gemeinsam haben. Es gibt laut WHO 3 Formen:

- a) Arteriolosklerose
- b) Atherosklerose
- c) Mönckeberg-Mediaverkalkung

Bei der Atherosklerose dagegen handelt es sich laut WHO eine von der *Tunica intima* auf die *Tunica media* übergreifende Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien, die mit herdförmigen Anhäufungen von Lipiden (gr. „athyré“: Fettbrei), komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, Kalziumablagerungen und diffuser Kollagenfasernhäufung („Sklerose“) einhergeht und formalpathogenetisch durch Elemente einer chronischen Entzündungsreaktion geprägt ist (1 – 4). Die Atherosklerose liegt verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen zu Grunde, darunter u.a. die koronare Herzerkrankung (KHK) (1), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), das abdominelle Aortenaneurysma und die Stenose der Arteria carotis (2). Diese Erkrankungen können einen Myokardinfarkt, Mesenterialinfarkt oder ischämischen Schlaganfall zur Folge haben (5, 6). Durch eine Atherosklerose kann es außerdem zu einer Einschränkung der Windkesselfunktion der basalen Hirnarterien kommen, die zur Ausbildung eines Normaldruckhydrozephalus und somit zu einer Demenz führt (3).

In den Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache. Dies belegen die Zahlen der Gesundheitsberichterstattung des Bundes:

Im Jahr 2003 verstarben laut Todesbescheinigungen 29.550 Frauen (6,5% aller verstorbenen Frauen) und 34.679 Männer (9,4% aller verstorbenen Männer) an einem akuten Herzinfarkt. Desweiteren starben 56.772 Frauen und 42.444 Männer an nicht näher spezifizierten Folgen einer KHK. Dies bedeutet, dass rund jeder fünfte Sterbefall auf eine Folge einer KHK zurückzuführen ist. 2007 betrug das mittlere Sterbealter in der Gruppe der Patienten mit Atherosklerose 84,6 Jahre. Es wurden 2007 10.483 Sterbefälle in der Diagnosegruppe „Atherosklerose“ verzeichnet. Dies sind 12,7 Fälle pro 100.000 Einwohner. 2007 gab es 413 vorzeitige Sterbefälle (= Tod unter 65/70 Jahren) (0,6/100.000 Einwohner). Die Inzidenz der Atherosklerose steigt mit dem Lebensalter an (4). Insgesamt ist jedoch die Sterblichkeit der Patienten in der Diagnosegruppe „Atherosklerose“ von 18,3 Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr 1998 auf 9,7 Fälle pro 100.000 Einwohner im Jahr 2010 zurück gegangen (5), was wahrscheinlich auf ein besseres Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose und bessere Interventionsmöglichkeiten zurückzuführen ist.

Schon 1986 konnte mit der „Seven Countries Study“ gezeigt werden, dass die 15-Jahres-Todesrate der KHK mit dem Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung korreliert (6). In der Weiterführung der Studie konnte dies für die 25-Jahres-Todesrate bestätigt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass dieser Zusammenhang auch für Cholesterin besteht und das Ausmaß der diätischen Aufnahme von Cholesterin und ungesättigten Fettsäuren eng miteinander verknüpft sind (7). 2004 wurden in der INTERHEART-Studie 9 Risikofaktoren für die Entstehung von Myokardinfarkt und Atherosklerose identifiziert (8):

1. Aktueller Nikotinabusus
2. Erhöhter ApoB/ApoA-Quotient
3. Arterielle Hypertonie
4. Diabetes mellitus
5. Abdominelle Adipositas
6. Mangelnder täglicher Obstkonsum
7. Regelmäßiger Alkoholkonsum
8. Unregelmäßige körperliche Aktivität
9. Psychosoziale Risikofaktoren

Während die INTERHEART-Studie keine Unterscheidung der einzelnen psychosozialen Risikofaktoren trifft, unterscheidet die INTERSTROKE-Studie 2010 in dieser Gruppe psychosozialen Stress und Depression als Risikofaktoren für den ischämischen und den hämorrhagischen Schlaganfall (9).

1.1.2 Arterientypen, Aufbau der Arterienwand und Funktion des Endothels

Herznahe Arterien sind überwiegend Arterien vom elastischen Typ, die durch ihre elastischen Eigenschaften Druck und Strömungsschwankungen, die durch die Herzaktivität entstehen, dämpfen. Durch die so genannte Windkesselfunktion entsteht ein kontinuierlicher Blutstrom. Peripher finden sich überwiegend Arterien vom muskulären Typ. Durch die Kontraktions- und Dehnungsfähigkeit dieser Arterien wird die Blutverteilung in die Organe und Gewebe gewährleistet. Arteriolen sind kleinste Verzweigungen der Gefäße (10).

Der Aufbau der Arterien ist dreischichtig. Die innerste Schicht ist die *Tunica intima* („Intima“). Zum Lumen hin besteht die *Tunica intima* aus einem einschichtigen Endothel. Der subendotheliale Raum der *Tunica intima* besteht aus extrazellulärer Matrix, wenigen glatten Muskelzellen und ggf. Makrophagen. Begrenzt wird die *Tunica intima* von der *Lamina elastica interna*, die die Grenze zur *Tunica media* darstellt. Die *Tunica media* („Media“) besteht überwiegend aus glatten Muskelzellen und wenig

extrazellulärer Matrix. Sie wird zur *Tunica adventitia* hin durch die *Lamina elastica externa* begrenzt. In der *Tunica adventitia* („Adventitia“) ist nur noch vereinzelt glatte Muskulatur zu finden. In der lockeren fibrösen Matrix finden sich zudem vereinzelt Fibroblasten. In der *Tunica adventitia* verlaufen ernährende Gefäße (*Vasa vasorum*) und vegetative Nervenfasern für Vasodilatation und –konstriktion (Abbildung 1) (10).

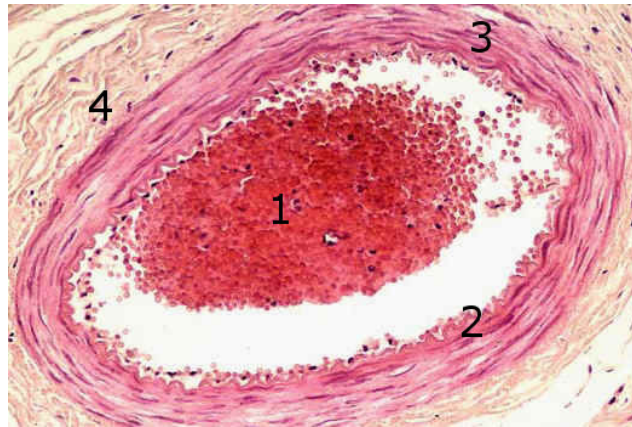


Abbildung 1: Arterie vom muskulären Typ im Querschnitt, HE-Färbung. 1: Blutkoagel, 2: *Tunica intima* mit einschichtigem Endothel, 3: *Tunica media*, 4: *Tunica adventitia*. Quelle: Medizinische Hochschule Hannover, Kurspräparate der mikroskopischen Anatomie (<http://www.mh-hannover.de/19135.html>)

Dem Endothel kommen vielfältige Aufgaben zu. Zunächst bildet das Endothel eine semipermeable Membran. Außerdem ist das Endothel für die Expression von Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren und für die Bildung vasoaktiver Substanzen verantwortlich (10), z.B. NO und Prostazyklin für die Vasodilatation und Endothelin (14, 15) sowie das durch das *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE) gebildete Angiotensin II für die Vasokonstriktion. Das Endothel beeinflusst die lokale Bluthämostasie durch die Bildung von Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren. Eine wichtige Rolle spielt das Endothel zudem in der parakrinen Wachstumsregulation des subendothelialen Gewebes und der Beeinflussung von Entzündungsreaktionen (10). So werden z.B. Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic-fibroblast growth factor* (bFGF) und Makrophagenkoloniestimulierender Faktor (M-CSF) vom Endothel gebildet. Ebenso bildet das Endothel Wachstumsinhibitoren wie Heparin und *transforming growth factor β* (TGF β) (16 – 18).

1.1.3 Oxidativer Stress und Atherogenese

„Atherosklerose ist eine Erkrankung der inneren Arterienwand.“ schrieb Rudolf Virchow, der Begründer der modernen Zell-Pathologie, schon vor über 150 Jahren (11). Die Entstehung der Atherosklerose ist ein multifaktorielles Geschehen, an dem verschiedene Zellen aus der Arterienwand, z.B. Endothelzellen und glatte Muskelzellen, und aus dem Blut, z. B. Monozyten und Thrombozyten, beteiligt sind. Als gemeinsamer Pathomechanismus wird oxidativer Stress, insbesondere durch oxidiertes LDL (oxLDL), angenommen, welcher über eine endotheliale Dysregulation zur Ausbildung von atherosklerotischen Plaques und im weiteren Verlauf zur endothelialen Dysfunktion führt (12), die mit funktionellen und strukturellen Methoden messbar ist. Oxidativer Stress ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen der Rate, bei welcher der intrazelluläre Anteil an freien Radikalen ansteigt, relativ zu der Kapazität der Zellen, die freie Radikale durch Antioxidanzien wie Glutathion oder antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD) zu eliminieren (12). Freie Radikale können endogen in der Atmungskette oder als *oxidative burst* in der Abwehr gegen Antigene entstehen. Exogene Quellen für freie Radikale können z.B. Toxine oder Zigarettenrauch sein (13). Freie Radikale interagieren mit DNA, Proteinen und Lipiden (20 – 22). Der Hauptangriffsort für freie Radikale sind die Lipide (13). Dabei kann eine Lipid-Peroxidation von Membranlipiden verschiedene wichtige biophysikalische Folgen für die Membran haben, da es zur Veränderungen der Fluidität und zur Veränderungen von Membranrezeptoren oder –enzymen kommen kann, die die zelluläre Funktion beeinträchtigen können (13). Durch oxidativen Stress kommt es zudem zu einer Veränderung von verschiedenen Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren sowie zur Veränderung der Expression verschiedener Substanzen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anti-/ proapoptotischen Faktoren (s.u.). Ein wichtiger Faktor in der Entstehung und Unterhaltung der Atherosklerose ist der Zelltod in der Gefäßwand (12).

Als initiale Veränderungen der *Tunica intima* werden nach der „Response-to-injury“-Hypothese Mikroverletzungen des Endothels durch die verschiedenen Risikofaktoren angenommen (14). Mögliche Risikofaktoren können bakterielle Toxine,

vasokonstriktive Hormone bei Hypertonie, Produkte der Glykoxidation bei Hyperglykämie, proinflammatorische Zytokine und vermehrte Bildung von oxLDL sein. An der Oberfläche der verletzten Endothelzellen erscheinen Adhäsionsmoleküle. Die wichtigsten Vertreter der Adhäsionsmoleküle sind *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) und *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1). Monozyten und T-Lymphozyten binden an diese Adhäsionsmoleküle und wandern unter dem Einfluss von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die durch das Endothel freigesetzt werden, in die *Tunica intima* ein. Dort nehmen die Makrophagen und glatte Muskelzellen oxLDL auf und es kommt zur Bildung von Schaumzellen und lipidbeladenen glatten Muskelzellen. Durch kontinuierliche Einwanderung und Proliferation dieser Zellen und durch die kontinuierliche Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren kommt es zur Progression dieses Geschehens (15) und zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques.

Atherosklerotische Plaques können in stabile und vulnerable Plaques eingeteilt werden. Der stabile Plaque zeichnet sich durch einen Lipidkern, der von einer stabilen fibrösen Kappe umgeben ist, aus. Der vulnerable Plaque dagegen ist durch eine dünne fibröse Kappe mit einem großen Lipidkern gekennzeichnet (25, 26). Eine erhöhte Rupturgefahr und somit eine erhöhte Gefahr für ein akutes Koronarsyndrom, das als instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt oder plötzlicher Herztod definiert ist, besteht v.a. beim vulnerablen Plaque (26, 27). Die Plaqueentstehung lässt sich nach Stary in 6 Stadien einteilen (16):

Stadium 1	Formierung von einzelnen Schaumzellen im einschichtigen Endothel der <i>Tunica intima</i>
Stadium 2	Bildung von <i>fatty streaks</i> , charakterisiert durch eine erhöhte Akkumulation von Makrophagen, Auftreten von Schichten von Schaumzellen und lipidbeladenen glatten Muskelzellen
Stadium 3	Progression zu einer präatherosklerotischen Läsion durch kontinuierliche Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten unter dem Einfluss der sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren, multiple extrazelluläre Lipidablagerungen in den muskuloelastischen Schichten
Stadium 4	Atherom im engeren Sinne, Ausbildung eines Lipidkerns, entstanden durch Vergrößerung des Lipidkerns aus Stadium 3
Stadium 5	Entwicklung einer fibrösen Deckplatte durch Veränderung der oberen Tunica intima
Stadium 6	Ruptur, Hämatom, Thrombus

1.1.4 Besonderheit des oxLDLs

OxLDL wird eine wichtige Rolle in der Initiation und Progression der Atherosklerose zugeschrieben. Es fördert die Bildung von Zytokinen (17) und chemotaktischen Faktoren durch eingewanderte Immunzellen (18). Außerdem wird durch oxLDL die lokale Synthese von Adhäsionsmolekülen stimuliert (31, 32). Neben diesen Eigenschaften zeigt oxLDL zytotoxische Effekte gegenüber verschiedenen Zelltypen wie humanen Fibroblasten und aortalen glatten Muskelzellen (19) sowie Makrophagen (20). Viele biologische Effekte des oxLDL laufen über Signalwege, die die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beinhalten und somit in die Expression von Genen, die in den Entzündungsprozess, in die Abwehr von oxidativem Stress oder in die Zellregulation, involviert sind (21). 1997 wurde oxLDL von Steinberg als ein Antigen beschrieben, gegen das *in vivo* eine große Anzahl von Antikörpern existiert (22). Vaarala et al. beschrieben 1995 einen erhöhten Titer von Auto-Antikörpern gegen

oxLDL und oxidierte Phospholipide als einen Marker für eine KHK in einer Kohorte gesunder Männer (23).

1.2 Signalwege

1.2.1 AP-1 (*activator-protein 1*)

Activator-protein 1 (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der wesentliche Bedeutung für Zellwachstum und –differenzierung sowie Tumorstadium und –entstehung hat (38, 39). Über AP-1 werden inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) (24), Interleukin 1 β (IL-1 β) (25) und Osteopontin (26) exprimiert. Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Specificity Protein 1* (Sp1) ist AP-1 an einer Angiotensin-II-induzierten Entzündungsreaktion beteiligt (27). Zudem spielt AP-1 für die Regulation der intrazellulären Cholesterinkonzentration eine Rolle (28). AP-1 ist ein Heterodimer aus Proteinen der Jun- und Fos-Familie (29). Dieser Transkriptionsfaktor kann u.a. durch UV-Licht, Phorbolster wie *phorbol-12-myristate 13-acetate* (PMA) oder TNF α aktiviert werden (45, 46).

1.2.2 CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*)

cAMP-responsive element-binding protein (CREB) ist ubiquitär in allen Geweben zu finden und hat eine wichtige Funktion in der Wachstumsfaktor- und Stress-induzierten Genexpression. CREB ist in eine Vielzahl physiologischer Prozesse inklusive Lernen, Gedächtnis und T-Zell-Bildung involviert. CREB induziert die Expression von mehr als 4000 beschriebenen Genen über den cAMP-vermittelten Signalweg, unter denen auch viele Wachstumsfaktoren und antiapoptotische Gene sind (47, 48). Die Signalkaskade wird über cAMP-gesteuert, das die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, die CREB am Serin-133 phosphoryliert. Über diesen Weg kommt es zur Promotorbindung und somit zur Aktivierung der Transkription (30). CREB ist Substrat für verschiedene zelluläre Kinasen wie Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase B (Akt) (31), *mitogen- & stress-activated protein kinase-1* (MSK-1) (31), *mitogen-activated protein kinase-activator protein 2 kinase* (MAPKAP-2) (31), und *calcium/calmodulin-dependent protein kinases II und IV*

(CaM K II + IV) (31). CREB kann über den cAMP-Agonist Forskolin (FSK) aktiviert werden. Auch Trichostatin A (TSA) kann die Aktivierung von CREB verbessern (47, 49).

Wie oben beschrieben, wird die CREB-Signalkaskade über cAMP gesteuert. Dieses kann über verschiedene Rezeptorblocker blockiert werden. SQ22,536 ist ein Inhibitor der Adenylzyklase, der z.B. PGE₁-induzierte erhöhte cAMP-Spiegel in humanen Thrombozyten inhibiert (32). AH6809 ist ein EP- und DP-Rezeptorantagonist welcher für die Rezeptoren EP1, EP2, EP3-III und DP1 eine annähernd ähnliche Affinität hat. AH6809 blockiert u.a. die PGE₂-induzierte Akkumulation von cAMP in COS-Zellen (33) und die Akkumulation von Ca²⁺ in *Xenopus* Oozyten, die den humanen EP1-Rezeptor exprimieren (34). L-161,982 ist ein potenter und selektiver EP4-Rezeptorantagonist (35). KH7 ist ein selektiver Inhibitor der löslichen Adenylatzyklase (sAC) mit einem zusätzlichen kleinen Effekt auf die membrangebundene Adenylatzyklase (36).

1.2.3 HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*)

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der die adaptive Antwort auf Hypoxie in tierischen Zellen reguliert. Dies geschieht über Erythropoese, Angiogenese, Glykolyse, Invasion und Regulation des vaskulären Tonus. HIF-1 ist ein Heterodimer und besteht aus einer 1 α - und einer 1 β - Untereinheit. HIF-1 β wird konstitutiv gebildet, HIF-1 α ist bei Hypoxie induzierbar. Zur schnellen Reaktion auf Hypoxie wird die 1 α -Untereinheit unter nicht-hypoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert und wieder abgebaut. Unter Hypoxie wird der Abbau vermindert und die α -Untereinheit stabilisiert. Das Protein akkumuliert und es kommt zur Dimerisierung mit HIF-1 β . Das Dimer bindet an das *hypoxia-response-element* (HRE) der Zielgene und aktiviert somit die Transkription (55, 56). HIF aktiviert die Expression von Erythropoetin (EPO), VEGF, *plasminogen aktivator inhibitor 1* (PAI-1), Angiopoeitin 1 und 2 (ANGPT 1 + 2), *placental growth factor* (PGF) und *platelet-derived-growth-factor B* (PDGFB) (57 – 60). VEGF-Expression wird von HIF-1 direkt aktiviert. Für ANGPT 1 und 2, PGF und PDGFB ist nicht bekannt, ob die Aktivierung direkt oder indirekt erfolgt. HIF-1 α stimuliert auch die Expression von anderen für die Pathophysiologie der Atherosklerose relevanten Genen wie Zylooxygenase-2 (COX-2), VCAM1 und IL-1 β

(37). Darüber hinaus wird HIF-1 eine Rolle bei der Plaqueruptur in vulnerablen Plaques zugeschrieben (38). HIF-1 α kann neben hypoxischen Zuständen auch durch Substanzen wie FG-2216 (39), Ciclopiroxolamin (CPX), Deferoxamin (DFO) (40) und CoCl₂ (41) stabilisiert und damit aktiviert werden.

1.2.4 NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*)

Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) wurde zunächst als Induktor der Zytokin-Genexpression in T-Zellen beschrieben. Die NFAT-Familie besteht aus den 4 Isoformen NFATc1, -c2, -c3 und -c4 oder kurz NFAT 1-4. Neben T-Lymphozyten findet sich NFAT auch in anderen Immun- und Entzündungszellen wie B-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen (42). NFAT spielt eine wichtige Rolle inner- und außerhalb des Immunsystems. Dies bestätigen Defekte im Immunsystem und in anderen Organen in *NFAT-Knockout*-Mäusen. So ist z.B. die Bildung der Pulmonal- und Aortenklappe bei *NFATc1-Knockout*-Mäusen blockiert. Der NFAT-Signalweg reguliert wichtige Prozesse in der kardiovaskulären Entstehung inklusive der Herzklappenmorphogenese, der myokardialen Entstehung und der peripheren vaskulären Strukturierung. NFAT wird über einen Calcium/Calmodulin-abhängigen Signalweg aktiviert. In ruhenden Zellen liegt NFAT in phosphoryliertem Zustand im Zytoplasma vor. Dieser Zustand wird durch konstitutiv aktive Kinasen aufrechterhalten. Bei einem Anstieg des intrazellulären Calciums bindet das Calcium an Calcineurin und aktiviert somit die Translokation des aktivierten NFAT in den Zellkern. Dort bindet NFAT alleine oder zusammen mit AP-1 an spezifische DNA-Bindungsstellen und aktiviert die Gentranskription von Zytokinen wie IL-2, TNF α oder *cluster of differentiation 40 ligand* (CD40L). Zudem wird die Expression von VEGF, VCAM-1 und COX-2 in Endothelzellen stimuliert. Calcineurin wird inaktiviert wenn das intrazelluläre Calcium sinkt. NFAT wird dann durch Kinasen rephosphoryliert und über das Transportprotein Cm1 wieder ins Zytoplasma gebracht. Der NFAT-Signalweg kann durch die Calcineurininhibitoren Ciclosporin A (INN) und Tacrolimus (FK506) blockiert werden (67, 68). Phorbolester wie PMA (43) und Ionomycin aktivieren den NFAT Signalweg indem sie die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen und die Aktivität der PKC fördern (69, 70). Zudem ist eine Aktivierung von NFATc1 in humanen Klappenendothelzellen durch VEGF-A beschrieben. OxLDL

stimuliert die NFAT-Bindungskapazität in T-Lymphozyten, Fibroblasten und Makrophagen (44).

1.2.5 NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)

Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB) ist ein ubiquitär vorkommender spezifischer Transkriptionsfaktor, der die Zellimmunantwort, die Zellproliferation und den Zelltod reguliert. Er spielt eine Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems und des lymphatischen Systems. Durch DNA-Bindung an ein KB-Motiv an zahlreichen regulatorischen Bereichen kommt es zur verstärkten Transkription von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Stimuli für NFκB sind Zytokine wie TNFα und IL-1β, bakterielle und virale Antigene wie Lipopolysaccharide (LPS) oder RNA, chemisch-physikalische Noxen wie freie Radikale und oxLDL oder auch Wachstumsfaktoren (45). NFκB ist in verschiedene Entstehungsschritte der Atherosklerose inklusive der Monozytenadhäsion und der Entzündung involviert (46). Seine aktivierte Form konnte in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (47). Für eine Aktivität von NFκB in der Atherosklerose spricht zudem, dass selektive Inhibitoren von NFκB die Schaumzellbildung und Statine die NFκB-Bildung in vaskulären Endothelzellen reduzieren (75, 76).

1.2.6 VEGF (*vascular endothelial growth factor*)

VEGF gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren. Das VEGF-A wurde zuerst beschrieben und wird in fast allen Gefäßen exprimiert. Durch alternatives *Splicing* sind 5 Isoformen von VEGF-A bekannt: VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-189 und VEGF-206. Die beiden langen Formen besitzen eine hohe Affinität für eine Heparinbindung. Die VEGF-Familie ist an der Regulation der endothelialen Zellfunktion beteiligt und ist ein Schlüsselregulator der Angiogenese. VEGF fördert die Zellmigration und –proliferation, stimuliert die Neovaskularisation in ischämischem Gewebe nach Myokardinfarkt und fördert die Bildung von Kollateralgefäßen. VEGF-B spielt eine Rolle in der parakrinen Endothelzellfunktion. VEGF-C und –D regulieren hauptsächlich die Lymphangiogenese. Die Effekte der VEGF-Familie werden über die 2 Rezeptoren

VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1) vermittelt. Beide Rezeptoren spielen eine Rolle in der Blutgefäßformation und der Tumor-Angiogenese. VEGF und VEGFR-1 werden durch HIF-1 über HRE-Bindung direkt aktiviert. HIF-1 vermittelt autokrine Signale zwischen VEGF und seinen Rezeptoren. Für VEGFR-2 ist beschrieben, dass die Genexpression nicht wesentlich durch HIF-1 beeinflusst bzw. nur moderat herab reguliert wird. Grund ist, dass das VEGFR-2-Gen keine Bindungsstelle für HIF-1 besitzt (48). Eine Deletion von HIF-1 α in Endothelzellen unterbricht eine autokrine Schleife, die wichtig für die Induktion von VEGFR-2 durch VEGF-Signale über VEGFR-1 ist. Dadurch kommt es zum verminderten Endothelzellwachstum und zur verminderten Kapillarröhrchenbildung (49). VEGF ist im Serum von Patienten mit myokardialer Ischämie erhöht. Isoprostane können die VEGF-induzierte Migration sowie die die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* hemmen (siehe unten) (77, 79). Im Gegensatz zu den bisher genannten Signalwegen der Inflammation ist VEGF kein Transkriptionsfaktor.

1.3 Isoprostane

1.3.1 Definition und Geschichte der Isoprostan-Entdeckung

Isoprostane sind Prostaglandin-Isomere, die durch die nicht-enzymatische Oxidation von Arachidonsäure entstehen. Schon um 1930 wurden die Prostaglandine durch den Gynäkologen Ulf Euler auf Grund ihrer vasoaktiven Eigenschaften in menschlicher Samenflüssigkeit beschrieben (50). Die Annahme, dass Prostaglandine der Prostata entstammen, führte zu der bis jetzt gebräuchlichen Namensgebung (51). Bereits 1964 wurden bei der Inkubation von ungesättigten Fettsäuren in verschiedenen Gewebekomogenaten die Prostaglandine beschrieben. Sune Bergstrom identifizierte in den frühen 60er Jahren verschiedene Mitglieder der Prostaglandin-Familie (82 – 85). Erst 1969 gelang jedoch die Isolierung des Prostaglandin PGE₂. Sune Bergstrom erhielt 1982 zusammen mit Bengt Ingemar Samuelsson und John Robert Vane den Nobelpreis für Medizin "für ihre bahnbrechenden Arbeiten über Prostaglandine und nahe verwandter biologisch aktiver Substanzen" (86, 87). Ebenfalls in den 60er Jahren wurde von Pryor und Porter beschrieben, dass bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu Prostaglandinen auch andere Regio- und Stereoisomere

entstehen können. Diese Reaktion stellt eine durch freie Radikale katalysierte Autooxidation der ungesättigten Fettsäuren dar (88, 89). Erst 1990 beschrieben Morrow und Roberts, dass diese Reaktionen auch *in vivo* stattfinden (52). Seit dem sind Isoprostane Gegenstand der Forschung zur nicht-invasiven Analyse der Lipid-Oxidation *in vitro* und *in vivo*.

1.3.2 Entstehungsmechanismus der Isoprostane

Prostaglandine entstehen über eine COX-katalysierte Reaktion nur aus freier Arachidonsäure (53). Es sind zwei COX-Isoformen bekannt: die konstitutiv exprimierte COX-1 und die induzierbare COX-2. Dem entgegen steht die Isoprostanenstehung, die durch freie Radikale nichtenzymatisch katalysiert wird und COX-unabhängig ist (abgesehen von 8-iso-PGF_{2α} (iPF_{2α}-III), s.u.). Bei der Isoprostanenstehung ist das Substrat nicht nur die freie Arachidonsäure sondern insbesondere veresterte, d.h. als Membranlipid gebundene, Arachidonsäure (54). Neben der Arachidonsäure werden auch andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch freie Radikale oxidiert und ihre Oxidationsprodukte nachweisbar, so z.B. Oxidationsprodukte der Docosahexaensäure, die u.a. in Neuronen vorkommt. Daher werden die Produkte dieser Reaktion Neuroprostane und Neuroketale genannt (55). Für die Arachidonsäure finden sich Isoprostane der A₂, B₂-, D₂-, E₂-, F₂- und J₂-Familie sowie Isoprostazykline und Isothromboxane (94, 95). Ihre Bezeichnung erfolgt in Anlehnung an die Prostanoiden. Desweiteren konnten auch Isoketale *in vivo* nachgewiesen werden (56). Für die Familie der F₂-Isoprostane sind 4 Regioisomer-Klassen bekannt für die insgesamt 64 Isomere denkbar sind (57). Von besonderer Bedeutung ist unter den F₂-Isoprostanen die Klasse der 5er-Serie (Abbildung 2: einige Beispiele der 5er-Serie der F₂-Isoprostane). So konnte z.B. gezeigt werden, dass F₂-Isoprostane der 5er-Serie die höchste Konzentration in menschlichem Urin erreichen (58).

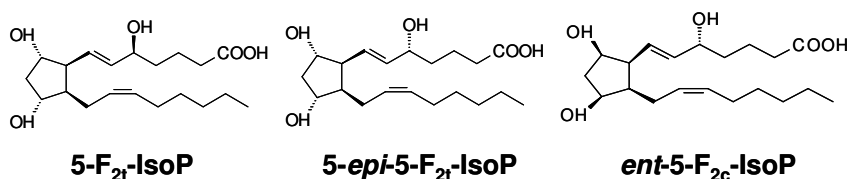


Abbildung 2: Drei F₂-Isoprostane der 5er-Serie

Eine Sonderstellung nimmt das Isoprostan 8-iso-PGF_{2α} der 15-er Serie ein. Es ist das 1990 von Morrow und Roberts zuerst *in vivo* beschriebene Isoprostan (52). Darüber hinaus ist es ein Nebenprodukt der COX-2-Aktivität. Stimuli für diese Reaktion sind Kollagen und Thrombin. Eine erhöhte COX-2-Aktivität ist ebenfalls mit der 8-iso-PGF_{2α}-Entstehung assoziiert. Spezifische COX-2-Hemmer hemmen dosisabhängig die Entstehung von Isoprostanen. Nicht-selektive COX-Inhibitoren haben jedoch keinen Effekt auf die Ausscheidung von F₂-Isoprostanen in gesunden Probanden (99 – 102).

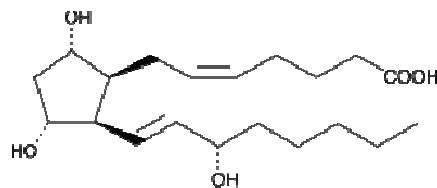


Abbildung 3: Isoprostan 8-iso-PGF_{2α} (iPF_{2α}-III, 15-F_{2t}-Isoprostan)

1.3.3 Nomenklatur der Isoprostane

1974 beschrieb Nelson die Prostaglandin-Nomenklatur, die A-, B-, C-, D- und E-Prostaglandine voneinander abgrenzt. Diese unterscheiden sich in ihrem 5-Ring-System. Für Prostaglandine wird die Abkürzung PG verwendet, gefolgt vom entsprechenden Buchstaben der Prostaglandin-Familie. Die Anzahl der Doppelbindungen der Seitenkette folgt im Index hinter dem Buchstaben der Familie (59). 1997 wurde von Traber et al. die IUPAC-Nomenklatur der Isoprostane vorgeschlagen. Demnach werden nicht-enzymatisch entstandene C₂₀-Prostanoide Isoprostane genannt. Die Abkürzung ist IsoP. C₂₂-Prostanoide, die aus Docosahexaensäure entstanden sind, werden als Neuroprostane bezeichnet, Abkürzung NeuroP. C₁₈-Prostanoide aus Linolensäure nennen sich Phytprostane und werden mit PhytoP abgekürzt. Der 5-Ring wird nach dem Prostaglandin-System benannt. Allerdings steht der Familienbuchstabe bei der IUPAC-Nomenklatur vor der entsprechenden Abkürzung (60). Rockach beschrieb 1997 eine alternative Nomenklatur, die die unterschiedlichen Wege der Isoprostan-Biosynthese berücksichtigt. Er teilte die Isoprostane nach ihrem Entstehungsmechanismus in

verschiedene Klassen ein, die mit einer römischen Zahl beschrieben werden. Die Abkürzung der Isoprostane ist iP gefolgt vom Buchstaben der Familie, der sich an der Prostaglandin-Nomenklatur orientiert. Die Zahl im Index gibt auch hier die Anzahl der Doppelbindungen der Seitenkette an (105, 106).

1.3.4 Biologische Aktivität von Isoprostanen und klinische Bedeutung

Isoprostane sind nicht nur Marker der Lipidoxidation und des oxidativen Stresses, sondern auch Mediatoren der „zellulären Aktivität des oxidativen Stresses“ (94, 107). Ihre Aktivität lässt sich bereits im nanomolaren Bereich beschreiben. Die systemische Infusion von 8-iso-PGF_{2α} bei Ratten führte zu einer potenten renalen Vasokonstriktion und damit verbunden zu einer Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses um 60% (61). Es konnten vasokonstriktive Effekte an verschiedenen anderen Gefäßen wie Pulmonalarterien (62), Koronarien (63), zerebralen Arteriolen (64) und retinalen Gefäßen (65) gezeigt werden. Zudem führte 8-iso-PGF_{2α} in Rattenlungen zu einer Bronchokonstriktion. In retinalen vaskulären Endothelzellen von neugeborenen Ratten konnte eine Induktion des Zelltodes beschrieben werden (66). Isoprostane spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose zugegeschrieben. F₂-Isoprostane modulieren die Plättchenaggregation (67) und induzieren die Mitose in glatten Muskelzellen (61). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte F₂-Isoprostanentstehung mit einer gesteigerten Oxidation von LDL verknüpft ist (68). Es konnte gezeigt werden, dass in *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC-Zellen) die Monozytenbindung durch 8-iso-PGE₂ stimuliert werden kann. Dies trifft nicht auf die Neutrophilenbindung zu (69). Zudem stimulieren Isoprostane die proliferative Antwort in Fibroblasten (70). Isoprostane sind in der Lage, konzentrationsabhängig die VEGF-induzierte Migration von Endothelzellen, die VEGF-induzierte kardiale Angiogenese *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* über die Aktivierung des TBXA₂R zu hemmen (71). Unter Angiogenese wird die Neubildung von Blutkapillaren verstanden, die für die Pathophysiologie vieler Erkrankungen inklusive myokardialer Ischämie bei KHK-Patienten von Bedeutung ist (118, 119). Angenommen wird, dass Isoprostane ihre biologische Aktivität über den Thromboxan-Rezeptor (TP) vermitteln. Dafür spricht,

dass vaskuläre Effekte durch die TP-Antagonisten SQ 29,548, BM 567 und ICI 192,605 antagonisiert werden können. Jedoch lassen Bindungsstudien vermuten, dass 8-iso-PGF_{2α} nicht an der gleichen Bindungsstelle wie der TP-Agonist U46619 mit dem Rezeptor interagieren (72). Neben den Effekten auf den TP werden potenzielle Interaktionen von einigen Isoprostanen auf Prostaglandin-Rezeptoren der glatten Muskelzellen der Gefäßwand diskutiert.

Schon 1996 konnten Reilly et al. zeigen, dass bei chronischen Zigarettenrauchern die F₂-Isoprostankonzentration im Plasma und die F₂-Isoprostanausscheidung im Urin im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht ist (73). Morrow et al. konnten eine Korrelation zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten und dem F₂-Isoprostanspiegel im Plasma und der F₂-Isoprostanausscheidung im Urin aufzeigen. Beide Werte fielen 2 Wochen nach Nikotinkarenz wieder ab (74). Gopaul et al. beschrieben schon 1995 passend zur Hypothese erhöhter Lipid-Peroxidation bei Diabetes mellitus eine erhöhte Plasmakonzentration von F₂-Isoprostanen bei Patienten mit NIDDM gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe (75). Auch bei Patienten mit Atherosklerose ist die Isoprostanbildung erhöht (76). Schon 1997 konnte Pratico zeigen, dass passend zu der These, dass in atherosklerotischen Plaques Lipid-Peroxidation und Entzündung stattfindet, sich hohe Konzentrationen von F₂-Isoprostanen in atherosklerotischen Plaques finden (77).

Die Messung des oxidativen Stresses *in vivo* war lange Zeit problematisch, da keine zuverlässige Methode zur Verfügung stand. Da Isoprostane frei im Plasma zirkulieren, über den Urin ausgeschieden werden und zwischen der Exkretion im Urin und der Zirkulation im Plasma eine lineare Korrelation besteht, ist die F₂-Isoprostan-Messung eine zuverlässige Methode zur Quantifizierung des oxidativen Stresses *in vivo* (78). Als Methoden stehen die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), die Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) und Immunoassays zur Verfügung (79). Die Messung der Isoprostane hat verschiedene Vorteile gegenüber anderen Markern für oxidativen Stress *in vivo*, denn Isoprostane (21, 121, 127 – 129):

- 1) Sind chemisch stabil
- 2) Sind ein spezifisches Produkt der Peroxidation
- 3) Entstehen *in vivo*
- 4) Sind in normalen Geweben und biologischen Flüssigkeiten enthalten
- 5) Steigen in Tiermodellen bei oxidativem Stress an
- 6) Werden durch den Fettgehalt in der Nahrung nicht beeinflusst
- 7) Können ein sensitiver biochemischer Marker bei Dosisfindungsstudien für Antioxidanzien sein

1.4 Phytoprostane

1.4.1 Phytoprostane in Pflanzen

Statt Arachidonsäure kommen in Pflanzen hauptsächlich α -Linolsäure und α -Linolensäure vor (80). Die α -Linolensäure kann analog zu den Prostaglandinen aus der Membran gelöst und zu Hormonen metabolisiert werden (81). Ähnlich wie die Arachidonsäure ist auch α -Linolensäure anfällig für Autooxidation und Photooxidation (82). Bereits 1976 beschrieben Pryor et al. die Autooxidation von α -Linolensäure (83). Die 3-fach ungesättigte α -Linolensäure ist dabei im Gegensatz zur 4-fach ungesättigten Arachidonsäure weniger anfällig für Lipidperoxidation. Die Reaktion von α -Linolsäure zu Phytoprostanen geht zudem langsamer vonstatten als die Reaktion von Arachidonsäure zu Isoprostanen. Phytoprostane liegen in Pflanzen als freie und veresterte Formen vor, wobei die veresterten Phytoprostane zu über 99% in Membranen vorliegen. Freie Phytoprostane werden überwiegend durch Lipaseaktivität gebildet (84). Seit 1998 sind mehr als 20 Pflanzenspezies auf Phytoprostane untersucht worden. In allen wurden freie A₁-, B₁-, D₁-, E₁- und J₁-Phytoprostane gefunden (82). Auch in Pflanzen sind Phytoprostane ein Marker für oxidativen Stress *in vivo*. In Pflanzen liegt die Konzentration der Phytoprostane bei bis zu 1124 ng/g Trockengewicht (85). Weiter konnte gezeigt werden, dass der Phytoprostangehalt stark ansteigt, wenn Pflanzen trocknen. Es konnten 250-fach höhere Konzentrationen als in frischen Pflanzen gefunden werden (bis zu 55 μ g/g Trockengewicht) (85).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass frische Pflanzenteile bestimmter Pflanzen eine Tendenz zur Akkumulation von freien F₁-Phytoprostanen auf bis zu 32 µg/g zeigen. Phytoprostane können als Marker für den oxidativen Abbau von pflanzlicher Nahrung genutzt werden (85).

1.4.2 Nomenklatur der Phytoprostane

Die Nomenklatur der Phytoprostane basiert auf einem Vorschlag von Müller im Jahr 1998 (106, 134). Dieser basiert auf der Prostaglandin-Nomenklatur von Nelson (59). Die Abkürzung für die Phytoprostane ist PP, gefolgt vom Familiennamen und der Indexnummer, die die Anzahl der Doppelbindungen in der Seitenkette angibt. Angelehnt an die Nomenklatur von Rokach 1997 gibt eine römische Ziffer die Klasse der Phytoprostane an. Ungerade Typnummern beschreiben die Prostaglandin-Standard-Konfiguration, gerade Typnummern beschreiben eine Nicht-Prostaglandin-Konfiguration (106, 134).

1.4.3 Phytoprostane in der menschlichen Nahrung und die Bedeutung für den Menschen

Phytoprostane sind in der menschlichen Nahrung nicht unwesentlich enthalten. 2006 wurden durch Kathrin Karg verschiedene Speiseöle auf ihren Phytoprostan-Gehalt hin untersucht (86):

Tabelle 1: Gehalt von Phytoprostanen in der menschlichen Nahrung aus Krag, K. „Analyse biologisch aktiver, oxidierter Lipide in Pflanzen und Menschen“, Dissertation, Universität Würzburg, gekürzt (86).

Speiseöl	Linolensäure [g / 100 ml]	Phytoprostane [mg / 100 ml Öl]
Leinöl	51,0 – 56,0	25,43 +/- 2,78
Soja-Öl	5,0 – 9,5	28,73 +/- 0,36
Bio-Soja-Öl	8	8,15 +/- 1,27
Rapsöl	6,4 – 14,1	1,86 +/- 0,68
Bio-Rapsöl	9	1,79 +/- 0,39
Walnussöl	9,0 – 1,50	5,46 +/- 0,63
Olivenöl	< 0,05 – 0,9	4,23 +/- 0,49
Traubenkernöl	< 0,05 – 1,0	0,37 +/- 0,17

Über die biologische Aktivität der Phytoprostane im menschlichen Organismus ist noch wenig bekannt. Phytoprostane konnten im Urin identifiziert und mit Lipiden im Plasma von gesunden Männern nach Pflanzenölaufnahme nachgewiesen werden (87). Es werden den Phytoprostanen antiinflammatorische, antivirale und antiapoptotische Effekte zugeschrieben (84). Phytoprostane könnten eine Rolle in der Immunmodulation spielen. Möglicherweise tragen Phytoprostane zur Aktivierung und Modulation des NFκB- und *peroxisome proliferator-activated receptor* γ –Signalweges (PPAR-γ-Signalweg) durch Birkenpollen bei und sind so am Pathomechanismus der allergischen Rhinitis beteiligt (88, 137). Andere Studien gehen davon aus, dass oral aufgenommene Phytoprostane langsam absorbiert und schnell metabolisiert werden und somit wohl keinen Effekt beim Menschen haben (88).

1.5 Nitroölsäuren

Nitroölsäuren sind elektrophile Lipid-Signalmediatoren. Sie entstehen endogen durch NO und NO₂⁻ durch andere reaktive Stickstoff-Spezies (RNI, *reactive nitrogen species*) (89). 600 nM freie Säuren und 300 nM mit Lipiden veresterte Säuren 9-NO₂-Ölsäure (OA) und 10-NO₂-OA konnten im menschlichen Blut nachgewiesen werden. Über die Stabilität von Nitroölsäuren im menschlichen Blut und Plasma ist noch wenig bekannt (90). Für die Nitroölsäuren sind antinflammatorische Eigenschaften beschrieben. So

sind Nitroölsäuren zum Beispiel Repressoren der NFκB-Genexpression indem sie an die p65-Untereinheit des NFκB binden. Dadurch kommt es zu einer verminderten Zytokinproduktion durch Makrophagen und einer verminderten Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS oder NOS-2) (139, 141). Nitroölsäuren sind zusätzlich PPAR-γ-Agonisten (91). Außerdem ist die durch oxLDL induzierte Phosphorylierung des proinflammatorischen Signaltransduktors und Transkriptionsaktivators *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT-1) in LPS-stimulierten Makrophagen beschrieben. Die STAT-1-Aktivierung ist assoziiert mit der Schaumzellbildung während der Atherosklerose. Durch verminderte Akkumulation von Entzündungszellen in atherosklerotischen Plaques und verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) wird die Ausbildung der atherosklerotischen Plaques vermindert (143 -145). Für Nitroölsäuren ist weiterhin beschrieben, dass sie die neutrophile Funktion und die Monozytenadhäsion in Endothelzellen *in vitro* inhibieren. Dies funktioniert über eine supprimierte Adhäsionsmolekülexpression und eine verminderte Freisetzung von Zytokinen in Monozyten und Makrophagen (146, 147). Nitroölsäuren induzieren die Migration von Endothelzellen sowie die Formation von Aussprossungen. Zudem sind sie an der Angiogenese *in vivo* in einem NO-abhängigen Zusammenhang beteiligt (92). Weiterhin wird die Expression zahlreicher antioxidativer Gene über Nitroölsäuren kontrolliert. Dies wurde für Hämoxxygenase 1 (HO-1), Ferritin, CU/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1), Glutathion-Peroxidase (GPX), Glutathion-S-Transferase (GST), NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase (NQO1 und NQO2), γ-Glutamylcystein-Synthase (γGCS) und UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT) beschrieben (93). Nitroölsäuren fungieren nicht nur als Reservoir für NO, sondern agieren zusätzlich als endogene NO-Donoren. Sie vermitteln Gefäßrelaxation sowie Stimulation und Aktivitätssteigerung der endothelialen NOS (eNOS oder NOS-3) (92).

1.6 Eiöl

Eiöl ist ein Lipidextrakt, welches aus Eiern von Vögeln oder Reptilien gewonnen wird. Es handelt sich um ein konservierungsstofffreies Produkt, welches bei Verbrennungen, inklusive Sonnenbrand, aber auch zur Regeneration von besonders beanspruchter oder

angegriffener Haut genutzt wird (150, 151). 1996 ist ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem Eiöl und seiner Verwendung zugelassen worden (94). Zur Hautverträglichkeit und zur Anwendung bei den oben genannten Hauterkrankungen sind verschiedene Anwendungsstudien durchgeführt worden. Bisher wurde allerdings nur eine Studie 2005 von Laslo Puskas zur Wirkung auf Atherosklerose in Ungarn durchgeführt. Dafür wurden 14 Kaninchen mit einer Cholesterol-reichen Diät ernährt, die zu typischen atherosklerotischen Plaques führte, die den humanen Plaques ähnlich sind. 7 Kaninchen bekamen eine Diät nur mit Cholesterol, 7 Kaninchen bekamen eine Diät mit Cholesterol und Zusatz von Eiöl. In einer 15-wöchigen Beobachtungszeit wurden alle wichtigen hämatologischen und biochemischen Blutparameter zu festgesetzten Zeiträumen untersucht (Tag 0, Woche 4, Woche 9, Woche 15). Vier Kaninchen starben während des Beobachtungszeitraumes in der 14. Woche. Nach 15 Wochen wurden die Kaninchen autopsiert und die Aorten histologisch auf Plaques untersucht und nach einer modifizierten Stary-Einteilung klassifiziert. Zu diesen Untersuchungen wurde zusätzlich die Genexpression der inflammatorischen Gene ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1 untersucht. Zusammenfassend zeigte sich, dass nur zwei Laborparameter eine signifikante Änderung zeigen: Nach 4 Wochen zeigte die Lactat-Dehydrogenase (LDH) der Eiöl-Gruppe eine geringere Aktivität als in der Kontrollgruppe. In der Woche 4, 9 und 15 war die Kreatinkinase-Aktivität (CK-Aktivität) der Eiöl-Gruppe geringer als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass Eiöl einen Effekt auf Muskelzellen hat, da die CK ein Parameter für den Untergang von Muskelzellen ist. Es ist möglich, dass Eiöl einen Effekt auf die Entzündung in Muskelzellen hat. In der Untersuchung inflammatorischer Gene zeigten sich keine Änderungen. Es konnte zudem kein Effekt auf die Atherosklerose und die Entzündung gezeigt werden (95).

2 Fragestellung

Isoprostane spielen bei vielen Prozessen, die an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, eine wichtige Rolle. Bisher wenig untersucht ist ihre Wirkung auf die Genexpression, insbesondere solcher Gene, die in Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Atherosklerose stehen. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Beeinflussung verschiedener Transkriptionsfaktorbindungselemente durch Isoprostane, Phytoprostane, Nitroölsäuren und Eiöl. Daher wurden zunächst verschiedene Transkriptionsfaktoren in einer Endothelzelllinie, der humanen Hybrid-Endothelzelllinie EA.HY, als Reportersysteme exprimiert. In einem Screening-Ansatz sollten verschiedene Isoprostane, Phytoprostane, Nitroölsäuren und Eiöl auf ihre aktivierenden oder inhibierenden Effekte untersucht werden. Substanzen, die einen Effekt zeigten, sollten dann im letzten Schritt auf ihre Wirkung auf die Expression geeigneter Zielgene, die unter Kontrolle der Target-Transkriptionsfaktoren liegen, in primären Endothelzellen, der humanen Nabelschnurendothelzelllinie HUVEC, untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Die Isoprostane 8-iso-PGA₂, 8-iso-PGD₂, 8-iso-PGE₂ und 8-iso-PGF_{2α} sowie das Prostaglandin PGF_{2α} wurden über Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA bezogen. Die beiden Prostaglandine PGE₁ und PGE₂ konnten über Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, bezogen werden. Die Substanzen Spirit of Charismon und Eiöl wurden in größerer Menge von der Firma E. Prüfer GmbH aus Düsseldorf zur Untersuchung bereitgestellt. Nitroölsäure und Ölsäure stammten aus dem *Cardiovascular Research Center* (CVRC) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aus der Arbeitsgruppe von Tanja und Volker Rudolph.

Das Isoprostan ent-1 (5-ent-F_{2c}-IsoP) (96) wurde von Günter Helmchen vom Organisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die zu untersuchenden Phytoprostane, einige Isoprostane und Prostaglandin D₂ (PGD₂) wurden von Thierry Durand vom Institut Biomolecules Max Mousseron (IBMM) Montpellier zur Verfügung gestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Liste der getesteten Iso- und Phytoprostane

Name	Typ
AG113A	5 _{2t} -IsoP (iPF _{2α} VI)
AG113B	5-epi-5-F _{2t} -IsoP (5-epi-iPF _{2α} VI)
AG260	9-epi-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG267	PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG273A	ent-9-epi-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG273B	ent-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG441A	9-epi-PPE ₁ Typ II
AG441B	PPE ₁ Typ II
JMG312	ent-15-F _{2t} -IsoP
JMG317	ent-15-epi-15-F _{2t} -IsoP
JMG400	16 (R/S) PPE ₁ Typ I
SE126A	ent-16-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ I
SE126B	ent-F ₁ -Phytoprostan Typ I
SE139A	ent-9-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ II
SE139B	ent-F ₁ -Phytoprostan Typ II
SE175A	ent-B ₁ -Phytoprostan Typ I
SE175B	B ₁ -Phytoprostan Typ I
SE194R	ent-B ₁ -Phytoprostan Typ II
SE195S	B ₁ -Phytoprostan Typ II
SEVD34A	F ₁ -Phytoprostan Typ II
SEVD34B	9-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ II
VD24B	F ₁ -Phytoprostan Typ I
YB1-160	15-D _{2t} -Isoprostan

Zur Validierung der Luciferase-Versuche sollte das ODN-System verwendet werden. Die ODNs wurden für die Signalwege der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NFκB von Andreas Wagner von der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Geräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM® 7900HT <i>Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
accu-jet® pro Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
<i>brother</i> HL 2030	brother, Bad Vilbel
CO ₂ -Inkubator <i>Hera cell</i>	Heraeus, Hanau
Eppendorf 8-Kanal-Pipette (Volumen 30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf <i>Mastercycler</i> *ep*gradient	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Hub-Pipetten (Volumen: 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
HP <i>ColorLaserJet</i> CP1510	HP, Böblingen
IBM <i>ThinkPad</i> T40	Lenovo, Stuttgart
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riss
Leonovo <i>ThinkPad</i> X220i	Lenovo, Stuttgart
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
NALGENE™ <i>Cyro 1 °C Freezing Container</i>	NALGENE Labware, Roskilde (DK)
<i>NanoDrop</i> ND-1000	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer Fuchs-Rosenthal	LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Schüttelapparat Titramax 101	Heidolph, Kelheim
Sicherheitswerkbank <i>Hera safe</i>	Heraeus, Hanau
Stoppuhr Polar F6	Polar, Büttelborn
UV-VIS <i>Fluorescence and Absorbance Reader</i> , Safire II	Tecan, Crailsheim (D), Männedorf (CH)
Vakuumpumpe <i>MiniVac</i> E1	AxonLab, Reichenbach/Stuttgart
Vortex-Schüttler Reax Top	Heidolph, Kelheim
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich, Bäch (CH)

3.1.3 Gebrauchsgegenstände

Tabelle 4: Liste der verwendeten Gebrauchsgegenstände

Gebrauchsgegenstand	Größe/Volumen	Hersteller
<i>Cell Scraper</i> Zellschaber	16 mm	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Clou Prestige</i> Kosmetiktücher	-	WEPA, Arnsberg
Digitil N Handschuhe	M, L	Paul Hartmann, Heidenheim
Digitil PF Handschuhe	M, L	Paul Hartmann, Heidenheim
DIN A4-Block	-	Clairefontaine, Köln
ep T.I.P.S. Pipettenspitzen	0,1-1,0 µl 2-200 µl 20-300 µl 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Folienstift Multimark 1513 permanent	-	Faber-Castell, Stein
Gewebekulturflaschen	25 cm ² 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Injekt Spritzen Fa. Braun	10 ml	B.Braun, Melsungen
nunc <i>CyroTube™ Vials</i>	1,8 ml	nunc, Roskilde (DK)
Parafilm® M	-	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipetten/Sarpetten	1 ml 2 ml 5 ml 10 ml 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
<i>PS Microplate CELLSTAR® 96 well</i>	-	greiner bio-one, Kremsmünster (AU)
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	15 ml 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
<i>SafeSeal</i> Gefäß	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
<i>SafeSeal</i> Gefäß	2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Kanüle	0,7x40 mm	B.Braun, Melsungen
<i>Tissue Culture Plate 6-well Flat Bottom bzw. 12-well Flat Bottom</i>	-	Sarstedt, Nümbrecht
<i>Tissue Culture Plate 96-well</i>	-	Sarstedt, Nümbrecht
VWR Sterile Syringe Filter	-	VWR LabShop, Batavia (USA)

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Medien

Chemikalien und Medien	Hersteller
Prostanoid E- und D-Rezeptor Antagonist (AH 6809)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
<i>alamarBlue® cell proliferation indicator</i>	AbD Serotec, Oxford
<i>Aqua ad iniectabila</i>	Baxter S.A., Brüssel, (B)
Chloroform minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Cobalt(II)chloride hexahydride, <i>cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Deferoxamine mesylate salt</i> , approx 95% TLC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DMSO: Dimethyl sulphoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Forskolin <i>from Coleus forskohlii</i> , ≥98% (HPLC), <i>powder</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HAT Supplement (50X), <i>liquid</i>	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
Ionomycin <i>calcium salt</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Isopropanol (2-Propanol) reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Inhibitor der löslichen Adenylylcyclase (KH7)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Prostanoid E-Rezeptor <i>Subtyp 4</i> Antagonist (L-161,982)	Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polybrene (1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide, hexadimethrine bromide)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Puromycin	InvivoGen, San Diego (USA)
RNAzol®B <i>RNA Isolation Regent</i>	WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach, TS
Prostanoid E-Rezeptor Antagonist (SQ 22,536)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TNF- α <i>human</i>	biomol, Hamburg
<i>Trypan blue Solution 0,4%, cell culture tested</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Hersteller
5% Trypsin, Trypsin-EDTA 10%	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
BSA, Bovines Serum-Albumin	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
<i>DMEM Dulbecco's Modified Eagle Media</i>	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	Biochrom AG, Berlin
<i>FCS: Heat Inactivated FBS</i>	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe
<i>Gelatin solution 2% f. Bovine</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PenStrep (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin)	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Kits

Tabelle 7: Liste der verwendeten *Kits*

Kit	Hersteller
Signal™ <i>Lenti Reporters</i>	SABiosciences, Frederick (USA)
<i>Steady-Glow® Luciferase-Assay System</i>	Promega, Madison (USA)
RevertAid™H Minus <i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot
Maxima® Probe/ROX qPCR <i>Master Mix (2x)</i>	Fermentas Life Sciences, St.Leon-Rot

3.1.7 Software

Tabelle 8: Liste der verwendeten *Software*

Software	Hersteller
Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.6	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, München
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim
NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
TaqMan SDS 2.2	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Xfluor4 (basierend auf MS Excel)	Tecan, Crailsheim

3.1.8 Lösungen

Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen

Reagenz	Abkürzung	Stocklösung	Lösungsmittel
<i>Phosphat buffered saline</i>	PBS		
Ionomycin <i>calcium salt</i>	Ionomycin	0,1 mM	DMSO
Cobalt(II)chlorid	CoCl ₂	30 mM	H ₂ O
Phorbol 12-myristate 13-acetate	PMA	10 µg/ml	DMSO
TNF- α <i>human</i>	TNF α	1 mg/ml	H ₂ O + 0,1%BSA
Prostanoid E- und D-Rezeptor Antagonist	AH6809	100 mM	DMSO
Prostanoid E-Rezeptor <i>Subtyp 4</i> Antagonist	L-161,982	1 mM	DMSO
<i>Deferoxamine mesylate salt</i> , approx 95% TLC	DFO	160 µM	H ₂ O
<i>Forskolin from Coleus forskohlii</i> , $\geq 98\%$ (HPLC)	FSK	25 mM	DMSO
Inhibitor der löslichen Adenylylzyklase	KH7	100 mM	DMSO
Prostanoid E-Rezeptor Antagonist	SQ 22,536	100 mM	H ₂ O

3.1.9 Genexpressions-Assays

Tabelle 10: Liste der verwendeten Genexpressions-Assays

Primer	ID	Hersteller
<i>fms-related tyrosine kinase 1</i> (VEGFR-1)	Hs01052936_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (GAPDH)	Hs99999905_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>heme oxygenase</i> (decycling) 1 (HO-1)	Hs00157965_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>kinase insert domain receptor</i> (VEGFR-2)	Hs00176676_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>myosin light chain kinase</i> (MYLK)	Hs00981463_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>NADPH oxidase 1</i> (NOX-1)	Hs00246589_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>nitric oxide synthase 1</i> (NOS-1)	Hs00167223_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>nitric oxide synthase 2, inducible</i> (NOS 2A)	Hs00167257_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>nitric oxide synthase 3</i> (NOS-3)	Hs00167166_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>Phosphatase and Tensin homolog</i> (PTEN)	Hs00829813_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>superoxide dismutase 1, soluble</i> (SOD1)	Hs00533490_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i> (SOD2)	Hs00167309_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt
<i>vascular endothelial growth factor</i> A (VEGFA)	Hs00900055_m1	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Damstadt

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultur

3.2.1.1 Zelllinien

Die EA.HY 926-Zelllinie ist eine humane endotheliale Zelllinie, die durch Fusion von humanen alveolarepithelähnlichen Lungenkarzinomzellen (A549/8-Zellen) mit HUVEC-Zellen entstanden ist. Die in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten EA.HY-GFP-Zellen tragen stabil im Genom die Gensequenz für das *green fluorescent protein* und sind somit in der Lage, grünes fluoreszierendes Licht zu erzeugen, welches bei geeigneten Wellenlängen messbar ist. EA.HY-Zellen hatten für die vorliegenden Versuche neben einer einfachen Handhabung den Vorteil, dass ein Reportergen stabil ins Zellgenom eingebaut werden konnte und die Zellen auch noch in hohen Passagenummern stabile Eigenschaften in Bezug auf die Genexpression zeigten.

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) sind primäre Endothelzellen, die aus Nabelschnüren per Kollagenase-Verdau isoliert werden. HUVEC-Zellen sind im Gegensatz zu EA.HY-Zellen anspruchsvoller zu kultivieren und können maximal bis zu einer Passagenummer $p = 7$ verwendet werden.

3.2.1.2 Nährmedien und Herstellung der Nährmedien

Für die Kultivierung der EA.HY-Zellen und EA.HY-GFP-Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-Medium + GlutaMAX 1 g/L D-Glucose, Pyruvat der Firma Gibco (Invitrogen) verwendet. Zur Herstellung von Nährmedium wurde 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 0,1% BSA und 1% HAT zugegeben. Das Hungermedium für EA.HY-Zellen wurde analog hergestellt, jedoch ohne Zugabe von FCS. Für Zellen, die unter Selektionsdruck kultiviert wurden, wurde 1 µg/ml Puromycin zugesetzt. HUVEC-Zellen wurden mit *Endothelial cell growth medium* der Firma PromoCell kultiviert, dem 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Als Hungermedium wurde für diese Zellen *Endothelial cell basal medium* mit

100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Bei 4°C wurden alle Medien gelagert.

3.2.1.3 Standardzellkultur

Sowohl EA.HY-Zellen als auch HUVEC-Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Routinemäßig wurden die Zellen täglich und vor jeder Passage unter mikroskopischer Kontrolle auf Morphologie und Konfluenzgrad untersucht. Die Kultivierung der adhärenenten EA.HY-Zellen fand in T25-Kulturflaschen mit oben beschriebenem Medium statt. Ein Mediumwechsel mit 35 °C warmem Nährmedium erfolgte in der Regel alle 2 Tage. Dafür wurde das alte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und durch 4 ml 35 °C-warmes Medium ersetzt. Die Zellen wurden bei ca. 80% iger Konfluenz 1:3 aufgeteilt. Dies war in der Regel alle 3 – 4 Tage der Fall.

Die adhärenenten HUVEC-Zellen wurden hauptsächlich in beschichteten T75-Kulturflaschen kultiviert. 30 min vor der Passage wurden die Kulturflaschen für die HUVEC-Zellen mit Gelatine beschichtet. Dafür wurden 4 ml 0,1% Gelatine in die Kulturflasche gegeben und die Kulturflasche bei 37 °C 30 min im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde der Gelatineüberstand aus der Flasche abgesaugt und die HUVEC-Zellen in die Zellkulturflaschen überführt. Bei HUVEC-Zellen fand der Mediumwechsel zunächst am Tag nach dem Passagieren statt und anschließend alle 2 Tage. Auch HUVEC-Zellen wurden bei ca. 80% iger Konfluenz 1:6 auf Kulturflaschen aufgeteilt.

3.2.1.4 Passagieren der Zellenkultur

Das Passagieren der Zellkultur erfolgte mit 35 °C warmem PBS, Trypsin und Nährmedium. Nach Absaugen des alten Mediums wurde die Zellkultur mit 1 ml 35 °C warmen PBS pro T25-Kulturflasche gewaschen und das PBS anschließend abgesaugt. Danach konnten die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin und Inkubation für 3 min im Inkubator vom Untergrund abgelöst werden. Durch leichtes Klopfen gegen die

Kulturflasche und mikroskopischer Kontrolle wurde sichergestellt, dass sich alle Zellen vom Untergrund lösten. Die Trypsinwirkung konnte durch Überführen der Zellen in Nährmedium mit zusätzlicher Zugabe von 10% FCS abgestoppt werden. Nach Zentrifugation bei 220 xg für 4 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zell-Pellet wurde mit Nährmedium resuspendiert und die Zellen für die weitere Kultivierung in neue Kulturflaschen ausplattiert. Für Versuche wurden die Zellen entsprechend des gewünschten Versuchsaufbaus auf 96-Loch-Platten oder 6-Loch-Platten ausgesät. Für die Zell-Zählung wurde eine Neubauer-Zählkammer von Fuchs-Rosenthal verwendet.

3.2.1.5 Einfrieren und Auftauen

Um Zellschäden während der Dauerlagerung im flüssigen Stickstoff vorzubeugen wurde die Methode der Kryokonservierung mit DMSO genutzt. DMSO ist bei Raumtemperatur zytotoxisch, beugt aber bei kalten Temperaturen Zellschäden vor. Die ersten Arbeitsschritte der Kryokonservierung erfolgten analog dem Schema des Passagierens der Zellen. Die Zellen wurden jedoch nach dem Zentrifugieren mit 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert, das aus Nährmedium mit Zusatz von 10% DMSO bestand. Anschließend wurden die Zellen in *nunc CryoTube™ Vials* überführt und im *NALGENE™ Cyro 1 °C Freezing Container* mit 1 °C Abkühlung pro Minute für 1 d eingefroren. Die Dauerlagerung erfolgte bei 134 °C in flüssigem Stickstoff.

Beim Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell gearbeitet werden um dem zytotoxischen Effekt von DMSO vorzubeugen. Die Zellen wurden nach Entnahme aus dem Stickstoff in der Hand aufgetaut, in bereitgestelltes warmes Medium überführt und anschließend bei 220 xg für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 4 ml warmem Nährmedium pro T25-Flasche resuspendiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Der nächste Mediumwechsel erfolgte am folgenden Tag.

3.2.2 Transduktion

Unter Transduktion wird in der Molekularbiologie der Austausch von genetischem Material zwischen Bakterien und Viren verstanden. Dies kann *in vitro* genutzt werden, um Zielzellen mit viralen Vektoren zu infizieren, die temporär oder stabil ins Genom der Zielzelle eingebaut werden können. Ziel der Transduktion in den vorliegenden Versuchen war es, ein an ein Luciferase-Gen (Reporter-gen) gekoppeltes Bindungselement eines Transkriptionsfaktors stabil in das Endothelzellgenom von EA.HY-GFP-Zellen einzubauen. Bindet der zu untersuchende Transkriptionsfaktor an sein Bindungselement, wird zusätzlich das Reporter-gen mit abgelesen. Durch die folgende Luciferase-Reaktion wird Energie in Form einer Lichtreaktion frei, die mittels einer Luminescence-Messung quantifiziert werden kann (s. Kapitel Luciferase-Assay). Für die Transduktion wurde für die vorliegenden Versuche das *Signal™ Lenti Reporters-System* der Firma SABioscience ausgewählt, welches auf Lentiviren basiert. Lentiviren sind eine Gattung innerhalb der Retroviren, deren bekanntester Vertreter ist das HI-Virus ist. Vorteil der Lentiviren ist, dass diese auch ruhende Zellen infizieren können und somit die Ausbeute der transduzierten Zellen erhöht werden kann. Für diesen Versuch wurden EA.HY-GFP-Zellen verwendet, da so eine Normierung des Chemilumineszenz-Signales der Luciferase-Reaktion auf die Fluoreszenz der Zellen und damit Zellzahl erfolgen konnte.

Einen Tag vor der Transduktion wurden zur Versuchsvorbereitung $0,5 \times 10^4$ EA.HY-GFP-Zellen pro Kavität auf eine 96-Loch-Platte aufgebracht und 24 h inkubiert. Als Medium wurde 80 µl Nährmedium pro Kavität ohne Puromycin-Zusatz verwendet. Es wurden 6 Kavitäten pipettiert, von denen 3 für die Transduktion genutzt wurden und 3 Kavitäten die Kontrolle bildeten.

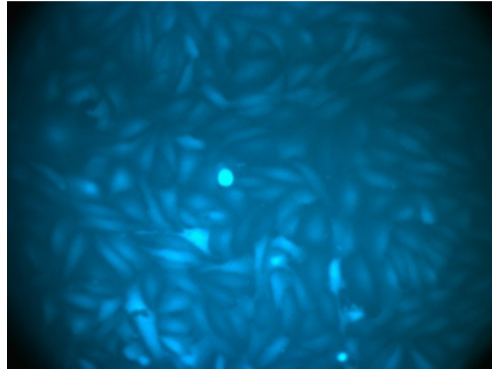


Abbildung 4: EA.HY-GFP-Zellen, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung

Am Versuchstag wurde zunächst das Medium aus den einzelnen Kavitäten abgesaugt und durch 50 µl neues Nährmedium ohne Puromycinzusatz ersetzt. Im Anschluss wurde Polybrene hinzupipettiert, so dass eine Konzentration von 8 µl/ml in jeder Kavität vorlag. Zuletzt wurde in 3 Kavitäten das Virus mit dem jeweiligen Reporter in der vom Hersteller angegebenen Konzentration hinzugegeben:

Tabelle 11: Herstellerangabe der zur Transfektion benötigten Konzentrationen

Name	Lot Number	Titer (TU/ml)
CRE-Reporter	20080703	$2,5 \times 10^7$
NFκB-Reporter	20080708	$3,5 \times 10^7$
HIF-1-Reporter	20080804	$4,9 \times 10^7$
AP-1-Reporter	20080627	$2,0 \times 10^7$
NFAT-Reporter	20080626	$0,8 \times 10^7$

Es erfolgte die Inkubation der EA.HY-GFP-Zellen zusammen mit dem Virus für 2 d. Nach 2 d wurden die transduzierten Zellen auf eine Kavität einer 12-Loch-Platte gesplittet und dort weiter kultiviert. Die Zellen aus den Kontrollkavitäten wurden ebenfalls gesplittet und auf Kavität der 12-Loch-Platte weiter kultiviert. Zur Selektion wurde Nährmedium mit Puromycin-Zusatz verwendet. Da die virusinfizierten Zellen nun eine Puromycin-Resistenz trugen, überlebten diese Zellen. Die Kontroll-Zellen starben in Anwesenheit von Puromycin ab. Bei ca. 80% iger Konfluenz wurden die Zellen auf einer 6-Loch-Platte gesplittet. Anschließend wurden die Zellen in T25-Kulturflaschen entsprechend dem Zellkulturprotokoll weiter kultiviert.



Abbildung 5: EA.HY-Zellen nach Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 und 2-wöchiger Selektion unter Puromycin, Lichtmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung



Abbildung 6: EA.HY-Zellen ohne Transduktion nach 2-wöchiger Selektion unter Puromycin, Lichtmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung

HUVEC-Zellen wurden in Analogie zum Transduktionsprotokoll für EA.HY-Zellen infiziert. Da die HUVEC-Zellen empfindlicher waren, wurden diese Zellen erst 1 Woche später mit Puromycin selektioniert.

3.2.3 Stimulation der Zellkultur

3.2.3.1 Allgemeine Stimulation

Sowohl für die Luciferase-Versuche als auch für die Gen-Expressions-Versuche folgte die Stimulation der Zellen nach analogem Schema und wird daher in einem eigenen Kapitel beschrieben. Für die Stimulation der Zellen wurde für jeden der ausgewählten Transkriptionsfaktoren eine Substanz oder Methode ausgewählt, die den entsprechenden Transkriptionsfaktor aktiviert. Im ersten Schritt wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors zunächst mittels Luciferase-Assay quantifiziert bzw. getestet. Dafür wurde zunächst eine nicht stimulierte Kontrolle vs Stimulation mit jeweils $n = 3$

angesetzt. Es zeigte sich für den Transkriptionsfaktor NFAT eine bessere Stimulation nach 7 h. Für alle anderen Transkriptionsfaktoren konnte eine Stimulationszeit von 6 h eingehalten werden.

Tabelle 12: Stimulationszeiten und Stimulationszusätze der verschiedenen Signalwege

Zelltyp	Stimulationszeit	Stimulus	Konzentration	verwendete Zell-Passagen
EA.HY - AP1	6h	PMA	10 ng/ml	p = 1 - p = 10
EA.HY - CRE	6h	FSK	25 µM	p = 1 - p = 24
EA.HY - HIF-1	6h	DFO	16 µM	p = 1 - p = 12
EA.HY - NFκB	6h	humanes TNFα	5 ng/ml	p = 4 - p = 18
EA.HY - NFAT	7h	PMA/Ionomycin	10 ng/ml PMA, 0,5 µM Ionomycin	p = 4 - p = 13

Zur Vorbereitung des Versuches wurden die Zellen am Tag vor dem Versuch mit 5×10^4 Zellen pro Kavität in 80 µl Hungermedium auf eine 96-Loch-Platte ausgesät und 12 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Am Versuchstag wurde zunächst eine Stimulationslösung frisch in Hungermedium angesetzt, die die 5-fache Konzentration des Stimulus enthielt. Von dieser wurden 20 µl in den Versuchsansatz geben, so dass mit einer 1:4-Verdünnung die in oben dargestellter Tabelle angegebene Endkonzentration erreicht wurde. Der Versuchsansatz wurde anschließend für die oben angegebene Stimulationszeit inkubiert und entsprechend der im Kapitel Luciferase-Assay (Kapitel 3.2.5) bzw. Quantitative PCR (Kapitel 3.2.6) dargestellten Versuchsanleitung weiter bearbeitet.

3.3 Stimulation mit Testsubstanzen

Die einzelnen Testsubstanzen wurden nach folgenden Schemen simultan mit der Stimulationslösung auf die Zellen pipettiert und der Versuchsansatz anschließend für die oben angegebene Stimulationszeit im Brutschrank inkubiert. Die Stimulationslösungen wurden für alle Versuche in unten aufgeführter Konzentration verwendet. Die Prostaglandine, Isoprostane und Phytoprostane waren dabei in 10%igem Ethanol gelöst, die Ethanol-Endkonzentration betrug in allen Versuchen

maximal 0,1 %. Mit n = 3 wurde jede Bedingung durchgeführt und für die oben angegebene Inkubationszeit im Brutschrank inkubiert. Das weitere Vorgehen orientierte sich anschließend an den Versuchsbeschreibungen für die Luciferase-Versuche (Kapitel 3.2.5) bzw. für die mRNA-Gewinnung mit anschließender quantitativer PCR (qPCR, Kapitel 3.2.6).

Tabelle 13: Konzentrationen der jeweiligen Versuchszusätze der Testsubstanzen

	AP-1	CREB	HIF-1	NFAT	NFκB
Nitroölsäure	1 µM	1 µM			1 µM
Ölsäure	1 µM	1 µM			1 µM

	AP-1	CREB	HIF-1	NFAT	NFκB
Prostaglandine	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M
Isoprostane	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M
Phytprostane	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M

	AP-1	CREB	HIF-1	NFAT	NFκB
Spirit of Charismon	1% und 0,1%	0,10%	0,10%	1% und 0,1%	1% und 0,1%
Eiöl	1%	0,10%	0,10%	1%	1%

	AP-1	CREB	HIF-1	NFAT	NFκB
DMSO	1% und 0,1%	1% und 0,1%		1% und 0,1%	
Ethanol	0,1%	0,3%	0,1%	0,1%	0,1%

Da Spirit of Charismon in 1% iger-Konzentration zytotoxische Effekte aufzuweisen schien, wurde eine maximale Konzentration von 0,1% für Luciferase- und Expressionsversuche eingesetzt. Die Stimulanzen PMA, Ionomycin und FSK und bestimmte Testsubstanzen (Prostaglandine, Isoprostane und Phytprostane) waren in DMSO bzw. in Ethanol gelöst, so dass pro Versuchsansatz eine Ethanolkontrolle bzw. eine DMSO-Kontrolle entsprechend der Konzentration im Versuchsansatz pipettiert wurde. Im Ergebnisteil ist jedoch immer nur eine unbehandelte Kontrolle dargestellt, wenn sich keine Unterschiede durch das Lösungsmittel ergeben haben. Da DFO und TNFα in H₂O gelöst waren, wurde bei HIF-1- und NFκB-Versuchen auf die Ethanol- bzw. DMSO-Kontrolle verzichtet. Ethanol und DMSO wurden für Luciferase- und

Expressionsversuche in einer maximalen Konzentration von 0,1 % bzw. 0,15 % eingesetzt.

3.3.1.1 Rezeptorblockade und -inhibitoren

Für den Transkriptionsfaktor CREB war es interessant, Versuche mit den Rezeptorblockern AH6809 (EP- und DP-Rezeptorblocker) und L-161,982 (EP₄-Rezeptorblocker) sowie den Inhibitoren SQ22,536 (Inhibitor der Adenylylzyklase) und KH7 (selektiver Inhibitor der löslichen Adenylylzyklase) durchzuführen. Der Versuchsaufbau orientierte sich an den in den Kapiteln Allgemeine Stimulation (Kapitel 3.2.3.1) und Stimulation mit Testsubstanzen (Kapitel 3.2.3.2) beschriebenen Prinzipien. Es erfolgte jedoch zusätzlich die Zugabe eines Rezeptorblockers gleichzeitig mit dem Aktivator des jeweiligen Transkriptionsfaktors. Nach 6 h Inkubation erfolgte der weitere Versuchsaufbau nach dem Prinzip des Luciferase-Assays (Kapitel 3.2.5). Zudem wurde eine Vorinkubation mit Rezeptorblockern von 2 h getestet. Auch diese Versuche wurden mit n = 3 durchgeführt und für 6 h mit dem Aktivator des jeweiligen Transkriptionsfaktors inkubiert. Dafür wurden folgende Rezeptorblocker-Konzentrationen eingesetzt:

Tabelle 14: Konzentrationen der Rezeptorblocker beim Transkriptionsfaktor CREB

	AH6809	KH7	L-161,982	SQ22,536
Testkonzentrationen bei der Titration des Blockers	1 mM 100 µM 50 µM	100 µM	100 µM 50 µM	1 mM
Endgültige verwendete Versuchs-Konzentration	50 µM	100 µM	100 µM 50 µM	

3.3.2 Oligodeoxynucleotide (ODNs)

Bedingung für die Versuche mit Oligodeoxynucleotiden (ODNs) war eine möglichst dichte Konfluenz der Zellen mit Zell-Zell-Kontakten, da diese für eine effiziente Aufnahme der ODNs in die Zellen notwendig sind. Für die ODN-Versuche wurden die Zellen auf durchsichtige 96-Loch-Platten ausgesät und dort so lange kultiviert, bis eine möglichst dichte Konfluenz erreicht war. Dann wurde das Nährmedium gegen Hungermedium ausgetauscht und die Zellen anschließend 12 h gehungert. Am Versuchstag wurde zunächst die ODN-Lösung zu den Zellen gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ entstand. Dies wurde zwischen 2 min und 6 h vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde $\text{TNF}\alpha$ -Lösung nach Stimulationsprotokoll hinzupipettiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne jeweiligen Stimulus und eine $\text{TNF}\alpha$ -Kontrolle ohne ODNs durchgeführt. Jede Bedingung wurde mit $n = 3$ durchgeführt. Der restliche Versuch orientierte sich am letzten Abschnitt des Versuches Luciferase-Assay (Kapitel 3.2.5).

Da in den ersten Versuchen kein deutlicher Effekt zu sehen war, musste die Möglichkeit, dass die $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration zu hoch war, in Betracht gezogen werden. Daher wurde ein Versuch mit der $\text{TNF}\alpha$ - EC_{50} von 0,5 ng/ml, einer Vorinkubationszeit von 2 h und einer Inkubationszeit von 6 h angesetzt. Auch hier orientierte sich die weitere Versuchsdurchführung am Luciferase-Assay (Kapitel 3.2.5).

3.3.3 Luciferase-Assay

Für die Durchführung des Luciferase-Assays wurde eine durchsichtige 96-Loch-Platte benutzt, da so die Kontrolle des Zellwachstums im Hungermedium durch Mikroskopie gewährleistet war. Die eigentliche Messung fand auf einer weißen 96-Loch-Platte statt. Die Messung der Photonenintensität bei der Luminescence-Messung erfolgt nur senkrecht zur Platte und somit kann bei der Messung in einer weißen Platte das volle Chemilumineszenz-Signal erfasst werden.

Am Tag vor Versuchsbeginn wurden die Zellen ausgesät und 5×10^4 EA.HY-Zellen pro Kavität pipettiert. Diese wurden anschließend 12 h in 100 µl Hungermedium unter weiterer Puromycinselektion kultiviert und am Versuchstag nach Stimulationsprotokoll stimuliert.

Zur Vorbereitung des Versuchs wurde die Luciferase im 4 °C-Kühlschrank ca. 4 h vor Versuchsbeginn langsam aufgetaut. Ungefähr 1 h vor Versuchsbeginn wurde das Luciferase-Reagenz auf Raumtemperatur gebracht und anschließend kurz vor Versuchsbeginn nach Herstellerangaben gelöst. 15 min vor Ende der Stimulationszeit wurde der Zellkultur-Versuchsansatz aus dem Inkubator in den Kühlschrank überführt und dort bei 4 °C 15 min abgekühlt. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Lagerung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde in jede Kavität der 96-Loch-Platte mit einer 8-Kanal-Pipette 100 µl Luciferase-Reagenz pipettiert. Abgedeckt mit Alufolie wurde der Versuchsansatz nun mit dem Luciferase-Reagenz für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Überführen auf eine weiße 96-well-Platte erfolgte erneutes Schütteln für 5 min, ebenfalls abgedeckt mit Alufolie. Im Anschluss erfolgte die Luminescence-Messung bei 1000 ms im Tecan Safire II. Zur Auswertung der Daten wurden diese mit Hilfe der *Software* x-fluor4 für Tecan Safire II in ein Excel-Datenblatt konvertiert.

3.3.4 Quantitative PCR

3.3.4.1 Gewinnung von mRNA

Um die Auswirkung auf die Expression von geeigneten Zielgenen zu untersuchen, wurde mRNA aus HUVEC-Zellen, die kein Luciferase-Reporter-System exprimierten, nach Stimulation gewonnen. Diese Zellen wurden einige Tage vor Versuchsbeginn auf 6-Loch-Platten ausgesät und kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 80% erreicht war. Dann wurden die HUVEC-Zellen 12 h im Hungermedium kultiviert, bevor sie zu Versuchsbeginn nach Stimulationsprotokoll stimuliert wurden. Nach Ende der Stimulationszeit wurde zuerst das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen sofort auf Eis

gelagert. Anschließend wurden 800 µl RNAzol direkt auf die Zellen gegeben und die Zellen mit dem Zellschaber vom Untergrund abgeschabt. Zellen und RNAzol wurden nun in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sec gevortext. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform erfolgte ein erneutes Vortexen für 30 sec und im Anschluss die Lagerung auf Eis für 15 min. Nach der anschließenden Zentrifugation für 15 min bei 12 x 1000 xg und 4 °C wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in vorbereitete Eppendorf-Gefäße mit 1 ml vorgelegtem Isopropanol gegeben. Die Lösung wurde gut gevortext und anschließend die RNA für mindestens 1 h bei -20 °C in der Tiefkühltruhe ausgefällt. Im Anschluss erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 12 x 1000 xg und 4 °C für 30 min. Die präzipitierte RNA befand sich nun als Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 200 µl höchst reinem 70% EtOH gewaschen und gut gevortext. Bei 4 °C und 12 x 1000 xg wurde dies erneut 10 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde von dem Pellet vorsichtig abgesaugt und das umgedrehte Eppendorf-Gefäß vorsichtig mit einem Wattestäbchen ausgewischt ohne das Pellet zu berühren. Das RNA-Pellet wurde für 1-2 min im umgedrehten Eppendorf-Gefäß getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert und photometrisch bei 260 nm und 280 nm die RNA-Menge bestimmt. Nullwert war DEPC-Wasser. Nach Resuspension war die Weiterverarbeitung der gewonnen mRNA direkt möglich. Es konnte jedoch auch eine Dauerlagerung bei -80 °C erfolgen.

3.3.4.2 qPCR

Alle weiteren Arbeiten mit mRNA und cDNA wurden auf Eis durchgeführt. Die isolierte mRNA wurde zunächst mit dem Maxima Probe/ROX qPCR *Master Mix* der Firma Fermentas in cDNA umgeschrieben, der pro Probe folgende Bestandteile enthielt:

Tabelle 15: *Master-Mix* für die cDNA-Synthese

Master-Mix cDNA-Synthese	
RevertAid™ H Minus M-MuL V <i>Reverse Transcriptase</i> (200 u/μl)	1 μl
RiboLock™ <i>Rnase Inhibitor</i> (20 u/μl)	1 μl
5x <i>Reaction Buffer</i> (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 nM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 μl
10 mM dNTP Mix	2 μl

Es wurde pro Probe 1 μg mRNA eingesetzt, welche in 12 μl H₂O gelöst war. Zu diesem wurde anschließend 1 μl *random hexamer primer* und 8 μl *Master-Mix* pipettiert, so dass ich ein Gesamtvolumen von 20 μl ergab. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde die Amplifikation der PCR im Eppendorf-*Thermocycler* gestartet. Für die PCR wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 16: PCR-Protokoll für die cDNA-Synthese

Step	Temperature [°C]	Time	Number of cycles
<i>Initial denaturation</i>	94	3 min	1
<i>Denaturation</i>	94	30 s	35
<i>Annealing</i>	58	30 s	
<i>Extension</i>	72	45 s	

Im ABI PRISM® 7900HT *Sequence Detection System* ("TaqMan") fand anschließend eine Expressionsanalyse der cDNA statt. Dafür wurde die zuvor hergestellte cDNA zunächst 1:8 mit H₂O verdünnt. Zudem wurde ein *Master-Mix* nach Angaben in Tabelle 17 pipettiert. Die Sonde entspricht dabei dem Expressions-Assay des jeweilig untersuchten Genes. *Housekeeping*-Gen oder Bezugs-Gen war für alle Versuche GAPDH. Pro Probe wurden für die Genexpressionsanalyse 2 μl der verdünnten cDNA und 8 μl *Master-Mix* verwendet, so dass ein Gesamtvolumen pro Probe von 10 μl eingesetzt wurde. Bei den Genexpressions-Analysen wurden alle Proben als Doppelbestimmung durchgeführt. Für die qPCR wurde das in Tabelle 18 dargestellte PCR-Protokoll verwendet.

Tabelle 17: *Master-Mix* für die qPCR

Master-Mix “TaqMan“-RT-PCR für jeweils 2 Ansätze (Doppelbestimmung)	
Maxima [®] Probe/ROX qPCR Master Mix 2x	8 µl
Sonde (Genexpressions-Assay)	1 µl
H ₂ O	8 µl

Tabelle 18: PCR-Protokoll für die qPCR

Step	Temperature [°C]	Time	Number of cycles
<i>Initial denaturation</i>	95	10 min	1
<i>Denaturation</i>	95	15 s	40
<i>Annealing</i>	60	30 s	
<i>Extension</i>	72	30 s	

3.3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Luciferase-Versuche erfolgte zunächst mittels Microsoft Excel 2007. In einem ersten Schritt wurden die Messwerte auf den Mittelwert der nicht stimulierten Kontrolle normiert. Die normierten Werte wurden anschließend mittels GraphPad Prism 5 graphisch dargestellt und über die *One-way-ANOVA*-Methode auf die statistische Signifikanz geprüft.

Die Auswertung der Genexpressions-Versuche erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (155, 156). Dabei wird die Genexpression des untersuchten Gens mit der des *Housekeeping*-Gen GAPDH in Beziehung gesetzt. Die ermittelte relative Genexpression wurde graphisch mit GraphPad Prism 5 dargestellt. Als statistischer Test wurde hier ebenfalls die *One-way-ANOVA*-Methode verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Der AP-1-Transkriptionsfaktor und Zielgene

Durch Stimulation der EA.HY-Zellen mit 10 ng/ml PMA zeigte sich eine 5-fache Aktivierung des AP-1-Transkriptionsfaktors (Abbildung 7, $p < 0,05$). Werden die nicht stimulierten Bedingungen betrachtet, so zeigte sich ein Anstieg des Signals bei Zugabe von PGD_2 um 50% ($p < 0,05$). Vergleicht man die nicht stimulierte Kontrolle mit den Bedingungen, bei denen die alleinige Zugabe von 8-iso- PGD_2 erfolgte, zeigte sich ein Anstieg des Signales auf das 2,5-fache ($p < 0,05$). Im Vergleich der stimulierten Kontrolle mit den stimulierten Bedingungen mit PGD_2 -Zugabe kam es zu einem Anstieg des Luciferase-Signales um 28% (n.s.). Gegenüber der stimulierten Kontrolle zeigte sich eine Verdopplung des Luciferase-Signales bei Zugabe von 8-iso- PGD_2 ($p < 0,05$).

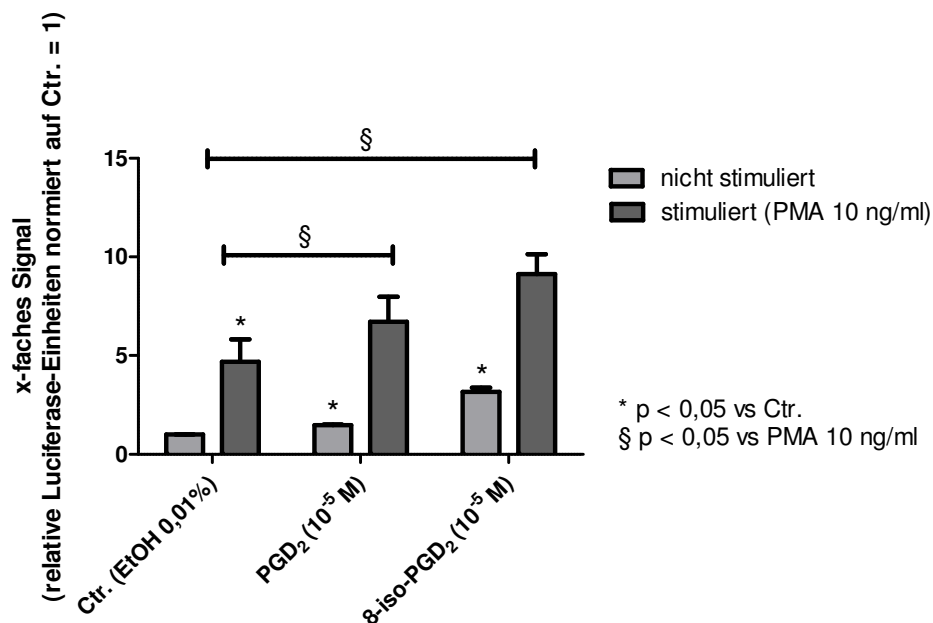


Abbildung 7: Effekte von PGD_2 und 8-iso- PGD_2 auf den Transkriptionsfaktor AP-1 in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation des AP-1-Transkriptionsfaktors erfolgte über 10 ng/ml PMA, die Konzentrationen der Iso- bzw. Phytoprostane waren 10^{-5} M. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1. Für alle Bedingungen gilt $n = 6$ und Inkubationszeit 6 h.

* $p < 0,05$ vs Ctr., § $p < 0,05$ vs PMA 10 ng/ml.

Im Gegensatz zu den untersuchten Isoprostanen zeigte das Phytoprostan SEVD34A (F₁-Phytoprostan Typ II) eine Reduktion des Luciferase-Signals in EA.HY-Zellen um 40% unter PMA-Stimulation ($p < 0,05$). Für das Stereoisomer, das Phytoprostan SEVD34B (9-epi-F₁-Phytoprostan Typ II), konnte kein Effekt gezeigt werden. Ohne Stimulation war kein Effekt nachweisbar (Abbildung 8).

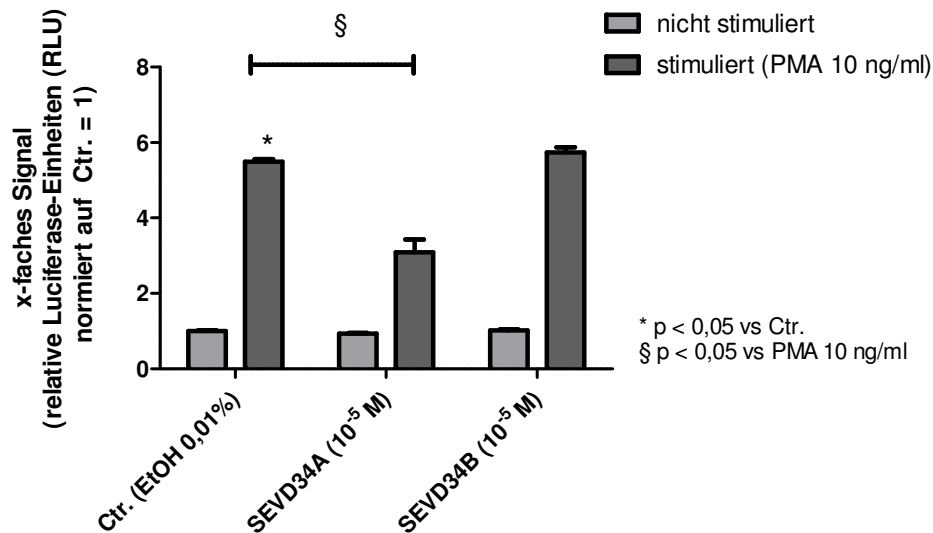


Abbildung 8: Effekte der Phytoprostane SEVD34A und SEVD34B auf den AP-1-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation des AP-1-Transkriptionsfaktors erfolgte über 10 ng/ml PMA, die Konzentrationen der Iso- bzw. Phytoprostane betrug 10^{-5} M. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1. Für alle Bedingungen gilt $n = 6$ und Inkubationszeit 6 h.

* $p < 0,05$ vs Ctr., § $p < 0,05$ vs PMA 10 ng/ml.

Anhand von Literatur wurden für den AP-1-Transkriptionsfaktor die Zielgene HO-1 und eNOS ausgewählt (97). Genexpressionsanalysen wurden mit dem Phytoprostan SEVD34A in HUVEC-Zellen durchgeführt. Die Stimulation mit PMA zeigte für die HO-1 eine 10-fach gesteigerte relative Genexpression ($p < 0,05$). Die Zugabe von SEVD34A reduzierte jedoch nicht die durch PMA gesteigerte Expression von HO-1 (Abbildung 9 Teil A). Die Stimulation mit PMA führte nicht zu einer gesteigerten Expression der eNOS unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 9 Teil B).

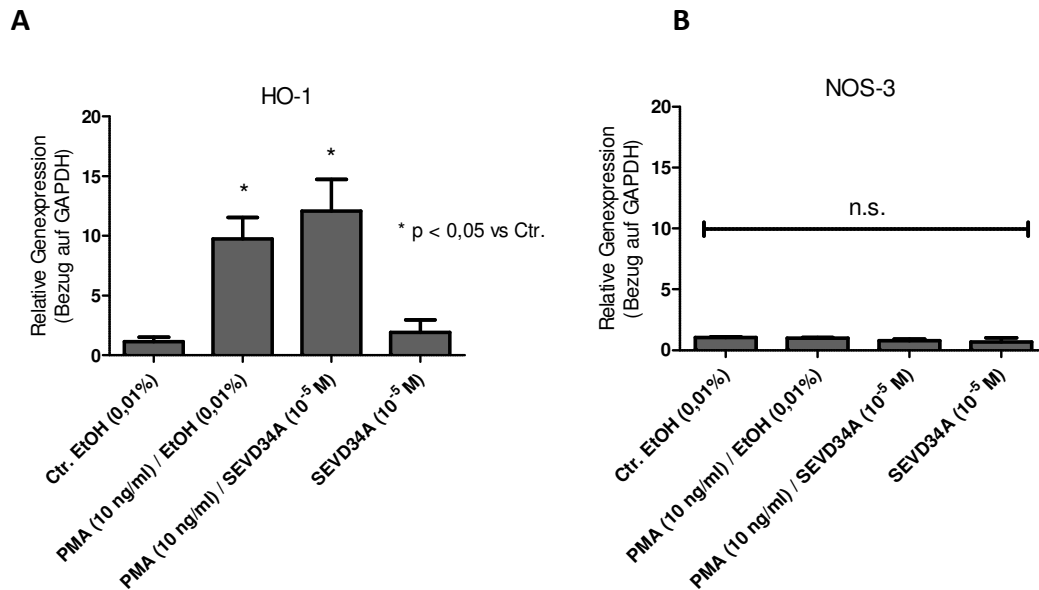


Abbildung 9: Effekte des Phytoprostans SEVD34A auf die Genexpression in HUVEC-Zellen der beiden Zielgene HO-1 (Abbildung Teil A) und NOS-3 (eNOS) (Abbildung Teil B)

Die Stimulation des AP-1-Transkriptionsfaktors in HUVEC-Zellen erfolgte mit 10 ng/ml PMA, Konzentrationen der Phytoprostane: 10⁻⁵ M. Darstellung der relativen Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit 6 h und n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr..

4.2 Der CREB-Transkriptionsfaktor und Zielgene

Durch Stimulation der EA.HY-Zellen mit 25 μ M FSK wurde eine 20-fache Aktivierung des CREB-Transkriptionsfaktors erreicht (Abbildung 10). Bereits eine Konzentration von 10⁻⁸ M führte zu einem 10-fachen Anstieg des CREB-Luciferase-Signals für 8-iso-PGA₂ (Abbildung 10 Teil A, p < 0,0001) bzw. zu einem 7-fachen Anstieg für PGF_{2 α} (Abbildung 10 Teil B, p < 0,05). Unter FSK-Stimulation zeigte sich eine weitere Verstärkung des Luciferase-Signals um 30% sowohl für 8-iso-PGA₂ als auch für 8-iso-PGF_{2 α} . Für 8-iso-PGE₂ zeigte sich ein Trend für eine Steigerung des nicht stimulierten Luciferase-Signals (Abbildung 11, n.s.). Die strukturell verwandten Prostaglandine PGE₁ und PGE₂ zeigten einen Anstieg des Luciferase-Signals auf das 15-fache bei PGE₁ und auf das 10-fache bei PGE₂ (beide p < 0,05). Unter FSK-Stimulation zeigte sich ein Signalanstieg um 40% für PGE₁ (p < 0,05), um 50% für PGE₂ (p < 0,05) und um 30% für 8-iso-PGE₂ (n.s.).

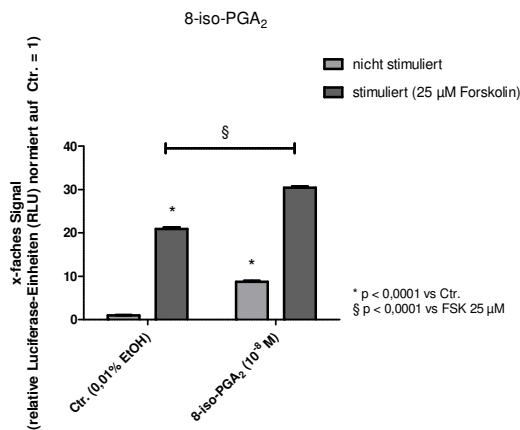
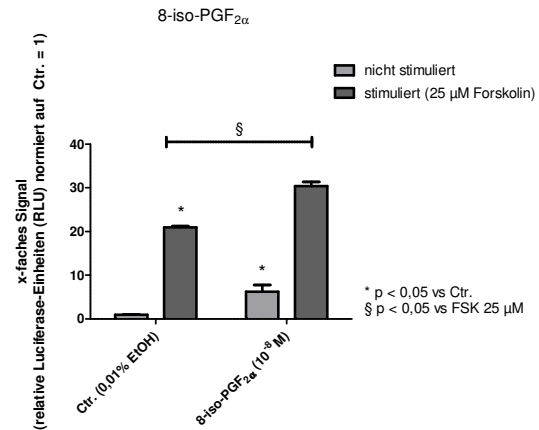
A**B**

Abbildung 10: Effekte der Isoprostane 8-iso-PGA₂ (Abbildung Teil A) und 8-iso-PGF_{2α} (Abbildung Teil B) auf den Transkriptionsfaktor CREB in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation des CREB-Transkriptionsfaktors erfolgte über 25 µM FSK. Konzentrationen der Testsubstanzen: 10⁻⁸ M. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit 6 h und n = 6. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr., § p < 0,05 vs FSK 25 µM.

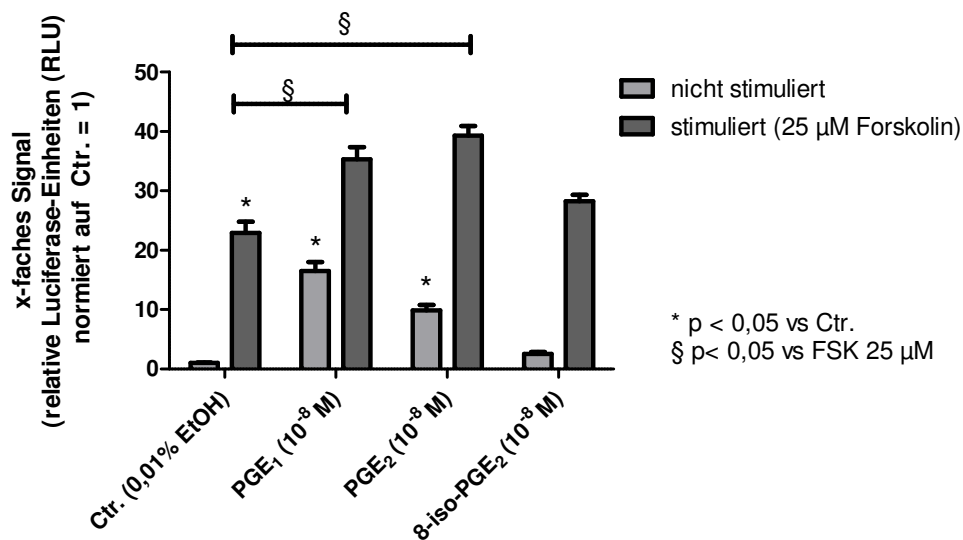


Abbildung 11: Effekte von PGE₁, PGE₂ und 8-iso-PGE₂ auf dem CREB-Signalweg in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Für die Stimulation des CREB-Signalweges wurde 25 µM FSK verwendet. Die Testsubstanzen wurden in der Konzentration 10⁻⁸ M eingesetzt. Inkubationszeit: 6 h, n = 15. Normierung: Ctr. nicht stimuliert = 1. * p < 0,05 vs Ctr., § p < 0,05 vs FSK 25 µM.

Für die Prostaglandine PGE_1 und PGE_2 sowie das Isoprostan 8-iso- PGE_2 wurde untersucht, ob an der Aktivierung des CREB-Signalweges die Prostaglandinrezeptoren DP oder EP_4 und die Adenylylzyklase beteiligt sind. Um dies zu untersuchen wurden Luciferase-Versuche mit den Rezeptorblockern AH68090 (1 mM, 100 μM , 50 μM) und L-161,982 (100 μM , 50 μM) sowie den Inhibitoren SQ22,536 (1 mM) und KH7 (100 μM) durchgeführt. Die Inhibition der Adenylylzyklase führte bereits unter Kontrollbedingungen zu einer Unterdrückung des Luciferasesignals. Der unselektive DP- und EP-Rezeptorblocker AH6809 zeigte unter den gewählten Bedingungen keinen Hemmeffekt. Unter dem selektiven EP_4 -Rezeptorblocker L-161,982 zeigte sich eine signifikante Reduktion des Luciferase-Signals nach Aktivierung mit PGE_1 oder PGE_2 (Abbildung 12). Dies galt sowohl für die nicht stimulierte als auch die FSK-stimulierte Luciferasereaktion. Unter Kontrollbedingungen hatte der Rezeptorblocker L-161,982 keinen Effekt auf die Signalintensität der Luciferasereaktion. Der Effekt von 8-iso- PGE_2 auf die Luciferase konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht durch den EP_4 -Rezeptorantagonisten beeinflusst werden.

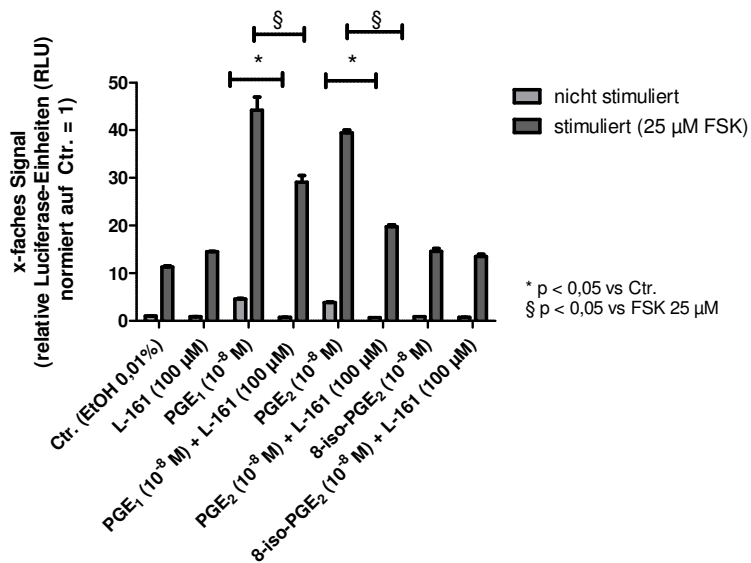


Abbildung 12: Effekt des EP4-Rezeptorblockers L-161,982 auf die Prostaglandine PGE₁ und PGE₂ sowie das Isoprostan 8-iso-PGE₂ im Luciferase-Versuch beim CREB-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen

Konzentrationen der Testsubstanzen: 10⁻⁸ M, des Rezeptorblockers L-161,982: 100 µM. Inkubationszeit: 6 h, n = 3. Normiert auf Ctr. nicht stimuliert = 1.

* p < 0,05 vs PGE₁/PGE₂, § p < 0,05 vs. PGE₁/PGE₂ unter Stimulation mit 25 µM FSK.

Für den CREB-Transkriptionsfaktor wurden nach Literaturrecherche die Zielgene HO-1 und COX-2 (97) für die Genexpressionsanalyse ausgewählt. Für die Genexpressionsanalyse in HUVEC-Zellen wurden für die Stimulation des CREB-Signalweges 25 µM FSK verwendet. Die jeweiligen Testsubstanzen wurden in der Konzentration 10⁻⁸ M eingesetzt. Für die HO-1 kam es unter keiner der gewählten Bedingungen zu einer signifikanten Beeinflussung der Genexpression (Abbildung 13, Teil A). Es zeigte sich lediglich ein Trend für eine verstärkte Genexpression unter FSK und PGE₂. Bei der COX-2 zeigte sich nach Stimulation mit FSK eine Zunahme der Genexpression bei gleichzeitiger Aktivierung mit PGE₂ (Abbildung 13, Teil B). Stimulation mit FSK oder PGE₂ alleine führte unter den gewählten Versuchsbedingungen lediglich zu einer tendentiell gesteigerten Expression der COX-2.

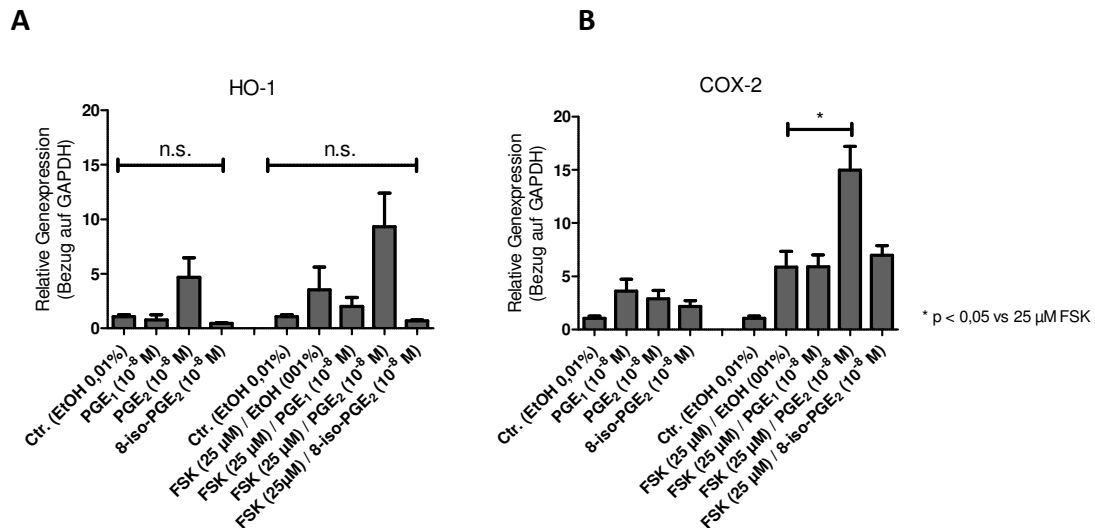


Abbildung 13: Genexpressionsanalyse in HUVEC-Zellen der Prostaglandine PGE₁ und PGE₂ sowie des Isoprostans 8-iso-PGE₂ beim CREB-Transkriptionsfaktor für die Zielgene HO-1 (Teil A der Abbildung) und COX-2 (Teil B der Abbildung)
 Stimulation: 25 µM FSK. Konzentration der Testsubstanzen: 10⁻⁸ M. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs. FSK 25 µM.

In einem weiteren Experiment mit HUVEC-Zellen konnte die durch PGE₂ gesteigerte Genexpression der COX-2 durch den EP₄-Rezeptorblocker L-161,982 signifikant verringert werden (Abbildung 14 Teil B). Für die HO-1 zeigten sich keine signifikanten Effekte. Interessanter Weise führte die gleichzeitige Inkubation der HUVEC-Zellen mit 8-iso-PGE₂ und EP₄-Rezeptorblocker zu einer 3-fach gesteigerten Expression der HO-1 und einer 5-fach gesteigerten Expression der COX-2 (Abbildung 14, beide p < 0,05).

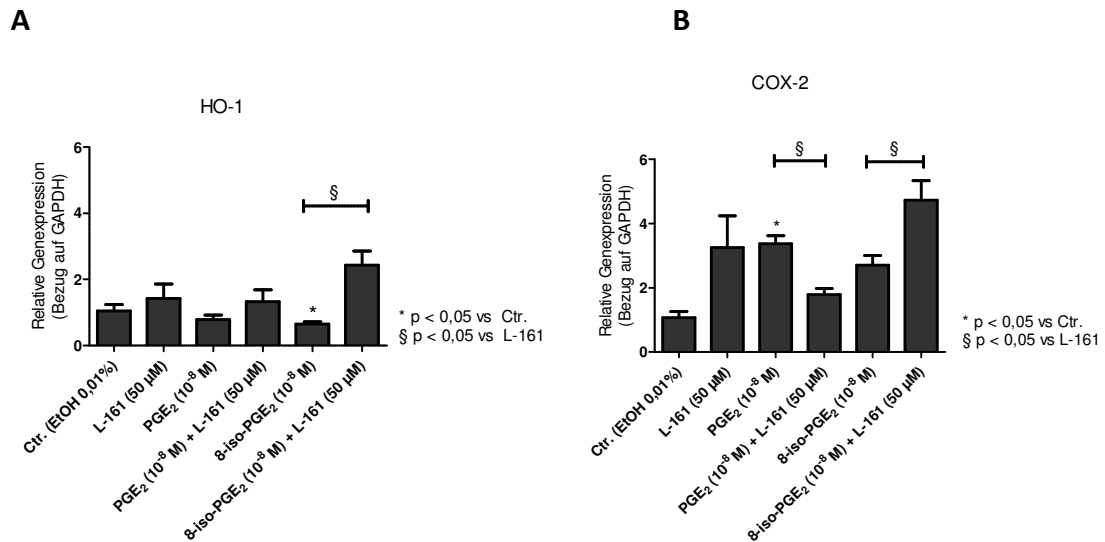


Abbildung 14: Genexpressionsanalyse in HUVEC-Zellen: Einfluss von PGE₂ und 8-iso-PGE₂ auf die Zielgene HO-1 (Abbildung Teil A) und COX-2 (Abbildung Teil B) unter Rezeptorblockade mit dem EP4-Rezeptor L-161,982

Konzentrationen von PGE₂ und 8-iso-PGE₂: 10⁻⁸ M, der Rezeptorblocker L-161,982 wurde in der Konzentration 50 µM eingesetzt. Kontrollen: 0,01% EtOH bzw. 50 µM L-161,982. Inkubationszeit 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr., § p < 0,05 vs L-161,982.

4.3 Der HIF-1-Transkriptionsfaktor und Zielgene

Eine Möglichkeit der Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 ist 300 µM CoCl₂ (41). Unter den in der vorliegende Arbeit gewählten Bedingungen kam es jedoch bei EA.HY-Zellen unter Stimulation mit CoCl₂ für 6 h nach Luciferase-Zugabe zu einem Farbumschlag des Kulturmediums von orange-gelb zu braunrot und zu einer Reduktion des Luciferase-Signals auf die Hälfte in den stimulierten Bedingungen gegenüber den nicht stimulierten Bedingungen (Abbildung 15). Auch nach verschiedenen Waschschritten konnte keine Stimulation der Luciferaseaktivität durch CoCl₂ erzielt werden. Als Alternativen zur Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurden TNFα, DFO und Hypoxie beschrieben (64, 158). Während TNFα unter den gewählten Bedingungen zu keiner Steigerung der Luciferaseaktivität führte, zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen eine 1,2-fache und unter DFO-Stimulation eine 3-fache Steigerung der Aktivität. Aufgrund der besseren Stimulation, der einfacheren

Handhabung und der geringeren Streuung der Einzelwerte wurde für die weiteren Versuche 16 μM DFO eingesetzt (Abbildung 15).

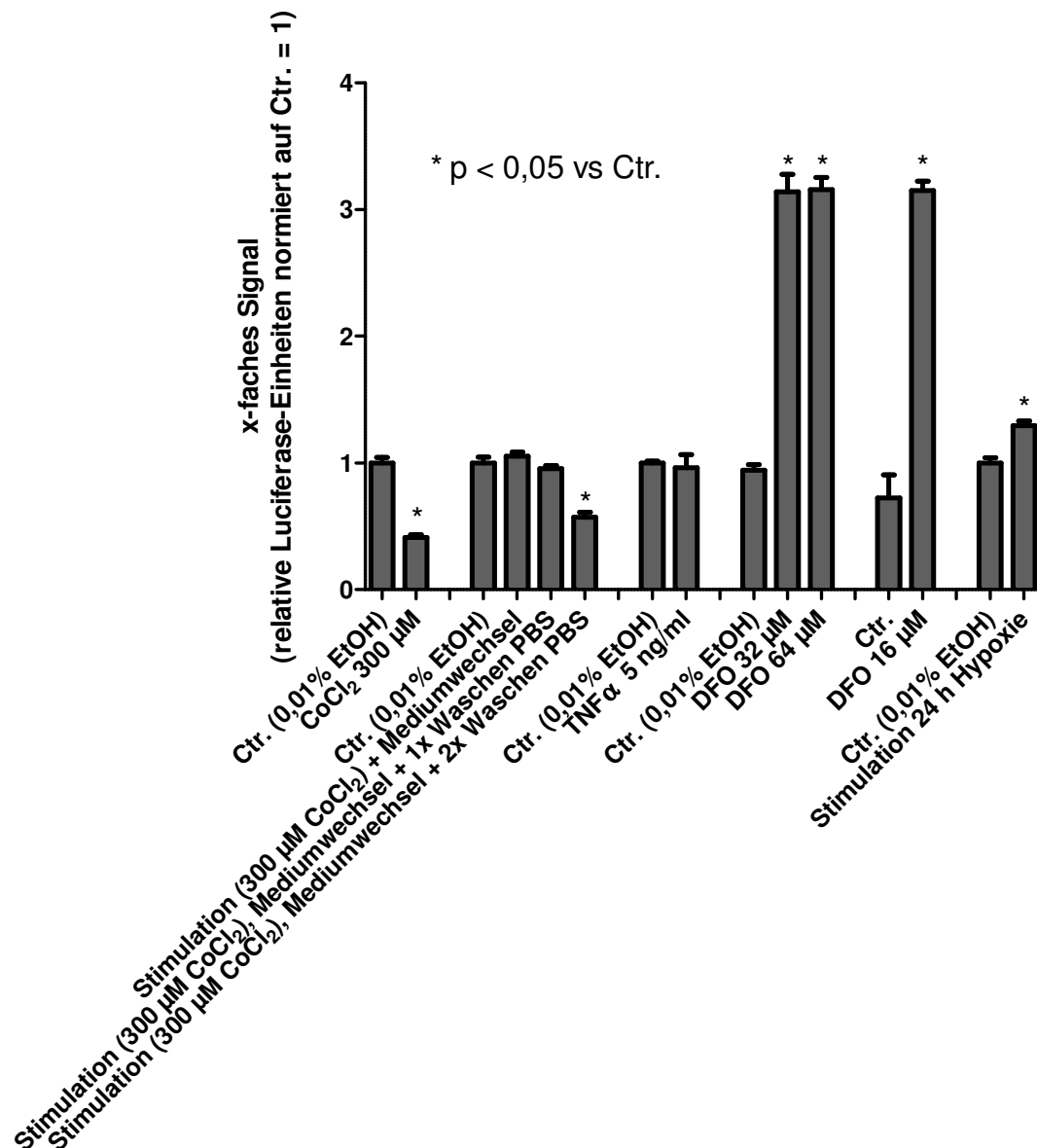


Abbildung 15: Versuche zur Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch, Normierung jeweils unbehandelte Kontrolle = 1.

Block 1: Effekt von 300 μM CoCl₂ gegenüber mediumbehandelten EA.HY-Zellen nach 6 h Inkubation mit Reduktion auf die Hälfte des Kontrollsignals nach Zugabe der Luciferase, $n = 3$ (* $p < 0,05$ vs Ctr.)

Block 2: Effekt von 6-stündiger Inkubation von EA.HY-Zellen mit 300 μM CoCl₂ mit anschließendem Mediumwechsel und Auswaschen des CoCl₂ mittels PBS: $n = 6$ für alle Bedingungen, ein Mediumwechsel und einmaliges Waschen mit PBS zeigen keinen Effekt auf das Luciferase-Signal. Zweimaliges Waschen mit PBS anschließend

Mediumwechsel zeigt einen Wascheffekt mit einer Reduktion des Signals auf das 0,6-fache (* $p < 0,05$ vs Ctr.)

Block 3: Effekt von 5 ng/ml TNF α gegenüber unbehandelten EA.HY-Zellen nach 6 h Inkubation: $n = 3$ (* $p > 0,05$ vs Ctr.)

Block 4: Effekt von 32 μ M DFO und 64 μ M DFO gegenüber unbehandelten EA.HY-Zellen: $n = 3$ (* $p < 0,05$ vs Ctr.)

Block 5: Effekt von 16 μ M DFO gegenüber unbehandelten EA.HY-Zellen, $n = 6$
* $p < 0,05$ vs Ctr.

Block 6: Effekt von 24 h Hypoxie gegenüber einer unbehandelten Kontrolle: $n = 6$
* $p < 0,05$ vs Ctr.

Das Isoprostan 8-iso-PGD₂ führte sowohl für nicht stimulierte Zellen als auch nach Stimulation mit 16 μ M DFO zu einer signifikanten Zunahme der Luciferaseaktivität (Abbildung 16).

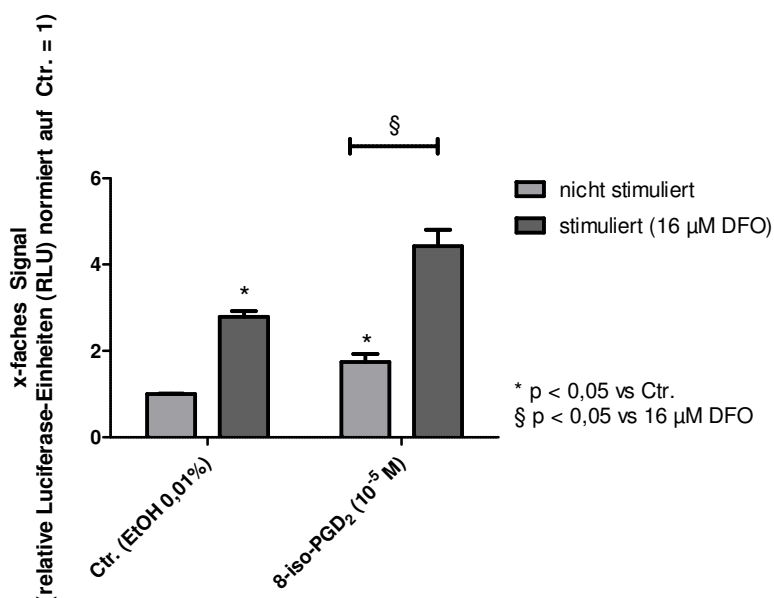


Abbildung 16: Effekt von 8-iso-PGD₂ auf den HIF-1-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Stimulation des HIF-1-Transkriptionsfaktors: 16 μ M DFO. 8-iso-PGD₂ wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Für alle Bedingungen $n = 9$, Inkubationszeit: 6 h. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1.

* $p < 0,05$ vs. Ctr., § $p < 0,05$ vs 16 μ M DFO.

Für den Transkriptionsfaktor HIF-1 wurden anhand von Literatur folgende Zielgene ausgewählt: VEGFR-1 (Flt-1) (98), VEGFR-2 (Flk-1) (99), VEGFA (55, 56, 160), iNOS (NOS-

2) (100) und HO-1 (160, 161). Die iNOS-Expression konnte in den HUVEC-Zellen auf Grund zu hoher Zyklenzahlen qPCR nicht ausgewertet werden. Sowohl die Expression der HO-1 als auch von VEGF wurde durch 8-iso-PGD₂ um das 60-fache bzw. 300-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert (Abbildung 17). Weder unter DFO alleine als auch unter der Kombination mit 8-iso-PGD₂ kam es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer Veränderung der Genexpression von HO-1 und VEGFA.

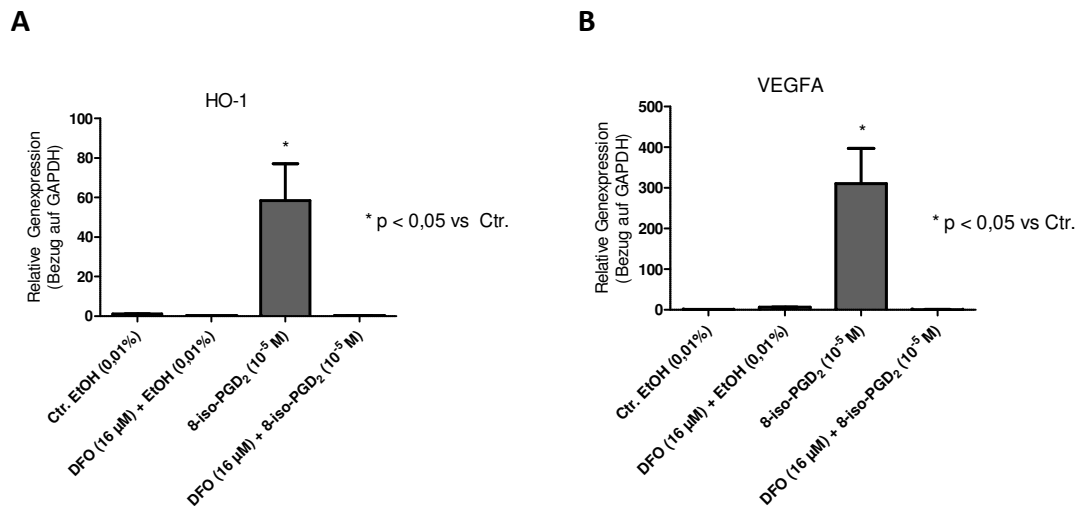


Abbildung 17: Effekt von 8-iso-PGD₂ auf die relative Genexpression in HUVEC-Zellen der Zielgene HO-1 (Abbildung Teil A) und VEGFA (Abbildung Teil B). Stimulation des HIF-1-Transkriptionsfaktors mit 16 µM DFO. Konzentration von 8-iso-PGD₂: 10⁻⁵ M. Für alle Bedingungen n = 3, Inkubationszeit: 6 h. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression mit Bezug auf das *Houesekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr.. Abweichend von den anderen Abbildungen erfolgt in diesem Fall die Darstellung der beiden Teile der Abbildung in verschiedenen Skalierungen zur Wahrung der besseren Übersichtlichkeit.

Weder DFO noch 8-iso-PGD₂ zeigten einen Effekt auf die Expression des VEGFR-1 (Abbildung 18 Teil A). Sowohl für DFO als auch für 8-iso-PGD₂ kam es zu einer Abnahme der VEGFR-2 Expression, wobei dieses Ergebnis lediglich für 8-iso-PGD₂ signifikant ist (Abbildung 18 Teil B).

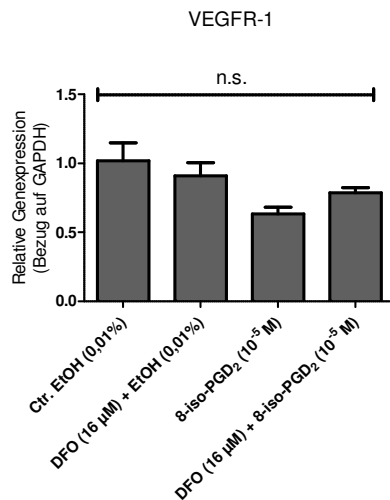
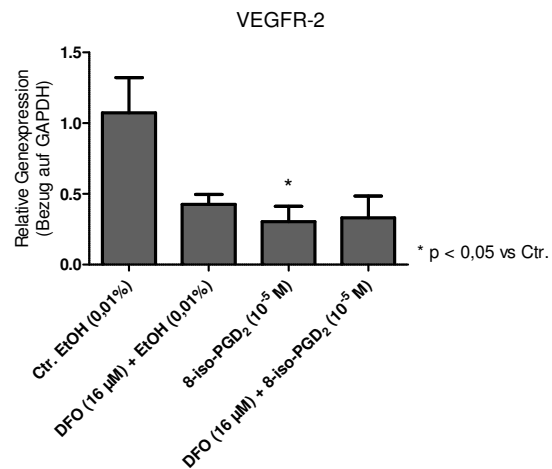
A**B**

Abbildung 18: Effekt von 8-iso-PGD₂ auf die relative Genexpression der Zielgene VEGFR-1 (Abbildung Teil A) und VEGFR-2 (Abbildung Teil B) in HUVEC-Zellen. Die Stimulation des HIF-1-Signalweges erfolgte über 16 µM DFO. 8-iso-PGD₂ wurde in einer Konzentration von 10⁻⁵ M eingesetzt. Für alle Bedingungen n = 3, Inkubationszeit: 6 h. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

4.4 Der NFAT-Transkriptionsfaktor und Zielgene

Unter Stimulation der EA.HY-Zellen mit 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin konnte eine 4,5-fache Signalinduktion beobachtet werden (Abbildung 19). Unter nicht stimulierten Bedingungen zeigte 8-iso-PGD₂ einen Anstieg des Luciferase-Signals auf das 1,7-fache gegenüber der Kontrolle (p < 0,05). Unter Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigte sich jedoch kein weiterer Effekt.

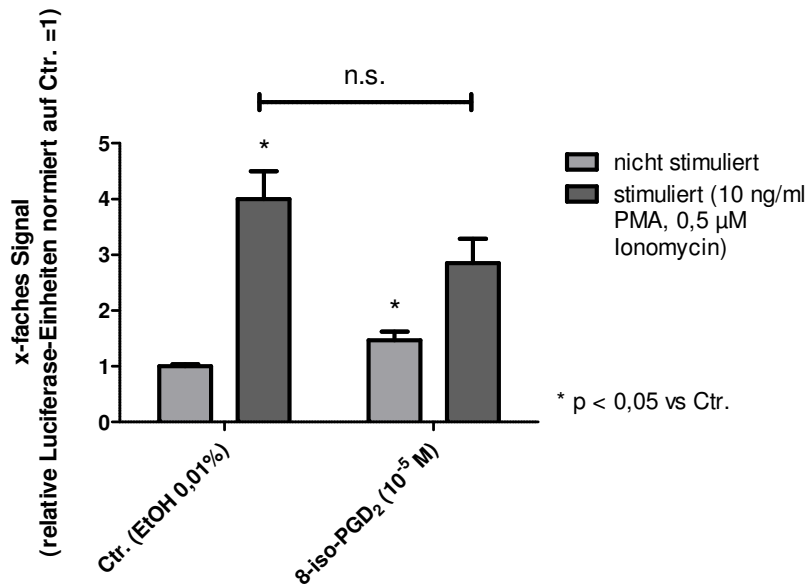


Abbildung 19: Effekt von 8-iso-PGD₂ auf den NFAT-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Der NFAT-Transkriptionsfaktor wurde über 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin stimuliert. Die Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 10⁻⁵M eingesetzt. Inkubationszeit: 7 h, n = 6. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs. Ctr..

Das Isoprostan AG113A (5-F_{2t}-IsoP oder iPF_{2α} VI) zeigte im Luciferase-Versuch ebenfalls einen Effekt, jedoch führte es im Gegensatz zu 8-iso-PGD₂ zu einer Reduktion der Luciferase-Aktivität (Abbildung 20). Dieser Effekt war nicht für das Stereoisomer AG113B (5-epi-5-F_{2t}-IsoP oder 5-epi-iPF_{2α} VI) zu beobachten. Unter Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigte sich lediglich ein Trend zur Reduktion des Luciferasesignals.

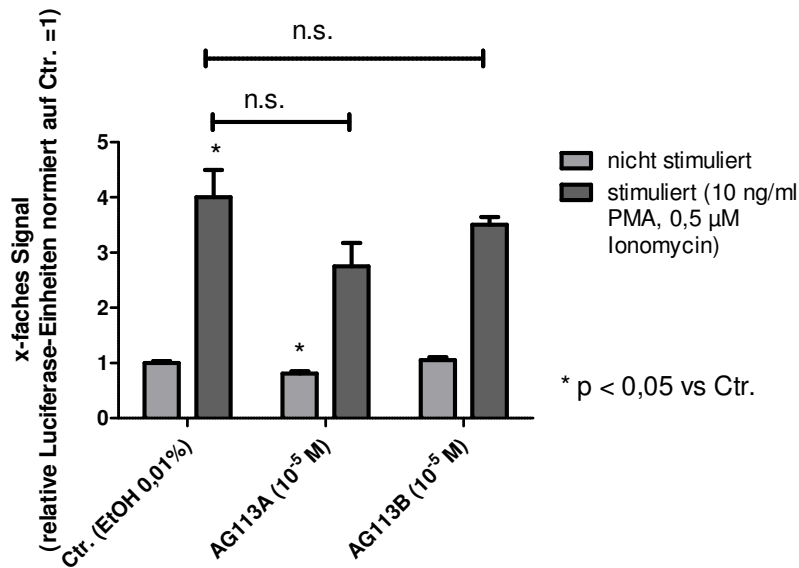


Abbildung 20: Luciferase-Versuch für die Phytoprostane AG113A und AG113B auf dem NFAT-Signalweg in EA.HY-Zellen

Die Stimulation des Transkriptionsfaktors erfolgte über 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin, die Phytoprostane wurden in einer Konzentration von 10⁻⁵ M eingesetzt. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit von 7 h und n = 6. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. * p < 0,05 vs Ctr..

Interessanter Weise zeigte auch das Isoprostan ent-1 (5-ent-F_{2c}-IsoP) eine Reduktion der Promotoraktivität für den NFAT-Luciferase-Reporter. Im Gegensatz zu AG113A war dieser Effekt jedoch nur nach Stimulation mit PMA und Ionomycin signifikant (Abbildung 21).

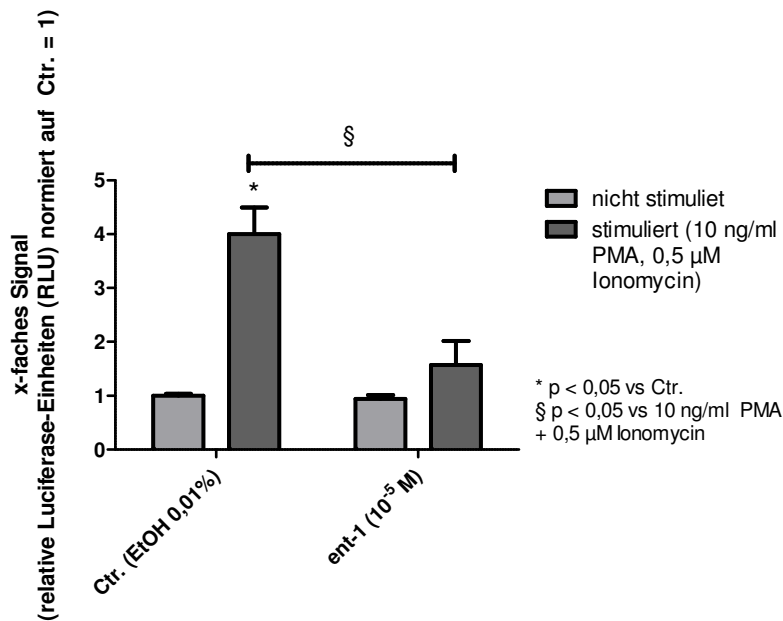


Abbildung 21: Effekt des Isoprostans ent-1 auf dem NFAT-Signalweg in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation des Signalweges erfolgte über 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin, ent-1 wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit von 7 h und n = 6. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr., § p < 0,05 vs 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin.

AG113A und ent-1 standen nicht mehr für weiterführende Zielgen-Analysen zur Verfügung. Alle weiteren Genexpressionsanalysen sind im Kapitel Eiöl und Spirit of Charismon (Kapitel 4.5) dargestellt.

4.5 Eiöl und Spirit of Charismon

Eiöl und Spirit of Charismon wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf ihren Einfluss auf die Luciferaseaktivität im Luciferase-Reporter-Assay als auch auf ihren Einfluss auf die Expression möglicher Zielgene, die unter der Kontrolle der Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, HIF-1, NFAT und NFκB stehen, untersucht. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden diese Substanzen zunächst in 1%iger Konzentration im Luciferase-Reporter-Assay der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NFκB eingesetzt.

Für 1% Spirit of Charismon zeigte sich für den NFAT-Promotor eine Reduktion der Luciferase-Aktivität, sowohl für nicht stimulierte als auch für mit PMA und Ionomycin stimulierte EA.HY-Zellen (nicht dargestellt). Bei Inkubation mit 1 % Spirit of Charismon bzw. 1 % Eiöl zeigte sich für nicht stimulierte EA.HY-Zellen kein Effekt auf die Luciferase-Aktivität des NFAT-Reportersystems gegenüber der Kontrolle (Abbildung 22). Unter Stimulationsbedingungen zeigte sich bei Inkubation mit 1% Spirit of Charismon eine Reduktion des Signals um 20%, bei Inkubation mit 1% Eiöl um 30%.

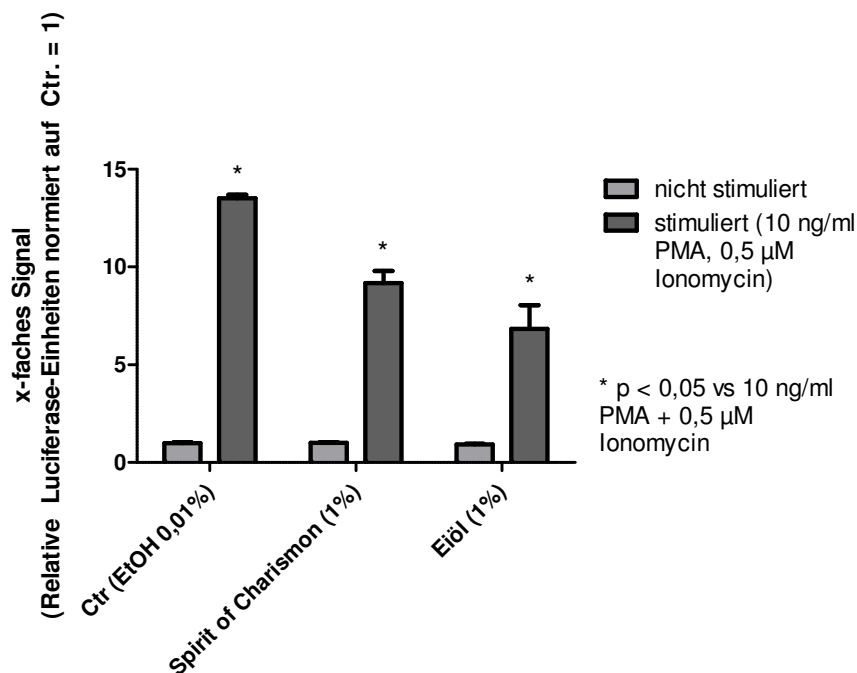


Abbildung 22: Effekt von 1% Spirit of Charismon und 1% Eiöl auf EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation der EA.HY-Zellen erfolgte mit 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin. Spirit of Charismon und Eiöl wurden in 1% iger Konzentration eingesetzt. Alle Bedingungen n = 6, Inkubationszeit: 7 h. Normierung auf unbehandelte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr..

Für die 3 Zielgene VEGFA (157, 162, 163), VEGFR-1 (101) und VEGFR-2 (101) wurde mittels Genexpressionsanalyse in HUVEC-Zellen ermittelt, ob die Substanzen Spirit of Charismon und Eiöl Einfluss auf die Expression dieser Zielgene des NFAT-Transkriptionsfaktors haben. Zunächst zeigte sich für alle 3 Zielgene eine adäquate Reaktion auf den Stimulus aus 10 ng PMA und 0,5 µM Ionomycin, wobei PMA und

Ionomycin die Expression des VEGFA-Gens um das 40-fache (Abbildung 23) sowie die Expression des VEGFR-1-Gens auf das 5-fache steigerten (Abbildung 24 Teil A) und die Expression des VEGFR-2-Gens um die Hälfte reduzierten (Abbildung 24 Teil B). Für alle 3 Zielgene zeigten die Substanzen Eiöl und Spirit of Charismon keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression im Vergleich zu den jeweiligen nicht stimulierten bzw. stimulierten Kontrollen, der über den Stimulationseffekt mit PMA und Ionomycin hinausging. Dieser Versuch zeigte jedoch eine gegensinnige Regulation der Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 auf den Stimulus 10 ng PMA und 0,5 μ M Ionomycin hin (Abbildungen 23 und 24).

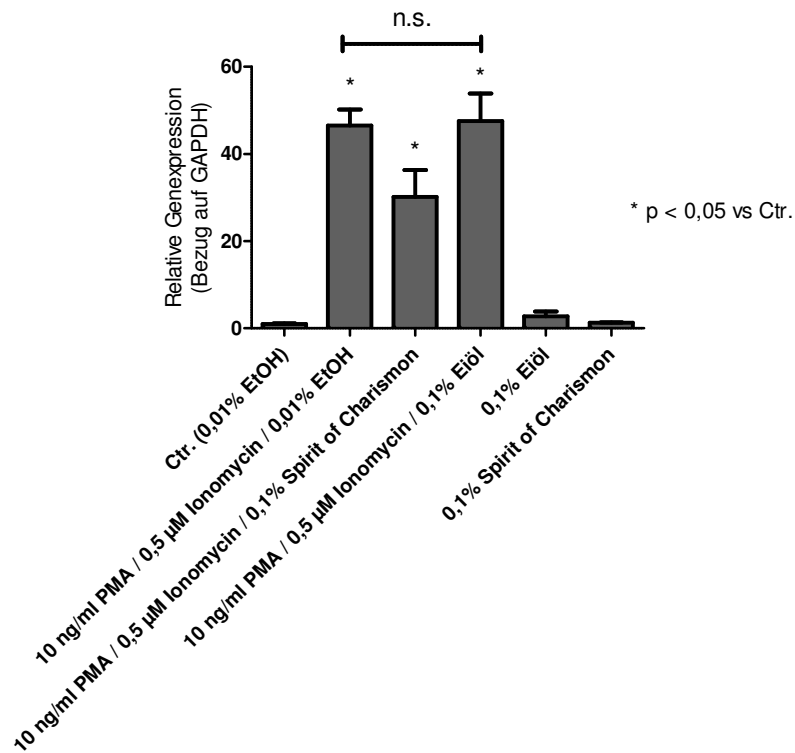


Abbildung 23: Genexpressionsanalyse des Zielgenes VEGFA für den NFAT-Transkriptionsfaktor in HUVEC-Zellen mit 0,1% Spirit of Charismon und 0,1% Eiöl. Die Stimulation des NFAT-Transkriptionsfaktors erfolgte über 10 ng/ml PMA und 0,5 μ M Ionomycin. Spirit of Charismon und Eiöl wurden in einer Konzentration von 0,1% eingesetzt. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit 7 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression mit Bezug auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

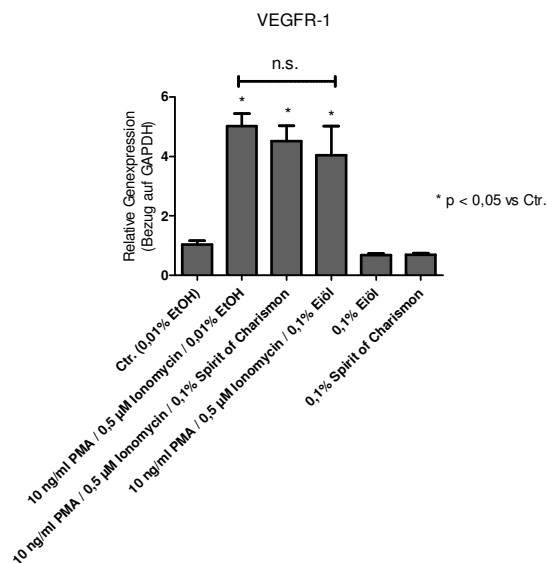
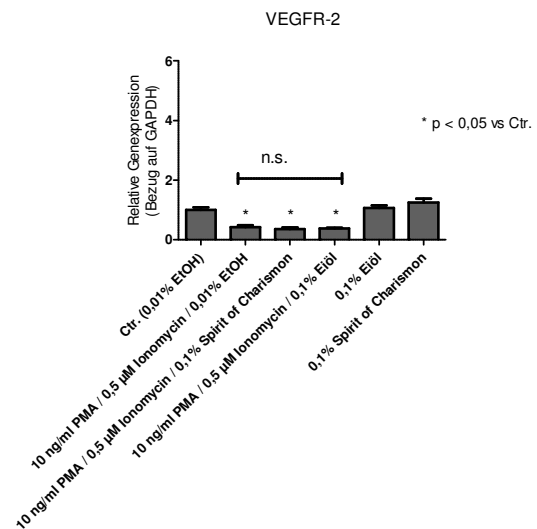
A**B**

Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der Zielgene VEGFR-1 (Abbildung Teil A) und VEGFR-2 (Abbildung Teil B) auf dem NFAT-Signalweg in HUVEC-Zellen mit 0,1% Spirit of Charismon und 0,1% Eiöl

Die Stimulation des Signalweges erfolgte über 10 ng/ml PMA und 0,5 µM Ionomycin. Für alle Bedingungen: Inkubationszeit 7 h und n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Darstellung der relativen Genexpression mit Bezug auf das Housekeeping-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

4.6 Der NFκB-Transkriptionsfaktor und Zielgene

Beim Transkriptionsfaktor NFκB zeigte sich in EA.HY-Zellen ein Effekt für das Isoprostan ent-1. Unter dem Stimulus 5 ng/ml TNFα konnte eine 7-fache Signalinduktion beobachtet werden (Abbildung 25). Bei Inkubation mit ent-1 alleine zeigte sich keine Signaländerung gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Unter stimulierten Bedingungen zeigte sich ein Signalabfall des Luciferasesignals um 20%.

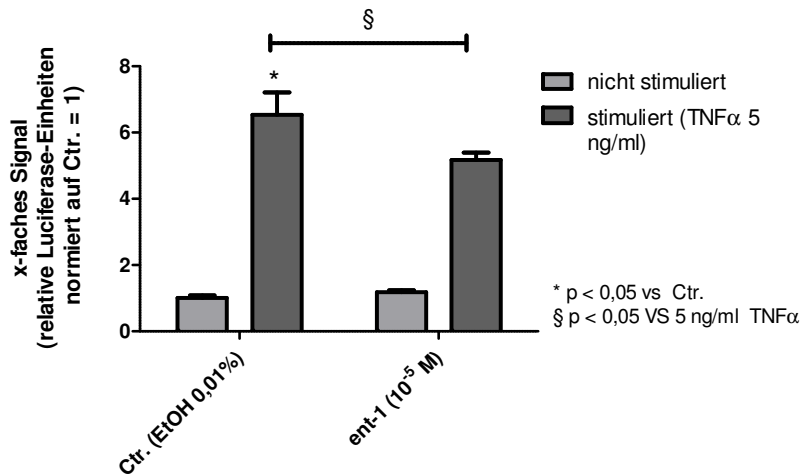


Abbildung 25: Effekt des Isoprostans ent-1 auf dem NFκB-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen im Luciferase-Versuch

Die Stimulation des NFκB-Signalweges erfolgte mit 5 ng/ml TNFα. Die Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 10⁻⁵ M eingesetzt. Inkubation 6 h, n = 6. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr: § p < 0,05 vs 5 ng/ml TNFα.

Des Weiteren konnte auf dem NFκB-Signalweg ein Effekt bei Nitroölsäuren gesehen werden. Auf den Stimulus 5 ng/ml TNFα konnte eine Signalsteigerung auf das 7-fache der nicht stimulierten Kontrolle erreicht werden (s.o.). Die Inkubation mit Nitroölsäuren zeigte ein 10-fach gesteigertes Luciferase-Signal gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 26). Unter stimulierten Bedingungen konnte eine 4-fache Aktivierung durch Nitroölsäure beobachtet werden. Als Kontrolle diente Ölsäure. Im Gegensatz zur Nitroölsäure konnte bei der Ölsäure kein Effekt auf dem Signalweg des Transkriptionsfaktors NFκB gemessen werden (Abbildung 26).

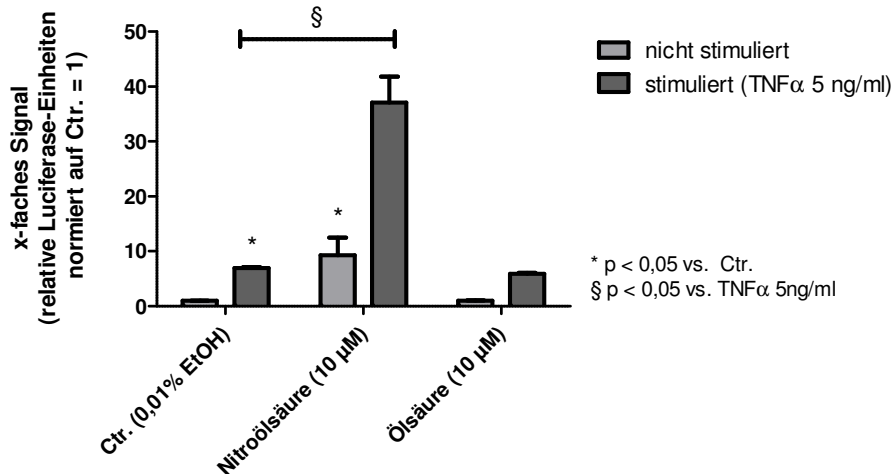


Abbildung 26: Effekt von Nitroölsäure und Ölsäure im Luciferase-Versuch auf den NFκB-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen

Für die Stimulation des Signalweges wurde 5 ng/ml TNFα verwendet. Nitroölsäure und Ölsäure wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Für alle Bedingungen n = 3. Die Normierung erfolgte auf die nicht stimulierte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr., § p < 0,05 vs 5 ng/ml TNFα.

Für das Isoprostan 8-iso-PGD₂ zeigte sich eine 4-fache Signalverstärkung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 27). Als Kontrolle diente PGD₂, das im Luciferase-Versuch keinen ausgeprägten Effekt zeigte. Die Stimulation mit 5 ng/ml TNFα führte zu einem Signalanstieg auf das 14-fache der Kontrolle. Unter Stimulation zeigte sich ebenfalls kein Effekt für PGD₂ und eine Tendenz eines Signalanstieges auf das 1,5-fache für 8-iso-PGD₂ (n.s.).

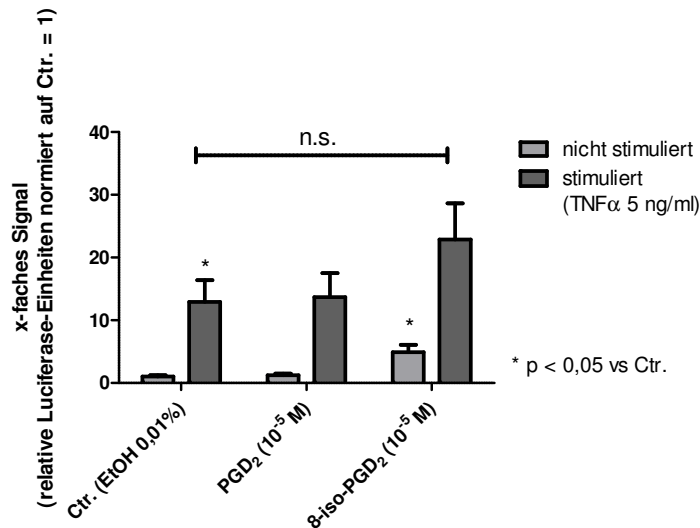


Abbildung 27: Effekt von PGD₂ und 8-iso-PGD₂ im Luciferase-Versuch auf den NFκB-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen

Für die Stimulation des NFκB-Signalweges wurde 5 ng/ml TNFα verwendet. PGD₂ und 8-iso-PGD₂ wurden in einer Konzentration von 10⁻⁵ M eingesetzt. Für alle Bedingungen n = 9, Inkubationszeit: 6 h. Die Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1.

* p < 0,05 vs Ctr..

Der spezifische Effekt des Isoprostans 8-iso-PGD₂ legte die Überlegung nahe, ob 8-iso-PGD₂ eine proinflammatorische Komponente besitzt. Aus diesem Grund wurde im Versuch verstärkt auf Vitalität und Morphologie der Zellkultur der HUVEC-Zellen geachtet und dies fotografisch dokumentiert (t = 6 und t = 24). Zum Vergleich wurden in diesem Fall die Isoprostane 8-iso-PGE₂ und 8-iso-PGF_{2α} als Kontrolle mit beobachtet. Zu diesen beiden Zeitpunkten waren in den Ansätzen mit 8-iso-PGD₂ deutlich mehr apoptotische Zellen zu finden als in den übrigen Bedingungen. Für 8-iso-PGD₂ wurde in diesem Zusammenhang jedoch keine Vitalitätsanalyse durchgeführt (Abbildung 28).

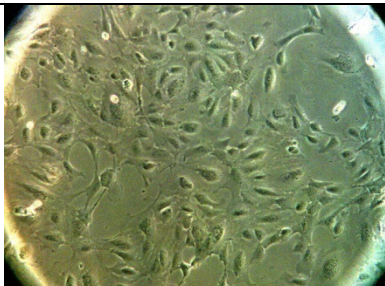
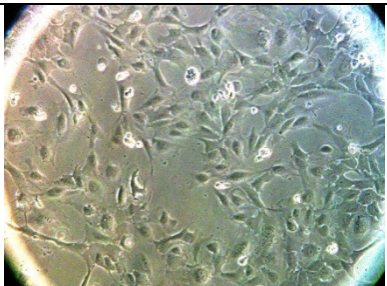
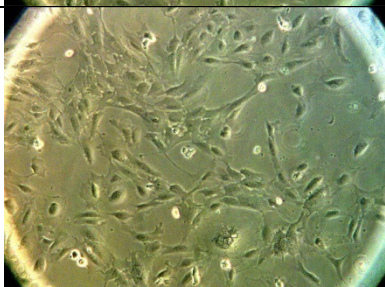
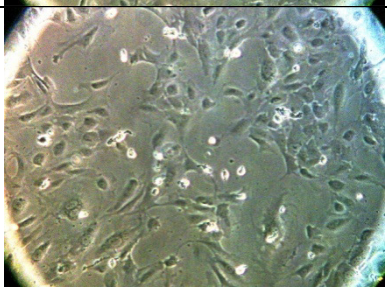
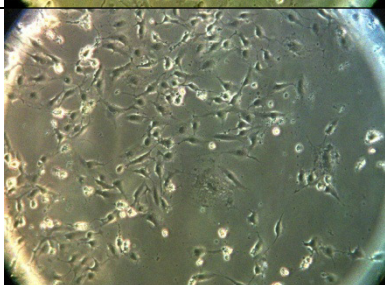
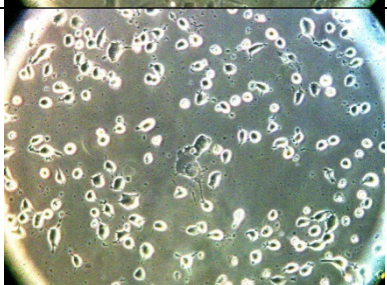
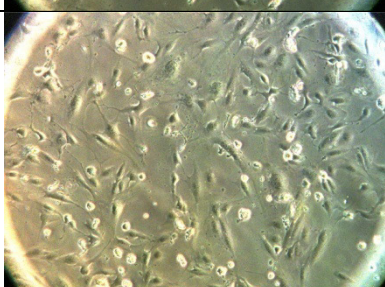
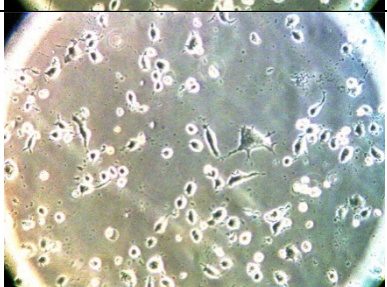
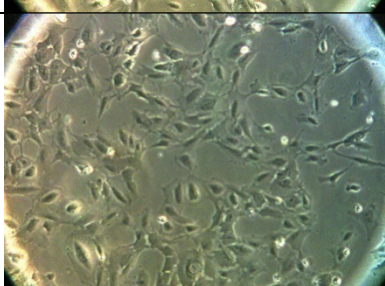
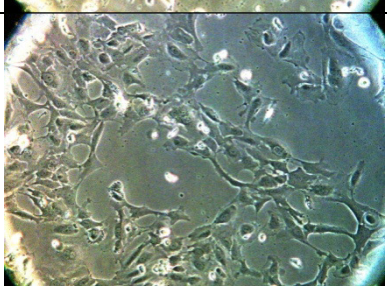
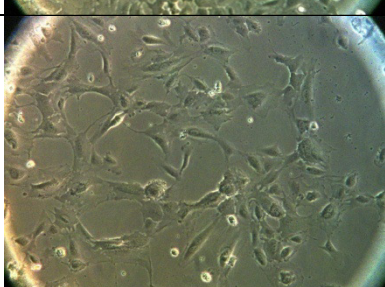
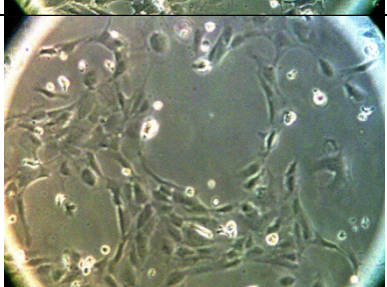
	t = 6	t = 24
Ctr (0,01% EtOH)		
TNF α (5 ng/ml) / EtOH (0,01%)		
TNF α (5 ng/ml) / 8-iso-PGD $_2$ (10 $^{-5}$ M)		
8-iso-PGD $_2$ (10 $^{-5}$ M)		
8-iso-PGE $_2$ (10 $^{-5}$ M)		
8-iso-PGF $_{2\alpha}$ (10 $^{-5}$ M)		

Abbildung 28: Fotodokumentation der Zellmorphohologie von HUVEC-Zellen unter Einfluss der Isoprostane 8-iso-PGD₂, 8-iso-PGF_{2α} und 8-iso-PGE₂ 6 h und 24 h nach Isoprostanzugabe, Vergrößerung: 400 x.

Für die Stimulation wurde 5 ng/ml TNFα verwendet. Die Isoprostane wurden in einer Konzentration von 10⁻⁵ M eingesetzt.

Nach Literaturrecherche wurden für den NFκB-Transkriptionsfaktor die Zielgene COX-2 (164 – 166), MYLK (102), neuronale NOS (nNOS oder NOS-1) (168, 169), eNOS (97), iNOS (157, 170 – 172), PTEN (103), NOX-1 (104), SOD1 (175, 176) und SOD2 (105) für die Genexpressionsanalyse ausgewählt. Diese Zielgene wurden für die Isoprostane und für Nitroölsäure untersucht. Dabei waren NOX-1 und iNOS auf Grund zu hoher Zyklenzahlen in der qPCR wiederholt nicht auswertbar.

Auf den Stimulus TNFα hin zeigte sich bei HUVEC-Zellen für die COX-2 eine Verdopplung des Signals gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 29 Teil A). Dieser Effekt ist statistisch nicht signifikant. Für die COX-2 zeigte 8-iso-PGD₂ ohne zusätzliche Stimulation eine Steigerung des Signals auf das 2,5-fache der nicht stimulierten Kontrolle. Unter Stimulationsbedingungen mit TNFα zeigte sich kein eindeutiger Effekt bei zusätzlicher Inkubation mit 8-iso-PGD₂. Für die MYLK zeigten sich keine Effekte (Abbildung 29 Teil B).

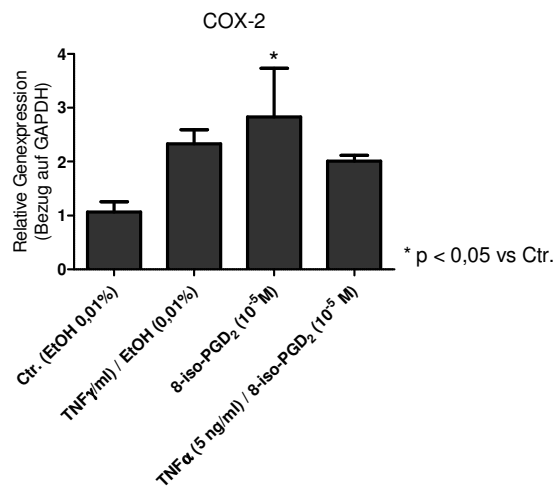
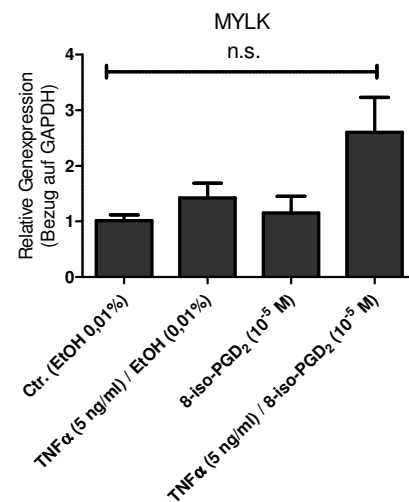
A**B**

Abbildung 29: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NF κ B Signalweg, Zielgene COX-2 (Abbildung Teil A) und MYLK (Abbildung Teil B) mit dem Isoprostan 8-iso-PGD₂

Die Stimulation des Signalweges wurde mit 5 ng/ml TNF α durchgeführt. 8-iso-PGD₂ wurde in einer Konzentration von 10^{-5} M eingesetzt. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

Die Stimulation mit TNF α zeigte bei der nNOS gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle eine leichte Reduktion des Signals auf das 0,7-fache (n.s.). Bei der nNOS konnte in den nicht stimulierten Bedingungen bei Inkubation mit 8-iso-PGD₂ eine deutliche Zunahme des Signals auf das 40-fache der nicht stimulierten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 30 Teil A). Die simultane Inkubation der TNF α -Stimulation mit 8-iso-PGD₂ zeigte ein Signal in Höhe der nicht stimulierten Kontrolle. Für die eNOS zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 30 Teil B).

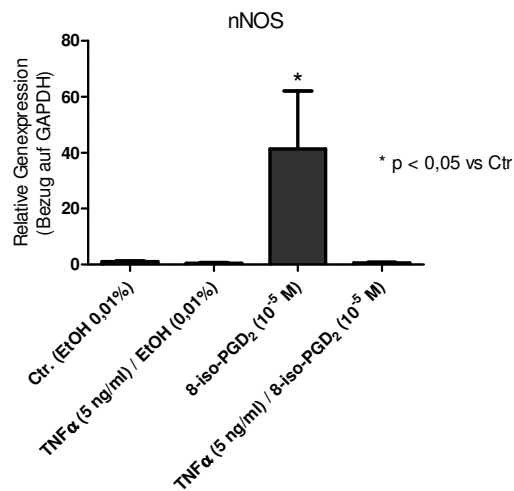
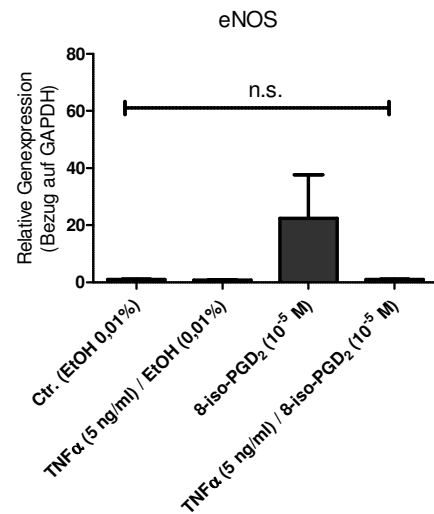
A**B**

Abbildung 30: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg für die Zielgene nNOS (Abbildung Teil A) und eNOS (Abbildung Teil B) mit dem Isoprostan 8-iso-PGD₂

Die Stimulation des Signalweges wurde mit 5 ng/ml TNFα durchgeführt. 8-iso-PGD₂ wurde in der Konzentration 10⁻⁵ M eingesetzt. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

Für die SOD1 zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 31 Teil A). Für die SOD2 zeigte sich bei Co-Stimulation mit TNFα und 8-iso-PGD₂ eine Signalanhebung auf das 5-fache der Kontrolle (Abbildung 31 Teil B). Für PTEN zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 32).

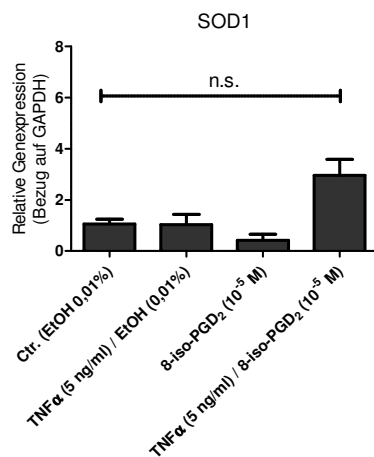
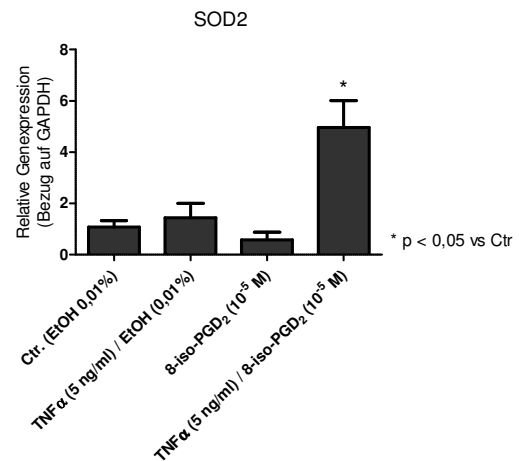
A**B**

Abbildung 31: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg für die Zielgene SOD1 (Abbildung Teil A) und SOD2 (Abbildung Teil B) mit dem Isoprostan 8-iso-PGD₂

Die Stimulation des Signalweges erfolgte mit 5 ng/ml TNFα. 8-iso-PGD₂ wurde in der Konzentration 10⁻⁵ M eingesetzt. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr..

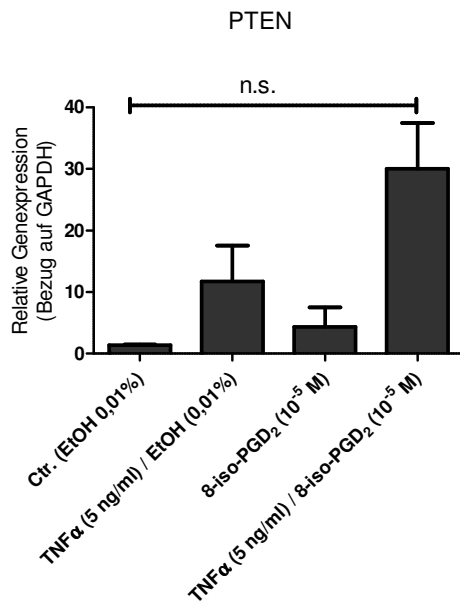


Abbildung 32: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg der Zielgens PTEN mit dem Isoprostan 8-iso-PGD₂

Die Stimulation des Signalweges erfolgte mit 5 ng/ml TNFα. 8-iso-PGD₂ kam in der Konzentration von 10⁻⁵ M zur Anwendung. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH.

Wie oben bereits beschrieben, wurde die Genexpressionsanalyse nicht nur für die Substanz 8-iso-PGD₂ sondern auch für Nitroölsäure durchgeführt. Als Kontrolle wurde Ölsäure verwendet. Für die nNOS und die eNOS konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 33).

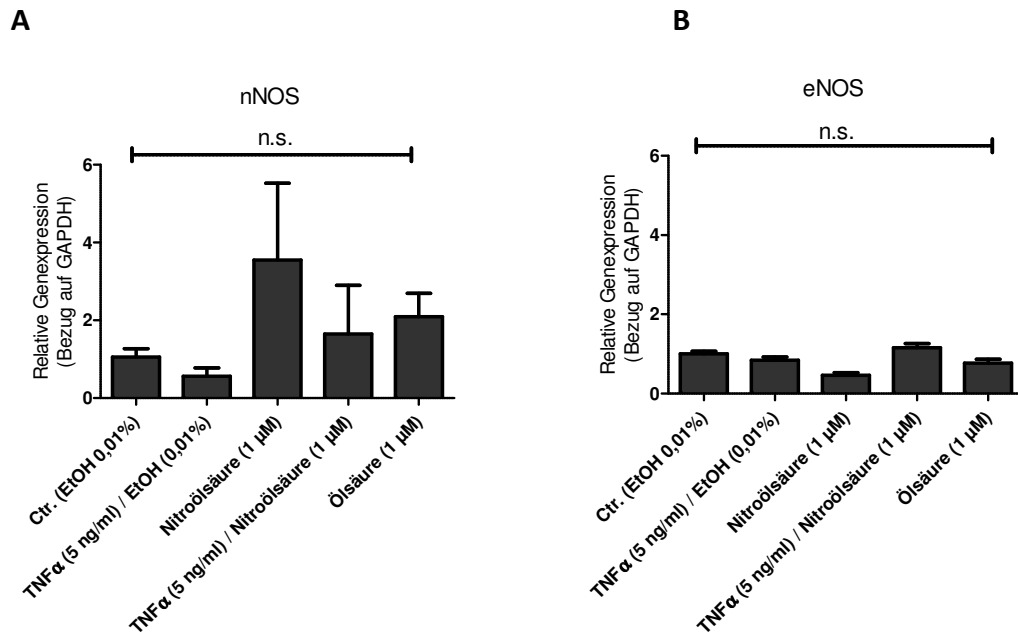


Abbildung 33: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg der Zielgene eNOS (Abbildung Teil A) und nNOS (Abbildung Teil B) mit Nitroölsäure und Ölsäure

Die Stimulation des Signalweges wurde mit 5 ng/ml TNFα durchgeführt. Nitroölsäure und Ölsäure kamen in einer Konzentration von 1 μM zur Anwendung. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH.

TNFα zeigte für die SOD1 und PTEN keine Signaländerung im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 34). Die Co-Stimulation von TNFα und Nitroölsäure zeigte eine Verdreifachung des Kontrollsignals für SOD1 (Abbildung 34 Teil A). Ölsäure zeigte keinen Effekt. Nitroölsäure zeigte einen deutlichen Signalanstieg auf das 20-fache gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 34 Teil B). Die Inkubation mit Nitroölsäure und TNFα zeigte keine zusätzliche Steigerung des Signales.

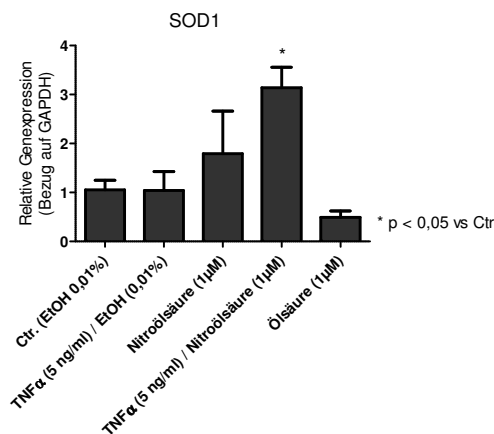
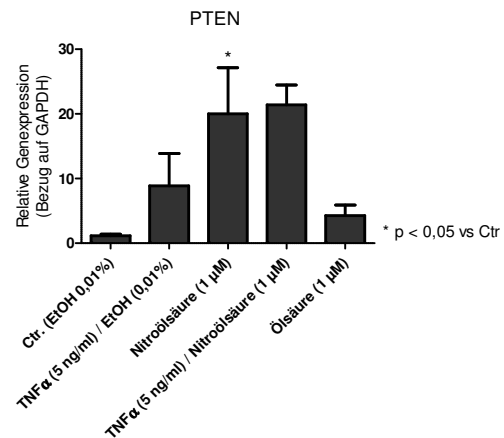
A**B**

Abbildung 34: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB-Signalweg der Zielgene SOD1 (Teil A der Abbildung) und PTEN (Teil B der Abbildung) mit Nitroölsäure und Ölsäure

Die Stimulation des Signalweges wurde mit 5 ng/ml TNFα durchgeführt. Nitroölsäure und Ölsäure kamen in einer Konzentration von 1 µM zur Anwendung. Inkubationszeit: 6 h, n = 4. Normierung: unbehandelte Kontrolle = 1. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH. * p < 0,05 vs Ctr.. In dieser Abbildung sind die beiden Anteile der Graphik abweichend in verschiedener Skalierung dargestellt.

4.7 Oligodeoxynucleotide (ODNs)

Das zugrunde liegende Prinzip der Oligodeoxynucleotide (ODNs) ist die kompetitive Blockade eines Transkriptionsfaktors bei der Bindung an sein Bindungselement (106). Somit war bei den vorliegenden Versuchen nach Stimulation der Zellkultur in den mit ODNs behandelten Bedingungen mit 5 ng/ml TNFα eine Reduktion des Luciferase-Signals im Vergleich zu den Bedingungen mit alleiniger TNFα-Stimulation zu erwarten. Dieses System wurde von Dr. Andreas Wagner in Heidelberg zunächst an HUVEC-Zellen getestet. Für EA.HY-Zellen lagen zur Versuchszeit noch keine Ergebnisse vor. Von Dr. Andreas Wagner wurde zunächst eine ODN-Konzentration von 10 µmol/L empfohlen. Da in den ersten Versuchen mit simultaner Zugabe von 10 µmol/L ODNs und 5 ng/ml TNFα keine Reduktion des Luciferase-Signals zu beobachten war, wurde zunächst die Vorinkubationszeit vor Zugabe von 5 ng/ml TNFα von 2 min (Ergebnisse hier nicht dargestellt) auf 2 h (unten dargestellt) nach ODN-Gabe erhöht.

Unter Stimulation mit 5 ng/ml TNF α zeigte sich im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle in den stimulierten Bedingungen ein Anstieg des relativen Luciferase-Signals auf das 30-fache (Abbildung 35). Bei Zugabe von ODNs zu 5 ng/ml TNF α zeigte sich keine Reduktion des Signales.

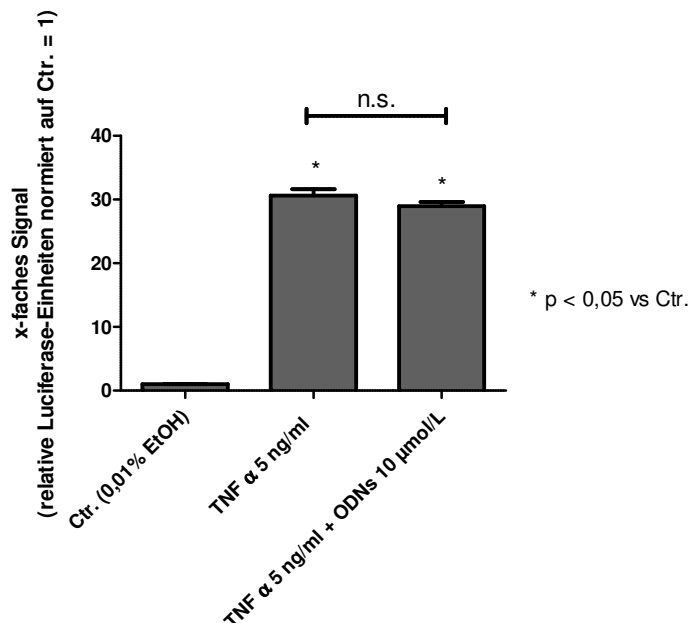


Abbildung 35: Einfluss von ODNs auf das Luciferase-Signal bei EA.HY-Zellen nach einer Vorinkubation von 2 h mit 10 μ mol/L ODNs und anschließender Stimulation mit 5 ng/ml TNF α für 6h, n = 3. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1. * p < 0,05 vs Ctr..

Zunächst wurde überlegt ob 5 ng/ml TNF α gegenüber 10 μ mol/L ODNs ein zu starker Stimulus war. Daher wurde zunächst die TNF α -Konzentration auf 0,5 ng/ml reduziert und die Vorinkubationszeit mit ODNs auf 4 h erhöht. Mit einer TNF α -Konzentration von 0,5 ng/ml konnte in der Kontrolle keine adäquate Stimulation mehr erzielt werden (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Da dieses System an HUVEC-Zellen getestet worden war und nicht an EA.HY-Zellen, musste auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die EA.HY-Zellen die ODNs nicht in der gedachten Menge und Form aufnehmen konnten, um das Luciferase-Signal in der erwarteten Form reduzieren zu können. Diese Überlegungen führten zu weiteren Versuchen, bei denen zunächst HUVEC-Zellen mit dem an ein Reporter-gen gekoppelten Bindungselement des

Transkriptionsfaktors NF κ B transfiziert wurden. Zunächst wurde ein Versuch durchgeführt mit 10 μ mol/L ODNs und einer Vorinkubationszeit von 4 h. Bei diesem Versuch wurde nach der Vorinkubation 5 ng/ml TNF α eingesetzt und die HUVEC-Zellen 6 h inkubiert. In diesem Versuch konnte keine deutliche Reduktion des Luciferase-Signals beobachtet werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein weiterer Versuch mit einer Vorinkubation von 6 h und 10 μ mol/L ODNs, 5 ng/ml TNF α und einer Inkubationszeit von 10 h zeigte ebenfalls keine eindeutige Reduktion des Signals. Unter Stimulation mit TNF α konnte eine Signalinduktion auf das 7-fache der nicht stimulierten Kontrolle erreicht werden (Abbildung 36). Bei Inkubation mit ODNs zeigte sich jedoch nicht die erwartete Reduktion des Luciferase-Signals unter Stimulationsbedingungen.

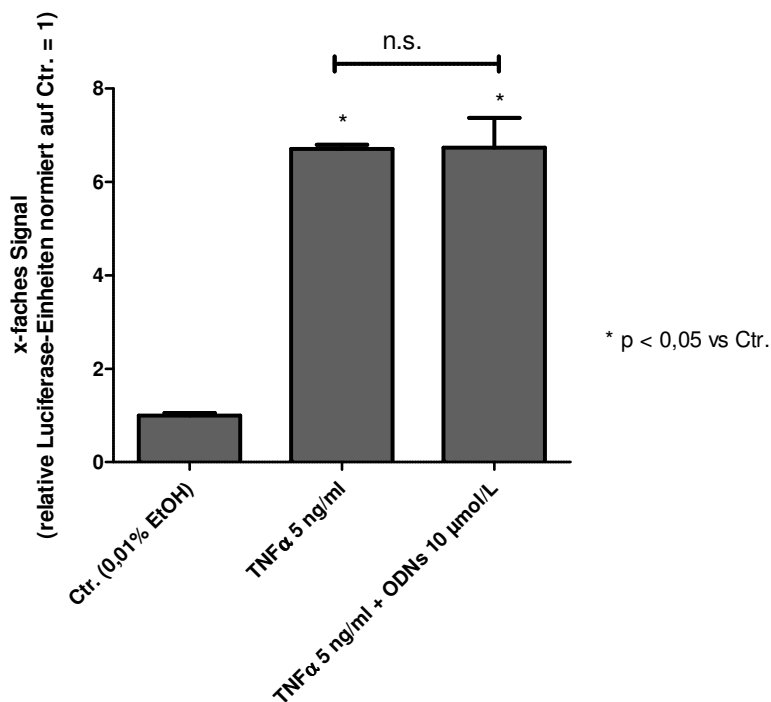


Abbildung 36: Einfluss von 10 μ mol/L ODNs auf das Luciferase-Signal bei HUVEC-Zellen mit einer Vorinkubation von 6 h und einer 10-stündigen Inkubationszeit mit 5 ng/ml TNF α , n = 3. Normierung: nicht stimulierte Kontrolle = 1. * p < 0,05 vs Ctr..

5 Diskussion

In den Industrieländern ist ca. jeder 5. Sterbefall auf kardiovaskuläre Ursachen zurückzuführen. Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen in diesen Ländern zu den häufigsten Todesursachen (4). Pathophysiologisch ist eine der wichtigsten zugrunde liegenden Erkrankung die Atherosklerose. Als Folgeerkrankungen der Atherosklerose gelten KHK, pAVK, Aortenaneurysmata und Karotisstenose (107). Diese Folgeerkrankungen können zu akuten Ereignissen wie Myokard- und Mesenterialinfarkt sowie ischämischem Schlaganfall führen (107), aber auch über die Einschränkung der Durchblutung der basalen Hirnarterien zur vaskulären Demenz (3). In 60 – 65% der Fälle ist eine Ruptur vulnerabler Plaques als Ursache für ein akutes Koronarsyndrom beschrieben (25, 26). Die Atherosklerose wurde schon 1856 vom Begründer der modernen Zell-Pathologie, Rudolf Virchow, als eine „Erkrankung der inneren Arterienwand“ beschrieben (11). Es kommt dabei zu einer Schädigung der *Tunica intima* der Gefäßwand, mit der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques und nachfolgend zu einer endothelialen Dysfunktion (12). Durch oxidativen Stress kommt es zur Veränderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Änderung zellulärer Signalkaskaden in der Gefäßwand. Dies führt weiterhin zu einer fortschreitenden chronischen Entzündung der *Tunica intima*, die auf die *Tunica media* übergreift (12). Die Veränderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren hat eine Änderung der Genexpression zur Folge. Für Isoprostane konnte die Beteiligung an vielen Prozessen, die mit Entzündung und oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, nachgewiesen werden. Bisher wenig untersucht ist ihre Rolle in Bezug auf die Genexpression, besonders solcher Gene, die im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Atherosklerose stehen. Ebenfalls nicht untersucht ist hierbei die Rolle der Phytoprostane und Nitroölsäuren sowie für die Substanzen Eiöl und Spirit of Charismon.

Die vorliegende Arbeit stellt einen *Screening*-Ansatz dar, der die mögliche Beeinflussung der Genexpression von atherosklerose-abhängigen Genen, die der Kontrolle bestimmter Transkriptionsfaktoren unterliegen, untersucht. Methodisch

wurden zunächst die 5 ausgewählten Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB, HIF-1, NFAT und NFκB in der humanen Hybrid-Endothelzelllinie EA.HY als Luciferaseaktivitäts-Reporter-System exprimiert. Die Aktivierung oder Inhibition der Transkriptionsfaktoren wurden im Luciferase-Versuch unter Einfluss von Isoprostanen, Phytoprostanen, Nitroölsäuren, Eiöl und Spirit of Charismon untersucht. Anschließend wurde der Einfluss der Testsubstanzen, die im Luciferase-Versuch einen Effekt zeigten, auf die Genexpression geeigneter Zielgene, die unter Einfluss der Transkriptionsfaktoren stehen, in der humanen Endothelzelllinie HUVEC untersucht.

5.1 Einfluss der Isoprostane 8-iso-PGD₂, 8-iso-PGE₂, ent-1 und AG113A auf die Genexpression

5.1.1 Isoprostan 8-iso-PGD₂

Das Isoprostan 8-iso-PGD₂ zeigte Effekte auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1, HIF-1 und NFκB (siehe Kapitel 4.1, 4.3 und 4.6). Der Effekt war für AP-1 sehr gering ausgeprägt, so dass hierfür keine Genexpressionsanalyse durchgeführt wurde. Für HIF-1 und NFκB zeigte sich jedoch ein deutlicher Effekt. Für die Zielgene HO-1, VEGFA und die beiden VEGF-Rezeptoren wurde daher der Einfluss von 8-iso-PGD₂ auf die Genexpression getestet (Tabelle 19). Für HO-1 und VEGFA zeigte sich eine deutliche Signalsteigerung, während die Expression der beiden VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 unbeeinflusst blieb. Dieses spiegelt eine physiologische Reaktion wieder, da einzelne Zielgene durch die jeweiligen Transkriptionsfaktoren jeweils in einem unterschiedlichen Ausmaß beeinflusst werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die unterschiedlich stark ausgeprägte DNA-Bindung für einen gegebenen Transkriptionsfaktor an das jeweilige responsive Element des Zielgenes (179 – 181) und somit eine variable Expression entsprechend der Transkriptionsfaktorbindung.

Tabelle 19: Expressionsanalyse der Zielgene (Transkriptionsfaktor HIF-1) unter Einfluss von 8-iso-PGD₂ in HUVEC-Zellen, ↑ Steigerung der Expression, ↓ Hemmung der Expression, ° kein Effekt, Stimulation mit DFO

Zielgen	nicht stimuliert	stimuliert
HO-1	↑	°
VEGFA	↑	°
VEGFR-1	°	°
VEGFR-2	°	°

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 ist in protektive und pathologische Prozesse in der ischämischen Herzerkrankung und Infarkt (108) sowie bei Neoplasien (109) und chronischer Lungenerkrankung involviert (110). Für das Zielgen HO-1 sind in der Literatur protektive Eigenschaften beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der HO-1 über eine Downregulation des TNFR-1 der TNF α -induzierten Entzündung in den Endothelzellen der Atemwege vorbeugt (111). Moderater oxidativer Stress dagegen scheint eine transiente Reduktion der HO-1-Expression in zerebralen Endothelzellen hervorzurufen (112). HO-1-Expression konnte zudem in atherosklerotischen Plaques beschrieben werden (113). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische oder virale Überexpression der HO-1 Angiogenese in hypercholersterinämischen Tier-Modellen inhibiert (113). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass HO-1-Expression in Makrophagen antioxidative Komponenten in atherosklerotischen Plaques ansteigen lässt, während inflammatorische Komponenten inhibiert werden (114). VEGFA ist einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese (48). Er spielt sowohl bei verschiedenen Nierenerkrankungen, so u.a. der diabetischen Nephropathie (115) als auch bei der Herzentwicklung und in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle (116). Die Aktivierung des HIF-1-Transkriptionsfaktors durch das Isoprostan 8-iso-PGD₂ könnte somit für die embryonale und kardiovaskuläre Entwicklung von Bedeutung sein.

Auf dem NFκB-Signalweg zeigt sich folgendes Reaktionsprofil:

Tabelle 20: Expressionsanalys der Zielgene (Transkriptionsfaktor NFκB) unter Einfluss von 8-iso-PGD₂ in HUVEC-Zellen, ↑ Steigerung der Expression, ↓ Hemmung der Expression, ° kein Effekt, Stimulation mit TNFα

Zielgen	nicht stimuliert	stimuliert
COX-2	↑	°
MYLK	°	°
nNOS	↑	°
eNOS	(↑)	°
SOD1	°	°
SOD2	°	↑
PTEN	°	↑

NFκB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der die Zellimmunantwort, die Zellproliferation und den Zelltod reguliert. Die Inkubation der HUVEC-Zellen mit 8-iso-PGD₂ führte zu einer Steigerung der Expression der COX-2, der nNOS und geringfügig auch der eNOS unter nicht stimulierten Bedingungen. Bei Stimulation mit TNFα kam es zu einem Anstieg der SOD2 und der PTEN. Kein Einfluss hatte die Inkubation mit 8-iso-PGD₂ auf die Expression der MYLK und der SOD1.

Für die COX-2 ist beschrieben, dass sie ein Produkt von schnell reagierenden Genen in der Inflammation darstellt (117). Die Expression der COX-2 wird durch Endotoxine oder Zytokine induziert. Die COX-2 ist in Synoviozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) oder Osteoarthritis erhöht (192 – 194). Für die NOS-Untertypen iNOS und nNOS ist beschrieben, dass erhöhte Konzentrationen in Epithelzellen in der *Psoriasis vulgaris* gefunden wurden, während die eNOS nur moderat exprimiert wird (118). Die durch 8-iso-PGD₂ und TNFα hervorgerufene gesteigerte Expression der SOD2 könnte als adaptiver Mechanismus einer gesteigerten Inflammation und damit verbundenen ROS-Produktion angesehen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass hohe SOD-Aktivität auch toxische Effekte induzieren kann (196, 197). Interessanter Weise wurde auch für das Down-Syndrom und die Alzheimer-Erkrankung eine erhöhte SOD1-Expression beschrieben (198 – 200). Die Toxizität, die in Zellen, die die SOD überexprimieren,

gezeigt werden konnte, wird dadurch erklärt, dass eine erhöhte Hydrogenperoxid-Konzentration (H_2O_2) vorliegt und somit größere Zellschäden durch Hydroxylradikale entstehen (198, 201 – 205). Gesteigerte H_2O_2 -Konzentrationen konnten für Fibroblasten gezeigt werden, die die SOD2 (MnSOD) (119) überexprimieren. Dies konnte auch für epidermale Mäusezellen, die SOD1 (120) überexprimieren, gezeigt werden. Die Co-Stimulation der HUVEC-Zellen mit 8-iso-PGD₂ und TNF α führte darüber hinaus zu einer Steigerung der PTEN-Expression. Physiologisch hemmt PTEN die Zellproliferation und die Apoptose (121). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression der PTEN bei Karzinomzellen zur Apoptose (122).

Zusammengefasst lassen die oben dargestellten Beobachtungen den Schluss zu, dass 8-iso-PGD₂ in Endothelzellen sowohl proinflammatorische, adaptiv antioxidative als auch proapoptotische Signalwege aktiviert.

5.1.2 Isoprostan 8-iso-PGE₂

Als weiteres Isoprostan zeigte 8-iso-PGE₂ einen Effekt auf den CREB-Transkriptionsfaktor (Kapitel 4.2). Als Kontrolle dienten die Prostaglandine PGE₁ und PGE₂, die in den Luciferase-Versuchen zunächst einen größeren Effekt als 8-iso-PGE₂ zeigten. In den Versuchen für die vorliegende Arbeit war der Effekt auf die Zielgene HO-1 und COX-2 von PGE₁ und PGE₂ ebenfalls ausgeprägter als der des 8-iso-PGE₂. Aufgrund der Beobachtung, dass alle 3 Substanzen einen Effekt auf den CREB-Transkriptionsfaktor erzielen konnten, wurde untersucht, ob der Wirkmechanismus über einen der Prostaglandinrezeptoren EP2 oder EP4 vermittelt wird. Dafür wurden die Rezeptorblocker AH6809 (EP- und DP-Rezeptorblocker) und L-161,982 (EP4-Rezeptorblocker) sowie den Inhibitoren SQ22,536 (Inhibitor der Adenylzyklase) und KH7 (selektiver Inhibitor der löslichen Adenylzyklase) ausgewählt, von denen nur der Rezeptorblocker L-161,982 einen Effekt im Luciferase-Versuch zeigte. L-161,982 ist ein selektiver Blocker des EP4-Rezeptors (35). Dieser Effekt wurde in der Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen weiter untersucht. Dabei wurde als Kontrollsubstanz PGE₂ eingesetzt. Mit dem Blocker L-161,982 ließ sich wie erwartet der Effekt des PGE₂ aufheben. Durch Blockade des EP4-Rezeptors kam es beim Isoprostan

8-iso-PGE₂ jedoch zu einem Anstieg der Genexpression sowohl für HO-1 als auch für COX-2. Die Effekte von 8-iso-PGE₂ scheinen demnach nicht über den EP₄-Rezeptor sondern über andere Mechanismen vermittelt zu werden.

5.1.3 Isoprostan ent-1

Das Isoprostan ent-1 zeigte im Luciferase-Versuch deutliche Effekte auf die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFAT und NFκB (Kapitel 4.4 und 4.6). Diese Effekte konnten in den Genexpressionsanalysen nicht weiter untersucht werden, da die Substanz ent-1 für weitere Versuche nicht mehr zur Verfügung stand.

5.1.4 Isoprostan AG113A

Auf dem NFAT-Signalweg zeigte das Isoprostan AG113A (5_{2t}-IsoP) einen Effekt. Dies traf nicht auf das Stereoisomer AG113B (5-epi-5-F_{2t}-IsoP) zu (Kapitel 4.4). Dieser Effekt war jedoch im Luciferase-Versuch nicht ausgeprägt genug, als dass diese Substanz auf diesem Signalweg für eine Genexpressionsanalyse in Frage gekommen wäre.

5.2 Phytoprostane

Bisher ist noch nicht sicher, ob Phytoprostane Effekte beim Menschen vermitteln, da keine Daten zu Stabilität, Resorption und Metabolismus der Substanzen im menschlichen Verdauungstrakt vorliegen. Erstmals konnte Kathrin Karg 2006 zeigen, dass Phytoprostane einer Resorption und anschließender Ausscheidung über den Urin unterliegen, indem die Phytoprostankonzentrationen nach oraler Aufnahme von Pflanzenölen im menschlichen Blut und Urin bestimmt wurden (86). Über die Effekte der Phytprostane zwischen Aufnahme und Ausscheidung im menschlichen Organismus gibt es bisher noch keine weiterführenden Erkenntnisse. Es ist vorstellbar, dass Phytoprostane langsam absorbiert und schnell metabolisiert werden, so dass nur schwer ein Effekt beim Menschen vorstellbar ist (88). Weiterhin deutet vieles auf die Beteiligung von Isoprostanen, den Äquivalenten der Phytoprostane im menschlichen Organismus, an Entzündungsprozessen hin. Aufgrund von ähnlichem

Entstehungsmechanismus und ähnlichen Strukturen der Iso- und Phytoprostanen ist es vorstellbar, dass Phytoprostanen ebenfalls an der Modulation der Genexpression von Genen, die in der Pathophysiologie der Atherosklerose beteiligt sind, eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit waren die Effekte der Phytoprostanen sehr gering ausgeprägt. Für die folgenden Substanzen konnte kein Effekt gezeigt werden:

Tabelle 21: Liste der Phytoprostanen, für die in der vorliegenden Arbeit kein Effekt gezeigt werden konnte.

Name	Phytoprostan-Typ
AG260	9-epi-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG267	PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG273A	ent-9-epi-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG273B	ent-PPE ₁ Typ II Ethyl-Ester
AG441A	9-epi-PPE ₁ Typ II
AG441B	PPE ₁ Typ II
JMG312	ent-15-F _{2t} -IsoP
JMG317	ent-15-epi-15-F _{2t} -IsoP
JMG400	16 (R/S) PPE ₁ Typ I
SE126A	ent-16-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ I
SE126B	ent-F ₁ -Phytoprostan Typ I
SE139A	ent-9-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ II
SE139B	ent-F ₁ -Phytoprostan Typ II
SE175A	ent-B ₁ -Phytoprostan Typ I
SE175B	B ₁ -Phytoprostan Typ I
SE194R	ent-B ₁ -Phytoprostan Typ II
SE195S	B ₁ -Phytoprostan Typ II
SEVD34B	9-epi-F ₁ -Phytoprostan Typ II
VD24B	F ₁ -Phytoprostan Typ I
YB1-160	15-D _{2t} -Isoprostan

Auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 zeigte das Phytoprostan SEVD34A (F₁-Isoprostan Typ II) einen Effekt (Kapitel 4.1). Dies traf für das Stereoisomer SEVD34B (9-

epi-F₁-Isoprostan Typ II) nicht zu. In der Genexpressionsanalyse ausgewählter Zielgene zeigte SEVD34A keinen Effekt.

Für Phytoprostane konnten zusammengefasst im Luciferase-Versuch für eine Substanz Effekte herausgearbeitet werden, die in der Genexpressionsanalyse nicht bestätigt werden konnten. Wie bei den Isoprostanen bereits beschrieben zeigen sich die Effekte der einzelnen Substanzen selektiv auf bestimmte Transkriptionsfaktoren bzw. auf bestimmte Zielgene. Dies ist für Phytoprostane auch vorstellbar. In dem Fall ist es denkbar, dass die Auswahl der Transkriptionsfaktoren bzw. der Zielgene so getroffen wurde, dass keine Effekte der Phytoprostane detektiert werden konnten und die Effekte auf anderen Signalwegen bzw. anderen Zielgenen zu finden sind.

Da Phytoprostane in der Nahrung, besonders in Speiseölen, bei längerer Lagerung mit steigendem Phytoprostangehalt, und in vertrockneten Pflanzen in nicht unerheblicher Menge enthalten sind (85), ist ein möglicher Effekt der Phytoprostane auf den menschlichen Organismus nicht uninteressant. Die Modifikation der Genexpression scheint zumindest unter Einfluss von Isoprostanen verändert zu sein. Trifft dies auch auf Phytoprostane zu, könnte dies zukünftig interessante Optionen zur Protektion der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen über die Ernährung eröffnen. Eine abschließende Beurteilung der Möglichkeit der Modulation der Genexpression von Zielgenen im Entzündungsprozess kann in einer Arbeit, die einen einsteigenden *Screening*-Ansatz beinhaltet nicht gegeben werden. Zudem kann keine abschließende Beurteilung zur Modifikation der Genexpression von inflammatorischen Genen in der Pathphysiologie der Atherosklerose im menschlichen Organismus auf Basis einer experimentellen Arbeit auf Zellkulturbasis gegeben werden.

5.3 Eiöl und Spirit of Charismon

Bei Eiöl handelt es sich um ein konservierungsfreies Lipidextrakt aus Eiern von Vögeln und Reptilien. Spirit of Charismon ist die alkoholische Lösung des Eiöls. Die im Internet abrufbaren Informationen des Herstellers versprechen mannigfaltige Wirkungen: eine Regulierung der Lipolyse, die Auflösung von Entzündungsprozessen, die Regulierung

des Ionentransportes durch die Zellmembran und somit eine Auswirkung auf die Fähigkeit der Zelle, elektrische Impulse zu transportieren, die Modulierung des synaptischen Potenzials, die Auslösung der Blutgerinnungsprozesse, die Regulierung des Schlaf-/Wachrhythmus, die Steuerung verschiedener Fortpflanzungsprozesse, die Regulierung der Cholesterinsynthese, die Verbesserung der Infektanfälligkeit, die Feineinstellung der Stimmung, ein Einfluss auf Gedächtnis und Gefühle, der Einfluss auf den altersbedingten Sehverlust, einen Einfluss auf die Gehirntätigkeit sowie die Gehirn- und Sehfähigkeit von Kleinkindern und außerdem ein Einfluss auf das Wachstum. Aus diesem Grund wurden bereits einige Studien zur Wirksamkeit von Eiöl-Präparaten durchgeführt, die sich jedoch im Wesentlichen auf dermatologische und allergologische Anwendungsuntersuchungen beschränkten, mit dem Hauptaugenmerk auf Sonnenbrand und leichte Verbrennungen. In diesen wurden wiederholt antientzündliche und antibakterielle Eigenschaften beschrieben (210, 211). Neben mehreren dermatologischen Anwendungsstudien wurde nur eine Studie zu einem möglichen Einfluss auf die Atherosklerose durchgeführt (95). Dabei wurde eine kleine Population von 14 Kaninchen mit einer cholesterolreichen Diät ernährt, so dass es zur Ausbildung der typischen Atheroskleroseplaques kam. Der Beobachtungszeitraum betrug 15 Wochen. Zu fest protokollierten Zeitpunkten erfolgte eine Blutentnahme mit Untersuchung wesentlicher Laborparameter. Vier der Kaninchen starben während des Beobachtungszeitraumes, die Restlichen wurden am Ende des Beobachtungszeitraums autopsiert. Mit Ausnahme zweier Laborparameter konnten während des Beobachtungszeitraumes keine signifikante Wirkung auf die Atherosklerose beschrieben werden. Auch Analysen von inflammatorischen Genen zeigten keinen Unterschied zwischen Eiöl- und Placebo-Gruppe (95).

In den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich für AP-1, NFAT und NFκB bei Inkubation mit 1% Eiöl bzw. 1% Spirit of Charismon eine deutliche Abnahme des Luciferase-Signals (Kapitel 4.1 und 4.4). Die Ursache hierfür war eine deutliche Zytotoxizität der 1%igen Lösungen. In 0,1% iger Konzentration konnte dieser Effekt ebenfalls abgeschwächt beobachtet werden.

Trotz dieser Beobachtungen wurde auf eine Genexpressionsanalyse proinflammatorischer Proteine für Eiöl und Spirit of Charismon in 0,1%iger Lösung durchgeführt. Es konnte kein Effekt auf die Genexpression der ausgewählten Zielgene beobachtet werden. Dass Eiöl und Spirit of Charismon einen Einfluss auf die Genexpression von inflammatorischen Genen in der Atheroskleroseprogression haben, scheint nach den oben dargestellten Untersuchungen und Beobachtungen unwahrscheinlich.

5.4 Nitroölsäuren und Ölsäuren

Nitroölsäuren sind elektrophile Signalmediatoren, die endogen aus NO und NO_2^- als RNI im oxidativen Stress entstehen können (123). Nitroölsäure zeigte in der vorliegenden Arbeit eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB und proinflammatorische Zielgene in HUVEC-Zellen. Dies bestätigt Daten einer anderen Arbeitsgruppe, die gezeigt haben, dass Nitroölsäure an die p65-Untereinheit des NFκB bindet, die DNA-Bindungsaktivität inhibiert und somit die NFκB-abhängige Genexpression herabreguliert (89).

Ein eindeutiger Effekt auf die Genexpression der Zielgene MYLK, eNOS, nNOS, SOD1, SOD2 und PTEN durch Nitroölsäure konnte nicht gezeigt werden. Darüber hinaus ist über die Stabilität der Nitroölsäuren in der Zellkultur und im menschlichen Organismus noch wenig bekannt (90). Es ist daher vorstellbar, dass die Nitroölsäuren schnell zerfallen. Dies könnte auch auf die großen Streuungen der Ergebnisse im Zellkulturversuch erklären.

Weiterhin wurde für die vorliegende Arbeit untersucht, ob die oben beschriebenen Effekte auch durch Ölsäure induziert werden können. Dabei zeigte sich kein Effekt der Ölsäure auf die Aktivität der untersuchten Transkriptionsfaktoren bzw. die Genexpression.

5.5 Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1

Die Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1 wurde zunächst mit CoCl_2 durchgeführt (41). Dabei kam es nach Luciferase-Zugabe zu einem Farbumschlag von gelblich-rot auf braun und einer Reduktion des Luciferase-Signals auf die Hälfte der nicht stimulierten Kontrollen. Aus diesem Grund wurde in einem Versuch vor Luciferase-Zugabe ein Mediumwechsel und ein Waschschrift mit PBS durchgeführt. In diesem Luciferaseversuch kam es in den stimulierten Kontrollen zu einem Signal in Höhe der nicht stimulierten Kontrollen. Zweimaliges Waschen mit PBS zeigte einen Wascheffekt mit Reduktion des Luciferase-Signals. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass CoCl_2 das Mg^{2+} vom ATPase-Komplex der Luciferase verdrängt und somit die Luciferase-Reaktion behindert.

In weiteren Versuchen wurde versucht, den Transkriptionsfaktor HIF-1 durch $\text{TNF}\alpha$ zu aktivieren (124). Dies führte jedoch nicht zu einer gesteigerten Luciferaseaktivität. Für alle weiteren durchgeführten Versuche wurde daher 16 μM DFO verwendet, das zu einer Verdreifachung der Aktivität des Transkriptionsfaktors führte.

5.6 VEGFR-1 und VEGFR-2 auf dem NFAT-Signalweg

Wie in Kapitel 4.3 dargestellt zeigt sich kein Effekt der Substanzen Spirit of Charismon und Eiöl auf die Genexpression von Genen, die unter der Kontrolle des NFAT-Transkriptionsfaktors stehen. In dem durchgeführten Versuch zur Genexpressionsanalyse zeigt sich jedoch nebenbefundlich eine moderate gegensätzliche Regulation der Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 durch Stimulation mit PMA und Ionomycin. VEGFR-1 zeigte auf den Stimulus hin eine deutliche Induktion der Genexpression auf das 5-fache der Kontrolle. VEGFR-2 dagegen zeigte nur einen sehr geringen Effekt, der sich in einer moderaten Reduktion der relativen Genexpression auf das 0,5-fache der Kontrolle beschränkt. Bei Betrachtung der Eigenschaften der beiden Rezeptoren wird eine gegensinnige Regulation auf dem proinflammatorischen NFAT-Signalweg verständlich. VEGFR-1 ist ein Rezeptor, der membrangebunden oder gelöst vorkommen kann und in der Embryogenese ein negativer Regulator von

Angiogenese und Vaskulogenese ist. Im adulten Organismus spielt VEGFR-1 eine Rolle als positiver Regulator in der Angiogenese und Entzündung und ist somit an vielen Erkrankungen wie RA und Neoplasien beteiligt (125). VEGFR-2 ist in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der embryonalen, postnatalen und pathologischen Angiogenese in der Signaltransduktion beteiligt und reguliert die Proliferation und Migration von Endothelzellen (126). Die Aktivierung von VEGFR-2 wirkt auf Endothelzellen chemotaktisch und mitogen. Die Expression von VEGFR-2 ist in der späteren Entwicklung und im adulten Organismus auf Endothelzellen beschränkt. In anderen Zellsystemen ist die Expression von VEGFR-2 weitestgehend herabreguliert, kann jedoch bei der Neubildung von Blutgefäßen reaktiviert werden. Diese Reaktivierung spielt möglicherweise eine Rolle in der pathologischen Angiogenese von Tumoren und bei Hypoxie, da unter Sauerstoffmangel zunächst die Expression von VEGF und in direkter Folge die Expression von VEGFR-2 induziert wird (127). Auf dem NFAT-Signalweg zeigte sich in den vorliegenden Versuchen eine proinflammatorische Induktion des VEGFR-1 während der in adulten Geweben weitgehend herabregulierte VEGFR-2 als Effekt allenfalls eine moderate Herabregulation auf den gesetzten Stimulus hin zeigte.

5.7 ODNs und Validierung der Versuche

Das zugrunde liegende Prinzip der Oligodeoxynucleotide (ODNs) ist die kompetitive Blockade eines Transkriptionsfaktors bei der Bindung an sein Bindungselement (106). Dieses System wurde von Dr. Andreas Wagner in Heidelberg zunächst an HUVEC-Zellen getestet. Voraussetzung für diese Versuche ist eine möglichst dichte Konfluenz der Zellen, da Zell-Zell-Kontakte für die Aufnahme der ODNs essenziell sind. Dieses System sollte zur Evaluation der vorliegenden Versuche dienen, indem in den transfizierten Zellen, in denen das Bindungselement des Transkriptionsfaktors an ein Luciferase-Gen, das Reportergen, gekoppelt ist, die ODNs die Transkriptionsfaktorbindung kompetitiv hemmen. Somit wäre bei Zugabe der ODNs eine Reduktion des Luciferase-Signals gegenüber der Kontrolle zu erwarten. Für EA.HY-Zellen lagen zum Versuchszeitpunkt noch keine Ergebnisse vor.

Für die vorliegende Arbeit wurde dies für den NFκB-Signalweg getestet. Bei entsprechenden Resultaten hätte dieses System zusätzlich noch für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFAT Anwendung finden sollen, da diese Idee die Möglichkeit barg, eine genaue Differenzierung der beiden Signalwege durchführen zu können, deren Stimulationsprinzipien mit PMA bzw. PMA und Ionomycin sehr ähnlich waren.

Von Dr. Andreas Wagner wurde zunächst eine ODN-Konzentration von 10 μmol/L empfohlen. Für die vorliegende Arbeit fanden zunächst EA.HY-Zellen Anwendung. Da in den ersten Versuchen mit simultaner Zugabe von ODNs und TNFα keine Reduktion des stimulierten Luciferase-Signals zu Stande kam, wurde zunächst die Vorinkubationszeit mit ODNs variiert bevor eine Zugabe von 5 ng/ml TNFα erfolgte. Diese Versuche zeigten eine gute Stimulation der Bedingungen mit TNFα gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Eine deutliche Reduktion des Luciferase-Signals in der Gruppe mit TNFα und ODNs war jedoch nicht ersichtlich, was auf eine zu starke Stimulation mit 5 ng/ml TNFα hinweisen könnte. Daher wurde die TNFα-Konzentration verringert. Mit 0,5 ng/ml TNFα konnte jedoch keine gesteigerte Aktivität der Luciferase beobachtet werden. Da das System bisher nur an HUVEC-Zellen getestet worden war, könnte auch eine zu geringe Aufnahme der ODNs in EA.HY-Zellen für den nicht zu beobachtenden Effekt verantwortlich sein.

Aus diesem Grund wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem zunächst in HUVEC-Zellen ein Reportergen transfiziert wurde, das das Bindungselement des Transkriptionsfaktors NFκB mit nachgeschalteter Luciferase überexprimierte. Anschließend wurde der oben beschriebene Versuchsaufbau an HUVEC-Zellen wiederholt. Dies führte jedoch ebenfalls nicht zur erwarteten Abschwächung des Luciferase-Signals bei Inkubation mit ODNs.

5.8 Bezug zur Atherosklerose

In den beschriebenen Versuchen hat sich für das Isoprostan 8-iso-PGD₂ gezeigt, dass es die Expression von Genen, die in die Pathophysiologie der Atherosklerose involviert

sind, verändern kann. Für die Nitroölsäure konnte ein Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktor NFκB gezeigt werden. Phytoprostanen zeigten in dieser Arbeit hingegen keine Effekte. Trotzdem könnte für diese Substanzen ein Einfluss aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den Isoprostanen möglich und aus ernährungstherapeutischer Sicht aufgrund ihres Gehaltes in der menschlichen Nahrung interessant sein. Ebenfalls keinen Effekt, außer Zytotoxizität, zeigten die Substanzen Eiöl und Spirit of Charismon.

Die veränderte Genexpression konnte in dieser Arbeit an Zellkulturversuchen gezeigt werden. Die Konzentrationen der Testsubstanzen waren aufgrund des explorativen Ansatzes der Arbeit sehr hoch gewählt. Zudem wurden die Endothelzelllinien 6 h mit den Testsubstanzen inkubiert. *In vivo* ist eine Isoprostan-Konzentration im mikromolaren Bereich nicht (patho-) physiologisch relevant. Für Isoprostanen ist eine Wirksamkeit im nanomolaren Bereich beschrieben (61). Aus diesen Gründen können aus den Zellkulturversuchen, wie sie für diese Arbeit durchgeführt worden sind, keine Rückschlüsse auf die physiologischen Prozesse der untersuchten Substanzen im menschlichen Organismus gezogen werden. Wohl aber ist es denkbar, dass Isoprostanen pharmakologisch in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt werden könnten, wenn es hierbei nicht zu toxischen Effekten kommt. Entsprechende Untersuchungen z. B. zur letalen Dosis von Isoprostanen (LD_{50}) sind bisher jedoch nicht durchgeführt worden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

In den Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache. Atherosklerose ist eine Erkrankung der inneren Arterienwand. Die Entstehung der Atherosklerose ist ein multifaktorielles Geschehen, an dem verschiedene Zellen aus der Arterienwand, z.B. Endothelzellen und glatte Muskelzellen, und aus dem Blut, z. B. Monozyten und Thrombozyten, beteiligt sind. Als gemeinsamer Pathomechanismus wird oxidativer Stress, insbesondere durch oxidiertes LDL angenommen, welcher zu einer endothelialen Dysfunktion und im

Folgenden zu einer Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen führt. Durch oxidativen Stress kommt es zudem zu einer Veränderung verschiedener Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren, zur Veränderung der Expression verschiedener Substanzen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anti-/proapoptotischen Faktoren. Isoprostane spielen bei vielen Prozessen, die an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, eine wichtige Rolle. Bisher wenig untersucht ist ihre Wirkung auf die Genexpression, insbesondere solcher Gene, die in Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Atherosklerose stehen. In der Pathophysiologie der Atherosklerose werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Expression bestimmter Zielgene regulieren. Isoprostane, Phytoprostane, Nitroölsäure und Eiöl könnten diese Effekte beeinflussen. Daher wurden zunächst verschiedene Transkriptionsfaktoren in Endothelzelllinien als Luciferase-Reporter-Systeme exprimiert. Anschließend wurden verschiedene Iso- und Phytoprostane sowie Nitroölsäuren, Eiöl und Spirit of Charismon auf ihre aktivierende oder inhibierende Wirkung auf diese Transkriptionsfaktoren untersucht. In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung der Substanzen auf die Expression geeigneter Zielgene in der primären HUVEC-Endothelzelllinie untersucht. Für die Substanzen Eiöl und Spirit of Charismon zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein wesentlicher Einfluss auf die Genexpression verschiedener Zielgene, jedoch ein Anhalt auf Zytotoxizität. Für die Nitroölsäuren zeigte sich eine inhibitorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NFκB. Für die untersuchten Phytoprostane konnte keine Beeinflussung der Genexpression gezeigt werden. Bei den eingesetzten Isoprostanen zeigten sich auf verschiedenen Signalwegen Effekte für das Isoprostan 8-iso-PGD₂. In den HUVEC-Zellen zeigte sich sowohl ein proinflammatorischer bzw. eine proapoptotischer Effekt.

6.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Isoprostane, Phytoprostane, Nitroölsäuren, Eiöl und Spirit of Charismon überhaupt einen Effekt auf die Expression von Genen, die an der Progression der Atherosklerose beteiligt sind, haben. Dabei zeigte sich, dass von den getesteten Substanzen die Isoprostane und die Nitroölsäure die Expression bestimmter Gene über Aktivierung insbesondere des

Transkriptionsfaktors NFκB beeinflussen. Dies traf insbesondere für das Isoprostan 8-iso-PGD₂ zu, welches in Endothelzellen sowohl proinflammatorische, adaptiv antioxidative als proapoptotische Signalwege aktiviert. In weiteren Arbeiten wäre die Komplettierung der *in vitro* erzielten Ergebnisse durch *in vivo*-Studien an Tiermodellen zur Progression der Atherosklerose interessant.

7 Literaturverzeichnis

1. **Mizuno, Y., Jacob, R.F., Mason, R.P.** Inflammation and the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 18, 2011, Bd. 5, 351-358.
2. **Kreuzer, J., Tiefenbacher, C.** *Atherosklerose - Taschenatlas spezial.* Stuttgart : Thieme Verlag Stuttgart, 2003. 3-13-13281-X.
3. **Kiefer, M., Unterberg, A.** Differenzialdiagnose und Therapie des Normaldruckhydrozephalus. *Dtsch Arztebl Int.* 109, 2012, 15-26.
4. **GBE - Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes.** www.gbe.de. [Online] [Zitat vom: 14. 09 2009.]
5. **GBE - Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes.** <http://www.gbe-bund.de>. [Online] [Zitat vom: 29. 12 2011.] www.gbe-bund.de
6. **Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, H., Djordjevic, B.S., Dantas, A.S., Fidanza, F., Keys, M.H., Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccareccia, F., Toshima, H.** The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 124, 1986, Bd. 6, 903-915.
7. **Kromhout, D., Menotti, A., Blomberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dantas, A., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Karvonen, M., Katan, M., Nissinen, A., Nedeljkovic, S., Pekkanen, J., Pekkarinen, M., Punsar, S., Räsänen, L., Simic, B.** Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* 24, 1995, 308-315.
8. **Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L.** Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 362, 2004, 937-952.
9. **O'Donnell, M.J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S.L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M.J., Mondo, C., Damasceno, A., Lopez-Jaramillo, P., Hankey, G.J., Dans, A.L., Yusuf, K., Truelsen, T., Diener, H.C. et al.** Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 376, 2010, Bd. 9736, 112 - 123.
10. **Welsch, U.** *Lehrbuch Histologie.* München : Verlag Urban&Fischer, 1. Auflage 2003. 212-228.

11. **Virchow, R.** *Phlogie und Thrombose im Gefäßsystem. In: Gesammelte Abhandlungen Zur Wissenschaftlichen Medizin.* Berlin : Meidinger Sohn und Co., 1856. 458-463.
12. **Kinscherf, R., Metz, J.** Die Bedeutung des oxidativen Stresses für Gefäßwandveränderungen. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin.* 2000, 6-10.
13. **Montuschi, P., Barnes, P.J., Jackson Roberts II, L.** Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18, 2004, 1791-1800.
14. **Ross, R., Glomset, J., Harker, L.** Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 86, 1977, Bd. 3, 675–684.
15. **Newby, A.C.** An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett.* 112-113, 2000, 519-529.
16. **Stary, H.** Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 20, 2000, 1177-1178.
17. **Jovinge, S., Ares, M.P., Kallin, B., Nilsson, J.** Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 16, 1996, 1573-1579.
18. **Terkeltaub, R., Banka, C.L., Solan, J., Santoro, D., Brand, K., Curtiss, L.K.** Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler Thromb.* 14, 1994, 47-53.
19. **Hessler, J.R., Morel, D.W., Lewis, L.J., Chisolm, G.M.** Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Atherosclerosis.* 3, 1983, 215-222.
20. **Tsimikas, S., Miller, Y.I.** Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 17, 2011, Bd. 1, 27-37.
21. **Mazière, C., Mazière, J.C.** Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 46, 2009, 127-137.
22. **Steinberg, D.** Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 95, 1997, Bd. 4, 1062-1071.
23. **Vaarala, O., Manttari, M., Manninen, V., Tenkanen, L., Puurunen, M., Aho, K., Palosua, T.** Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation.* 91, 1995, Bd. 1, 23-27.

24. **Gu, Q., Bowden, G.T., Normolle, D., Sun, Y.** SAG/ROC2 E3 ligase regulates skin carcinogenesis by stage-dependent targeting of c-Jun/AP1 and I κ B- α /NF- κ B. *J Cell Biol.* 178, 2007, Bd. 6, 1009-1023.
25. **Serkkola, E., Hurme, M.** Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 beta gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur J Biochem.* 213, 1993, Bd. 1, 243-249.
26. **Bidder, M., Shao, J.S., Charlton-Kacjogan, N., Loewy, A.P., Semenkovic, C.F., Towler, D.A.** Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *J Biol Chem.* 277, 2002, Bd. 15, 44485-44496.
27. **Chen, Y., Currie, R.W.** Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced SP-1 and AP-1 and stimulates Oct-1 DNA-binding activity in heart. *Inflammation Res.* 54, 2005, 338-343.
28. **Sanatmarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qui, Y., Freeman, L., Cheng, J.F., Osario, J., Ramaley, A., Yang, X.P., Duverger, N., Rubi, E.M., Rosier, M., Denèfle, P., Frederikson, D.S., Brewer Jr. H.B.** Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 2000, Bd. 14, 7987-7992.
29. **Shaulian, E., Karin, M.** AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 4, 2002, Bd. 5, E131-136.
30. **Fass, D.M., Butler, J.E.F., Goodman, R.H.** Deacetylase activity is required for cAMP activation of a subset of CREB target genes. *J Biol Chem.* 278, 2003, Bd. 44, 43014-43019.
31. **Mayr, B.M., Canettieri, G., Montminy, M.R.** Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 2001, Bd. 19, 10936-10941.
32. **Harris, D.N., Asaad, M.M., Phillips, M.B., Goldenberg, H.J., Antonaccio, M.J.** Inhibition of adenylate cyclase in human blood platelets by 9-substituted adenine derivatives. *J Cyclic Nucleotide Res.* 5, 1979, 125-34.

33. **Woodward, D.F., Pepperl, D.J., Burkey, T.H., Regan, J.W.** 6-Isopropoxy-9-oxoxanthene-2-carboxylic acid (AH 6809), a human EP2 receptor antagonist. *Biochem Pharmacol.* 50, 1995, 1731-1733.
34. **Funk, C.D., Furci, L., FitzGerald, G.A., Grygorczyk, R., Rochette, C., Bayne, M.A., Abramovitz, M., Adam, M., Metters, K.M.** Cloning and expression of a cDNA for the human prostaglandin E receptor EP1 subtype. *J Biol Chem.* 268, 1993, Bd. 35, 26767-26772.
35. **Balzary, R.W., Cocks, T.M.** Lipopolysaccharide induces epithelium- and prostaglandin E(2)-dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *J Pharmacol Exp Ther.* 317, 2006, 806-812.
36. **Hallows, K.R., Wang, H., Edinger, R.S., Butterworth, M.B., Oyster, N.M., Li, H., Buck, J., Levin, L.R., Johnson, J.P., Pastor-Soler, N.M.** Regulation of epithelial Na⁺ transport by soluble adenylyl cyclase in kidney collecting duct cells. *J Biol Chem.* 284, 2009, Bd. 9, 5774-5783.
37. **Jiang, G., Li, T., Qui, Y., Rui, Y., Chen, Q., Lou, Y.** RNA interference for HIF-1 α inhibits foam cells formation in vitro. *Eur J Pharmacol.* 562, 2007, Bd. 3, 183-190.
38. **Chen, P., Erikson, P., Kimura, T., Herzfeld, I., Valen, C.** Apoptosis and angiogenesis are induced in the unstable coronary atherosclerotic plaque. *Coron Artery Dis.* 16, 2005, 191-197.
39. **Thevis, M., Schänzer, W.** Dopingmittel der Zukunft und deren Nachweis - Selektive Androgenrezeptor Modulatoren und HIF-Stabilisatoren. *www.dopinginfo.de*. [Online] F.I.T. Das Wissenschaftsmagazin, 2009. [Zitat vom: 13. 07 2011.]
40. **Linden, T., Katschinski, D.M., Eckhardt, K., Scheid, A., Pagel, H., Wenger, R.H.** The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1 α stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J.* 17, 2003, Bd. 6, 761-763.
41. **SABiosciences.**
http://www.sabiosciences.com/reporter_assay_product/HTML/CLS-007L.html.
 [Online] SABiosciences. [Zitat vom: 13. 07 2011.]
42. **Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G.** Transcription factors of the NFAT-family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15, 1997, 707-747.

43. **Roehrl, M.A.H., Kang, S., Aramburu, J., Wagner, G., Rao, A., Hogan, P.G.** Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2004, Bd. 20, 7554-7559.
44. **Mazière, C., Morlière, P., Massy, Z., Kamel, S., Louandre, C., Conte, M.A., Mazière J.C.** Oxidized low-density lipoprotein elicits an intracellular calcium rise and increases the binding activity of the transcription factor NFAT. *Free Radic Biol Med.* 38, 2005, Bd. 4, 427-480.
45. **Li, X., Stark, G.R.** NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Haematol.* 30, 2002, 285-296.
46. **de Winther, M.P., Kanters, E., Kaal, G., Hofker, M.H.** Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25, 2005, 904-914.
47. **Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., Neumeier, D.** Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest.* 97, 1996, Bd. 7, 1715-1722.
48. **Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wilders, H, Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A.** Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 56, 2004, 549-580.
49. **Liao, D., Johnson, R.S.** Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 2007, 281-290.
50. **von Euler, U.S.** An depressor substance in the vesicular gland. *J Physiol.* 84, 1935, 21.
51. **von Euler, U.S.** On the specific vasodilating and plain musclestimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and versiglandin). *J Physiol.* 88, 1936, 213-214.
52. **Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., Roberts, L.J.** 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.* 87, 1990, Bd. 23, 9383-9387.
53. **Ricciotti, E., FitzGerald, G.A.** Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 2011, Bd. 5, 986-1000.

54. **Yin, H., Cox, B.E., Liu, W., Porter, N.A, Morrow J.D., Milne, G.L.** Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 44, 2009, Bd. 5, 672-680.
55. **Roberts, L.J., Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Detbarn, W.D., Morrow, J.D.** Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 273, 1998, Bd. 22, 13605-13612.
56. **Brame, C.J., Salomon, R.G., Morrow, J.D., Roberts, L.J.** Identification of extremely reactive gamma-ketoaldehydes (isolevuglandins) as products of the isoprostane pathway and characterization of their lysyl protein adducts. *J Biol Chem.* 274, 1999, 13139-13146.
57. **Praticò, D.** F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis.* 147, 1999, 1-10.
58. **Li, H, Lawson, J.A., Reilly, M., Adiyaman, M., Hwang, S.W., Rokach, J., FitzGerald, G.A.** Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F(2)-isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9, 1999, 13381-13386.
59. **Nelson, N.A.** Prostaglandin nomenclature. *J Med Chem.* 17, 1974, 911-918.
60. **Traber, D.F., Morrow, J.D., Roberts, J.L.** A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins.* 53, 1997, 63-67.
61. **Takahashi, K., Nammour, T.M., Fukunaga, M., Ebert, J., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Hoover, R.L., Badr, K.F.** 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.* 90, 1992, 136-141.
62. **González-Luis, G., Pérez-Vizcaíno, F., García-Muñoz, F., de Mey, J.G., Blanco, C.E., Villamor, E.** Age-related differences in vasoconstrictor responses to isoprostanes in piglet pulmonary and mesenteric vascular smooth muscle. *Pediatr Res.* 57, 2005, 845-852.
63. **Kromer, B.M., Tippins, J.R.** Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *Br J Pharmacol.* 119, 1996, 1276-1280.

64. **Hou, X., Gobeil, F. Jr., Peri, K., Speranza, G., Marrache, A.M., Lachapelle, P., Roberts, L.J., Varma, D.R., Chemtob, S.** Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F(2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F(2alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels. *Stroke*. 31, 2000, 516-525.
65. **Lahaie, I., Hardy, P., Hou, X., Hassessian, H., Asselin, P., Roberts, L.J. et al.** A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F2 alpha on retinal vessels. *Am J Physiol*. 274, 1998, R1406-R1416.
66. **Beauchamp, M.H., Martinez-Bermudez, A.K., Gobeil, F. Jr., Marrache, A.M., Hou, X., Speranza, G., Abran, D., Quiniou, C., Lachapelle, P., Roberts, J. et al.** Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol*. 90, 2001, 2279-2299.
67. **Patono, C. FitzGerald, G.A.** Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 17, 1997, 2309-2315.
68. **Lynch, S.M., Morrow, J.D., Roberts, L.J., Frei, B.** Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *J Clin Invest*. 93, 1994, 998-1004.
69. **Huber, J., Bochkov, V.N., Binder, B.R., Leitinger, N.** The isoprostane 8-iso-PGE2 stimulates endothelial cells to bind monocytes via cyclic AMP- and p38 MAP kinase-dependent signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 5, 2003, Bd. 2, 163-169.
70. **Kunapuli, P., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A.** Functional characterization of the ocular prostaglandin f2alpha (PGF2alpha) receptor. Activation by the isoprostane, 12-iso-PGF2alpha. *J Biol Chem*. 272, 1997, 27147-27154.
71. **Benndorf, R., Schwedhelm, E., Gnann, A., Taheri, R., Kom, G., Didié, M., Steenpass, A., Ergün, S., Böger, R.** 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 ox. *Circ Res*. 103, 2008, Bd. 9, 1037-1046.
72. **Khasawneh, F.T., Huang, J.S., Mir, F., Srinivasan, S., Tirupathi, C., Le Breton, G.C.** Characterization of isoprostane signaling: evidence for a unique coordination profile of 8-iso-PGF(2alpha) with the thromboxane A(2) receptor, and activation of a separate

cAMP-dependent inhibitory pathway in human platelets. *Biochem Pharmacol.* 75, 2008, Bd. 12, 2301-2315.

73. **Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.** Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation.* 94, 1996, 19-25.

74. **Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Oates, J.A., Roberts, L.J.** Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 332, 1995, 1198-1203.

75. **Gopaul, N.K., Anggard, E.E., Mallet, A.J., Betteridge, D.J., Wolff, S.P., Nourooz-Zadeh, J.** Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* 44, 1995, 223A.

76. **Polidori, M.C., Praticò, D., Parente, B., Mariani, E., Ceccetti, R., Yao, Y., Sies, H., Cao, P., Mecocci, P., Stahl, W.** Elevated lipid peroxidation biomarkers and low antioxidant status in atherosclerotic patients with increased carotid or iliofemoral intima media thickness. *J Investig Med.* 55, 2007, 163-167.

77. **Praticò, D., Iuliano, L., Mauriello, A., Spagnoli, L., Lawson, J.A., MacLaurin, J., Violi, F., FitzGerald, G.A.** Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 100, 1997, 2028-2034.

78. **Schwedhelm, E., Bartling, A., Lenzen, H., Tsikas, D., Maas, R., Brümmer, J., Gutzki, F.M., Berger, J., Frölich, J., Böger, R.H.** Urinary 8-iso-prostaglandin F2alpha as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation.* 109, 2004, Bd. 7, 843-848.

79. **Schwedhelm, E., Benndorf, R., Böger, R., Tsikas, D.** Mass spectrometric analysis of F2-isoprostanes: markers and mediators in human disease. *Current Pharmaceutical Analysis.* 3, 2007, 39-51.

80. **Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A., Durand, T., Ryan, C.A.** Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol.* 111, 1996, 797-803.

81. **Mueller, M.J.** Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant.* 100, 1997, 653-663.

82. **Parchmann, S., Mueller, M.J.** Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants. *J Biol Chem.* 273, 1998, 32650-32655.
83. **Pryor, W.A., Stanley, J.P., Blair, E.** Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids.* 11, 1976, 370-379.
84. **Thoma, I., Krischke, M., Loeffler, C., Mueller, M.J.** The isoprostanoid pathway in plants. *Chem Phys Lipids.* 128, 2004, 135-148.
85. **Imbusch, R., Mueller, M.J.** Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Rad Biol Med.* 28, 2000, 720-726.
86. **Karg, K.** Analyse biologisch aktiver, oxidiertes Lipide in Pflanzen und Menschen. *Dissertation.* Würzburg : s.n., 24.11.2006.
87. **Barden, A.E., Croft, K.D., Durant, T., Guy, A., Mueller, M.J., Mari, T.A.** Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. *J nutr.* 139, 2009, Bd. 10, 1890-1895.
88. **Imbusch, R. Mueller, M.J.** Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F(1) (phytoprostanes F(1)) in plants. *Plant Physiol.* 124, 2000, 1293-1303.
89. **Rudolph, T.K., Rudolph, V., Edreira, M.M., Cole, M.P., Bonacci, G., Schopfer, F.J., Woodcock, S.R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N.K.H., Hasty, A.H., Baldus, S., Freeman, B.A.** Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 2010, 938-945.
90. **Mitschke, A., Gutzki, F.M., Tsikas, D.** 9- and 10-Nitro-oleic acid do not interfere with the GC-MS quantitative determination of nitrite and nitrate in biological fluids when measured as their pentafluorobenzyl derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 851, 2007, Bde. 1-2, 287-291.
91. **Li, Y., Zhang, J., Schopfer, F.J., Martynowski, D., Garcia-Barrio, M.T., Kovach, A., Suino-Powell, K., Baker, P.R., Freeman, B.A., Chen, Y.E., Xu, E.H.** Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat Struct Mol Biol.* 15, 2008, 865-867.
92. **Rudnicki, M., Faine, L.A., Dehne, N., Namgaladze, D., Ferderbar, S., Weinlich, R., Amarante-Mendes, G.P., Yan, C.Y., Krieger, J.E., Brüne, B., Abdalla, D.S.** Hypoxia

inducible factor-dependent regulation of angiogenesis by nitro-fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31, 2011, Bd. 6, 1360-1367.

93. **Villacorta, L., Zhang, J., Garcia-Barrio, M.T., Chen, X.L., Freeman, B.A., Chen, Y.E., Cui, T.** Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293, 2007, Bd. 1, H770-H776.

94. **Nawrocki, Werner Ch., Dr.** Verfahren zur Gewinnung von hochreinem Eiöl und seine Verwendung. DE4405486C2 19. 12 1996. <http://www.patent-de.com/19961219/DE4405486C2.html>.

95. **Puskás, L., Kitajka, K.** Report on the measurement of the possible effect of anti-atherogenic diet. A study on "Spirit of Charismon". Szeged : s.n., 2005.

96. **Elsner, P., Jetter, P., Brödner, K., Helmchen, G.** Stereoselective synthesis of a cis-1,2-dialkylcyclopentane: building block and its application in isoprostane synthesis (5-ent-F2c-IsoP). 2008. *Eur J Org Chem*, 2552-2563.

97. **Minami, T., Aird, W.C.** Endothelial cell gene regulation. *Trends Cardiovasc Med.* 15, 2005, Bd. 5, 174.e1-174.e24.

98. **Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 9, 2003, Bd. 6, 677-684.

99. **Bougatef, F., Menashi, S., Khayati, F., Naïmi, B., Porcher, R., Podgorniak, M.P., Millot, G., Janin, A., Calvo, F., Lebbé, C., Mourah, S.** EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2 α mediated up-regulation of VEGF-receptor-2. *PLoS One.* 5, 2010, Bd. 8, e12265.

100. **Brat, D.J., Kaur, B., Van Meir, E.** Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors. *Front Biosci.* 8, 2003, d100-116.

101. **Zeini, M., Hang, C.T., Lehrer-Graiwer, J., Dao, T., Zhou, B., Chang, C.P.** Spatial and temporal regulation of coronary vessel formation by calcineurin-NFAT signaling. *Development.* 136, 2009, Bd. 19, 3353-3345.

102. **Graham, W.V., Wang, F., Clayburgh, D.R., Cheng, J.X., Yoon, B., Wang, Y., Lin, A., Turner, J.R.** Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the

human long myosin light chain kinase promoter. *J Biol Chem.* 281, 2006, Bd. 36, 26205-26215.

103. **Xia, D., Srinivas, H., Ahn, Y.H., Sethi, G., Sheng, X., Yung, W.K., Xia, Q., Chiao, P.J., Kim, H., Brown, P.H., Wistuba, I.I., Aggarwal, B.B., Kurie, J.M.** Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J Biol Chem.* 282, 2007, Bd. 6, 3507-3519.

104. **Manea, A., Tanase, L.I., Raicu, M., Simionescu, M.** Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 396, 2010, Bd. 4, 901-907.

105. **Xu, Y., Krishnan, A., Wan, X.S., Majima, H., Yeh, C.C., Ludewig, G., Kasarskis, E.J., St. Clair, D.K.** Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene.* 18, 1999, Bd. 1, 93-102.

106. **Stadlbauer, T.H.W., Wagner, A.H., Hölschermann, H., Fiedel, S., Fingerhuth, H., Tillmanns, H., Bohle, R.M., Hecker, M.** AP-1 and STAT-1 decoy oligodeoxynucleotides attenuate transplant vasculopathy in rat cardiac allograft. *Cardiovasc res.* 79, 2008, Bd. 4, 698-705.

107. **Herold, Gerd.** *Innere Medizin* . Köln : Gerd Herold, 2011. ASIN: B00442K7RQ.

108. **Semenza, G.L.** Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 148, 2012, Bd. 3, 399-408.

109. **Semenza, G.L.** Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 33, 2012, Bd. 4, 207-214.

110. **Schumacker, P.T.** Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc Am Thorac Soc.* 6, 2011, 477-484.

111. **Lee, I. Luo, S.F., Lee, C.W., Wang, S.W., Lin, C.C., Chang, C.C., Chen, Y.L., Chau, L.Y., Yang, C.M.** Overexpression of HO-1 protects against TNFalpha-mediated airway inflammation by down-regulation of TNFR1-dependent oxidative stress. *Am J Pathol.* 175, 2009, Bd. 2, 519-532.

112. **Méthy, D., Bertrand, N., Prigent-Tessier, A., Stanimirovic, D., Beley, A., Marie, C.** Differential MnSOD and HO-1 expression in cerebral endothelial cells in response to sublethal oxidative stress. *Brain res.* 1003, 2004, 151-158.

113. **Wu, M.L., Ho, Y.C., Lin, C.Y., Yet, S.F.** Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 1, 2011, Bd. 2, 150-158.
114. **Orozco, L.D., Kapturczak, M.H., Barajas, B., Wang, X., Weinstein, M.M., Wong, J., Deshane, J., Bolisetty, S., Shaposhnik, Z., Shih, D.M., Agarwal, A., Lusa, A.J., Araujo, J.A.** Heme oxygenase-1 expression in macrophages plays a beneficial role in atherosclerosis. *Circ Res.* 100, 2007, Bd. 12, 1703-1711.
115. **Veron, D., Reidy, K.J., Bertuccio, C., Teichmann, J., Villegas, G., Jimenez, J., Shen, W., Kopp, J.B., Thomas, D.B., Tufro, A.** Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney int.* 77, 2010, Bd. 11, 989-999.
116. **Miquerol, L., Langille, B., Nagy, A.** Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development.* 127, 2000, Bd. 18, 3941-3946.
117. **Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C., Gregory, S.A.** Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest.* 97, 1996, Bd. 11, 2672-2679.
118. **Simonetti, O., Lucarini, G., Campanati, A., Goteri, G., Zizzi, A., Marconi, B., Ganzetti, G., Minardi, D., Di Primio, R., Offidani, A.** VEGF, survivin and NOS overexpression in psoriatic skin: critical role of nitric oxide synthases. *J Dermatol Sci.* 54, 2009, 205-208.
119. **de Haan, J.B., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M.J., Kola, I.** Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet.* 5, 1996, Bd. 2, 283-292.
120. **Schmidt, K.N., Amstad, P., Cerutti, P., Baeuerle, P.A.** The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol.* 2, 1995, 13-22.
121. **Zhao, H., Dupont, J., Yakar, S., Karas, M., LeRoith, D.** PTEN inhibits cell proliferation and induces apoptosis by downregulating cell surface IGF-IR expression in prostate cancer cells. *Oncogene.* 23, 2004, 786-794.

122. **Brandt, A.** Expressionsstudien zur Funktion des Tumorsupressorgens PTEN beim Prostatakarzinom. *Dissertation*. Düsseldorf : s.n., 2007.
123. **Freeman, B.A., Baker, P.R.S., Schopfer, F.J., Woodcock S., Napolitano, A., D'Ischia, M.** Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem*. 283, 2008, Bd. 23, 15515-15519.
124. **Stiehl, Daniel Philipp.** Einfluss intrazellulärer Kinasen auf die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 durch Insulin, Interleukin-1 β und Hypoxie. *Dissertation*. Lübeck : s.n., 09.11.2004.
125. **Shibuya, M.** Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep*. 41, 2008, Bd. 4, 278-286.
126. **Shibuya, M., Claesson-Welsh, L.** Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*. 312, 2006, Bd. 5, 549-560.
127. **Elvert, G.** Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des VEGF-Rezeptors 2 (Flk-1). *Dissertation*. Köln : s.n., 2001.
128. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laurates/1982/index.html. [Online] [Zitat vom: 01. 11 2009.]
129. www.nobelpreis.org/medizin/bergstrom.htm. [Online] [Zitat vom: 17. 10 2009.]
130. **Bergstrom, S., Ryhage, R., Samuelsson, B, Sjovall, J.** Prostaglandins and related factors 15. The structure of prostaglandin E1 α and F18. *J Biol Chem*. 238, 1963, 3555-3564.
131. **Carmiliet, P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438, 2005, 932-936.
132. **Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.** Nomenclature of Isoprostanes: A Proposal. *Prostaglandins*. 54, 1997, 853-873.
133. **Richelle, M., Turini, M.E., Guidoux, R., Gavazzi, I., Metairon, S., Fay, L.B.** Urinary isoprostanes excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett*. 459, 1999, 259-262.
134. **Graier, W.F., Wascher, T.C.** Zelluläre Grundlagen der Gefäßkomplikation bei Diabetes mellitus. *J Kardiol*. 7, 2000, 9-13.

135. **Mueller, M.J.** Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem Biol.* 5, 1998, 323-333.
136. **Cui, T., Schopfer, F.J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T, Baker, P.R., Batthyany, C., Chacko, B.K., Feng, X., Patel, R.P., Agarwal, A., Freeman, B.A., Cehn, Y.E.** Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem.* 281, 2006, 35686-35698.
137. **E. Prüfer GmbH.** <http://www.charismon-schoenheit-und-gesundheit.de/produkte/produkte.htm>. [Online] E. Prüfer GmbH. [Zitat vom: 19. 07 2011.]
138. **Nawrocki, Dr. Werner Ch.** <http://www.dr nawrocki.de/charismon.html>. [Online] [Zitat vom: 19. 07 2011.]
139. **Pfaffl, M.W.** Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *BIOSpektrum.* 1, 2004.
140. **Elroy-Stein, O., Bernstein, Y., Groner, Y.** Overproduction of human Cu/zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* 5, 1986, 615-622.
141. **Kedziora, J., Bartosz, G.** Down's Syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 4, 1988, 317-330.
142. **E. Prüfer GmbH.** <http://www.charismon-schoenheit-und-gesundheit.de/produkte/wirkungsweise.htm>. [Online] E. Prüfer GmbH. [Zitat vom: 09. 07 2011.]
143. **E. Prüfer GmbH.** <http://www.charismon-schoenheit-und-gesundheit.de/wissenschaft/wissenschaft.htm>. [Online] E. Prüfer GmbH. [Zitat vom: 09. 07 2011.]
144. **Vidal-Vanaclocha, F.** Inflammation in the molecular pathogenesis of cancer and atherosclerosis. *Reumatol Clin.* 5S1, 2009, 40-43.
145. **Cracowski, J.L., Durand, T., Bessard, G.** Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends pharmacol sci.* 23, 2002, 360-366.

146. **Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., Legrand, A.** Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3, 2000, 373-384.
147. **Naghavi, M., Libby, P. et al.** From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation.* 108, 2003, 1664-1672.
148. **Erbel, R.** Vulnerable plaque -- vulnerable vessel -- vulnerable patient. Plaques prone to rupture in atheroma/fibroatheroma. *Herz.* 28, 1997, Bd. 6, 483-487.
149. **Naghavi, M., Libby, P. et al.** From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation.* 108, 2003, Bd. 15, 1772-1778.
150. **Ishii, H., Kizaki, C.L., Horie, S., Kazama, M.** Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem.* 271, 1996, Bd. 14, 8458-8465.
151. **Qinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D.** Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 1987, Bd. 9, 2995-2998.
152. **Imler, J., Wasyluk, B.** AP1, a composite transcription factor implicated in abnormal growth control. *Prog Growth Factor Res.* 1, 1989, Bd. 2, 69-77.
153. **Radler-Pohl, A., Gebel, S., Sachsenmaier, C., König, H., Krämer, M., Oehler, T., Streile, M., Ponta, H., Rapp, U., Rahmsdorf, H.J. et al.** The activation and activity control of AP-1 (fos/jun). *Ann N Y Acad Sci.* 684, 1993, 127-148.
154. **Zang, X., Odom, D.T., Koo, S.H., Conkright, M.D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Hacobsen, E., Kadam, S., Ecker, J.R., Emerson, B., Hogenesch, J.B., Untermann, T., Young, T., Montminy, M.** Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 2005, Bd. 12, 4459-4464.
155. **Jhun, B.S., Lee, J.Y., Oh, Y.T., Lee, J.H., Choe, W., Baik, H.H., Kim, S.S., Yoon, K.S., Ha, J., Kang, I.** Inhibition of AMP-activated protein kinase suppresses IL-2 expression

through down-regulation of NF-AT and AP-1 activation in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 351, 2006, Bd. 4, 986-992.

156. **Breier, G., Licht, A.H., Nicolaus, A., Klotzsche, A., Wielockx, B., Kirsnerova, Z.** HIF in vascular development and tumour angiogenesis. *Novartis Found Symp.* 283, 2007, 126-133.

157. **Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G.N., Semenza, G.L.** Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 105, 2005, 659-669.

158. **Matsuda, T., Abe, T., Wu, J.L., Fujiki, M., Kobayashi, H.** Hypoxia-inducible factor-1 α DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model. *Neurol Res.* 27, 2005, 503-508.

159. **Kietzmann, T., Roth, U., Jungermann, K.** Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood.* 94, 1999, 4177-4185.

160. **Cron, R.Q.** HIV-1, NFAT, and cyclosporin: immunosuppression for the immunosuppressed? *DNA Cell Biol.* 20, 2001, Bd. 12, 761-767.

161. **Meyer, K.B., Ireland J.** PMA/ionomycin induces Ig kappa 3' enhancer activity which is in part mediated by a unique NFAT transcription complex. *Eur J Immunol.* 28, 1998, 1467-1480.

162. **Lyakh, L., Ghosh, P., Rice, N.R.** Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol.* 17, 1997, Bd. 5, 2475-2484.

163. **Ferreira, V., van Dijk, K.W., Groen, A.K., Vos, R.M., van der Kaa, J., Gijbels, M.J., Havekes, L.M., Pannekoek, H.** Macrophage-specific inhibition of NF-kappaB activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis.* 192, 2007, 283-290.

164. **Lin, R., Liu, N., Yang, G., Gan, W.** Lovastatin reduces nuclear factor kappaB activation induced by C-reactive protein in human vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 28, 2005, Bd. 9, 1630-1634.

165. **Bergstrom, S., Sjovall, J.** The isolation of Prostaglandin F from sheep prostate glands. *Acta chem scand.* 14, 1960, 1693-1700.

166. **Bergstrom, S. Sjovall, J.** The isolation of prostaglandin E from sheep prostate glands. *Acta chem scand.* 14, 1960, 1701-1705.

167. **Bergstrom, S, Ryhage, R., Samulsson, B., Sjovall, J.** The structure of prostaglandin E, F1 and F2. *Acta chem scand.* 16, 1962, 501-502.
168. **Porter N.A., Funk, M.O.** Letter: Peroxy radical cyclization as a model for prostaglandin biosynthesis. *J Org Chem.* 40, 1975, 3614-3615.
169. **Morrow, J.D., Roberts, L.J.** The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res.* 36, 1997, 1-21.
170. **Chen, Y., Morrow, J.D., Roberts, L.J.** Formation of reactive cyclopentenone compounds in vivo as products of the isoprostane pathway. *J Biol Chem.* 274, 1999, 10863-10868.
171. **Praticò, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A.** Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Biol Chem.* 270, 1995, 9800-9808.
172. **Praticò, D., FitzGerald, G.A.** Generation of 8-epiprostaglandin F2alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem.* 271, 1996, 8919-8924.
173. **Praticò, D.** Prostanoid and isoprostanoid pathways in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 201, 2008, Bd. 1, 8-16.
174. **Montuschi, P., Currò, D., Ragazzoin, E., Preziosi, P., Ciabattini, G.** Anaphylaxis increases 8-iso-prostaglandin F2alpha release from guinea-pig lung in vitro. *Eur J Pharmacol.* 365, 1999, 59-64.
175. **Mueller, M.J.** Isoprostane nomenclature: inherent problems may cause setbacks for the development of the isoprostanoid field. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 82, 2010, 71-81.
176. **Gopaul, N.K., Halliwell, B., Anggard, E.E.** Measurement of plasma F2-isoprostanes as an index of lipid peroxidation does not appear to be confounded by diet. *Free Radic Res.* 33, 2000, 115-127.
177. **Gopaul, N.K., Zacharowski, K., Halliwell, B., Anggard, E.E.** Evaluation of the postprandial effects of a fast-food meal on human plasma F(2)-isoprostane levels. *Free Radic Biol Med.* 28, 2000, 806-814.
178. **Gilles, S., Mariani, V., Bryce, M., Mueller, M.J., Ring, J., Jakob, T., Pastore, S., Behrend, H., Traidl-Hoffmann, C.** Pollen-derived E1-phytoprostanes signal via PPAR-

gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms. *J Immunol.* 182, 2009, Bd. 11, 6653-6658.

179. **Ferreira, A.M., Ferrari, M., Trostchansky, A., Batthyany, C., Souza, J.M., Alvarez, M.N., López, G.V., Baker, P.R., Schopfer, F.J., O'Donnell, V., Freeman, B.A., Rubbo, H.** Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J.* 417, 2008, 223-234.

180. **Lim, W.S., Timmins, J.M., Seimon, T.A., Sadler, A., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Tabas, I.** Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation.* 117, 2008, 940-951.

181. **Koga, M., Kai, H., Yasukawa, H., Yamamoto, T. Kawai, Y. Kato, S., Kusaba, K., Kai, M., Egashira, K., Kataoka, Y., Imaizumi, T.** Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. *Circ Res.* 101, 2007, 348-356.

182. **Argawell, S., Febbraio, M., Podrez, E., Cathcart, M.K., Stark, G.R., Chisolm, G.M.** Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation.* 115, 2007, 2939-2947.

183. **Cole, M.P., Rudolph, T.K., Khoo, N.K., Motanya, U.N., Golin-Bisello, F., Wertz, J.W., Schopfer, F.J., Rudolph, V., Woodcock, S.R., Bolisetty S, Ali MS, Zhang J, Chen YE, Agarwal A, Freeman BA, Bauer PM.** Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res.* 105, 2009, 965-972.

184. **Livak, K.J., Schmittgen, T.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 2001, Bd. 4, 402-408.

185. **Dawn, B., Bolli, R.** HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289, 2005, H522-H524.

186. **Minami, T., Miura, M., Aird, W.C., Kodama, T.** Thrombin-induced autoinhibitory factor, Down syndrome critical region-1, attenuates NFAT-dependent vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammation in the endothelium. *J Biol Chem.* 281, 2006, Bd. 29, 20503-20520.

187. **Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., Yamamoto, S.** Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem.* 270, 1995, Bd. 52, 31315-31320.
188. **Ackerman, W.E. 4th, Summerfield, T.L., Vandre, D.D., Robinson, J.M., Kniss, D.A.** Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biol Reprod.* 78, 2007, Bd. 1, 68-76.
189. **Kaltschmidt, B., Linker, R.A., Deng, J., Kaltschmidt, C.** Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC Mol Biol.* 3, 2002, 16.
190. **Nakata, S., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Yamashita, T., Tanimoto, A., Tasaki, H., Ozumi, K., Sabanai, K., Morishita, T., Suda, O., Hirano, H., Sasaguri, Y., Nakashima, Y., Yanagihara, N.** Statin treatment upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through Akt/NF-kappaB pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 2008, Bd. 1, 92-98.
191. **Li, Y., Li, G., Li, C., Zhao, Y.** Identification of nuclear factor-kappaB responsive element within the neuronal nitric oxide synthase exon 1f-specific promoter. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 39, 2007, Bd. 4, 247-254.
192. **Morris, K.R., Lutz, R.D., Choi, H.S., Kamitani, T., Chmura, K., Chan, E.D.** Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun.* 71, 2003, Bd. 3, 1442-1452.
193. **Guo, G., Bhat, N.R.** Hypoxia/reoxygenation differentially modulates NF-kappaB activation and iNOS expression in astrocytes and microglia. *Antioxid Redox Signal.* 8, 2006, Bde. 5-6, 911-918.
194. **Hughes, J.E., Srinivasan, S., Lynch, K.R., Proia, R.L., Ferdek, P., Hedrick, C.C.** Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res.* 102, 2008, 950-958.
195. **Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W.** Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am J Physiol.* 269, 1995, Bd. 5 Pt 1, L588-602.

196. **Rojo, A.I., Salinas, M., Martín, D., Perona, R., Cuadrado, A.** Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci.* 24, 2004, Bd. 33, 7324-7334.
197. **Furumatsu, T., Asahara, H.** Histone acetylation influences the activity of Sox9-related transcriptional complex. *Acta Med Okayama.* 64, 2010, Bd. 6, 351-357.
198. **Grunstein, M.** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature.* 389, 1997, Bd. 6649, 349-352.
199. **Niu, W., Lu, Z.J., Zhong, M., Sarov, M., Murray, J.I., Brdlik, C.M., Janette, J., Chen, C., Alves, P., Preston, E., Slightham, C., Jiang, L., Hyman, A.A., Kim, S.K., Waterston, R.H., Gerstein, M., Snyder, M., Reinke, V.** Diverse transcription factor binding features revealed by genome-wide ChIP-seq in *C. elegans*. *Genome Res.* 21, 2011, Bd. 2, 245-254.
200. **Raz, A., Wyche, A., Siegel, N., Needleman, P.** Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. *J Biol Chem.* 6, 1988, Bd. 263, 3022–3028.
201. **Maier, J.A.M., Hla, T., Maciag, T.** Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 265, 1990, Bd. 19, 10805–1080.
202. **O’Sullivan, M.G., Chilton, F.H., Huggins, Jr., E.M., McCal, C.E.** Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem.* 267, 1992, Bd. 21, 14547–1455.
203. **Bloch, C.A., Ausubel, F.M.** Paraquat-mediated selection for mutations in the manganese-superoxide dismutase gene *sodA*. *J Bacteriol.* 168, 1986, Bd. 2, 795-798.
204. **Scott, M.D., Meshnick, S.R., Eaton, J.W.** Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J Biol Chem.* 264, 1989, Bd. 5, 2498-2501.
205. **Amstad, P., Peskin, A., Shah, G., Mirault, M.E., Moret, R., Zbinden, I., Cerutti, P.** The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry.* 30, 1991, 9305-9313.
206. **Gardner, R., Salvador, A., Moradas-Ferreira, P.** Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation. *Free Radic Biol Med.* 32, 2002, Bd. 12, 1351-1357.

207. **Lohr, J.B.** Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch Gen Psychiatry*. 48, 1991, 1097-1106.
208. **Elroy-Stein, O., Groner, Y.** Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase--implication for gene dosage effects in Down syndrome. *Cell*. 52, 1988, 259-267.
209. **Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Sinet, P.M.** Cellular clones and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase: models for the study of free radical metabolism and aging. *EXS*. 62, 1992, 89-98.
210. **Machraoui, A., Grewe, P., Fischer, A.** *Koronarstenting - Werkstofftechnik, Pathomorphologie, Therapie*. Darmstadt : Steinkopff Verlag Darmstadt, 2001. ISBN 3-7985-1280-9.
211. **de Brux, J. A. et al.** Classification of atherosclerotic lesions - Report of a study group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 143, 1958, 1-20.
212. **Cipollone, F., Fazia, M.L., Mezzetti, A.** Oxidativestress, inflammation and atheroscleroticplaquedevelopment. *International congress serie*. 1303, 2007, 35-40.
213. **Libby, P.** Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*. 91, 2003, 3A-6A.
214. **Damert, A., Ikeda, E., Risau, W.** Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem J*. 327, 1997, 419-423.
215. **Costa, V., Reis, E., Quintanilla, A., Moradas-Ferreira, P.** Aquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 300, 1993, 608-614.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µmol	Mikromol
10-NO ₂ -OA	Nitroölsäure
8-iso-PGF _{2α}	F ₂ -Isoprostan (iPF _{2α} -III, 15-F _{2t} -Isoprostan)
9-NO ₂ -OA	Nitroölsäure
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym, Synonym: Kinase II
Akt	Proteinkinase B
ANGPT	Angiopoeitin
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Apo	Apolipoprotein
bFGF	<i>basic-fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaM K	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinases</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD40L	<i>cluster of differentiation 40 ligand</i>
cDNA	englisch: <i>complementary DNA</i> , deutsch: komplementäre DNS
CK	Kreatin-Kinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoCl ₂	Cobaltchlorid
COS-Zellen	Fibroblastenzelllinie
COX	Zyklooxygenase
CPX	Ciclopiroxolamin
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
Ctr.	Kontrolle
CVRC	<i>Cardiovascular Research Center</i>
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethyldicarbonat
DFO	Deferoxamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP-Rezeptor	Prostaglandin-D ₂ -Rezeptor
EA.HY	Humane Nabelschnurhybridendothelzelle

EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
eNOS	endotheliale NOS oder NOS-3
ent-1	5-ent-F _{2c} -IsoP, Isoprostan
EPO	Erythropoetin
EP-Rezeptor	Prostaglandinrezeptor
EtOH	Ethanol
FCS	festales Kälberserum
Flk-1	VEGF-Rezeptor 2
Flt-1	VEGF-Rezeptor 1
FSK	Forskolin
g	Gramm
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC/MS	Gas-Chromatographie/Massen-Spektrometrie
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
GPX	Glutathion-Peroxidase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HAT	flüssige Mischung aus Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidine für die Zellkultur
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus
HO-1	Hämoxygenase
HRE	<i>hypoxia-response-element</i>
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzelle
IBMM	<i>Institut Biomolecules Max Mousseron</i>
<i>ICAM1</i>	<i>inter-cellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
INN	Ciclosporin A
iNOS	induzierbare NOS oder NOS-2
iP	Isoprostan
iPF _{2α} III	F ₂ -Isoprostan (15-F _{2t} -Isoprostan, 8-iso-PGF _{2α})
IsoP	Isoprostan
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KHK	Koronare Herzerkrankung
L	Liter
LC/MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol

MAPKAP-2	<i>mitogen-activated protein kinase-activator protein 2</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunde
MSK-1	<i>mitogen-& stress-activated protein kinase-1</i>
MYLK	Myosinleichtketten-Kinase
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NeuroP	Neuroprostan
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NIDDM	Nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nNOS	neuronale NOS oder NOS-1
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase 1
NQO	NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase
OA	Ölsäure
o.g.	oben genannt
ODN	Oligodesoxynucleotid
oxLDL	oxidiertes LDL
p	Signifikanzniveau
p	Passagenummer
p53	Protein 53
PAI-1	<i>plasminogen aktivator inhibitor 1</i>
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor, Wachstumsfaktor</i>
PDGFB	<i>platelet-derived-growth-factor B</i>
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF	<i>placental growth factor</i>
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PhytoP	Phytoprostan

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PP	Phytosteran
PPAR	<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	quantitative PCR
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RNI	Reaktive Stickstoffspezies, engl: <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl: <i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Realtime-PCR</i>
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
sAC	lösliche Adenylatzyklase
sec	Sekunde
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	Superoxiddismutase 1, CuZnSOD
SOD2	Superoxiddismutase 2, MnSOD
Sp1	Specificity protein 1 (Transkriptionsfaktor)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
t	Zeitpunkt
TBXA2R	Thromboxanrezeptor
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TNFR-1	TNFα-Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TP	Thromboxanrezeptor
TSA	Trichostatin A
U	Einheit Enzymaktivität
u	Einheit Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
UDP-GT	UDP-Glucuronosyltransferase
v.a.	vor allem
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
vs	versus
WHO	<i>World Health Organisation</i>
xg	Erdbeschleunigung/Zentrifugeneinheit
z.B.	zum Beispiel
γGCS	γ-Glutamylcystein-Synthase

Die Abkürzungen sec. bzw. s und μM bzw. μmol sowie U bzw. u sind in dieser Arbeit jeweils beide benutzt worden. Die Abkürzungen sec. und μM wurden standardmäßig genutzt. Bei den Angaben s und μmol handelt es sich um Herstellerangaben, die ohne Änderung übernommen worden sind. Bei den Enzymaktivitäten U und u handelt es sich jeweils um die Angaben der entsprechenden Hersteller.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gehalt von Phytoprostanen in der menschlichen Nahrung aus Krag, K. „Analyse biologisch aktiver, oxidierter Lipide in Pflanzen und Menschen“, Dissertation, Universität Würzburg, gekürzt.....	25
Tabelle 2: Liste der getesteten Iso- und Phytoprostane	30
Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte	31
Tabelle 4: Liste der verwendeten Gebrauchsgegenstände.....	32
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Medien	33
Tabelle 6: Liste der verwendeten Zellkulturmedien	34
Tabelle 7: Liste der verwendeten <i>Kits</i>	34
Tabelle 8: Liste der verwendeten <i>Software</i>	35
Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen.....	35
Tabelle 10: Liste der verwendeten Genexpressions-Assays	36
Tabelle 11: Herstellerangabe der zur Transfektion benötigten Konzentrationen	41
Tabelle 12: Stimulationszeiten und Stimulationszusätze der verschiedenen Signalwege.....	43
Tabelle 13: Konzentrationen der jeweiligen Versuchszusätze der Testsubstanzen	44
Tabelle 14: Konzentrationen der Rezeptorblocker beim Transkriptionsfaktor CREB.....	45
Tabelle 15: <i>Master-Mix</i> für die cDNA-Synthese	49
Tabelle 16: PCR-Protokoll für die cDNA-Synthese.....	49
Tabelle 17: <i>Master-Mix</i> für die qPCR.....	50
Tabelle 18: PCR-Protokoll für die qPCR	50
Tabelle 19: Expressionsanalyse der Zielgene (Transkriptionsfaktor HIF-1) unter Einfluss von 8-iso-PGD ₂ in HUVEC-Zellen.....	84
Tabelle 20: Expressionsanalys der Zielgene (Transkriptionsfaktor NFκB) unter Einfluss von 8-iso-PGD ₂ in HUVEC-Zellen	85
Tabelle 21: Liste der Phytoprostane, für die in der vorliegenden Arbeit kein Effekt gezeigt werden konnte.	88

8.3 Abbildungsverzeichnis

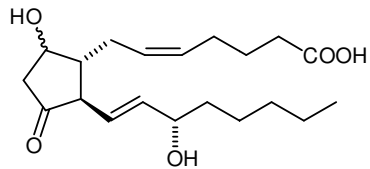
Abbildung 1: Arterie vom muskulären Typ im Querschnitt, HE-Färbung.	10
Abbildung 2: Drei F ₂ -Isoprostane der 5er-Serie	20
Abbildung 3: Isoprostan 8-iso-PGF _{2α} (iPF _{2α} -III, 15-F _{2t} -Isoprostan)	20
Abbildung 4: EA.HY-GFP-Zellen, Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme,	41
Abbildung 5: EA.HY-Zellen nach Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor AP-1.....	42
Abbildung 6: EA.HY-Zellen ohne Transduktion	42
Abbildung 7: Effekte von PGD ₂ und 8-iso-PGD ₂ auf den Transkriptionsfaktor AP-1 in.....	51
Abbildung 8: Effekte der Phytoprostane SEVD34A und SEVD34B auf den AP-1- Transkriptionsfaktor	52
Abbildung 9: Effekte des Phytoprostans SEVD34A auf die Genexpression in HUVEC- Zellen der beiden Zielgene HO-1 und NOS-3 (eNOS)	53
Abbildung 10: Effekte der Isoprostane 8-iso-PGA ₂ und 8-iso-PGF _{2α} auf den Transkriptionsfaktor CREB	54
Abbildung 11: Effekte von PGE ₁ , PGE ₂ und 8-iso-PGE ₂ auf dem CREB-Signalweg in	54
Abbildung 12: Effekt des EP4-Rezeptorblockers L-161,982 auf die Prostaglandine PGE ₁ und PGE ₂ sowie das Isoprostan 8-iso-PGE ₂ beim CREB-Transkriptionsfaktor.....	56
Abbildung 13: Genexpressionsanalyse der Prostaglandine PGE ₁ und PGE ₂ sowie des Isoprostans 8-iso-PGE ₂ beim CREB-Transkriptionsfaktor für die Zielgene HO-1 und COX- 2	57
Abbildung 14: Genexpressionsanalyse: Einfluss von PGE ₂ und 8-iso-PGE ₂ auf die Zielgene HO-1 und COX-2 unter Rezeptorblockade mit dem EP4-Rezeptor L-161,982.....	58
Abbildung 15: Versuche zur Stimulation des Transkriptionsfaktors HIF-1	59
Abbildung 16: Effekt von 8-iso-PGD ₂ auf den HIF-1-Transkriptionsfaktor.....	60
Abbildung 17: Effekt von 8-iso-PGD ₂ auf die relative Genexpression in HUVEC-Zellen der Zielgene HO-1 und VEGFA	61
Abbildung 18: Effekt von 8-iso-PGD ₂ auf die relative Genexpression der Zielgene VEGFR-1 und VEGFR-2	62
Abbildung 19: Effekt von 8-iso-PGD ₂ auf den NFAT-Transkriptionsfaktor in EA.HY-Zellen	63
Abbildung 20: Phytoprostane AG113A und AG113B auf dem NFAT-Signalweg.....	64
Abbildung 21: Effekt des Isoprostans ent-1 auf dem NFAT-Signalweg.....	65

Abbildung 22: Effekt von 1% Spirit of Charismon und 1% Eiöl	66
Abbildung 23: Genexpressionsanalyse des Zielgenes VEGFA für den NFAT- Transkriptionsfaktor in HUVEC-Zellen mit 0,1% Spirit of Charismon und 0,1% Eiöl	67
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der Zielgene VEGFR-1 und VEGFR-2 auf dem NFAT-Signalweg in HUVEC-Zellen mit 0,1% Spirit of Charismon und 0,1% Eiöl	68
Abbildung 25: Effekt des Isoprostans ent-1 auf dem NFκB-Transkriptionsfaktor	69
Abbildung 26: Effekt von Nitroölsäure und Ölsäure auf den NFκB-Transkriptionsfaktor	70
Abbildung 27: Effekt von PGD ₂ und 8-iso-PGD ₂ auf den NFκB-Transkriptionsfaktor	71
Abbildung 28: Fotodokumentation der Zellmorphohologie von HUVEC-Zellen unter Einfluss der Isoprostane 8-iso-PGD ₂ , 8-iso-PGF _{2α} und 8-iso-PGE ₂	73
Abbildung 29: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg, Zielgene COX-2 und MYLK mit dem Isoprostan 8-iso-PGD ₂	74
Abbildung 30: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg für die Zielgene nNOS und eNOS mit dem Isoprostan 8-iso-PGD ₂	75
Abbildung 31: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg für die Zielgene SOD1 und SOD2 mit dem Isoprostan 8-iso-PGD ₂	76
Abbildung 32: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg der Zielgens PTEN mit dem Isoprostan 8-iso-PGD ₂	77
Abbildung 33: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB Signalweg der Zielgene eNOS und nNOS mit Nitroölsäure und Ölsäure	78
Abbildung 34: Genexpressionsanalyse an HUVEC-Zellen auf dem NFκB-Signalweg der Zielgene SOD1 und PTEN mit Nitroölsäure und Ölsäure	79
Abbildung 35: Einfluss von ODNs auf das Luciferase-Signal bei EA.HY-Zellen.....	80
Abbildung 36: Einfluss von 10 µmol/L ODNs auf das Luciferase-Signal bei HUVEC-Zellen	81

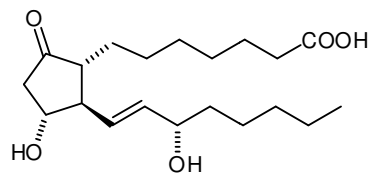
8.4 Strukturformeln der verwendeten Substanzen

8.4.1 Prostaglandine

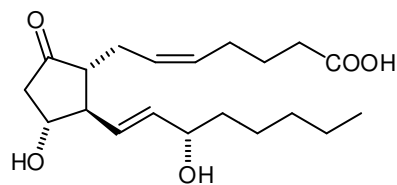
8.4.1.1 Prostaglandin D₂ (PGD₂)



8.4.1.2 Prostaglandin E₁ (PGE₁)

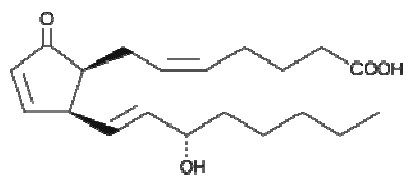


8.4.1.3 Prostaglandin E₂ (PGE₂)



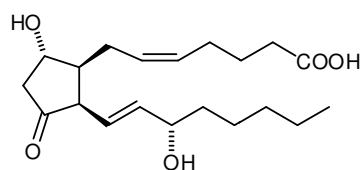
8.4.2 A₂-Isoprostan

8.4.2.1 8-iso-PGA₂



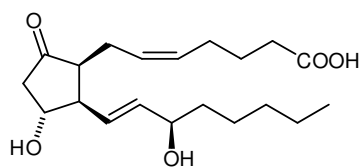
8.4.3 D₂-Isoprostan

8.4.3.1 15-D_{2t}-Isoprostan, „YB1-160“, 8-isopPGD₂



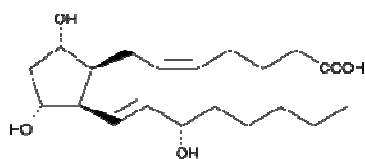
8.4.4 E₂-Isoprostan

8.4.4.1 15-E₂t-Isoprostan, 8-iso-PGE₂

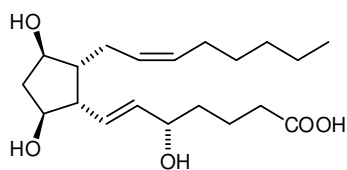


8.4.5 F₂-Isoprostane

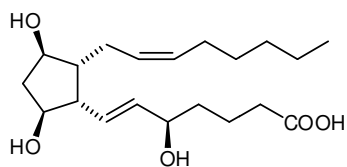
8.4.5.1 15-F₂t-Isoprostan, 8-iso-PGF_{2α}



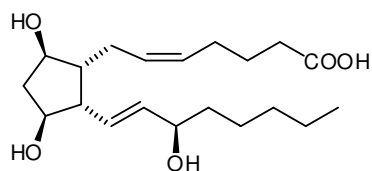
8.4.5.2 5₂t-IsoP, iPF_{2α} VI, „AG113A“



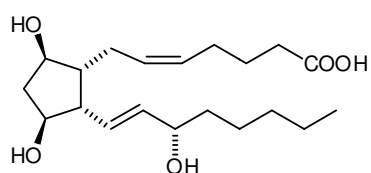
8.4.5.3 5-epi-5-F₂t-IsoP, 5-epi-iPF_{2α} VI, „AG113B“



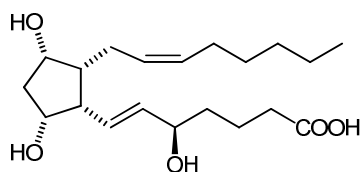
8.4.5.4 ent-15-F₂t-IsoP, „JMG312“



8.4.5.5 ent-15-epi-15-F₂t-IsoP, „JMG317“

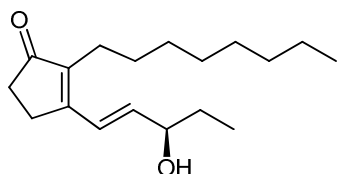


8.4.5.6 ent-5F_{2C}-IsoP, „ent-1“

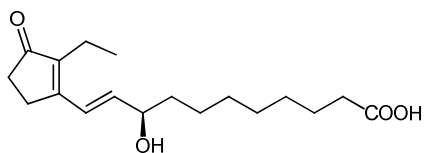


8.4.6 B₁-Phytprostane

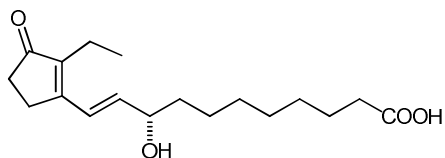
8.4.6.1 ent-B₁-Phytprostan Typ I, „SE175A“



8.4.6.2 ent-B₁-Phytprostan Typ II, „SE194R“

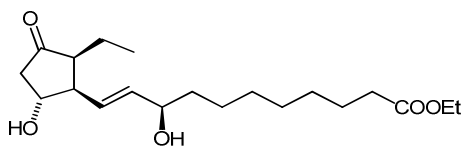


8.4.6.3 B₁-Phytprostan Typ II, „SE195S“

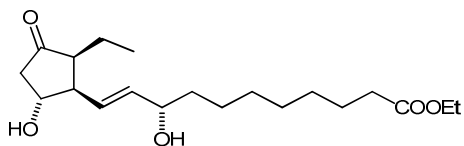


8.4.7 E₁-Phytprostane

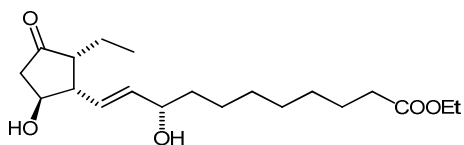
8.4.7.1 9-epi-PPE₁ Typ II Ethyl-Ester, „AG260“



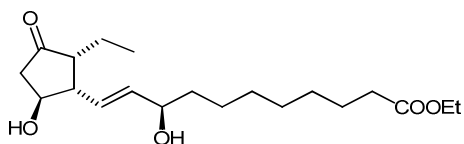
8.4.7.2 PPE₁ Typ II Ethyl-Ester, „AG267“



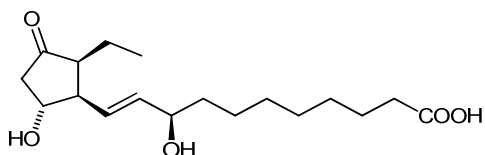
8.4.7.3 ent-9-epi-PPE₁ Typ II Ethyl-Ester, „AG273A“



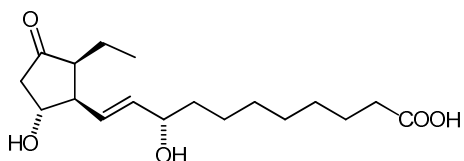
8.4.7.4 ent-PPE₁ Typ II Ethyl-Ester, „AG273B“



8.4.7.5 9-epi-PPE₁ Typ II, „AG441A“

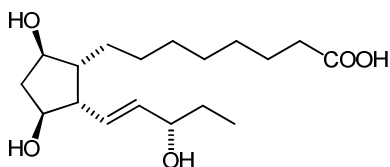


8.4.7.6 PPE₁ Typ II, „AG441B“

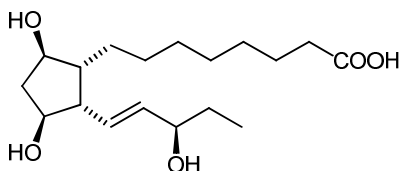


8.4.8 F₁-Phytoprostane

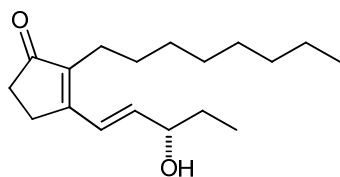
8.4.8.1 ent-16-epi-F₁-Phytoprostan Typ I, „SE126A“



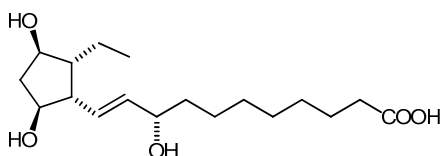
8.4.8.2 ent-F₁-Phytoprostan Typ I, „SE126B“



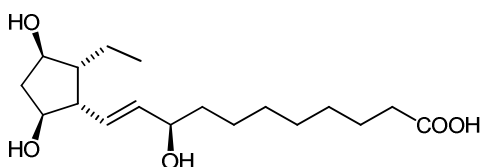
8.4.8.3 ent-F₁-Phytoprostan Typ II, „SE175B“



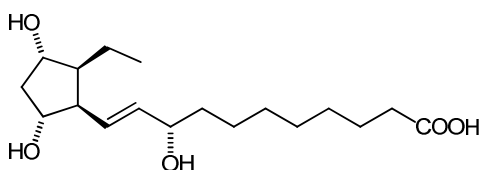
8.4.8.4 ent-9-epi-F₁-Phytoprostan Typ II, „SE139A“



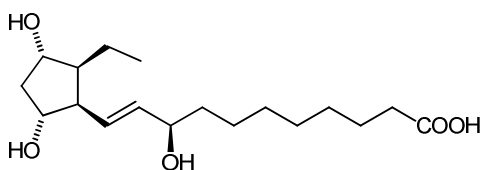
8.4.8.5 ent-F₁-Phytoprostan Typ II, „SE139B“



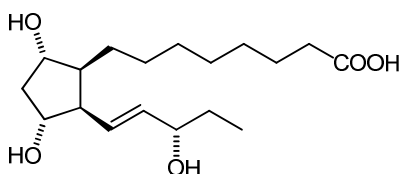
8.4.8.6 F₁-Phytoprostan Typ II, „SEVD34A“



8.4.8.7 9-epi-F₁-Phytoprostan Typ II, „SEVD34B“

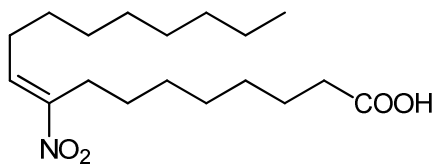


8.4.8.8 F₁-Phytoprostan Typ I, „VD34B“

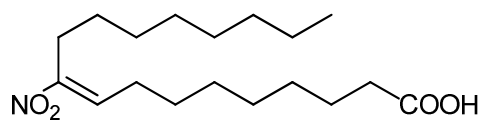


8.4.9 Nitroölsäuren

8.4.9.1 9-NO₂-OA (9-Nitroölsäure)



8.4.9.2 10-NO₂-OA (10-Nitroölsäure)



9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die an der Universität Hamburg angefertigte Arbeit mit dem Titel:

Isoprostane, Phytprostane, Nitroölsäuren und Eiöl als Modulatoren der Genexpression: Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Atherosklerose

im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger und der Betreuung durch Herrn PD Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm an der Medizinischen Fakultät 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 in- oder ausländischen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg im April 2012

Jutta Heinz

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Vergabe der Promotion, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die umfassende Betreuung während der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Meinen größten Dank möchte ich Dr. Edzard Schwedhelm aussprechen und ihm für viel Geduld, sein jederzeit offenes Ohr und viele fruchtbare Diskussionen, auch am Wochenende, danken. Zudem wäre die Arbeit ohne seine kontinuierliche und andauernde Motivation sowie Unterstützung nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Familie Schwedhelm für die schöne Zeit und einige Überraschungen danken.

Für viele nützliche Tipps und ständige Hilfsbereitschaft danke ich Dr. Nicole Lüneburg und Dr. Maike Anderson. Diesen Dank möchte ich auch den Mitarbeitern des Institutes, vor allem Anna Stenpass, Mariola Kastner, Sandra Maak und Cornelia Wörmann, aussprechen, ohne deren ständig Hilfe und vielen Tipps diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Bruder Martin Heinz, der mit viel Geduld und zeitlichem Aufwand sämtliche Soft- und Hardwarefragen sowie Layoutprobleme gelöst und mich mit aufmunternden Worten motiviert hat. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden Kay Pfeiffer und Dr. Stephan Labsch für ihre wertvolle Korrekturarbeit und ihre Anregungen bedanken. Für manche hilfreiche Diskussion danke ich zudem Marius Dose.

Mein aufrichtigster Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir auf meinem bisherigen Lebensweg jederzeit zur Seite standen und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

11 Lebenslauf