

Heike Oberwittler

Dr. med.

## **Nachweis und Quantifizierung der Cyclooxygenase-2 in der arteriosklerotischen Läsion mittels PCR**

Geboren am 12.10.1965 in Werther

Reifeprüfung am 21.05.1985 in Bielefeld

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989 bis WS 1996

Physikum am 02.09.1991 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 07.11.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv. Doz. Dr. med. E. v. Hodenberg

Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane sind vasoaktive Substanzen deren Funktion und Bedeutung auch im arteriosklerotischen Prozeß diskutiert wird.

Als Schlüsselenzym in der Modifikation dieser Eicosanoide wird die Cyclooxygenase angesehen. 1991 wurde eine zweite Form des Enzyms beschrieben, die im Gegensatz zur ersten Form neben dem konstitutiven auch einem induktiven Expressionsmodus unterliegt.

Bis zur Beschreibung dieser Cyclooxygenase-2 korrelierte ein Anstieg der Produkte nicht eindeutig mit dem Anstieg des Enzyms. Die Cyclooxygenase-2 ist unter anderem durch Substanzen, die in der Arteriosklerose eine atherogene Funktion haben, induzierbar.

In dieser Arbeit wurden Proben aus gesunder Aortenwand von Herzspenderaorten und arteriosklerotische Plaques von Thrombendarteriektomien aus der Arteria carotis auf ihren Gehalt an Cyclooxygenase-1 und -2 untersucht.

Aufgrund der großen Homologie der beiden Enzyme zueinander und der jeweils geringen Mengen der einzelnen Proben, wurde der Nachweis auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR durchgeführt.

Für die Quantifizierung der COX-2-mRNA wurde in dieser Arbeit eine kompetitive RT-PCR Methodik mit einem nicht-homologen Standard etabliert, die zu quantifizierende cDNA und die Standardsequenz wurden mit den jeweils gleichen Primern amplifiziert. Als Referenzgröße für die COX-2-Expression diente die GAPDH-mRNA-Expression. Mit dieser Methode war ein spezifischer und sensitiver Nachweis der COX-2 bis zu einem Minimum von 2 Molekülen im PCR-Ansatz möglich.

Die kompetitive RT-PCR war mit Variationskoeffizienten  $<12\%$  hinsichtlich der Reproduzierbarkeit aussagekräftig. Für cDNA und Standardsequenz konnte die gleiche Amplifikationseffizienz nachgewiesen werden, so daß die Quantifizierung mit wenig Ausgangsmaterial unabhängig von der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt werden konnte.

In dieser Arbeit wurde neben der mRNA der Cyclooxygenase-1 auch die der Cyclooxygenase-2 in der gesunden Aortenwand und in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen. Als Positivkontrollen für die COX-2-Expression dienten LPS-stimulierte Makrophagen und seruminkubierte glatte Gefäßmuskelzellen.

Die Quantifizierung der Cyclooxygenase-2 ergab eine durchschnittlich höhere Expression im arteriosklerotischen Plaque im Vergleich zur gesunden Aortenwand.

Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Bedeutung der Cyclooxygenase-2 in der Atherogenese hin. Die Frage hinsichtlich einer pro- oder antiatherogenen Funktion läßt sich für das Enzym aufgrund der Verschiedenartigkeit der Endprodukte nicht beantworten. Seit einigen Jahren wird die Cyclooxygenase in der klinischen Therapie mit ASS blockiert, um die durch Thromboxane begünstigte Thrombozytenaggregation zu hemmen.

Neuere Untersuchungen heben jedoch auch die protektive Funktion der Prostaglandine und Prostazykline hervor, die durch ASS ebenfalls unterdrückt werden.

Eine therapeutisch blockierende Intervention auf der Ebene der Cyclooxygenase, deren Induktion auch die Produktion der protektiven Prostaglandine und Prostazykline hervorruft, sollte daher weiter untersucht werden.