

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Detlev Drenckhahn

**Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration
in Gefäßendothelzellen
unter rheologischer Beanspruchung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Frank Dziewior
aus Frankfurt am Main

Würzburg, Juni 2001

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2001

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Das Endothel und seine Aufgaben.....	1
1.2 Zytoskelett und Zellkontakte.....	2
1.3 Reaktionen des Endothels auf mechanische Beanspruchung.....	3
1.4 Stressvermittelte Signalwege in Endothelzellen.....	5
2. <u>Fragestellung</u>	7
3. <u>Material- und Geräteverzeichnis</u>	8
3.1 Präparation von Endothelzellen und Zellkultur.....	8
3.1.1 Medium für PPAEC.....	8
3.1.2 Medium für MyEnd.....	8
3.1.3 Plastikartikel.....	8
3.1.4 Enzyme.....	8
3.1.5 Weitere Materialien und Geräte.....	8
3.2 Immunhistochemie.....	9
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	9
3.2.2 Puffer.....	9
3.2.3 Fixierungsreagenz.....	9
3.2.4 Detergenz zum Permeabilisieren.....	9
3.3 Geräte am Messplatz.....	9
3.4 Reagenzien am Messplatz.....	10
3.4.1 Schermedium.....	10
3.4.2 Fluoreszenzfarbstoff Fura 2.....	10
3.4.3 Zellstimulantien.....	10
4. <u>Methoden</u>	11
4.1 Zellkultur.....	11
4.1.1 Präparation von Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins	11
4.1.2 Mikrovaskuläre myokardiale Endothelzellen (MyEnd).....	11
4.1.3 Aussaat von Endothelzellen.....	12
4.1.4 Beschichtung von Deckgläsern.....	12
4.2 Immunhistochemie (indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung des filamentären Aktinnetzes).....	12
4.3 Calciummessung mit Fura 2.....	13

5. <u>Aufbau des Experimentierplatzes und Ergebnisse</u>	16
5.1 Aufbau des Systems.....	16
5.1.1 Strömungskammer.....	16
5.1.2 Untersuchungssystem.....	18
5.2 Überprüfung der Kammerfunktion an kultivierten Endothelzellen.....	19
5.3 Calciummessung nach Applikation von physiologischen Endothelzellstimuli und Calciumionophoren.....	21
5.4 Calciummessung unter rheologischer Beanspruchung von Endothelzellen.....	26
5.4.1 MyEnd-Zellen unter rheologischer Beanspruchung.....	26
5.4.2 Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins (PPAEC) unter rheologischer Beanspruchung	28
6. <u>Diskussion</u>	32
6.1 Ein System zur Calciummessung in Echtzeit unter physiologischen Bedingungen.	32
6.1.1 Eignung des Systems zur Messung von Calciumantworten auf rheologische Beanspruchung.....	32
6.1.2 Veränderungen der endothelialen Zellmorphologie unter rheologischer Beanspruchung.....	34
6.2 Führt rheologische Beanspruchung zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in Endothelzellen?.....	34
7. <u>Zusammenfassung</u>	38
8. <u>Literaturverzeichnis</u>	39

1. Einleitung

1.1 Das Endothel und seine Aufgaben

Endothelzellen bedecken als innerste Zellschicht die Oberfläche des gesamten Blutgefäßsystems sowie des Herzens und bilden so eine mechanische und metabolische Barriere zwischen zirkulierendem Blut und umgebendem Gewebe. Das Endothel beeinflusst mit einer Vielfalt von Molekülen die Hämostase und die Hämodynamik und ist im Gegenzug in der Lage, auf Transmitter der Umgebung zu reagieren. So haben Endothelzellen entscheidenden Anteil an der Aktivierung der Blutgerinnung durch Synthese von Gerinnungsfaktor V und dem von-Willebrand-Faktor. Dieser wird aus spezialisierten Sekretgranula, Weibel-Palade-Körperchen, in die Basalmembran der Endothelzellen und in den Blutstrom abgegeben, wo er sich mit Gerinnungsfaktor VIII zu einem funktionellen Komplex verbindet. Auf der anderen Seite werden antithrombotisch wirksame Substanzen wie Heparansulfatproteoglykan, Thrombomodulin, Nexin und Plasminogenaktivatoren bereitgestellt. Das Endothel ist auch an der Regulation der Durchblutung beteiligt. Es produziert die gefäßverengenden Substanzen Angiotensin-Converting-Enzym und Endothelin, ein sehr potentes vasokonstriktorisches Peptid, sowie gefäßerweiternde Faktoren und Aktivitäten wie Stickstoffmonoxid und Angiotensinase. Ausserdem ist das Endothel an der Aussprossung bei der Bildung neuer Kapillaren beteiligt (Angiogenese) und produziert Wachstumsfaktoren wie den Platelet Derived Growth Factor.

Obwohl die Endothelzellen eine Kompartimentierungs- und Barrierefunktion ausüben und durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind, bilden sie doch keine vollkommen undurchlässige Schranke. Bei Entzündungen können die Zell-Zell-Kontakte geöffnet und dadurch die Permeabilität der Endothelbarriere um ein Vielfaches gesteigert werden. Makromoleküle des Blutes und sogar Zellen können durch die geöffneten Interzellularspalten in das umgebende Gewebe gelangen (Schnittler et al 1990, Drenckhahn 1994). Die an der Endothelzelloberfläche existierenden Invaginationen, Caveolae, die sich als intrazelluläre Vesikelketten fortsetzen und zu transendothelialen Kanälen verschmelzen können wurden dabei lange als Durchtrittspforte für hochmolekulare Stoffe postuliert. Entgegen früherer Annahme sind sie aber offenbar nur für die Transzytose sehr weniger Proteine von Bedeutung. Dagegen dürften Lücken in der Zonula occludens und aktive Öffnungsmechanismen der Interzellularspalten eine größere Rolle spielen. Für den Durchtritt von Zellen durch das Endothel besitzen die Endothelzellen eine Reihe spezifischer Membranproteine wie die zuckerbindenden Selektine E- und P-Selektin und die Integrin-

bindenden Membranproteine ICAM und VCAM, welche Lymphozyten und Monozyten als Anheftungsmoleküle dienen und die anschließende Migration in das umliegende Gewebe ermöglichen.

Aufgrund der Vielzahl an Aufgaben und mechanischen Belastungen, die eine Endothelzelle zu bewältigen hat, ist eine Anpassungsfähigkeit ihres Zellstoffwechsels und ihrer Zellmorphologie an unterschiedliche Umgebungsbedingungen unabdingbar. Diese morphologische Wandlungsfähigkeit gewährleistet die Endothelzelle durch ein ausgeprägtes System von kontraktile und stützenden Faserbündeln, den Aktin- und Myosinfilamenten sowie Intermediärfilamenten.

1.2 Zytoskelett und Zellkontakte

Um der hohen mechanischen Beanspruchung durch die Scherkräfte des Blutstromes standzuhalten besitzen Endothelzellen ein ausgeprägtes Filamentsystem. Das Zytoskelett besteht aus Aktin- und Myosinfilamenten, die einen Anteil von bis zu 16 % des Gesamtproteins der Zellen ausmachen können im Verhältnis Aktinmonomer : Myosindimer = 16,3 : 1 (Schnittler et al 1990). Dieser für Nichtmuskelzellen hohe Wert unterstreicht die Bedeutung des Filamentsystems für die Möglichkeit der aktiven Verformung, der Erhaltung der Integrität sowie des Ablaufs von Transportvorgängen. Desweiteren kommen Intermediärfilamente vom Vimentin-Typ und Mikrotubuli vor. Das Verteilungsmuster der Filamente innerhalb der Endothelzelle ist keinesfalls starr, sondern abhängig vom Vorhandensein bzw. Art und Richtung wirkender Scherkräfte des Blutstromes. Zellen die keiner oder nur sehr geringer hämodynamischer Beanspruchung ausgesetzt sind, weisen ein in der Peripherie die gesamte Zirkumferenz der Zelle umspannendes Aktinnetz auf. Bei Zellen, auf die starke Scherkräfte wirken oder die sich im Rahmen von Reendothelialisierung in einem Migrationsvorgang oder Mitoseaktivität befinden, lässt sich das periphere Netzwerk aus Aktinfilamenten nur in sehr geringem Ausmaß beobachten. Hier ordnet sich das Aktin zu langen, kräftigen Filamentbündeln, den Stressfasern an. Diese ziehen annähernd parallel durch das Zentrum der Endothelzelle und sind in Längsrichtung zur wirkenden Kraft orientiert (Drenckhahn 1983, Gabbiani et al 1983, Wong et al 1983, Kim et al 1989, Gotlieb 1990, Langille et al 1991, Colangelo et al 1994, Drenckhahn und Ness 1997). Zudem existieren kortikale Aktinfilamente unter der luminalen Plasmamembran, die sich unmittelbar nach Applikation einer Scherkraft bündeln und der luminalen Zellmembran Steifigkeit gegenüber deformierenden Kräften verleihen (Sato et al 1987). Das Filamentsystem ist durch

Fokalkontakte und Adhaerens-Kontakte an der Plasmamembran verankert. Mit Hilfe der Fokalkontakte findet die Zelle Halt in der Basallamina. Sie enthalten Aggregate von transmembranären Integrinen und zytoplasmatischen Adaptorproteinen und Signalproteinen wie p125^{FAK}, Tensin, Paxillin, Talin, Zyxin, alpha-Actinin und Vinculin, die einerseits mit Hilfe von Ankerproteinen in der extrazellulären Matrix festhalten, auf der anderen Seite durch zytoplasmatische Proteine mit dem Aktinfilamentsystem der Endothelzelle verbunden sind (Davies 1995). Die Zonula adhaerens befindet sich in der lateralen Membran und übernimmt mechanische Funktionen. Sie besteht aus Adhäsionsproteinen (VE-Cadherin), die mit peripheren intrazellulären Proteinen, den Plaqueproteinen (Vinculin, α -Actinin, Plakoglobin, α -Catenin, β -Catenin), verbunden sind. Weiterhin existiert auf der zytoplasmatischen Seite der Zonula ein Aktinfilamentbündel, das in Endothelzellen auch Myosinmoleküle enthält und somit kontraktile Eigenschaften besitzt. So spielt die Zonula adhaerens auch eine Rolle bei der Regulation der Permeabilität des Endothels. Durch Zug der kontraktile Elemente an den Zell-Zell-Kontakten können durch Endothelzellen aktiv Interzellularspalten geöffnet werden (Schnittler et al 1990, Drenckhahn und Ness 1997). Das Netzwerk aus Aktinfilamenten mit seinen vielen Anheftungsstellen in der Plasmamembran und die Möglichkeit der Anpassung dieses Zellgerüsts an veränderte Hämodynamik gestatten es den Endothelzellen, ihre strukturelle Integrität zu wahren und ggf. entstandene Defekte durch Reendothelialisierung zu schließen.

1.3 Reaktionen des Endothels auf mechanische Beanspruchung

Endothelzellen sind in der arteriellen Strombahn - stärker als im venösen Schenkel - permanenten hydrodynamischen Kräften ausgesetzt, die bezüglich ihrer Angriffsrichtung grundsätzlich in zwei Vektoren aufgelöst werden können. Die eine Kraft greift senkrecht zur Gefäßwand an und entspricht dem Blutdruck, die andere wirkt parallel zur Wand als Schubspannung (Scherstress) und wird rheologisch erzeugt durch das vorbeiströmende Blut (Davies 1995).

Die Zellen reagieren in mannigfaltiger Weise auf einsetzende rheologische Beanspruchung. Ob es dabei zu einer Zellantwort kommt, hängt in erster Linie von der Stärke der Schubspannung, die in der Einheit dyn/cm^2 angegeben wird und von der Dauer der Applikation ab (Davies 1995). Im folgenden sind die wichtigsten Reaktionen aufgeführt.

In vivo und in vitro ließ sich beobachten, daß rheologischer Beanspruchung ausgesetzte Zellen in Abhängigkeit von der Dauer und der Intensität der applizierten Kraft eine Veränderung ihrer Gestalt erfahren.

In konfluenten Endothelzellrasen ließ sich nach Applikation von laminarem Scherstress eine Ausrichtung der Zellen in Flußrichtung ohne verstärkte Zellteilungsaktivität beobachten (Davies et al 1986). Es wurde festgestellt, daß die Zellen dabei eine Verlängerung ihrer Längsachse in Flußrichtung erfahren und sich von einer polygonalen in eine ellipsoide Form umwandeln, ohne dabei Schaden zu nehmen (Langille et al 1981, Dewey Jr et al 1981, Eskin et al 1984, Levesque et al 1986, Levesque et al 1989). Es konnte eine signifikante Häufung von Zellen gesehen werden, die unter laminarer Scherstresseinwirkung eine Verlagerung von Mikrotubulus-Organisationszentrum und Golgi-Apparat stromaufwärts aufwiesen (Coan et al 1993). Die Neuorientierung von F-Aktin im Gefäßendothel ist eine Reaktion, die von Dauer und Stärke der Scherkraft abhängt. Während bei Kontrollzellen nach einer Rhodamin-Phalloidin-Färbung das filamentäre Aktin (F-Aktin) hauptsächlich als peripheres Netzwerk mit nur wenigen und dünnen zentralen Filamenten sichtbar war, wurden nach Scherstressapplikation in Flußrichtung orientierte zentrale Stressfaserbündel sichtbar, die mit verlängerter Scherdauer noch zunahmen und sich auf Kosten des peripheren Aktinnetzes bildeten - dieses konnte erst 24 Stunden nach Beendigung der Scherstresseinwirkung wieder in ursprünglicher Intensität beobachtet werden (Ookawa et al 1992). Die Untersuchung zu verschiedenen Zeitpunkten machte deutlich, daß sich die meisten zentralen Stressfasern zwischen der ersten und zweiten Stunde der rheologischen Exposition gebildet hatten (Franke et al 1984). Endothelzellen, die vorher mit Cytochalasin B zur Verhinderung der Bildung von Stressfasern behandelt wurden, konnten einer Scherstressbeanspruchung nicht standhalten und es entstand ein beträchtlicher Zellverlust. Nach Unterdrückung der Tubulin-Polymerisation konnte allerdings kein Verlust von Zellen beobachtet werden, so daß nicht die Mikrotubuli sondern die Ausbildung von Stressfasern der entscheidende Faktor bei der Erhaltung der Integrität der Endothelzellschicht zu sein scheint (Wechezak et al 1989). Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, daß das Endothel durch die Reduktion von Unebenheiten in der luminalen Zellmembran in der Lage ist, den an der Zelloberfläche wirkenden Scherstressgradienten zu reduzieren. Diese Unebenheiten waren nach 24 dyn/cm² über 12 Stunden von +3,4/-0,7 µm auf +1,8/-0,5 µm zurückgegangen, wobei die verbliebenen Undulationen an der Zelloberfläche in Flußrichtung ausgerichtet waren und die Insertionsstellen der Stressfaserbündel in die Zellmembran darstellten (Barbee et al 1994). Eine Aktivierung nonselektiver Kationenkanäle in Form einer Steigerung der Öffnungsfrequenz

der Kanäle konnte bei mechanischer Stimulation von Endothelzellen gezeigt werden (Lansman et al 1987). Bei Scherstressbeanspruchung kommt es zu einer verstärkten Expression und Synthese von Stickoxid (NO) sowie zu einer leichten Reduzierung der Expression von Endothelin-1 und damit zu einer stressvermittelten Vasodilatation (Nishida et al 1992, Noris et al 1995, Uematsu et al 1995). Im Gegensatz zu glatten Muskelzellen läßt sich am Gefäßendothel durch Scherstressapplikation eine mehrfach reproduzierbare ATP-Freisetzung beobachten (Milner et al 1990, Bodin et al 1991), Substanz P wird unter hohen Flußraten ins Gefäßbett abgegeben (Ralevic et al 1990) und eine Freisetzung von Acetylcholin läßt sich inkonstant auslösen (Milner et al 1990).

1.4 Stressvermittelte Signalwege in Gefäßendothelzellen

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, reagieren Endothelzellen in vielfältiger Weise auf mechanische Beanspruchung. Bezüglich der dafür verantwortlichen Rezeptoren und der intrazellulären Signaltransduktion existieren verschiedene Hypothesen, die nachfolgend kurz skizziert werden sollen.

Die Plasmamembran der Endothelzellen scheint an der Signalaufnahme beteiligt zu sein. Sie weist eine ausgeprägte Glykocalix aus kohlenhydratreichen Glykoproteinen auf, bei denen es sich zu einem großen Teil um Rezeptoren oder mit Rezeptoren assoziierte Membranproteine handelt. Diese Membranproteine sind potentielle Kandidaten für die Umsetzung von mechanischer Stimulation in einen intrazellulären Signalweg. Es kommen dafür zwei Mechanismen in Betracht. Die Glykocalix ragt mit ihrem Saum in den Flüssigkeitsstrom, was zu einer physikalischen Delokation von Proteinen innerhalb der Plasmamembran führen und eine Zellantwort provozieren könnte. In dieser wenig bewegten Flüssigkeitsschicht direkt an der luminalen Zelloberfläche existieren ausserdem von der Zelle sezernierte oder aus dem Plasma stammende Transmitterstoffe in von der sonstigen Umgebung abweichender Konzentration. Flußbedingte Konzentrationsänderungen in diesem Milieu könnten Signalwege in Zellen beeinflussen (Dull et al 1991, Dull et al 1992, Nollert et al 1992, Shen et al 1993). Membranproteine sind weiterhin daran beteiligt, den aufgenommenen mechanischen Reiz passiv über das Zytoskelett in andere Zellregionen weiterzuleiten und dort eine Antwort hervorzurufen. Hier müssen alle möglichen Kontaktpunkte zwischen Filamentsystem und Membranproteinen in Betracht gezogen werden, wie Interzellularkontakte, Fokalkontakte an der abluminalen Zelloberfläche, die Kernmembran und die luminalen Zelloberfläche (Burrige et al 1988, Pienta et al 1992).

Insgesamt sind die intrazellulären Signalmechanismen, die der Zelle einen Umbau ihres stützenden und kontraktilen Filamentsystems und somit den Erhalt ihrer strukturellen Integrität bei rheologischer Beanspruchung gestatten, bisher noch weitgehend unklar. In jüngster Zeit fokussierte sich das Interesse auf die mögliche Beteiligung von Calcium als intrazellulärem Botenstoff. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen beschäftigte sich mit der Frage, ob Endothelzellen Scherstressbeanspruchung mit einer Elevation der zytosolischen Calciumkonzentration beantworten und kam dabei zu teilweise sehr stark divergierenden Ergebnissen. Vor diesem Hintergrund erschien es interessant, einen Messplatz zur Beobachtung der intrazellulären Calciumkonzentration unter rheologischer Beanspruchung zu etablieren und die Rolle von Calcium in der endothelialen Signaltransduktion näher zu untersuchen.

2. Fragestellung

Die den Zellstoffwechsel und das Zytoskelett betreffenden Adaptationsvorgänge in Gefäßendothelzellen unter mechanischer Beanspruchung sowie deren intrazelluläre Vermittlung sind von besonderem klinischen Interesse, da Gefäßwandschäden eine entscheidende pathogenetische Relevanz bei der Entstehung vaskulärer Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose zukommt (Ross 1997).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der Konstruktion und der Etablierung eines Messplatzes mit einer Flusskammer zur rheologischen Beeinflussung von kultivierten Endothelzellen, der es erlaubt, zytoskelettale Umbauvorgänge durch Scherstressapplikation zu induzieren und über ein Mikroskop mit angeschlossener Photonenkamera während der rheologischen Beanspruchung Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration durchzuführen. Mit diesem System sollte im Anschluß untersucht werden, ob Endothelzellen auf eine Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress mit einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration reagieren. Solche Calciumantworten würden Hinweise auf die Frage geben, ob Calcium an der Signaltransduktion bei der Beantwortung rheologischer Stimuli im Gefäßendothel beteiligt ist.

3. Material- und Geräteverzeichnis

3.1 Präparation von Endothelzellen und Zellkultur

3.1.1 Medium für PPAEC

M199 Kulturmedium von Gibco BRL (Medium 199 mit Earle-Salzen, ohne L-Glutamin, ohne Natriumhydrogencarbonat), fertige Pulvermischung in 5 l Ampuwa lösen, mit 11 g Natriumhydrogencarbonat versetzen und sterilfiltrieren.

Vor Gebrauch 10 % FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin),
10 ml Glutamin (200 mM, Biochrom, Berlin)/500ml Kulturmedium,
50 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe) und
50 U/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) zugeben.

3.1.2 Medium für MyEnd

DMEM Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Karlsruhe) mit
Natrium-Pyruvat (110 mg/l)

10 % FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin)

50 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe)

50 U/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)

3.1.3 Plastikartikel

Petrischalen, 30 mm Durchmesser (Greiner, Nürtingen)

Gewebekulturflaschen mit 25cm²/75 cm² Wachstumsfläche (T₂₅/T₇₅) (Greiner, Nürtingen)

3.1.4 Enzyme

Trypsin 0,05 % in PBS gelöst (Serva, Heidelberg)

Kollagenase 1 mg/ml in PBS gelöst (Boehringer, Mannheim)

3.1.5 Weitere Materialien und Geräte

Deckgläser rund, 22 mm Durchmesser (Hartenstein, Würzburg)

Objektträger 76 x 26 x 1 mm (Marienfeld, Deutschland)

20 %ige Glutaraldehydlösung (GLA) (Roth, Karlsruhe) zum Quervernetzen der Deckgläser

Gelatinepulver 0,5 % in H₂O (Sigma, München)

Brutschrank: B 5060 EC-CO₂ (Heraeus, Hanau)

Zentrifugen: 5417R / 5415C (Eppendorf, Hamburg)

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Phalloidin markiert mit TRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) (Sigma, München)

3.2.2 Puffer

PBS, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit pH = 7,3

137,00 mM NaCl

2,68 mM KCl

6,50 mM Na₂HPO₄

1,50 mM KH₂PO₄

3.2.3 Fixierungsreagenz

zur Zellfixation: 2%ige Lösung von Formaldehyd in PBS frisch hergestellt aus Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg)

3.2.4 Detergenz zum Permeabilisieren

Triton X-100 0,15%ig in PBS (Sigma, München)

3.3 Geräte am Messplatz

Flusskammer (Institutswerkstatt)

Image Intensifier, ARGUS-50 Image Processor (Hamamatsu)

Filterwechsler Lambda 10-2 (Wechsler für optische Filter, Sutter Instrument Company)

ICCD-Photonenkamera C 2400 (Hamamatsu)

Mikroskope: Fluoreszenz (Zeiss)

Invers Axiovert 135 TV (Zeiss/Olympus)

Rollenpumpe BV-GES (Istatec, Zürich)

Heizwasserbad TD (Lauda, Lauda-Königshofen)

Fluoreszenzlampe VXHC 75/100 W (Zeiss)

Steuerungscomputer mit Monitoren

Verschiedene Glaswaren (Bechergläser, Erlenmeyerkolben), Schlauchverbindungen und Adapter (Fa. Hartenstein, Würzburg)

Silikongel Baysilone-Paste, mittelviskös (Bayer, Leverkusen)

3.4 Reagenzien am Messplatz

3.4.1 Medium zur Überströmung der Zellen bei Scherstressexperimenten

NaCl 122,5 mmol/l

KCl 5,4 mmol/l

CaCl₂ 1,2 mmol/l

MgCl₂ 0,8 mmol/l

Glucose 5,5 mmol/l

Hepes 10,0 mmol/l

gelöst in Ampuwa, titriert mit NaOH und HCl auf pH 7,4 bei 37°C

3.4.2 Fluoreszenzfarbstoff Fura 2

Fura 2-AM, zellpermeable Esterform des Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2 (Sigma, München)

3.4.3 Zellstimulantien:

Thapsigargin (Sigma, München)

A23187 (Sigma, München)

ATP (Sigma, München)

Thrombin (Sigma, München)

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Präparation von Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins (PPAEC)

Ein Teil der Versuche wurde mit Primärkulturen aus Endothel des Truncus pulmonalis des Hausschweins durchgeführt. Zu deren Gewinnung wurde der Truncus pulmonalis noch im Schlachthof unmittelbar nach dessen Abgang aus dem rechten Ventrikel und oberhalb der Bifurcatio abgesetzt und für den Transport in einem sterilen Glasbehälter auf Eis gelagert. Bei der Weiterverarbeitung unter der Sterilbank wurde das Blutgefäß zunächst mit PBS gespült, an einer Seite mit einer Klemme verschlossen und die entstehende Tasche mit ca. 3 ml Kollagenase (1 mg/ml) in PBS gefüllt. Die andere Öffnung wurde mit einer weiteren Klemme verschlossen und die Arterie für 15 Minuten in 37°C warmem PBS inkubiert. Durch vorsichtiges Massieren des Gefäßes konnten noch nicht von der Gefäßwand dissoziierte Endothelzellen gelöst werden. Die Kollagenase-Zellsuspension wurde mittels einer Spritze abgesaugt, die Gefäßwände mit insgesamt 10 ml M199-Kulturmedium nachgespült und die gesamte Suspension 10 Minuten bei 500 g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in M199 Kulturmedium resuspendiert und in mit Gelatine beschichtete T-25-Gewebekulturflaschen ausgesät. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel, wobei nicht adhaerente, im Medium schwimmende Zellen entfernt wurden. Das Medium wurde im Verlauf alle zwei Tage gewechselt. Eine Woche nach Präparation erhielt man einen konfluenten Zellrasen. Für die Experimente wurden Zellen der ersten und zweiten Passage verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert.

4.1.2 Mikrovaskuläre myokardiale Endothelzellen (MyEnd)

Die MyEnd-Zell-Linie wurde von der Arbeitsgruppe Golenhofen erhalten. Die Zell-Linie wurde aus mikrovaskulären myokardialen Endothelzellen durch Transfektion mit dem Polyoma mittleren T-Antigen hergestellt (Golenhofen und Drenckhahn 1999). MyEnd-Zellen sind positiv für verschiedene Endothelzellmarker wie z.B. von-Willebrand-Faktor und VE-Cadherin. Morphologisch sind sie gekennzeichnet durch die für mikrovaskuläre Endothelzellen typische langgestreckte Zellform. MyEnd-Zellen wurden in DMEM

Kulturmedium kultiviert, einmal pro Woche im Verhältnis 1:3 neu ausgesät und in Passage 10-20 für die Experimente verwendet.

4.1.3 Aussaat von Endothelzellen

Nach kurzer Spülung mit PBS zur Entfernung restlichen Kulturmediums wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin 0,05 % in PBS inkubiert. Nach ca. zweiminütiger Einwirkzeit wurden die Zellen durch Beklopfen der Kulturflasche vom Boden gelöst und durch Zugabe von M199 Kulturmedium in Suspension gebracht und anschließend in neue, gelatinebeschichtete Gewebekulturflaschen oder auf Glasträger für die Experimente ausgesät. Die Zellen wurden dabei im Verhältnis 1:1 bis 1:3 verdünnt und bildeten nach 2-3 Tagen einen konfluenten Zellrasen.

4.1.4 Beschichtung von Deckgläsern

Frische und saubere Deckgläser wurden für eine halbe Stunde mit steriler 0,5%-iger Gelatine in PBS benetzt. Nach Absaugen der Gelatine wurden die Gläser für eine weitere halbe Stunde mit 2% Glutaraldehyd in PBS zum Quervernetzen der Gelatine bedeckt. Die Deckgläser wurden ausgiebig mit PBS gespült und in Petrischalen mit Antibiotikum (Penicillin 150 U/ml und Streptomycin 150 µg/ml) gelagert. Es ist zu beachten, daß die frisch gelatinierten Deckgläser mindestens 24 Stunden vor Gebrauch gelagert sein sollten, damit Reste des zytotoxischen Glutaraldehyds aus der Gelatine diffundieren können.

4.2 Immunhistochemie (Indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung des filamentären Aktinnetzes)

Endothelzellen wurden mit PBS gespült und anschließend mit 2 % Formaldehyd in PBS 10 Minuten fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gespült und zur Permeabilisierung der Zellmembran für ca. 5 Minuten mit 0,1 % Triton X-100 in PBS bedeckt. Dieser Schritt ist notwendig, um es später dem Antikörper zu ermöglichen, mit intrazellulären Strukturen in Kontakt zu treten. Nach Spülung mit PBS wurden die Endothelzellen nun mit 20 µl Phalloidin-Rhodamin-Lösung (10µg/ml) für ca. 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Phalloidin ist ein bicyclisches Heptapeptid des grünen

Knollenblätterpilzes, *Amanita phalloides*, das spezifisch an filamentäres Aktin (F-Aktin) bindet. An das Phalloidin ist mit einer kovalenten Bindung der Farbstoff TRITC, Tetramethylrhodaminisothiocyanat, geknüpft, der mit 542 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 563 nm detektiert wurde.

Die Zellen wurden abschließend zur Verhinderung von Austrocknung mit 60 % Glycerin in PBS eingedeckt, dem 1,5% n-Propylgallat als Schutzmittel zur Reduktion der Ausbleichung von TRITC zugeführt wurde.

4.3 Calciummessung mit Fura 2

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura 2 leitet sich vom Salicylaldehydderivat XXV ab, das in acht Stufen aus p-Hydrochinon synthetisiert wird. Er ist ein sehr selektiver Indikator für Calciumionen. Fura 2 bindet zwar u.a. auch andere divalente Kationen (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} und Fe^{2+}), der Fluoreszenzeffekt ist jedoch vergleichsweise sehr gering und die Affinitäten von Fura 2 sind gegenüber diesen Ionen deutlich geringer als bei verwandten Farbstoffen (Grynkiewicz et al 1985). Fura 2 permeiert in veresterter Form die Zellmembran, wobei in der Zelle die Estergruppe hydrolytisch abgespalten wird. Verbindet sich der Farbstoff mit Calciumionen, beginnt er zu fluoreszieren. Fura 2 bietet dem Experimentator dabei den Vorteil, daß es aufgrund seiner charakteristischen, von der Anregungswellenlänge abhängigen Leuchtintensität eine quantifizierbare Messung erlaubt. Die Calciumkonzentration in der Zelle kann unabhängig von der Gesamtmenge des aufgenommenen Farbstoffes, der Wegstrecke des Lichts oder der Sensitivität der Messinstrumente ermittelt werden. Grund hierfür ist, daß sich bei Fura 2 das Emissionsmaximum in Abhängigkeit von der Calciumbindung zu einer anderen Anregungswellenlänge verschiebt. Dies ist in Abbildung 1 veranschaulicht. In den hier durchgeführten Experimenten wurden zur Detektion der intrazellulären Calciumkonzentration die Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm verwendet.

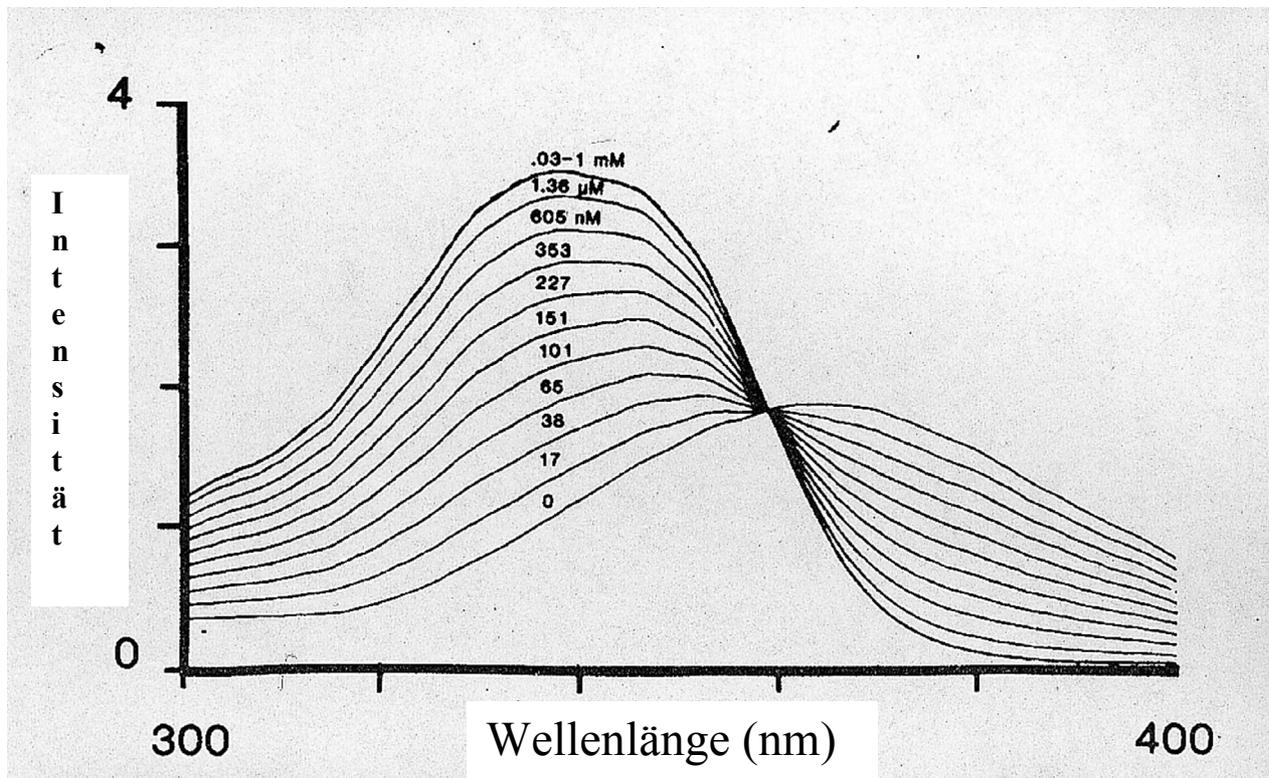


Abbildung 1: Exzitiationsspektren von 1 μM Fura 2 bei 20 °C in Puffern mit Werten freien Calciums zwischen 0 und 1 mM (nach Grynkiewicz et al, 1985).

Mit zunehmender Calciumbindung fluoresziert Fura 2 bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm stärker, die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm nimmt hingegen bei zunehmender Calciumbindung ab. Bildet man nun das Verhältnis der Emissionsfluoreszenz bei 340 und 380 nm, so erhält man ein direktes Maß für die Calciumkonzentration. Durch Aufnahme der Fluoreszenzbilder läßt sich somit ein Verhältnisbild (ratio-Bild) errechnen, welches die Calciumkonzentrationen einzelner Bildpunkte oder ganzer Flächen wiedergibt (Grynkiewicz et al 1985). Das Programm Argus 50 Ratio Imaging Ca[Fura 2] ermöglicht es, rechteckige Beobachtungseinheiten verschiedener Größe innerhalb des Gesamtbeobachtungsfeldes festzulegen, so daß sowohl die Calciumkonzentration des gesamten Feldes, als auch einzelner Zellen detektiert werden kann. Bei den durchgeführten Versuchen wurde jeweils das Gesamtareal als eine Beobachtungseinheit bestimmt und

darüberhinaus mehrere Einzelzellen markiert. Innerhalb einer Beobachtungseinheit werden die vielen ratio-Werte der einzelnen Bildpunkte gemittelt, so daß sich für dieses Areal ein numerischer Wert ergibt. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel (Microsoft) konnten die gemessenen Werte ausgewertet und in Form von Kurvendiagrammen veranschaulicht werden.

Die Beobachtung der Endothelzellen erfolgte durch ein Ölobjektiv mit vierzigfacher Vergrößerung, so daß im Gesamtbeobachtungsareal gemittelt 40 Zellen detektiert werden konnten.

Für die Experimente wurden die Endothelzellen 30 Minuten zuvor mit 5 µl Fura 2(1mM in DMSO)/ml Medium inkubiert.

5. Aufbau des Experimentierplatzes und Ergebnisse

5.1 Aufbau des Systems

Das Ziel bestand zunächst in Aufbau und Etablierung eines Messplatzes mit einer Flusskammer zur Erzeugung laminarer Strömungen, der gleichzeitig die Durchführung von Echtzeitcalciummessungen mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubt.

5.1.1 Strömungskammer

In Anlehnung an Koslow et al (1986) wurde eine Flusskammer konstruiert, in der Scherkräfte erzeugt und dabei die Reaktion kultivierter Endothelzellen beobachtet werden können. Die Strömungskammer besteht aus zwei parallelen Platten, wobei die Grundplatte aus Edelstahl und die Deckplatte aus Glas gefertigt ist. Zwischen den beiden Platten ist eine Silikonfolie, die wie in Abbildung 2 zugeschnitten ist, als Abstandshalter eingebracht, so daß sich eine Kammer mit einem divergierenden Eingang und einem konvergierenden Ausgang ergibt. Die Deckplatte ist mittels zweier Befestigungsleisten in seitlichen Bohrungen der Grundplatte verankert. In der Grundplatte existiert eine kreisrunde Aussparung, in die durch ein Gewinde eine Metallscheibe von unten in die Ebene der Platte eingeschraubt werden kann. Diese Metallscheibe besitzt in der Mitte eine Fräsung, die in Durchmesser und Tiefe exakt dem Glasträger entspricht, der mit den auf ihm kultivierten Zellen eingebracht wird, so daß die Zellen in einer Ebene mit der Platte zu liegen kommen. Zwei Bohrlöcher in der Grundplatte, die sich im Ein- bzw. Ausgangsbereich der Kammer befinden, dienen dem Zu- und Abstrom des Mediums. Sie haben Verbindung zu zwei Schlauchadaptern am jeweiligen Plattenende. Zur Abdichtung der Kammer bei Durchströmung mit Medium werden alle Grenzflächen dünn mit mittelviskösem Silikongel beschichtet.

Die in der Kammer auf die Zellen einwirkende Scherkraft ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die an einer Rollenpumpe eingestellte Geschwindigkeit bestimmt die Volumenflußrate Q [ml/s]. Weiterhin ist die Scherkraft abhängig von der Spaltbreite zwischen Zellen und Deckplatte, wobei die Breite der Flußbahn w [cm] und die halbe Höhe der Folie b [cm] entscheidend sind. Ebenfalls ist die Viskosität μ [$\text{g cm}^{-1}\text{s}^{-1}$] der den Scherstress vermittelnden Flüssigkeit von Bedeutung. Diese kann bei Zellkulturmedien als eins angenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren erfolgt die Berechnung der Scherkraft τ wie folgt:

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

Die Scherkraft τ erhält dabei die Einheit dyn/cm², wobei 1 dyn 10⁻⁵ Newton entspricht.

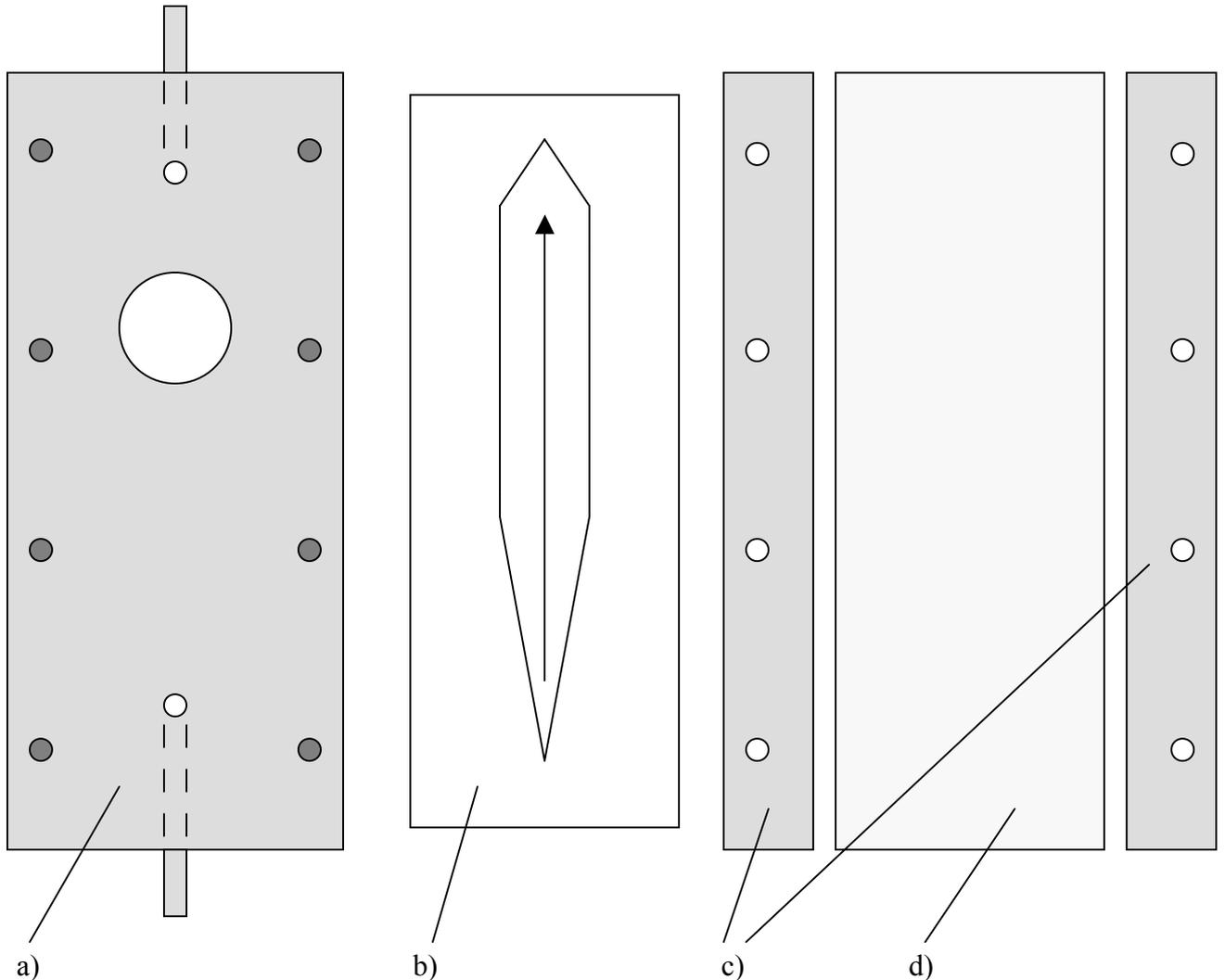


Abbildung 2: Darstellung der Einzelkomponenten der Flusskammer. a) Grundplatte aus Edelstahl mit der Aussparung zum Einbringen des Glasträgers sowie mittigen Bohrlöchern für den Zu- und Abstrom des Mediums (weiss) und seitlichen Bohrlöchern zur Verankerung der Deckplatte (grau), b) Silikonfolie, c) Befestigungsleisten für die Deckplatte, d) Deckplatte aus Glas.

5.1.2 Untersuchungssystem

Die oben beschriebene Flusskammer wird mit Hilfe der Schlauchadapter an ein Perfusionssystem angeschlossen, das von einer Rollenpumpe, deren Pumpgeschwindigkeit

nahezu stufenlos variiert werden kann, angetrieben wird. Die Pumpe saugt das Medium aus einem im Wasserbad auf 37°C vorgeheizten Vorratsgefäß an und befördert es in einen ebenfalls im Wasserbad befindlichen, dicht verschlossenen Erlmeyerkolben, der überwiegend luftgefüllt ist. Aus diesem Erlmeyerkolben wird das Medium durch den entstehenden Überdruck in den auf die Kammer zuführenden Schlauch geleitet, wobei das Luftreservoir im Kolben der Dämpfung der Pulsationen der Rollpumpe und somit der Erzeugung einer laminaren Strömung dient. Auf dem Weg zur Flusskammer ist der zuführende Schlauch von einem weiteren großlumigeren Schlauch ummantelt, der im Gegenstrom von der 37°C warmen Wasserbadflüssigkeit durchströmt wird. Dies gewährleistet, daß das Medium beim Eintritt in die Kammer tatsächlich die gewünschte Temperatur besitzt. Unmittelbar vor der Kammer ist ein Dreiwegehahn zwischengeschaltet, der das Einspritzen von Substanzen ermöglicht. Der Abstrom des Mediums erfolgt wiederum durch einen Schlauch zurück in das Vorratsbehältnis im Wasserbad. Ist die zu untersuchende Zellpopulation in die Flusskammer eingebracht, so wird die Kammer auf einem speziell angefertigten Mikroskoptisch fixiert, der das Heranfahren eines Ölobjektives an das zellentragende Glasplättchen gestattet und ein Verrutschen des Beobachtungsfeldes verhindert.

Die Beobachtungseinheit besteht aus einem Mikroskop mit angegliederter Fluoreszenzeinheit, einem Filterwechsler und einer hochempfindlichen ICCD-Kamera mit dazugehörigem Verstärker und Verarbeitungseinheit, die wie in Abbildung 3 ersichtlich angeordnet und verschaltet sind. Die hochsensitive ICCD-Kamera ist in der Lage, einzelne Photonen zu registrieren und gestattet es so, selbst schwächste Fluoreszenzmissionen zu messen.

Die Funktion der Einzelkomponenten wird beim Meßvorgang durch einen Steuerungscomputer über das Programm Argus 50 Ratio Imaging Ca[Fura 2] koordiniert. So wird von der Photonenkamera zu jedem Meßzeitpunkt jeweils ein Bild der Anregungswellenlänge 340 nm bzw. 380 nm registriert und vom Steuerungscomputer zu einem Ratio-Bild verarbeitet.

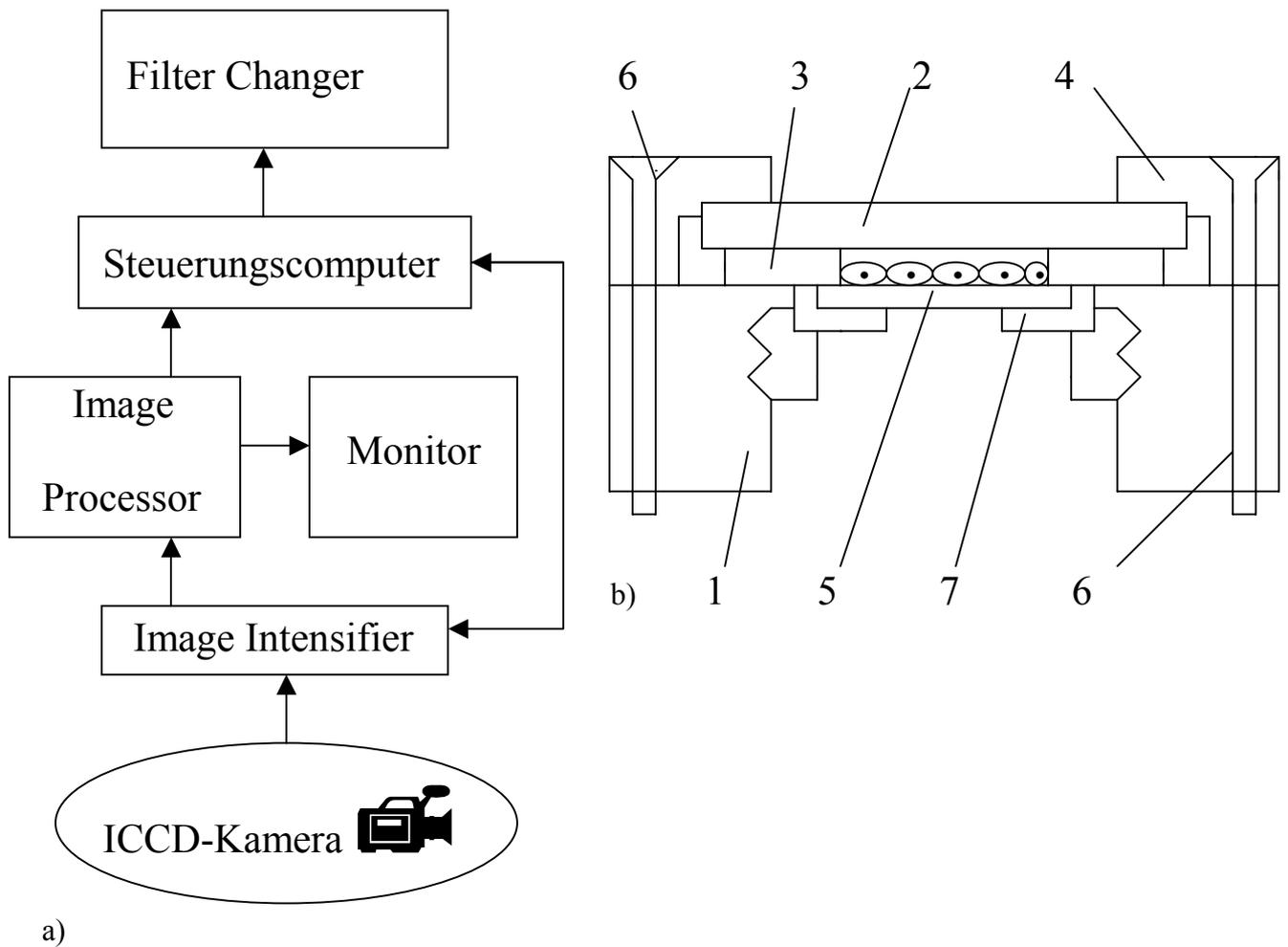


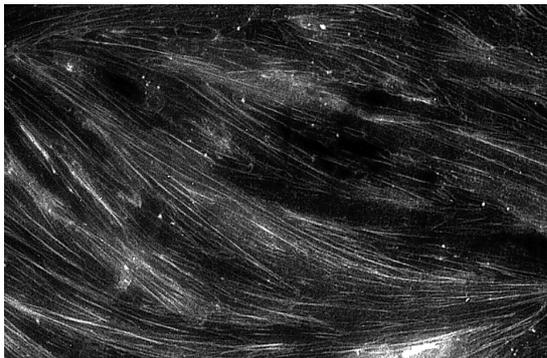
Abbildung 3: Abbildung 3 a) zeigt die Anordnung und Verschaltung der Einzelkomponenten des Untersuchungssystems, in Abbildung 3 b) ist ein Schnitt durch die Strömungskammer unter experimentellen Bedingungen dargestellt. Im einzelnen sind Grundplatte (1), Deckplatte (2), Silikonfolie (3), Befestigungsleisten (4), zellenbesetzter Glasträger (5), Befestigungsschrauben (6) und die Metallscheibe (7), die den Glasträger in ihrer Fräsung aufnimmt, zu erkennen. Die schematische Darstellung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit stark überhöht gezeichnet.

5.2 Überprüfung der Kammerfunktion an kultivierten Endothelzellen

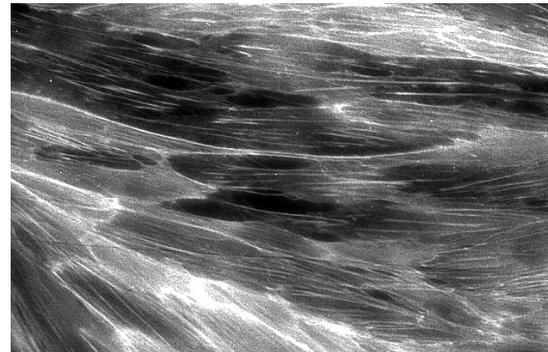
Bei Endothelzellen kommt es durch die Applikation von Scherstress in Abhängigkeit von Einwirkstärke und -dauer zu charakteristischen morphologischen Veränderungen wie einer Ausbildung von Stressfasern und auch zur Ausrichtung der Zellen parallel zur wirkenden Scherkraft. Die Beobachtung dieser Umbauvorgänge erscheint daher besonders geeignet, um die Kammerfunktion zu überprüfen.

Zunächst wurde die Flusskammer ohne Zellen perfundiert. Dabei ließ sich feststellen, daß die Kammer bereits nach wenigen Minuten die Temperatur des durchströmenden Mediums adaptiert hatte. Nach Injektion eines Farbstoffbolus über den Dreiwegehahn vor der Kammer konnten durch Beobachtung der Farbstofffront die annähernd laminaren Strömungsbedingungen in der Flusskammer gesehen werden.

Es wurden nun Endothelzellen vom MyEnd-Zelltyp in die Flusskammer eingebracht und für eine Stunde mit einer Scherkraft von 20 dyn/cm² überströmt. Nach anschließender Fixierung der Zellen wurde das Aktinfilamentsystem mit dem Rhodamin(TRITC)-markierten Phalloidin dargestellt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollpopulation von Zellen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität sowohl in der Zellperipherie als auch im Zentrum der Zellen als Ausdruck einer F-Aktin Zunahme. Ein typischer Ausschnitt einer MyEnd-Zellpopulation mit Darstellung des Aktinfilamentsystems nach Scherstressbeanspruchung und die entsprechende Kontrollpopulation ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Da MyEnd-Zellen bereits unter statischen Bedingungen viele Stressfasern enthalten, ist die Zunahme der Stressfasern nach Scherstress weniger auffällig als bei kultivierten PPAEC.



a)



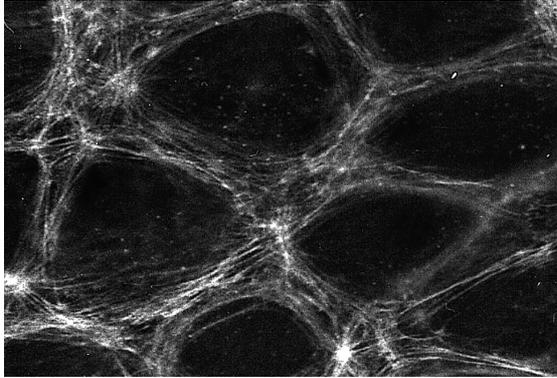
b)

Abbildung 4: Darstellung des Aktinfilamentsystems durch Rhodamin-Phalloidin in a) MyEnd-Kontrollzellen und b) MyEnd-Zellen nach Applikation von 20 dyn/cm² für eine Stunde.

In PPAEC konnte gesehen werden, daß sich im Vergleich zu den Kontrollzellen kräftige, die Zelle durchmessende zentrale Stressfaserbündel bei einer gleichzeitigen Reduktion des kortikalen Aktinnetzes gebildet hatten. Abbildung 5 zeigt beispielhaft die Vergrößerung einer Zelle mit den beschriebenen Umbauvorgängen sowie eine entsprechende Kontrollpopulation von Zellen.

Die von verschiedenen Arbeitsgruppen (s.o.) beschriebene Neuorientierung von F-Aktin in Gefäßendothelzellen unter rheologischer Beanspruchung konnte somit auch in dem hier verwendeten Untersuchungssystem gezeigt werden.

a)



b)



Abbildung 5: TRITC-Phalloidin-Markierung des Aktinfilamentsystems von PPAEC. Abbildung 5 a) zeigt eine Kontrollpopulation von Zellen mit deutlich sichtbaren kortikalen Aktinfilamenten, in Abbildung 5 b) ist die Vergrößerung einer einzelnen Zelle mit stark ausgeprägten zentralen Stressfaserbündeln nach einstündiger Applikation von 20 dyn/cm² zu erkennen.

5.3 Calciummessung nach Applikation von physiologischen Endothelzellstimuli und Calciumionophoren

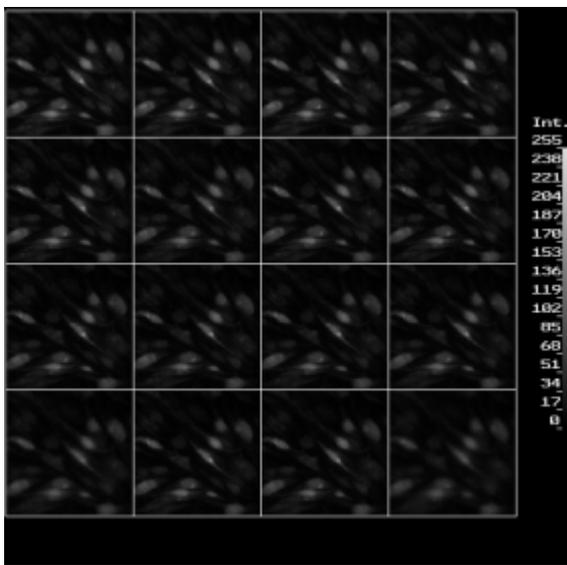
Es wurden Calciummessungen mit MyEnd-Zellen unter Einwirkung physiologischer Stimuli und Calciumionophoren zur Testung des Calciummeßsystems durchgeführt. Zur Erzeugung eines zytosolischen Calciumanstiegs wurden Thrombin, ATP, A23187 und Thapsigargin verwendet. Thapsigargin ist ein hochspezifischer und sehr potenter Inhibitor der Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums. A23187 (Calcimycin) ist ein antibiotisches Calciumionophor, das zu einer irreversiblen Öffnung membranständiger Calciumkanäle und somit zu einem Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum führt. Thrombin und ATP führen als Endothelzellstimulantien im Rahmen der Signaltransduktion zu schnellen Calciumantworten in der Zelle (Jacob et al, 1990).

Die Endothelzellen wurden in die Flusskammer eingebracht und mit 2 dyn/cm² von ATP-freier HEPES-gepufferter physiologischer Salzlösung mit Glucose überströmt. Nach einer zwischen 10 und 40 Minuten dauernden Adaptationsphase wurden die Zellen durch Einspritzung über den Dreiwegehahn mit dem stimulierenden Agens in Berührung gebracht.

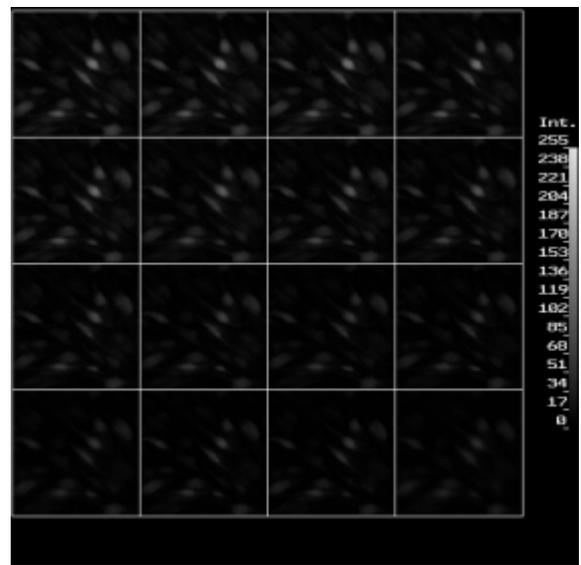
Nach einminütiger Einwirkdauer wurden die Substanzen durch neuerliche Überströmung mit 2 dyn/cm² von den Zellen gewaschen.

Durch die Applikation der stimulierenden Substanzen kam es zu Erhöhungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen von unterschiedlicher Intensität und Dauer.

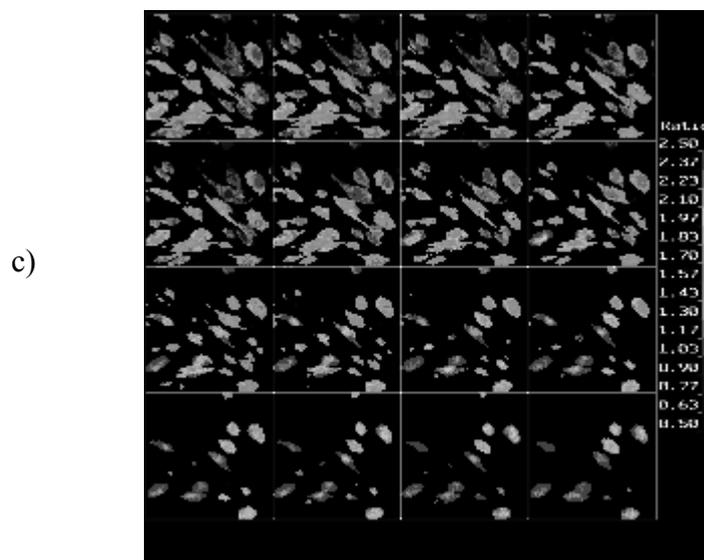
Abbildung 6 zeigt eine typische Originalregistrierung des 340/380 nm Verhältnis nach Applikation von 1µM A23187, wie sie in allen durchgeführten Experimenten (n=4) beobachtet wurde. Zusätzlich sind für dieses Experiment auszugsweise die Registrierungen bei 340 nm und 380 nm sowie das sich hieraus ergebende Verhältnisbild zur Veranschaulichung dargestellt. Auf die Wiedergabe der Einzelbilder zu den Verhältniskurven wird im folgenden verzichtet.



a)



b)



c)

Abbildung 6: Originalregistrierungen der Fura-2-Fluoreszenz der Endothelzellen unter Anregung durch 340 nm (a) und 380 nm (b) bei Stimulation mit A23187. Die erste Registrierung zeigt die Zellen zum Zeitpunkt 20 Minuten, die folgenden Bilder – von links oben nach rechts unten betrachtet – in jeweils dreiminütigem Abstand bis zum Zeitpunkt 68 Minuten. Der intrazelluläre Calciumanstieg spiegelt sich in einer Zunahme der Fluoreszenz bei einer Anregung bei 340 nm (a) bzw. Fluoreszenzabnahme bei Anregung bei 380 nm (b) wider. Aus den Fura-2-Fluoreszenzregistrierungen der Abbildungen (a) und (b) errechnet sich das 340/380 nm-Verhältnisbild (c). Deutlich ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration während des Experimentes am Farbwechsel der Zellen zu erkennen.

A23187 führte zu einem langsamen, kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration über einen Zeitraum von 20 bis 25 Minuten, der mit der Bildung eines Plateaus auf hohem Niveau endete. Der Gesamtanstieg des 340/380 nm Verhältnis lag bei 1 Einheit. Der Calcium-Anstieg ist durch Öffnung plasmamembranöser Calciumkanäle und einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum zu erklären.

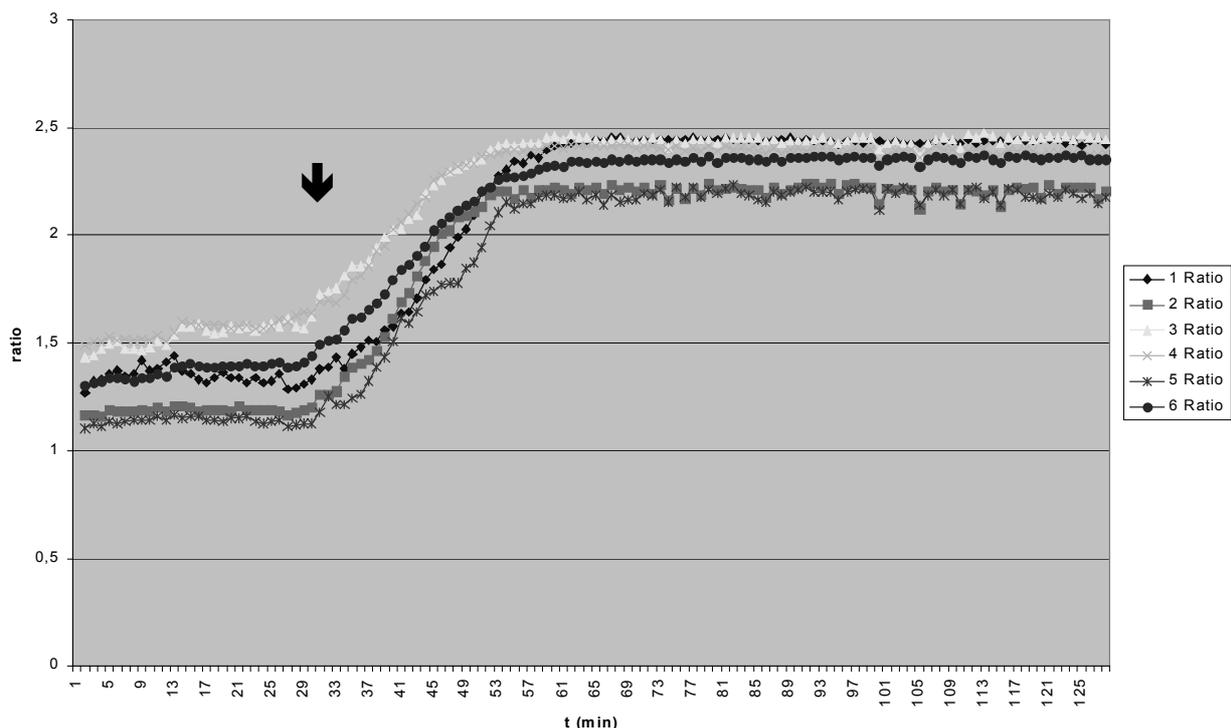


Abbildung 7: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Applikation von 1 μM A23187 30 Minuten (\blacktriangledown) nach Beginn der Meßreihe. Die Verhältniskurve 1 gibt hier, wie in allen folgenden Experimenten, den Durchschnittswert des Gesamtbildes wieder, bei den übrigen Kurven handelt es sich um Registrierungen von Einzelzellen.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft für die weiteren Versuche dieser Meßreihe (n=3) den Kurvenverlauf bei Stimulierung von Endothelzellen durch 0,1 μM Thapsigargin. Hier

reagierten die Endothelzellen zunächst mit einem raschen Calciumanstieg innerhalb weniger Minuten und anschließend einem leichten Rückgang der intrazellulären Calciumkonzentration, wobei diese immer deutlich über dem Ausgangswert blieb. Der durchschnittliche Anstieg des 340/380 nm Verhältnis lag bei 0,7 Einheiten. Der Kurvenverlauf erklärt sich durch die von Thapsigargin hervorgerufene initiale Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher und der anschließenden Hemmung der Rückpumpfunktion durch Blockierung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase.

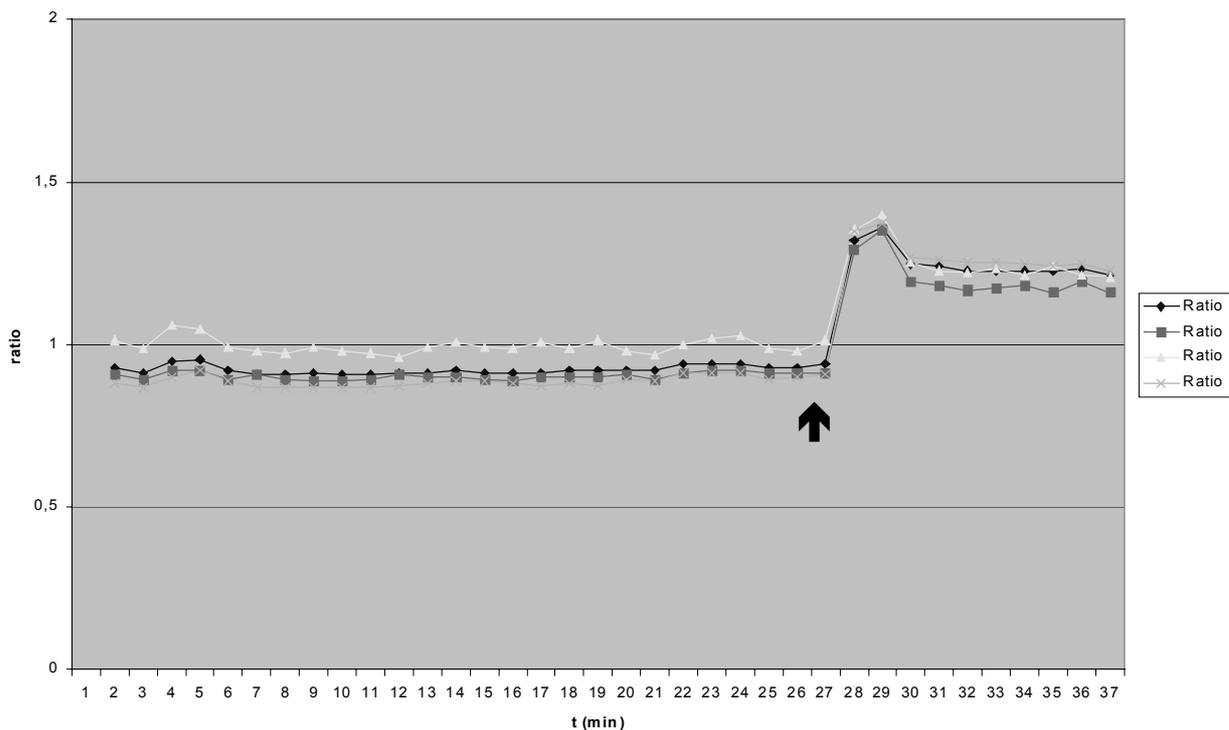


Abbildung 8: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Applikation von 1 μM Thapsigargin 26 Minuten (\blacktriangle) nach Beginn der Meßreihe.

In Abbildung 9 ist eine repräsentative Originalregistrierung von Versuchen ($n=3$) mit Applikation von 1 μM Thrombin wiedergegeben. Es kam zu einer Zunahme des zytosolischen Calciums bis zu einem Höchstwert innerhalb der ersten fünf Minuten. In den darauffolgenden 15 Minuten ließ sich ein Rückgang der Calciumkonzentration auf den Ausgangswert beobachten. Der maximale Anstieg des 340/380 nm Quotienten war dabei verhältnismäßig deutlich schwächer ausgeprägt als bei Thapsigargin oder A23187 und lag gemittelt bei 0,15 Einheiten.

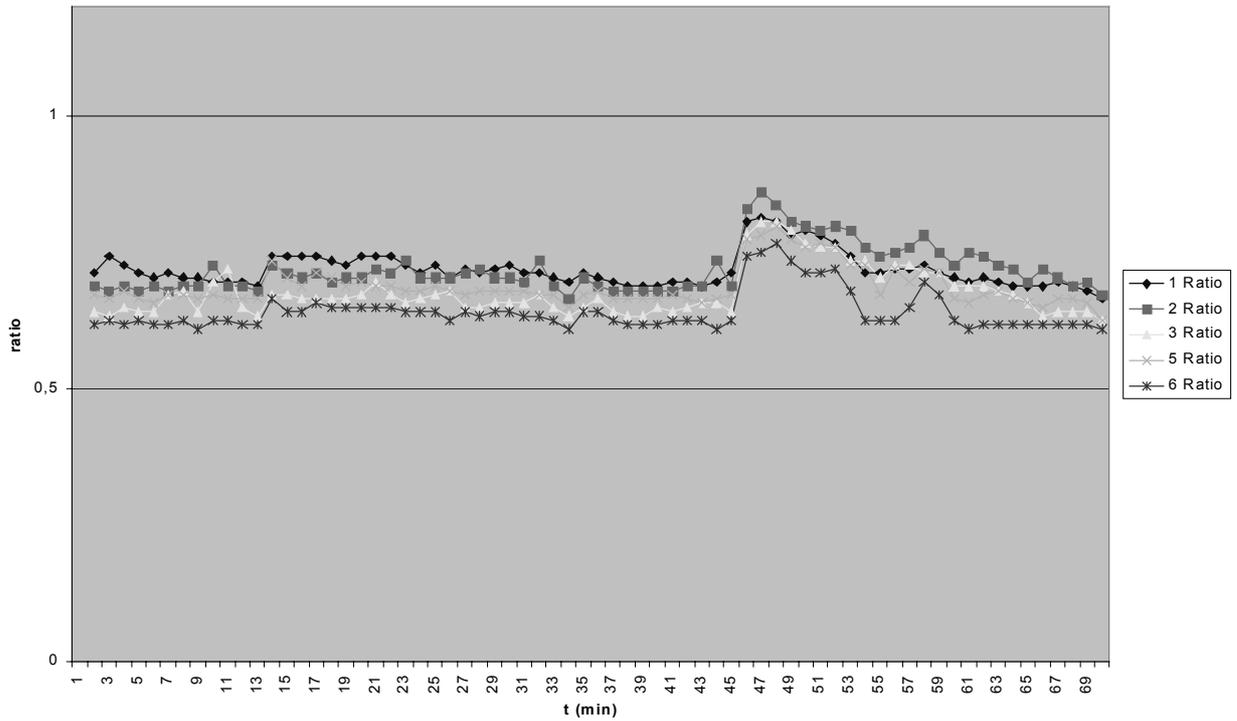


Abbildung 9: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Applikation von 1 μ M Thrombin 45 Minuten nach Beginn der Meßreihe.

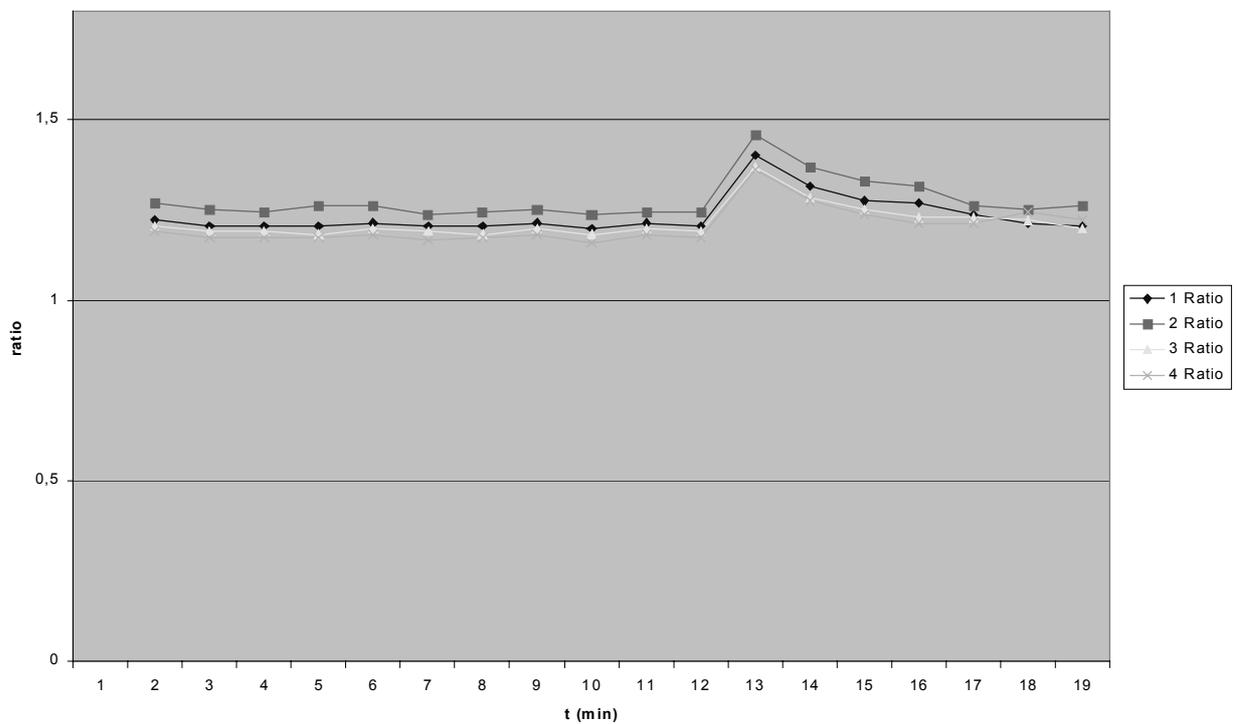


Abbildung 10: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Applikation von 1 mM ATP 12 Minuten nach Beginn der Meßreihe.

Abbildung 10 gibt den Kurvenverlauf bei Stimulierung von MyEnd-Zellen mit 1 mM ATP wieder. Bei diesen Experimenten (n=3) zeigten die Zellen ebenfalls eine dezente intrazelluläre Calciumerhöhung mit einem Anstieg des 340/380 nm Verhältnis von 0,2 Einheiten. Innerhalb von 10 Minuten kam es zu einer Rückkehr der Werte auf Ausgangsniveau.

5.4 Calciummessung unter rheologischer Beanspruchung von Endothelzellen

5.4.1 MyEnd-Zellen unter rheologischer Beanspruchung

MyEnd-Zellen wurden unterschiedlichen Scherstresspegeln ausgesetzt und dabei Messungen der zytosolischen Calciumkonzentration durchgeführt. Nach der Positionierung der Zellen in der Flusskammer wurden diese zunächst jeweils mit einer geringen Scherkraft von 2 dyn/cm² für 20 Minuten an die Umgebungsbedingungen adaptiert. Dies gewährleistet, daß die Zellen permanent von Medium bedeckt sind und ist weiterhin erforderlich, da ständig warmes Medium zugeführt werden muss, um eine konstante Kammertemperatur und damit einen physiologischen pH-Wert des Mediums zu erzeugen. Die während dieser Zeit gemessenen Werte ergaben bei allen Experimenten eine Basislinie der Calciumkonzentration mit nur sehr geringen Undulationen, die sich in Veränderungen des 340/380 nm Verhältnis von < 0,1 Einheiten ausdrückten.

Nach Ablauf der Adaptationsphase wurden die Zellen in den Versuchen (n=9) durch Hochregulierung der Pumpengeschwindigkeit Scherstresspegeln von 10, 20, 30 sowie 45 dyn/cm² ausgesetzt. Hierbei konnten abgesehen von den weiter bestehenden geringen Schwankungen um die Basislinie keine nennenswerten Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden, was in den Abbildungen 11 und 12 für 2 typische Experimente veranschaulicht ist.

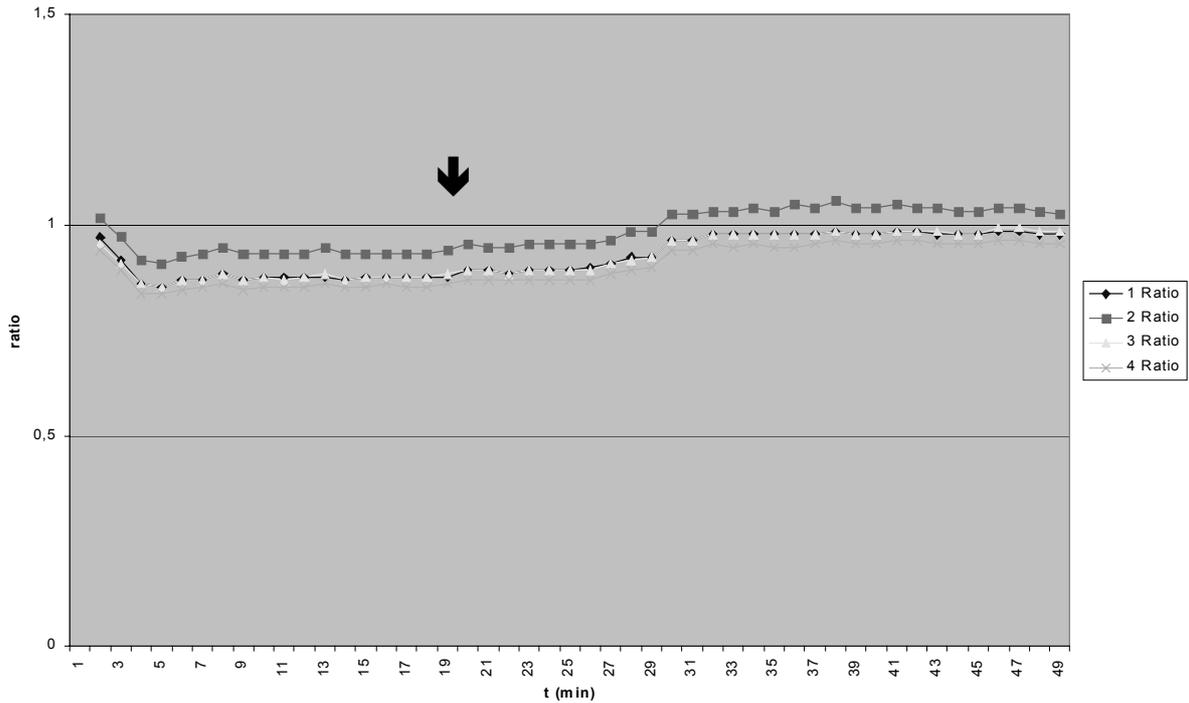


Abbildung 11: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Anhebung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 20 dyn/cm² 20 Minuten (↓) nach Beginn der Meßreihe.

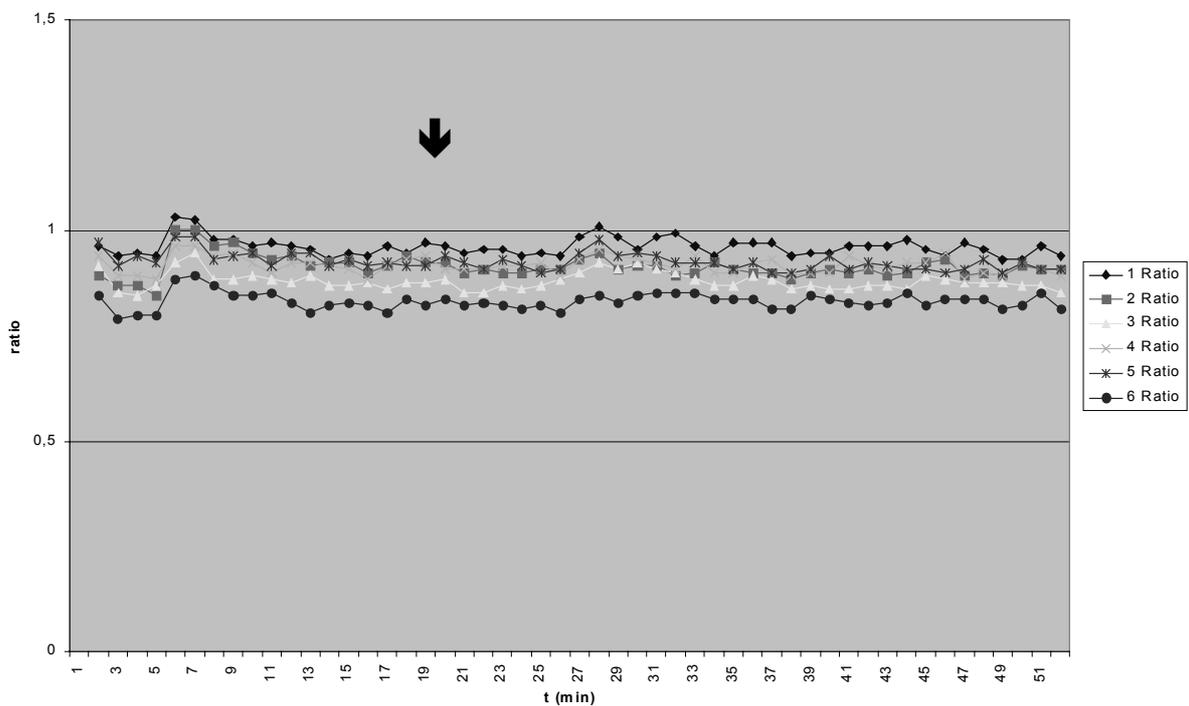


Abbildung 12: MyEnd-Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Anhebung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 30 dyn/cm² 20 Minuten (↓) nach Beginn der Meßreihe.

Auch durch eine schrittweise Anhebung der Scherkraft auf zunächst 10 dyn/cm² nach 10 Minuten Adaptation und auf anschließend 20 dyn/cm² nach weiteren 10 Minuten ließ sich

keine Abweichung der Calciumkonzentration von den zuvor gemessenen Werten provozieren (n=4), was in Abbildung 13 dargestellt ist.

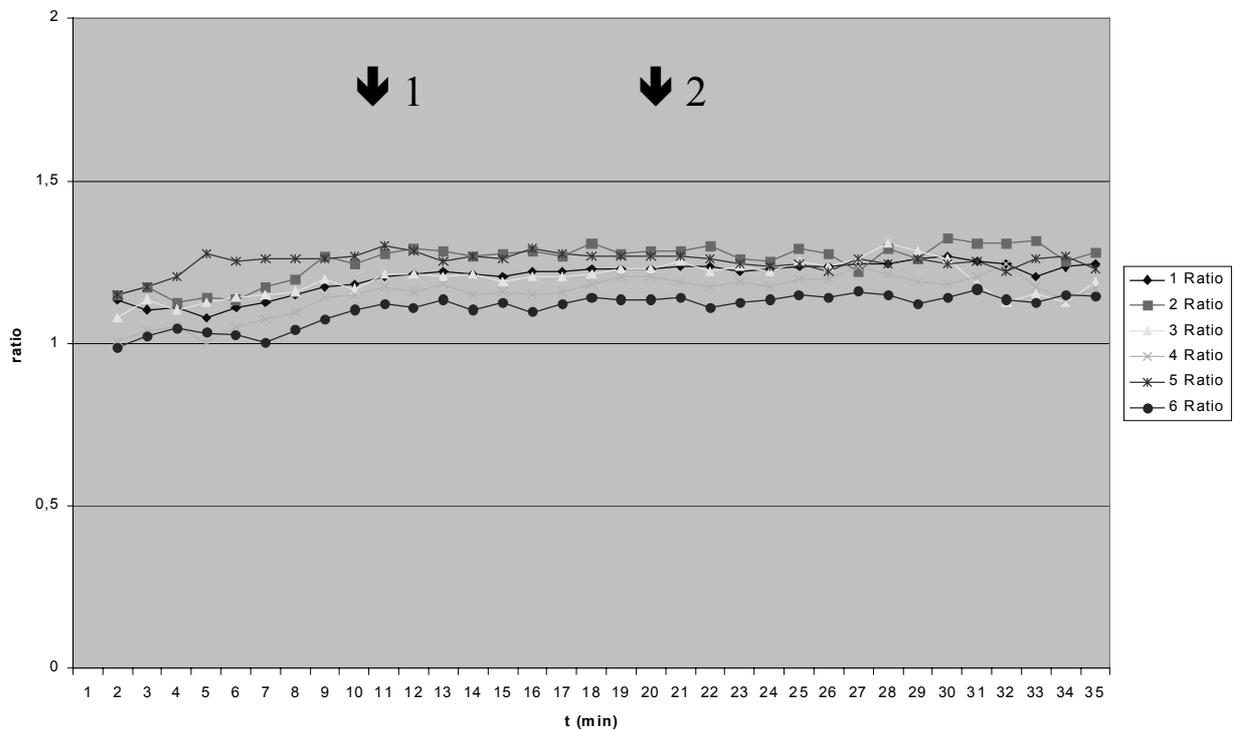


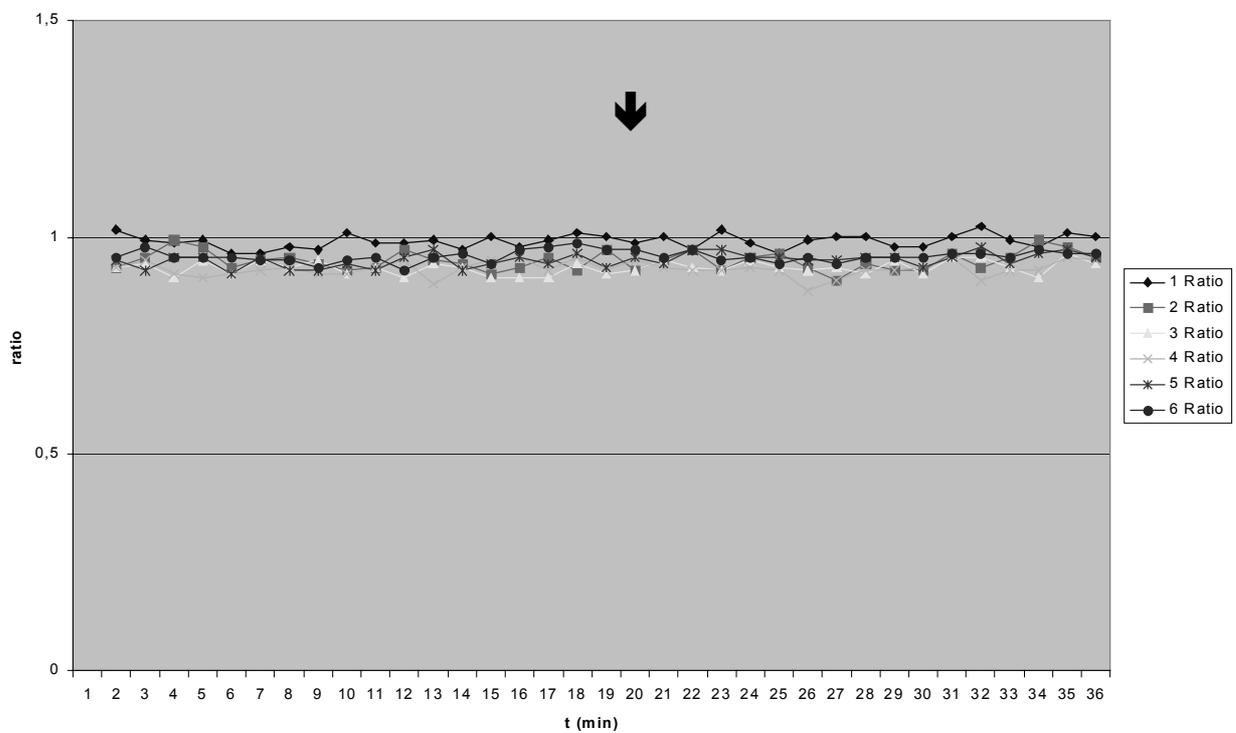
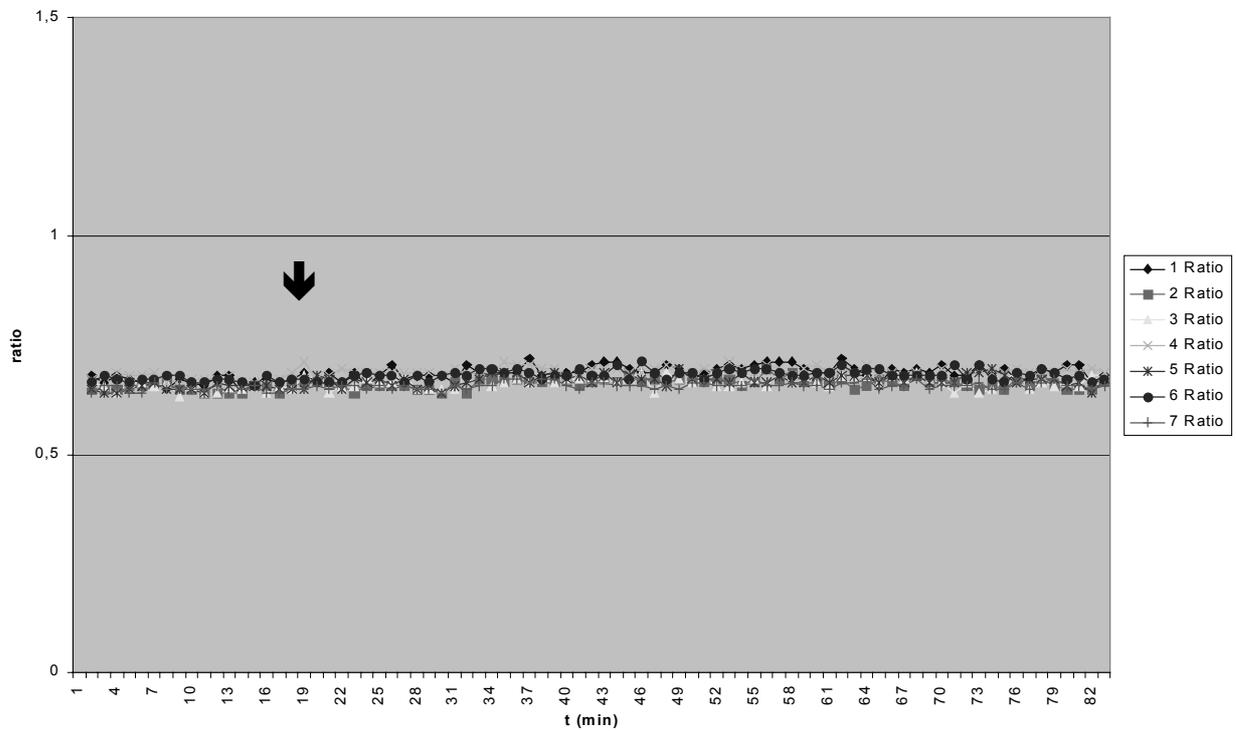
Abbildung 13: MyEnd Zellen. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Anhebung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 10 dyn/cm² 10 Minuten (↓1) nach Beginn und anschließend auf 20 dyn/cm² 20 Minuten (↓2) nach Beginn der Meßreihe.

Einem Anstieg der intracellulären Calciumkonzentration scheint somit als Signalweg in MyEnd-Zellen bei der Rezeption von Scherkraften keine entscheidende Bedeutung zuzukommen.

5.4.2 Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins (PPAEC) unter rheologischer Beanspruchung

Als ein weiteres Zellsystem wurden Endothelzellen aus dem Truncus pulmonalis des Schweins unter rheologischer Beanspruchung untersucht. Die PPAEC wurden ebenfalls zunächst wie oben beschrieben an die Bedingungen im Untersuchungssystem adaptiert, auch hier konnte eine Basislinie mit Schwankungen des 340/380 nm Verhältnis unter 0,1 Einheiten beobachtet werden. Nach Erhöhung der Scherkraft auf 25 dyn/cm² blieben die geringfügigen Undulationen um den Ausgangswert erhalten, ein Anstieg des zytosolischen Calciums wurde

nicht gesehen. Die Originalregistrierungen dieser Experimente (n=2) sind in den Abbildungen 14 und 15 wiedergegeben.



Abbildungen 14 und 15: PPAEC. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Anhebung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 25 dyn/cm² 20 Minuten (↓) nach Beginn der Meßreihe.

Um zu zeigen, daß die fehlende Calciumantwort der Endothelzellen nach einer Scherstressapplikation keine Meßartefakte darstellt, wurden in weiteren Versuchen im Anschluß Thapsigargin oder Thrombin appliziert.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde die Scherkraft zunächst von 2 dyn/cm² auf 25 dyn/cm² erhöht. Es kam dabei zu keiner Veränderung der Calciumkonzentration. Nach weiteren 15 Minuten wurden die Zellen mit 0,1 µM Thapsigargin stimuliert, worauf die für Thapsigargin typische rasche Calciumelevation und ein anschließender leichter Rückgang des 340/380 nm Verhältnis wie auch schon bei den vorangegangenen Kontrollexperimenten (siehe Kapitel 5.3) gezeigt werden konnte (n=2).

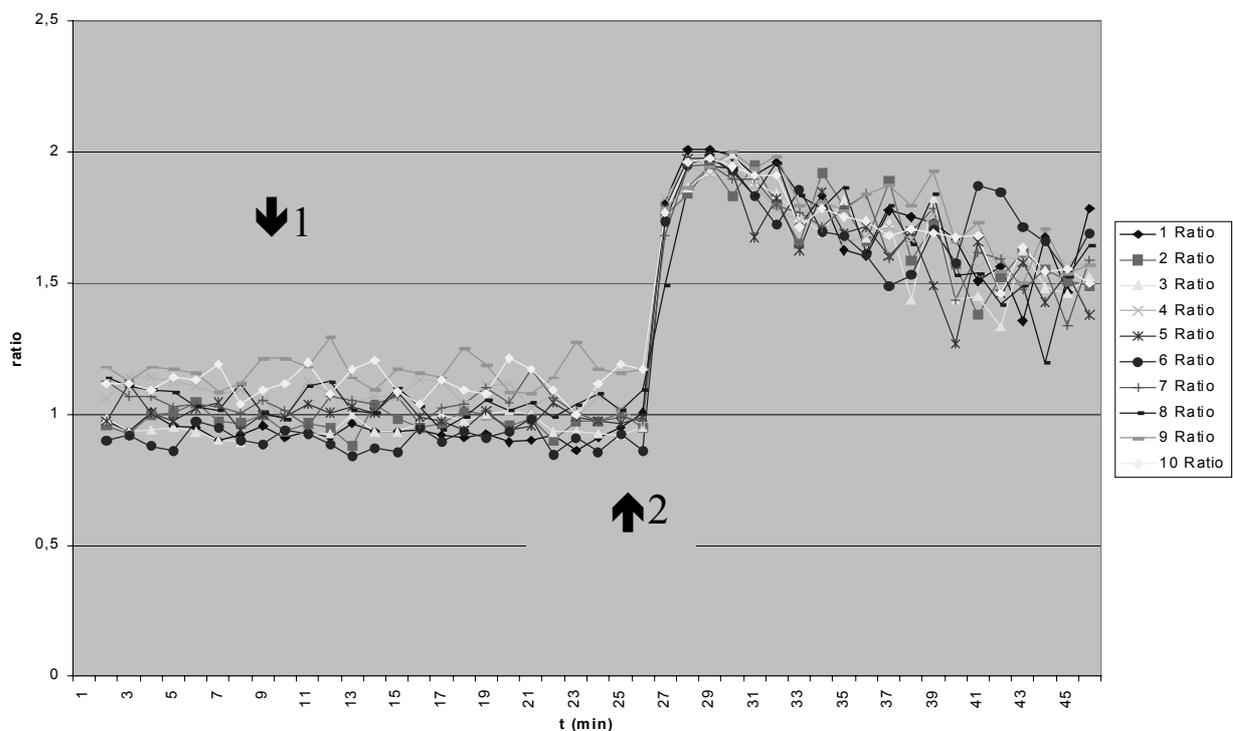


Abbildung 16: PPAEC. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Erhöhung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 25 dyn/cm² 10 Minuten (↓1) nach Beginn und anschließender Applikation von 0,1 µM Thapsigargin 25 Minuten (↑2) nach Beginn der Meßreihe.

In gleicher Weise wurden zuvor gescherte Endothelzellen mit 1 µM Thrombin behandelt. Auch hier konnte ein intrazellulärer Calciumanstieg beobachtet werden, der dem früherer Kontrollen entsprach (Abbildung 17, n=2).

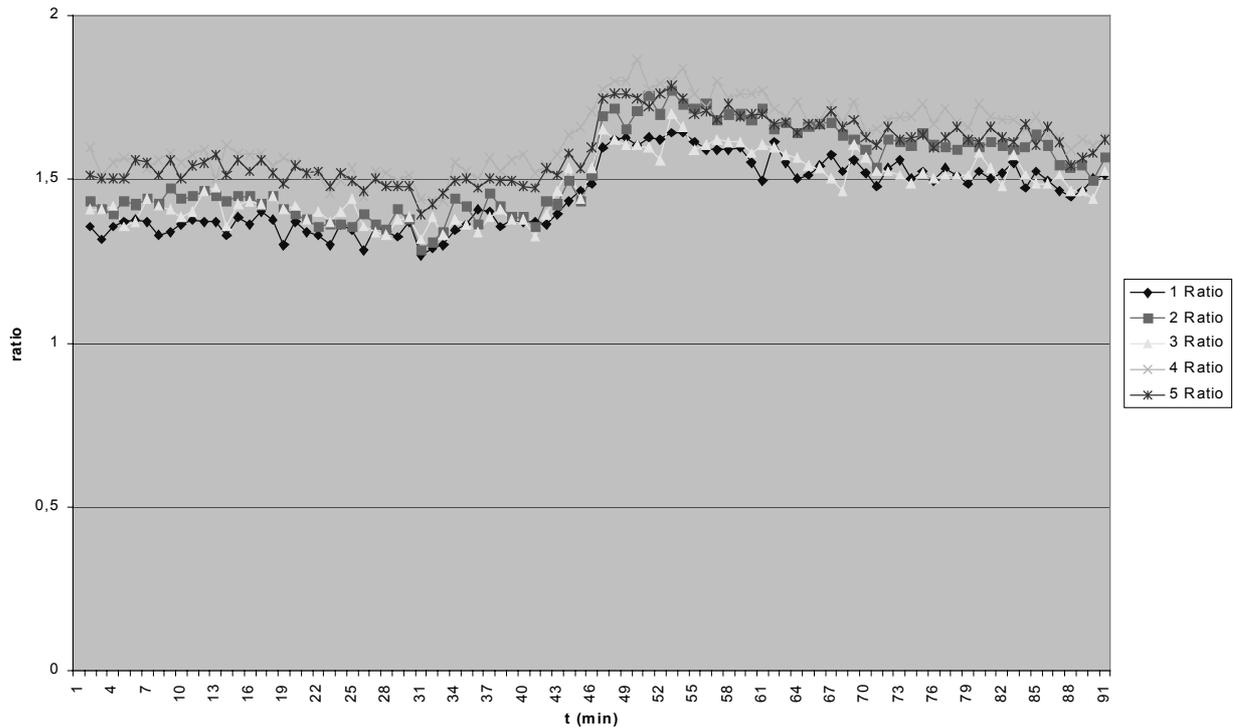


Abbildung 17: PPAEC. Darstellung der 340/380 nm-Verhältniskurve bei Erhöhung der Scherkraft von 2 dyn/cm² auf 25 dyn/cm² 20 Minuten nach Beginn und anschließender Applikation von 1 µM Thrombin 40 Minuten nach Beginn der Meßreihe.

Es konnte somit in zwei verschiedenen Endothelzellsystemen (PPAEC, MyEnd) gezeigt werden, daß in diesem Untersuchungssystem kein intrazellulärer Calciumanstieg durch rheologische Beanspruchung provoziert werden kann.

6. Diskussion

6.1 Ein System zur intrazellulären Calciummessung in Echtzeit in kultivierten Endothelzellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein System zur Beobachtung der intrazellulären Calciumkonzentration von Endothelzellen durch Echtzeitmessungen während rheologischer Beanspruchung zu etablieren.

6.1.1 Eignung des Systems zur Messung von Calciumantworten auf rheologische Beanspruchung

Die Konstruktion der verwendeten Flusskammer und des angeschlossenen Perfusionssystems erlaubten es, Endothelzellen einer annähernd laminaren Überströmung durch ein Kulturmedium mit konstanter Temperatur und gleichbleibendem pH-Wert auszusetzen und die Zellen dabei gleichzeitig mikroskopisch zu betrachten. In der Vergangenheit sind von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche rheologische Untersuchungssysteme entwickelt worden. Die Arbeitsgruppe von James (1995) verwendete ebenfalls eine Flusskammer, erreichte die Zellperfusion jedoch mittels eines hydrostatischen Druckgradienten zwischen Mediumvorratsgefäß und Flusskammer, wobei die Flußstärke über ein der Kammer nachgeschaltetes Ventil reguliert werden konnte. Diese Anordnung hat den Nachteil, daß eine Diskriminierung von verschiedenen hydrodynamischen Effekten (Scherstress, hydrostatischer Druck) nicht möglich ist. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Perfusionssystem umgeht diese Problematik durch die Verwendung einer nahezu stufenlos verstellbaren Rollenpumpe, deren pulsatile Pumpverhalten durch die Zwischenschaltung eines luftgefüllten Vorratsgefäßes abgepuffert und so ein nonpulsatiler Fluß erzeugt wurde. Dewey et al (1981) konstruierten ein Platten-Kegel-Rheometer, in dem laminare Flussbedingungen herrschen, das allerdings eine Beobachtung der Zellen während des Experimentes nicht ermöglicht. Das System wurde von Schnittler und Mitarbeitern weiterentwickelt, so daß auch im Platten-Kegel-Rheometer die Echtzeitbeobachtung der Zellpopulation unter experimentellen Bedingungen möglich wurde (Schnittler et al 1993). Es besteht dabei jedoch der Nachteil, daß der Untersucher keine Möglichkeit besitzt, nacheinander verschiedene Stimuli an den Endothelzellen zu testen. Dies gelingt in der vorliegenden Arbeit. Im hier vorgestellten Untersuchungssystem besteht die Möglichkeit, in einem Versuchsansatz nacheinander die Auswirkungen der Applikation verschiedener Stimuli

auf dieselbe Endothelzellpopulation zu beobachten und diese direkt miteinander zu vergleichen. Es konnte zunächst die Reaktion der Zellen auf Scherstressbeanspruchung aufgezeichnet und anschließend die Antwort auf einen zweiten Reiz gesehen werden. Dies diente dabei gleichzeitig der Funktionskontrolle des Meßsystems. Im Beobachtungs- und Verarbeitungssystem konnte durch den Einsatz einer hochsensitiven CCD-Kamera mit Verstärkungseinheit die Intensität des UV-Anregungslichtes und die Expositionsdauer so gering gehalten werden, daß mögliche schädigende Einflüsse der UV-Belichtung auf die Zellen weitgehend auszuschliessen sind. Durchlichtmikroskopische Betrachtungen der Zellpopulationen zu Beginn und am Ende der Experimente zeigten keine erkennbaren morphologischen Veränderungen. Das Beobachtungssystem übt also keine nennenswerten toxischen Einflüsse auf die Zellen aus.

Ein weiterer Vorteil des verwendeten Systems und des Messprogramms besteht in der Möglichkeit durch die Auswahl verschiedener Messareale sowohl die Reaktion einer grösseren Zellpopulation als auch die individuelle Antwort von Einzelzellen zu beobachten und diese so direkt miteinander zu vergleichen.

Ein Nachteil der Echtzeit-Calciummessung mit Fura 2 begründet sich in der Tatsache, daß der Quotient 340/380 nm zwar ein direktes Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration darstellt, aber nur schwer in die absolute Konzentration umzurechnen ist. Hierfür müsste vorausgesetzt werden, daß vor oder nach jedem Experiment eine Eichung mit einem bekannten Stimulus durchgeführt und der Verstärkungsfaktor für die Bilder bei beiden Anregungswellenlängen dementsprechend eingestellt wird. Dieser Forderung kann bei den hier vorliegenden Versuchen nicht nachgekommen werden, da man durch eine Eichung vor dem Experiment in den Calciumhaushalt der Zelle eingreifen und dadurch die anschließenden Meßergebnisse beeinflussen würde. Eine Abgleichung des Verstärkungsfaktors im Anschluß an das Experiment gestattet das verwendete Meßprogramm der Firma Hamamatsu nicht. So läßt sich also durch die Verhältnisbildung der Lichtemission bei 340 und 380 nm durchaus eine Aussage über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration während eines Experimentes treffen, die Angabe der absoluten Calciumkonzentration ist jedoch nicht ohne weiteres möglich.

Artefakte bei der Calciummessung mit Fura 2 können weiterhin durch Ausbleicheffekte des Fluoreszenzfarbstoffes entstehen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen (geringe Anregungsintensität, kurze Belichtungsdauer, jede Minute ein Bild, Dauer des Experimentes < 90 Minuten) zeigte sich jedoch kein Ausbleicheffekt. Wurde die Bildaufnahmefrequenz erhöht (alle 15 Sekunden eine Registrierung), benötigte die anfängliche Fokussierung der

Zellen und die Einstellung des Verstärkungsfaktors unter UV-Belichtung zu viel Zeit oder mußte während des Experimentes nachfokussiert werden, so liessen sich jedoch erhebliche Ausbleicheffekte beobachten. Es muss daher die Forderung gestellt werden, die Messintervalle so lang wie annehmbar und die Belichtungszeiten so kurz wie möglich zu halten, um ergebnisverfälschende Ausbleicheffekte zu minimieren.

6.1.2 Veränderungen der endothelialen Zellmorphologie unter rheologischer Beanspruchung

Die Arbeitsgruppen von Franke (1984) und Ookawa (1992) beobachteten unter rheologischer Beanspruchung von Endothelzellen eine von der Einwirkdauer und –stärke abhängige Neuorientierung von F-Aktin im Gefäßendothel. Die hier für makrovaskuläre Endothelzellen von Mensch und Schwein vorbeschriebenen Veränderungen in Form einer Reduktion des peripheren Aktinnetzes zugunsten kräftiger, zentraler und in Flußrichtung orientierter Stressfaserbündel deckt sich mit unseren Beobachtungen bei den Experimenten zur Austestung des rheologischen Systems mit PPAEC. Bei der Untersuchung von mikrovaskulären Endothelzellen der MyEnd-Zelllinie im gleichen System zeigte sich ein etwas abweichendes Verhalten dieses Zelltyps unter Scherstressbeanspruchung. Zwar ließ sich auch hier eine Vermehrung des F-Aktin-Gehaltes (TRITC-Phalloidin-Fluoreszenz) beobachten, aber die Zunahme der Zahl der Stressfasern war weniger deutlich. Das unterschiedliche Wachstumsmuster dieser Zellen, die sich im Gegensatz zu den polygonal pflastersteinartig aneinanderliegenden makrovaskulären Endothelzellen durch langgestreckte Zellkörper und ein wirbelförmiges Wachstum auszeichnen, könnte den Grund für die unterschiedliche Stressfaseranordnung nach Scherstressbeanspruchung darstellen.

6.2 Führt rheologische Beanspruchung zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in Endothelzellen?

In den vorliegenden Experimenten konnte gezeigt werden, daß es in dem verwendeten Untersuchungssystem bei Einsetzen oder der Verstärkung einer rheologischen Beanspruchung zu keiner signifikanten Änderung in der intrazellulären Calciumkonzentration von Endothelzellen (MyEnd, PPAEC) kommt. Die hierbei applizierten Scherkräfte führten in den Zellen zu einer Induktion von Stressfasern, das heißt die gewählte Scherkraft war ausreichend groß, um die typischen Umbauvorgänge des Aktinfilamentsystems unter Scherstressbelastung auszulösen. Es kann somit gefolgert werden, daß Calcium nicht als Signalgeber an diesen

Umbauvorgängen beteiligt ist. Die unter anderen physiologischen Stimuli und Calciumionophoren beobachteten Calciumerhöhungen bewiesen die vorhandene Responsivität der verwendeten Endothelzellen.

Die von uns beobachtete Calciumantwort in MyEnd und PPAEC auf Thrombin und ATP steht im Einklang mit Ergebnissen von Hallam (1986, 1988) und Jacob (1988). Diese haben gezeigt, daß verschiedene physiologische Stimuli wie Thrombin, ATP, Bradykinin und Histamin innerhalb weniger Sekunden zu einem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration von Ausgangswerten nahe 100 nM auf mehrere hundert nM führen. Dabei wird ein anfänglicher Höchstwert gesehen, der unabhängig von einer Calciumpräsenz in der extrazellulären Flüssigkeit entsteht, so daß von einer initialen Entleerung intrazellulärer Speicher ausgegangen werden kann. In Abwesenheit extrazellulären Calciums kommt es anschließend zu einem Rückgang der intrazellulären Konzentration auf den Ausgangswert und eine neuerliche Applikation des Stimulus führt nur noch zu einer minimalen Antwort, da unter diesen Bedingungen eine Erschöpfung der intrazellulären Speicher stattgefunden hat und das Calcium in den Extrazellulärraum abgepumpt worden ist. Es ist wahrscheinlich, daß die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern hier – wie in den meisten Zellen – durch Inositol (1,4,5) – triphosphat vermittelt wird. In Anwesenheit von extrazellulärem Calcium bildet sich nach dem anfänglichen Spitzenwert ein Plateau aus, für das die rezeptorvermittelte Öffnung plasmalemaler Calciumkanäle verantwortlich ist (Johns 1988).

Unser Befund einer unveränderten intrazellulären Calciumkonzentration bei Scherstress deckt sich mit den Ergebnissen von Marchenko et al (1999), der die endotheliale Antwort auf Stimulation durch Scherkräfte bzw. Acetylcholin an der Aorta von Ratten untersucht hat. Hier konnte auf beide Reize eine endothelabhängige Relaxation des Blutgefäßes gesehen werden, im Gegensatz zur Applikation von Acetylcholin kam es aber bei Scherstressbeanspruchung zu keiner Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration der Endothelzellen. Es gibt jedoch auch Arbeitsgruppen, die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration unter Scherstress beobachteten. Diese differierenden Beobachtungen können zum Teil auf unterschiedliche Experimentalsysteme zurückgeführt werden, die im folgenden diskutiert werden sollen. Die Arbeitsgruppe von Yoshikawa (1997) führte Messungen der zytosolischen Calciumkonzentration unter rheologischer Beanspruchung in Abhängigkeit von der ATP-Präsenz im Kulturmedium durch. Sie konnte zeigen, daß in Abwesenheit von ATP das Einsetzen von Scherkräften zu keiner Calciumantwort in der Endothelzellpopulation führt. In Anwesenheit von ATP konnte bereits bei geringen Flußraten zwischen 1 und 10 dyn/cm² eine dauerhafte Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden. Auch zwei

andere Arbeitsgruppen (Dull et al 1991, Mo et al 1991) sahen keine Veränderungen des $[Ca^{2+}]_i$ bei Einsetzen von Scherstress im ATP-freien Schermedium. Beide Gruppen konnten aber in Anwesenheit von ATP einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ beobachten, dessen Ausmass eine positive Korrelation zur ATP-Konzentration und der Flußstärke aufwies. Das Auswaschen des ATP von den Endothelzellen oder die Abstellung der Flüssigkeitsströmung führten zu einer unverzüglichen Rückkehr der Calciumkonzentration auf den Ausgangswert. Mo et al setzten weiterhin die Endothelzellpopulation in ähnlicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit zunächst erhöhten Scherstresspegel bis zu 25 dyn/cm² aus, wobei keine Änderung von $[Ca^{2+}]_i$ registriert werden konnte. Bei anschließender Applikation von ATP in Konzentrationen zwischen 1 µM und 1 mM wurden dosisabhängige Elevationen von $[Ca^{2+}]_i$ auf Werte zwischen 400 nM (1µM ATP) und 1000 nM (1mM ATP) beobachtet.

Die Arbeitsgruppe von Ando (1993) konnte sowohl bei Einsetzen als auch bei der Verstärkung einer rheologischen Beanspruchung positive Calciumantworten messen und interpretierte diese als eine Reaktion der Endothelzellen auf die Scherstressbeanspruchung. Allerdings wurden hier ausschließlich Schermedien mit 500 nM ATP verwendet, so daß angenommen werden kann, daß die gemessenen Effekte auf die Präsenz des Agonisten zurückzuführen sind. Auch die Feststellung der Autoren, daß ähnliche Calciumantworten nach Irritation der Zellen mittels Reibung durch einen Gummiballon in der Abwesenheit von Medium auf der Endothelzellschicht beobachtet werden konnten und somit unabhängig von einer ATP-Präsenz sind, sollten kritisch betrachtet werden, da hier keinesfalls physiologische Untersuchungsbedingungen gegeben sind.

Da ATP selbst einen potenten Stimulus für die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration darstellt, kann gefolgert werden, daß die gemessenen Calciumantworten nicht auf die rheologische Beanspruchung, sondern auf die Präsenz von ATP im Schermedium zurückzuführen sind.

Weiterhin wäre es denkbar, daß sich die Calciumkonzentration nur lokal in speziellen Zellkompartimenten verändert. Dies wurde von Schilling et al (1992) untersucht. Nachdem die Arbeitsgruppe keine Veränderungen der zytosolischen endothelialen Calciumkonzentration unter Scherstressbeanspruchung detektieren konnte, wurde der Frage nachgegangen, ob sich Schwankungen von $[Ca^{2+}]_i$ bei rheologischer Beanspruchung im Bereich direkt unterhalb der Plasmamembran ereignen und somit bei Registrierungen der Fura-2-Fluoreszenz mehrerer hundert Zellen aufgrund ihres relativ geringen Gewichtes verglichen mit dem Gesamtcalciumgehalt der Zellen nicht detektiert werden können. Es wurde herausgefunden, daß der Efflux von $^{86}Rb^+$ mit der Stimulation calciumabhängiger

Kaliumkanäle assoziiert ist und somit Rückschlüsse auf die Calciumkonzentration in der Nähe der Plasmamembran zuläßt. Durch eine Aktivitätsmessung des $^{86}\text{Rb}^+$ -Effluxes an der Plasmamembran unter stationären Bedingungen nach Gabe eines Inhibitors der Kaliumkanäle einerseits und unter Scherstressbedingungen andererseits konnte gezeigt werden, daß auch hier die Calciumkonzentration vom Einsetzen der rheologischen Beanspruchung unbeeinflußt bleibt.

Sirgurdson et al (1993) beobachteten reproduzierbare Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration in HUVEC und PPAEC nach mechanischer Irritation der Zellen durch eine Mikropipette. Hier muß jedoch kritisch angemerkt werden, daß durch den verwendeten Stimulus, nämlich das Absenken der Pipette auf die Zelloberfläche bis zum Erhalt einer Calciumantwort ein unphysiologischer, inadäquater Reiz gesetzt worden ist. Bei der Applikation geringer Flüssigkeitsströmungen ($< 0,1 \text{ dyn/cm}^2$) konnten auch von Sigurdson et al keine relevanten Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dokumentiert werden. Schwarz et al (1992) sahen ebenfalls zytosolische Calciumelevationen nach rheologischer Stimulation mittels einer Mikropipette. Helmlinger et al (1995) beobachteten unter kontinuierlich bzw. pulsatil appliziertem Scherstress Calciumanstiege, wohingegen die Endothelzellen auf rein oszillierenden Scherstress ($0 \pm 20 \text{ dyn/cm}^2$, $1,0 \text{ Hz}$) keine Calciumantwort zeigten.

Insgesamt fällt es abschließend aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Grundvoraussetzungen schwer, die einzelnen Untersuchungen miteinander zu vergleichen und eine klare Aussage über die Rolle der intrazellulären Calciumkonzentration bei der Signaltransduktion von Scherkräften im Gefäßendothel zu treffen.

So bestehen bei den einzelnen Arbeitsgruppen Unterschiede in bezug auf das verwendete Kulturmedium vor Beginn der Experimente (ATP-frei vs. ATP-haltig), die Art der Scherstressbeanspruchung (pulsatiler vs. nonpulsativer vs. oszillierender Fluß), das verwendete Kulturmedium (Ca^{2+} -frei vs. Ca^{2+} -haltig, ATP-frei vs. ATP-haltig) oder des verwendeten Untersuchungssystems (Flusskammer vs. Rheometer vs. Mikropipette vs. Gummiballon). Auch die applizierten Scherkräfte variierten bei den einzelnen Experimentatoren zwischen $0,1 \text{ dyn/cm}^2$ und bis zu 88 dyn/cm^2 . Bezüglich dieser Variablen sind die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen zum Teil höchst widersprüchlich. Aufgrund der Meßdaten der vorliegenden Arbeit, die unter möglichst physiologischen Bedingungen erhoben werden konnten, wird jedoch davon ausgegangen, daß eine alleinige rheologische Beanspruchung von Endothelzellen keinen Einfluß auf deren intrazelluläre Calciumkonzentration ausübt.

7. Zusammenfassung

Gefäßendothelzellen antworten auf rheologische Beanspruchung mit einer Umstrukturierung ihres Aktinfilamentsystems im Sinne einer Ausbildung von Stressfasern. Hierdurch wird eine bessere Stabilität der Endothelzellen und der Erhalt der strukturellen Integrität bei der Einwirkung von Scherkräften erreicht.

Der intrazelluläre Signalweg, über den die Zelle einen rheologischen Reiz in die entsprechende Zellantwort umsetzt, ist bisher weitgehend ungeklärt geblieben, wobei eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration als Signalgeber diskutiert wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen Messplatz zu etablieren, der es gestattet, Veränderungen in der zytosolischen Calciumkonzentration in kultivierten Endothelzellen nach Applikation von Ca^{2+} -erhöhenden Agonisten, Calciumionophoren sowie während rheologischer Beanspruchung in Echtzeit zu dokumentieren.

Die Eignung des verwendeten rheologischen Systems für Scherstressexperimente konnte durch die Beobachtung der für Endothelzellen unter rheologischer Beanspruchung typischen zytoskelettalen Umbauvorgänge im Sinne einer Neuorientierung der Aktinfilamente mit der Ausbildung von Stressfasern gezeigt werden.

Erstmalig konnte dabei auch die Reaktion mikrovaskulärer Endothelzellen der MyEnd-Zelllinie der Maus auf Scherstressbeanspruchung gesehen werden. Bei diesen Zellen konnte eine Vermehrung des F-Aktin-Gehaltes beobachtet werden, im Gegensatz zu kultivierten Endothelzellen des Truncus pulmonalis des Hausschweins blieb aber eine signifikante Bildung von Stressfasern aus. Dieses unterschiedliche Verhalten ist wahrscheinlich der andersartigen Zellmorphologie der MyEnd-Zellen zuzuschreiben.

Es konnte in zwei verschiedenen Endothelzellsystemen gezeigt werden, daß Gefäßendothelzellen den Kontakt mit verschiedenen endogenen Stimuli bzw. Calciumionophoren mit einer zytosolischen Calciumerhöhung unterschiedlichen Ausmaßes beantworten. Bei einsetzendem oder sich verstärkendem Flüssigkeitsscherstress konnte von uns hingegen keine Calciumantwort beobachtet werden. An der Induktion zytoskelettaler Umbauvorgänge scheint Calcium als Botenstoff in den hier untersuchten Zellsystemen also nicht primär beteiligt zu sein.

8. Literaturverzeichnis

1. Schnittler HJ, A Wilke, T Gress, N Suttorp, D Drenckhahn: Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J. Physiol.* 431, 379-401, 1990
2. Drenckhahn D: Zellenlehre. In: Benninghoff Anatomie Band 1, 9-94. D. Drenckhahn und W. Zenker, eds., Urban & Schwarzenberg 1994
3. Drenckhahn D: Cell motility and cytoplasmic filaments in vascular endothelium. *Prog. Appl. Microcirc.* 1:53-70, 1983
4. Gabbiani G, F Gabbiani, D Lombardi, SM Schwartz: Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80(8), 2361-2364, 1983
5. Wong AJ, TD Pollard, IM Herman: Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 219(4586), 867-869, 1983
6. Kim DW, AI Gotlieb, BL Langille: In vivo modulation of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress. *Arteriosclerosis* 9(4), 439-445, 1989
7. Gotlieb AI: The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium. *Toxicol. Pathol.* 18(4 Pt 1), 603-617, 1990
8. Langille BL, JJ Graham, D Kim, AI Gotlieb: Dynamics of shear-induced redistribution of F-actin in endothelial cells in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 11(6), 1814-1820, 1991
9. Colangelo S, BL Langille, AI Gotlieb: Three patterns of distribution characterize the organization of endothelial microfilaments at aortic flow dividers. *Cell Tissue Res.* 278(2), 235-242, 1994

10. Drenckhahn D, W Ness: The endothelial contractile cytoskeleton. In: *Vascular endothelium: Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities* (G.V.R. Born/C.J. Schwartz, Eds.). New Horizon Series 3, 1-25, Schattauer Stuttgart 1997
11. Sato M, MJ Levesque, RM Nerem: Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress. *Arteriosclerosis* 7, 276-286, 1987
12. Davies PF: Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Review* 75(3), 519-560, 1995
13. Davies PF, A Remuzzi, EJ Gordon, CF Dewey Jr, MA Gimbrone Jr: Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83 (7): 2114-2117, 1986
14. Langille BL, SL Adamson: Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation in arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ. Res.* 48(4), 481-488, 1981
15. Dewey Jr CF, SR Bussolari, MA Gimbrone Jr, PF Davies: The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J. Biomech. Eng.* 103(3), 177-185, 1981
16. Eskin SG, CL Ives, LV McIntire, LT Navarro: Response of cultured endothelial cells to steady flow. *Microvasc. Res.* 28(1), 87-94, 1984
17. Levesque MJ, D Liepsch, S Moravec, RM Nerem: Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis* 6(2), 220-229, 1986
18. Levesque MJ, RM Nerem: The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture. *Biorheology* 26(2), 345-357, 1989
19. Coan DE, AR Wechezak, RF Viggers, LR Sauvage: Effect of shear stress upon localization of the Golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells. *J. Cell Sci.* 104(Pt 4), 1145-1153, 1993

20. Ookawa K, M Sato, N Ohshima: Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress. *J. Biomech.* 25(11), 1321-1328, 1992
21. Franke RP, M Grafe, HJ Schnittler, D Seiffge, C Mittermayer, D Drenckhahn: Induction of human vascular endothelial stress fibers by fluid shear stress. *Nature* 307 (5952), 648-649, 1984
22. Wechezak AR, TN Wight, RF Viggers, LR Sauvage: Endothelial adherence under shear stress is dependent upon microfilament reorganization. *J. Cell Physiol.* 139(1), 136-146, 1989
23. Barbee KA, PF Davies, R Lal: Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ. Res.* 74(1), 163-171, 1994
24. Lansman JB, TJ Hallam, TJ Rink: Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325(6107), 811-813, 1987
25. Nishida K, DG Harrison, JP Navas, AA Fisher, SP Dockery, M Uematsu, RM Nerem, RW Alexander, TJ Murphy: Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 90(5), 2092-2096, 1992
26. Noris M, M Morigi, R Donadelli, S Aiello, M Foppolo, M Todeschini, S Orisio, G Remuzzi, A Remuzzi: Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ. Res.* 76(4), 563-543, 1995
27. Uematsu M, Y Ohara, JP Navas, K Nishida, TJ Murphy, RW Alexander, RM Nerem, DG Harrison: Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.* 269(6 Pt 1), C1371-8, 1995
28. Milner P, KA Kirkpatrick, V Ralevic, V Toothill, J Pearson, G Burnstock: Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 241(1302), 245-248, 1990

29. Bodin P, D Bailey, G Burnstock: Increased flow-induced ATP release from isolated vascular endothelial cells but not smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 103(1), 1203-1205, 1991
30. Ralevic V, P Milner, O Hudlicka, F Kristek, G Burnstock: Substance P is released from the endothelium of normal and capsaicin-treated rat hind-limb vasculature, in vivo, by increased flow. *Circ. Res.* 66(5), 1178-1183, 1990
31. Dull RO, PF Davies: Flow modulation of agonist (ATP)-response (Ca^{2+}) coupling in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 261, H149-H156, 1991
32. Dull RO, JM Tarbell, PF Davies: Mechanisms of flow-mediated signal transduction in endothelial cells: kinetics of ATP surface concentrations. *J. Vasc. Res.* 28, 410-419, 1992
33. Nollert MU, SL Diamond, LV McIntire: Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism. *Biotech. Bioeng.* 38, 588-602, 1991
34. Shen J, MA Gimbrone jr., FW Lusinskas, CF Dewey jr.: Regulation of adenine nucleotide concentration at endothelium-fluid interface by viscous shear flow. *Biophys. J.* 64, 1323-1330, 1993
35. Burridge K, K Fath, T Kelly, G Nuckolls, C Turner: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 487-525, 1988
36. Pienta KJ, DS Coffey: Nuclear-cytoskeletal interactions: evidence for physical connections between the nucleus and cell periphery and their alteration by transformation. *J. Cell Biochem.* 49, 357-365, 1992
37. Ross R: Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis (Ireland)*, 131 Suppl pS3-4, 1997

38. Golenhofen N, D Drenckhahn: Herstellung und Charakterisierung einer mikrovaskulären Endothelzell-Linie, myEnd, aus dem Myokard der Maus. *Annals of Anatomy*, 181, Suppl.:263, 1999
39. Grynkiewicz G, M Poenie, RY Tsien: A new generation of Ca^{2+} -Indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260(6), 3440-3450, 1985
40. Koslow AR, RR Stromberg, LI Friedman, RJ Lutz, SL Hilbert, P Schuster: A flow system for the study of shear forces upon cultured endothelial cells. *J. Biomech. Eng.* 108, 338-342, 1986
41. Jacob R, SO Sage, TJ Rink: Aspects of calcium signalling in endothelium. In: *The endothelium: An introduction to current research* (John B. Warren, editor), 33-44, Wiley-Liss 1990
42. James NL, DG Harrison, RM Nerem: Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. *FASEB J* 9(10): 968-973, 1995
43. Schnittler HJ, RP Franke, U Akbay, C Mrowietz, D Drenckhahn: 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-C98, 1993
44. Hallam TJ, JD Pearson, LA Needham: Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem. J. (England)*, 251(1), 243-249, 1988
45. Hallam TJ, JD Pearson: Exogeneous ATP raises cytoplasmic free calcium in fura 2 loaded piglet aortic endothelial cells. *FEBS Lett.*, 207(1), 95-99, 1986
46. Jacob R, JE Merritt, TJ Hallam: Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature* 335(6185), 40-45, 1988

47. Johns A, AD Freay, DJ Adams, TW Lategan, US Ryan: Role of calcium in the activation of endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12 Suppl 5, 119-123, 1988
48. Marchenko SM: The effect of shear stress on vascular endothelium. *Fiziol Zh* 45(1-2), 50-55, 1999
49. Yoshikawa N, H Ariyoshi, M Ikeda, M Sakon, T Kawasaki, M Monden: Shear-stress causes polarized change in cytoplasmic calcium concentration in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Calcium* 22(3), 189-194, 1997
50. Mo M, SG Eskin, WP Schilling: Flow-induced changes in Ca^{2+} signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am. J. Physiol.* 260(5 Pt 2), H1698-H1707, 1991
51. Ando J, A Ohtsuka, R Korenaga, T Kawamura, A Kamiya: Wall shear stress rather than shear rate regulates cytoplasmic Ca^{2+} responses to flow in vascular endothelial cells. *Biochem. And Biophys. Research Comm.* 190(3), 716-723, 1993
52. Schilling WP, M Mo, SG Eskin: Effect of shear stress on cytosolic Ca^{2+} of calf pulmonary artery endothelial cells. *Experimental Cell Research* 198, 31-35, 1992
53. Sigurdson WJ, F Sachs, SL Diamond: Mechanical perturbation of cultured human endothelial cells causes rapid increases of intracellular calcium. *Am. J. Physiol.* 264, H1745-H1752, 1993
54. Schwarz G, G Callewaert, G Droogmans, B Nilius: Shear stress-induced calcium transients in endothelial cells from human umbilical cord veins. *J. Physiol.* 458, 527-538, 1992
55. Helmlinger G, BC Berk, RM Nerem: Calcium responses of endothelial cell monolayers subjected to pulsatile and steady laminar flow differ. *Am. J. Physiol.* 269, C367-C375, 1995

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Drenckhahn für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute kontinuierliche Betreuung während der vergangenen Jahre.

Frau Dr. Nikola Golenhofen danke ich ebenfalls für die sehr gute Betreuung, das Interesse am Fortgang der Arbeit und viele motivierende Gespräche. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Anatomischen Institutes Würzburg, insbesondere Frau Rita Hermann für die Unterstützung in der Zellkultur.

Dank an meinen Kommilitonen Tobias M. Seyfarth, durch dessen Hilfe längst verloren geglaubte Messdaten aus den Tiefen der Festplatte zu Tage gefördert werden konnten.

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern Hanna und Dr. rer. nat. Joachim Dziewior in Dankbarkeit gewidmet.

Lebenslauf

Frank Dziewior, geboren am 15.09.1974 in Frankfurt am Main

Vater: Dr. Dipl.-Phys. Joachim Dziewior, Patentanwalt

Mutter: Hanna Dziewior, geb. Wiemann

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980/1981 Besuch der Grundschule Neu-Isenburg

1981-1984 Fortsetzung der Grundschule in Neu-Ulm/Offenhausen

1984-1993 Bertha-von-Suttner-Gymnasium Neu-Ulm,

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Ersatzdienst:

7/1993-9/1994 Arbeiter-Samariter-Bund Ulm, Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer

Hochschulbildung:

10/1994-5/2001 Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

9/1996 Ärztliche Vorprüfung, Beginn der Dissertation am Anatomischen Institut

8/1997 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/2000-3/2001 Praktisches Jahr

5/2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Seit 01.06.2001 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Herzchirurgie am
Zentralklinikum Augsburg, Chefarzt Prof. Dr. med. M. Beyer

Augsburg, den 17.06.2001

Frank Dziewior