

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Summary	3
3. Einleitung.....	5
3.1. Der RhoA/ROCK-Signalweg	5
3.1.1. RhoA und kleine Rho-GTPasen	5
3.1.2. Rho-assoziierte Kinasen (ROCK)	7
3.1.3. Physiologische Funktionen von ROCK.....	10
3.1.4. Pathologische Funktionen von ROCK	13
3.1.5. Isoform-spezifische Funktionen der Rho-Kinasen.....	14
3.2. CTGF	15
3.3. Das Aktinzytoskelett	17
3.4. Migration	21
3.5. Fokale Adhäsionen	25
3.6. VE-Cadherin.....	26
3.7. Hypoxie	27
3.8. Angiogenese	29
3.8.1. Krankheiten und Therapiemöglichkeiten	29
3.8.2. Molekulare Effektoren der Angiogenese.....	31
3.8.3. Rolle der endothelialen Vorläuferzellen bei der Angiogenese.....	33
3.8.4. Beginn des Angiogeneseprozesses	34
3.8.5. Das Aussprossen.....	35
3.8.6. Migration während des Angiogeneseprozesses	37
3.8.7. Reifung der neu gebildeten Gefäße	39
3.9. Zielsetzung der Arbeit	41
4. Material und Methoden.....	42
4.1. Zellkultur	42
4.2. Westernblot.....	43
4.2.1. Proteinextraktion und -quantifizierung.....	43
4.2.2. SDS-PAGE-Gelelektrophorese	45
4.2.3. Immunoblot	46
4.3. siRNA	48
4.4. Immunfluoreszenzfärbung.....	49
4.5. Boydenkammer-Assay	50
4.6. Lateral migrations-Assays	51
4.6.1. Scratch-Assay.....	51
4.6.2. Barrieren-Assay	52

4.7.	<i>In vitro</i> Sprouting-Assay	52
4.7.1.	Herstellung der Endothelzellsphäroide mittels der <i>hanging drop</i> -Methode	52
4.7.2.	Einbetten der Sphäroide in Kollagenmatrix	52
4.7.3.	Quantifizierung	53
4.7.4.	Hoechst-Färbung der Sphäroide	53
4.8.	3D-2D-Migrationsassay	54
4.8.1.	BrdU-Proliferationsassay	54
4.8.2.	Live Cell Imaging	55
4.9.	<i>In vitro</i> Tube Formation Assay (Matrigel)	55
4.10.	VEGF ELISA	56
4.11.	Chemikalien	56
5.	Ergebnisse	58
5.1.	Einfluss von Rho-Kinase-Inhibitoren auf die CTGF-Expression	58
5.1.1.	Herunterregulation von CTGF durch H1152	58
5.1.2.	Modulation der CTGF-Expression durch SLX2119 und SLX3058-1	59
5.1.3.	Einfluss von ROCK2-spezifischer siRNA auf die CTGF-Expression	61
5.2.	Hemmung der MYPT-Phosphorylierung durch Rho-Kinase-Inhibitoren	62
5.3.	Beeinflussung der Cofilin-Phosphorylierung durch ROCK-Inhibition	64
5.4.	Verbindung der CTGF-Regulation zu dem PI3-Kinase/AKT-Signalweg	66
5.5.	Einfluss von Rho-Kinase-Inhibitoren auf die Zytoskelettarchitektur	67
5.6.	Untersuchung des Einflusses von Rho-Kinase-Inhibitoren auf die Migration in 2D	69
5.6.1.	Transmigration	69
5.6.2.	Lateralmigration	70
5.7.	Migration im 3D-2D-Modell	74
5.8.	Einfluss von Rho-Kinase-Inhibitoren auf die <i>in vitro</i> Tube Formation	83
5.9.	Einfluss von Rho-Kinase-Inhibitoren auf das sprouting <i>in vitro</i>	85
6.	Diskussion	93
6.1.	Einfluss der ROCK-Inhibition auf die CTGF-Expression	93
6.2.	MYPT und Cofilin als potentielle Marker für die Aktivität der Rho-Kinasen	95
6.3.	Veränderungen des F-Aktin-Zytoskeletts durch Rho-Kinase-Inhibitoren	96
6.4.	Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch ROCK-Inhibitoren	97
6.5.	Beeinflussung der Strukturbildung und Angiogenese durch Rho-Kinasen	103
7.	Literatur	114

8. Abkürzungsverzeichnis	128
Publikationen	133
Danksagung	134
Lebenslauf	135