

Aus dem Anatomischen Institut

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

**„Untersuchung über die scherstressabhängige Induktion des platelet-derived
growth factor mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays an transfizierten
Endothelzellen“**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Katharina Hamm

aus Erfurt

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Professor Dr. D. Drenckhahn

Koreferent: Professor Dr. P. Kugler

Dekan: Professor Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2005

Die Promovendin ist Ärztin.

In Liebe meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Methoden und Materialien	12
2.1.	Zellkultur	12
2.1.1.	Herstellung des Nährmediums für die EAhy-Zelllinie	12
2.1.2.	Herstellung des Nährmediums für die HDMEC-Zelllinie	12
2.1.3.	Gelatinieren von Kulturflaschen und Glasoberflächen	12
2.1.4.	Standardkultur	13
2.1.5.	Einfrieren von Zellen	14
2.1.6.	Auftauen von Zellen	14
2.2.	Transfektion von Zellen	14
2.3.	Generieren von stabilen Zellklonen	15
2.4.	DNA –Agarosegel	16
2.4.1.	Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid	17
2.5.	DNA-Fällung	17
2.6.	Plasmid-Präparation	17
2.6.1.	Quantifizierung der DNA	18
2.7.	Transformation kompetenter E.coli-Bakterien	18
2.7.1.	Anlegen von Glycerolstöcken	19
2.7.2.	Anlegen von Platten- und Flüssigkulturen von Bakterien	19
2.8.	Proteinbestimmung nach Amidoschwarz	19
2.9.	SDS-Page	20
2.9.1.	Gesamtproteinfärbung der Polyacrylamidgele	21
2.10.	Immunreplikanalyse (Westernblot)	22
2.11.	Fixieren und Eindecken von Deckgläschen	23
2.12.	Aufbau des Meßplatzes	23
2.13.	Der Reporter-gen-Assay	26
2.14.	Lebendmaterialien	27
2.14.1.	Endothelzelllinien	27
2.14.2.	Stabil transfizierte Klone	27

2.14.3.	Bakterienstämme	28
2.15.	Vektoren	28
2.16.	Medien und Platten	30
2.17.	Antikörper	30
2.18.	Reaktionskits	31
2.19.	Weitere zusätzliche Materialien	31
3.	Ergebnisse	33
3.1.	Vervielfältigung schon vorhandener Plasmide und Generierung vier verschiedener stabiler EAhy 926- Zelllinien mit diesen Plasmiden	33
3.2.	Funktionalitätstests des Promotors mit Phorbolester	35
3.3.	Messung der EAhy 926-Konstrukte unter Scherstress	38
3.3.1.	Allgemeine Bedingungen	38
3.3.2.	Auswertung der Versuche und Statistik	39
3.3.3.	Messung der EAhy 926-Zellen mit den Kontrollplasmiden CMV-EGFP und CMV (SSRE)ins-EGFP	41
3.3.4.	Messung der EAhy 926-Zellen mit dem PDGF-EGFP-Plasmid und dem Kontrollplasmid 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP	42
3.4.	Kontrollmessung durch transient transfizierte EAhy 926-Zellen mit den Plasmiden 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP und 1,3 kb PDGF-EGFP	44
3.5.	Messungen mit transient transfizierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)	45
4.	Diskussion	46
4.1.	Diskussion eigener Ergebnisse	46
4.1.1.	Methoden	46
4.1.2.	Phorbolester-Induktion	47
4.1.3.	Experimente mit Scherstress	47
4.2.	Diskussion der Fehlermöglichkeiten und Einschränkungen	50
4.3.	Diskussion im Zusammenhang	50
4.4.	Weitere Forschungsansätze	55

5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Abkürzungen	68

1. Einleitung

Die Arteriosklerose stellt in der westlichen Welt ein großes Problem dar, denn die arteriosklerotischen Herzkreislaufkrankungen sind die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter. Der Anteil kardiovaskulärer Erkrankungen macht ca. 48 Prozent der gesamten Todesursachen aus, von denen mindestens 90 % arteriosklerotisch bedingt sind. Im Vergleich dazu stellen die Krebserkrankungen 26% der Todesursachen dar (Todesursachenstatistik 1999, statistisches Bundesamt). Arteriosklerotisch bedingte Schlaganfälle führen zu einer Vielzahl von Behinderungen. Die Inzidenz in den Industrienationen liegt bei 200-350/100000, wobei ca. 70% der Fälle durch Arteriosklerose hervorgerufen werden (Masuhr, Neumann, 1996). Die periphere arterielle Verschlusskrankheit auf dem Boden einer Arteriosklerose fordert allein in Deutschland ca. 35000 Amputationen im Jahr (Renz-Polster, Braun, 2000).

Schon Virchow erkannte, dass die Verteilung arteriosklerotischer Plaques nicht gleichmäßig ist und postulierte, dass mechanische Kräfte in verschiedenen arteriellen Regionen dafür verantwortlich sein könnten (Virchow, 1860). Doch worin liegen die Ursachen?

Arterien und Venen bilden ein geschlossenes System elastischer Röhren, die nervös, hormonal und autonom regulierbare Transport-, Kapazitäts- und Austauschwege darstellen. Außerdem wirken sie bei Abwehrvorgängen, Blutstillung und der Aufrechterhaltung des Blutdrucks mit. Die Gefäße sind dreischichtig aus Intima, Media und Adventitia aufgebaut, wobei die Intima aus einer Endothelschicht sowie dem Stratum subendotheliale besteht und als innerste Schicht den Schub des vorbeifließenden Blutstroms (entspricht Scherstress) aufnimmt. Die Media aus Muskelzellen, kollagenen Fibrillen und elastischen Fasern ist an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Die Adventitia verbindet das Gefäß mit der Umgebung. Die wesentlichen zellulären Komponenten sind die Endothelzellen und die Mediamyozyten, die strukturell und metabolisch miteinander gekoppelt sind. Die Längsachse der Endothelzellen steht in den Arterien meist in Blutstromrichtung, während sie in Venen mehr ein polygonales Muster bildet. Je nach Lokalisation proliferieren sie unterschiedlich schnell, was aber nach Schädigung des Endothels (z.B. durch Rauchen) erheblich ansteigen kann. Endothelzellen enthalten alle typischen Organellen

eukaryonter Zellen, wobei spezifisch die Weibel-Palade-Körper, zytoplasmatische Granula, auftreten, die unter anderem Endothelin und von-Willebrand-Faktor enthalten. Letzterer wird sowohl in die Basalmembran als auch in den Blutstrom abgegeben, wo er sich mit Gerinnungsfaktor VIII zu einem funktionellen Komplex verbindet und zirkulierenden Thrombozyten zur Anheftung dient und so eine Ersatzintima nach Verletzung bildet. Aktivierung und Hemmung der Blutgerinnung stehen normalerweise in einem Gleichgewicht, was aber bei bestimmten entzündlichen Reizen zugunsten der Aktivierung verschoben werden kann.

Weiterhin besitzen Endothelzellen ein stark ausgebildetes kontraktiles Filamentsystem (Aktin und Myosin), welches in strömungsexponierten Abschnitten in Myofibrillen ähnlichen Faserbündeln angeordnet ist, sogenannte Stressfasern. Sie schützen so vor Ablösung durch die hohen Scherkräfte des Blutstroms. Wichtige Funktionen des Endothels sind Interaktion mit Leukozyten über luminalen Rezeptoren (E- und P-Selektin; ICAM 1,2; VCAM-1; u.a.), Angiogenese (VEGF), Synthese von Substanzen zur Regulation der Blutgefäßweite (gefäßerweiternd: NO, gefäßverengend: Endothelin) und Regulation der Gefäßpermeabilität (durch freigesetztes Histamin, Bradykinin, Plättchenaktivierungsfaktor) sowie der Abbau von Blutfetten und die Synthese von Wachstumsfaktoren (PDGF, bFGF). Außerdem produziert es Substanzen, die die Mediamyozyten an der Proliferation hindern. Wird das Endothel immer wieder geschädigt, fallen diese Mitoseinhibitoren weg und die Myozyten wandeln sich in eine metabolisch aktive Form um (Myofibroblasten), die empfänglich für mitogene Reize ist und große Mengen an faserhaltiger Grundsubstanz produziert. Dies führt zu Mediaverdickung und Elastizitätsverlust, die Zeichen einer Arteriosklerose. Das ist ein Sammelbegriff für primär nicht entzündliche Arterienerkrankungen, bei denen ein fibröser Umbau zu einer Verdickung, Verhärtung und einem Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt. Zur Ätiologie der sekundären Atherosklerosen gehören metabolische, entzündliche und physikalische Gefäßwandschäden, die später in einen sklerosierenden Gefäßumbau übergehen. In gewissem Umfang ist dies ein Prozess des normalen Alterns. Als Risikofaktoren werden folgende angesehen: die Hyperlipidämie, speziell die Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Zigarettenrauch, das männliche Geschlecht sowie genetische Faktoren. Die Pathogenese der Arteriosklerose ist ein großes Forschungsgebiet, das ständig durch neue Ergebnisse erweitert wird, wobei ich

hier nur die Grundlagen zusammen fassen möchte. LDL und HDL können durch den transmuralen Strom in die Gefäßwand transportiert und teilweise in die Myozyten aufgenommen werden. Steigt die Konzentration von LDL im Blut und darüber in der Gefäßwand an, bleibt dieses dort länger liegen (noch verstärkt durch Kollagenfaser- und Proteoglykanvermehrung), wird chemisch modifiziert und von Makrophagen phagozytiert. Es entstehen Lipidplaques mit Schaumzellen (lipidbeladene Makrophagen). Kann das aus den Lysosomen freigesetzte Cholesterin nicht durch HDL abtransportiert werden, kristallisiert es und sprengt die Makrophagen. Es bildet sich ein Herd mit zentraler Nekrosezone und fettigem Detritus, umgeben von weiteren Schaumzellen- ein Atherom. Die Plaquemakrophagen setzen proinflammatorische Zytokine frei, was eine Entzündungsreaktion nach sich zieht. Im weiteren Verlauf bricht der Plaque auf und es blutet in ihn ein, wodurch ein intramuraler Thrombus entsteht, der den Sklerosierungsvorgang beschleunigt. Auf solch ein atherosklerotisches Ulcus können sich Thromben aufpfropfen, die bis zu einer Okklusion des Gefäßes führen können. Die proliferative Aktivität der Mediamyozyten erschöpft sich, so dass die Umgebung des Atheroms zellarm, faserreich und verkalkt wird. Damit besteht eine Einbuße in der Wandfestigkeit und Elastizität des Gefäßes. Eine Rückbildung ist nur möglich, solange der Verfettungsprozeß auf vitale Makrophagen beschränkt ist. (Drenckhahn, 2003; Riede, Schaefer, 1995)

Die Funktionen des 1974 von Ross et al. sowie Kohler und Lipton erstmalig beschriebenen platelet-derived growth factor (PDGF) erstrecken sich von der embryonalen Entwicklung, Zellwanderung und -entwicklung, Wundheilung bis hin zur Beeinflussung des ZNS sowie des vaskulären Systems: PDGF-Rezeptoren werden in Endothelzellen gebildet, und vermitteln einen Angiogenese-induzierenden Effekt (Bar et al., 1989). Auch der Blutdruck kann durch PDGF reguliert werden, wobei es je nach Zelltyp entweder zu einer Vasokonstriktion oder zu einer Nitritoxid-vermittelten Dilatation kommt (Sachinidis et al., 1990; Cunningham et al., 1992). Besondere Bedeutung kommt der PDGF-Wirkung auf die Thrombozyten-Aggregation zu: diese sinkt bei PDGF-Stimulation. Hierbei handelt es sich um eine autokrine Kontrolle von durch Thrombozyten freigesetzten PDGF nach Thrombin-induzierter Aggregation (Vassbotn et al., 1994). Während in gesunden Arterien PDGF nur in geringem Maße produziert wird, stellten Ross et al., (1993) fest, dass er in Verbindung mit der

inflammatorisch-fibroproliferativen Antwort, die für eine Artherosklerose typisch ist, verstärkt exprimiert wird. Diese Ergebnisse deckten sich mit verschiedenen Beobachtungen, die bei experimentell verursachter Artherosklerose und nach PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) auftraten (Wilcox et al., 1988; Ueda et al., 1996), bei denen ebenfalls erhöhte PDGF- und PDGF-Rezeptor-Spiegel entdeckt worden waren. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass PDGF, entweder durch Makrophagen, glatte Muskelzellen, Endothelzellen oder aus Thrombozyten freigesetzt, eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Plaques spielt. Interessant ist auch die Tatsache, dass Infusion von PDGF-BB in Ratten nach Ballon-Angioplastie zu einer verstärkten Intimaverdickung führt (Jahwien et al., 1992) und umgekehrt diese gehemmt wird durch Gabe von neutralisierenden PDGF-Antikörpern (Ferns et al., 1991). Man nimmt an, dass PDGF glatte Muskelzellen anregt, aus der Media in die Intima zu wandern, um dort zu proliferieren und Matrixmoleküle zu produzieren (Pompili et al., 1995). Ein zweiter relevanter Mechanismus wird durch die Tatsache begründet, dass PDGF chemotaktisch auf Monozyten und Neutrophile wirkt, die sich in der Subintima sammeln und dort aktiviert werden, Entzündungsmediatoren zu produzieren. Untersuchungen bei Patienten mit Hypercholesterinämie zeigten, dass PDGF A- und B-Ketten mRNA in mononukleären Zellen vermehrt war (Billett et al., 1996), so dass man annimmt, dass PDGF in cholesterolinduzierter Artherosklerose involviert ist. Die Behandlung von Ratten, die durch Ballon-Angioplastie verletzt wurden, mit Antisense-Oligonukleotiden führte zu sinkender PDGF- β -Rezeptor Expression und zu vermindertem Intimawachstum (Sirois et al., 1997). Diese Beobachtungen sind klinisch relevant und führten in Studien mit dem unspezifischen PDGF-Inhibitor Trapidil (=Triazolopyrimidin) zu ersten guten Ergebnissen (Maresta et al., 1994). Eine weitere wichtige Rolle spielt PDGF bezüglich des Zellwachstums in Glioblastomen und Sarkomen durch autokrine Stimulation sowie durch parakrine Stimulation in anderen Tumoren, das heißt in der Onkogenese, und auch in fibrotischen Prozessen, z.B. Lungen- und Nierenfibrose, Leberzirrhose und Myelofibrose. Das Glykoprotein PDGF kann in homo- und heterodimerer Form von durch Disulfidbrücken gebundenen A- oder B-Polypeptidketten vorkommen. Die Ketten sind jeweils ca. 100 Aminosäuren lang, wobei 60% der beiden Ketten bezüglich ihrer Sequenz identisch sind (Haniu et al., 1993, 1994). Die zwei Untereinheiten sind antiparallel angeordnet.

Die dreidimensionale Struktur ist nicht nur ähnlich der des VEGF, welcher eine verwandte Aminosäuresequenz besitzt, sondern zeigt auch Ähnlichkeiten mit der von NGF und TGF- β (Muller et al., 1997, Murray-Rust et al., 1993). Die Gensequenzen der A- und B-Ketten sind auf den Chromosomen 7 beziehungsweise 22 lokalisiert (Betsholtz et al., 1986). Beide Ketten werden als Vorläufermolekül synthetisiert (ca. 30 kDa), welche noch proteolytisch gespalten werden, so dass ca. 15 kDa schwere Ketten entstehen (Östman et al., 1988). Der PDGF-B Promotor enthält verschiedene Regulationselemente, z.B. das so genannte "Sis proximal element" (SPE) (Jin et al., 1993), an welches Sp1 und Sp3 Transkriptionsfaktoren binden. Auch Bindungsstellen für "AP-1-like" und "ETS-like" Transkriptionsfaktoren sind gefunden worden (Khachigian et al., 1994). Weitere wichtige Genloci im Promotor sind involviert in die Thrombin-induzierte PDGF-B Transkription in Endothelzellen sowie in die TPA-abhängige Promotoraktivierung (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat = 12-myristat-13-acetat-Phorbol ester) (Jin et al., 1993; Scarpati et al., 1996). Das TPA-abhängige Element wurde als erstes in K562-Zellen entdeckt. Es umfaßt 250 Basenpaare, doch das essentielle Element (SPE) für die TPA-Aktivierung liegt auf der Position -58 bis -39 relativ der PDGF-B mRNA Initiationsstelle. Ein bedeutendes Element ist das Shear-stress response element (SSRE) im PDGF-B-Promotor, welches von Resnick et al., (1993) in Endothelzellen beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um ein 12 Basenpaare großes Element, das eine Kernbindungssequenz (GAGACC) enthält, die zu gesteigerter Transkription unter Scherstress führt. Interessanterweise befindet sich diese Sequenz auch in anderen Genen, die durch Scherstress induziert werden, z.B. ICAM 1, TGF β und t-PA (tissue plasminogen activator). Dies führt zur Annahme, dass die Expression von PDGF-B teilweise von Scherstress-induzierten Transkriptionsfaktoren, die mit einem Promotorelement interagieren, reguliert wird. Gesichert ist bereits, dass die Synthese von PDGF durch externe Stimuli reguliert wird, so z.B. durch niedrige Sauerstoffspannung, Thrombin, Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, Cytokinen und anderen (Betsholtz et al., 1993).

Der freigesetzte PDGF bindet dann an Kollagen, Thrombospondin und Heparansulfat. Er interagiert auch mit löslichen Proteinen, wobei hier als wichtigste PDGF-associated protein (PAP) und α 2-Makroglobulin zu nennen sind (Fischer et al., 1996; Hogg et al., 1997; Lustig et al., 1996; Somasundaram et al., 1996).

PDGF aktiviert 2 Typen von Rezeptoren, α - und β -Rezeptoren, mit jeweils einer Größe von ca. 170 und 180 kDa. Jeder Rezeptor besitzt 5 Immunglobulin-ähnliche Domänen und intrazellulär eine Tyrosinkinase-Domäne. Der β -Rezeptor bindet nur die B-Kette mit hoher Affinität, während der α -Rezeptor A- und B-Kette bindet (Kanakaraj et al., 1991; Matsui et al., 1989). Beide Rezeptoren übertragen Mitose-induzierende Signale, beeinflussen Aktinfilament-Reorganisation und Chemotaxis, führen zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung, inhibieren die Kommunikation über Nexus und vermitteln einen antiapoptotischen Effekt (Hosang et al., 1989; Heldin et al., 1999). Interessant ist hierbei die Erkenntnis, dass beide Rezeptoren dabei auch entgegengesetzt wirken können, z.B. besitzt der β -Rezeptor immer eine stimulierende Wirkung auf Chemotaxis, während der α -Rezeptor in bestimmten Zelltypen (Fibroblasten und glatte Muskulatur) eine Hemmung der Chemotaxis auslöst (Siegbahn et al., 1990). Die Wirkung des PDGFs hängt also von dem in der Zelle exprimierten Rezeptor ab. Es gibt Zellen, die beide Typen von Rezeptoren produzieren, aber auch Zellen, die nur einen von beiden bilden. So werden in kapillären Endothelzellen nur β -Rezeptoren gebildet (Smits et al., 1989), während ausschließlich α -Rezeptoren in Thrombozyten und Astrozyten vorkommen (Vassbotn et al., 1994; Hart et al., 1989). Da PDGF als Doppelkette vorkommt, bindet es zwei Rezeptoren, was eine Dimerisierung bewirkt, wodurch eine Tyrosinkinase über Autophosphorylierung aktiviert wird (Heldin et al., 1996). Ein weiterer wichtiger Weg der Aktivierung erfolgt über SH2-Domänen ähnlich der des Insulins, bei dem sie an phosphorylierte Tyrosine binden können und darüber weitere Signalwege in Bewegung setzen. Es folgen dann verschiedene Signaltransduktionswege, die aktiviert werden können. Das Spektrum umfaßt hier Phosphatidylinositol 3'-kinasen (PI 3-kinasen), die Src Familie von Tyrosinkinasen, SHP-2 Tyrosinphosphatasen, Phospholipase C (PLC), GTPase aktivierende Proteine (GAP), welche Ras deaktivieren, sowie Proteine der Stat-Familie, die in Promotorregionen spezifischer Gene binden, und andere. Besonders erwähnenswert an dieser Stelle ist der Weg über PLC, der auch bei der Vermittlung des Scherstress' eine große Rolle spielt. Über Inositol 1,4,5,-triphosphat und Diacylglycerol werden Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt und Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Diese Signaltransduktionswege unterliegen einer strengen Kontrolle, die über verschiedenste Mechanismen, z.B. negative Feedback-Mechanismen, reguliert werden. Ein weiterer

Punkt der PDGF-abhängigen Zellen ist, dass sie Kontakte zu Matrixmolekülen benötigen, um zu proliferieren, für die Zellmigration und eine Verhinderung der Apoptose. Diese Kontakte werden über Integrine (transmembrane Rezeptoren für Matrixmoleküle) hergestellt (Clark et al., 1995). (Für eine detailliertere Darstellung der Signaltransduktionswege siehe auch Heldin et al., 1998: "Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors")

Wie oben schon erwähnt, spielen mechanische Kräfte, die durch den Blutfluß ausgeübt werden, eine große Rolle bezüglich der Kontrolle des vaskulären Tonus, der Regulation arterieller Strukturen und der Remodellierung sowie der Lokalisation arteriosklerotischer Plaques. Die mechanische Umgebung einer Zelle wird durch komplexe Interaktionen zwischen Gravitationskräften, lokalen durch Luft-, Flüssigkeitsdruck und Bewegung ausgelösten Kräften und intrazellulärer Spannung durch die Organisation des Zytoskeletts definiert. Am Endothel führen Veränderungen dieser Kräfte zu zellulären Antworten (Davies, 1995). Die Kraft des Blutstroms kann in zwei Vektoren eingeteilt werden- einer ist senkrecht zur Gefäßwand und wird durch den Blutdruck hervorgerufen, der andere verläuft parallel und stellt Reibungskraft, den so genannten Scherstress, dar (Giddens et al., 1990). Diese Kraft setzt sich aus der mittleren Flußrate, ihrer Viskosität und den physikalischen Eigenschaften der Blutgefäße zusammen. (siehe hierzu Kap. 2.12.) In den großen Arterien in geraden Abschnitten beläuft sich der Scherstress meist auf 20-40 dyn/cm², während er bei vergrößerter kardialer Auswurfleistung oder Hypertonus bis auf Werte um 100 dyn/cm² ansteigen kann (Nerem et al., 1993). Es gibt verschiedene Methoden, Scherstress in vitro nachzuahmen, z.B. durch einen Kegel-Platten-Viskosimeter, einen Parallel-Platten-Viskosimeter oder in einem kapillären Röhren-Viskosimeter (Malek et al., 1994).

Flaherty et al., (1972) entdeckten, dass sich die Zellmorphologie durch Scherstress ändert und sich die Zellen der Richtung des Blutflusses nach ausrichten. Interessanterweise fehlt diese Orientierung bei turbulentem Fluß (Davies et al., 1986). Von Bedeutung ist auch, dass letzterer in irgend einer Form einen Trigger für die Zelle darstellt, in den Zellzyklus einzutreten und sich zu teilen, während bei laminarem Streß die Zellreplikation eher supprimiert wird (Resnick et al., 1995). Zellform und Orientierung werden durch das Zytoskelett bestimmt. So konnte nachgewiesen werden,

dass F-Aktin normalerweise in der Peripherie polygonaler Zellen liegt und sich unter Scherstress zu Bündeln von Strebfasern anordnet (Franke et al., 1984; Wong et al., 1983) Dabei stellten Dieterich et al., (2000) fest, dass die Anordnung durch vier Phasen charakterisiert ist: 1. keine Veränderung (Stillstand), 2. beginnende Bewegung, 3. Beginn der Längsausrichtung und 4. Zellstreckung. Zu Beginn des Scherstress kommt es zu keinen Veränderungen, während die Zellen sich dann in Richtung des Flusses bewegen und ausrichten. Erst nach Stunden setzt die Streckung der Zelle ein. Es ist anzunehmen, dass diese Effekte durch Tyrosinkinase-Aktivität und steigendes intrazelluläres Calcium vermittelt werden, während Proteinkinase C keine Rolle zu spielen scheint (Malek et al., 1996). Auch intermediäre Filamente sind wenig relevant im Gegensatz zu Mikrotubuli, nach deren Hemmung Scherstress-induzierte morphologische Änderungen und Aktinstrebfaser-Induktion ausblieben (Malek et al., 1996). Scherstress-induzierte Mechanotransduktion wird durch lokale Verschiebung von Sensoren auf der Zelloberfläche, Krafttransmission via Zytoskelett und Transduktion übertragen (Sims et al., 1992). Besonders relevant scheinen auch hier die Aktinfilamente zu sein, welche mit transmembranen Integrinen verbunden sind und darüber die Übertragung von außen nach innen steuern (Wang et al., 1993). Doch Endothelzellen reagieren auf Scherstress nicht nur mit Remodellierung sondern auch durch das Freisetzen verschiedenster Substanzen, z.B. Zytokinen, vasoaktive Faktoren, Adhäsion- und chemotaktische Moleküle und Modulatoren der Blutgerinnung. So konnten Pohl et al., (1986) zeigen, dass ein gesteigerter Scherstress zur vermehrten Produktion und Freisetzung von NO führt, was dann in der glatten Muskulatur zur Vasodilatation führt. Doch Sexton et al. zeigten, dass auch gesteigert vasokonstriktive Faktoren wie Histamin, Serotonin, Endothelin und ATP freigesetzt werden. Dabei wirkt gerade Endothelin auch Mitose-auslösend auf glatte Muskelzellen und spielt darüber für die Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle (Hirata et al., 1989).

Es gibt derzeit unterschiedliche Ansätze für die Scherstress-induzierte Signaltransduktion. Allgemein wird angenommen, dass es zu einem Anstieg von Inositoltrisphosphat (IP₃) kommt und darüber eine Calcium-Freisetzung sowie die Aktivierung von Diacylglycerol mit Proteinkinase C (PKC) erfolgt, wobei in BAEC (bovine aortal endothelial cells) keine signifikante Erhöhung der PKC-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Malek et al., 1994). (für detailliertere Darstellungen siehe

auch Malek et al., 1994) Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren wird gerade in den letzten Jahren erforscht. So ist bekannt, dass c-fos, c-jun und c-myc induziert werden (Resnick et al., 1995; Gudi et al., 1996). Ein weiterer Weg über NFκB, welcher direkt an das SSRE in der PDGF B-Kette bindet, ist von Khachigian et al., (1995) publiziert worden. Eine wichtige Rolle spielen auch mechanosensitive Ionenkanäle, die zum einen Calcium intrazellulär ansteigen lassen (Schwartz et al., 1992), zum anderen die Hyperpolarisation über einen scher-aktivierten Kalium-Kanal ($I_{K,S}$) bewirken (Olesen et al., 1988). Speziell unterscheidet man hier eine schnelle (Sekunden- Minuten), mittelfristige (Minuten- Stunden) und lang andauernde (Stunden- Tage) Antwort auf Scherstress, wobei die schnelle extrazellulär-regulierte Kinasen (MAPK, ERK1/2) und die andauernde Tyrosinphosphorylierungen von FAK (focal adhesion kinase) miteinbezieht (Burnstock, 1999). Die biologische und pathologische Bedeutung dieser Einteilung spiegelt sich darin wieder, dass die kurze und die lange Antwort wahrscheinlich beim Gefäß-Umbau und deren Adaptation relevant sind, während die mittelfristige eher mit der kurzzeitigen Regulation des vaskulären Tonus in Verbindung gebracht wird (Burnstock, 1999). Für weitere Ausführungen dieser Einteilung siehe Tabelle1 (Tab. 1).

Kurzfristige Antwort	Mittelfristige Antwort	Langfristige Antwort
Biomechanische Übertragungseignisse	Erste biologische Antworten	Zelluläre Adaptationen
<ul style="list-style-type: none"> • Ionenkanalaktivierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Endozytose 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellform-Änderung und Anordnung
<ul style="list-style-type: none"> • Calciumänderungen im Zytosol 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellreplikation 	<ul style="list-style-type: none"> • Reorganisation des Zytoskeletts
<ul style="list-style-type: none"> • "Second-messenger" Kaskaden 	<ul style="list-style-type: none"> • Genregulation 	<ul style="list-style-type: none"> • Extrazellulärer Matrix-Umbau

Tab. 1: Scherstress-abhängige Antworten des Endothels, nach Resnick et al., (1995)

Auch Leonardo da Vinci erkannte Ende des 15. Jahrhunderts, dass die Hämodynamik für das kardiovaskuläre Gewebe eine große Bedeutung besitzt, indem er den Blutfluß im Bereich von Herzklappen mit der wirbelnden Strömung eines Baches um Hindernisse herum verglich (Davies, 1995). Arteriosklerotische Plaques entwickeln sich an bestimmten Stellen häufiger, z.B. an Bifurkationen, Abzweigungen von Ästen, Engen oder Biegungen, an Stellen also, an denen der Scherstress durch Verwirbelungen maximale Werte erreicht. Es fiel auf, dass extrem hoher Scherstress von ca. 400 dyn/cm² endotheliale Schäden verursacht (Fry et al., 1973). Später erkannte man, dass wahrscheinlich die Druckgradienten eine bedeutende Rolle spielen (Davies et al., 1986). Es wurde gezeigt, dass sich die Funktion der Endothelzellen durch Scherstress ändert und eventuell über Schäden in der Zellmembran den Influx von großen Makromolekülen erlaubt. Dadurch wird ein Mechanismus in Gang gesetzt, durch den zytosolische Stoffe des Endothels, z.B. bFGF freigesetzt werden (McNeil et al., 1993; Rifkin et al., 1989).

Da die Arteriosklerose, wie oben bereits erwähnt, epidemiologisch ein großes Problem darstellt, ist es wichtig, dieses Gebiet weiter zu erforschen und die Zusammenhänge der einzelnen Faktoren aufzuklären. Wie oben bereits erläutert, stellt das Zytokin PDGF einen wichtigen Faktor in der Arteriosklerose-Entwicklung dar. Es ist bereits eine Methode entwickelt worden, mit der die Zellen während des Scherstress mikroskopisch beobachtet werden können und so direkt die lebende Zelle als Einzelzelle im Zellverband, ihre Reaktion auf angebotene Reize und ihre Reaktionskinetik daraufhin festgestellt werden können. Dieses Verfahren ist ein Reporter-Gen-Assay mit Konstrukten, bei denen das grünfluoreszierende Protein GFP unter der Kontrolle des PDGF-Promotors steht. Bei jeder Aktivierung des PDGF-Promotors kommt es so zur Synthese von GFP, welches fluoreszenzmikroskopisch gemessen werden kann (Schwarz, 1999). Dieses System ist bereits für die ECV 304-Zelllinie etabliert worden, die sich später als Zelllinie urothelialen, nicht endothelialen Ursprungs herausstellte. Relevant für die Arteriosklerose ist allerdings die Untersuchung von Endothelzellen hinsichtlich ihrer Reaktion auf Scherstress. Dafür war es wichtig, eine Endothelzelllinie mit den schon existierenden Konstrukten stabil zu transfizieren, um diese dann auf PDGF-Bildung unter Scherstress über Fluoreszenzmessung zu untersuchen und gegebenenfalls die dazugehörige Kinetik zu

bestimmen. Da diese Zelllinie eine immortalisierte Linie ist, war es wichtig, auch mit Primärkulturen diese Messungen zu versuchen und gegebenenfalls ein Ergebnis zu erzielen.

2. Methoden und Materialien

2.1. Zellkultur

2.1.1. Herstellung des Nährmediums für die EAhy-Zelllinie

Als Kultivierungsmedium dient als Basis eine 1:1-Mischung von HAM'S F 12 und Iscove's modified Dulbecco's Medium der Firma Sigma. HAM'S F 12 wird als fertige Pulvermischung geliefert und in 5l Ampuwa aufgelöst, durch die Zugabe von 6g NaHCO₃ gepuffert und abschließend steril filtriert. Das Medium ist so bei 4°C für längere Zeit lagerbar. Iscove's modified Dulbecco's Medium wurde als Fertigmedium vom Hersteller bezogen. Vor Gebrauch wurde das Medien-Gemisch mit 5% Newborn calf serum (NCS) sowie Penicillin/ Streptomycin (1:1, 50 units pro 500ml, Stammlösung 10000 units) und L-Glutamin (2mM) versetzt.

2.1.2. Herstellung des Nährmediums für die HDMEC-Zelllinie

Hier wurde Medium M 199 mit Earle-Salzen als Fertigmedium von GIBCO BRL verwendet. Vor Gebrauch setzten wir 10% FCS, Penicillin/ Streptomycin (1:1, 30 units pro 500ml) und basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF- 1,1ng/ml nach Austestung der urologischen Klinik der Universität Würzburg, siehe auch Kap. 2.13.1.) zu.

2.1.3. Gelatinieren von Kulturflaschen und Glasoberflächen

Endothelzellen benötigen zum Wachsen gelatinierte Oberflächen. Deshalb beschichtet man die Kulturflaschen vor dem Einbringen der Zellen für 10 min mit 0,5% Gelatine, läßt diese ablaufen und spült mit Nährmedium nach. Besonders für die Transfektion hat es sich als sinnvoll erwiesen, die Flaschen zu gelatinieren, weil das Transfizieren einen großen Streß für die Zelle darstellt und man ihnen durch das Anbieten einer extrazellulären Matrix das Anwachsen erleichtert.

Für die Scherstressversuche und die damit verbundenen hohen Kräfte werden die Glasoberflächen der Rheos, speziell angefertigte Glasplättchen für die Scherstresskammer, folgendermaßen gelatiniert:

0,5% Gelatine wird in Ampuwa gelöst und autoklaviert (für eine Stunde bei 100°C).

Die Glasoberflächen werden gereinigt und mehrfach mit Aqua dest. gespült. Mit einer Spatelspitze EDTA werden sie in der Mikrowelle aufgekocht, wieder gespült und anschließend autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen gibt man sie in Petrischalen und beschichtet sie für 30 min mit 0,5% Gelatine. Nach Absaugen wird zum Vernetzen der Gelatine 2% Glutaraldehyd (gelöst in PBS) für 30 min zugegeben. Anschließend wird gut mit PBS nachgespült und eine PBS/Antibiotikalösung darüber gegeben. Die Petrieschalen sind so über längere Zeit bei 4°C steril gelagert.

2.1.4. Standardkultur

Die adhärent wachsenden EAhy-Zellen werden unter dem in Kap. 2.1.1. beschriebenen Medium bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank gehalten. Bei einem Konfluenzgrad von 90-100% können die Zellen bis zum Verhältnis 1:10 gesplittet werden. Dafür wäscht man die Zellen nach Mediumabsaugen mit PBS und inkubiert dann für ca 3 min mit Trypsin (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS, pH 7,2) im Brutschrank. Durch leichtes Beklopfen lösen sich die Zellen vom Untergrund. Es sollten nun schnell FCS-haltiges Medium zum Neutralisieren des Trypsins zugesetzt und die Zellen im Verhältnis bis 1:10 auf neue Kulturflaschen ausgesät werden.

In dem unter 2.1.2. beschriebenen Medium und 6-7% CO₂ bei 37°C werden die adhärent wachsenden HDMEC-Zellen im Brutschrank gehalten. Diese Zellen können im konfluenten Zustand bis zum Verhältnis 1:4 gesplittet werden. Routinemäßig werden die Zellen 3 mal die Woche oder vor jedem Splitten im Phasenkontrastmikroskop auf Morphologie und Konfluenzgrad untersucht. Ein Wechsel des Kulturmediums sollte alle 3 Tage erfolgen.

2.1.5. Einfrieren von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, nutzt man die Kryokonservierung mit DMSO, um Gefrierschäden vorzubeugen. Man behandelt die Zellen wie unter 2.1.4. erläutert und zentrifugiert das abtrypsinierte Zell-Mediumgemisch bei 110g für 5-10 min. in der Zwischenzeit bereitet man die Kryoröhrchen sowie das Medium/DMSO-Gemisch (DMSO und Medium im Verhältnis 1:9) vor und lagert diese im Eisbad. Aus einer T25 kann ein Kryoröhrchen weggefroren werden, aus einer T75 entsprechend 3. DMSO ist bei Raumtemperatur cytotoxisch, daher sollten alle an die Sedimentation anschließenden Schritte bei 4°C durchgeführt werden. Nach der Sedimentation wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen in 1 ml DMSO/Medium-Gemisch pro Kryoröhrchen resuspendiert. Die so behandelten Zellen werden bei -80°C für 3 Tage weggefroren und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.1.6. Auftauen von Zellen

Beim Auftauen der Zellen ist möglichst schnell zu arbeiten, um den zelltoxischen Effekten des DMSO entgegen zu wirken. Vor dem Auftauen stellt man sich je ein Bluecap pro Kryoröhrchen mit ca 20 ml Medium bereit. Nach dem Entnehmen aus flüssigem Stickstoff werden die Zellen schnell bei 37°C in Wasserbad angetaut. Wenn sich die Zellen lösen werden sie sofort in das bereitgestellte Bluecap überführt und für 5 min bei 110g zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Resuspendierung des Zellsediments mit 5 ml Medium pro T25. Über Nacht werden die Zellen im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

2.2. Transfektion von Zellen

Die Transfektion erfolgte mit Effectene™ Transfection Reagent von Qiagen, einem organischen Reagenz, dass die DNA erst kondensieren läßt (Enhancer) und dann

Micellen bildet, die besser in die Zellen aufgenommen werden. Am Tag vor der Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen so ausplattiert, dass ihr Konfluenzgrad 50-80% erreicht und nicht überschreitet, denn wichtig für die Aufnahme der DNA in die Zellen ist deren Teilungs- und Wachstumspotential. Für die Transfektion mit Effecten haben wir das im Labor übliche und von Qiagen vorgegebene Protokoll benutzt. Es werden 2µg DNA (Gewinn der DNA siehe 2.6.) mit entsprechend so viel EC-Puffer eingestzt, dass beides 150µl ergibt. Dazu werden 16 µl Enhancer gegeben, gut vermischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Dann fügt man 20µl Effecten hinzu, vermischt es und inkubiert den Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit werden die Zellen mit neuem Medium versorgt. Dem Transfektionsansatz wird 600µl Medium zugesetzt, das Ganze auf die vorbereiteten Zellen getropft und im Brutschrank inkubiert. Wichtig ist, dass das Medium spätestens nach 18 Stunden gewechselt sein sollte, da die Lösung sonst toxisch wirkt. Für die EAhy-Zellen hat es sich als günstig erwiesen, den Transfektionsansatz nach 6-8 Stunden gegen Medium auszuwechseln.

2.3. Generieren von stabilen Zellklonen

Der Vorteil von stabil transfizierten Kulturen gegenüber transient transfizierten besteht darin, dass man immer wieder auf denselben Zellklon zurückgreifen kann, da das transfizierte Konstrukt in das Genom der Zellen integriert ist. Bei transient transfizierten Kulturen liegt das Plasmid häufig nur extrachromosomal vor, so dass es im Laufe der Zellteilungen meist verloren geht. Der transfizierte Charakter bei stabilen Kulturen geht also auch bei Kryokonservierung nicht verloren.

Um stabile Zelllinien zu erhalten, habe ich mich der unter Kap. 2.2. aufgezeigten Transfektionsmethode bedient. Im Unterschied zu transienten Transfektionen beginnt man allerdings am 2.Tag mit der Selektion transfizierter Klone. Die Selektion besteht in der Zugabe einer vorher ermittelten Antibiotikum-Konzentration, wobei nicht transfizierte Zellen nicht mehr weiter wachsen. Da die Plasmide eine Kanamycin/Geneticin-Resistenz integriert haben, wurde entsprechend Geneticin (50mg/ml in der Stammlösung) zum Selektionieren benutzt. Die Konzentration wird

durch eine Konzentrationsreihe ermittelt, bei der jeweils steigende Konzentrationen von Geneticin eingesetzt wurden. Für EAhy ergab sich dabei eine Konzentration von 400-600µg/ml, bei der die Zellen abstarben. Während der Transfektionen stellten wir aber fest, dass diese Konzentration auch für die transfizierten Zellen zu hoch war und diese abstarben, so dass sich später 200µg/ml als positive Konzentration zur Selektion herausstellte. Nach ca. einer Woche erhält man einen aus verschiedenen Zellinseln bestehenden Rasen. Die Zellinseln werden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf 96-well-Platten bzw 24-well-Platten weiter selektioniert. Zum Zeitpunkt der Konfluenz werden sie gesplittet und auf eine größere Fläche ausplattiert. Unter ständiger mikroskopischer Kontrolle werden die Zellen entweder weiteren Selektionszyklen unterzogen oder bei vollständiger Merkmalsausprägung (Fluoreszenz) weiter verwendet bzw kryokonserviert. Eine weitere Methode, um das Picken zu erleichtern, ist das Kratzen von Kolonien. Das heißt, dass nicht transfizierte Kolonien unter halbsterilen Bedingungen lichtmikroskopisch mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze entfernt werden. Dadurch verringert sich die Anzahl der nicht transfizierten Zellen und das Wachstum der transfizierten wird angeregt.

2.4. DNA-Agarosegel

Um eine Degradation der verwendeten DNA auszuschließen, wurde die Molekülgröße der Probe bestimmt. Zur Auftrennung der DNA-Proben wurden Agarosegele (0,8% Agarose in 1x TBE-Puffer) verwendet. Dabei wird die Mischung in einen Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen. Nach 20-30 min ist das Gel fest, wird in die mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer im Verhältnis 2:1 oder 1:1 aufgetragen und vorher kurz bei 68°C inkubiert. Der DNA-Marker (F-Marker: kennzeichnet den Bereich zwischen 700-8000 Bp) wurde ebenfalls kurz erhitzt. Es wurde eine Spannung von 80V angelegt. Nach Beendigung des Gellaufs macht man die DNA-Banden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar.

Probenpuffer (6x):	1 mM	EDTA
	50%	Glycerol
	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylenxanolblau

2.4.1. Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid

Ethidiumbromid interkaliert mit den Basen der DNA. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Gele ca. 30 min bei Raumtemperatur in 0,5% Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und dann bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=302\text{nm}$ betrachtet und fotografiert. Ethidiumbromid kann UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=302\text{ nm}$ und $\lambda=366\text{ nm}$ absorbieren und emittiert Licht bei $\lambda=590\text{nm}$.

2.5. DNA-Fällung

Gibt man Salze zu gelöster DNA hinzu, fällt diese aus, da die Salze ihr das Lösungswasser entziehen. Es wurde eine DNA-Menge von $10\mu\text{g}$ eingesetzt und mit Hilfe von Natriumacetat (1/9 der DNA-Menge) und Ethanol (2,5-fache Menge der eingesetzten DNA-Menge) gefällt. Dabei wird das Gemisch erst bei -80°C 1 Stunde inkubiert, bevor es abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde. Anschließend wurden $500\mu\text{l}$ Ethanol neu zugesetzt und die gefällte DNA im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

2.6. Plasmid-Präparation

Das Protokoll der Plasmid-DNA-Präparation folgte der Vorlage von Qiagen für den „Qiaprep-Mini-Prep Plasmid Kit“ sowie den „Qiaprep-Midi-Prep Plasmid Kit“. Für den Mini-Prep wurden 2ml Bakterienkultur in LB-Medium (am Tag vorher ansetzen) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Ansatzes beträgt die Ausbeute $10\text{-}20\mu\text{g}$ Plasmid-DNA. Für

den Midi-Prep wurden dagegen 100ml Startkultur eingesetzt. Hier wurde die DNA per optischer Dichtemessung quantifiziert.

2.6.1. Quantifizierung der DNA

Bei der DNA-Mengenbestimmung macht man sich deren Exstinktionmaxima bei $\lambda=260\text{nm}$ und $\lambda=280\text{nm}$ zu nutze. Die Quantifizierung der DNA erfolgt bei $\lambda=260\text{nm}$. Dabei dient eine optische Dichte (OD) als Referenzwert. Eine optische Dichte entspricht $50\mu\text{g dsDNA pro 1ml}$. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten bei einem Endvolumen von ca. $300\mu\text{l}$ (Verdünnen der DNA mit Ampuwa), wobei $5\text{-}20\mu\text{l}$ der Midi-Prep-DNA eingesetzt wurden.

2.7. Transformation kompetenter E.coli-Bakterien

Die Lösung mit kompetenten E.coli DH 5 α wurde auf Eis aufgetaut. Es wurden je $100\mu\text{l}$ der Lösung mit einmal $3\mu\text{l}$ DNA-Lösung der Konstrukte $1,3\text{kb PDGF} (\Delta \text{SSRE})\text{-EGFP}$ und $\text{CMV (SSRE)ins-EGFP}$ sowie einmal $2\mu\text{l}$ DNA-Lösung der Konstrukte $1,3\text{kb PDGF-EGFP}$ und CMV-EGFP eingesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Damit die DNA, die sich an die Zellwände der Bakterien angelagert hat, permeieren kann, wurden die Zellwände durch Hitzeschock (90 sec bei 42°C) geschädigt. Anschließend wurden sie wieder 5 min auf Eis inkubiert und dann in $800\mu\text{l}$ LB-Medium im Wärmerraum bei 37°C auf dem Rad ca. 1 Stunde gelagert. Es folgte für 5 min Zentrifugieren und das Dekantieren des Überstandes. Dann wurde das Pellet resuspendiert, die Lösung auf $\text{LB}_{\text{kanamycin}}$ -Platten (siehe 2.16.) ausplattiert und über Nacht im Wärmerraum aufbewahrt.

2.7.1. Anlegen von Vorräten der Bakterien in Glycerol, sogenannten Glycerolstöcken

Zur Langzeitlagerung von Bakterien empfiehlt es sich, Glycerolstöcke anzulegen, die über mehrere Jahre haltbar sind. Dafür werden ca. 150µl der Bakterienkultur auf LB_{kan}-Platten ausplattiert und im Wärmerraum über Nacht inkubiert. Am Folgetag darauf werden 2ml Glycerol und 1,2-fach LB-Medium dazu gegeben, alles zusammen gestrichen und abpipettiert. Die Glycerolstöcke werden bei -20°C gelagert.

2.7.2. Anlegen von Platten- und Flüssigkulturen von Bakterien

Plattenkulturen ermöglichen die Isolation von Einzelkolonien sowie die Anlage von Flüssigkulturen, während Flüssigkulturen zum Beispiel für DNA-Plasmid Kits, die Anlage von Plattenkulturen und Glycerolstocks verwendet werden. Plattenkulturen werden mit einer sterilen Impföse oder durch Ausplattieren auf LB_{kan}-Platten angelegt und über Nacht im Wärmerraum aufbewahrt. Flüssigkulturen entstehen durch Überimpfen von Einzelkolonien in LB_{kan}-Medium in sterilen Reagenzgläsern. Auch sie werden über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsrad gelagert. Die eingesetzte Menge an Kanamycin zur Selektion transformierter Bakterien beträgt 70µg/ml, dabei wird eine Stammlösung von 10mg/ml benutzt.

2.8. Proteinbestimmung nach Amidoschwarz

Diese Methode hat gegenüber der Bradford-Proteinbestimmung den Vorteil, dass auch Proben mit hohem Salzgehalt oder in Anwesenheit von Detergenzien, das heißt denaturierte Proteine, bestimmt werden können. Sie beruht auf der Bindung von Amidoschwarz an freien N-terminalen Proteingruppen. Dabei werden 5µl jeder Probe auf Calciumstreifen (Schleicher&Schüll) aufgetragen, in Amidoschwarz-Färbelösung 10 min inkubiert und dann entfärbt. Die einzelnen Streifen werden dann mit 1 ml Auflöselösung bei 50°C im Wärmebad für ca. 30 min aufgelöst. Die Extinktion wird bei $\lambda=620\text{nm}$ gemessen. Als Referenzwerte dienen standartisierte BSA-Lösungen.

Färbelösung:	0,5%	Amidoschwarz
	45%	Methanol
	45%	Ampuwa
	10%	Eisessig

Entfärber:	47,5%	Methanol
	47,5%	Ampuwa
	5%	Eisessig

es werden ca. 500ml benötigt

Auflöselösung	80%	Ameisensäure
	10%	Eisessig
	10g	TCA

es werden ca. 100ml benötigt

2.9. SDS-Page

Durch diese Form der Gelelektrophorese können gelöste Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Über die Bindung an SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung und werden denaturiert. Die Proteinlösungen werden im Verhältnis 1:1 oder 1:2 mit Probenpuffer (3x) versetzt, durch Ultraschall defragmentiert und bei 95°C erhitzt. Ein Gel setzt sich zusammen aus einem 10%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel, das sich nach oben hin anschließt.

Das Sammelgel läuft mit einer Spannung von 80 Volt durch, das Durchlaufen des Trenngels erfolgt mit ca. 100-200 Volt. Als Marker wird Peq Gold eingesetzt.

Probenpuffer (3x):	125 mM	Tris-HCL (pH 6,8)
	10%	Glycerin
	2%	SDS
	0,001%	Bromphenolblau
	0,5%	Dithiothreit

2.10. Immunreplikanalyse (Western-Blot)

Bei diesem Verfahren werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose übertragen. Das Proteingel wird dabei auf Nitrozellulose und beides zwischen Filterpapier (alles in Transferpuffer eingeweicht) gelegt und bei 42mA für 1,5 Stunden geblottet. Anschließend wird mit PonceauS-Rot gefärbt, um den Marker und die Proteinbanden sichtbar zu machen, und dann wieder mit PBS entfärbt. Die Nitrozellulose wird nun 60 min in Magermilch (5% Magermilchpulver in PBS Tween 0,1%) abgesättigt und dann der Erstantikörper, welcher in Magermilch gelöst ist, über Nacht bei 4°C am Rad inkubiert. Am nächsten Tag wird nach Waschen in PBS Tween (3x ca. 5 min) der Zweitantikörper in Magermilch für 60 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird wieder gewaschen (3x ca. 10 min), entwickelt und fixiert.

Als Erstantikörper wurde ein Maus-anti-GFP-Antikörper in Magermilch im Verhältnis 1:1000, als Zweitantikörper ein goat-anti mouse-Antikörper (gam) in Magermilch im Verhältnis 1:2000 eingesetzt. Der Zweitantikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers gerichtet ist, ist mit einer Peroxidase (POX) gekoppelt, durch die Luminol mit Hilfe eines bestimmten Katalysators (ECL-Detection-Kit, Amersham, Buckinghamshire, UK) oxidiert und Wasserstoffperoxid reduziert wird. Die dabei freigesetzten Lichtquanten können Röntgenfilme schwärzen (Hyperfilm™ECL™, Amersham).

Transferpuffer:	25 mM	Tris
	192mM	Glycin
	20%	Methanol
	0,1%	SDS

2.11. Fixieren und Eindecken von Deckgläschen

Diese Methode dient der Fixierung und Stabilisierung von Zellen auf Deckgläschen, so dass sie über längere Zeit aufbewahrt werden können. Nach Waschen mit PBS werden die Deckgläschen in 2% Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Nach erneuter PBS-Spülung wird nun zur Permeabilisierung der Zellmembran für ca. 5 min 0,1% TritonX 100 in PBS darauf gegeben. Das ist notwendig, um es Antikörpern zu ermöglichen, mit intrazellulären Strukturen in Verbindung zu treten. Die Deckgläschen werden nun als Schutz vor Austrocknung mit 60% Glycerin in PBS eingedeckt, dem 1,5% n-Propylgallat zugeführt wurde, um Ausbleichung zu verhindern.

2.12. Aufbau des Messplatzes

Nach Koslow et al. (1986) wurde eine Flusskammer (Institutswerkstatt) benutzt, in der lineare Scherkräfte erzeugt und dabei die Reaktion kultivierter Zellen beobachtet werden konnten. Diese Flusskammer setzt sich aus einer Grundplatte und einer Deckplatte zusammen, die durch eine Silikonmembran, wie in Abb. 2.1. dargestellt, als Abstandshalter auseinander gehalten werden. Die Grundplatte ist aus Edelstahl, die Deckplatte aus Glas gefertigt. Die Deckplatte wird durch zwei Befestigungsleisten mit Bohrungen und Schrauben an der Grundplatte verankert. In die Grundplatte sind an jedem Ende eine Öffnung eingebracht, so dass sich ein divergierender Zu- und ein konvergierender Abfluß ergibt. Außerdem besitzt sie in der Mitte eine Fräsung, die in Tiefe und Durchmesser genau dem Glasträger entspricht, der mit den auf ihm kultivierten Zellen in die Fräsung eingebracht wird und so in einer Ebene mit der Platte abschließt. Zur Abdichtung der Kammer bei Durchströmung mit Medium werden alle Grenzflächen dünn mit mittelviskösem Silikongel beschichtet.

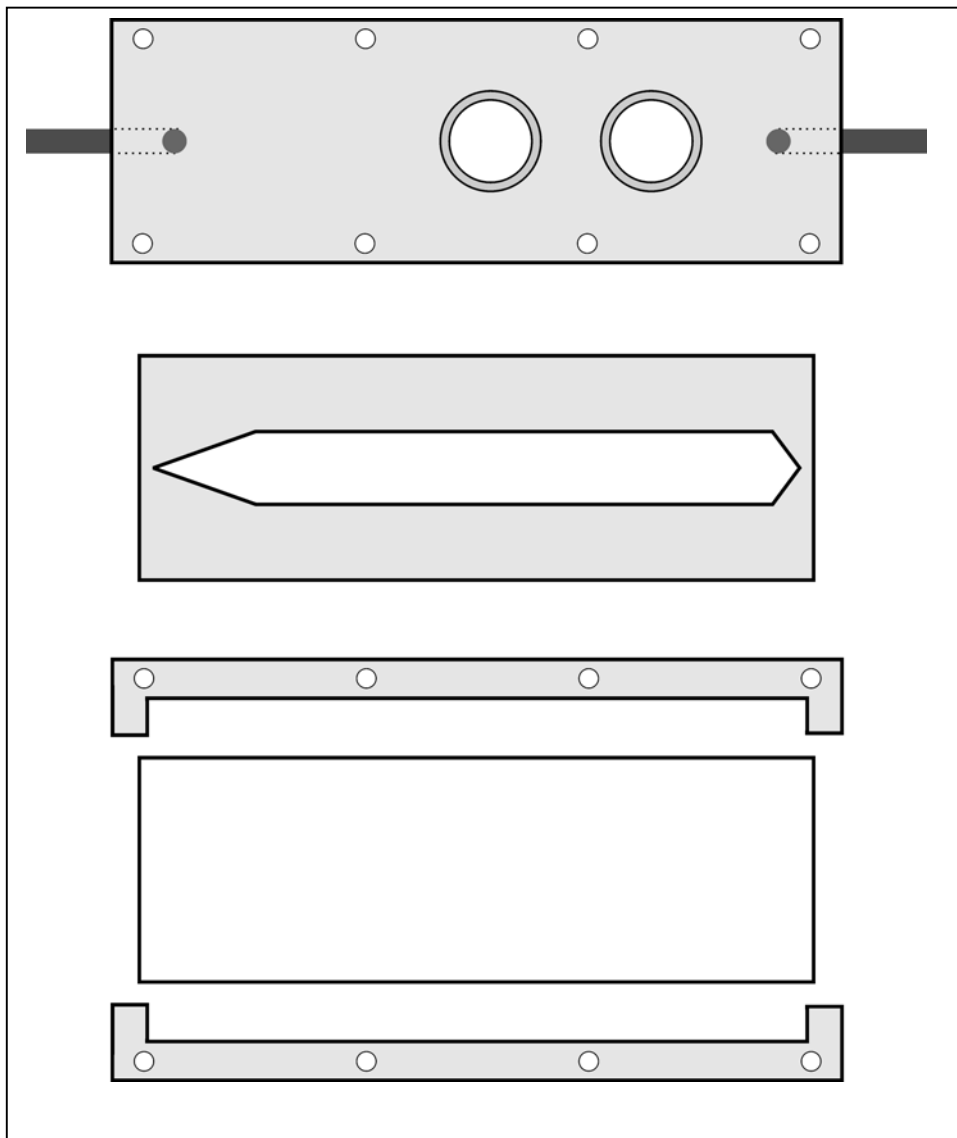


Abb 2.1.: Flusskammer mit ihren Einzelkomponenten, dargestellt sind von oben nach unten: Grundplatte mit Fräsung, in die die Glasplättchen mit Zellen eingebracht werden; Silikonmembran; Metallschienen zum Befestigen; Glasplatte

Die Flusskammer wird über zwei Schlauchadapter mit einem Schlauchsystem verbunden, die in einem Aufbewahrungsgefäß mit Medium beginnen und auch wieder dort enden.

Dieses befindet sich in dem auf 37°C vorgeheiztem Wasserbad, um ein Auskühlen der Zellen zu vermeiden. Mit Hilfe einer Rollenpumpe wird das Medium in den Schlauch gesaugt. Die Pumpgeschwindigkeit kann nahezu stufenlos variiert werden und ermöglicht so die Untersuchung der Zellen bei verschiedenen Scherstärken. Außerdem ermöglicht sie einen pulsatilen und somit physiologischen Fluß.

Die Flusskammer mit den zu untersuchenden Zellen wird auf einen speziell vorgefertigten Mikroskopiertisch fixiert, der ein Verrutschen der Beobachtungsfeldes verhindert. Die Beobachtungseinheit besteht aus einem Mikroskop mit Fluoreszenzausstattung (Zeiss mit zugehöriger Fluoreszenzeinheit), einem Filterwechsler (Lambda 10-2, Sutter Instrument Company), einer hochsensitiven ICCD-Kamera (Photon Counting ICCD Camera C2400-30 Serie, Hamamatsu) und den dazu gehörigen Verarbeitungseinheiten (Argus-50 Image Processor und Kontrolleinheit für die verstärkbare CCD-Kamera, I.I Controller M4314, beides von Hamamatsu sowie dem Steuerungscomputer), welche wie in Abb. 2.2. ersichtlich angeordnet und verschaltet sind. Die Funktion der Einzelkomponenten wird durch einen Steuerungscomputer über das Programm Argus 50 Ratio Imaging koordiniert.

Die in der Kammer auf die Zellen einwirkende Scherkraft ist von mehreren Faktoren abhängig. So bestimmt die an der Rollenpumpe eingestellte Geschwindigkeit die Volumenflußrate Q (ml/s). Die Scherkraft ist auch von der Spaltbreite zwischen Zellen und Deckplatte abhängig, wobei die Breite der Flußbahn w (cm) und die halbe Höhe der Folie b (cm) in die Berechnung eingehen. Von Bedeutung ist ebenfalls die Viskosität μ (g /cm x s) der den Scherstress vermittelnden Flüssigkeit, diese kann jedoch bei Kulturmedium als eins gesetzt werden. Die Scherkraft τ kann nun unter Berücksichtigung der eben genannten Faktoren folgendermaßen berechnet werden:

$$\tau = \frac{3 \mu Q}{2 b^2 w}$$

Die Scherkraft τ erhält die Einheit dyn/cm². Dabei entspricht 1 dyn 10⁻⁵ Newton. Zur Erläuterung der Auswertung der Versuche siehe Kap. 3.3.2.

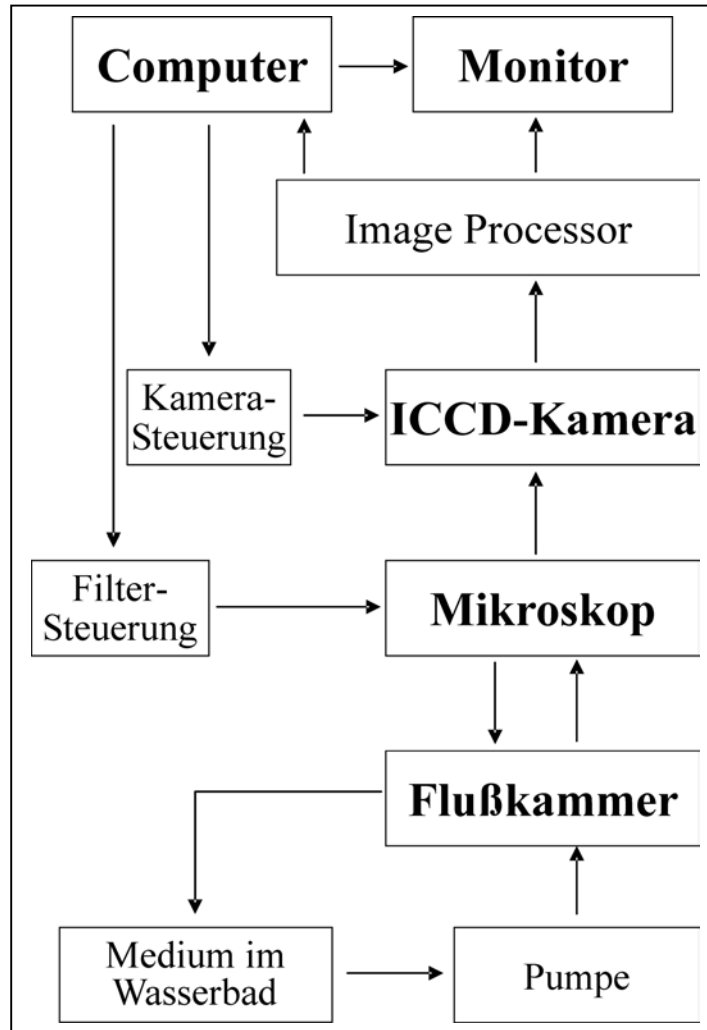


Abb 2.2.: Aufbau des Meßplatzes

2.13. Der Reporter-gen-Assay

Hierbei liegt ein Verfahren vor, mit dem es gelingt, Reporter-messungen direkt in lebenden Zellen durchzuführen.

Das Gen für das grünfluoreszierende Protein GFP ist so in den Vektor kloniert, dass es unter der Kontrolle des PDGF-Promotors steht. Unter der Annahme, dass Scherstress zu einer Aktivierung des PDGF-Promotors führt, wäre gleichzeitig auch die Synthese von GFP gestartet. Diese Syntheseleistung läßt sich fluoreszenzmikroskopisch messen und über Computerprogramme quantifizieren.

2.14. Lebendmaterial

2.14.1. Endothelzelllinien

EAhy 926-Zellen wurden durch eine Fusion von humanen umbilikanischen Venen-Endothelzellen mit der permanenten humanen Zelllinie A549 erhalten. A549-Zellen wurden von Lieber et al. aus Lungencarcinom-Zellen gewonnen. Die Zelllinie exprimiert intrazellulär Factor VIII-related antigen, welches sich auch zusammen mit von Willebrand-Faktor im Kulturmedium nachweisen läßt (Edgell et al.,1983).

HDMEC sind humane (dermale) mikrovaskuläre Endothelzellen, die nicht immortalisiert sind und aus Vorhaut eines 5-jährigen Jungen gewonnen wurden (PromoCell, Heidelberg). Diese Zellen wurden freundlicherweise vom Labor der urologischen Klinik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Gearbeitet wurde mit Zellen der Passagen 8-12.

2.14.2. Stabil transfizierte Klone

Die stabil transfizierten Klone beruhen auf einer Transfektion der Zelllinie EAhy 926 mit den unterschiedlichen Plasmidkonstrukten (siehe 2.14.). Die Transfektion und Etablierung der Klone erfolgte wie unter 2.2. und 2.3. beschrieben..

1)

CMV-EGFP	EAhy 926-Klone, die das EGFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors als Kontrollkonstrukt exprimieren
----------	--

CMV(SSRE)ins-EGFP	EAhy 926-Klone, die GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, der das SSRE als Insertion trägt
-------------------	---

2)

1,3 kb PDGF-EGFP EAhy 926-Klone, die GFP unter der Kontrolle des gesamten PDGF-Promotors exprimieren

1,3 kb PDGF (Δ SSRE)-EGFP wie unter 2), aber der PDGF-Promotor ist um das SSRE deletiert

2.14.3. Bakterienstämme

E.coli DH5 α Anlage von Glycerolstocks (siehe 2.7.1.)

2.15. Vektoren

Bei pEGFP-N1 handelt es sich um ein von pUC19 abgeleitetes Phagemid mit pUC19 Replikationsursprung. Eine Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette, die unter der Promotorkontrolle von SV40 steht, dient als Selektionsmarker. Diese läßt eine Selektion sowohl in Bakterien als auch in eukaryontischen Zellen zu. Besonderes Merkmal des Vektors ist eine für das grünfluoreszierende Protein GFP aus *Aequorea victoria* kodierende Transkriptionskassette. N-terminal können so noch heterologe Proteine an das GFP fusioniert werden. Die Fluoreszenzintensität des Proteins EGFP ist durch Punktmutation im Vergleich zum wildtypischen GFP um den Faktor 35 erhöht. Das GFP-Gen steht unter der Promotorkontrolle des humanen Cytomegalievirus (CMV) und ist für den humanen Codongebrauch optimiert (Schwarz, 1999). Siehe hierzu auch Abbildung 2.3.

Nach Amplifizierung des PDGF-Promotors aus dem Genom mittels PCR, wurde das Amplifikat in den T-Vektor (pBluescript KS, ein 2,96 kb großes Phagemid) kloniert. Dieses Promotorkonstrukt wurde in den Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert. Nach Entfernung des CMV-Promotors lag das Testkonstrukt 1,3 kb PDGF-EGFP vor (Abb 2.4.). Um das dazu gehörige Kontrollkonstrukt zu erhalten, mußte das

Scherstresselement SSRE deletiert werden. Es entstand 1,3 kb PDGF (Δ SSRE)-EGFP (Schwarz, 1999). Als weitere Kontrollkonstrukte wurden der pEGFP-Vektor, CMV-EGFP, und pEGFP mit Insertion des SSRE, CMV (SSRE)ins-EGFP, eingesetzt. (für detailliertere Darstellung siehe Schwarz K, 1999)

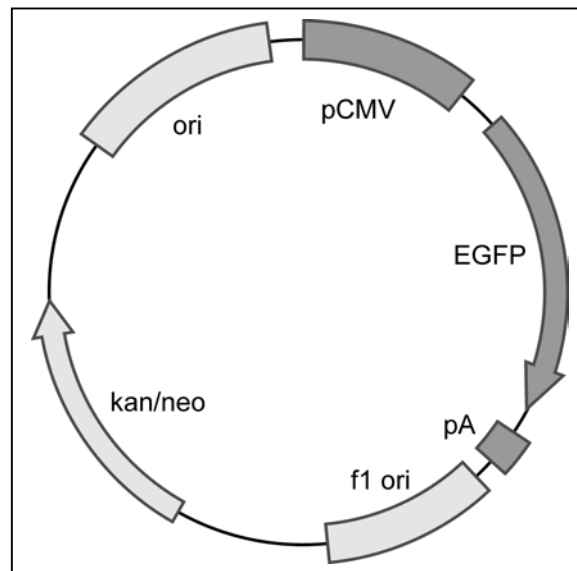


Abb. 2.3.: schematische Darstellung des Vektors

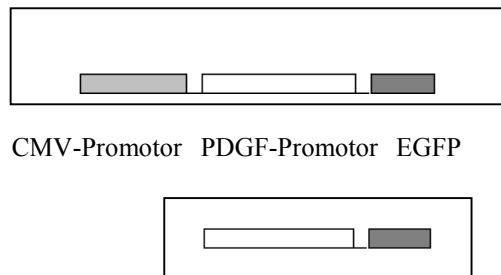


Abb. 2.4.: Schematische Darstellung eines Teils des pEGFP-N1 Vektors mit hineingeklontem PDGF-Promotor und der anschließenden Entfernung des CMV-Promotors

2.16. Medien und Platten

Zellnährmedien	siehe 2.1.1. und 2.1.2.	
LB-Medium	10g/l	NaCl
	5g/l	Baktohefeextrakt
	10g/l	Baktotrypton
Zusatz von Kanamycin	70µg/ml bei einer Stammlösung von 10mg/ml	
LB-Plattenmedium	siehe LB-Medium	
PBS (Phosphatgepufferte NaCl-Lösung) (pH: 7,4)	0,137M	NaCl
	2,7mM	KCl
	8,1mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5mM	KH ₂ PO ₄
TBE (pH: 8,3)	89mM	Tris
	89mM	Borsäure
	2mM	EDTA

2.17. Antikörper

Anti-GFP-Antikörper	ist ein monoklonaler Maus-Antikörper von Roche Diagnostics, der an grünfluoreszierendes Protein bindet
gam- POX	ist ein Ziege-Anti Maus-Antikörper von Sigma, der an Maus-Antikörper bindet und mit einer Peroxidase gekoppelt ist

2.18. Reaktionskits

Plasmidaufreinigung

Qiagen Plasmid Midi Prep	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Prep	Qiagen

2.19. Weitere zusätzliche Materialien

Acrylamidlösung, 40%	Roth
Agarose	GIBCO BRL
Ameisensäure	
Amidoschwarz	Applichem
Ammoniumpersulfat, APS	Sigma
Ampuwa	Fresenius
Bovine Serum Albumin, BSA	Sigma
Trihydroxybenzoesäurepropylester	Serva
Bromphenolblau	Merck
Calciumstreifen	Schleicher&Schüll
Coomassie-Blau	Serva
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma
Dithioreitol, DTT	Roth
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen
Essigsäure	Baker
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum, FCS	Biochrom
Gelatine	Sigma
Geneticin	GIBCO BRL
Glutaraldehyd	Roth
Glycerin, 99,5%	Merck
Glycerol	Merck

Iscove's modified Dulbecco's Medium (ohne L-Glutamin, mit NaHCO ₃)	Sigma
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Biochrom
L-Glutamin	Sigma
Medium M 199 (mit Earle-Salzen, mit L-Glutamin)	GIBCO BRL
Methanol	Baker
N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Serva
Natriumacetat	Merck
Natriumbicarbonat, NaHCO ₃	Applichem
Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth
Newborn calf serum, NCS	Sigma
Nutrient Mixture F-12 (HAM) (mit L-Glutamin und 25mM HEPES, ohne NaHCO ₃)	Sigma
Paraformaldehyd, PFA	Applichem
PBS	Biochrom
Penicillin	Sigma
Peq Gold	peq lab
Phorbol-12 myristat-13 acetat	Sigma
PlastikreaktionsgefäÙe	Eppendorf
Ponceau-S	Applichem
Streptomycin	Sigma
Trichloracetat, TCA	Roth
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
TritonX-100	Merck
Trypsin	Serva
Tween 20	Merck
Zellkulturflaschen	Greiner

3. Ergebnisse

3.1. Vervielfältigung schon vorhandener Plasmide und Generierung vier verschiedener stabiler EAhy 926- Zelllinien mit diesen Plasmiden

Der erste große Teilabschnitt dieser Arbeit bestand darin, stabil transfizierte Endothelzelllinien zu generieren. Dafür war es notwendig mit den in Kap. 2.15. schon erwähnten DNA-Konstrukten zu arbeiten. Diese wurden als erstes per DNA-Agarose-Gel überprüft, um eine Degradation der DNA auszuschließen, bevor sie zur Transformation kompetenter E.coli eingesetzt wurden. Anschließend wurde die so vervielfältigte DNA durch ein Mini-Prep-Kit isoliert. Gleichzeitig wurden Glycerolstöcke angelegt. Als nächstes folgte die DNA-Präparation durch ein Midi-Prep-Kit, welches den Vorteil besitzt, dass größere Mengen an DNA hergestellt werden können. Die so gewonnene DNA wurde einer optischen Dichtemessung unterzogen, um den DNA-Gehalt pro ml zu bestimmen. Dabei wurden folgende Werte erreicht:

▪ 1,3 kb PDGF-EGFP	385 ng/ml
▪ 1,3 kb PDGF(Δ SSRE)-EGFP	612 ng/ml
▪ CMV-EGFP	482 ng/ml
▪ CMV (SSRE) _{ins} -EGFP	787 ng/ml

Nach diesen Vorbereitungen konnte nun mit der eigentlichen Aufgabe der Transfektion begonnen werden. Die als erstes transient transfizierten Zellen wurden als positiv gewertet, wenn eine grüne Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop festzustellen war. Die Transfektion erfolgt wie unter Kap. 2.2. beschrieben.

Als positiv wurden solche Klone eingestuft, die nach 3-5 Selektionsrunden Antibiotikaresistenz und Merkmalsausprägung zeigten. Wichtig ist, dass dabei auch die Intensität der Merkmalsausprägung der Zellklone unterschiedlich sein konnte. Es muß also davon ausgegangen werden, dass die etablierten Zelllinien nicht monoklonal sind. Da dies aber für den später eingesetzten Reporter-Gen-Assay nicht relevant ist, wurde auf eine Subklonierung zur Erzeugung monoklonaler Linien verzichtet. Es sind so folgende stabile Zellkulturen etabliert worden:

- EAhy 926 mit dem Konstrukt 1,3 kb PDGF-EGFP
- EAhy 926 mit dem Konstrukt 1,3 kb PDGF(Δ SSRE)-EGFP
- EAhy 926 mit dem Konstrukt CMV-EGFP
- EAhy 926 mit dem Konstrukt CMV (SSRE)ins-EGFP

Hierbei stellen die Zellklone mit 1,3 kb PDGF-EGFP und 1,3 kb PDGF(Δ SSRE)-EGFP das Hauptkonstrukt und seine Kontrolle dar. Um eine weitere Kontrolle bzw. einen Vergleich zu erhalten, wurden die beiden CMV-Konstrukte eingeführt.

Neben dem Nachweis der Fluoreszenz konnte auch im Western-Blot das GF-Protein in den jeweiligen Zellklonen gezeigt werden (Abb.3.1.). Die für den Western-Blot eingesetzte Proteinmenge wurde mit Coomassie-Blau-Färbung quantifiziert und abgeschätzt.

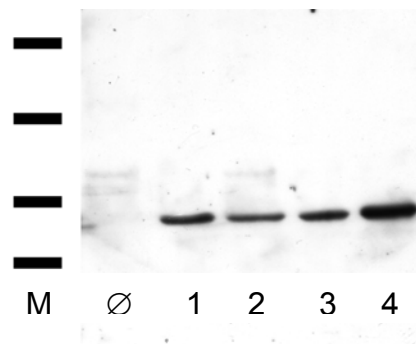


Abb.3.1: Western-Blot

Der hier eingesetzte Marker ist Peq Gold mit den Markierungsgrößen 97kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa. M steht für Marker, \emptyset für EAhy-Zellen ohne Transfektion, 1 = 1,3 kb PDGF(Δ SSRE)-EGFP, 2 = CMV (SSRE)ins-EGFP, 3 = 1,3 kb PDGF-EGFP, 4 = CMV-EGFP

Wie zu erwarten, liegt GFP bei ca 68kDa

3.2. Funktionalitätstests des Promotors mit Phorbol ester

Bevor die Zellklone nun gemessen werden konnten, mußte getestet werden, ob der Promotor funktionell aktiv ist. Dies war notwendig, da mit dem Reporter gen-Assay nun neue Zelllinien gemessen werden sollten. Deshalb mußte sichergestellt sein, dass alle Effekte durch einen vollständig aktiven Promotor hervorgerufen werden.

Jin et al., (1993) zeigten, dass es innerhalb des PDGF-Promotors durch Phorbol ester aktivierbare Elemente gibt. Daher wurde dies als Kontrolle genutzt.

Die Zellen wurden per Fluoreszenzmikroskop im Messsystem getestet. Dazu wurden die Endothelzellen konfluent ausgesät und am Tag darauf auf dem Mikroskopiertisch platziert, Phorbol ester (100ng/ml Medium) zu Beginn der Messung hinzugegeben und zu bestimmten Zeitpunkten die Fluoreszenzintensität von GFP gemessen. Es wurden 5 Versuche unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Auswertung dieses Experiments ist in den Diagrammen 3.1. und 3.2. dargestellt.

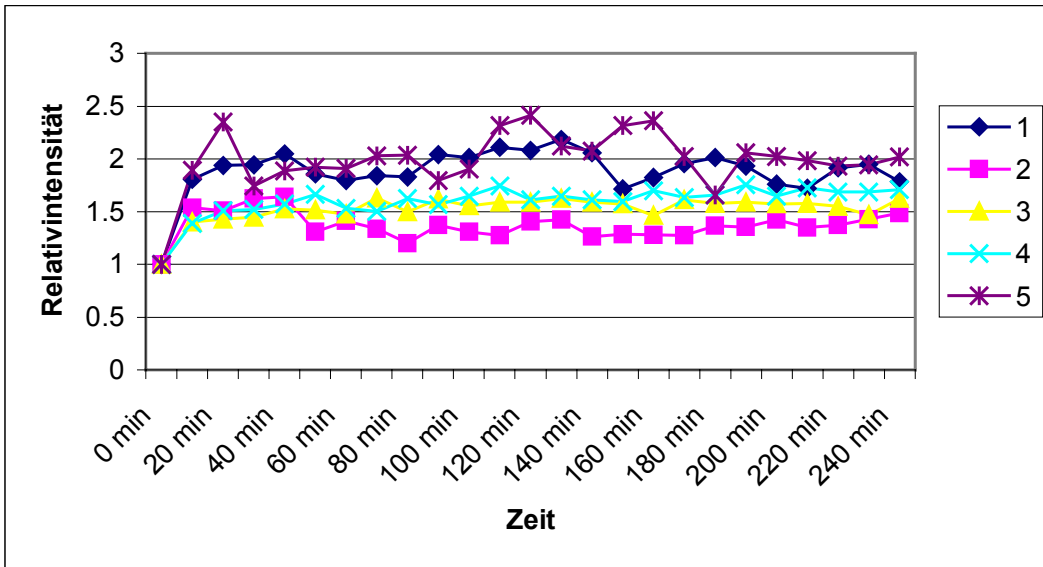


Diagramm 3.1.: Fluoreszenz des GFP von Einzelzellen der Zelllinie 1,3 kb PDGF-EGFP im Phorbol ester-Versuch über 4 Stunden nach Zusatz von Phorbol ester

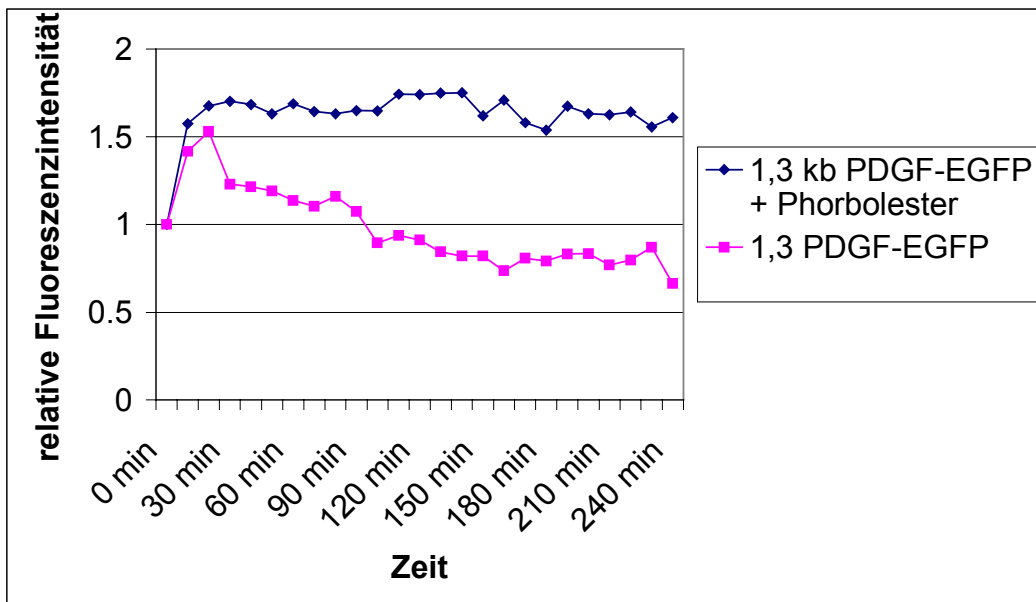


Diagramm 3.2.: Fluoreszenz des GFP bei der Induktion des Hauptkonstruktes 1,3 kb PDGF-EGFP mit Phorbol ester und ohne Phorbol ester über vier Stunden, dargestellt ist der Mittelwert aller gemessener Zellen; Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest : $5,960e^{-8}$

Ab dem Zeitpunkt null ist der deutliche Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität zu sehen, der nach ca. 40 Minuten in eine Plateauphase bei ca. 1,7 übergeht. Die Kontrollgruppe dagegen zeigt einen kurzen Anstieg, der ab 20 Minuten wieder abfällt und unter das Ausgangsniveau sinkt. Dies beweist die Induktion des Promotors, so dass man davon ausgehen kann, dass die eingesetzten Konstrukte und das Messsystem funktionell aktiv sind.

Als Ergänzung hierzu wurde auch versucht, die Induktion im Western-Blot nachzuweisen.

Die Zellen wurden in Petrischalen mit 100ng Phorbolster pro ml Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 4 Stunden inkubiert. Gleichzeitig wurde jeweils eine Negativ-Probe mit im Brutschrank inkubiert, der man keinen Phorbolster zugesetzt hatte. Anschließend wurde versucht, den Anstieg von GFP im Western-Blot zu detektieren. Um gleiche Proteinmengen für den Western-Blot zu verwenden, wurden die Proteinproben zuvor per Amidoschwarz-Proteinbestimmung quantifiziert und dann mit jeweils dem gleichen Anteil an Protein gearbeitet. Da mit Amidoschwarz-Proteinbestimmung aber nur die Gesamtproteinmenge bestimmt wird und für jedes Konstrukt eine unterschiedliche Anzahl von GFP-tragenden Zellen in der Probe vorhanden war, sind die GFP-Banden je Konstruktpaar unterschiedlich breit. Pro Konstruktpaar wurde allerdings die gleiche Anzahl GFP-tragender Zellen im Versuchsansatz verwendet, so dass dies vergleichbar ist.

Wie im Western-Blot unten (Abb.3.2.) dargestellt, läßt sich hier keine quantitative Zunahme von GFP pro Konstrukt zwischen den Ansätzen mit und ohne Phorbolster verzeichnen. (siehe dazu auch Diskussion 4.1.2.)

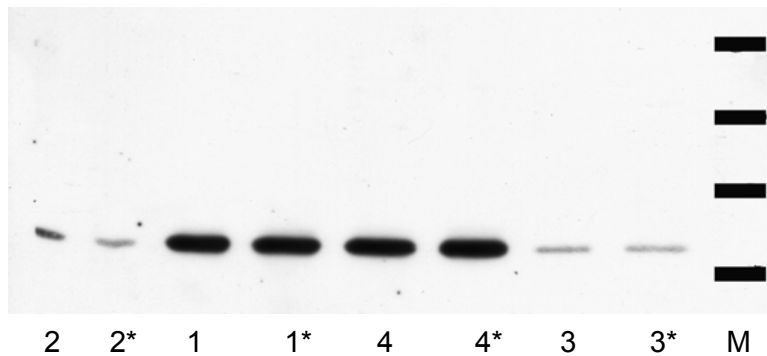


Abb.3.2.: Western-Blot

Der hier eingesetzte Marker ist Peq Gold mit den Markierungsgrößen 97kDa, 66kDa, 45kDa, 35kDa. M steht für Marker, 1 = 1,3 kb PDGF(Δ SSRE)-EGFP, 2 = CMV (SSRE)ins-EGFP, 3 = 1,3 kb PDGF-EGFP, 4 = CMV-EGFP. Dabei stellen die mit Sternchen (*) versehenen Nummern immer die Konstrukte mit Induktion durch Phorbolster dar.

3.3. Messung der EAhy 926-Konstrukte unter Scherstress

3.3.1. Allgemeine Bedingungen

Für die Scherstressexperimente wurden die Endothelzellen immer so auf Deckgläschen ausgesät, dass sie am darauf folgenden Tag konfluent waren. Dann wurde das Deckgläschen in die speziell dafür gefertigte Halterung eingepannt und das Messprogramm gestartet. Die Messungen erfolgten jeweils über 4 Stunden bei 0 und bei 30 dyn/cm², wobei alle 10 min eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität erfolgte. Es wurden für jedes Konstrukt mit den jeweiligen Messungen bei 0 dyn/cm² und 30 dyn/cm² mindestens 4 Versuche mit ca. 20 Zellen durchgeführt. In den Diagrammen ist der Mittelwert der gemessenen Zellen dargestellt. Dabei ist es wichtig, dass Einzelzellen gemessen wurden, das heißt, dass die Zellen am Vortag mit nicht transfizierten Zellen gemischt wurden (ca. im Verhältnis 1:20 zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen) und somit während der Messung im konfluenten Monolayer vorlagen. Dies ist für die Auswertung von großer Relevanz.

3.3.2. Auswertung der Versuche und Statistik

Die Auswertung erfolgte nach dem Modell von M. Zeller.

Dabei besitzt das Gesichtsfeld des Mikroskops bei Benutzung des Standardobjektivs von 20x und der Optik der Photonenkamera eine Seitenlänge von ca. 260 μm . Die Helligkeit des Gesichtsfeldes wird mit Hilfe des ARGUS-CA-Programms von Hamamatsu berechnet. Das Programm unterteilt das Gesichtsfeld in 500 mal 500 kleine Felder, 250 000 sogenannte Pixel. Die Lichtintensitätsbestimmung erfolgt nun für jedes Pixel. Der erhaltene Wert wird als Photonenäquivalenzwert zwischen 1 und 255 angegeben. Um jede zu messende Zelle wird ein Feld gelegt. Werden die Photonenäquivalenzwerte aller Pixel eines Feldes addiert, erhält man die Gesamtintensität dieses Feldes. Die Durchschnittsintensität eines Feldes berechnet sich durch Division der Gesamtintensität durch die Pixel des Feldes.

Ein weiteres Problem stellt die Zellwanderung dar, die bei Scherkräften von 30 dyn/cm^2 auftritt. Bei konfluenten Populationen transfizierter Zellen kann ein Auswertungsfeld nur willkürlich ohne das Beachten von Zellgrenzen hineingelegt werden. Da die Zellen aber nicht monoklonal sind, das heißt unterschiedliche Grundhelligkeiten besitzen, bedeutet eine Bewegung der Zellen schon eine Änderung der Gesamtintensität des Feldes. Um diese Artefakte zu relativieren, müssen einzelne transfizierte Zellen vor einem möglichst stummen Hintergrund (kaum Hintergrundaktivitäten) bestimmt werden, indem man um jede Zelle ein Auswertungsfenster legt, das die beobachtete Zelle nicht verläßt und in welches keine anderen transfizierten Zellen wandern (siehe hierzu auch Abbildung 3.3.).

Zur Bestimmung der Hintergrundintensität wird ein zweites Auswertungsfeld nahe dem Auswertungsfeld gesetzt, wobei auch hier keine transfizierte Zelle durch das Feld ziehen darf. Die Durchschnittsintensität zu jedem Zeitpunkt der Messung wird für dieses Feld bestimmt und mit der Pixelzahl des Auswertungsfeldes multipliziert. Dieser Wert stellt die Hintergrundintensität des Auswertungsfeldes (G_H) dar. Er muß vom Gesamtintensitätswert des Auswertungsfeldes (G_Z) zu jedem Zeitpunkt der Messung (t_0 bis t_x) subtrahiert werden. Man erhält so die korrigierte Gesamtintensität des Zellfeldes (kG_Z).

Daraus folgt: $kG_z = G_z - GH_z$

Nun wird das Verhältnis der korrigierten Gesamtintensitäten zum Zeitpunkt x zu dieser des Zeitpunkts t_0 gebildet und so die Relativintensität zum Zeitpunkt t_x (R_{tx}) ermittelt.

Daraus folgt: $R_{tx} = kG_{ztx} / kG_{zt0}$

Diese Rechnung wird für alle Auswertungsfelder eines Gesichtsfeldes durchgeführt und dann mit den erhaltenen Relativintensitäten für jeden Zeitpunkt der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe einer entwickelten EXEL-Matrize konnten die einzelnen Versuche schneller ausgewertet werden.

Die statistische Auswertung bezieht sich auf einen Rangkorrelationstest, da die Ergebnisse binominal verteilt sind.

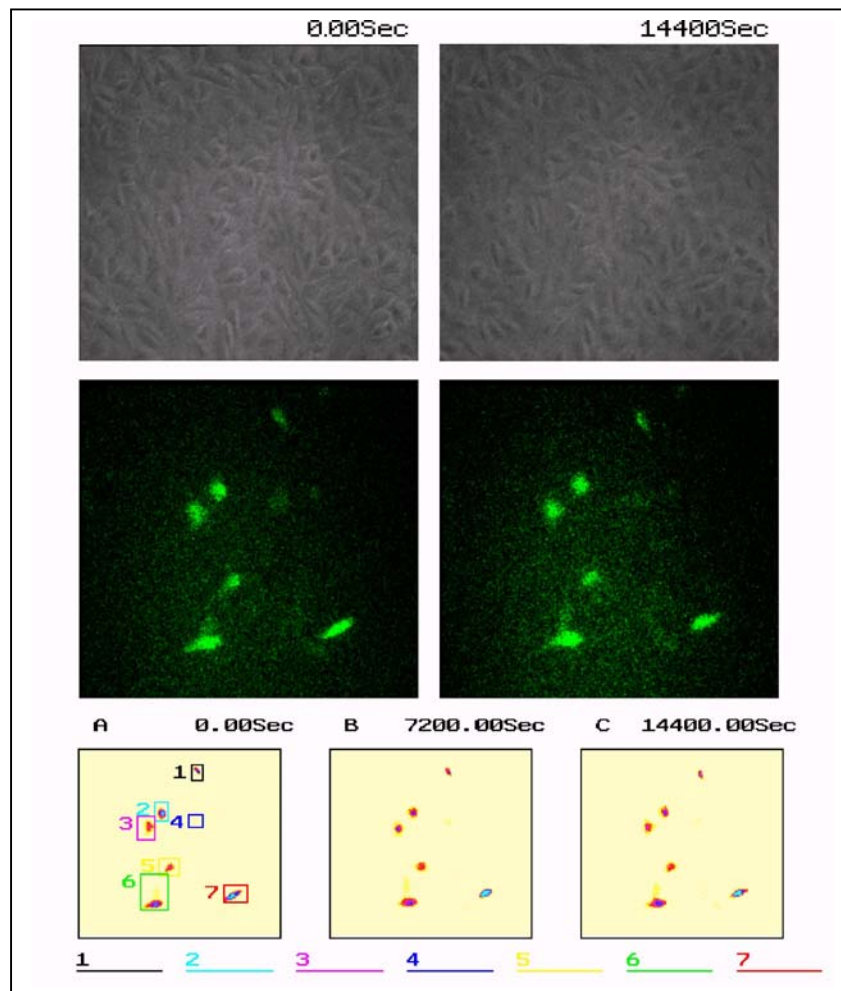


Abb 3.3.: Dargestellt sind der Reihe nach von oben nach unten die lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen vor und nach der Messung, die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme vor und nach der Messung und die anschließende Auswertung mit den um die Zellen gelegten Feldern.

3.3.3. Messung der EAhy 926-Zellen mit den Kontrollplasmiden CMV-EGFP und CMV (SSRE)ins-EGFP

Initial wurden die beiden Kontrollkonstrukte mit dem CMV-Promotor gemessen. Für das CMV-EGFP- Konstrukt ist kein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen (Diagramm 3.3.). Die 0 dyn/cm²-Kurve bleibt um ihren Ausgangswert konstant, während die 30 dyn/cm²-Kurve um ihren Anfangswert herum schwankt. Dies äußert sich in einem kurzzeitigen minimalen Anstieg, bevor sie wieder unter das Anfangsniveau abfällt.

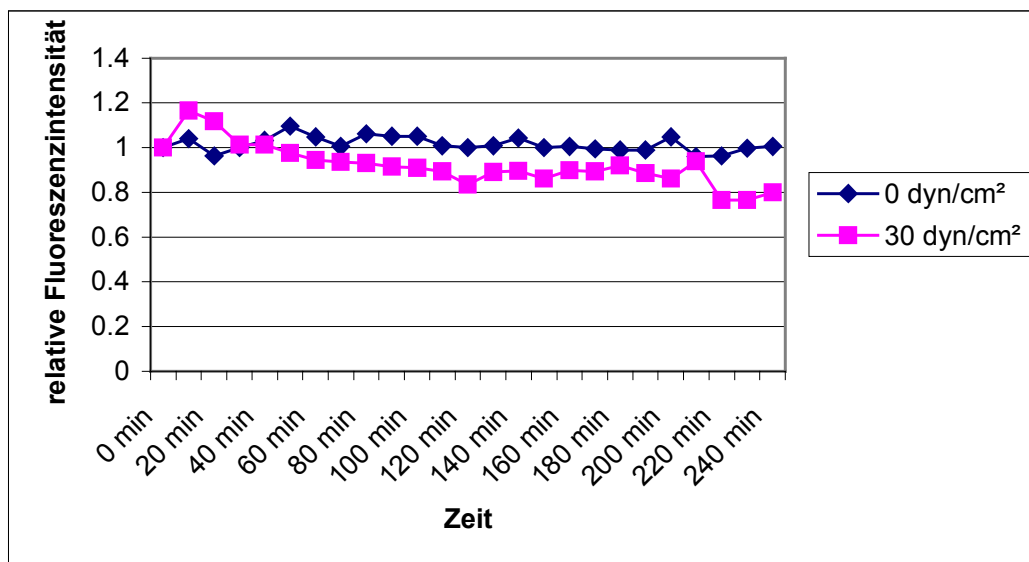


Diagramm 3.3.: Dargestellt sind die Messungen der Fluoreszenz des GFP mit dem Konstrukt CMV-EGFP über 4 Stunden bei 0 und 30 dyn/cm².

Im Gegensatz dazu ist bei dem Konstrukt CMV -(SSRE)ins-EGFP ein signifikanter Anstieg der 30 dyn/cm²-Kurve gegenüber der 0 dyn/cm²-Kurve zu beobachten (Diagramm 3.4.). Das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest beläuft sich auf $5,960e^{-8}$, was einer signifikanten Erhöhung der 30 dyn/cm²-Kurve gegenüber der 0 dyn/cm²-Kurve entspricht. Die Relativintensität steigt bei 30 dyn/cm² in den ersten 30 Minuten auf 2, fällt dann bis 110 Minuten wieder ab, um ab 120 Minuten wieder auf ein Niveau um 2 anzusteigen. Die 0 dyn/cm²-Kurve dagegen steigt auf ca 1,2 an und

bleibt dann konstant auf diesem Niveau. Es wurden ca. 20 Zellen in vier unabhängigen Experimenten untersucht.

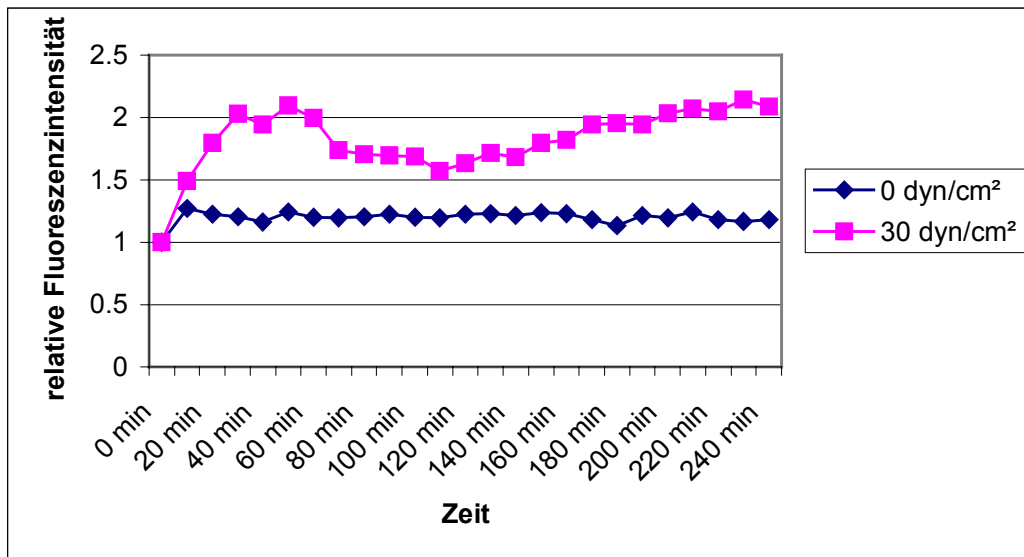


Diagramm 3.4.: Dargestellt sind die Messungen der Fluoreszenz des GFP mit dem Konstrukt CMV-(SSRE)ins-EGFP über 4 Stunden bei 0 und 30 dyn/cm²; das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest ist $5,960e^{-8}$.

3.3.4. Messung der EAhy 926-Zellen mit dem PDGF-EGFP-Plasmid und dem Kontrollplasmid 1,3 kb PDGF-(ΔSSRE)-EGFP

Die Testung der PDGF-Konstrukte verlief unter den gleichen Bedingungen wie bei den CMV-Konstrukten und unter 3.3.1. erwähnt.

Die Fluoreszenzintensität der PDGF-EGFP-transfizierten Zellen steigt während der Messung mit 30 dyn/cm² sehr schnell auf einen Relativintensitätswert von 2 und bleibt dann konstant (Diagramm 3.5.). Die Kurve der 0 dyn/cm²-Messung steigt in den ersten 20 min auf ca.1,5, fällt dann aber kontinuierlich unter das Ausgangsniveau ab. Die 30 dyn/cm² -Kurve ist gegenüber der 0 dyn/cm² -Kurve signifikant erhöht. Hier beläuft sich das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest auch auf $5,960e^{-8}$.

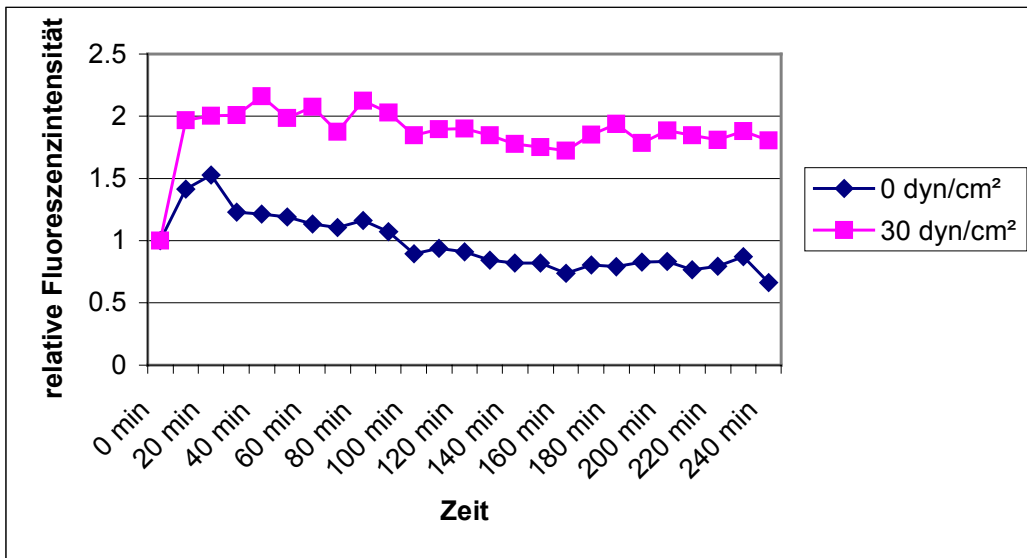


Diagramm 3.5.: Dargestellt sind die Messungen der Fluoreszenz des GFP mit dem Konstrukt 1,3 kb PDGF-EGFP über 4 Stunden bei 0 und 30 dyn/cm²; das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest ist $5,960e^{-8}$

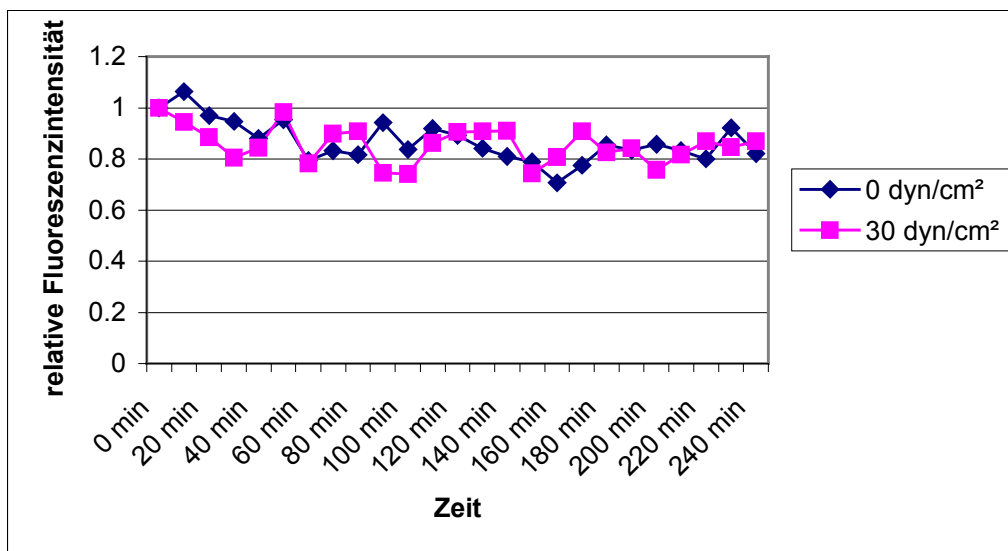


Diagramm 3.6.: Dargestellt sind die Messungen der Fluoreszenz des GFP mit dem Konstrukt 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP über 4 Stunden bei 0 und 30 dyn/cm²

Die 0 dyn/cm² - und die 30 dyn/cm²-Kurve mit dem Kontrollkonstrukt, 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP-transfizierte Zellen (Diagramm 3.6.), dagegen pendeln zwischen dem Ausgangswert 1 und 0,8. Hier ist kein Anstieg einer Kurve gegenüber der Vergleichskurve zu beobachten.

3.4. Kontrollmessung durch transient transfizierte EAhy 926-Zellen mit den Plasmiden 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP und 1,3 kb PDGF-EGFP

Um Fehlermöglichkeiten der stabilen Transfektion, z.B. durch falsch inserierte Genabschnitte, auszuschließen, wurden die Scherstressversuche nochmals mit transient transfizierten Zellen mit den gleichen Konstrukten (1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP und 1,3 kb PDGF-EGFP) wiederholt. Die einzige Änderung bestand darin, dass diese Versuche nur bei 12 dyn/cm² wegen der leichteren Durchführbarkeit getestet wurden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die transient 1,3 kb PDGF-EGFP-transfizierten Endothelzellen in den ersten 10 min bis auf einen Intensitätswert von 1,4 steigen und dann weiter leicht zunehmen (Diagramm 3.7.), um gegen Ende der Messung Werte um 1,6 zu erreichen. Die Kontrollzellen mit dem 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP-Konstrukt dagegen bleiben bei ihrem Anfangswert von 1 während der gesamten Messung. Das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest beläuft sich auf $5,960e^{-8}$, was einer signifikanten Erhöhung des Konstruktes 1,3 kb PDGF-EGFP gegenüber dem Kontrollkonstrukt 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP entspricht.

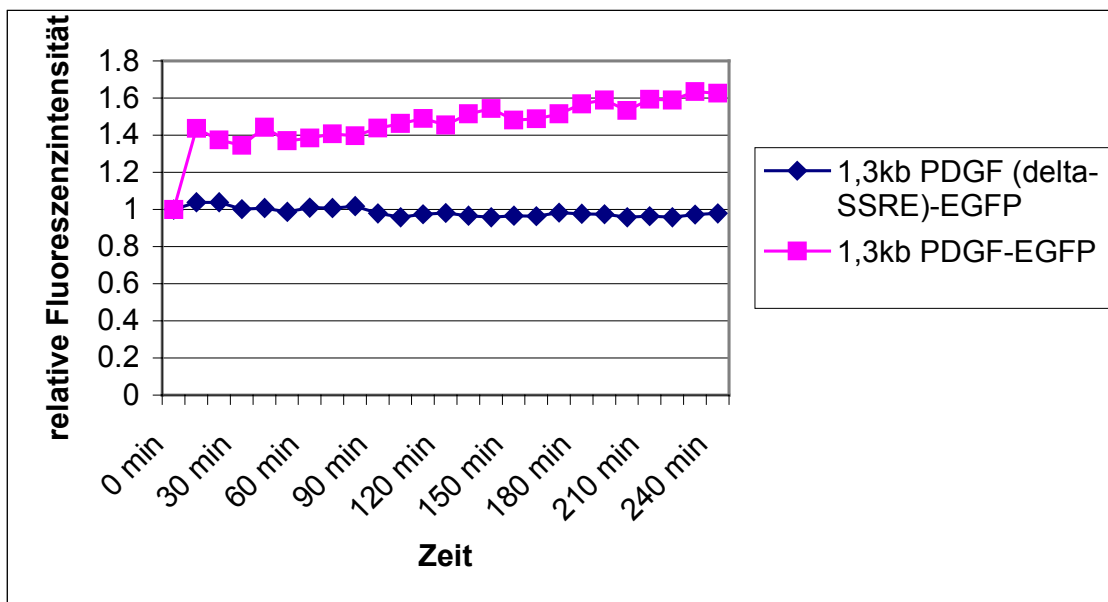


Diagramm 3.7.: Dargestellt sind die Messungen der Fluoreszenz des GFP mit den Konstrukten 1,3 kb PDGF-EGFP und 1,3 kb PDGF-(Δ SSRE)-EGFP über 4 Stunden bei 12 dyn/cm²; das Signifikanzniveau nach dem Rangkorrelationstest ist $5,960e^{-8}$.

3.5. Messungen mit transient transfizierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Es wurden weitere Versuche unter den gleichen Bedingungen mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) durchgeführt, die aber zu keinem nennenswerten Ergebnis führten. Ein Grund dafür könnte der nicht vorhandene Monolayer während der Scherstressmessung sein, denn es gelang nicht, mit der hier vorgestellten Transfektionsmethode transient transfizierte Zellen so zu erzielen, dass sie später im konfluenten Zellverband vorlagen.

4. Diskussion

4.1. Diskussion eigener Ergebnisse

4.1.1. Methoden

Dieser neue Reportergerennachweis (Schwarz, 1999) bietet interessante Ansätze, um mit lebenden Zellen zu arbeiten und diese auch während Langzeitversuchen beobachten zu können. Ein weiterer Vorteil ist das Durchführen mehrerer Meßrunden hintereinander, denn die Reporterexpression kann während der gesamten Meßzeit hindurch beobachtet werden ohne die Zellen am Ende des Experiments lysieren zu müssen. Daher können auch Versuche mit Erholungsphasen beziehungsweise unterschiedlichen Stimulationen mit den selben Zellen durchgeführt werden. Interessant ist natürlich auch die Möglichkeit, individuelle Reaktionen einzelner Zellen aufzuzeichnen, das heißt man kann überprüfen, ob sich in einer Zellpopulation alle Zellen ähnlich verhalten oder verschieden auf die dargebotenen Reize reagieren. Wichtig ist die Tatsache, dass schädliche und toxische Einflüsse auf die Zellen (z.B. DNA-Schäden) sowie Ausbleicheffekte des GFP durch den Einsatz einer hochsensitiven CCD-Kamera nahezu ausgeschlossen sind.

Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass immer nur ein Translationsprodukt des Reportergens gemessen wird, das heißt, dass das eigentlich zu messende Produkt immer nur über dieses getestet werden kann. Daraus folgt, dass man nicht wirklich, wie in diesem Fall, PDGF quantifizieren kann, sondern immer nur das Translationsprodukt GFP. Dieses Problem liegt natürlich allen Reportergeren-Assays zugrunde. Auch ist es schwieriger, die erhaltenen Daten zu quantifizieren. Dieses Problem wird allerdings dadurch versucht zu umgehen, indem Verhältnisse, hier relative Fluoreszenzintensitäten, gebildet werden, mit denen Veränderungen dargestellt werden können. Die Bestimmung absoluter Reportergerenproduktmengen stellt sich jedoch als schwierig dar. Da dies aber nicht unser Anliegen in diesen Experimenten war, ist es in dem Fall kein Nachteil.

Da wir die Rolle von PDGF in Endothelzellen unter Scherstressbedingungen testen wollten, also das Vorhandensein des von Resnick et al., (1993) beschriebenen „shear-

stress-responsive elements“ (SSRE), erwiesen sich die vorhandenen Plasmide PDGF-EGFP und PDGF (Δ SSRE)-EGFP als gut nutzbar, zumal sie zusätzlich zu dem von uns gebrauchten SSRE auch eine Antibiotikaresistenz zur Selektionierung nach Transfektion integriert haben. Die CMV-Plasmide konnten als zusätzliche Kontrollplasmide für die zu beobachtenden Testkonstrukte genutzt werden.

Nach Austestung optimaler Bedingungen (z.B. der Genetickonzentration) ist es uns gelungen, auch die empfindlicheren Endothelzellen zu transfizieren. Als stabil transfizierte Zellen wurden solche gewertet, die nach 3-5 Selektionsrunden und nach Kryokonservierung das grünfluoreszierende Protein als Marker noch aufwiesen.

4.1.2. Phorbolster-Induktion

Um die Funktionstüchtigkeit des Promotors in den stabil transfizierten Zelllinien zu untersuchen, wurde eine Induktion mit Phorbolster durchgeführt. Diese von Jin et al., (1993) entdeckte Sequenz im PDGF-Promotor wird durch die Bindung von Phorbolster aktiviert. Die Induktion konnte über die Erhöhung von GFP fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Arbeitsgruppe Mitsumata et al., (1993), die feststellten , dass PDGF-B-Ketten mRNA durch Phorbolster induziert wurde.

Um noch einen anderen Nachweis zu erbringen, wurde versucht, GFP auch quantitativ im Western-Blot nachzuweisen. Dies konnte nicht gezeigt werden, da GFP auch basal exprimiert war und die Methode nicht sensitiv genug war, einen zusätzlichen Anstieg auf Proteinebene nachzuweisen.

4.1.3. Experimente mit Scherstress

Für die Konstrukte mit SSRE (PDGF-EGFP und CMV (SSRE)ins-EGFP) konnte nach Beginn des Flusses und damit des Scherstress´ ein sehr rascher Anstieg der GFP-Menge, also darüber auch der PDGF-Menge, und eine daran anschließende relative Plateauphase gemessen werden. Dagegen zeigten die jeweiligen Kontrollkonstrukte

ohne SSRE (PDGF (Δ SSRE)-EGFP und CMV -EGFP) keine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Leichte Anstiege der Relativintensität zu Beginn der 0 dyn/cm²-Messung können auf Änderungen des Milieus durch z.B. den startenden Kulturmediumfluß und Verunreinigungen, die das Fluoreszenzmikroskop detektiert, zurückgeführt werden. Diese geben sich aber nach spätestens 30 Minuten, so dass die Fluoreszenzintensität wieder absinkt. Insgesamt lassen sie aber keine Zunahme der Relativintensität erkennen und bleiben um ihren Ausgangsintensitätswert konstant.

Es läßt sich also feststellen, dass die GFP- Menge während der 30 dyn/cm²- Messung zunimmt, was über eine SSRE- vermittelte Aktivierung des PDGF-Promotors zu erklären ist, denn bei den Konstrukten, die kein SSRE integriert haben, ansonsten aber identisch sind, sowie bei den 0 dyn/cm²- Messungen ist keine Fluoreszenzzunahme zu verzeichnen.

Diese Hauptversuche mit den vier Konstrukten erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die Untersuchung der ECV 304-Zellen (Zeller M, noch nicht veröffentlicht; Schwarz, 1999).

Die Zellen wurden nur mit dem arteriellen Mittelscherstresswert von 30 dyn/cm² und 0 dyn/cm² als Kontrolle getestet. Es ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass sie sich in ihrer Kinetik bei anderen Scherstresswerten ähnlich wie die dahingehend schon getesteten ECV 304-Zellen verhalten. Diese wiesen bei 12 dyn/cm² eine geringere Zunahme der GFP-Menge auf als bei 30 dyn/cm².

Da die Versuche als Kontrolle auch mit transient transfizierten Zellen durchgeführt wurden und sich hier ähnliche Ergebnisse fanden (ein Anstieg der GFP-Menge während der Messung mit dem PDGF-EGFP-Konstrukt, keine Zunahme mit dem PDGF (Δ SSRE)-EGFP-Konstrukt), kann davon ausgegangen werden, dass die stabil transfizierten Zellklone ebenfalls funktionell aktiv sind. Einen weiteren Hinweis bietet hier auch die Tatsache, dass während jeder Messung viele nicht transfizierte Zellen im Zellrasen (entspricht einer Negativkontrolle) mit getestet wurden und diese außer einer minimalen Eigenfluoreszenz von Anfang an keine nennenswerten Änderungen aufwiesen. Auch unbehandelte EAhy 926-Zellen zeigten eine nur geringe Autofluoreszenz, die sich während der Messungen nicht änderte (Daten nicht ausführlich gezeigt). So konnte auch bewiesen werden, dass eine unspezifische Bildung endogenen grünfluoreszierenden Proteins oder anderer Fluoreszenzwerte

ausgeschlossen werden kann. Einflüsse durch die Transfektion konnten so ebenfalls als nicht auffällig dargestellt werden.

Die Eigenfluoreszenz des Zellnährmediums oder des Deckglases wurden berücksichtigt, so dass die erhaltenen Daten nur korrigierte Werte repräsentieren und so nur Veränderungen der Relativfluoreszenzintensitäten der reagierenden Zellen aufzeigen.

Zur Auswertung sind auch folgende Anmerkungen zu beachten:

- Die Zellen werden während der Messung durch die Kamera verstärkt, um sie besser auf dem Monitor detektieren zu können. Bei der Berechnung der Lichtintensitätsentwicklung werden störende Hintergrundaktivitäten herausgerechnet und die Veränderungen als relativer Prozeß betrachtet. Das Maß der Verstärkung hat also keinen Einfluß auf das Meßergebnis.
- Das Gesichtsfeld eines Mikroskops ist nie völlig gleichmäßig ausgeleuchtet, weshalb vor Versuchsbeginn eine Messung dieser Ausleuchtung erfolgen muß. Diese Daten werden vor der Auswertung zu einer so genannten „shading-correction“ gebraucht, um rechnerisch die inhomogene Ausleuchtung des Gesichtsfeldes auszugleichen.
- Die Durchschnittsfluoreszenzintensität eines Feldes berechnet sich aus der Division der Gesamtfluoreszenzintensität durch die Pixelanzahl des Feldes. Daraus folgt, dass ein dunkles Feld mit kleinem hellem Fleck die gleiche Durchschnittsfluoreszenzintensität aufweisen kann wie ein gleichmäßig helles Feld.

Daraus ergibt sich, dass die Berechnung der Relativintensität einer Vielzahl von Fehlerquellen ausgesetzt ist, die durch sorgfältige Austestung jedes Versuches vor Messungsbeginn und anschließender Auswertung aber zu umgehen sind.

Als letzten Punkt sind die Versuche mit der Primärkultur HDMEC zu erwähnen. Da diese Zellen nicht immortalisiert sind, könnte man hier Zellen ohne genetische Veränderungen testen. Da immortalisierte Zellen sehr schwer nur zu transfizieren sind und stabile Kulturen entfallen, war es problematisch, einen geschlossenen Zellverband für die Messungen zu erhalten. Sehr viele Zellen gingen während der Transfektion zu Grunde, weitere bei dem Versuch, sie abzutrypsinieren und sie mit nicht transfizierten Zellen zu mischen, um einen konfluenten Monolayer zu erzielen. Da es nicht gelang, sie im Zellverband messen zu können (viele Zellen fielen auch während der Scherstressbelastung ab), waren die Ergebnisse nicht verwend- und auswertbar.

4.2. Diskussion der Fehlermöglichkeiten und Einschränkungen

Als wichtigster Punkt ist hier aufzuführen, dass Zellkultur nicht mit den physiologischen Gegebenheiten überein stimmt. Die Zellen wachsen auf gelatinierten Böden, die allerdings eine Basalmembran imitieren sollen. Die äußeren Bedingungen wie Zellnährmedium und Sauerstoff bzw. CO₂-Gehalt differieren häufig von den physiologischen Bedingungen. So kann eine Änderung in diesen Punkten schon zu vermehrtem Zellstress führen.

Ebenso weisen immortalisierte Zellen immer genetische Veränderungen mit chromosomalen Aberrationen auf. Auch die Funktionstüchtigkeit der schon vorhandenen Plasmide kann verändert sein, was aber durch gelelektrophoretische Auftrennung und die offensichtlich vorhandene Funktion abgeklärt wurde.

Die Vor- und Nachteile des Messsystems sind ausführlich schon in Abschnitt 4.1. besprochen worden, ebenso die Fehlermöglichkeiten bei der Auswertung der Daten.

Das gesamte Messsystem birgt die Gefahr der Verunreinigung des Zellmediums und des Sterilitätsverlustes, was zu erhöhter Ausschüttung anderweitiger Faktoren führen kann. Dies könnte ein limitierender Faktor bei Langzeitmessungen sein. Auch können Änderungen im pH-Wert sowie der Temperatur vorkommen, wobei große pH-Änderungen durch die Indikatorfarbe des Mediums auffallen würden und die Temperatur über einen Regelmechanismus bei annähernd 37°C konstant gehalten wird. Wie schon erwähnt, ist es wichtig, dass die Zellen im Zellverband gemessen werden, um wenigstens dieses physiologische Kriterium zu gewährleisten. Trotzdem kann es vorkommen, dass Zellen während der Messung abfallen. Diese wurden dann nicht gewertet. Einen positiven Aspekt stellt aber die Sicherstellung eines linearen und auch pulsatischen Stromflusses dar, der den Scherstress relativ physiologisch imitiert.

4.3. Diskussion im Zusammenhang

Durch die vorhandene Flusskammer und das angeschlossene Perfusionssystem ist es möglich, die Endothelzellen einer annähernd laminaren Überströmung durch ein Zellnährmedium mit konstanter Temperatur und gleichbleibendem pH-Wert

auszusetzen und die Zellen während der Messung mikroskopisch zu betrachten. Es wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Modelle entwickelt. Die Arbeitsgruppe von James et al., (1995) gebrauchten eine Flusskammer, die mittels eines hydrostatischen Druckgradienten zwischen Mediumgefäß und Flusskammer die Perfusion erreichten. Hierbei ist nachteilig, dass eine Diskriminierung zwischen verschiedenen hydrodynamischen Effekten (hydrostatischer Druck, Scherstress) nicht möglich ist. Das in dieser Arbeit verwendete Perfusionssystem verwendet eine nahezu stufenlose Pumpe mit pulsatilem Pumpverhalten, was physiologischer ist. Dewey et al., (1981) benutzten ein Platten- Kegel- Rheometer, mit dem laminare und später auch turbulente (Sdougos et al., 1984) Flußbedingungen möglich sind, der aber die Beobachtung der Zellen während des Versuches nicht erlaubte. Dies wurde von Schnittler et al., (1993) weiterentwickelt und ist nun auch möglich. Ein weiteres System ist das von Olesen et al., (1988) benutzte Kapillarröhren- Viskosimeter, was den Vorteil bietet, nahezu physiologische Bedingungen bezüglich Scherstress und hydrostatischem Druck aufzuweisen, aber eine Beobachtung der Zellen mit dem Mikroskop nur schwer zuläßt. Dieser Aspekt war jedoch während unserer Arbeit enorm wichtig, weshalb wir ein Parallel-Platten-Viskosimeter benutzten (siehe hierzu auch Kap 2.12.).

Interessante unterschiedliche Aussagen gibt es bezüglich der Art und Weise der PDGF-Freisetzung. Resnick et al., (1993) stellten fest, dass endogene PDGF-B- Transkripte in BAEC- Zellrasen schon nach 30 Minuten nach Expositionsbeginn durch laminaren Scherstress von 10 dyn/cm² nachweisbar waren. Einen vorübergehenden und milden Anstieg von PDGF- B- Ketten mRNA Expression in BAEC mit einem nach 1-2 Stunden beginnenden und langanhaltenden Abfall der Expression wurde von Malek et al., (1994) beschrieben. In diesem Versuch war PDGF-A- Ketten mRNA nicht nachweisbar. Resnick et al., (1995) faßten zusammen, dass auch ohne Scherstress (static conditions) PDGF-B- Ketten nachweisbar sind und unter Scherstress die Induktion deshalb weniger auffällig ist. So stieg die Menge an Transkriptionsprodukten in BAEC, die laminarem Scherstress von 10 dyn/cm² ausgesetzt waren, sehr rasch in weniger als einer Stunde, blieb dann mehrere Stunden bei diesem Niveau, bevor sie wieder abfiel. Diese Ergebnisse sind sehr interessant, da sie direkt die Transkriptionsmenge von PDGF widerspiegeln. In unseren Versuchen konnten wir nach einem raschen Anstieg keinen Abfall beobachten, was aber damit zusammenhängen könnte, dass wir die GFP-

Menge messen, für die ein Abbau in der Zelle vielleicht auch gar nicht vorgesehen ist. Das würde bedeuten, dass selbst wenn die PDGF- Expression nachließe, das nicht sofort zu messen wäre. Es würde nur weniger oder kein GFP gebildet werden, was über ein gleichbleibendes GFP- Niveau, wie es bei unserer Auswertung vorkommt, zu erklären wäre.

Neue Erkenntnisse gibt es auch bezüglich der chronischen Exposition des Scherstress` und seinen Folgen. Nachdem Endothelzellen auf akuten Scherstress durch Aktivierung von Ionenkanälen, Umbau des Zytoskeletts und Transkription von Genen reagieren (siehe Kap. 1; Ballermann et al., 1998), kommt es auf chronischen Streß hin zu einer verstärkten Anhaftung der Zellen an ihren Untergrund, was durch Zellhypertrophie, einer Zunahme von Aktinmikrofilamenten und lokalen Adhäsionsmolekülen erklärt wird (Dardik et al., 1998). Chronischer Scherstress führt auch zu einer Abnahme des PDGF-Niveaus (Eng et al., 1996), obwohl PDGF NFκB vermittelt (über SSRE) bei akutem Scherstress ansteigt (Lan et al., 1994). In vivo ist PDGF-B in Endothelzellen meist herunter reguliert und wird nur durch Verletzungen der Gefäßwand und Entzündungsmediatoren stimuliert (Hajjar et al., 1987).

Wie hängen nun Scherstress, PDGF- Expression und Arteriosklerose zusammen?

Wie in Kap. 1 erwähnt, gibt es hier eine schnelle Entwicklung von neuen Theorien. Es wird angenommen, dass geringer Scherstress ($< 4 \text{ dyn/cm}^2$) und in Gebieten gegenüber von Bifurkationen, in denen der Blutfluß sistiert, zu Arteriosklerose führt (Jou et al., 1996). Malek et al., (1999) beschreiben in ihrem Artikel, dass Scherstress $< 15 \text{ dyn/cm}^2$ zu einer geringen Freisetzung von PDGF, sinkende Zellzyklen und Proliferation sowie Apoptose führt, was für sogenannten oszillativen (zeit- und richtungsändernden) Scherstress genau entgegen gesetzt gilt. Unsere Fakten zeigen aber, dass auch Scherstress von 30 dyn/cm^2 zu einer PDGF- Erhöhung führt. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten auch Mitsumata et al., (1993), die BAEC in einem Parallel-Platten-Viskosimeter Scherstress von 30 dyn/cm^2 aussetzten (Das entspricht unserer Versuchsanordnung.). Über 3 Stunden konnte ein Anstieg von PDGF-B-Ketten beobachtet werden, der nach 6 Stunden sein Maximum erreichte und für 24 Stunden auf diesem Niveau blieb.

Wichtige Ergebnisse erbrachte auch ein Versuch von Nakazawa et al., (2000), die zeigten, dass Thrombozyten und Endothelzellen, die vorher Scherstress ausgesetzt

waren, zusammen mit glatten Muskelzellen (SMC) dazu führten, dass sich die SMCs ausbreiteten, was Thrombozyten und Endothelzellen ohne Scherstressexposition nicht taten. Diese spreitende Aktivität in der ersten Gruppe konnte durch Zugabe von anti-PDGF-Antikörpern unterbunden werden. Diese Versuche beweisen, dass PDGF eine Rolle bezüglich Zellwanderungen und damit der Arterioskleroseentstehung zukommt. Im gleichen Jahr wurde auch ein Artikel veröffentlicht (Palumbo et al., 2000), der sich mit glatten Muskelzellen (SMC) und ihrer Reaktion auf Scherstress beschäftigt. Dabei ist einer Zellkultur mit SMC PDGF-B zugesetzt worden, um sie dann mit Scherstress zu testen. Drei Stunden laminarer Scherstress hatte keinen Effekt auf eine starke SMC-Wanderung und Invasion. Dagegen zeigten sich nach 15 Stunden Scherstress, dass die SMC-Wanderung und Invasion deutlich sinkt, was mit einem Abfall von MMP-2 einherging. Dies ist eine Metalloproteinase, die bei geringem und turbulenten Scherstress ansteigt und darüber mit intimaalem Wachstum assoziiert ist (Bassiouny et al., 1998). Also führt laminarer Scherstress (arterielles Niveau), dem SMC ausgesetzt sind, zu einer Reduktion von Zellwanderung und -invasion trotz PDGF-BB, welches, wie vorher erwähnt, sonst Zellbewegungen bewirkt. Diese Tests sind aber relativ realitätsfern, da glatte Muskelzellen physiologisch gar nicht mit Scherstress in Berührung kommen, es sei denn, eine Intimaverletzung liegt vor, was dann aber sicherlich nicht zu laminarem Scherstress sondern zu oszillativem führen würde, was die Arteriosklerosebildung, wie schon erläutert, verstärkt.

Dazu veröffentlichten Mondy et al., (1997) einen Artikel, der sich auf In Vivo-Versuche mit Ratten bezieht, bei denen die Carotiden operativ einmal sehr hohem ($33,4 \text{ dyn/cm}^2$) und einmal sehr niedrigem ($1,4 \text{ dyn/cm}^2$) Scherstress ausgesetzt waren. Dabei wurde beobachtet, dass die Carotiden mit niedrigem Scherstress einen erhöhten Anstieg der PDGF-Expression hatten im Vergleich zu der Gruppe mit hohem Scherstress. Dieser erreichte sein Maximum nach 48 Stunden und sistierte dann bis 72 Stunden. Demzufolge war auch in der Gruppe mit niedrigem Scherstress die Zellproliferation induziert, bei dem auch das Maximum bei 48 Stunden lag.

Es wird so auch deutlich, dass Hämodynamik in vivo ein komplexes Feld darstellt (Davies, 1995; Ballermann, 1998; Resnick et al., 1995). Das Blutgefäß hat nun einmal viele Abzweigungen und Unregelmäßigkeiten, die in vitro nur schwer nachzubilden sind, und Blut ist eine nicht-newtonsche Flüssigkeit, die ebenso zelluläre Bestandteile

enthält, was wiederum zu anderen Erscheinungen führt als mit der newtonschen Flüssigkeit des Kulturmedium. Ein weiterer wichtiger Faktor ist das abrupte Beginnen aus statischen Bedingungen heraus, die normalerweise so nicht auftreten (außer bei z.B. Bypass-Ops oder der Umstellung des embryonalen Kreislaufs postnatal). Interaktionen mit anderen hämodynamischen Parametern, wie z.B. der Blutdruck, bleiben in vitro unberücksichtigt. Auch bedeuten Verletzungen des Endothels umfassende Dysfunktionen des Blutflusses, die in vitro nur schwer nachzuahmen sind.

Aufgrund dieser Nachteile von in vitro-Versuchen werden immer mehr in vivo-Versuche durchgeführt.

Die Ballon- Angioplastie ist eine bekannte therapeutische Intervention für Stenosen in Gefäßen, die in 30 –50% der Fälle zu Restenosen führt. Als therapeutische Strategie darauf hin versucht man, glatte Muskelzellen zu inhibieren. Es gibt hierfür mehrere Ansätze (siehe auch Kap. 1- Jawien et al., 1992; Sirois et al., 1997) und auch den von Deguchi et al., (1999). Diese brachten in durch Ballon-Angioplastie verletzte Rattenarterien einen Adenovirus-Vektor mit einem verkürzten Gen des PDGF- β -Rezeptors ein. Dieser ist in der Lage, PDGF-BB zu binden, ist also ein funktioneller PDGF-BB-Antagonist. Es konnte so gezeigt werden, dass 14 Tage nach Ballon-Angioplastie bei mit Adenovirus infizierten Ratten 57% weniger Intimawachstum vorlag als in der Vergleichsgruppe (nicht infizierte Ratten). Auch waren das Niveau der Tyrosin-phosphorylierten PDGF- β -Rezeptoren 4 mal niedriger als die der Kontrollgruppe. Es wird davon ausgegangen, dass Scherstresseffekte durch Tyrosinkinase vermittelt sind (Ishida et al., 1997).

Auch mit Kunstgefäßen wurden Tests gemacht, da sie sehr schnell wieder thrombosieren, sich dadurch verschließen und zu neointimaler Hyperplasie führen. So setzte man mit Endothel bewachsene Kunstgefäße ein, was nicht den gewünschten Erfolg brachte, da die Zellen schnell untergingen. Erst Kunstgefäße mit Endothel, das vor Einsatz Scherstress von 25 dyn/cm² ausgesetzt war, zeigte, dass die Zellen zu 98% lebend noch am Ausgangsort waren. Im Gegensatz dazu konnten nur 50 % solcher gesunder Zellen bei 1 dyn/cm² beobachtet werden, was letztendlich nicht zum gewünschten Erfolg führte. Deshalb haben sich diese Implantate schon etabliert (Dardik et al., 1998).

Aus diesen gesamten neuen Forschungsinhalten läßt sich erkennen, dass PDGF und Scherstress in der Arterioskleroserecherche eine wichtige Rolle spielen. Deshalb war es wichtig, Endothelzellen Scherstress auszusetzen, um die Relevanz des Regulationselementes SSRE (shear-stress response element) im PDGF-Promotor nachzuweisen und Aussagen über die Expression von PDGF und der dazu gehörigen Kinetik zu erhalten sowie die Zellen während der Messung zu beobachten und darüber wichtige Zellveränderungen zu erkennen. Dieses Ziel wurde mit der hier dargestellten Arbeit erreicht und diskutiert.

4.4. Weitere Forschungsansätze

Diese stellen sich in der weiteren Ausarbeitung des Zusammenhangs zwischen PDGF-Anstieg und Scherstressintensität dar. So wäre es sinnvoll, auch 4, 15 und 50 dyn/cm² zu messen, um so über die PDGF-Expression bei geringem und hohem Scherstress eine Information zu erhalten. Nachdem laminarer und hoher Scherstress als eher artheroprotektiv beschrieben wurden (Berk et al., 2001), gilt es nun, auch turbulenten Scherstress mit diesem Messsystem zu testen und seine PDGF-Expression zu beobachten.

Spannend ist auch der Punkt, dass Harlan et al., (1986) zeigen konnten, dass Endothelzellen unter Stimulation kleine Mengen PDGF ausschütten können, auch wenn keine Proteinbiosynthese abläuft. Das legt nahe, dass es eventuell auch eine intrazelluläre, inaktive Vorläufer-Form von PDGF gibt. Dies stellt einen weiteren interessanten Ansatz dar, PDGF-Expression auch ohne Scherstress zu erhalten und sollte neue Ansatzpunkte bezüglich der Expressionskinetik bieten. Dahingehend ist auch die Tatsache zu klären, warum der Anstieg des GFPs in unseren Versuchen so schnell verläuft und ob das mit diesen Vorläufer-Formen in Verbindung stehen könnte. Ganz wichtige Versuche werden in Zukunft auch die mit nicht immortalisierten Zellen sein, denn diese enthalten weniger genetische Veränderungen und entsprechen so eher den Zellen in vivo.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PDGF glatte Muskelzellen zur Migration und Invasion anregt und darüber zu Intimawachstum führt, ist es wichtig, nun Hemmstoffe

dagegen zu finden und diese auch in vivo einsetzen zu können. Deshalb ist es notwendig, die Scherstress-vermittelnden Signaltransduktionswege weiter aufzudecken. Interessante Ansatzpunkte dazu zeigen Berk et al., (2001) auf, denn sie stellten fest, dass fluider Scherstress und turbulenter Fluß einen artherogenen Effekt auslösen. Dies scheint auch über Phosphorylierung von JNK (c-Jun N-terminale Kinase) reguliert zu sein.

5. Zusammenfassung

Das Zytokin PDGF stellt einen wichtigen Faktor in der Arteriosklerose-Entwicklung dar. Als Wachstumsfaktor reguliert es eine Vielzahl biologischer Prozesse, z.B. Zelldifferenzierung, -proliferation oder -migration, was eine genaue zelltypspezifische Regulation erfordert. In Gefäßendothelzellen erfolgt die Regulation der PDGF-Expression unter anderem durch den Scherstreß des Blutstroms, der durch ein cis-aktives Element (SSRE) vermittelt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, lebende Endothelzellen auf ihre PDGF-Expression unter Scherstreßbedingungen zu untersuchen und gegebenenfalls eine dazu gehörige Kinetik zu erhalten. Ein weiterer interessanter Punkt stellt die Beobachtung der Zellen während der Messung dar, um so wichtige Veränderungen festzustellen.

EAhy 926-Endothelzellen wurden mit vier verschiedenen Plasmiden stabil transfiziert. Es entstanden so das zu untersuchende Hauptkonstrukt 1,3kb PDGF-EGFP, bei dem das Gen für ein grün fluoreszierendes Protein unter der Kontrolle des PDGF-Promotors steht und somit immer dann exprimiert wird, wenn das PDGF-Gen aktiviert ist. Weiterhin wurde ein Kontrollkonstrukt 1,3kb PDGF (Δ SSRE)-EGFP, bei dem im PDGF-Promotor die vermutlich für die Scherstreßaktivierung verantwortliche Sequenz (SSRE) fehlt, sowie zwei weitere Kontrollkonstrukte mit einem CMV-Promotor, von denen eins das SSRE künstlich inseriert hat, das andere aber nicht, etabliert.

Die Stimulation des PDGF-Promotors mit Phorbol ester bestätigte die Funktionalität der Konstrukte.

Die Messungen mit Scherstreß zeigen, dass PDGF in den Zellen scherstreßabhängig exprimiert wird, welche Konstrukte mit SSRE enthalten. Endothelzellen transfiziert mit Konstrukten ohne SSRE weisen keinen Anstieg der Expression auf. Dies konnte nicht nur in den stabil transfizierten Zellen, sondern auch in transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Damit bestätigt sich die Relevanz des Regulationselementes SSRE im PDGF-Promotor bezüglich seiner Vermittlung zwischen Scherstress und dem Translationsprodukt PDGF. Weiterhin offen bleibt, warum der Anstieg der PDGF-Expression bereits innerhalb von 10 Minuten erfolgt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, stabil transfizierte Endothelzellen mit einem Reporter-gen-Assay zu messen und damit den Einfluß des Scherstress' auf die PDGF-Expression und darüber auch auf die Arteriosklerose zu ermitteln.

6. Literaturverzeichnis

1. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A: Shear stress and the endothelium, *Kidney Int.* 67, 100-108, 1998
2. Bar RS, Boes M, Booth BA, Dake BL, Henley S, Hart MN: The effects of platelet-derived growth factor in cultured microvessel endothelial cells, *Endocrinology* 124, 1841-1848, 1989
3. Bassiouny HS, Song RH, Hong XF et al.: Flow regulation of 72-kD collagenase IV (MMP-2) after experimental arterial injury, *Circulation* 98, 157-163, 1998
4. Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisichat J, Yan C: Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms, *Ann N Y Acad Sci* 947, 93-111, 2001
5. Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, Westermark B, Lind P, Urdea MS, Eddy R, Shows TB, Philpott K, Mellor AL, Knott TJ, Scott J: cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumor cell lines, *Nature* 320, 695-699, 1986
6. Betsholtz C: The PDGF genes and their regulation, edited by B. Westermark and C. Sorg, Basel, Karger 1993, vol. 5, 11-30
7. Billett MA, Adbeish IS, Alrokayan SAH, Bennett AJ, Marenah CB, White DA: Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 399-406, 1996
8. Burnstock G: Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction, *J. Anat.* 194, 335-342, 1999
9. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken, *Science* 268, 233-239, 1995
10. Cunningham LD, Brecher P, Cohen RA: Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta, *J. Clin. Invest.* 89, 878-882, 1992
11. Dardik A, Liu A, Ballermann BJ: Chronic in vitro shear stress stimulates endothelial cell retention on prosthetic vascular grafts and reduces subsequent in vivo neointimal thickness, *J Vasc Surg* 29, 157-167, 1999

12. Davies PF, Remuzzi A, Gordon ES, Dewey CF, Gimbrone MA: Turbulent shear stress induces vascular endothelial turnover in vitro, PNAS USA 83, 2114-2118, 1986
13. Davies PF, Remuzzi A, Gordon ES, Dewey CF, Gimbrone MA: Turbulent shear stress induces vascular endothelial turnover in vitro, PNAS USA 83, 2114-2118, 1986
14. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction, *Physiol. Reviews* 75, 519-560, 1995
15. Deguchi j, Namba T, Hamada H, Nakaoka T, Abe J, Sato O, Miyata T, Makuuchi M, Kurokawa K, Takawa Y: Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury, *Gene Ther* 6, 956-965, 1999
16. Dewey JR CF, Bussolari SR, Gimbrone MA JR, Davies PF: The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *J. Biomech. Eng* 103 (3), 177-185, 1981
17. Dieterich P, Odenthal-Schnittler M, Mrowietz C, Krämer M, Sasse L, Oberleithner H, Schnittler HJ: Quantitative morphodynamics of endothelial cells within confluent cultures in response to fluid shear stress, *Biophys. J.* 79, 1285-1297, 2000
18. Drenckhahn, 2003: Blutgefäße, Ic, Benninghoff- Drenckhahn (Hrsg. D. Drenckhahn), „Anatomie“, 16. Auflage, Urban&Fischer-Verlag
19. Edgell CJ, McDonald C, Graham J: Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization, PNAS 80, 3734-3737, 1983
20. Eng E, Ballermann BJ: Acute arterial shear stress downregulates PDGF-B message in glomerular capillary endothelial cells chronically conditioned to venous shear stress, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1996 (abstract)
21. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R: Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF, *Science* 253, 1129-1132, 1991
22. Fischer WH, Schubert D: Characterization of a novel platelet-derived growth factor-associated protein, *J. Neurochem.* 66, 2213-2216, 1996

23. Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ, Tucker WK, Fry DL: Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular references to hemodynamic events, *Circ. Res.* 30, 23-33, 1972
24. Franke RP, Grafe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D: Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress, *Nature Lond.* 307, 648-650, 1984
25. Fry DL: Atherogenesis: Initiating factors, *Ciba Found. Symp.* 12, 96-118, 1973
26. Giddens DN, Zarins CK, Glagov S: Response of arteries to near-wall fluid dynamic behavior, *Appl. Mech. Rev.* 43, 98-102, 1990
27. Gudi SRP, Clark CB, Frangos JA: Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells, *Circ. Res.* 79, 834-839, 1996
28. Hajjar KA, Hajjar DP, Silverstein RL, Nachman RL: Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells, *J. Exp. Med.* 166, 235-245, 1987
29. Haniu M, Frohde MF, Kenney WC: Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages, *Biochemistry* 32, 2431-2437, 1993
30. Haniu M, Hsieh P, Frohde MF, Kenney WC: Characterization of disulfide linkages in platelet-derived growth factor AA., *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 433-439, 1994
31. Harlan JM, Thompson PJ, Ross R, Bowen-Pope DF: α -thrombin induces release of PDGF-like molecule(s) by cultured human endothelial cells, *J. Cell. Biol.* 103, 1129-1133, 1986
32. Hart IK, Richardson WD, Heldin CH, Westermark B, Raff MC: PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage, *Development* 105, 595-603, 1989
33. Heldin CH, Östman A, Rönstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors, *Biochem. Biophys. Acta* 1378, 79-113, 1998
34. Heldin CH, Östman A: Ligand-induced dimerization of growth factor receptors: variations on the theme, *Cytokines Growth Factor Rev.* 7, 3-10, 1996
35. Heldin CH, Westermark B: Mechanism of Action and in vivo role of platelet-derived growth factor, *Physiological Reviews* Vol.79, No. 4, October 1999

36. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F: Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 78, 225-228, 1989
37. Hogg PJ, Hotchkiss KA, Jimenez BM, Stathakis P, Chesterman CN: Interaction of platelet-derived growth factor with thrombospondin 1, *Biochem. J.* 326, 709-716, 1997
38. Hosang M, Rouge M, Wipf B, Eggimann B, Kaufmann F, Hunziker W: Both homodimeric isoforms of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover, *J. Cell. Physiol.* 140, 558-564, 1989
39. Ishida T, Takahashi M, Corson MA, Berk BC: Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses?, *Ann. N Y Acad. Sci* 811, 12-23, 1997
40. James NL, Harrison DG, Nerem RM: Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP, *FASEB J* 9(10), 968-973, 1995
41. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW: Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty, *J. Clin. Invest.* 89, 507-511, 1992
42. Jin HM, Brady ML, Fahl WE: Identification and characterization of an essential, activating regulatory element of the human SIS/PDGFB promoter in human megakaryocytes, *PNAS USA* 90, 7563-7567, 1993
43. Jou LD, van Tyen R, Berger SA, Saloner D: Calculation of the magnetization distribution for fluid flow in curved vessels, *Magn. Reson. Med.* 35, 577-584, 1996
44. Kanakaraj P, Raj S, Khan SA, Bishayee S: Ligand-induced interaction between α - and β -type platelet-derived growth factor (PDGF) receptors: role of receptor heterodimers in kinase activation, *Biochemistry* 30, 1761-1767, 1991
45. Khachigian LM, Fries JW, Benz MW, Bonthron DT, Collins T: Novel cis-acting elements in the human platelet-derived growth factor B-chain core promoter that mediate gene expression in cultured vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 269, 22647-22656, 1994
46. Khachigian LM, Mann EM, Gimbrone MA, Collins T: Nuclear factor- κ B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear-stress, *J. Clin. Invest* 96, 1169-1175, 1995

47. Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone A, Collins T: Nuclear factor κ B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress, *J. Clin. Invest.* 96, 1169-1175, 1995
48. Kohler N, Lipton A: Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity, *Exp. Cell Res.* 87, 297-301, 1974
49. Lan Q, Mercurius KO, Davies PF: Stimulation of transcription factors NF κ B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress, *Biochem Biophys Res Commun* 201, 950-956, 1994
50. Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma properties of type II alveolar epithelial cells, *Int J Cancer* 17 (1), 62-70, 1976
51. Lustig F, Hoebeke J, Stergren-Lunden G, Velge-Roussel F, Bondjers G, Olsson U, Rüetschi U, Fager G: Alternative splicing determines the binding of platelet-derived growth factor (PDGF-AA) to glycosaminoglycans, *Biochemistry* 35, 12077-12085, 1996
52. Malek AM, Alper SL, Izumo S: Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis, *JAMA* 282, 2035-2042, 1999
53. Malek AM, Izumo S: Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress, *J. Cell. Sci.* 109, 713-726, 1996
54. Malek AM, Izumo S: Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell, *J. of Hypertension* 12, 989-999, 1994
55. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, Fontanelli A, Monici Preti PA, Repetto S, De Servi S, Varani E: Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study, *Circulation* 90, 2710-2715, 1994
56. Masuhr KF, Neumann M: *Neurologie*, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, MLP- Duale Reihe, 1996
57. Matsui T, Heidaran M, Miki T, Toru M, Popescu N, La Rochelle W, Kraus M, Pierce J, Aaronson SA: Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes, *Science* 243, 800-803, 1989

58. McNeil PL: Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress, *Trends Cell. Biol.* 3, 302-307, 1993
59. Mitsumata M, Fishel RS, Nerem RM, Alexander RW, Berk BC: fluid shear stress stimulates platelet- derived growth factor expression in endothelial cells, *AJP- Heart and Circ. Physiol.* 265, 3-8, 1993
60. Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL: Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo, *Circ Res* 81, 320-327, 1997
61. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM: Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site, *PNAS USA* 94, 7192-7197, 1997
62. Murray-Rust J, McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA: Topological similarities in TGF- β 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors, *Structure* 1, 153-159, 1993
63. Nakazawa T, Yasuhara H, Shigematsu K, Shigematsu H: Smooth muscle cell migration by shear-loaded platelets and endothelial cells. Enhanced platelet- derived growth factor production by shear-loaded platelets, *Int. Angiol.* 19, 142-146, 2000
64. Nerem RM, Harrison DG, Taylor WR, Alexander RW: Hemodynamics and vascular endothelial biology, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21, 6-10, 1993
65. Olesen S, Clapham DE, Davies PF: Haemodynamic shear stress activates a K^+ current in vascular endothelial cells, *Nature* 331, 168-170, 1988
66. Östman A, Rall L, Hammacher A, Wormstead MA, Coit D, Valenzuela P, Betsholtz C, Westermarck B, Heldin CH: Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer, *J. Biol. Chem.* 263, 16202-16208, 1988
67. PalumboR, Gaetano C, Melillo G, Toschi E, Remuzzi A, Capogrossi MC: Shear stress downregulation of platelet- derived growth factor receptor β and matrix metalloprotease 2 is associated with inhibition of smooth muscle cell invasion and migration, *Circulation* 102, 225-230, 2000
68. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E: Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo, *Hypertension* 8, 37-44, 1986

69. Pompili VJ, Gordon D, San H, Yang Z, Muller DWM, Nabel GJ, Nabel EG: Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2254-2264, 1995
70. Renz-Polster H, Braun J: *Basislehrbuch Innere Medizin*, 1. überarbeitete Auflage, Urban& Fischer- Verlag, 2000
71. Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Gimbrone MA: Platelet-derived growth factor B-chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress responsive element. *PNAS USA* 90, 4591-4595, 1993
72. Resnick N, Gimbrone A: Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression, *FASEB J.* 9, 874-882, 1995
73. Rifkin DB, Moscatelli B: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor, *J. Cell. Biol.* 109, 1-6, 1989
74. Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker L: A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *PNAS USA* 71, 1207-1210, 1974
75. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362, 801-809, 1993
76. Sachinidis A, Locher R, Hoppe J, Vetter W: The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB, induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms, *FEBS Lett.* 272, 95-98, 1990
77. Scarpati EM, Dicorleto PE: Identification of a thrombin response element in the human platelet-derived growth factor B-chain (c-sis) promoter, *J. Biol. Chem.* 271, 3025-3032, 1996
78. Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D: An improved rheological in vitro system for studying the effect of fluid shear stress on cultured endothelial cells and their adhesion to the substratum, *Am. J. Physiol.* 265: C289-C298, 1993
79. Schwartz G, Callewaert G, Droogmans G, Nilius B: Shear stress-induced calcium transients in endothelial cells from human umbilical cord veins, *J Physiol (Lond)* 458, 527-538, 1992

80. Schwarz K: Kinetik der Transkriptionsvorgänge durch ein scherstreßresponsives Promotorelement (SSRE) in Gefäßendothelzellen unter Verwendung des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) als Reporteragen, Würzburg, 1999
81. Sdougos HP, Bussolari SR, Dewey CF JR: Secondary flow and turbulence in a cone-plate device, *J. Fluid Mech.* 138, 379-404, 1984
82. Sexton AJ, Loesch A, Turmaine M, Miah S, Burnstock G: Electron-microscopic immunolabelling of vasoactive substances in human umbilical endothelial cells and their actions in early and late pregnancy, *Cell and Tissue Research* 284, 167-175, 1996
83. Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B, Heldin CH: Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes and granulocytes, *J. Clin. Invest.* 85, 916-920, 1990
84. Sims JR, Karp S, Ingber DE; Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell. Cytoskeletal and nuclear shape, *J. Cell. Sci.* 103, 1215-1222, 1992
85. Sirois MG, Simons M, Edelman ER: Antisense oligonucleotide inhibition of PDGF- β -receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation* 95, 669-676, 1997
86. Smits A, Hermanson M, Nister M, Karnushina I, Heldin CH, Westermark B, Funa K: Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors, *Growth Factors* 2, 1-8, 1989
87. Somasundaram R, Schuppan D: Type I, II, III, IV, V and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB and AB), *J. Biol. Chem.* 271, 26884-26891, 1996
88. U.-N. Riede, H.-E. Schaefer: „Allgemeine und spezielle Pathologie“, Georg Thieme Verlag, 4.Auflage, 1995
89. Udea M, Becker AE, Kasayuki N, Kojima A, Morita Y, Tanaka S: In situ detection of platelet-derived growth factor A- and B chain mRNA in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty, *Am. J. Pathol.* 149, 831-843, 1996

90. Vassbotn FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H: Negative feedback regulation of human platelets via autocrine activation of the platelet-derived growth factor α -receptor, *J. Biol. Chem* 269, 13874-13879, 1994
91. Virchow R: *Cellular Pathology as based upon physiological and pathological histology*, translated from the German by Clance F, London, Churchill, 1860
92. Wang N, Butler JP, Ingber DE: Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton, *Science Wash. DC* 260, 1124-1127, 1993
93. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon D: Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization, *J. Clin. Invest* 82, 1134-1143 1988
94. Wong AJ, Pollard TD, Hermann IM: Actin-filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo, *Science Wash. DC* 219, 867-869, 1983

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	<u>A</u> denosin <u>tr</u> iphosphat
BAEC	bovine aortal endothelial cells
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMV	Cytomegalie-Virus
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EAhy 926	Endothelzelllinie
ECV 304	Urothelzelllinie
EDTA	Ethylendiamin,N,N,N,N`-tetraessigsäure
EGFP	verstärktes grünfluoreszierendes Protein
f.c.	Endkonzentration
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HDL	high density lipoprotein
HDMEC	humane (dermale) mikrovaskuläre Endothelzellen
ICAM	intercellular adhesion molecule
Kap.	Kapitel
kb	kilo-Basen
kDa	kilo-Dalton
LDL	low density lipoprotein
mRNA	messenger- RNA
NCS	newborn calf serum
NFκB	Nuklear factor κ B
NGF	neural growth factor

NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
rpm	revolutions per minute
SSRE	scherstreßresponsives Promotorelement
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGF	transforming growth factor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat
tPA	tissue plasminogene activator
U	Units
u.a.	und andere
UV	ultraviolettes Licht
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Drenckhahn danke ich für die Überlassung des Themas, für seine konstruktiven Ideen und Vorschläge sowie die gute und unkomplizierte Betreuung.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Michael Zeller, der mir nicht nur die Grundtechniken der Zellkultur beibrachte, sondern mich in der Durchführung der Scherstressexperimente unterwies und mir in wichtigen Fragen der Auswertung und technischer Probleme half.

Frau Agnes Weth möchte ich für die unzähligen Stunden in der Zellkultur sowie die vielen aufbauenden und unterstützenden Worte danken.

Weiterhin schulde ich Herrn Dr. S. Hübner Dank, da er mir bei den anfänglichen Transfektionen und Selektionierungen der Zellen behilflich war.

Auch möchte ich Herrn Chris Bahr erwähnen, der mir vielfach mit Rat und Tat zur Seite stand.

Fast zum Verzweifeln brachte mich manchmal der Computer. Doch es gab immer eine Rettung, weshalb ich Herrn Gunnar Surber ganz sehr danken möchte.

Frau Katzschmann danke ich für ihre schnelle und unbürokratische Hilfe bei den ganz alltäglichen Problemen. Den medizinisch technischen Assistentinnen des Labors gilt mein Dank besonders bezüglich des Erlernens einzelner Methoden der Zellkultur und Molekularbiologie.

Zum Abschluß möchte ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Mann, danken, die mir außerhalb des Labors immer wieder Mut und Unterstützung zusprach.

Tabellarischer Lebenslauf

von Katharina Hamm
Scheffelstr. 19

68723- Schwetzingen
Tel: 06202/5779652

10.04.1979	Geburt als 1. Tochter der Eltern Dr. med. Christine Hamm, Zahnärztin, und Privatdozent Dr. med. habil. Klaus-Detlef Hamm, Neurochirurg, in Erfurt
Herbst 1986	Einschulung in die damalige POS 55
Herbst 1991	Besuch des J.W.Häßler-Gymnasiums
Herbst 1994	Wechsel an das Gutenberg-Gymnasium
Sommer 1998	Abitur
WS 1998/99 bis SS 2002	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität, Würzburg
14.09.2000	Physikum
ab SS 2001	Dissertationsarbeit am Anatomischen Institut der Universität Würzburg, Lehrstuhl II Prof. Dr. Drenckhahn
28.08.2001	1. Staatsexamen
WS 2002 bis WS 2004	Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Fakultät für Klinische Medizin, Mannheim
08.09.2003	2. Staatsexamen
19.11.2004	3. Staatsexamen
26.11.2004	Approbation