

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. D. Drenckhahn

Untersuchungen zum Scherstress-responsiven Element des PDGF-Promotors

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Michael-Wulf Zeller
aus Ulm

Würzburg, Juli 2004

Referenten

Referent: Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Koreferent: Prof. Dr. med. P. Kugler

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	1
1.1 Zellen unter dem Einfluss mechanischer Stimulation	1
1.1.1 Mechanische Einflüsse auf lebende Zellen.....	1
1.1.2 Endothelzellen unter mechanischer Krafteinwirkung.....	3
1.1.3 Reaktion des Knochens auf mechanische Kräfte.....	4
1.1.4 Reaktion der Muskelzellen auf mechanische Kräfte.....	5
1.1.5 Reaktion des Urothels auf mechanische Kräfte.....	5
1.2 Biologie von PDGF	6
1.2.1 Vorkommen von PDGF.....	6
1.2.2 Funktion von PDGF.....	6
1.2.3 Pathologie der unkontrollierten PDGF-Expression.....	7
1.2.4 PDGF-Gene und deren Regulation am Beispiel des PDGF-B-Gens.....	8
1.2.5 Struktur von PDGF.....	9
1.2.6 PDGF-Rezeptor.....	11
1.2.7 Zelluläre Effekte von aktiviertem PDGF-Rezeptor.....	11
1.2.8 Deaktivierung des PDGF-Rezeptors.....	12
1.3 Biologie des Reporterproteins EGFP	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material	18
2.1 Zelllinie ECV304	18
2.1.1 Beschreibung des Herstellers der Zelllinie ECV304.....	18
2.1.2 Beschreibung der DSMZ der Zelllinie ECV304.....	19
2.1.3 Beschreibung der DSMZ der Zelllinie T24.....	19
2.1.4 Morphologische Beschreibung der Zelllinie ECV304.....	19
2.1.5 ECV304: Endothel oder Urothel?	20
2.2 Stabiltransfizierte ECV304-Zellklone	21

Inhaltsverzeichnis	II
2.2.1 Klon mit Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP.....	22
2.2.2 Klon mit Konstrukt 1,3 kb-PDGF-[Δ SSRE]-EGFP.....	22
2.2.3 Klon mit Konstrukt CMV-EGFP.....	23
2.2.4 Klon mit Konstrukt CMV-[SSRE _{ins}]-EGFP.....	23
2.3 Medium für die Kultivierung von Zellen.....	23
2.4 Puffer und Lösungen.....	23
2.5 Chemikalien.....	24
2.6 Geräte.....	24
2.7 Software.....	25
2.8 Sonstiges Material.....	25
3. Methoden.....	26
3.1 Zellkultur.....	26
3.1.1 Nährmedium für die Zelllinie ECV304.....	26
3.1.2 ECV304-Standardkultur.....	26
3.1.3 Passagieren der Zelllinie ECV304.....	26
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	27
3.1.4.1 Einfrieren.....	27
3.1.4.2 Auftauen.....	28
3.1.5 Gelatinieren von Rheo-Gläschen.....	28
3.1.6 Erstellung von Mischkulturen.....	29
3.2 Messplatz.....	29
3.2.1 Struktur des Messplatzes.....	29
3.2.2. Flusskammer.....	31
3.2.3 Datenerfassung.....	33
3.3 Arithmetische Auswertung.....	34
3.3.1 Generierung von Intensitätswerten, -bildern, Gesamt- und Durch-	34

schnittsintensitätswerten.....	
3.3.2 Zellwanderung.....	36
3.3.3 CELL-TRACKING-Methode.....	37
3.3.4 EXEL-Matrizen.....	40
3.3.5 Fehlerrechnung.....	41
4. Ergebnisse.....	42
4.1 Funktionalitätstest des PDGF-Promotors und des Messplatzes.....	42
4.2 Einfluss der Scherstress-Stärke auf den durch PDGF-Promotorkonstrukte kontrollierten Reporter-EGFP.....	43
4.2.1 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 0,5 dyn/cm ²	43
4.2.2 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm ²	44
4.2.3 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm ²	44
4.2.4 Vergleich der Reaktionen des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP auf Scherstressraten von 0,5, 12 und 30 dyn/cm ²	45
4.3 Einfluss des Scherstress-responsive Elements auf die durch Scherstress induzierte Reporterexpression.....	46
4.3.1 Messung des Konstrukts 1,3 kb PDGF-[Δ SSRE]-EGFP bei 12 dyn/cm ²	47
4.3.2 Messung des Konstrukts 1,3 kb PDGF-[Δ SSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm ²	47
4.3.3 Messung des Konstrukts CMV-EGFP bei 30 dyn/cm ²	48
4.3.4 Messung des Konstrukts CMV-EGFP und CMV-[SSRE _{ins}]-EGFP bei 30 dyn/cm ²	49
4.3.5 Vergleich der Responsivität der Konstrukte CMV-EGFP und CMV-[SSRE _{ins}]-EGFP mit den Konstrukten 1,3 kb PDGF-EGFP und 1,3 kb PDGF-[Δ SSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm ²	50
4.4 Pharmakologische Beeinflussung der durch Scherstress induzierten Reporterexpression.....	51
4.4.1 Induktion des PDGF-Promotors durch Phorbolster.....	52

Inhaltsverzeichnis	IV
4.4.2 Hemmung der Proteinkinase C durch Chelerythrin.....	53
4.4.3 Hemmung der Proteinkinase C durch Calphostin C.....	54
4.4.4 Hemmung der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid.....	55
5. Diskussion	56
5.1 Etablierung eines Messplatzes für wandernde fluoreszierende Zellen....	56
5.2 Stärken und Schwächen des EGFP-Reportergen-Assays.....	57
5.3 Einfluss der Scherstress-Stärke auf den durch PDGF-Promotorkonstrukte kontrollierten Reportergen Gehalt (EGFP)	58
5.4 Die Rolle des Scherstress-responsiven Elements im PDGF-Promotor...	59
5.5 Pharmakologische Beeinflussung der durch Scherstress induzierten Reportergenexpression.....	60
5.6 Zukunftsperspektiven.....	62
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	65
8. Abkürzungen	74
9. Anhang	77
9.1 Karte des 1,3 kb PDGF-EGFP-Vektors.....	77
9.2 Sequenzdaten des 1,3 kb PDGF-EGFP-Vektors.....	78
10. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Zellen unter dem Einfluss mechanischer Stimulation

Leben steht ständig unter dem Einfluss von Ereignissen außerhalb seiner selbst. So beeinflussen biologische, chemische aber auch physikalische Vorgänge fortwährend den Organismus, der auf diese sich wandelnden Gegebenheiten adäquat reagieren muss. Dies kann von sozialen Reaktionen wie Flucht oder Kampf, über Organfunktionen wie Steigerung des Herzschlages bis hin zu zellulären Antworten wie der Regulation verschiedener Gene reichen.

Eine besondere Einflussgröße, der alle Lebewesen unterliegen, ist mechanische Kraft. Von der Gravitation bis zum Impuls, sie alle wirken direkt auf Organismen, Organe, Gewebe, Zellen und Makromoleküle ein. Da das Leben ohne flüssige Phase undenkbar wäre, kommt der durch Flüssigkeitsstrom erzeugten Scherkraft, dem Scherstress, eine besondere Rolle zu.

1.1.1 Mechanische Einflüsse auf lebende Zellen

Grundlage allen Lebens ist die Plasmamembran der Zelle. Sie besteht aus einer Doppelschicht aus amphiphilen Lipiden, die eine hohe laterale Mobilität aufweisen und somit unter physiologischen Bedingungen die Fluidität der Plasmamembran gewährleisten (Drenckhahn, 2003). Unter Scherstress kann es sowohl zu einer vorübergehenden Zerreißen der äußeren Lipidschicht durch unterschiedlich schnelle Flussgeschwindigkeiten der amphiphilen Lipide kommen (Simons et al., 1997) als auch zu einer „aerodynamischen“ Formanpassung der Membran durch Ausgleich von Unebenheiten, was den Scherstressgradienten zu reduzieren vermag (Barbee et al., 1994).

An der Plasmamembran ist das Zytoskelett verankert, das durch sein kortikales Netz die Lipiddoppelschicht stützt und durch seine Struktur der Zellmembran Elastizität gewährt. Eine Degradation des Zytoskeletts resultiert in einer Zerstörung der Plasmamembran durch kleinste Scherkräfte (Moiindas et al., 1994).

Das Zytoskelett setzt sich aus Mikrofilamenten (Aktin- und Myosinfilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zusammen, die verschieden in der Zelle angeordnet sind. Die elastischen Aktinfilamente bestehen aus einer Aktin-Doppelhelix, die in Bündeln, zweidimensionalen Matten oder dreidimensionalen

Gelen vorliegen können. Obwohl sie im gesamten Zytosol der Zelle vorkommen, finden sich Aktinfilamente besonders häufig unter der kortikalen Plasmamembran, wo sie ein kräftiges Netzwerk ausbilden. Mikrotubuli hingegen sind lange Hohlzylinder aus polymerisierten Tubulin-Molekülen. Sie sind sehr viel steifer als die Aktinfilamente und reichen vom zellkernnahe gelegenen Centrosom in die Peripherie der Zelle. Intermediärfilamente sind seilartige Polymere aus verschiedenen Molekülen. Ihnen wird die Aufgabe der passiven Stabilisation einer Zelle zugeschrieben, da sie oftmals quer durch das Zytoplasma verschiedene Zell-Zell-Kontakte miteinander verbinden (Alberts et al., 1994).

Die Moleküle des Zytoskeletts nehmen Kräfte auf, die auf die Plasmamembran wirken, tragen sie ins Innere der Zelle und geben sie als Elastizität wieder an die Plasmamembran und die Umgebung ab. Zudem wird ihnen eine entscheidende Rolle als Mechanosensor zugeschrieben. So sollen mit dem Zytoskelett verbundene Proteinkinasen, Interaktionen zwischen Zytoskelett und Integrinen oder direkte Einflüsse des Zytoskeletts auf den Zellkern die Reaktionen der Zellen auf mechanische Kräfte außerhalb der Zelle vermitteln (Ali et al., 2002).

In der Plasmamembran der Zelle sind verschiedene Makromoleküle eingebettet. Zu den durch die Membran reichenden gehören Ionenkanäle, von denen manche direkt auf mechanische Stimulation hin aktiviert werden. Dabei gibt es zwei Modelle für die Aktivierung dieser Ionenkanäle: Das eine geht von einem direkten Einwirken der gedehnten Plasmamembran auf integrale Membranmoleküle aus, die andere schlägt die Übertragung der mechanischen Kräfte durch Moleküle der Extrazellulärmatrix oder des Zytoskeletts vor, die die schwachen Verformungen der Plasmamembran per Hebelwirkung verstärken sollen (Hamill et al., 2001). So konnte gezeigt werden, dass mechanisch gesteuerte Ionenkanäle der Stereozilien von Haarzellen des Innenohrs ihre Fähigkeit zur Mechanotransduktion verlieren, wenn ihre Verbindung zu extrazellulären fadenförmigen Strukturen (tip links) durch Ca^{++} -Chelatoren zerstört wurde. Nach Rückbildung der Kontakte bildete sich die Fähigkeit zur Mechanotransduktion wieder zurück (Ziiao et al., 1996).

Einer der wichtigsten Effekte der Mechanotransduktion ist der Ca^{++} -Einstrom in Zellen, wie er durch mechanische Stimulation für Fibroblasten, Cardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Haarzellen und Neurone ge-

zeigt werden konnte (Hamill et al., 2001). Eine Veränderung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration führt zu verschiedensten zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Kontraktion, Zellwanderung oder Apoptose, indem Ca^{++} viele Signaltransduktionswege anstößt.

Zudem kann es unter Scherstress zu einer veränderten Genexpression kommen, die direkt auf die mechanische Krafteinwirkung auf die Zelle zurückzuführen ist. So konnte Resnick 1993 ein Scherstress-responsives Element (SSRE) im Promotor der PDGF-B-Kette identifizieren, das für die Mechanosensitivität des Promotors unerlässlich ist (Resnick et al., 1993). An dieses sechs Basenpaare lange Element bindet der nukleäre Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{-B}$, für den gezeigt wurde, dass er unter Scherstress-Einwirkung in den Zellkern wandert, nachdem er durch die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase IKK von dem ihn blockierenden Protein $\text{I}\kappa\text{-B}$ befreit wurde (Zandi et al., 1997). Die Signalwege, die von der mechanischen Kraft der Zelloberfläche zur Kinase IKK führen sind bisher nicht bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass die IKK von der Proteinkinase C (PK-C) aktiviert werden kann (Alberts et al., 1994). Inwieweit durch Scherstress stimulierte G-Proteine eine Rolle bei der Aktivierung der PK-C spielen (Gudi et al., 1996), muss noch genauer geklärt werden.

1.1.2 Endothelzellen unter mechanischer Krafteinwirkung

Endothelzellen sind in besonderer Weise mechanischer Krafteinwirkung ausgesetzt. So übt der systemische Blutdruck eine vertikale Kraft auf die Zellen aus, die im arteriellen System unter physiologischen Bedingungen im Mittel 100 mmHg liegt, im venösen System aber nur 0 - 20 mmHg beträgt. Zusätzlich erzeugt das vorbeiströmende Blut eine tangential auf die Zellen einwirkende Scherkraft aus, die im arteriellen System durchschnittlich einen laminaren Scherstress von 12 dyn/cm^2 erzeugt, an Gefäßverzweigungen aber auch 30 dyn/cm^2 erreichen kann (Davies, 1995).

Endothelzellen ändern unter Scherstress ihre Gestalt (Abb. 2.1.1). Sie werden länglich und richten sich in Flussrichtung aus, ohne dabei geschädigt zu werden (Levesque et al., 1989). Die Expression der löslichen Stickoxidsynthase (NOS) wird heraufgefahren, so dass vermehrt NO von der Endothelzelle gebildet wird, das zu einer Vasodilatation führt. Im Gegensatz dazu bewirkt das ebenfalls ver-

mehrt exprimierte Endothelin-1 (ET-1) eine starke Vasokonstriktion. (Uematsu et al., 1995).

Die Promotoren von NOS und Endothelin-1 enthalten wie der Promotor der PDGF-B-Kette das von Resnick erstmals beschriebene Scherstress-responsive Element (SSRE), das aus den sechs Basen GAGACC besteht (Resnik et al., 1993). Dieses Promotorelement konnte ebenfalls für den Wachstumsfaktor TGF- β , ET-1, Thrombomodulin, den Plasminogenaktivator t-PA und das kardiale natriuretische Peptid, CNP, nachgewiesen werden (Sumpio et al., 1997).

Als möglicher Signaltransduktionsweg wurde von Chien (Chien, 1998) eine Detektion der Scherkraft über Integrine wie $\alpha\beta3$ vorgeschlagen, die über die Kinase in den fokalen Adhäsionskontakten (FAK und c-*Src*) JNK und IKK aktivieren können. Die I κ B-Kinase IKK degradiert I κ B, was zur Freisetzung von NF κ -B führt, der in den Zellkern verlagert wird (Zandi et al., 1997). Dort kann NF κ -B an das SSRE binden, was zur Transkriptionsinduktion und damit zur gesteigerten Expression der Genprodukte führt (Khachigian et al., 1995).

Dagegen konnte gezeigt werden, dass Adrenomedullin, dessen Promotor ebenfalls das SSRE enthält, bei einsetzendem Scherstress in Abhängigkeit der Stärke und Dauer herabreguliert wird (Shinoki et al., 1998).

1.1.3 Reaktion des Knochens auf mechanische Kräfte

Die Knochenform ändert sich schnell unter dem Einfluss mechanischer Beanspruchung. Dabei nimmt die Knochenmatrix den Hauptteil der mechanischen Kraft auf und wird von Osteoklasten und -blasten umgebaut (Martin et al., 1989).

Die Deformierung des Knochens wirkt als Druck- und Zugspannung, Torsionsspannung und als Schubspannung auf die Knochenmatrix und -zellen (Drenckhahn, 2003). Durch die wässrige Füllung der Knochenarchitektur erzeugen mechanische Kräfte einen Flüssigkeitsstrom, der als Scherstress auf die Knochenzellen einwirkt (Turner et al., 1994).

Als Mechanorezeptor werden die Osteozyten angenommen und obwohl der Mechanosensor dieser Zellen noch nicht eindeutig zu identifizieren war, werden transmembrane Ionenkanäle (Gracia-Anoveroes et al., 1997), Bestandteile des Zy-

toskeletts (Tanaka-Kamioka et al., 1998) oder ein Ca^{++} -Einstrom (Hung et al., 1996) vorgeschlagen.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Gene scheint das Scherstress-responsive Element (SSRE) zu spielen. Es wurde nicht nur in den in Knochen unter mechanischer Stimulation hochregulierten Genen von iNOS, cox-2 und OPN gefunden, sondern auch im Promotor des c-fos-Gens (Nomura et al., 2000). Das Produkt des c-fos-Gens verbindet sich mit dem des c-JUN-Gens zum Transkriptionsfaktor AP-1, der die Transkription unzähliger Gene aktiviert.

1.1.4 Reaktion der Muskelzellen auf mechanische Kräfte

In Muskelzellen führt mechanischer Stress zu einer Aktivierung verschiedenster Proteinkinasen wie Raf-1 und der MAP-Kinase. Dies wiederum führt u. a. zu einer gesteigerten Produktion vasoaktiver Peptide wie Ang II und ET-1, die die Muskelzellen zur Hypertrophie bringen (Sadoshima et al., 1993). Auch wenn bei Muskelzellen der definitive Mechanosensor nicht gefunden wurde, konnte gezeigt werden, dass unter vielen mechanosensitiven Ionenkanälen der Na^+ - H^+ -Austauscher eine entscheidende Rolle spielt. Er ist direkt mit dem Signalweg der MAP-Kinase verbunden und induziert unter mechanischer Beanspruchung eine Hypertrophie der Myozyten über den oben beschriebenen Weg (Yamazaki et al., 1998).

1.1.5 Reaktion des Urothels auf mechanische Kräfte

Auch das Transitionalepithel der harnableitenden Wege ist mechanischer Kraftwirkung ausgesetzt. Dabei steht die Dehnungskraft, Druck und durch den Urin erzeugte Scherkraft im Vordergrund. Diese Kraft wirkt auf Zellen, die durch dicht organisierte Zonulae occludentes miteinander verbunden sind und bei Dehnung von einer kubischen in eine lang gestreckte Form übergehen (Drenckhahn, 2003). Bei dieser Transformierung bauen die Deckzellen des Urothels dehnungsabhängig Vesikel mit transmembranen Uroplakin-Molekülen in ihre Zellmembran ein, die zuvor im Zytoplasma in elektronenmikroskopisch dichten, diskoiden Vesikeln vorlagen (Apodaca, 2001).

Dehnungsstress führt in Urothelzellen zu einer Expressionssteigerung verschiedener Gene wie iNOS, IL-6 oder OPN (Coplen et al., 1995). Diese Gene besitzen in ihren Promotoren Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1, ein Komplex der Produkte des c-fos- und c-JUN-Gens. Das c-JUN-Gen wird von JNK ak-

tiviert, für das gezeigt werden konnte, dass es in mechanisch stimulierten Urothelzellen über eine Unterdrückung des Proteins IB1/JIP-1 kräftig hochreguliert wird (Tawadros et al., 2002). In den Promotoren der iNOS- und OPN-Gene findet sich aber auch das SSRE (Nomura et al., 2000), dessen Rolle im Urothel noch nicht untersucht wurde.

1.2 Biologie von PDGF

1.2.1 Vorkommen von PDGF

Der „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) wurde 1974 als Bestandteil des Vollblutserums gefunden, der in zellfrei gewonnenem Blutserum fehlt (Ross et al., 1974). Obwohl in der Folgezeit PDGF vor allem aus den α -Granula der Blutplättchen aufgereinigt wurde (Antoniades et al., 1979), da es dort die höchsten Konzentrationen erreicht, haben Untersuchungen gezeigt, dass PDGF von einer Vielzahl an Zelltypen synthetisiert werden kann. Neben Gefäßendothelzellen (Dicorleto et al., 1983), Zytotrophoblasten der Plazenta (Goustin et al., 1985), Makrophagen (Shimokado et al., 1985), Fibroblasten (Paulsson et al., 1987) und Megakaryozyten des Knochenmarks (Gladwin et al., 1990) produzieren vor allem glatten Muskelzellen (Seifert et al. 1984) das Protein, dessen Wirkung weit über die des reinen Wachstumsfaktor hinausgeht.

1.2.2 Funktion von PDGF

PDGF kommt nahezu ubiquitär im menschlichen Körper vor und spielt eine entscheidende Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsschritten, kontinuierlicher epithelialer Zellerneuerung und besonders in der Wundheilung.

In Versuchen mit PDGF-defizienten Mäusen war beispielsweise die Nierenentwicklung durch Fehlen des Mesangiums ebenso wie die Angiogenese schwer gestört. Es wurde eine extrem erweiterte Aorta beobachtet und das Herz der Mäuse war vergrößert und stark trabekuliert (Leveen et al., 1994). Die Alveolen der Lungen reiften nicht aus, so dass die Mäuse mit Emphysemen zur Welt kamen, und es traten Fehlbildungen des Schädels auf (Boström et al., 1996).

Im adulten Gefäßsystem sorgt PDGF durch Induktion der NO-Bildung in Endothelzellen für eine Relaxation der Media-Myozyten der Gefäße und damit für eine Senkung des Blutdrucks (Cunningham et al. 1992). Außerdem kontrolliert der Plättchen-Wachstumsfaktor die Thrombozyten-Aggregation. Nach dem Muster

einer autokrinen Rückkopplungs-Schleife wird das PDGF aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt, wenn diese durch Thrombin zur Verklumpung gebracht werden (Bryckaert et al., 1989).

Die chemotaktische und mitogene Potenz des PDGF wird bei der Wundheilung offenbar: Das Wundsekret zerstörten Bindegewebes enthält relativ hohe PDGF-Konzentrationen (Soma et al., 1992), während die Zellen des geschädigten Gebiets eine hohe Expression des PDGF-Rezeptors bieten (Antoniades et al., 1991). Der Wachstumsfaktor lockt parakrin nicht nur neutrophile Granulozyten und Makrophagen zum Abbau von Zelldetritus, Fibroblasten und glatte Muskelzellen zur Restrukturierung des Wundgebiets an, sondern sorgt durch seine mitogene Wirkung auch für die Vermehrung und Aktivitätssteigerung dieser Zelltypen (Heldin et al., 1996). Mit PDGF behandelte Wunden zeigten in Studien eine Zunahme an Granulationsgewebe, das reich an Extrazellulärmatrix-produzierenden Fibroblasten war und das eine beschleunigte Reepithelialisierung und Neovaskularisierung aufwies (Pierce et al., 1991).

1.2.3 Pathologie der unkontrollierten PDGF-Expression

PDGF gehört zur Familie der Proto-Onkogene. So ist die Vorstufe der PDGF-B-Kette identisch mit dem v-sis-Onkogen des SSV-Virus, das Zellen mit PDGF-Rezeptor in die autokrine Transformation treibt. In Versuchstieren konnten so Fibrosarkome, Gliome und Fibropapillome induziert werden. In vielen menschlichen Tumorspezies wurde die Expression von PDGF und seinem Rezeptor nachgewiesen. Es ist aber bis heute unklar, ob der Wachstumsfaktor eine entscheidende Rolle in der Initiation oder nur in der Promotion einer Neoplasie spielt. (Heldin et al., 1999).

In der Niere führt eine Überexpression des Wachstumsfaktors zur Proliferation der Mesangiumzellen, die verstärkt Kollagen synthetisieren. Dies kann zu einer Nierenfibrose führen, für die der Zusammenhang zur PDGF-Überexpression bei der IgA-Nephritis, der membranproliferativen Glomerulonephritis und der Nephritis bei systemischem Lupus erythematoses gezeigt werden konnte (Abboud et al., 1995).

Das erbliche Hermansky-Pudlak-Syndrom zeichnet sich durch eine entstehende Lungenfibrose aus. Dabei konnte in Bronchiallavagen erkrankter wie asymptomata-

tischer Patienten eine deutlich erhöhte Konzentration von PDGF nachgewiesen werden, die pathogenetisch wirksam ist (Harmon et al., 1994). Eine Überexpression von PDGF wurde ebenfalls für andere Arten der Lungenfibrose nachgewiesen, wie bei der Bronchiolitis obliterans, Sarkoidose, Asbestose, Histiozytose X, obliterierender Bronchiolitis nach Lungentransplantation und pulmonaler Hypertension.

Während eine basale Expression des PDGF in Endothelien des Gesunden physiologisch ist, ist sie in Gebieten der fibroproliferativen Entzündungsreaktion der Gefäßwand deutlich angehoben. Dieser für die Arteriosklerose charakteristische Prozess legt die pathogene Rolle des Wachstumsfaktors für die „Volkskrankheit“ nahe (Aldons, 2000). So konnte gezeigt werden, dass in arteriosklerotischen Plaques mit erhöhter PDGF-Expression der Wachstumsfaktor glatte Muskelzellen der Media chemotaktisch in die Intima des Gefäßes lockt und dort die Umwandlung der Myozyten in Matrixmoleküle-produzierende Myofibroblasten propagiert (Pompili et al., 1995). Die so erfolgende Organisation des arteriosklerotischen Plaques konnte bei Kaninchen mit extrem erhöhten Cholesterin-Werten durch eine Immunisation gegen PDGF verhindert werden (Rutherford et al., 1997).

1.2.4 PDGF-Gene und deren Regulation am Beispiel des PDGF-B-Gens

Die Gene für die A- bzw. B-Kette des PDGF befinden sich auf den Chromosomen 7 und 22. Sie besitzen sieben Exons, wobei die Exons 4 und 5 die Information für das endgültige Protein tragen. Die Polypeptid-Produkte der anderen Exons werden während der Prozessierung der PDGF-Vorstufen abgespalten (Bonthron et al., 1988).

Die Synthese von PDGF wird durch Stimuli wie Thrombin, Gewebsverletzung, Sauerstoffmangel, Zytokine oder mechanische Stimulation der Zellen gesteigert. Obwohl die meisten Zelltypen A- und B-Kette zu gleichen Teilen produzieren, ist die Expressionskontrolle der einzelnen Ketten unabhängig von einander (Dirks et al., 1996).

Der Promotor der PDGF-B-Kette besitzt eine „Sis proximal element“ (SPE) genannte regulatorische Einheit, die mit einem CACCC-Motiv die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 bindet (Liang et al., 1996). Eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der AP-1- und Ets-Familien wurden im Promotor genauso

ausgemacht (Khachigian et al., 1994) wie Transkriptionsverstärker im ersten Intron des PDGF-B-Gens (Franklin et al., 1991).

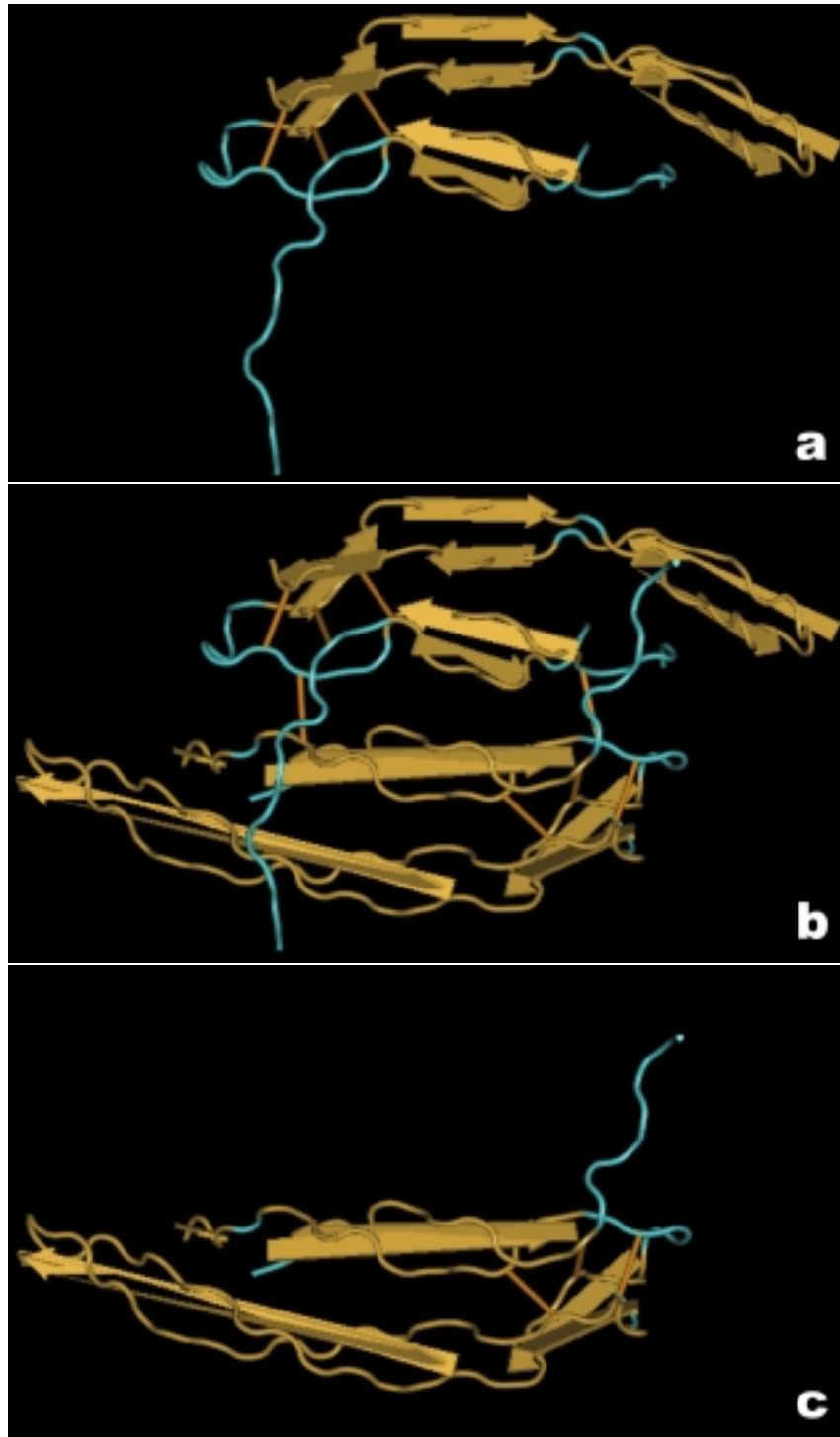
Endothelzellen produzieren unter Scherstress verstärkt PDGF-mRNA (Hsie et al., 1992). Dafür soll ein im Promotor gelegenes Element verantwortlich sein, das von NF κ -B aktiviert wird (Khachigian et al., 1995). Das cis-aktive Element besitzt eine Länge von 12 bp, wobei seine Kernregion nur 6 bp lang ist (ctctcaGAGACC). Diese Basenabfolge wurde aufgrund ihrer unter Strömungsbelastung vermittelten Promotorinduktion als „shear stress responsive element“ (SSRE) bezeichnet (Resnick et al., 1993). Das SSRE findet sich neben dem PDGF-Promotor auch in den Regulationsstrukturen der Gene für t-PA, TGF- β und NOSII, die ebenfalls unter Scherstress hochreguliert werden.

Bis heute im Dunkeln verbleiben die Mechanismen zur Hemmung der Transkription der B-Kette, wobei gewisse trans-aktive Elemente diskutiert werden (Leveen et al., 1993). Zur Steuerung der Translation besitzt die 3,5 kb lange mRNA des PDGF-B-Monomers eine ca. 1 kb lange 5'-untranslatierbare Sequenz, die durch ihre Struktur als starker Translationsinhibitor agiert.

1.2.5 Struktur von PDGF

Die Familie der PDGF-Isoformen besteht aus kationischen Homo- und Heterodimeren (Abb. 1.2.1 b) aus A- und B-Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Ketten sind um die 100 Aminosäuren lang, wobei die A-Kette ein Molekulargewicht von 14 000 besitzt und die B-Kette eines von 17 000. Beide Ketten weisen zu 60% Homologie auf, wobei die Cysteinreste für die Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den einzelnen Ketten an der selben Stelle der Primärstruktur konserviert sind (Hanui et al., 1994).

1992 wurde die Struktur des PDGF mit Hilfe der Röntgen-Strukturanalyse in einer Auflösung von 3,0 Å aufgeklärt (Oefner et al., 1992). Die A-Kette (Abb. 1.2.1 c) wird von drei antiparallelen Paaren aus β -Faltblättern mit drei intramolekularen Disulfidbrücken gebildet, während die B-Kette (Abb. 1.2.1 a) aus vier Paaren antiparalleler β -Faltblätter besteht, die durch drei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert sind.

Abb. 1.2.1: PDGF: Untereinheiten und Dimer-Struktur

Humanes PDGF ist ein kationisches Glykoprotein von 30 kD. Das Heterodimer [b] besteht aus einer A-Kette [c] und einer B-Kette [a], die über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Die A-Kette und B-Kette zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad.

Quelle: National Centre for Biotechnology Information, Bethesda/U.S.A. nach Oefner et al. 1992

Während sich beim Schwein PDGF-Homodimere aus B-Ketten finden (Waterfield et al., 1983) und menschliche Osteosarkomzellen ein AA-Homodimer produzieren (Heldin et al., 1984), ist das physiologisch beim Menschen gefundene PDGF ein Heterodimer aus A- und B-Kette (Antoniades, 1981). Die beiden Isoformen fügen sich in einer entgegengesetzten Art eng zusammen, so dass das entstandene Heterodimer ein geringeres Molekulargewicht von 30 kD besitzt als die beiden unterschiedlichen Monomere zusammen (A-Kette 14 kD, B-Kette 17 kD). Die dreidimensionale Struktur des PDGF ähnelt einem Knoten, der von den Cystinresten geformt wird. Sie ähnelt damit der Form des VEGF („vascular endothelial cell growth factor“), des TGF- β („transforming growth factor β) und des neuronalen Wachstumsfaktor NGF (Murray-Rust et al., 1993).

1.2.6 PDGF-Rezeptor

Der PDGF-Rezeptor besteht aus zwei strukturell verwandten Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Proteinen (Abb. 1.2.2). Die glykosilierten α - und β -Rezeptoren haben ein Molekulargewicht von 170 000 bzw. 180 000 und bestehen aus einer extrazellulären Immunglobulin-Einheit und einer zytosolischen Tyrosinkinase (Matsui et al., 1989). Die drei äußeren Immunglobulin-Domänen binden das PDGF-Dimer, die vierte interagiert bei der Dimerisation der Rezeptor-Proteine mit ihrem Partner der Gegenseite (Yu et al., 1994).

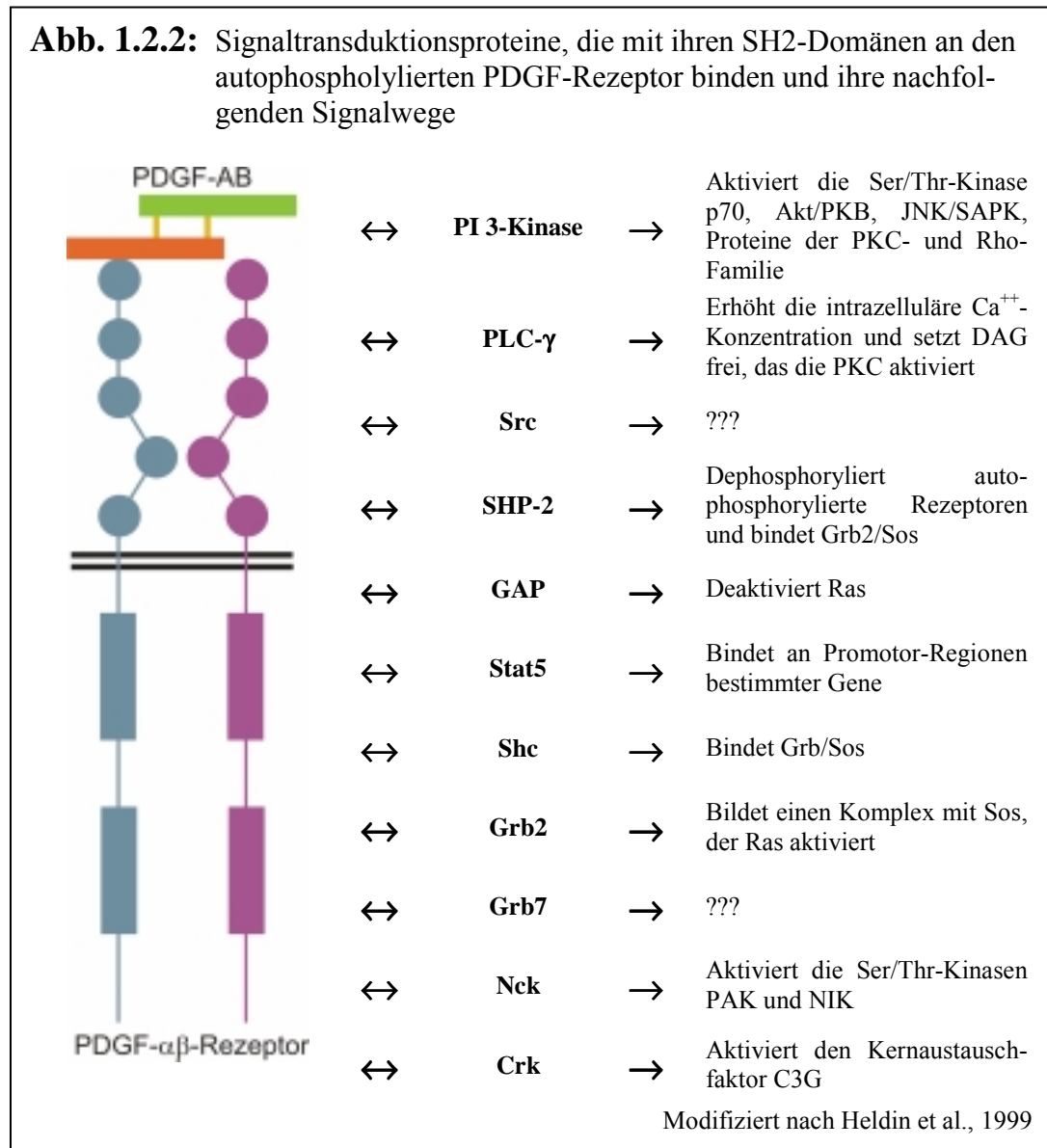
Das menschliche PDGF-AB-Dimer bindet sowohl an das $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homomer als auch an das $\alpha\beta$ -Heteromer allerdings nicht an das $\beta\beta$ -Rezeptor-Dimer. Durch die durch die PDGF-Bindung erzeugte Dimerisation des Rezeptors wird die intrazelluläre Domäne durch gegenseitige Phosphorylierung der Untereinheiten aktiviert (Kanakaraj et al., 1991).

1.2.7 Zelluläre Effekte von aktiviertem PDGF-Rezeptor

Die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptor-Dimers schafft eine Bindungsstelle für Signalproteine mit SH2-Untereinheiten. Da dieses Motiv weit verbreitet ist, bindet eine große Anzahl an Signalproteinen an den PDGF-Rezeptor (Abb. 1.2.2). Moleküle wie die PI 3-Kinase, die PLC- γ , die Tyrosinkinasen der Src-Familie, die Tyrosinphosphatase SHP-2 oder das GAP des Ras-Wegs sind selbst Enzyme während Proteine der STAT-Familie Transkriptionsfaktoren sind, die nach ihrer

Phosphorylierung und anschließenden Dimerisierung in den Zellkern wandern und die Expression bestimmter Gene steuern (Heldin et al., 1999).

So werden etliche intrazelluläre Signalwege angeworfen, die zu den unterschiedlichsten zellulären Reaktionen führen können.



1.2.8 Deaktivierung des PDGF-Rezeptors

Der PDGF-Rezeptor ist nicht gleichmäßig über die Zellmembran verteilt. Besonders stark ist sein Vorkommen in Caveolae und Membraneinstülpungen, die anschließend endozytiert werden (Liu et al., 1996). Das PDGF löst sich in den Endosomen vom Rezeptor, der entweder zurück in die Zellmembran gelangt oder bei Fusion der Endosomen mit Lysosomen degradiert wird. Da die Ausstattung einer

Zelle mit PDGF-Rezeptoren Einfluss auf die mitogene Wirkung des PDGF hat, wird der Abbau des Rezeptors über eine in seiner cytosolischen Domäne enthaltene Kinase-Aktivität ebenso wie durch die zytosolische PI 3-Kinase gesteuert (Sorkin et al., 1991).

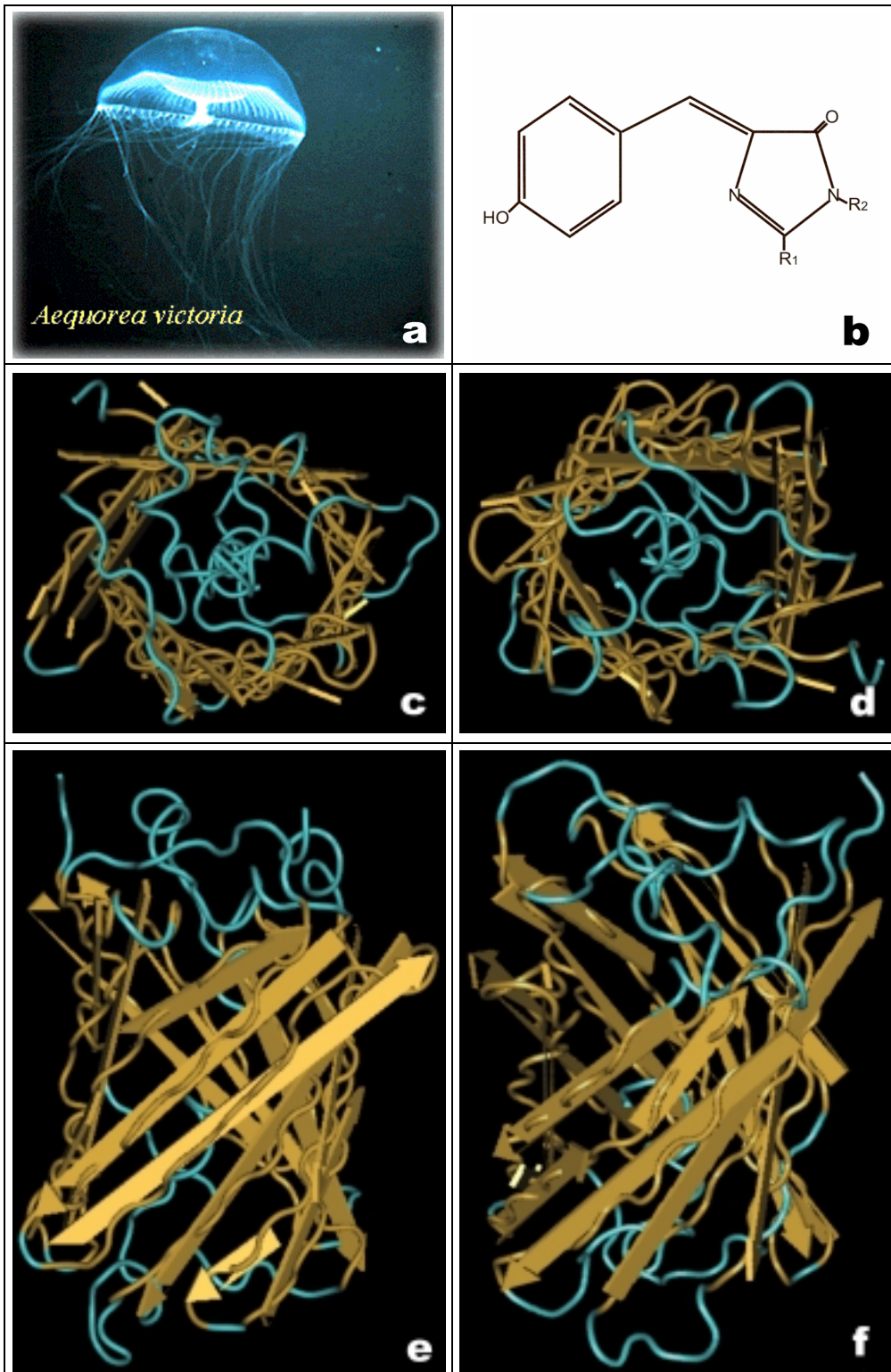
1.3 Das Reporterprotein EGFP

Die Klonierung des „green fluorescent protein“-Wildtyps (w_t GFP) aus der Meduse *Aequorea victoria* (Abb. 1.3.1 a) und die folgende Expression in verschiedenen Zellsystemen gab der Forschung ein kräftiges Werkzeug zur Hand. Mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konnten aussagekräftige Reportersysteme zur Gen-expression und Lokalisation von Proteinen etabliert werden. Dabei besitzt das GFP den großen Vorteil, dass das emittierte Lichtsignal in lebenden Zellen detektiert werden kann, was eine Beobachtung einer Kinetik in Echtzeit gestattet (Zimmer M, 2002).

In den letzten Jahren wurden immer mehr Verbesserungen an dem Protein vorgenommen, die die limitierten Einsatzmöglichkeiten des w_t GFP ausweiteten. Eines dieser Derivate ist das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP), das heller und stabiler ist. EGFP hat im Vergleich zum Wildtyp-Protein ein einziges, in den Rot-Bereich verschobenes Anregungsmaximum (Abb. 1.3.2) und eine um den Faktor 35 kräftigere Fluoreszenz (Haas J et al., 1996).

Um eine best mögliche Expression des EGFP-Gens in Säuger-Zellen zu erreichen, wurden in der codierenden Basensequenz mehr als 190 stille Mutationen vorgenommen, die das Codon-Muster der Meduse *Aequorea victoria* dem der Säuger anpasste (Haas J et al., 1996; Tsien RY, 1998). Unter Kontrolle diverser Promotoren wird das EGFP-Gen transkribiert und ribosomal translatiert. Es verbleibt cytosolisch und ist sehr unempfindlich gegenüber Quench-Agenzien, Ausbleichen und Proteolyse (Zimmer M, 2002).

Die molekulare Struktur des GFP wurde 1996 mit einer Auflösung von 1.9 Å aufgeklärt (Yang F et al., 1996). Das Protein besitzt die Form eines Zylinders, der von 11 β -Faltblättern gebildet wird (Abb. 1.3.1 e und f). Im Innern des Zylinders findet sich eine α -Helix, die das Chromophor trägt (Abb. 1.3.1 c und d). Kurze helikale Segmente schließen den Zylinder an der Ober- und Unterseite ab (Abb.

Abb. 1.3.1: EGFP: Vorkommen und Struktur

- a)** Meduse *Aequorea victoria*. Das Tier produziert das native GFP in seinen Lichtorganen.
- b)** Chromophor des EGFP aus einem Phenolring, verbunden über eine CH-Gruppe mit einem Imidazol-Ring. R₁ steht für den Peptidrest der Positionen 1 bis 64, R₂ für den der Position ab 67.
- c)** und **d)** Tertiärstruktur des EGFP: Blick von oben und unten in die Dosenstruktur. Das Chromophor sitzt mittig in der runden Form und wird von umgebenden β -Faltblättern geschützt.
- e)** und **f)** Tertiärstruktur des EGFP: Blick von den Seiten auf die zylinderartige dreidimensionale Struktur des EGFP, die von β -Faltblättern gebildet und von α -Helices geschlossen wird.
- Quelle: National Centre for Biotechnology Information, Bethesda/U.S.A. nach van Thor 2002

1.3.1 e und f). Dieses Motiv mit β -Faltblättern an der Außenseite und einer mittleren α -Helix war bis dato noch nicht beobachtet worden und erhielt den Namen „ β -can“

Die dosenartige Struktur des GFP mit dem mittleren Chromophor erklärt auch dessen Unempfindlichkeit gegenüber klassischen Quench-Agenzien wie Acrylamid und molekularem Sauerstoff (Rao et al, 1980). Die fast abgeschlossene, kompakte dreidimensionale Struktur ist auch selbst sehr widerstandsfähig gegenüber Verdau durch Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Proteinase K, Papain, Pankreatin und Pronase (Bokman und Ward, 1981)

Das Chromophor des GFP ist ein cyclisches Tripeptid, das in der Primärstruktur vorhanden ist und im Innern der „ β -can“ aus räumlich nahe zueinander liegenden Aminosäureresten gebildet wird (Cody CW et al., 1993). Es entsteht durch die Bildung eines aromatischen Ringsystems aus Tyr₆₆ mit der Reduktion seiner C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ -Bindung zusammen mit einer Ringbildung des benachbarten Glycin₆₇- und Serin₆₅-Rests (Yang F et al., 1996). Das fertige Chromophor besteht aus einem Phenolring, der über eine CH-Gruppe mit einem Imidazol-Ring verbunden ist (Abb. 1.3.1 b).

Die Bildung des Chromophors ist abhängig von molekularem Sauerstoff, der an die Tyrosin₆₆-Seitenkette angreift (Heim et al., 1994) und erfolgt spontan posttranslational (Inouye S, Tsuji FI, 1994).

Die Aktivierung des GFP ist nicht substrat- oder enzymabhängig (Heim R et al., 1994). Das Protein ist ein klassisches sekundäres Photoprotein bioluminiszenter mariner Organismen (Phillips GN Jr, 1997). Schon 1962 wurden zwei lichtemittierende Proteine aus den Lichtorganen von *Aequorea victoria* extrahiert. Aufgrund seiner Herkunft wurde das bei Zugabe von Ca⁺⁺ blau leuchtende Protein (Peak bei 460 nm) Aequorin getauft, das andere aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaft bei Anregung mit blauem Licht (Extinktionsmaximum bei 470 nm) green fluorescent protein, kurz GFP (Shimomura et al., 1962). Die Anregung des Aequorins durch Ca⁺⁺ gestattet es der Meduse, die Lichtproduktion zu kontrollieren. Durch Energietransfer in Form von Photonen auf das GFP wird das Emissionsspektrum von

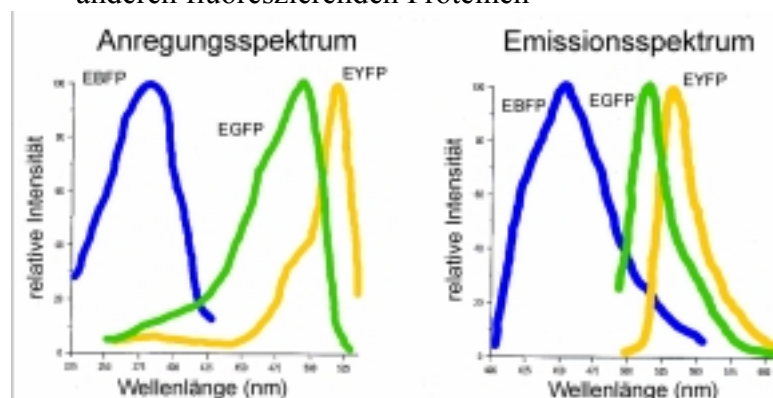
460 auf 509 nm weiter in den Rotbereich verschoben, der der Meduse eine höhere Reichweite im Ozean bietet (Zimmer M, 2002).

Außer der Anregung des GFP durch blaues Licht, wie in natura durch das Aequorin, erfolgen keine weiteren katalytischen Prozesse, eine Substratumsetzung oder Kofaktoren werden nicht benötigt. Dies prädestiniert das Protein zur Expression zu Forschungszwecken in anderen Organismen (Phillips GN Jr, 1997).

Durch Mutationen an der chromophoren Gruppe des GFP wurde das Protein immer mehr den labortechnischen Ansprüchen angepasst. So führte ein Austausch des Serin₆₅ durch Threonin gleichzeitig zu einer erhöhten Photostabilität, zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums auf 488 nm, zu einer vierfach beschleunigte Chromophorbildung und zu einem Anstieg der Fluoreszenzaktivität um ein Vielfaches. Nachdem der Codon-Gebrauch noch dem menschlichen angepasst wurde, war das EGFP geschaffen. (Heim et al., 1995).

Weitere Mutationen verschoben das Extinktions- wie das Emissions-Spektrum des Proteins (Abb. 1.3.2), wobei sich herausstellte, dass die Aminosäure Glycin₆₇ für die Chromophorbildung unerlässlich ist (Cormack et al., 1996). Mittlerweile stehen der Forschung fluoreszierende Proteine der Farben Grün, Gelb, Blau, Cyan und Rot zur Verfügung (Patterson G., 2001), die einen weitergehenden Einsatz wie zum Beispiel Doppelfluoreszenz-Mikroskopie, Fluoreszenzenergietransfer (FRET) oder Photobleich-Methoden zulassen (Yang TT, 1998).

Abb. 1.3.2: Anregungs- und Emissionsspektrum des EGFP im Vergleich zu anderen fluoreszierenden Proteinen



Das Emissions-Spektrum des EGFP zeichnet sich dadurch aus, dass es bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm (Anregungsoptimum) ein sehr enges Emissionsspektrum bietet (Emissionsmaximum bei 507 nm). Damit kann man sehr viele Hintergrundhelligkeit durch entsprechende Filter eliminieren.
Modifiziert nach Patterson et al. 2001

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, ein Reporterproteinsystem auf Basis des grünfluoreszierenden Proteins dazu zu nutzen, die Expressionskinetik des PDGF-Promotors daraufhin zu untersuchen, ob die Zellen der Ziellinie ECV304 auf Scherstress mit einer Erhöhung der Expression reagieren.

Dazu sollte für einen Messplatz eine Auswertungsmethode gefunden werden, die in Datenerfassung und Arithmetik dazu geeignet ist, unter Scherstress-Einfluss sich bewegende Zellen zu erfassen und angemessen auszuwerten.

Weiterhin sollte der Einfluss verschiedener Scherstress-Raten auf die Steigerung der über den PDGF-Promotor gesteuerten EGFP-Expression in ECV304-Zellen untersucht werden.

Zur Funktioncharakterisierung des Scherstress-responsiven Elements (SSRE) im PDGF-Promotor wurden SSRE-defiziente Promotor-Konstrukte vermessen und mit einem nativen CMV-Promotoren und einem CMV-Promotor mit inseriertem SSRE verglichen.

Anhand der ermittelten Expressionskinetiken des vom PDGF-Promotor abhängigen EGFP sollte der Einfluss verschiedener Reagenzien getestet werden, die an bestimmten Stellen in bekannte Signaltransduktionskaskaden eingreifen oder die Proteinbiosynthese beeinflussen.

2. Material

2.1 Zelllinie ECV304

1990 wurde die Zelllinie ECV304 von einem japanischen Labor (Takahashi et al., Tokyo) in die Forschung eingeführt und in zahlreichen Untersuchungen auf Grundlage der Morphologie, Cytochemie und genetischer Analysen als Endothel-Zelllinie bestätigt (Takahashi, 1992).

Sie diente seitdem als Grundlage für mehrere hundert Veröffentlichungen, die vom Verhalten endothelialer Zell-Zell-Kontakte während der Apoptose (Kee, 1999), über die endotheliale Stimulation der Gerinnungskaskade (Maderna, 1999) bis hin zu Berichten über die Potenz der Zellen zur Angiogenese (Hughes, 1996) reichen.

Schon seit 1996 wurden Unterschiede zwischen ECV304 und anderen HUVEC-Linien bemerkt. So exprimieren ECV304-Zellen keinen von-Willebrand-Faktor (Hughes, 1996), dafür aber die epithelialen Zytoskelettmarker Cytokeratin 6, 8, 10, 17, 18 und 19 (Hughes, 1996). Außerdem wurde von Howl et al. 1998 der Calcitonin-Rezeptor auf den Zellen nachgewiesen.

Spätestens als 1999 die European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) aufgrund genetischer Untersuchungen Ähnlichkeiten zwischen der Zelllinie ECV304 und einer Harnblasen-Carcinom-Zelllinie zeigte, kamen Zweifel auf, ob es sich bei der Zelllinie ECV304 tatsächlich um endotheliales Material handelt (Brown, 2000).

2.1.1 Beschreibung des Herstellers der Zelllinie ECV304

Dr. K. Takahashi, Tokio, beschrieb die von ihm gewonnene Zelllinie ECV304 in einem 1990 erschienenen Artikel als spontan transformierte EndothelZelllinie aus der Nabelschnurvene (HUVEC) eines 1984 geborenen japanischen Jungen. Die durch Transformation immortalisierten Zellen zeichneten sich durch eine hohe Proliferationsrate ohne Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren aus. In BALB/c nu/nu Mäusen seien die Zellen tumorgen und wiesen in Kultur eine für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterartige Morphologie auf.

2.1.2 Beschreibung der DSMZ der Zelllinie ECV304

Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) beschreibt die Zelllinie ECV304 mittlerweile als Zellen eines humanen Harnblasen-Carcinoms und als Derivat der Zelllinie T-24. Diese Abkunft sei eindeutig durch ein DNA-Fingerprinting gezeigt.

Das immunologische Profil der Zelllinie ECV304 sieht folgendermaßen aus:

Cytokeratin	+
Desmin	-
von Willebrand-Faktor	-
GFAP	-
Neurofilament	-
Vimentin	+

Die Beschreibung der weiteren Eigenschaften der Zelllinie stimmt mit der des Herstellers überein.

2.1.3 Beschreibung der DSMZ der Zelllinie T24

Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) beschreibt die Zelllinie T-24 als eine 1970 von Prof. W. A. Schulz (Düsseldorf) etablierte Zelllinie eines Transitionalzell-Carcinoms, Grad III einer 81-jährigen Frau. Es sind epitheloide, adherente Zellen, die in Kopfsteinpflasterartigen Monolayern wachsen. T-24 besitzt einen hohen basalen Umsatz an NO und ist in Wachstum und Proteinbiosynthese unabhängig von Plasmafaktoren.

Das immunologische Profil der Zelllinie T-24 sieht folgendermaßen aus:

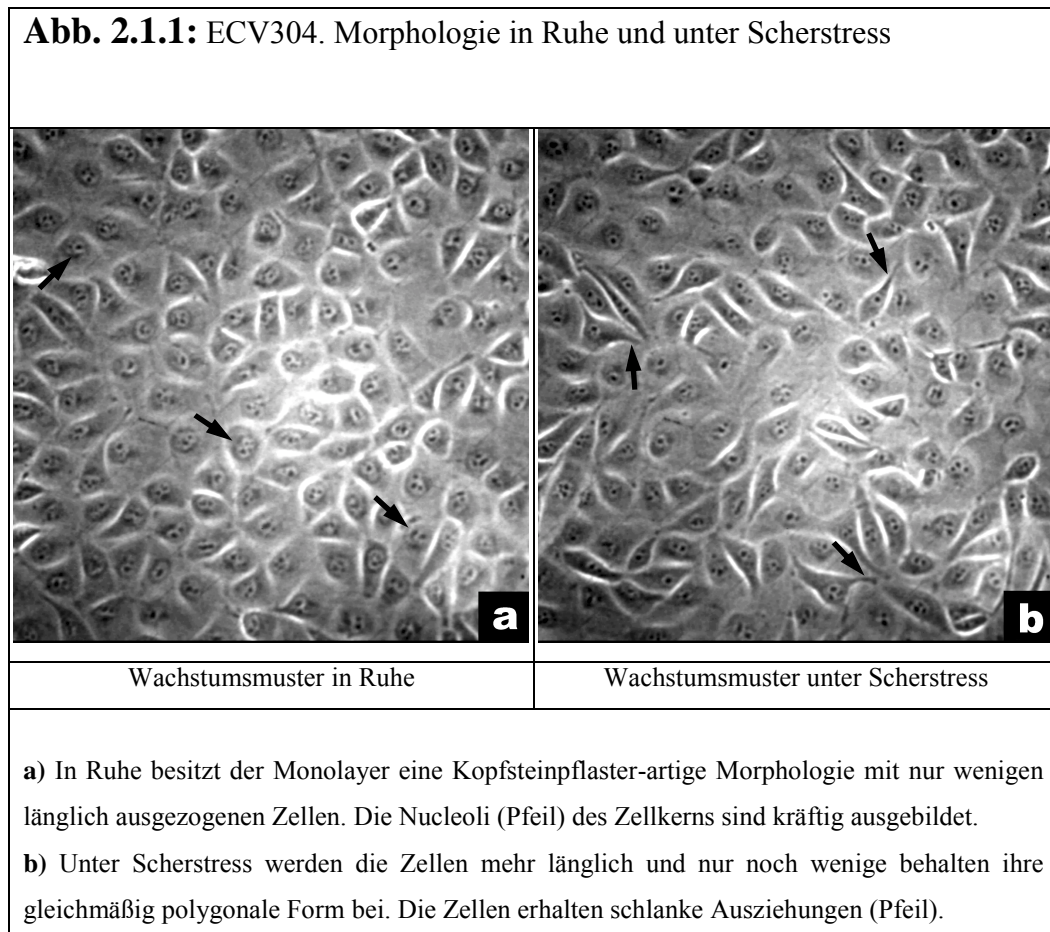
Cytokeratin	+
Desmin	-
von Willebrand-Faktor	-
GFAP	-
Neurofilament	-
Vimentin	+

2.1.4 Morphologische Beschreibung der Zelllinie ECV304

Die für diese Arbeit verwendeten Zellen der Zelllinie ECV304 besitzen in Ruhe unter Kulturbedingungen eine kopfsteinpflasterartige Morphologie mit gleichmä-

Big polygonalen Formen (Abb. 2.1.1a). Der einzelne Zellkern liegt mittig und zeigt kräftige Nukleoli (Pfeil).

Unter Scherstress verlieren die Zellen ihre gleichmäßige Form und werden mehr länglich (Abb. 2.2.1b). Sie erhalten schlanke Ausziehungen (Pfeil), behalten aber ihren Zellkern mit den kräftigen Nucleoli mittig.



2.1.5 ECV304: Endothel oder Urothel?

Nachdem die DSMZ schon 1999 die Kreuz-Kontamination humaner Tumorzelllinien beschrieben hat und die „epithelialen“ Eigenschaften der ECV304-Zellen als weitreichende Verunreinigung angesehen hat (MacLeod et al., 1999), zeigten Brown et al. 2000 die starke Ähnlichkeit der „endothelialen“ Zelllinie ECV304 und der epithelialen Zelllinie T-24 auf (Brown et al., 2000). Ein DNA-Fingerprinting zeigte die genetische Identität der beiden Zelllinien, die auch den selben Subtyp des Nukleotid-Rezeptors P2Y, P2Y₂ exprimieren. Verschiedenste Pharmaka erzielten den selben Effekt auf den cAMP-Gehalt beider Zellarten und

UTP induzierte bei ECV304-Zellen wie auch bei T-24 nicht die für Endothelzellen typische Steigerung der Produktion von Prostaglandin I₂. Durch diese Ergebnisse kamen Brown et al. zu dem Ergebnis, dass ECV304 ein Derivat der Zelllinie T-24 ist und somit nicht als Endothelmodell geeignet.

Moderater urteilt Suda (Suda et al., 2001), die zwar den identischen Genotyp der Blasen-Ca-Linie und der Zelllinie ECV304 betont, gleichzeitig aber darauf hinweist, dass die Zelllinien sich enorm in Wachstumsverhalten, Cytoarchitektur, der Anordnung ihrer Tight junctions, dem elektrischen Membranwiderstand und einigen Enzymaktivitäten unterscheiden. Suda et al. konnten sogar von Willebrand-Faktor in ECV304-Zellen nachweisen und zeigen, dass sie wie Endothelzellen low-density lipoprotein aufnehmen. Zudem weisen ECV304-Zellen zwar den Epithel-Marker Cytokeratin 18 auf, wohingegen T-24-Zellen hauptsächlich Cytokeratin 8 exprimieren. Von Suda et al. wird ECV304 weiterhin als geeignetes Modell für Endothelzellen angesehen.

Als Antwort ist der Artikel von Drexel et al. anzusehen (Drexel et al., 2002). Mit Verweis auf den Genotyp, fehlende Endothelmarker, positiven Epithelmarkern und dem klaren Nachweis der Verunreinigung der Herstellerquelle kommt für ihn die Zelllinie ECV304 auf keinen Fall als Endothelmodell in Frage.

Zum Abschluss dieser Diskussion sollte nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Zelllinie ECV304 eine immortalisierte Linie ist, die damit nicht das physiologische Genexpressionsmuster einer nativen Zelllinie aufweist, egal ob sie nun endothelialen oder epithelialen Ursprungs sein mag.

Deshalb sollte man sie als das ansehen, was sie ist: eine immortalisierte Zelllinie unklaren Ursprungs mit gewissen endothelialen Eigenschaften, die in dieser Arbeit als stabiles Modellsystem zur Untersuchung der Expressionsregulation eines eingebrachten Promotor-Konstrukts genutzt wurde.

2.2 Stabiltransfizierte ECV304-Zellklone

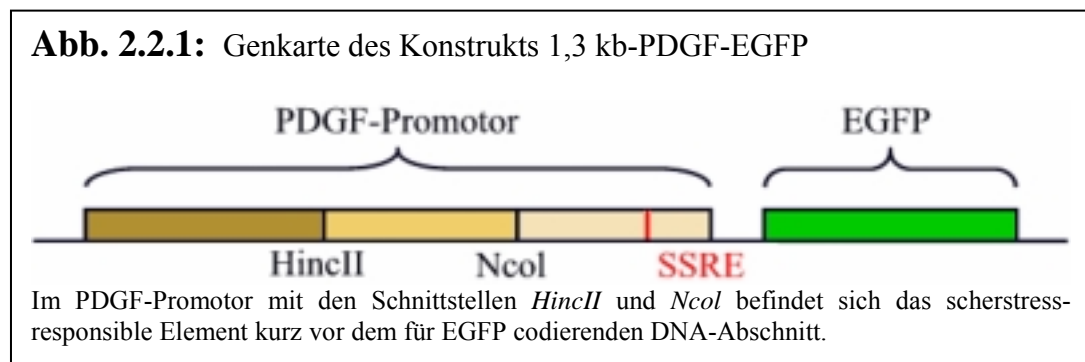
Die Klonkonstrukte der Zelllinie ECV304 wurden von Frau Karin Schwarz im Rahmen ihrer Doktorarbeit am Anatomischen Institut der Universität Würzburg erstellt und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der PDGF-Promotor wurde mittels PCR aus dem Genom amplifiziert und in den Polylinker des pBlueskript-Plasmids (pKS, EcoRV geschnitten) kloniert. Nach

Umklonierung in einen eukaryontischen Expressionsvektor (über HindIII und KpnI) wurde durch Restriktionsverdau zum einen ein Expressionskonstrukt mit intaktem PDGF-Promotor und EGFP erstellt, zum anderen wurde das Scherstress-responsive Element (SSRE) selektiv aus dem PDGF-Promotor herausgeschnitten. Als Kontrollvektor wurde aus dem eukaryontischen Expressionsvektor der PDGF-Promotor entfernt, so dass die Expression von EGFP hier unter die Kontrolle des im Vektor enthaltenen CMV-Promotors gestellt wurde. Dieser besitzt nachweislich kein Scherstress-responsives Element oder eine diesem verwandte Struktur. Um die Wirkung des SSRE auszutesten, wurde in ein weiteres Plasmid das Scherstresselement mittels *In vitro*-Mutagenese in den CMV-Promotor kloniert

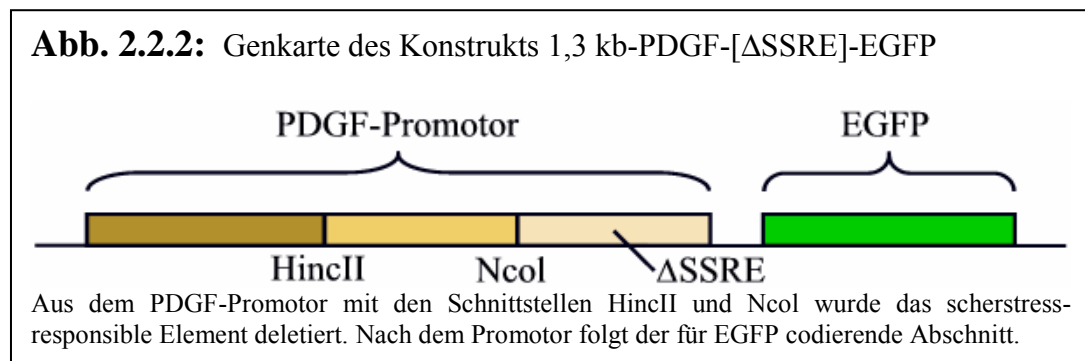
2.2.1 ECV304-Zellklon mit Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP

Stabil transfizierter Zellklon, der das EGFP unter Kontrolle des vollständigen PDGF-Promotors exprimiert.



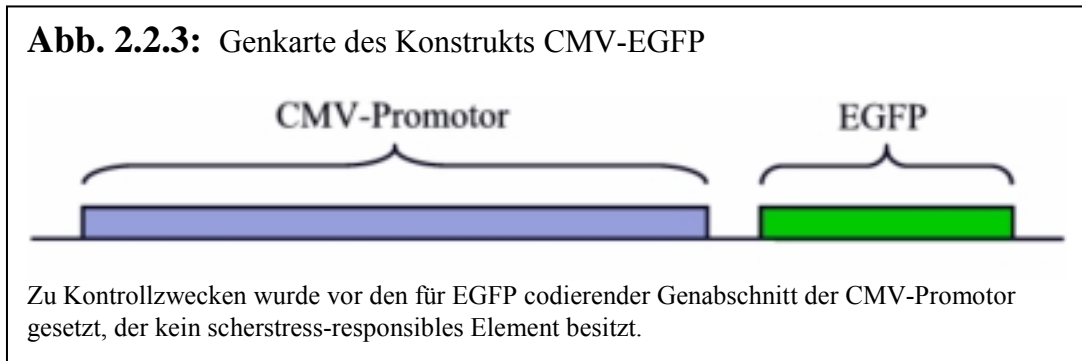
2.2.2 ECV304-Zellklon mit Konstrukt 1,3 kb-PDGF-[Δ SSRE]-EGFP

Stabil transfizierter Zellklon, der das EGFP unter Kontrolle des PDGF-Promotors exprimiert, in dem das SSRE deletiert ist.



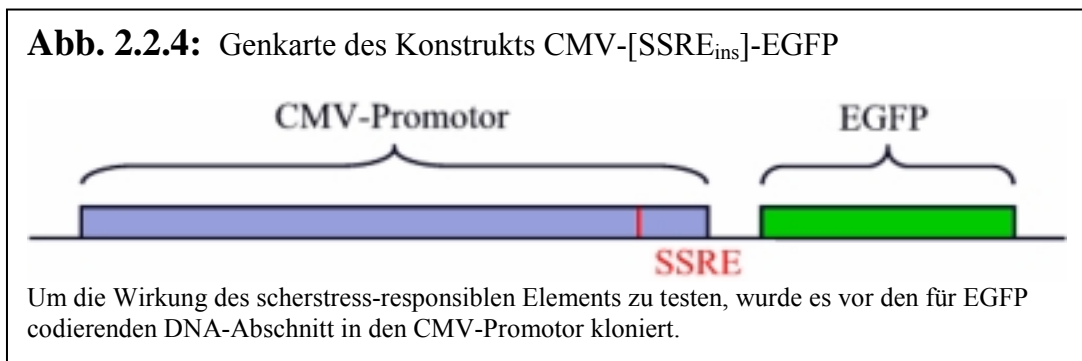
2.2.3 ECV304-Zellklon mit Konstrukt CMV-EGFP-ECV

Stabil transfizierter Zellklon, der das EGFP unter der Kontrolle des CMV als Kontrollkonstrukt exprimiert.



2.2.4 ECV304-Zellklon mit Konstrukt CMV-[SSRE_{ins}]-EGFP-ECV

Stabil transfizierter Zellklon, der das EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert, der das SSRE als Insertion trägt.



2.3 Medium für die Kultivierung von Zellen

Für die Kultivierung der Zelllinie ECV304 wird das Standardmedium M199 (mit Earle-Salzen, ohne L-Glutamin, ohne Natriumhydrogencarbonat) der Firma GIBCO BRL verwendet. Die fertige Pulvermischung wird in 5l H₂O (Ampuwa) gelöst, mit 11g Natriumcarbonat und L-Glutamin (f.c. 2 mM) versetzt und sterilfiltriert. Vor Gebrauch wird 10% fetales Kälberserum zugesetzt

2.4 Puffer und Lösungen

PBS, phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,3:

137,00 mM NaCl

2,68 mM KCl

6,50 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

2.5 Chemikalien

Ampuwa	Fresenius
Calphostin C	Sigma
Cheleyrtrin	Sigma
Cycloheximid	Sigma
Ethanol	Apotheke
FCS	Biochrom
Gelatine	Sigma
Glutamin 220 mM	Biochrom
Glutaraldehyd	Roth
Medium 199	GIBCO BRL
Penicillin 50 U/ml	GIBCO BRL
Phorbolester	Sigma
Silikongel Baysilone-Paste, mittelviskös	Bayer
Streptomycin 50 U/ml	GIBCO BRL
Trypsin 0,05% in PBS	Serva

2.6 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
ARGUS-50 Image Processor	Hamamatsu
Autoklav	Tecnomara
Computer mit Monitor	Vobis
Filterwechsler Lambda 10-2	Sutter Instruement Company
Fluoreszenzlampe VXHC 75/100 W	Zeiss
Flusskammer	Institutswerkstatt
Heizwasserbad	GFL
ICCD-Photonenkamera C 2400	Hamamatsu
Image Intensifier	Hamamatsu
Mikroskop Invers Axiovert 135 TV	Zeiss
Monitor M-433	Sony
Pipettus	Eppendorf
Rollenpumpe BV-GES	Istatec

Zentrifuge 5471R Eppendorf

2.7 Software

ARGUS-50 Control Program Hamamatsu
ARGUS-50/Ca Hamamatsu
Filter Exchanger Program Hamamatsu
Microsoft Editor 5.1 Microsoft
Microsoft Exel 2000 Microsoft
Microsoft PhotoDrawV2 Microsoft
Microsoft Word 2000 Microsoft

2.8 Sonstiges Material

Aluminiumfolie Hartenstein
Automatikpipetten Eppendorf
Bechergläser 10, 50, 500 ml Hartenstein
Bluecap 25 ml Greiner
Bluecap 50 ml Greiner
Einweghandschuhe Baxter
Gewebekulturflasche T₂₅ Greiner
Gewebekulturflasche T₇₅ Greiner
Glaspipetten Hartenstein
Parafilm American National
Petrischale Ø 30 mm Greiner
Petrischale Ø 80 mm Greiner
Platikipettenspitzen Eppendorf
Rheogläser rund, Ø 26 mm Hartenstein
Schlauchverbindungen Hartenstein

3. Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zellen der Zelllinie ECV304 wachsen adhärent am Boden ungelatinierter Polypropylen-Kulturflaschen. Die kopfsteinpflasterartigen Zellen sind robust und verdoppeln nach einer Passage ihre Anzahl ca. alle 36 Stunden, so dass sie nach drei bis vier Tagen nach Passage wieder Konfluenz erreichen. Die immortalisierten Zellen können mehrfach passagiert werden, eignen sich zur Kryokonservierung und werden zu Versuchszwecken auf so genannte Rheo-Gläschen ausgesät.

3.1.1 Nährmedium für die Zelllinie ECV304

Für die Kultivierung der Zelllinie ECV304 dient das Standardmedium M199 (mit Earle Salzen) der Firma GIBCO BRL. Die fertige Pulvermischung wird in H₂O (Ampuwa) gelöst, mit Hilfe von NaHCO₃ gepuffert und mit L-Glutamin (f.c. 2mM) versetzt. Nach Sterilfiltration kann das so erzeugte Medium bei 4° C bis zu drei Monate gelagert werden. Vor Gebrauch wird das Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und einer in PBS gelösten Antibiotika-Mischung aus Penicillin und Streptomycin (f.c. 100U/ml) supplementiert und ist anschließend bei 4° C bis zu einem Monat haltbar.

3.1.2 ECV304-Standardkultur

Die Zelllinie ECV304 wird adhärent in Kulturflaschen der Größe T₂₅ bzw. T₇₅ mit dem unter 3.1.1 beschriebenen Medium bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Jeden zweiten Tag sollten die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Morphologie und Konfluenzgrad untersucht werden. Bei Umschlag des Phenolrot-Indikators des Kulturmediums, zumindest aber alle zwei Tage muss das Medium gewechselt werden.

Bei einem Konfluenzgrad von ca. 90% werden die Zellen in einem Verhältnis 1:5 bis 1:10 geteilt und in neue Kulturflaschen gegeben, kryokonserviert oder zu Versuchen auf Rheo-Gläschen ausgesät.

3.1.3 Passagieren der Zelllinie ECV304

Frühestens nach vier, spätestens nach sieben Tagen nach erfolgter Aussaat sind die Zellen wiederum für ein erneutes Passagieren bereit. Dabei sollte eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht sein.

Zur Vorbereitung der Lösung der Zellen aus den Kulturflaschen werden diese zuerst zweimal mit PBS gespült und anschließend für drei Minuten mit PBS/0,1% EDTA überschichtet. Die PBS/0,1% EDTA-Lösung wird abgezogen und die Zellen werden für weiter zwei bis drei Minuten im Brutschrank einer Trypsinlösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) ausgesetzt. Sobald sich die Zellen mechanisch vom Grund der Kulturflasche lösen lassen, wird die Trypsinlösung durch Zugabe von Kulturmedium abgesättigt. Die Zellsuspension kann nun in weitere Kulturflaschen oder auf Rheo-Gläschen gegeben werden oder der Kryokonservierung dienen. Bei erneuter Aussaat wird nach 24 Stunden das Kulturmedium gewechselt, anschließend wird der übliche Zwei-Tages-Rhythmus wieder eingenommen.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um die Versuchsbedingungen möglichst zu standardisieren, sollten zwischen den Zellen, die für die einzelnen Versuche über einen längeren Zeitraum verwendet werden, möglichst wenige Passagen liegen, da somit der Wechsel von Zelleigenschaften vermieden werden kann. Da in gefrorenem Zustand fast alle Stoffwechsellaktivitäten einer Zelle stagnieren, ist dies eine gute Möglichkeit, Zellen gleicher Passagezahl über einen längeren Zeitraum zu konservieren. Um die für eine Zelle tödlichen Effekte des Einfrierens abzumildern, muss der Kryolösung der Gefrierschutz DMSO zugegeben werden. Da DMSO bei Raumtemperatur allerdings selbst zelltoxisch ist, müssen alle Arbeitsschritte, bei denen die Chemikalie mit Zellen in Berührung kommt, im Eisbad vorgenommen werden.

3.1.4.1 Einfrieren

Daher ist zuerst eine Lösung von 750 µl aus M199, 10% FCS und 20 % DMSO in ein Kryoröhrchen vorzugeben und ins Eisbad zu stellen. Anschließend werden wie unter 3.1.3 beschrieben die Zellen einer T₂₅-Kulturflasche abgelöst und die Zellsuspension bei 900g für sechs Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die sedimentierten Zellen werden mit 750 µl eiskaltem Medium M199/10%FCS resuspendiert. Die kalte Zellsuspension wird in das vorbereitete Kryoröhrchen gegeben und über Nacht bei -80° C eingefroren. Nach 24 Stunden kann das Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff zur Dauerlagerung überführt werden.

3.1.4.2 Auftauen

Da DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch ist, sollte das Auftauen und die Entfernung des DMSO von den Zellen möglichst schnell erfolgen. Daher ist unter der Arbeitsbank ein steriles Polypropylenröhrchen bereitzustellen, das mit 20 ml warmem Kulturmedium gefüllt ist. Anschließend wird das Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37° C leicht angetaut, so dass sich die gefrorene Zellsuspension lösen lässt. Diese wird sofort in das warme Kulturmedium überführt und im Polypropylenröhrchen sechs Minuten bei 900 g abzentrifugiert. Der Überstand mit dem DMSO wird verworfen, das Zellsediment mit 4 ml warmen Kulturmediums resuspendiert und auf die bereitgestellte T₂₅-Kulturflasche ausgesät. Die Zellen werden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit frischem Kulturmedium versorgt.

3.1.5 Gelatinieren von Rheo-Gläschen

Um die Zellen für Scherstress-Versuche nutzen zu können, müssen sie auf so genannte Rheo-Gläschen ausgesät werden. Damit das strömende Medium der Versuche die Zellen nicht von dieser Glasoberfläche spült, muss man den Zellen eine extrazelluläre Matrix simulieren, die aus einer Gelatinebeschichtung der Rheo-Gläschen besteht.

Die Gelatine, gewonnenes Kollagen der Schweinehaut, wird zu 0,5% in H₂O Ampuwa gelöst und anschließend für eine Stunde bei 100° C autoklaviert. Ebenso werden die gereinigten Rheo-Gläschen in H₂O (Ampuwa) autoklaviert.

Die sterilen Rheo-Gläschen werden unter der Arbeitsbank in eine sterile Petrischale gegeben, mehrfach mit dH₂O gespült und anschließend mit der Gelatinelösung für eine Stunde überschichtet. Die Gelatine wird abgezogen und durch eine 2% Glutaraldehyd-Lösung in PBS ersetzt, die die Proteine in der folgenden halben Stunde quervernetzt. Nach Entfernen der Glutaraldehyd-Lösung werden die beschichteten Rheo-Gläschen dreimal für zehn Minuten mit PBS gespült. Anschließend werden die Rheo-Gläschen mit PBS überschichtet und mit einer in PBS gelösten Antibiotika-Mischung aus Penicillin und Streptomycin (f.c. 100U/ml) supplementiert. Die mit Parafilm verschlossene Petrischale ist nun bei 4° C mehrere Wochen steril lagerbar. Vor Verwendung der beschichteten Rheo-Gläschen sollten diese zweimal kräftig mit PBS gespült werden.

3.1.6 Erstellung von Mischkulturen

Wie unter 3.3 ausgeführt wird, ist es für die Scherstress-Versuche sinnvoll, auf den Rheo-Gläschen einzelne transfizierte Zellen in einem Zellverband von konfluenten, nicht-transfizierten Zellen liegen zu haben. Da es dabei wichtig ist, dass sich die transfizierten Zellen möglichst in einem gewissen Abstand zu einander befinden, hat sich ein Mischungsverhältnis zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen von 1:30 bewährt. Da alle verwendeten Zelllinien unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen, ist es nicht möglich, die Mischkulturen als Dauerkultur zu führen. Daher erfolgt die Aussaat einer Mischkultur direkt zu Versuchszwecken auf Rheo-Gläschen.

Je eine T₂₅-Kulturflasche der nicht-transfizierten und der transfizierten Zellen wird wie unter 3.1.3 beschrieben abtrypsiniert und mit Medium versetzt, so dass sich je 12 ml Zellsuspension in den Kulturflaschen befinden. 2 ml Zellsuspension der transfizierten Zellen werden in ein steriles Polypropylenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium gegeben, so dass man 10 ml Zellsuspension erhält. Nach kräftigem Mischen werden aus diesem Röhrchen 2 ml Zellsuspension entnommen und in die Kulturflasche mit den nicht-transfizierten Zellen gegeben. Die so erhaltenen 14 ml Mischsuspension werden auf sieben gelatinierte Rheo-Gläschen in kleine Petrischalen gegeben. Jedes Rheo-Gläschen erhält noch 1 ml Kulturmedium. Die Petrischalen mit den Rheo-Gläschen werden anschließend 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor das Medium gewechselt wird. Nach zwei, spätestens drei Tagen erreichen die Zellen Konfluenz und können zu Versuchen herangezogen werden.

3.2 Messplatz

3.2.1 Struktur des Messplatzes

Die Zellen der Zelllinie ECV304 sind wie unter 2.2.1 – 4 beschrieben mit verschiedenen Reporter-Gen-Assays auf Grundlage des fluoreszierenden Proteins EGFP aus *Aequorea victoria* ausgestattet, das im Genom der Zellen hinter verschiedene Promotoren geschaltet ist.

Wie Hsie et al. schon 1992 zeigten und Resnik et al. 1993 spezifizierten, reagiert der PDGF-Promotor auf Scherstress mit einer Erhöhung der Expression hinter ihm gelegener DNA. Da sich in den hier verwendeten Zellen ein EGFP-Konstrukt an

dieser Stelle befindet, sollte untersucht werden ob es bei unterschiedlichen Scherstressraten zu einer gesteigerten Expression des EGFP kommt. Die Expressionsänderungen des fluoreszierenden Proteins können hierbei an den lebenden Zellen an einer Helligkeitsänderung detektiert werden.

Um die zu vermessenden Zellen Strömungskräften auszusetzen, müssen diese in eine Flusskammer gegeben werden, die nach dem Prinzip von Koslow (Koslow et al., 1986) modifiziert wurde. Die Kammer wird von warmem Medium durchflossen, dessen Flussgeschwindigkeit anhand einer Pumpe so reguliert werden kann, dass die erwünschte Scherkraft erzeugt wird. Die Strömungsstärke ist proportional der Höhe und Breite des durchflossenen Raums und abhängig von der Viskosität des strömenden Mediums. Bei herkömmlichem Kulturmedium geht man von einer Viskosität von 1 aus.

Somit ergeben sich für Scherkraft und Flussgeschwindigkeit die in einander umwandelbaren Formeln

$$T = \frac{Q \cdot 4\mu}{2b^2 \cdot w} \quad \text{bzw.} \quad Q = \frac{T \cdot 2b^2 \cdot w}{3\mu}$$

Wobei $T = \text{Scherkraft} [\text{dyn}/\text{cm}^2 = \text{g}/(\text{cm} \cdot \text{s}^2)]$

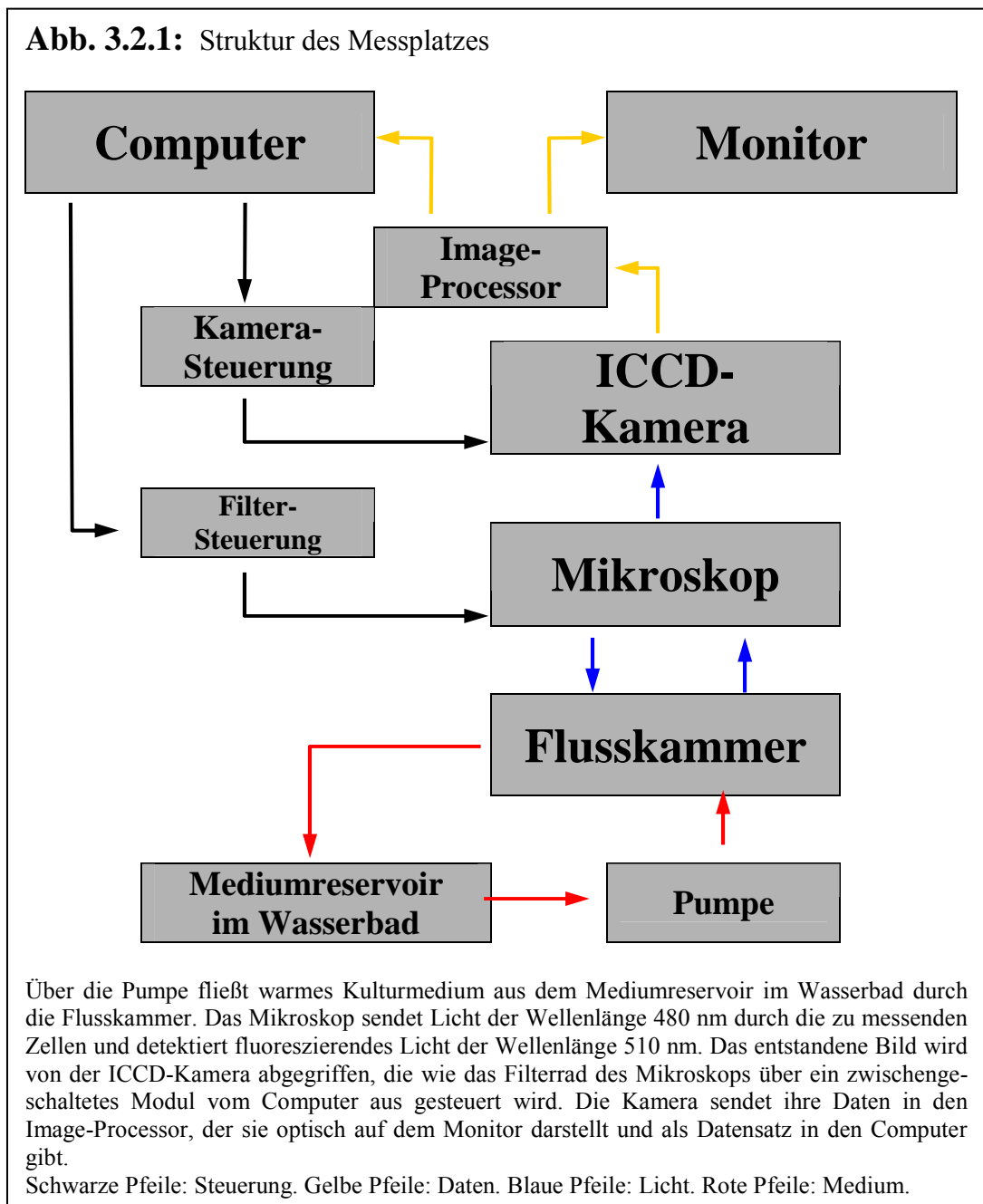
$b = \text{halbe Höhe des durchflossenen Raums} [\text{cm}]$

$w = \text{Breite der Strömungsbahn} [\text{cm}]$

$\mu = \text{Viskosität des Strömungsmediums} [\text{g}/(100 \cdot \text{cm} \cdot \text{s})]$

$Q = \text{Flussrate} [\text{cm}^3/\text{s} = \text{ml}/\text{s}]$

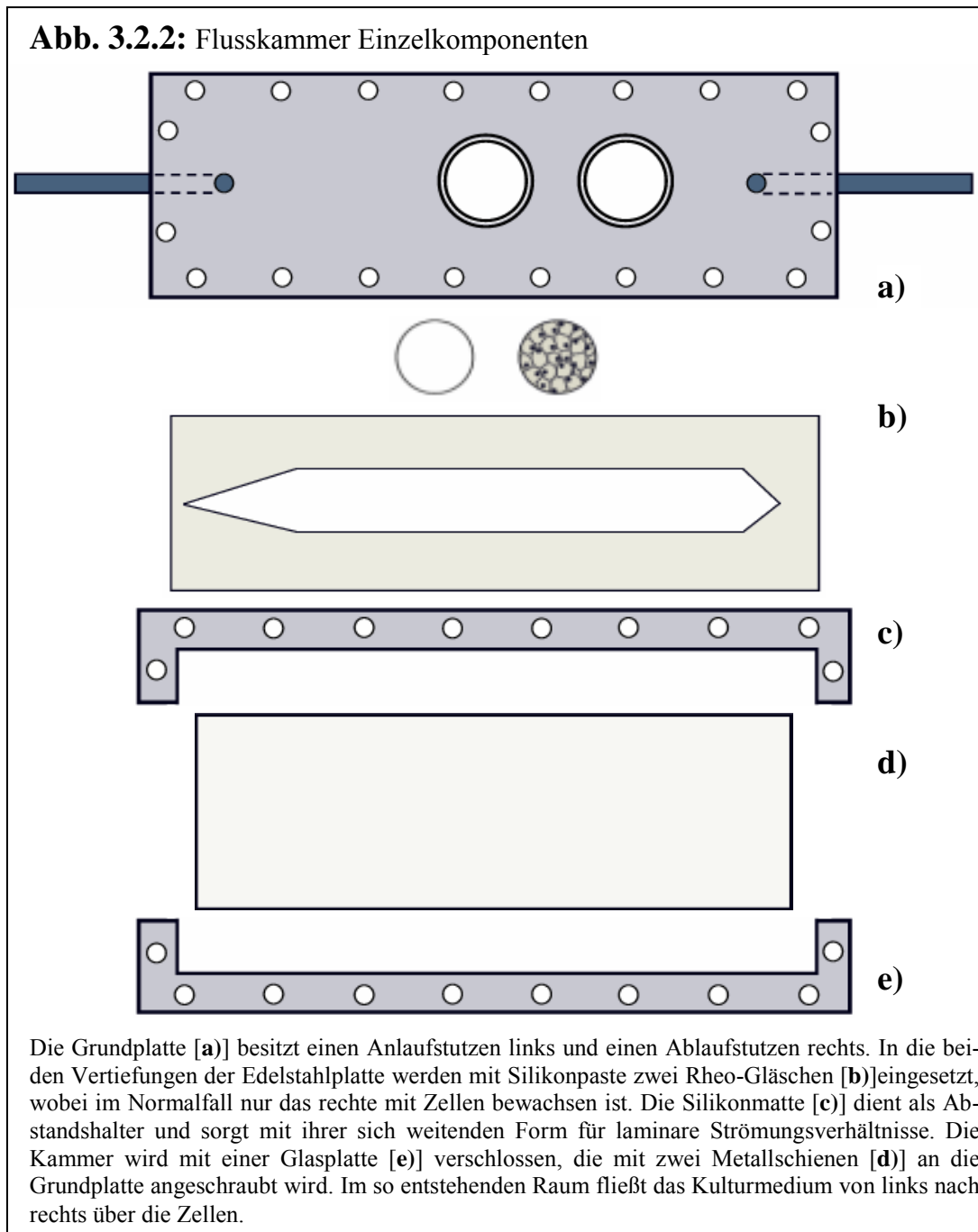
Die Zellen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) beobachtet, das sie mit Licht der Wellenlänge 480 nm anregt und Licht der Wellenlänge 510 nm detektiert, was dem Anregungs- und Fluoreszenzspektrum von EGFP entspricht. Das entstehende Bild wird von einer hochsensitiven ICCD-Kamera abgegriffen, die in der Lage ist, einzelne Photonen zu detektieren. Die gemessenen Signale werden in einem Image-Prozessor der Firma Hamamatsu verstärkt, digitalisiert und sowohl zur optischen Darstellung auf einen Bildschirm gegeben als auch als Datensatz in einen angeschlossenen Computer. Die so entstandenen Daten stehen nun zur Verarbeitung wie unter 3.3. beschrieben zur Verfügung.



3.2.2. Flusskammer

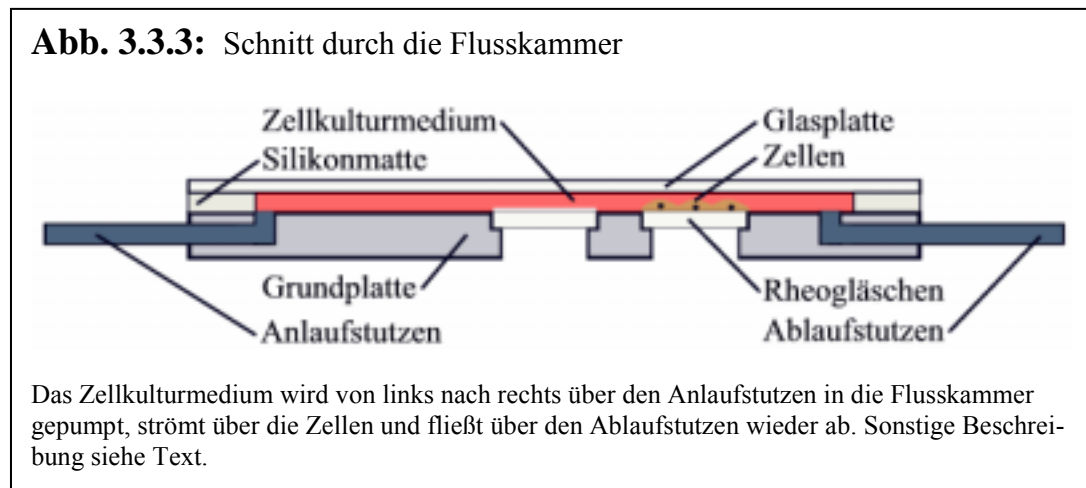
Die Basis der Flusskammer bildet eine Edelstahlplatte, in die zwei Vertiefungen für Rheo-Gläschen eingelassen sind. Diese Vertiefungen sind so gearbeitet, dass die Rheo-Gläschen mit Silikonpaste so in die Grundplatte eingepasst werden können, dass der Übergang zwischen Metall und Glas völlig plan ist, so dass es zu keiner Verwirbelung des Mediumstroms kommt. Eine Silikonmatte der Dicke

0,0175 cm dient als Abstandshalter zur abschließenden Glasplatte, die mit zwei Metallschienen an die Grundplatte angeschraubt wird (Abb. 3.3.2 und 3.3.3).



Das in einem Wasserbad auf 39° C erwärmte Kulturmedium wird über einen Silikon Schlauch und einen Anlaufstutzen von der Pumpe in die Flusskammer geleitet, so dass es mit 37° C die Zellen erreicht. Durch die sich weitende Form der Silikonmatte und einen Anlaufweg von 8,3 cm erreicht das Medium als laminare

Strömung die Zellen und verlässt die Kammer durch einen Ablaufstutzen nach der Zellpassage. Durch einen weiteren Silikonschlauch ist der Ablauf mit dem Mediumreservoir im Wasserbad verbunden, so dass es nach Wiedererwärmung einem weiteren Kreislauf zur Verfügung steht. Der pH-Wert des Kulturmediums wird durch das im Medium enthaltene Puffersystem konstant bei pH 7,4 gehalten.



3.2.3 Datenerfassung

Die Flusskammer mit den zu messenden Zellen ist in einem inversen Mikroskop (Zeiss) mit Fluoreszenzeinheit eingespannt. In regelmäßigen Abständen werden die Zellen mit einem Licht der Wellenlänge 480 nm angeregt und die dem Mikroskop nachgeschaltete ICCD-Kamera erreicht das gefilterte Fluoreszenzbild der Wellenlänge 510 nm. Die Steuerung des Filters und der Kamera übernimmt während des Versuchs das Computer-Programm ARGUS-CA der Firma Hamamatsu. Vor dem Versuch werden im Gesichtsfeld der Kamera Zellen eingestellt, die möglichst einzeln in bestimmtem Abstand zueinander liegen und eine gleichmäßige Fluoreszenzintensität aufweisen. Da bei der Berechnung der Lichtintensitätsentwicklung störende Hintergrundaktivitäten herausgerechnet werden und die Veränderungen als relativer Prozess betrachtet werden, hat das Maß der Verstärkung der Kamera keinen Einfluss auf das Messergebnis. Trotzdem sollte es möglichst bei allen Versuchen in einem mittleren Bereich gehalten werden, so dass es nicht zu Lichtintensitäten kommt, die über oder unter dem Auflösungsvermögen der Kamera liegen.

Da das Gesichtsfeld eines Mikroskops nie völlig gleichmäßig ausgeleuchtet werden kann, muss vor Versuchsbeginn eine Messung dieser Ausleuchtung erfolgen. Die gewonnenen Daten werden vor der Auswertung zu einer so genannten shading-correction verwendet, die rechnerisch die inhomogene Ausleuchtung des Gesichtsfeld ausgleicht.

Die von der Kamera erfassten Bilder stehen nun dem Computer-Programm ARGUS-CA der Firma Hamamatsu zur weiteren Auswertung zur Verfügung.

3.3 Arithmetische Auswertung

3.3.1 Generierung von Intensitätswerten und -bildern, Gesamt- und Durchschnittsintensitätswerten

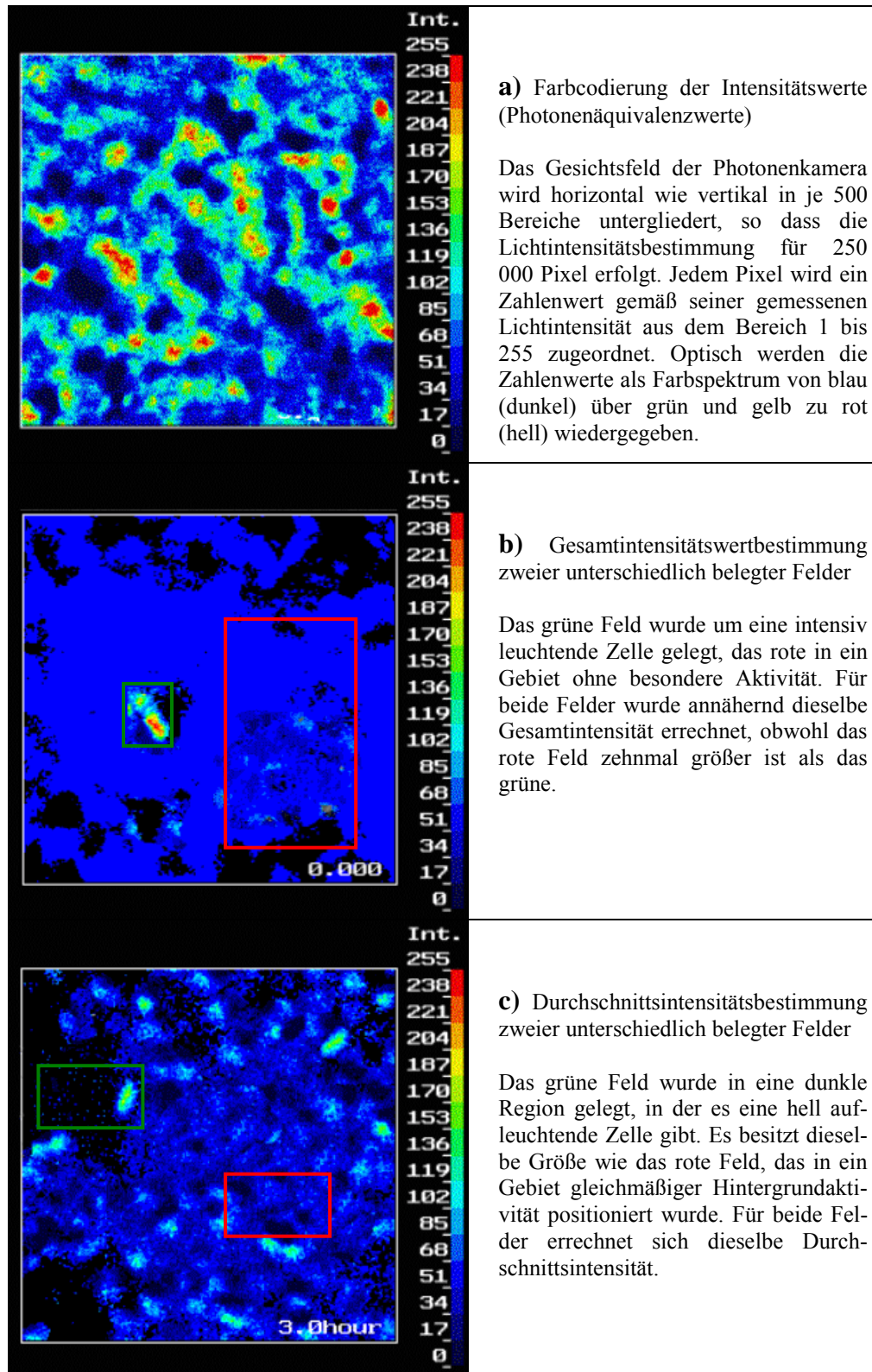
Das quadratische Gesichtsfeld der Photonenkamera wird über den ARGUS-50-Image-Prozessor (Hamamatsu) in den Computer eingelesen. Beim verwendeten Objektiv mit der Standardvergrößerung von 20x und der Optik der Photonenkamera besitzt das Gesichtsfeld eine Seitenlänge von ca. 260 μm . Mit Hilfe des ARGUS-CA-Programms (Hamamatsu) kann die Helligkeit des Gesichtsfelds bestimmt werden.

Dazu unterteilt das Programm das Gesichtsfeld in 500 mal 500 kleine Felder, also 250 000 so genannte Pixel. Für jeden Pixel wird eine Lichtintensitätsbestimmung durchgeführt und der erhaltene Wert wird als Photonenäquivalenzwert zwischen 1 und 255 angegeben. Optisch werden die Photonenäquivalenzwerte durch eine Farbabstufung von blau über grün und gelb hin zu rot codiert (Abb. 3.3.1a).

Die Gesamtintensitätsbestimmung eines Feldes erfolgt durch Addition sämtlicher Photonenäquivalenzwerte aller Pixel des Feldes. So kann ein großes dunkles Feld den selben Gesamtintensitätswert wie ein kleines helles Feld erhalten (Abb. 3.3.1b).

Die Durchschnittsintensität eines Feldes wird durch die Division der Gesamtintensität durch die Pixelanzahl des Feldes berechnet. So kann ein dunkles Feld mit einem kleinen hellen Fleck dieselbe Durchschnittsintensität wie ein Feld gleichmäßiger Helligkeit erhalten (Abb. 3.3.1c). Diese beiden Fälle zeigen die Hürden, die bei einer validen Auswertung von Lichtintensitäten fluoreszierender Zellen beachtet werden müssen.

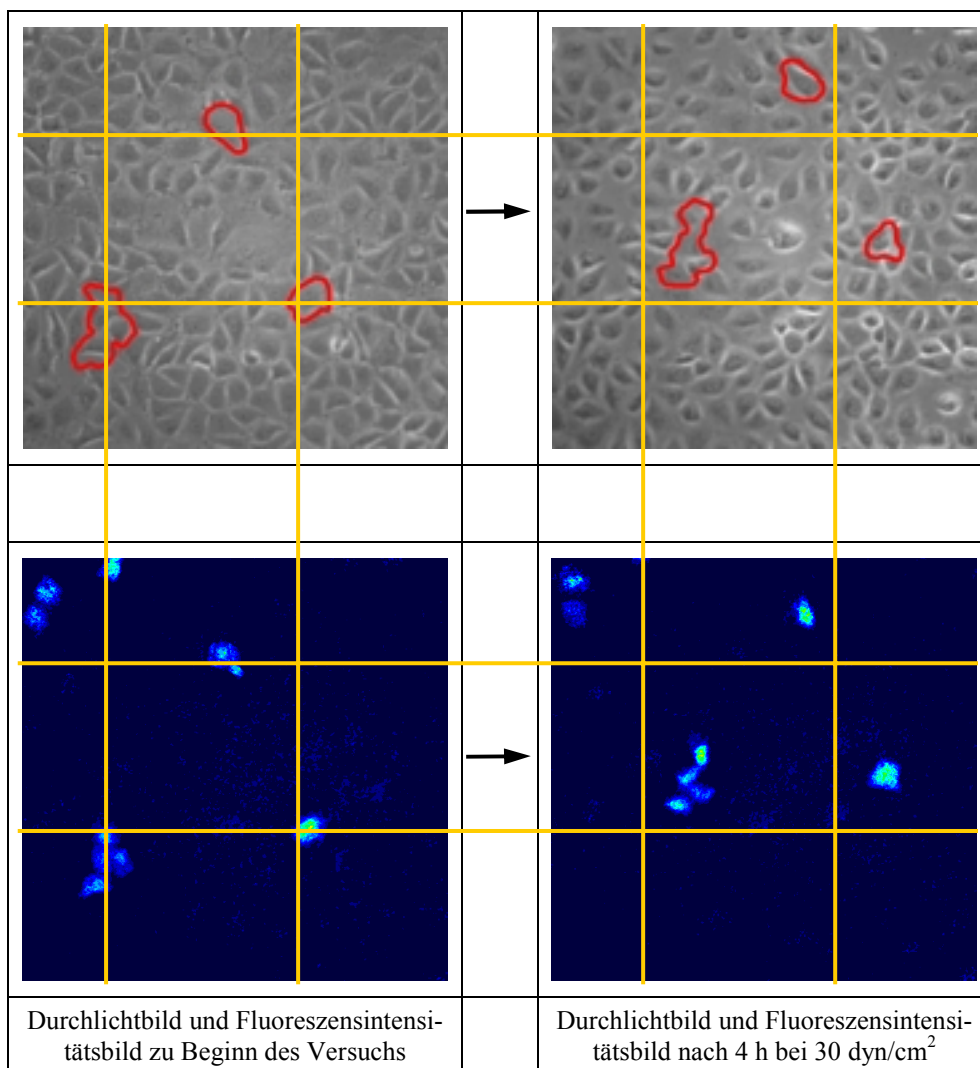
Abb. 3.3.1: Farbcodierung von Intensitätswerten und Generierung von Gesamt- und Durchschnittsintensitätswerten



3.3.2 Zellwanderung

Bei den erfolgten Versuchen wurden die Zellen einem an ihnen vorüberströmendem Medium ausgesetzt, das einen Scherstress von bis zu 30 dyn/cm^2 erzeugte. Damit die Zellen nicht abfallen, wurde die Glasoberfläche der Rheo-Gläschen gelatiniert. Trotzdem bewegen sich Zellen, die unter Kulturbedingungen diesen Scherkräften ausgesetzt sind, während eines Versuchs von vier Stunden um bis zu eine Zelllänge (Abb. 3.3.2).

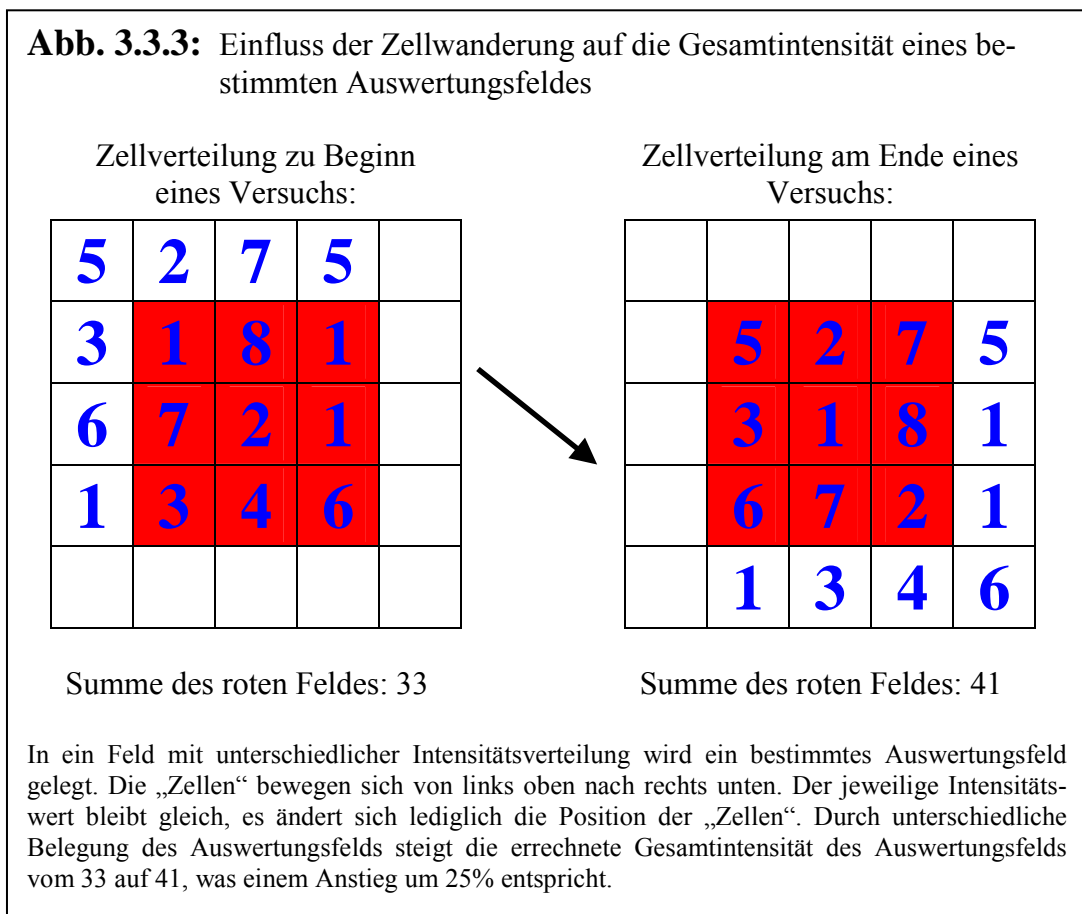
Abb. 3.3.2: Wanderung von mit 30 dyn/cm^2 für 4 Stunden gescherten Zellen



Die Abbildungen zeigen die Durchlichtaufnahmen und die dazugehörigen Aufnahmen der Fluoreszenzintensität von Zellen der Linie 1,3kb-PDGF-EGFP-ECV304 zu Beginn und am Ende eines vierstündigen Scherstressversuchs mit 30 dyn/cm^2 .

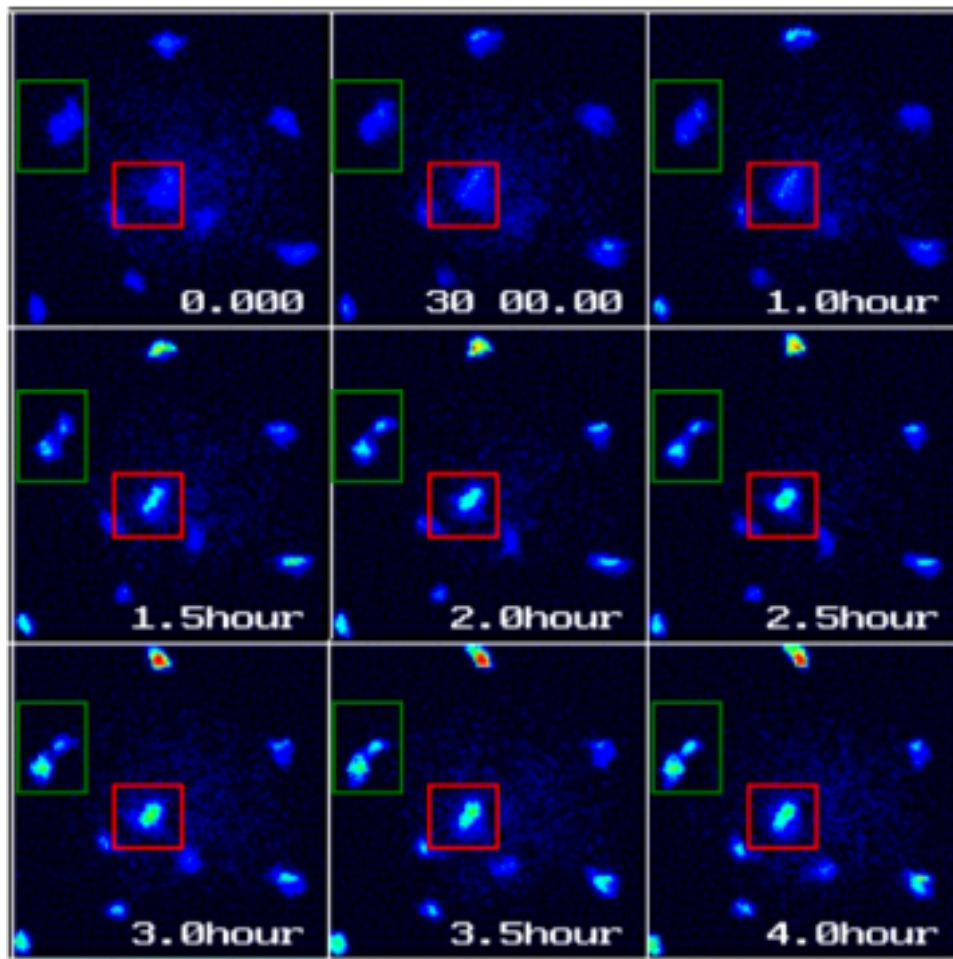
Man achte auf die Wanderbewegung sowohl in horizontaler wie in vertikaler Richtung bei horizontalem Mediumfluss von links nach rechts.

Diese Wanderungsbewegung stellt für die Detektion der Änderung der Lichtintensitäten ein weiteres Problem dar. Denn ein Auswertungsfeld kann in eine konfluente Population transfizierter Zellen nur willkürlich gelegt werden, ohne bestehende Zellgrenzen zu achten. Da die einzelnen Zellen aber eine unterschiedliche Expression an EGFP besitzen und damit unterschiedliche Grundhelligkeiten, führt schon die Bewegung der am Rand des Auswertungsfelds liegenden Zellen zu einer Änderung der Gesamtintensität des Feldes (Abb. 3.3.3).



3.3.3 CELL-TRACKING-Methode

Um das durch die Zellwanderung erzeugte Artefakt auszuschließen, müssen einzelne transfizierte Zellen vor einem möglichst stummen Hintergrund beobachtet werden. Um eine einzeln liegende transfizierte Zelle muss ein Auswertungsfenster gesetzt werden, das zu jedem Zeitpunkt der Messung größer als der von der Zelle überwanderte Raum ist, ohne dass eine andere transfizierte Zelle in das Fenster hineinwandert (Abb. 3.3.4).

Abb. 3.3.4: Setzen von Auswertungsfenstern

Fluoreszenzintensitätsbild eines Scherstressversuchs über vier Stunden bei 30 dyn/cm^2 . Das grüne Auswertungsfeld ist wie im Text beschrieben korrekt gelegt, in das rote Feld wandern andere Zellen ein, so dass es nicht auszuwerten ist.

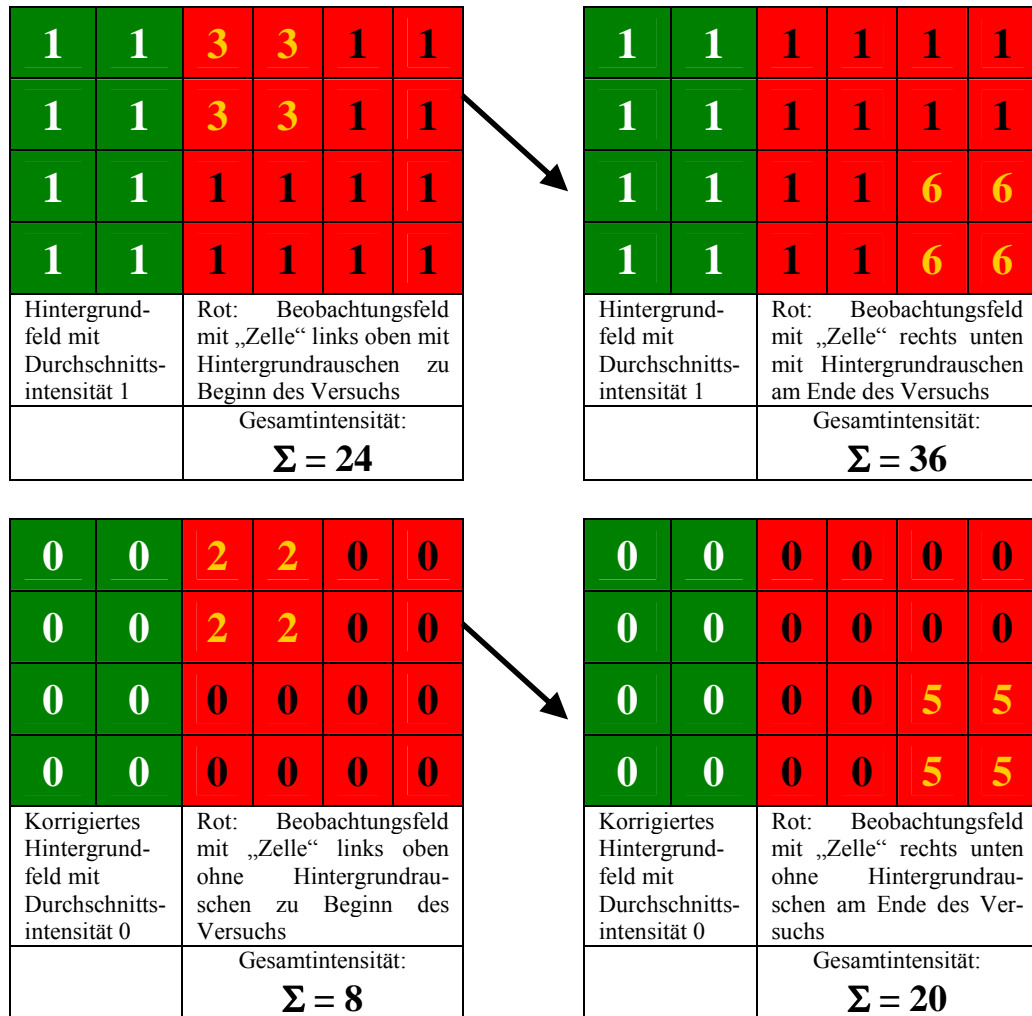
Dazu müssen transfizierte Zellen so im Gesichtsfeld platziert werden, dass sie nicht in allzu große Nähe einer anderen transfizierten Zelle liegen. Um trotzdem die physiologischen Bedingungen eines Monolayers zu gewährleisten, werden die transfizierten Zellen mit nicht-transfizierten Zellen gemeinsam so auf Rheo-Gläschen ausgesät wie unter 3.1.6 beschrieben.

Nun wird die Gesamtintensität des Auswertungsfensters wie unter 3.3.1 erläutert für jeden Zeitpunkt der Messung bestimmt.

Um das unter 3.3.1 beschriebene Problem des durch unterschiedliche Hintergrundintensität erzeugten Artefakts auszuschalten, muss ein errechneter Wert für die

Hintergrundintensität vom erhaltenen Wert der Gesamtintensität abgezogen werden. Zur Bestimmung der Hintergrundintensität wird ein zweites Auswertungsfeld bestimmter Größe nahe dem ersten Feld gesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass während des Versuchs durch das zweite Feld keine transfizierte Zelle gezogen ist.

Abb. 3.3.5: Entwicklung der Gesamtintensität eines Auswertungsfeldes ohne und mit Hintergrundkorrektur



Schematische Darstellung der Handhabung des durch Hintergrundaktivität erzeugten Artefakts. Im oberen Beispiel beträgt die Hintergrundintensität durchschnittlich 1 und überlagert das gesamte Auswertungsfenster (rot) und damit auch die zu beobachtende Zelle (gelb). Der Gesamtintensitätswert des Auswertungsfensters beträgt zu Beginn des Versuchs 24, zu Ende des Versuchs 36. Rechnerisch ergibt sich ein Intensitätsanstieg auf 150%.

Im unteren Beispiel zeigt sich dieselbe Situation wie im oberen, nur dass hier das Auswertungsfeld um den Wert der Hintergrundintensität von 1 pro Pixel, also 16 für das ganze Auswertungsfeld bereinigt wurde. Es ergibt sich ein Anstieg der Gesamtintensität des Auswertungsfeldes von 8 auf 20, also auf 250%.

Das rote Auswertungsfeld ist so gelegt, dass sich die „Zelle“ (gelb) während des gesamten Versuchs in diesem befindet, das grüne Hintergrundfeld wird von keiner Zelle durchzogen.

Für dieses Feld wird die Durchschnittsintensität zu jedem Zeitpunkt der Messung gebildet und mit der Pixelzahl des Auswertungsfeldes der transfizierten Zelle multipliziert. Der so erhaltene Wert stellt die Hintergrundintensität des Auswertungs-

fensters dar und muss vom Wert der Gesamtintensität zu jedem Zeitpunkt der Messung subtrahiert werden (Abb. 3.3.5).

Die so erhaltenen korrigierten Gesamtintensitäten stellen die Basis für die nun folgende Verhältnisrechnung dar.

3.3.4 EXEL-Matrizen

Das Computerprogramm AGRUS-CA der Firma Hamamatsu liefert für die vom Versuchsleiter gesetzten Fenster Werte auf Basis folgender Rechenoperationen:

$$D_H = \frac{\sum Pixelintensität}{n_H} \quad \text{und} \quad G_Z = \sum_{l=n_Z} Pixelintensität$$

wobei D_H = durchschnittlicher Intensitätswert der Hintergrundfelds

n_H = Zahl der Pixelfelder des Hintergrundfelds

G_Z = Gesamtintensität des Zellfelds

n_Z = Zahl der Pixelfelder des Zellfelds

Für die folgenden Rechenoperationen wurde eine EXEL-Matrize entwickelt, mit der die einzelnen Versuche schneller ausgewertet können. Die Matrizen vereinen folgende Rechenoperationen:

$$GH_Z = D_H \cdot n_Z \quad GH_Z = \text{Gesamthintergrundintensität des Zellfelds}$$

$kG_Z = G_Z - GH_Z$ $kG_Z = \text{korrigierte Gesamthintergrundintensität des Zellfelds}$
Diese Rechnung wird für die Auswertungsfelder für jeden Zeitpunkt t_1 bis t_x der Messung durchgeführt. Anschließend wird das Verhältnis der korrigierten Gesamthintergrundintensitäten zu der des Zeitpunkts t_1 gebildet:

$$R_{t_x} = \frac{kG_{Zt_x}}{kG_{Zt_1}} \quad R_{t_x} = \text{Relativintensität zum Zeitpunkt } t_x$$

Diese Rechnung wird für alle Auswertungsfenster eines Gesichtsfelds durchgeführt. Anschließend wird mit den erhaltenen Relativintensitäten für jeden Zeitpunkt der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe des unter 3.3.5 beschriebenen Rangkorrelationstests werden die einzelnen Zahlenscharen auf Signifikanz getestet.

Mehrere sich nicht signifikant unterscheidende Versuche werden nun zu einem Gesamtmittelwert zusammengefasst, anhand dessen die einzelnen Versuche untereinander auf Signifikanz getestet werden. Bei positivem Ergebnis kann der erhal-

tene Gesamtrelativmittelwert der Zeitpunkte t_1 bis t_x nun als Graph aufgetragen werden.

Da das Endergebnis eine relative Aussage darstellt, kann es mit Messungen anderer Scherkraft oder Kulturmedium-Modifikationen verglichen werden.

3.3.5 Fehlerrechnung

Um die einzelnen Versuche auf innere Konsistenz zu prüfen wird anhand eines Rangkorrelationstest jede Ergebniskurve auf signifikanten Unterschied zum Versuchsmittelwert getestet. Dabei gilt $p = 0,05$ als Ausschlusskriterium.

Erweist sich ein Versuch als konsistent, wird sein Mittelwert mit Mittelwerten weiterer konsistenter Versuche zu einem Gesamtmittelwert zusammengefasst. Anhand des Rangkorrelationstest wird ermittelt, ob die einzelnen unabhängigen Versuche eine in der Tendenz abweichende Reaktion der Zellen auf den Scherstress zeigen. Ist dies nicht der Fall, kann der Gesamtmittelwert als valide angesehen und mit anderen Gesamtmittelwerten verglichen werden.

Um die Signifikanz der Unterschiede einzelner Gesamtmittelwerte zu zeigen, wurde auf diese auch der Rangkorrelationstest mit Ausschlusswert $p = 0,05$ angewendet.

Beim Rangkorrelationstest wird darauf geachtet, wie oft sich zwei zu vergleichende Kurven in ihrem Verlauf schneiden. Anhand der Schnittanzahl und der Messpunkt-Anzahl kann das Signifikanzniveau einem Tabellenwerk entnommen werden. Da alle Versuche 25 Messpunkte besitzen, gelten folgende Werte (Abb. 3.3.6):

Abb. 3.3.6: Berechnung des Signifikanzniveaus

0	1	2	3	4	5
$2,980e^{-8}$	$7,748e^{-7}$	$9,715e^{-6}$	$7,826e^{-5}$	$4,552e^{-4}$	$2,038e^{-3}$

Bei einer Anzahl von 25 Messpunkten gilt bei der Anzahl an Überschneidungen der einzelnen Kurven in der oberen Zeile das entsprechende Signifikanzniveau der unteren Zeile. Die Grenze zwischen signifikant (grün unterlegt) und nicht-signifikant (rot unterlegt) wurde mit $p = 0,05$ festgesetzt.

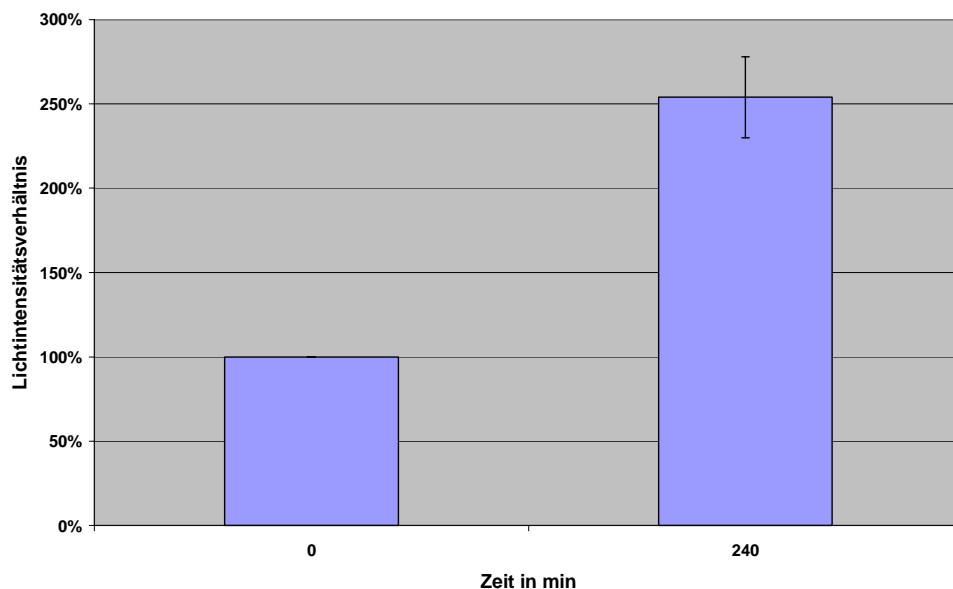
4. Ergebnisse

4.1 Funktionalitätstest des PDGF-Promotors und des Messplatzes

Zur Funktionalitätstestung der verwendeten Promotor-Konstrukte und des Messplatzes soll im Folgenden die Induktion der EGFP-Produktion durch Phorbolster am Messplatz gezeigt werden. Der Anstieg der EGFP-Produktion auf den Scherstressstimulus wurde bereits qualitativ mit Hilfe eines Western-Blots durch Frau Dr. K. Schwarz in ihrer Dissertation gezeigt.

Zellen der mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP stabil transfizierte Zelllinie ECV304 wurden für vier Stunden in der oben beschriebenen Apparatur bei 0,5 dyn/cm² in Kulturmedium inkubiert, dem Phorbolster (100 ng/ml) zugegeben wurde. Zu Beginn und zum Ende des Versuchs wurde ein Fluoreszenzbild aufgenommen, das nach der oben beschriebenen Methode ausgewertet wurde. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt und die unabhängigen Versuche zu einem Gesamtmittelwert vereint.

Abb. 4.1.1: Reaktion des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP auf Phorbolsterstimulation



Mittelwerte des Lichtintensitätsverhältnis von 24 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP unter Phorbolsterstimulation (f.c. 100 ng/ml) bei 0,5 dyn/cm². Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

Die Messung zeigt eine deutliche Zunahme des EGFP-Gehalts der mit Phorbol-lester stimulierten Zellen nach vier Stunden (Abb. 4.1.1).

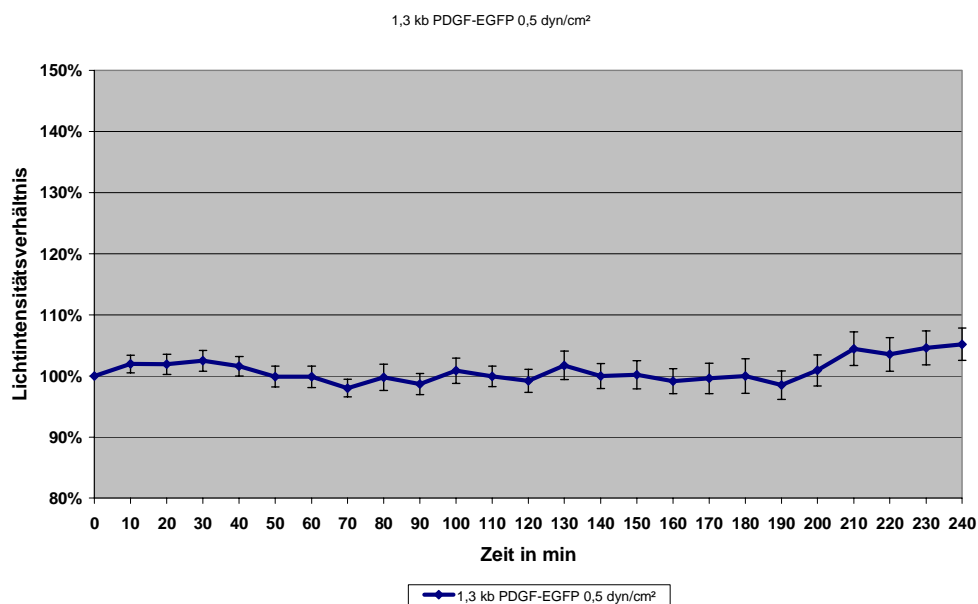
4.2 Einfluss der Scherstress-Stärke auf den durch PDGF-Promotorkonstrukte kontrollierten Reportergehalt (EGFP)

4.2.1 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$

In diesem Versuch wurden die ECV304-Zellen mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP für vier Stunden einem minimalen Scherstress von $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt. Dieser Wert ist der kleinstmögliche, der mit der oben beschriebenen Apparatur erzeugt werden kann, so dass es immer noch zu einem Mediaumtausch in der Flusskammer kommt, die Zellen mit frischen Nährstoffen versorgt werden und die Temperatur der Kammer gehalten wird.

Die Werte der erhaltenen Kurve undulieren um die Grundlichtintensität, von der er sich nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,8$). Es kommt also zu keiner Zunahme der Lichtintensität (Abb. 4.2.1).

Abb. 4.2.1: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$



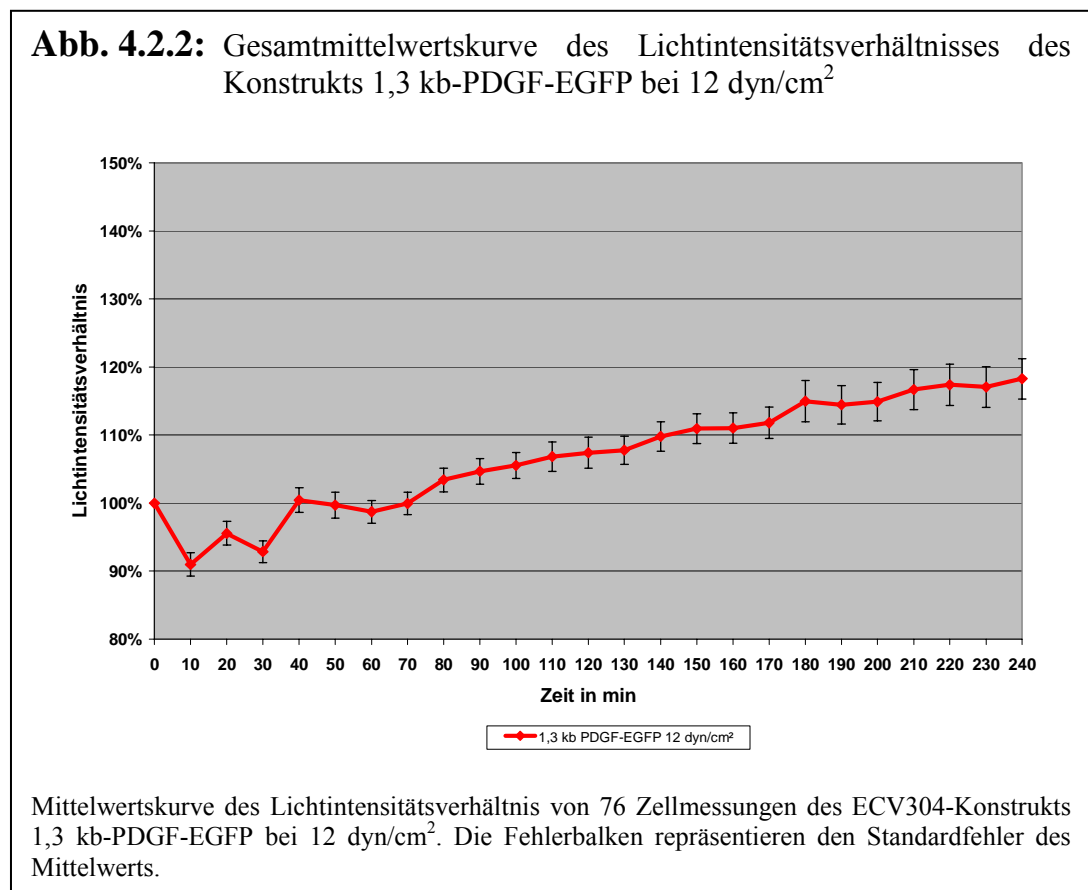
Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnis von 67 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts

4.2.2 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm²

Im folgenden Versuch wurde die Scherkraft auf 12 dyn/cm² erhöht und die Zellen mit dem Promotor-Vollkonstrukt ebenfalls über vier Stunden beobachtet (Abb. 4.2.2).

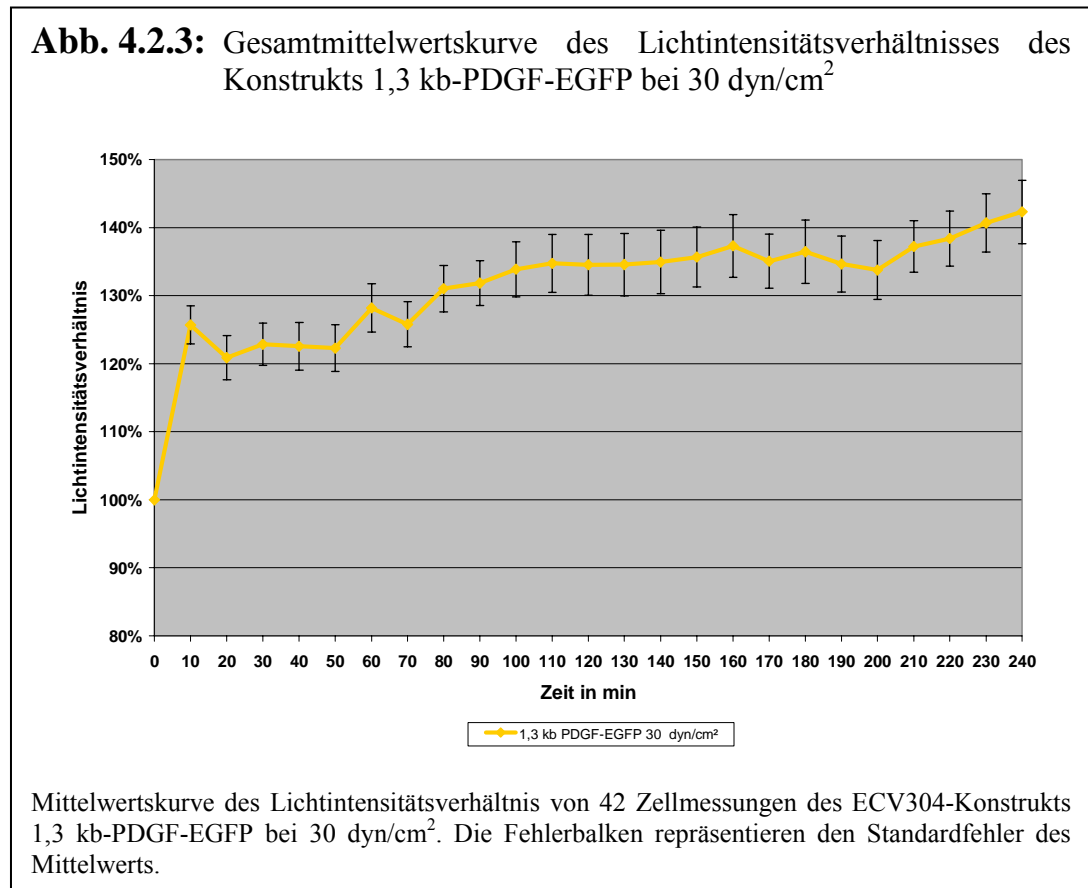
Die Werte der erhaltenen Kurve zeigen einen initialen Abfall der Lichtintensität, der sich nach 40 min wieder ausgeglichen hat. Anschließend steigt die Kurve weiterhin gleichmäßig auf einen Wert von 118% an, der sich damit deutlich vom Ausgangswert unterscheidet ($p = 0,007$).

Der PDGF-Promotor reagiert somit auf Scherstress mit einer gesteigerten Expression des nachgeschalteten Gens.

4.2.3 Messung des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm²

Steigert man den Scherstress auf 30 dyn/cm² und beobachtet die Entwicklung des Lichtintensitätsverhältnisses der Zellen ECV304 mit dem PDGF-Vollkonstrukt, tritt eine schnelle initiale Zunahme der Lichtintensität auf. Dieser schnelle Anstieg

wurde in allen der 42 durchgeführten Zellmessungen beobachtet. Die Zellen produzieren über die vier Stunden weiterhin steigend EGFP, so dass die Lichtintensität gleichmäßig auf den Wert von 142% steigt, der sich signifikant ($p = 0,001$) vom Ausgangswert unterscheidet.



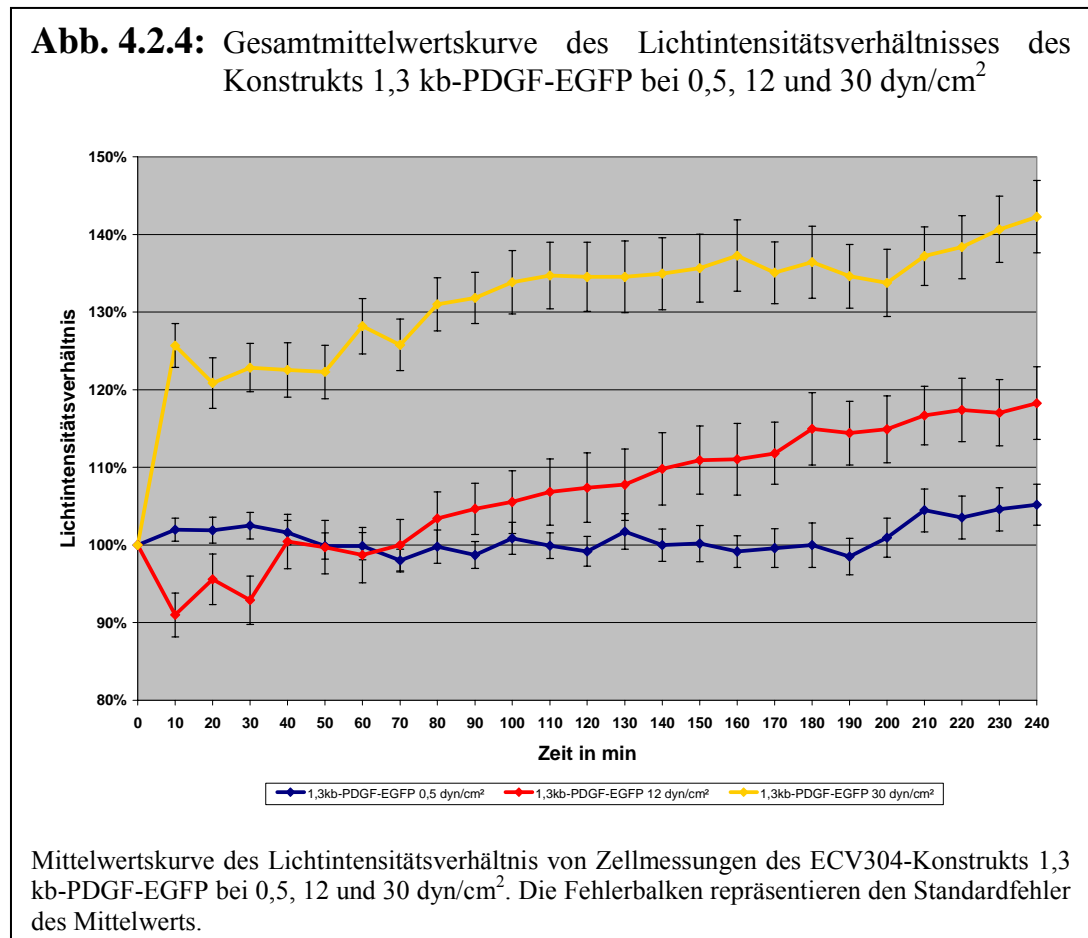
4.2.4 Vergleich der Reaktionen des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP auf Scherstressraten von 0,5, 12 und 30 dyn/cm²

Vergleicht man die bei 0,5, 12 und 30 dyn/cm² erhaltenen Kurven miteinander (Abb. 4.2.4), erkennt man, dass die Zellen entsprechend der gesteigerten Scherstresswerte einen gesteigerten EGFP-Gehalt liefern. Während bei 0,5 dyn/cm² ein Undulieren um den Ausgangswert zu sehen ist, steigt die Kurve des 12 dyn/cm²-Versuchs nach einem anfänglichen Abfall deutlich an und endet schließlich bei 118% ($p = 0,007$).

Das Lichtintensitätsverhältnis des Versuchs bei 30 dyn/cm² steigert sich nach einem initialen schnellen Anstieg kontinuierlich auf 142 % ($p = 0,001$). Alle Kurven

liegen bis auf die Überschneidungspunkte außerhalb des Standardfehler des Mittelwerts der anderen Kurven und unterscheiden sich im Verlauf signifikant voneinander ($p < 0,01$).

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass der intakte PDGF-Promotor auf Scherstress anspricht und der unterschiedlichen Scherstress-Stärke entsprechend unterschiedlich stark das ihm nachfolgende Gen exprimiert.

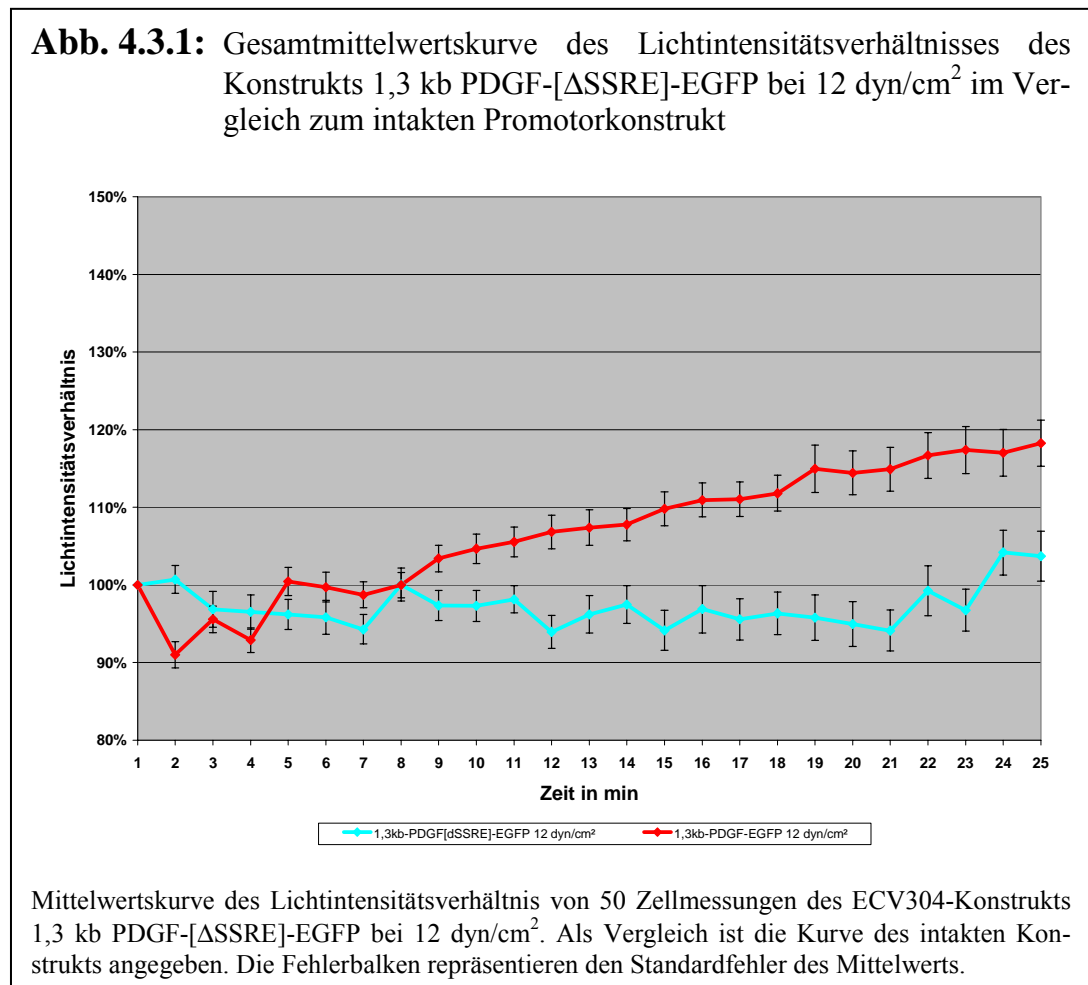


4.3 Einfluss des Scherstress-responsive Elements (SSRE) auf die durch Scherstress induzierte Reporterexpression

Um die Bedeutung des erstmals von Resnick et al. 1993 beschriebenen Scherstress-responsiven Elements (SSRE) zu testen, wurden verschiedene Zellklone vermessen, deren Reporterprotein-Konstrukte im Promotor SSRE-defizient sind, oder in deren von Natur aus SSRE-lose Promotoren das SSRE inseriert wurde.

4.3.1 Messung des Konstrukts 1,3 kb PDGF-[Δ SSRE]-EGFP bei 12 dyn/cm²

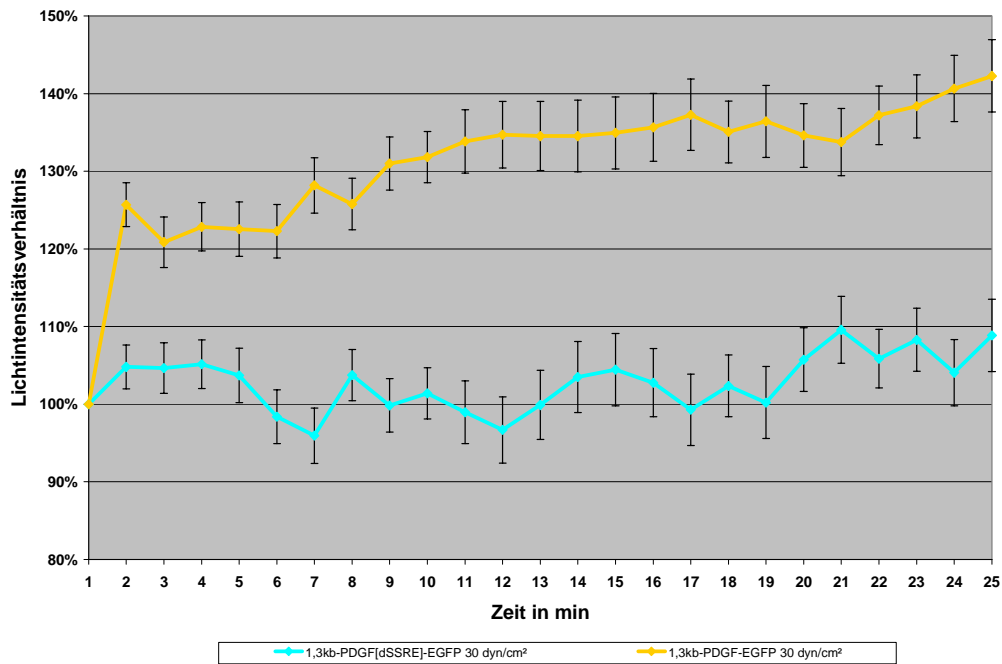
Aus dem PDGF-Promotor des Konstrukts wurde das SSRE über eine PCR entfernt. Die Zellen produzieren eine basale Menge an EGFP, die allerdings während des vier Stunden währenden Versuch bei 12 dyn/cm² praktisch nicht ansteigt (Abb. 4.3.1). Die erhaltene Kurve unterscheidet sich signifikant ($p = 0,02$) von der Kurve des Vollkonstrukts bei 12 dyn/cm², dessen Anstieg des Lichtintensitätsverhältnisses im Vergleich deutlich zu sehen ist.

4.3.2 Messung des Konstrukts 1,3 kb PDGF-[Δ SSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm²

Aus dem PDGF-Promotor des Konstrukts wurde das SSRE deletiert. Die Zellen produzieren eine basale Menge an EGFP, die allerdings während des vier Stunden währenden Versuch bei 30 dyn/cm² um den Grundwert unduliert ($p = 0,8$) und nur leicht ansteigt (Abb. 4.3.2). Die erhaltene Kurve unterscheidet sich signifikant (p

= 0,001) von der Kurve des Vollkonstrukts bei 30 dyn/cm², dessen Anstieg des Lichtintensitätsverhältnisses im Vergleich sehr deutlich zu sehen ist.

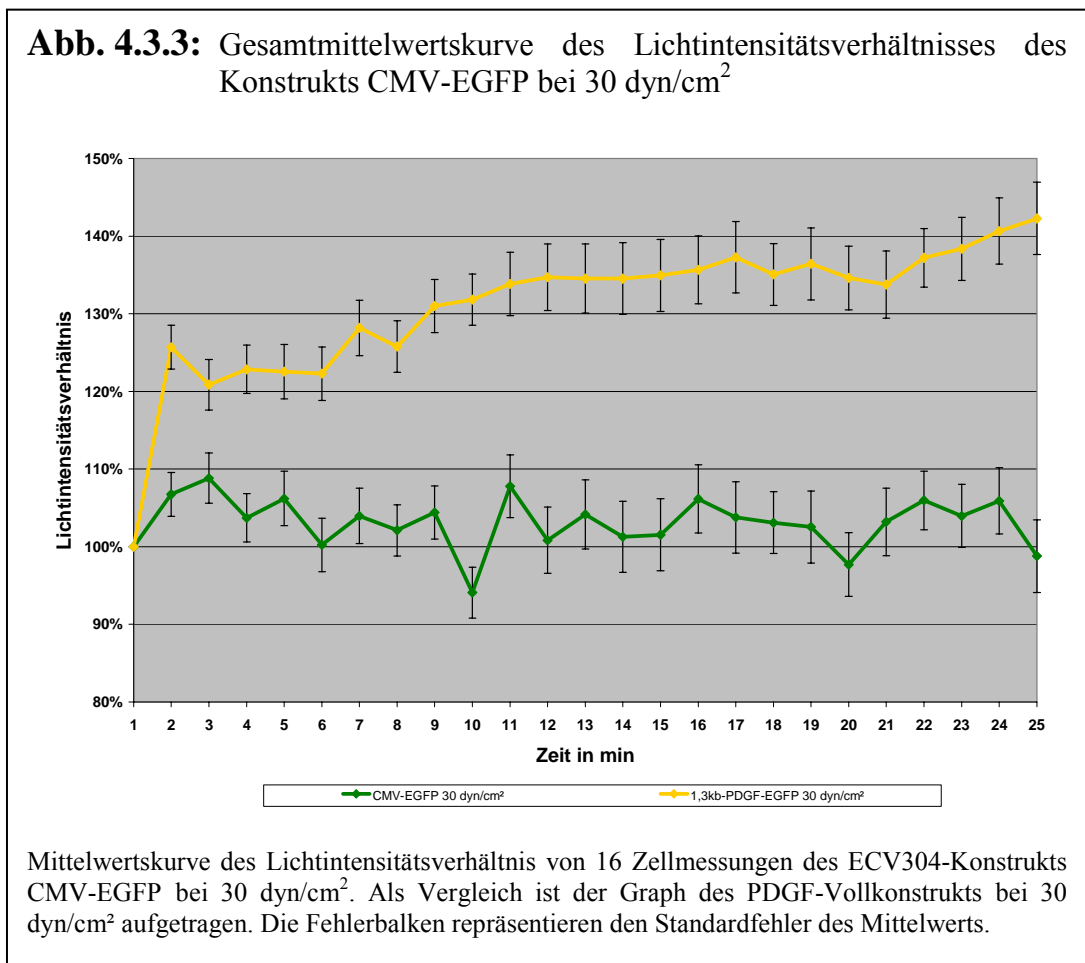
Abb. 4.3.2: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb PDGF-[ΔSSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm² im Vergleich zum intakten Promotorkonstrukt



Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnis von 59 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb PDGF-[ΔSSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm². Als Vergleich ist die Kurve des intakten Konstrukts angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

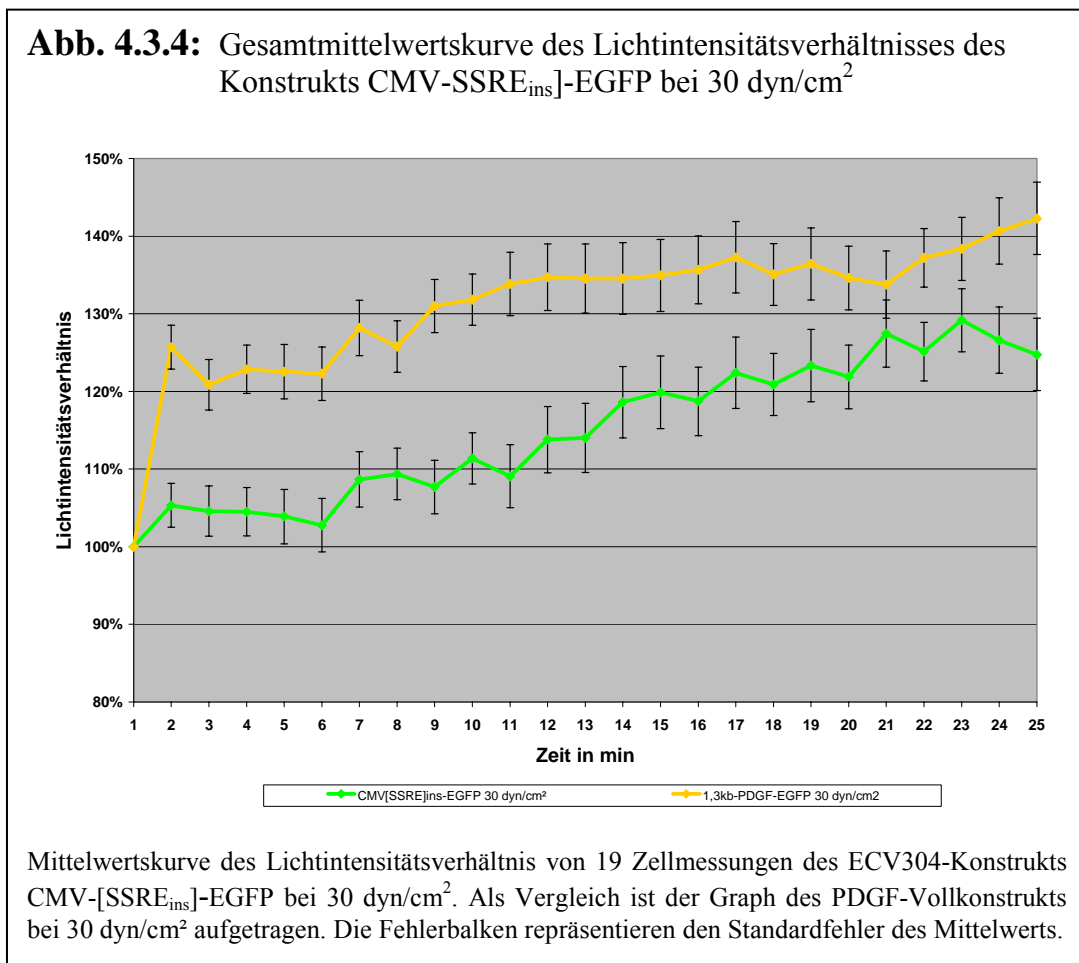
4.3.3 Messung des Konstrukts CMV-EGFP bei 30 dyn/cm²

Bei diesem Versuch wurde das EGFP unter die Expressionskontrolle des CMV-Promotors gestellt, der keine dem SSRE ähnliche Promotorstruktur enthält. Die Zellen produzieren eine basale Menge an EGFP, die allerdings während des vier Stunden währenden Versuchs bei 30 dyn/cm² zwar um den Grundwert unduliert ($p = 0,1$) aber praktisch nicht ansteigt (Abb. 4.3.3). Die erhaltene Kurve unterscheidet sich signifikant ($p = 0,001$) von der Kurve des Promotorkonstrukts 1,3 kb PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm², dessen Anstieg des Lichtintensitätsverhältnisses im Vergleich sehr deutlich zu sehen ist.



4.3.4 Messung des Konstrukts CMV-[SSRE_{ins}]-EGFP bei 30 dyn/cm²

Bei diesem Versuch wurde das EGFP unter die Expressionskontrolle des CMV-Promotors gestellt, dem das SSRE inseriert wurde. Die Zellen produzieren eine basale Menge an EGFP, die während des vier Stunden währenden Versuch bei 30 dyn/cm² deutlich ansteigt (Abb. 4.3.3). Die erhaltene Kurve unterscheidet sich allerdings signifikant ($p = 0,001$) von der Kurve des Promotorkonstrukts 1,3 kb PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm², dessen Anstieg des Lichtintensitätsverhältnisses im Vergleich zu sehen ist.

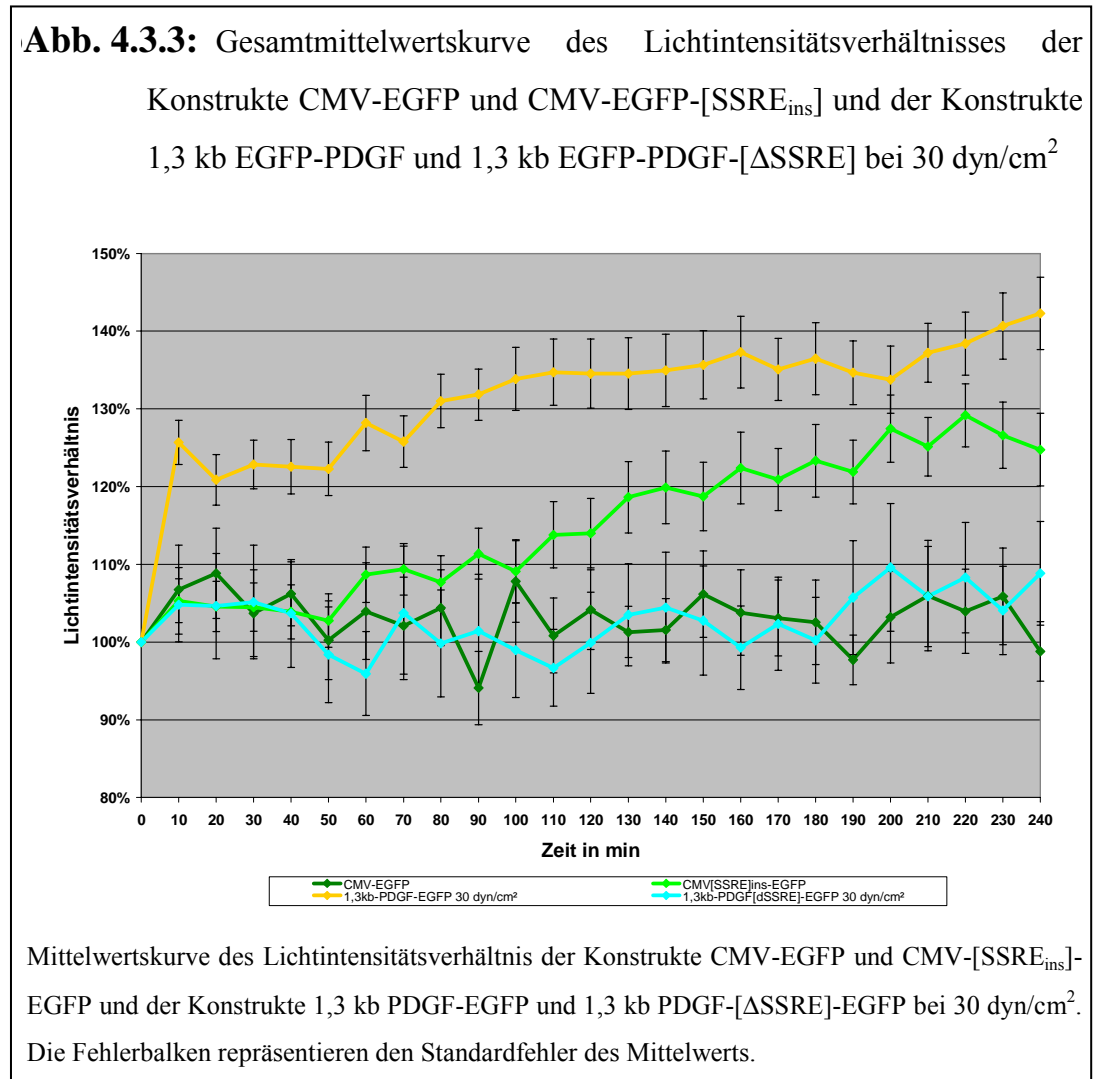


4.3.5 Vergleich der Responsivität der Konstrukte CMV-EGFP und CMV-[SSRE_{ins}]-EGFP mit den Konstrukten 1,3 kb PDGF-EGFP und 1,3 kb PDGF-[ΔSSRE]-EGFP bei 30 dyn/cm²

Betrachtet man die erhaltenen Kurven der verschiedenen Promotorkonstrukte, so erkennt man, dass die Kurvenverläufe der Konstrukte 1,3 kb PDGF-[ΔSSRE]-EGFP und CMV-EGFP nicht signifikant verschieden sind. Die beiden Kurven der Konstrukte ohne SSRE nehmen fast denselben Verlauf und steigern ihre Lichtintensität praktisch nicht (Abb. 4.3.5). Sie liegen weit unter der vom Vollkonstrukt 1,3 kb PDGF-EGFP erreichten Lichtintensität, zu dessen Kurvenverlauf sie signifikant unterschiedlich sind ($p = 0,001$).

Zwischen dem Vollkonstrukt und denen ohne SSRE liegt der Kurvenverlauf des CMV-Promotorkonstrukts mit inseriertem SSRE. Das Konstrukt CMV-[SSRE_{ins}]-EGFP unterscheidet sich sowohl signifikant vom Vollkonstrukt ($p = 0,001$) als auch von den SSRE-defizienten Konstrukten ($p = 0,02$).

Damit kann gezeigt werden, dass das SSRE für die Scherstress-vermittelte Induktion des PDGF-Promotors unerlässlich ist und gleichzeitig alleine in der Lage, einem Promotor Scherstressresponsivität zu verleihen.



4.4 Pharmakologische Beeinflussung der durch Scherstress induzierten Reporter-genexpression

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss verschiedener Chemikalien auf die Expression des PDGF-Vollkonstrukts untersucht.

Phorbol ester steigert die Transkriptionsrate des PDGF-Promotors, indem er an ein nahe der TATA-Box gelegenes „sis-proximal-element“ (SPE) bindet, das essenziell für die Reaktion mit Phorbol ester ist (Jin et al., 1993).

Die Proteinkinase C wurde mit Chelerythrin und Calphostin C gehemmt.

Chelerythrin ist ein pflanzliches Alkaloid aus dem Schöllkraut, das die Substrat-Stelle in der katalytischen Domäne der PKC blockiert. Die Hemmung ist damit unabhängig von anderen Co-Faktoren wie DAG oder Ca^{++} (Malek et al., 1996).

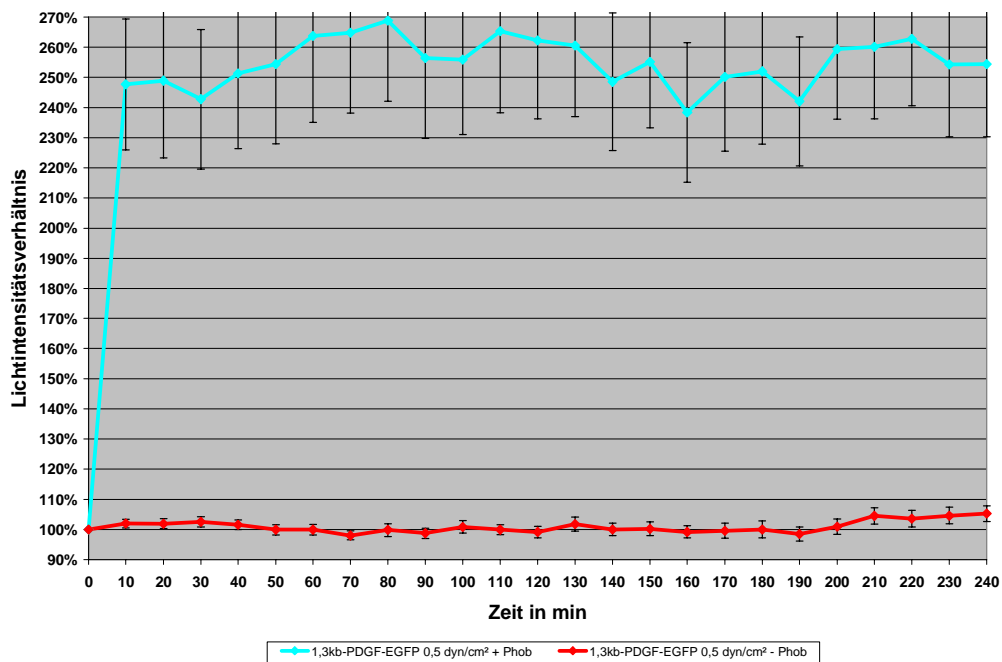
Calphostin C ist eine Pilzsubstanz, die an kompetitiven DAG- und Phorbolster-Bindungsstellen in der regulatorischen Domäne von PK C bindet.

Das Antibiotikum Cycloheximid ist ein Hemmer der Proteinsynthese, der in Eukaryonten direkt an die ribosomale mRNA-Translokase bindet und damit die Funktion der Ribosomen hemmt.

4.4.1 Induktion des PDGF-Promotors durch Phorbolster

Zellen mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP wurden für vier Stunden in der Flusskammer bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ mit Medium durchströmt, dem Phorbolster PMA (100 ng/ml) zugegeben wurde.

Abb. 4.4.1: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ unter Phorbolster



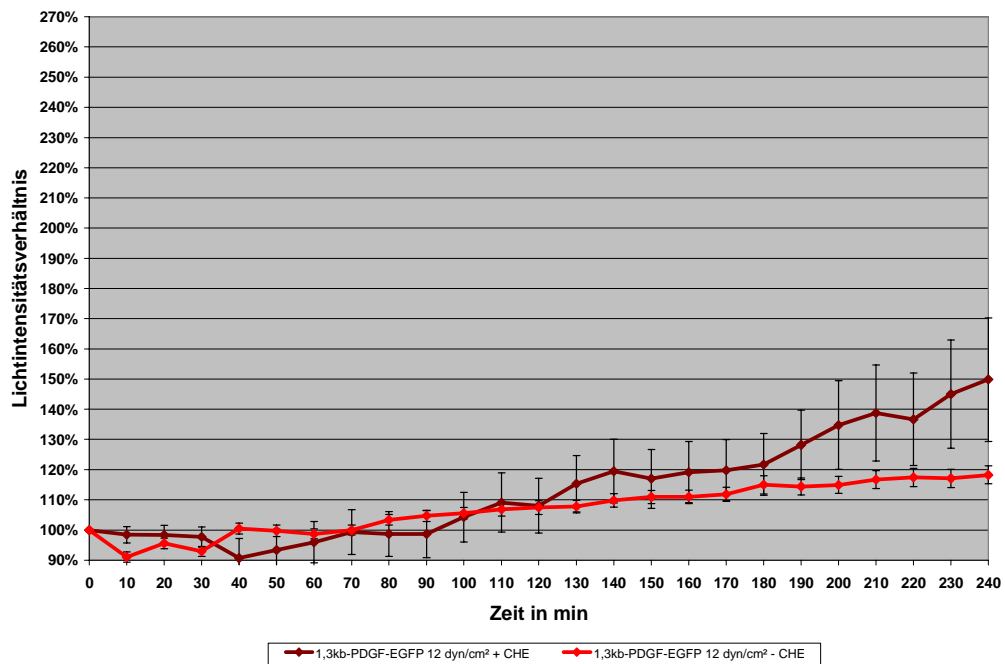
Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnis von 24 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ unter Cycloheximid ($10 \mu\text{g/ml}$). Als Vergleich ist die Kurve des intakten PDGF-Konstrukts bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ ohne Phorbolster angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

Die erhaltene Kurve zeigt eine schnelle initiale Zunahme der Lichtintensität, die sich über die gesamten vier Stunden aufrechterhält. Die Kurve unterscheidet sich signifikant ($p = 0,001$) von der Kurve des PDGF-Vollkonstrukts bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ ohne Phorbol ester-Stimulation.

4.4.2 Hemmung der Proteinkinase C durch Chelerythrin

Zellen der mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP stabil transfizierten Zelllinie ECV304 wurden für vier Stunden in der oben beschriebenen Apparatur bei 12 dyn/cm^2 in Medium inkubiert, dem Chelerythrin ($1 \mu\text{M}$) zugegeben wurde.

Abb. 4.4.2: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm^2 unter Chelerythrin



Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses von 19 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm^2 unter Chelerythrin (f. c. $1 \mu\text{M}$). Als Vergleich ist die Kurve des intakten PDGF-Konstrukts angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

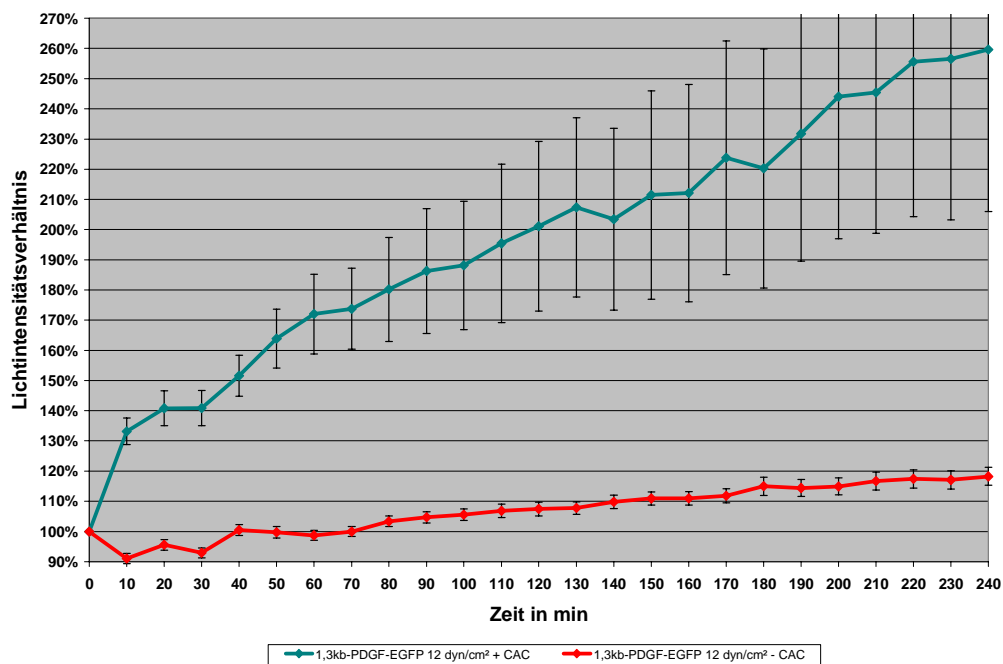
Die Lichtintensität der Zellen steigt nach einem initialen Abfall an und erreicht einen Wert von 150% nach vier Stunden (Abb. 4.4.2). Dabei unterscheidet sich die Kurve nach drei Stunden von dem der Messung derselben Zellen bei 12 dyn/cm^2 ohne Chelerythrin. Die Zellen unter Chelerythrin erreichen eine um 30% stärkere Lichtintensität als die nicht behandelten Zellen.

4.4.3 Hemmung der Proteinkinase C durch Calphostin C

Zellen der mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP stabil transfizierten Zelllinie ECV304 wurden für vier Stunden in der oben beschriebenen Apparatur bei 12 dyn/cm² in Kulturmedium inkubiert, dem Calphostin C (100 nM) zugegeben wurde.

Hemmt man die Proteinkinase C der Zellen mit Calphostin C bei 12 dyn/cm², so erhält man eine Kurve, die über vier Stunden gleichmäßig auf 260% des Ausgangswerts ansteigt (Abb. 4.4.3).

Abb. 4.4.3: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm² unter Calphostin C



Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses von 17 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 12 dyn/cm² unter Calphostin C (f. c. 100nM). Als Vergleich ist die Kurve des intakten PDGF-Konstrukts angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

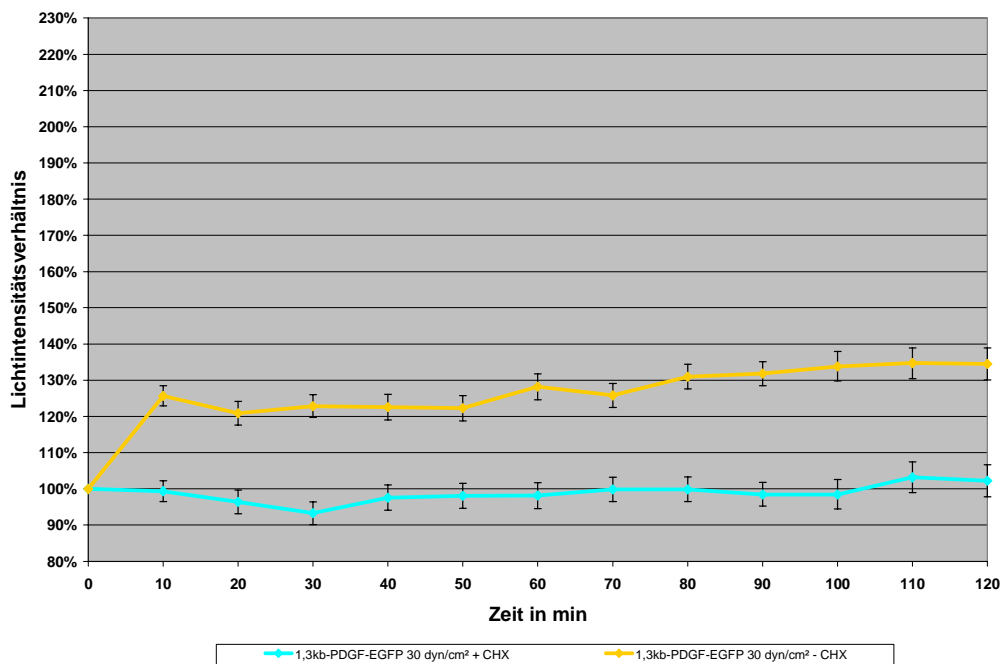
Die Kurve unterscheidet sich signifikant ($p = 0,001$) von der des Vollkonstrukts bei 12 dyn/cm² ohne Calphostin C-Zugabe, die nur einen Spitzenwert von 118% erreicht.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die Hemmung der Proteinkinase C zu einer erhöhten scherstressabhängigen Expression der unter der Kontrolle des PDGF-Promotors stehenden Gene führt.

4.4.4 Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid

Zellen der mit dem Konstrukt 1,3 kb-PDGF-EGFP stabil transfizierten Zelllinie ECV304 wurden für zwei Stunden in der oben beschriebenen Apparatur bei 30 dyn/cm² in Kulturmedium inkubiert, dem Cycloheximid (f.c. 10 µg/ml) zugegeben wurde.

Abb. 4.4.4: Gesamtmittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnisses des Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm² unter Cycloheximid



Mittelwertskurve des Lichtintensitätsverhältnis von 58 Zellmessungen des ECV304-Konstrukts 1,3 kb-PDGF-EGFP bei 30 dyn/cm² unter Cycloheximid (10 µg/ml). Als Vergleich ist der Graph des intakten PDGF-Konstrukts angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

Bei Hemmung der Proteinsynthese der Zellen steigt die Lichtintensität der Zellen wie erwartet nicht. Die Lichtintensität der Zellen pendelt leicht um den Grundwert, ändert sich aber kaum (Abb. 4.4.4).

Der bei der Messung der Zellen bei 30 dyn/cm² ohne Cycloheximid beobachtete schnelle initiale Anstieg der Lichtintensität kann in diesem Versuch gehemmt werden, so dass es sich beim diesem schnellen Anstieg nicht um ein Quench-Phänomen des schon vorliegenden Proteins handeln kann, sondern auf die Proteinsynthese zurückgehen muss.

5. Diskussion

5.1 Etablierung eines Messplatzes für wandernde fluoreszierende Zellen

Grundlage der hier vorgelegten Arbeit ist eine Flusskammer zur rheologischen Stimulation von Zellen. Die Kammer erlaubt es, mit Hilfe einer Rollenpumpe einen laminaren Mediumfluss bestimmter Scherstress-Stärke über Zellen zu erzeugen, die gleichzeitig mit einem inversen Mikroskop beobachtet werden können. Durch Transfektion von Zellen der Linie ECV304 mit einem EGFP-Reportergen und einer entsprechenden Fluoreszenzvorrückung des Mikroskops kann die Lichtintensität des Reporterproteins detektiert werden.

Durch die Sensitivität der hochauflösenden ICCD-Kamera und die verstärkten Fluoreszenzeigenschaften des Reporterproteins EGFP ist es möglich, die für die Fluoreszenzmessung benötigte Anregungsmenge von ultraviolettem Licht möglichst gering zu halten, so dass weder Zellen noch Proteine geschädigt werden. Dies konnte durch Vergleich der Durchlichtbilder zu Beginn und zu Ende eines jeweiligen Versuchs und einer intensiven Anregung einer definierten EGFP-Menge ohne erhaltene Ausbleicheffekte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Der Messplatz eignet sich damit zur Echtzeit-Beobachtung lebender Zellen und ihrer Reaktionen auf den applizierten Scherstress. Durch die praktisch stufenlose Verstellbarkeit der Rollenpumpe können definierte Scherkräfte auf die Zellen ausgeübt werden, wobei andere Versuchsbedingungen wie Zusammensetzung, pH und Temperatur des Kulturmediums konstant gehalten werden können. In gleicher Weise können bei konstanter Scherstress-Einwirkung auf die Zellen dem Medium Substanzen zugegeben werden und deren Einfluss auf die Zellen beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einen bestehenden Reportergen-Assay und den oben beschriebenen Messplatz so zu modifizieren, dass er dafür geeignet ist, sich unter Scherstress-Einwirkung bewegende Zellen zu erfassen und statistisch auszuwerten. Durch die gemischte Aussaat der mit dem Reportergen transfizierten Zellen der Linie ECV304 mit untransfizierten Zellen derselben Linie konnten die Kernprobleme des bestehenden Messplatzes angegangen werden: Zum einen die transfizierten Zellen möglichst einzeln vor einem stummen Hintergrund beobachten

zu können und zum anderen den physiologischen Zusammenhalt eines epithelialen bzw. endothelialen Monolayers zu gewährleisten.

5.2 Stärken und Schwächen des EGFP-Reporter-Gen-Assays

Der große Vorteil eines Reporter-Gen-Assays auf Basis des EGFP im Gegensatz zu anderen Assays auf Grundlage verschiedener Reporterenzyme, wie beispielsweise der oftmals eingesetzten Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), ist es, dass das Expressionsmuster lebender Zellen in Echtzeit beobachtet werden kann. Dabei ist es möglich, einzelne Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden hinweg zu verfolgen und eine Aussage über die Expressionsentwicklung des Reporter-Genprodukts derselben Zellen zu treffen. Bei einem Enzym-Assay wie dem CAT-Assay kann nur eine Zellgesamtheit beurteilt werden, die zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Versuch genommen wird. Ein zeitlicher Verlauf kann dabei nur als Aneinanderreihung von Datensätzen verschieden lange andauernder Versuche erreicht werden.

Anhand der in der Technik der gemischten Aussaat immer vorhandenen nicht-transfizierten Zellen kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Phänomenen um endogene Fluoreszenzbildung handelt, da diese Zellen konsistent negativ blieben. Ein gewisser gemessener Signalwert der nicht-transfizierten Zellen ist auf nicht gänzlich auszuschaltende Streulichtquellen und das Hintergrundrauschen der unter Hochspannung stehenden Photonenkamera zurückzuführen.

Ein Nachteil des Reporter-Gen-Assays ist es, dass er im hier angewandten Erfassungs- und Auswertungssystem nur relative Aussagen über die EGFP-Expression zulässt. Dabei stellt die erste Messung der Lichtintensität des EGFP der Zellen den Ausgangswert dar, auf den die weiteren Messungen bezogen werden. Da die Zellen zwar gleichförmig in Ruhe EGFP exprimieren, keinesfalls aber gleichmäßig, kann der Ausgangswert verschiedener beobachteter Zellen deutlich differieren. Damit enthalten die errechneten Kurven ausschließlich eine Aussage über die relative Entwicklung der EGFP-Expression, nicht aber über den absoluten Wert. Um dieses Defizit zu beheben, müsste die Messapparatur geeicht werden, was bei der Vermessung von wenigen einzeln in einem konfluenten Monolayer vorliegenden transfizierten Zellen praktisch unmöglich und von den Computer-Programmen der Firma Hamamatsu auch nicht vorgesehen ist.

5.3 Einfluss der Scherstress-Stärke auf den durch PDGF-Promotorkonstrukte kontrollierten Reportergehalt (EGFP)

Seit längerem ist bekannt, dass manche Gene durch den Einfluss der auf Zellen einwirkenden Strömungskräfte reguliert werden. Dabei stellte sich die Frage, ob es sich bei der Änderung der Expressionsrate verschiedener Gene um ein Alles-oder-Nichts-Gesetz handelt oder ob dieser Vorgang gestuft vonstatten geht.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines bestehenden Reporter-Gen-Assays auf Grundlage des EGFP die strömungsabhängige Expressionsänderung des PDGF-Promotors untersucht.

Dabei wurde zuerst einmal gezeigt, dass sich die Expression des dem PDGF-Promotor nachgeschalteten EGFP bei minimaler Schubspannung praktisch nicht ändert.

Im Folgenden wurde auf die Zellen der Linie ECV304, die mit dem Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert wurden ein Scherstress der Stärke 12 dyn/cm^2 und 30 dyn/cm^2 ausgeübt, wie er auch Arterien des Menschen durchaus vorkommt. Dabei zeigte sich, dass in beiden Ansätzen die EGFP-Expression deutlich angehoben wurde, wobei sich eine graduelle Abstufung zwischen 12 dyn/cm^2 und 30 dyn/cm^2 zeigte. Während sich die Lichtintensität bei geringer Schubspannung innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 4 Stunden nur um ca. ein Viertel steigerte, erreichte sie bei 30 dyn/cm^2 ein Niveau von fast 150% des Ausgangswerts.

Damit konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression des PDGF-Promotors scherstressabhängig ist und dass diese Abhängigkeit graduiert ist und nicht einem Alles-oder-Nichts-Gesetz entspricht. Somit können die von Resnick et al. gewonnenen Erkenntnisse über die Scherstress-Induktion des PDGF-Promotors bestätigt werden.

Interessant ist eine Betrachtung der Kinetiken der Fluoreszenzintensitätszunahme unter den verschiedenen Scherstress-Raten. Während es bei $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ nur zu einem Undulieren um den Ausgangswert kommt, fällt die Helligkeit der ECV304-Zellen bei 12 dyn/cm^2 erst einmal unter den Ausgangswert. Erst nach 40 Minuten wird die Ausgangshelligkeit wieder erreicht, deren Niveau für die folgende halbe Stunde gehalten wird. Erst 80 Minuten nach Einsetzen der Schubspannung kommt es zu einem Ansteigen der Lichtintensität über den Ausgangswert. Für die restlichen

zweieinhalb Stunden kann dann aber eine kontinuierliche Steigerung der Helligkeit auf einen Endwert von 118% beobachtet werden.

Bei der Messung mit 30 dyn/cm² kommt es initial zu einem enorm schnellen Anstieg der Lichtintensität auf gut 125%. Diese fällt innerhalb der nächsten 10 Minuten wieder auf 120% von wo aus sie bis zum Ende des Versuchs gleichmäßig auf 142% des Ausgangswerts ansteigt.

Als Mechanismus für einen Verlust an Helligkeit der Zellen könnte man sich ein Abschnüren EGFP-gefüllter Vesikel durch den Mediumfluss vorstellen, für die schnelle Lichtintensitätszunahme bei 30 dyn/cm² kommt hingegen eine Geninduktion kaum in Betracht, sondern vielmehr eine Translationsinduktion, da mit 10 Minuten die Zeit für die Transkription und Translation als zu kurz angesehen werden muss.

Die beobachteten Phänomene können nicht auf Quench- oder Anti-Quench-Effekte zurückgehen, da sie weder bei Reprotergen-Konstrukten mit dem CMV-Promotor, den SSRE-defizienten PDGF-Promotoren noch bei Hemmung der Proteinsynthese beobachtet wurden, bei denen zu Beginn der Scherstress-Applikation auch immer eine vergleichbare basale Menge EGFP vorlag, die ähnliche Vorgänge hätte erzeugen müssen.

Dieses Phänomen sollte in Zukunft näher darauf untersucht werden, ob es sich um eine Kombination verschiedener Vorgänge handelt, an denen das SSRE-Motiv des Promotors primär beteiligt ist. Zu denken wäre an ein nach Transkriptionsaktivierung ausgelöstes Phänomen, das entweder die Translation der bereits vorhandenen mRNA anhebt oder die Reifung und den Export von gespeicherter mRNA aus dem Zellkern steigert.

5.4 Die Rolle des Scherstress-responsiven Elements im PDGF-Promotor

Schon 1992 wurde von Hsie und Mitarbeitern gezeigt, dass die PDGF-Transkription in strömungsexponierten Endothelzellen gesteigert wird. Ein Jahr später wurde dieses Phänomen von Resnick et al. (1993) in Zusammenhang mit einem Promotorelement gebracht, dass von ihm als SSRE bezeichnet wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das SSRE essentiell und ausreichend für die Sensitivität des PDGF-Promotors für die Detektion von Scherstress außerhalb der Zelle ist.

Dafür wurden Zellklone untersucht, die im transfizierten PDGF-Promotor SSRE-defizient sind und mit dem Vollkonstrukt verglichen. Es ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen der beim Vollkonstrukt beobachteten Expressionssteigerung und dem Verbleiben des SSRE-defizienten Klons auf einem basalen Fluoreszenzintensitätsniveau. Durch das fehlende Ansprechen der EGFP-Expression der SSRE-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass das Promotor-Element für eine scherstressabhängige Induktion des einem Promotor nachgeschalteten Gens unbedingt erforderlich ist.

Um zu untersuchen, ob das Promotorelement allein ausreichend ist, um eine strömungsabhängige Expression von Genen zu veranlassen, wurde das SSRE in den Promotor des Cytomegalie-Virus kloniert. Dieser konstitutiv von humanen Zellen exprimierte Promotor besitzt selbst keinerlei Struktur, die dem SSRE ähnelt. So verwunderte es nicht, dass das Reporter-gen-Konstrukt mit CMV-Promotor und EGFP keinerlei EGFP-Zunahme unter Scherstress zeigte. Dagegen bot das CMV-Promotorkonstrukt, dem das SSRE inseriert wurde, eine deutliche Zunahme der Lichtintensität und damit des Reporter-Proteins EGFP. Diese Expressionssteigerung erreichte allerdings nicht das Niveau, das beim PDGF-Vollkonstrukt zu beobachten war.

Es konnte damit gezeigt werden, dass das SSRE in einen nicht Scherstress-responsiven Promotor verbracht diesen für Strömungskräfte suszeptibel macht. Dass dies aber nicht in selbener Masse wie beim PDGF-Promotor erfolgt, mag daran liegen, dass es zusätzlicher regulatorischer Elemente im Promotor bedarf, um die volle Expressions-Steigerung zu erhalten.

5.5 Pharmakologische Beeinflussung der durch Scherstress induzierten Reporter-genexpression

Zur Testung des Promotor-Konstrukts und des Messplatzes wurde das PDGF-Vollkonstrukt in Medium dem Phorbol-ester PMA inkubiert. Dieser bindet an den PDGF-Promotor und besitzt die Fähigkeit, diesen zu induzieren (Heldin et al.,

1999). Wie erwartet stieg die Lichtintensität des EGFP schnell auf das Zweieinhalbfache des Ausgangswerts, stieg langsam weiter an, um schließlich wieder leicht abzufallen. Damit konnte die Phorbolster-Induktion des PDGF-Promotors bestätigt und der Messplatz als geeignet betrachtet werden für die Auswertung sich ändernder Lichtintensitäten einzelner Zellen.

Als Negativ-Kontrolle wurden die ECV304-Zellen mit dem PDGF-Vollkonstrukt einem strömenden Medium von 30 dyn/cm² Schubkraft ausgesetzt, das mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid versetzt war. Eine Proteinbiosynthese in Form einer Lichtintensitätszunahme durch EGFP-Expression konnte in diesen Versuchen nicht beobachtet werden.

Einen ersten Schritt zur Aufhellung des Signaltransduktionswegs stellte die Hemmung der Proteinkinase C dar. Dieses zentrale Protein der intrazellulären Informationsweitergabe wurde in Untersuchungen von Jin et al. aus dem Jahre 1993 für die Induktion des PDGF-Promotors verantwortlich gemacht.

Die Hemmung des Proteins mit Chelerythrin und Calphostin C ergab in beiden Versuchsansätzen jeweils eine gesteigerte Lichtintensitätszunahme im Vergleich zum Ansatz ohne Hemmstoffe. Die Kinetiken der entsprechenden EGFP-Expression unterschieden sich dabei. So zeigten die Zellen bei einem Scherstress von 12 dyn/cm² und Chelerythrin im Medium erst nach 90 Minuten eine Steigerung der Lichtintensität, die nach drei Stunden den Anstieg der Normalmessung deutlich überflügelte. Dagegen stieg der Graph der Messung bei Calphostin C-Einsatz schon kurz nach Beginn an und erreichte einen Wert von 260% der Ausgangshelligkeit.

Die hier gefundenen Ergebnisse zur Hemmung der Proteinkinase C widersprechen den Resultaten von Jin und Mitarbeitern, die die Aktivierbarkeit der PDGF-Transkription durch einen PK-C-vermittelten Signalweg zeigte. Dabei stimulierten Jin et al. den Promotor nicht mit Hilfe einer angelegten Schubspannung, sondern induzierte die PDGF-Expression durch die Zugabe von Phorbolster. Dabei muss beachtet werden, dass Phorbolster zwar wie von Jin gezeigt die PK-C aktiviert (Parekh, 2000) und über eine mögliche Signalkaskade mit IKK, IκB und NFκ-B den PDGF-Promotor stimuliert, aber auch direkt an den PDGF-Promotor bindet und diesen induziert (Heldin et al., 1999).

5.6 Zukunftsperspektiven

Durch die erfolgreiche Anpassung des bestehenden Reporter-gen-Assays an die Ansprüche der Beobachtung sich bewegender Zellen hat man ein schlagkräftiges Werkzeug zur Untersuchung einzelner Zellen unter Scherstress-Einfluss zu Hand.

Als Perspektive für die Nutzung des hier etablierten Systems bieten sich mannigfaltige Einsatzmöglichkeiten an. So zwingt sich die weitere Klärung des Signaltransduktionswegs und die damit verbundene Suche nach einem Mechanorezeptor geradezu auf. Hierbei sollte besonders der Weg proximal des Transkriptionsfaktor NF κ -B näher untersucht werden und ob es hierbei eine Verbindung zu den als Mechanosensor vorgeschlagenen Integrinen oder zum Zytoskelett gibt.

Des Weiteren bietet sich durch die vorliegenden Vektor-Konstrukte eine Untersuchung anderer Zellarten wie Osteozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Myozyten etc. an. Diese könnten transfiziert werden und auf Scherstress-Responsivität und Einfluss diverser Pharmaka auf ihr PDGF-Expressionsmuster untersucht werden.

Dieselben Messungen bieten sich auch für Promotoren der Gene iNOS, TGF- β oder anderer an, in denen das SSRE nachgewiesen werden konnte. Ob und in welcher Weise diese Gene durch Scherstress reguliert werden, ist bis heute noch nicht klar und ist für das pathologische Verständnis diverser Erkrankungen interessant.

Durch Einsatz verschiedener Fluorochrome könnte auch eine Parallelbeobachtung mehrerer Promotor-Konstrukte erfolgen, so dass man die Expressions-Antworten der verschiedenen Konstrukte derselben Zellen in Echtzeit beobachten könnte. Dabei könnte man sich der sich deutlich unterscheidenden Emissionsspektren der aus dem GFP hervorgegangenen neuen fluoreszierenden Proteine bedienen.

6. Zusammenfassung

Zellen sind im menschlichen Organismus ständig mechanischen Kräften ausgesetzt. Eine dieser Kräfte ist die spezielle Schubkraft, die durch Flüssigkeitsstrom auf Zellen ausgeübt wird und als Scherstress bezeichnet wird.

Die Stimulation von Zellen durch Scherstress führt zu diversen Reaktionen, die von Wanderungsvorgängen, über Umbau des Zytoskeletts bis hin zur gesteigerten Expression verschiedener Gene reichen. Für die Induktion des Gens der B-Kette des Plättchen-Wachstumsfaktors (PDGF) wurde von Resnick 1993 ein sechs Basenpaare langes cis-aktives Scherstress-responsives Promotorelement (SSRE) identifiziert, das an der Transkriptionsinduktion des Gens durch Scherstress beteiligt ist.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten die Eigenschaften dieses SSRE gezeigt werden, indem ein Reportergen-Assay mit dem grün fluoreszierenden Proteins EGFP in Zellen der Linie ECV304 ausgetestet wurde. Eine Fragestellung der Arbeit bestand darin, zu prüfen ob das SSRE notwendig und ausreichend für die Scherstress-Responsivität eines Promotors ist und ob die Expressionsstärke des Reporterproteins EGFP mit der Stärke und Dauer der Scherstressstimulation korreliert. Zudem sollte der Effekt verschiedenartiger pharmakologischer Substanzen auf den PDGF-Promotor unter Scherstress gezeigt werden. Dazu wurde ein neues arithmetisches Verfahren entwickelt, das erlaubt, Zellen unter Einwirkung von Scherkraft angemessen zu vermessen und statistisch auszuwerten. Durch den Einsatz des EGFP und einer hochsensitiven ICCD-Photonenkamera war es möglich, die Messung der Expressionskinetik des Reportergens in Echtzeit durchzuführen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in ECV304-Zellen unter Scherstress von 0,5, 12 und 30 dyn/cm² die Expression des intakten PDGF-Promotors mit der Stärke und Dauer der Scherstressstimulation korreliert. Dieser Effekt ist nicht zu beobachten, wenn das SSRE aus dem PDGF-Promotor entfernt wird.

Ebenfalls zu keiner Steigerung der Genexpression kommt es, wenn das Reportergen hinter den Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV) geschaltet ist, der kein bekanntes Scherstress-responsives Promotor-Element enthält. Insetiert man in den CMV-Promotor das SSRE, so zeigt der Promotor unter Scherstress-Einwirkung ebenfalls eine gesteigerte

te Expression, die allerdings hinter der des PDGF-Vollkonstrukts zurückbleibt. Es konnte damit gezeigt werden, dass das SSRE in einen nicht Scherstress-responsiven Promotor verbracht diesen für Strömungskräfte suszeptibel macht.

Der PDGF-Promotor enthält eine bekannte Phorbolster-Bindungsstelle. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ECV304-Zellen bei Inkubation in mit Phorbolster versetztem Medium die Transkription des Reportergens deutlich steigern.

Ebenfalls zu einer Steigerung der Expression des PDGF-Vollkonstrukts kommt es bei appliziertem Scherstress von 12 dyn/cm² und gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase C (PK-C). Zwar zeigt die Hemmung mit Chelerythrin eine schwächere Lichtintensitätszunahme, wie sie beim Einsatz von Calphostin C, beide Messungen ergaben aber eine Steigerung der Lichtintensität gegenüber der Messung des PDGF-Vollkonstrukts bei 12 dyn/cm² in normalem Kulturmedium.

7. Literaturverzeichnis

- Abboud H. (1995) Role of platelet-derived growth factor in renal injury. *Annu Rev Physiol*; 57:297-309
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Pub
- Aldons J. (2000) Atherosclerosis. *Nature*; 407:233-242
- Ali M, Schumacker P. (2002) Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit Care Med*; 30:198-206
- Antoniades H N, Scher C D, Stiles C D. (1979) Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 76:1809-1812
- Antoniades H, Galanopolous T, Neville-Golden J, Kiritsky C, Lynch E. (1991) Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epidermal cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:565-569
- Antoniades H. (1981) Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. *Proc Natl Acad Sci*; 78:7314-7317
- Apodaca G. (2001) Stretch-regulated exocytosis of discoidal vesicles in urinary bladder epithelium. *Urology*; 57:103-104
- Barbee KA., Davies PF., Lal R. (1994) Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ. Res.*; 74:163-171
- Bokman SH., Ward WW. (1981) Renaturation of aequorea green-fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun.*; 101(4):1372-80.
- Bonthron D., Morton C., Orkin S., Connors T. (1988) Platelet-derived growth factor A chain: gene structure, chromosomal location and basis for alternative mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85:1492-1496
- Boström H., Willetts K., Pekny M., Leveen M., Lindahl P., Hedstrand H., Pekny M., Hellström M., Gebre-Medhin S., Schalling M., Nilsson M., Kurland S., Törnell J.,

- Heath J., Betsholtz C. (1996) PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell*; 85:863-873
- Brown J., Reading SJ., Jones S., Fitchett CJ., Howl J., Martin A., Longland CL., Michelangeli F., Dubrova YE., Brown CA. (2000) Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. *Lab Invest.*; 80(1):37-45.
- Bryckaert M., Rendu F., Tobelem G., Wasteson A. (1989) Collagen-induced binding to human platelets of platelet-derived growth factor leading to inhibition of P43 and P20 phosphorylation. *J Biol Chem*; 264:4336-4341
- Chien S. (1998) Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *INABIS 1998*
- Cody CW., Prasher DC., Westler WM., Prendergast FG., Ward WW. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry.*; 32(5):1212-1218.
- Coplen D., Howard P., Duckett J., Snyder H., Mecarak E. (1995) Cultured bladder cells and their response to mechanical strain. *Adv Exp Med Biol*; 385:207-214
- Cormack BP., Valdivia RH., Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.*; 173(1 Spec No):33-38.
- Cunningham L., Brecher P., Cohen R. (1992) Platelet-derived growth factor receptors on macrovascular endothelial cells mediate relaxation via nitric oxide in rat aorta. *J Clin Invest*; 89:878-882
- Davies P. (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*; 75(3):519-560
- DiCorleto P., Bowen-Pope, Daniel F. (1983) Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci*; 80:1919-1923
- Dirks R., Bloemers H. (1996) Signals controlling the expression of PDGF. *Mol. Biol Rep*; 22:1-24
- Schnitter H., Drenckhahn D. (2003) Biomechanik des Knochens. In: Benninghoff-Drenckhahn, Anatomie, Bd. 1 (D. Drenckhahn Hrsg.), pp. 267-277, Urban & Fischer, München-Jena

- Drenckhahn D. (2003) Epithelgewebe. In: Benninghoff-Drenckhahn, Anatomie, Bd. 1 (D. Drenckhahn Hrsg.), pp. 94-108, Urban & Fischer, München-Jena
- Drenckhahn D. (2003) Zellenlehre. In: Benninghoff-Drenckhahn, Anatomie, Bd. 1 (D. Drenckhahn Hrsg.), pp. 1-91, Urban & Fischer, München-Jena
- Drexel H., Quentmeier H., Dirks W., MacLeod R. (2002) Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 38(4):185-186
- Franklin G., Donovan M., Adam G., Holmgren L., Pfeifer-Ohlson S., Ohlson R. (1991) Expression of the human PDGF-B gene is regulated by both positively and negatively acting cell type-specific regulatory elements located in the first intron. *EMBO J*; 10:1365-1373
- Garcia-Anoveroes J., Corey D. (1997) The molecules of mechanosensation. *Annu Rev Neurosci*; 20:567-594
- Gladwin A. (1990) Human megacaryocyte size varies with anatomical site. *Br J Haematol*; 76:333-339
- Goustin A., Betsholtz C., Pfeifer-Ohlson S., Persson H., Rydnert J., Bywater M., Holmgren G., Heldin C., Westermark B., Ohlsson R. (1985) Coexpressing of the *sis* and *myc* proto-oncogenes in human developing placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell*; 41:301-302
- Gudi S., Clark C., Frangos J. (1996) Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. *Circ Res*; 79:834-839
- Haas J., Park EC., Seed B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*; 6(3):315-324
- Hamill O., Martinac B. (2001) Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev*; 81:686-740
- Haniu M., Hsieh M., Rohde M., Kenney W. (1994) Characterization of disulfide linkages in platelet-derived growth factor. *Arch Biochem Biophys*; 310:433-439
- Harmon K., Witkop C., White J., King R., Peterson M., Moore D., Tashjian J., Marinelli W., Bittermann P. (1994) Pathogenesis of pulmonary fibrosis: platelet-derived growth factor precedes structural alterations in the Hermansky-Pudlak syndrome. *J Lab Clin Med*; 123:617-627

- Heim R., Prasher DC., Tsien RY. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91(26):12501-12504.
- Heldin C., Johnson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., Westermark B. (1986) A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature*; 319:511-514
- Heldin C., Westermark B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*; 79:1283-1300
- Howl J., Mondszein RM., Wheatley M. (1998) Characterization of G protein-coupled receptors expressed by ECV304 human endothelial cells. *Endothelium*; 6(1):23-32
- Hughes SE. (1996) Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp Cell Res.*; 225(1):171-185
- Hung C., Allen F., Pollack S., Brighton C. (1996) Intracellular Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} are required in the real-time Ca^{2+} response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomech*; 29:1411-1417
- Inouye S., Tsuji FI. (1994) Evidence for redox forms of the aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.*; 351(2):211-214.
- Kanakaj P., Raj S., Khan S., Bishayee S. (1991) 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
- Kee SH., Cho KA., Kim MK., Lim BU., Chang WH., Kang JS. (1999) Disassembly of focal adhesions during apoptosis of endothelial cell line ECV304 infected with orientia tsutsugamushi. *Microb Pathog.*; 27(5):265-271
- Khachigian L., Fries J., Benz M., Bonthron D., Collins T. (1994) 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
- Khachigian L., Mann E., Gimbrone M., Collins T. (1995) Nuclear factor-kappaB interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress re-

- sponse element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Inv*; 96:1169-1175
- Leveen P., Betsholtz C., Westermark B. (1993) Negative trans-acting mechanisms controlling expression of platelet-derived growth factor A and B mRNA in somatic cell hybrids. *Exp Cell Res*; 207:283-289
- Leveen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larson E., Betsholtz C. (1994) Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular and hematological abnormalities. *Genes Dev*; 8:1875-1887
- Levesque M., Nerem R. (1989) The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture. *Biorheology*; 26(2):345-357
- Liang Y., Robinson D., Denning J., Suske G., Fahl W. (1996) Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp1 family of transcription factors. *J Biol Chem*; 271:11792-11797
- Liu P., Ying Y., Ko Y., Anderson R. (1996) Localisation of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J Biol Chem*; 271:10299-10303
- MacLeod R., Dirks W., Matsuo Y., Kaufmann M., Milch H., Drexler H. (1999) Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer*; 83:555-563
- Maderna P., Coleman P., Godson C., O'Meara YM., Brady HR. (1999) Serum from hemodialysis patients inhibits basal and cytokine-stimulated tissue factor expression in vitro. *J Am Soc Nephrol.*; 10(11):2403-2406
- Malek A., Izumo S. (1996) Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *JCS*; 109:713-726
- Matsui T., Heidaran M., Miki T., Toru M., Popescu N., La Rochelle W., Kraus M., Pierce J., Aaronson S. (1989) Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*; 243:800-803
- Moiindas N., Evans E. (1994) Mechanical properties of red cell membrane in relation to molecular structure and defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*; 23:787-818
- Murray-Rust J., McDonald N., Blundell T., Hosang M., Oefner C., Winkler F., Bradshaw R. (1993) Topological similarities in TGF- β 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure*; 1:153-159

- Nomura S., Takano-Yamamoto T. (2000) Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*; 19:91-96
- Oefner C., D'Arcy A., Winkler FK., Eggimann B., Hosang M. (1992) Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J.*; 11(11):3921-6.
- Parekh D. (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO*; 19:496-503
- Patterson G., Day RN., Piston D. (2001) Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci.* Mar;114(Pt 5):837-838
- Paulsson Y., Hammacher A., Heldin C., Westermark B. (1987) Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. *Nature*; 328:715-717
- Phillips GN. Jr. (1997) Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol*; 7(6):821-827
- Pierce G., Mustoe T., Altrock B., Deuel T., Thomason A. (1991) Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem*; 45:319-326
- Pompili V., Gordon D., San H., Yang Z., Muller D., Nabel G., Nabel E. (1995) Expression and function of a recombinant PDGF B gene in porcine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 15:2254-2264
- Rao B., Kemple M., Prendergast F. (1980) Proton nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopic studies of segmental mobility in aequorin and green fluorescent protein from *aequorea forskalea*. *Biophys J*; 32:630 – 632
- Resnick N., Collins T., Atkinson W., Bonthron D., Dewey C., Gimbrone M. (1993) Platelet-derived growth factor B chain contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4591-4595
- Resnick N., Yahav H., Khachigian L., Collins T., Anderson K., Dewey F., Gimbrone M. (1997) Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv Exp Med Biol*; 4:155-164
- Ross R., Glomset J. A., Kariya B., Harker L. (1974) A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Cell*; 14:203-210
- Rutherford C., Martin W., Carrier M., Änggård E., Ferns G. (1997) Endogenously elicited antibodies to platelet-derived growth factor-BB and platelet cytosolic protein

- inhibit aortic lesion development in the cholesterol-fed rabbit. *Int J Exp Pathol.*; 78:21-32
- Sadoshima J., Xu Y., Slayter HS., Izumo S. (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiomyocytes in vitro. *Cell*; 75:977-984
- Seifert R. A., Schwartz S. M., Bowen-Pope. (1984) Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature*; 311:669-671
- Shimokado K., Raines E., Madtes D., Barret T., Benditt E., Ross R., (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*; 43:277-286
- Shimomura O. (1979) Structure of the chromophore of aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett*; 104:220-222
- Shinoki N., Kawasaki T., Minamiono N., Okahara K., Ogawa A., Ariyoshi H., Sakon M., Kambayshi J., Kangawa K., Monden M. (1998) Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*; 71:109-115
- Simons K., Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*; 387:569-572
- Soma Y., Dvonch V., Grotendorst G. (1992) Platelet-derived growth factor AA homodimer is the predominant isoform in human platelets and acute human wound fluid. *FASEB J*; 6:2996-3001
- Sorokin A., Westermark B., Heldin C., Claesson-Welsh L. (1991) Effect of receptor kinase inactivation on rate of internalization and degradation of PDGF and the PDGF β -receptor. *J Cell Biol*; 112:469-478
- Suda K., Rothen-Rutishauser B., Gunthert M., Wunderli-Allenspach H. (2001) Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 37(8):505-514
- Sumpio B., Chang R., Xu W., Wang X., Du W. (1997) Regulation of tPA in endothelial cells exposed to cyclic strain: role of CRE, AP-2, and SSRE binding sites. *Am J Physiol*; 273:1441-1448

- Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol.*; 26(3 Pt 1):265-274.
- Takahashi K., Sawasaki Y. (1991) Human endothelial cell line, ECV304, produces pro-urokinase. *In Vitro Cell Dev Biol.*; 27A(10):766-768
- Tanaka-Kamioka K., Kamioka H., Riis H., Lim S. (1998) Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res*; 13:1555-1568
- Tawadros T., Formenton A., Dudler J., Thompson N., Nicod P., Leisinger H., Waeber G., Haeflinger J. (2002) The scaffold protein IB1/JIP-1 controls the activation of JNK in rat stressed urothelium. *J Cell Sci*; 115:385-393
- Tsien RY. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.*; 67:509-544
- Turner C., Forwood M., Otter M. (1994) Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? *FASEB J*; 8:875-878
- Uematsu M., Ohara Y., Navas J., Nishida K., Murphy T., Alexander R., Nerem R., Harrison D. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol.* 269:1371-1378
- van Thor JJ., Gensch T., Hellingwerf KJ., Johnson LN. (2002) Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nat Struct Biol.*; 9(1):37-41
- Waterfield M., Scarce G., Whittle N., Stroobant P., Johnson A., Wasteson A., Westermarck B., Heldin C., Huang J., Deuel T. (1983) Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature*; 034:35-39
- Yamazaki T., Komuro I., Kudoh S., Zou Y., Nagai R., Aikawa R., Uozumi H., Yazaki Y. (1998) Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*; 82:430-437
- Yang F., Moss LG., Phillips GN. Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.*; 14(10):1246-1251
- Yang TT., Sinai P., Green G., Kitts PA., Chen YT., Lybarger L., Chervenak R., Patterson GH., Piston DW., Kain SR. (1998) Improved fluorescence and dual color de-

- tection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem.*; 273(14):8212-8216
- Yu J., Mahadevan W., La Rochelle W., Pierce J., Heidarani M. (1994) Structural coincidence of α -PDGFR epitopes binding to platelet-derived growth factor-AA and a potent neutralizing monoclonal antibody. *J Biol Chem*; 269:10668-10674
- Zandi E., Rothwarf M., Delhase M., Hayakawa M., Karin M. (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF κ B activation. *Cell*; 91:243-252
- Ziiao Y., Yamoaii E., Gillespie P. (1996) Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:15469-15474
- Zimmer M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev.*; 102(3):759-781

8. Abkürzungen

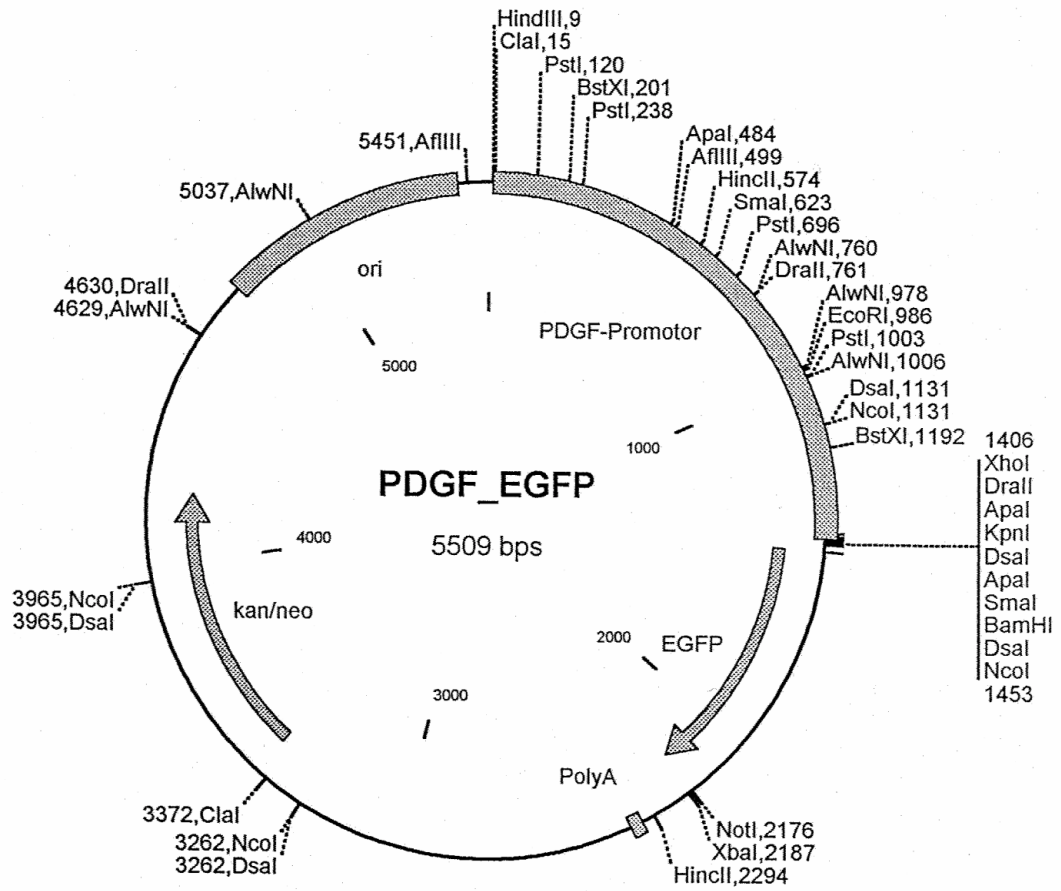
Abb.	=	Abbildung
Ang II	=	Angiotensin II
AP-1	=	activating protein 1
av β 3	=	Integrin
bp	=	Basenpaare
bzw.	=	beziehungsweise
C	=	Celsius
Ca	=	Calcium
ca.	=	circa
c-Fos	=	Protoonkogen-Protein
c-JUN	=	Protoonkogen-Protein
c-Src	=	Kinase der fokalen Adhäsions- kontakte
CAC	=	Calphostin C
CHE	=	Chelerythrin
CHX	=	Cycloheximid
CMV	=	Cytomegalievirus
CNP	=	kardiales natriuretisches Peptid
cox-2	=	Cyclooxygenase 2
d.h.	=	das heißt
Da	=	Dalton
dH ₂ O	=	deionisiertes Wasser
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DSMZ	=	Deutsche Sammlung von Mik- roorganismen und Zellkulturen
EGFP	=	verstärktes grünfluoresziertes Protein
ET-1	=	Endothelin-1
Ets	=	Transkriptionsfaktor

FAK	=	Kinase des fokalen Adhäsionskontakt
g	=	Gramm
GAP	=	GTPase-aktivierendes Protein
GFP	=	grünfluoreszierendes Protein
h	=	Stunde
IB1	=	Strukturprotein
IgA	=	Immunglobulin A
I κ -B	=	inhibitorisches Kappa-B-Protein
IKK	=	I κ -B-Kinase
IL-6	=	Interleukin 6
iNOS	=	induizierbare Stickoxidsynthase
ins	=	insetiert
JNK	=	c-Jun-N-terminale Kinase
l	=	Liter
M	=	Molar
MAP	=	mitogen aktiviertes Protein
min	=	Minute
mol	=	Mol
mRNA	=	Botenribonukleinsäure
N	=	Newton
NF κ -B	=	nukleärer Transkriptionsfaktor
NGF	=	neuraler Wachstumsfaktor
nm	=	Nanometer
NO	=	Stickoxid
NOS	=	lösliche Stickoxidsynthase
Nr.	=	Nummer
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
PDGF	=	Plättchenwachstumsfaktor
PK-C	=	Proteinkinase C
PLC- γ	=	Phospholipase C- γ

Raf-1	=	Signaltransduktionsprotein
Ras	=	Signaltransduktionsprotein
RNA	=	Ribonukleinsäure
rpm	=	Umdrehungen pro Minute
s.	=	siehe
SH2	=	Src-homologe Domäne 2
Sp1	=	Transkriptionsfaktor
SPE	=	Sis proximal element
SSRE	=	Scherstreß-responsives Element
STAT	=	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription
TGF	=	Transforming Growth Factor
t-PA	=	Plasminogenaktivator
U	=	Unit
u.a.	=	unter anderem
UV	=	ultraviolett
v-sis	=	Onkogen-Protein
VEGF	=	gefäßendothelialer Wachstums- faktor
vgl.	=	vergleiche
z.B.	=	zum Beispiel

9. Anhang

9.1 Karte des 1,3 kb PDGF-EGFP-Vektors



9.2 Sequenzdaten des 1,3 PDGF-EGFP-Vektors

Sequence Data

Molecule: PDGF_EGFP, 5509 bps DNA Circular
 Description: PDGF_egfp
 File Name: PDGF_EGFP.cm5
 Printed: 1-5509 bps (Full), format Annotated: Enzymes, Genes

```

1   tagttattaa HindIII gcttatcgat ClaI accgtccagg agcttggtac cacacccagc tccagtttat
61  aaattcatct ccagtttata aaggaggaaa ccgaggtact gagaggtaa aaaaccttcc
121 PstI tgcagacact tgtccagcaa gtggcactc caggatttgg accaagggat gtgtcttcag
181 gctgtgtctc tgccactgtg BstXI ccacgctgct gggtggtagg cagcagtggg tgggtgcctg
241 PstI cagtggctcg taaagaccac ctgagatgtc ctctctctc tgttcaccc tgtccaggtc
301 caagaagaca gtctatgaag agagagcagg tgtgactctc tcagtgtgct cctctgtgag
361 aagcaggctg acatcccaaa ggaagggcg gataacagag acagtgcaag cggaggagat
421 gagggtgctt caaagccggg aggctgggtg atgcaggagc ctgcgtgtcc cgaggggggt
481 ApaI gctgggccca AflIII gtgtgagtac gtgtgactgt gactgagaca gtgtgactgc tgaaggcagg
541 gacacagcag ctccctgact gggggcagaa HincII ggcgttaact gtgtgaagge tggttgtggg
601 tgggtgggct ctgggcctcg SmaI aaccggggg ctgagggaga tagtaaacag cagggtgact
661 gacgggaaga tcatgttggg agccctgcga PstI agatgctgca gggctgtggg gttttgtgtg
721 actttgcagt tcaacaaatt caaatcagc DraII caacgctggc AlwNI agggcctgtt gtgccaggca
781 accagctagg aggaggagac tcggaccag cttgcagctg aagggcctg gctgccgggt
841 tctgtgggtt caccttgcg tgtcttccct tgctaacct gagtccttac aatagccca
901 tctccaggtt gaggctagat ggaggggaca gagggaagtg acttgccaa ggtgaccaa
961 gctcccgagt gccagggcag AlwNI gatctgaatt BcoRI caggctetca PstI gactgcagag cctgagtecc
1021 tcctgccat gctgtgcca gggtggaat gtctggtcct ggaggggagc gtggactcct
1081 ggcttggtc ctggagacat cccctagac cacgtgggct cctaacctgt NotI DsaI ccatggtcac
1141 tgtgctgagg ggcgggacg tgggtcacc ctagttcttt tttcccagg BstXI gccagattca
1201 tggactgaag gttgtctcg ctctcagaga cccctaagc gccccccct gcccccaagc

```

PDGF_EGFP

1261 cctccccag ctcccgctc cccccctcc tggcgtgac tccgggccag aagaggaaag

1321 gctgtctcca cccacctctc gcactctccc ttctcttta taaggccgg aacagctgaa

1381 aggggtggcaa cttctctcc ^{XhoI} tggacctga ^{Apal} gggggggccc ^{DraII} ggtaccggg ^{KpnI} gcccggatc ^{Apal} ^{SmaI} ^{BamHI}

1441 ^{NcoI} caccggctgc ^{DsaI} caccatggtg ^{DsaI} agcaaggcg aggagctgtt caccgggggtg gtgccatcc
 ».....EGFP.....»

1501 tggtegagct ggacggcgac gtaaaccggc acaagttcag cgtgtccggc gaggcgagg
 ».....EGFP.....»

1561 gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg caccaccggc aagctgccc
 ».....EGFP.....»

1621 tgccctggcc caccctcgtg accacctga cctaccggct gcagtgttc agccgtacc
 ».....EGFP.....»

1681 ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgccat gcccgaggc tacgtccagg
 ».....EGFP.....»

1741 agcgacacat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcccggag gtgaagtctg
 ».....EGFP.....»

1801 agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca
 ».....EGFP.....»

1861 acatcctggg gcacaagctg gactacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg
 ».....EGFP.....»

1921 acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca
 ».....EGFP.....»

1981 gegtgcagct cgcgaccac taccagcaga acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc
 ».....EGFP.....»

2041 tgcccgaaa ccactacctg agcaccagt ccgcccctgag caaagacccc aacgagaagc
 ».....EGFP.....»

2101 gcgatcacat ggtcctgctg gatttctgta ccgcccggg gatcactctc ggcatggacg
 ».....EGFP.....»

2161 agctgtacaa gtaaagcggc ^{NotI} cgcgactcta ^{XbaI} gatcataatc agccatacca catttgtaga
 ».....EGFP.....»

2221 ggttttactt gcttttaaaa accteccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaaatgaa

2281 tgcaattggt ^{HincII} gttgttaact tgtttattgc agcttataat gttacaaat aaagcaatag

2341 catcacaat ttcacaata aagcattttt ttaactgcat tctagttgtg gtttgtocaa

PDGF_EGFP

2401 actcatcaat gtatcttaag gcgtaaattg taagcgttaa tattttgta aaattcgcgt
 2461 taaatTTTTg ttaaatcagc tcattTTTTa accaataggc cgaatcggc aaaatccctt
 2521 ataatcaaa agaatagacc gagataggt tgagtgttg tccagtttg aacaagagtc
 2581 cactatataa gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg
 2641 gccactacg tgaacctca cctaataca gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac
 2701 taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaa cggcgaaacg
 2761 tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaag gagcgggocg tagggcgctg gcaagtgtag
 2821 cggtcacgct gcgcgtaacc accacaccgc ccgcgcttaa tgcgcgcta cagggcgctg
 2881 caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatt ttctaatac
 2941 attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
 3001 aaaggaagag tcctgaggcg gaaagaacca gctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg
 3061 aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc
 3121 aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct
 3181 caattagtca gcaacctag tcccgcacct aactccgccc atcccgccc taactccgcc
 3241 cagttccgcc cattctccgc $\xrightarrow{\text{NotI}}$ cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga
 $\xrightarrow{\text{DsaI}}$
 3301 ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg
 3361 cttttgcaaa $\xrightarrow{\text{ClaI}}$ gatcgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg
 ».....kan/neo.....»
 3421 gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac
 ».....kan/neo.....»
 3481 aacagacaat cggctgctct gatgcgcgcg tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg
 ».....kan/neo.....»
 3541 ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg cctgaaatga actgcaagac gaggcagcgc
 ».....kan/neo.....»
 3601 ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcagc gttgtcactg
 ».....kan/neo.....»

PDGF_EGFP

3661 aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc
 ».....»
 kan/neo

3721 accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcg ctgcatacgc
 ».....»
 kan/neo

3781 ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta
 ».....»
 kan/neo

3841 ctccgatgga agccggctct gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg
 ».....»
 kan/neo

3901 cgcagccga actgttcgcc aggtcaagg cgagcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg
 ».....»
 kan/neo

$\frac{\text{NcoI}}{\text{DraI}}$

3961 tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggga aatggccgc tttctggat
 ».....»
 kan/neo

4021 tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgctatca ggacatagcg ttggctacc
 ».....»
 kan/neo

4081 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat ggctgaccg ctctctctg ctttacggta
 ».....»
 kan/neo

4141 tcgccctcc cgattcgag cgcctgcct tetatgcct tcttgacgag ttctctgag
 ».....»
 kan/neo

4201 cgggactctg ggttcgaaa tgaccgacca agcagcggc aacctgcat cagcagattt

4261 cgattccacc gccgcctct atgaaaggtt ggccttcgga atcgtttcc gggacgcccg

4321 ctggatgate ctccagcgc gggatctcat gctggagttc ttgcgccacc ctagggggag

4381 gctaactgaa acacggaagg agacaatacc ggaaggaacc cgcgctatga cggcaataaa

4441 aagacagaat aaaacgcacg gtgttgggc gtttgttcat aaacggggg ttccgtccca

4501 gggctggcac tctgtcgata cccaccgag acccattgg ggccaatag cccgcgttc

4561 ttcttttcc ccaccccacc cccaagttc ggtggaagg ccagggtcg cagccaacgt

$\frac{\text{DraI}}{\text{AlwNI}}$

4621 cggggcggca ggcctgcca tagcctcagg ttactcatat atactttaga ttgatttaaa

4681 acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa

4741 aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg

4801 atcttcttga gatccttttt ttctgcgct aatctgctgc ttgcaaaaa aaaaaccacc

PDGF_EGFP

4861 gctaccagcg gtggtttggt tgcggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac
4921 tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca
4981 ccacttcaag aactctgtag cacgcctac atacctcgt ctgctaatcc tgttaccagt
5041 AlwNI ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccggttg gactcaagac gatagttacc
5101 ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg ggttcgtgc acacagccca gcttggagcg
5161 aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc
5221 cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac
5281 gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct
5341 ctgacttgag cgtcgatitt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc
5401 cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc ADIII acatgttctt
5461 tcctgcgta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gccatgat

10) Danksagung

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. D. Drenckhahn danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Dr. Karin Schwarz möchte ich für die Überlassung der ECV304 Zellen mit den untersuchten Promotor-Konstrukten danken.

Herrn Dr. Winfried Ness möchte ich für die Einführung in das Thema und das Erlernen der Arbeitsweisen danken.

Frau Agnes Weth möchte ich für ihre Geduld, ihre Nachsicht und die immense Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Dr. Werner Baumgartner möchte ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuche danken.

Frau Cand. med. Katharina Hamm möchte ich für den erneuten Motivationschub und die unzähligen Telefonate danken, die dieser Arbeit neuen Wind einhauchten. Für ihre eigene Dissertation wünsche ich ihr viel Erfolg.

Ein großes Dankeschön meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre.

11) Lebenslauf

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael-Wulf Zeller
Geburtsdatum/-ort: 10.12.1976, Ulm
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1983 – 1984: Sägefild Grund- und Hauptschule Ulm Wiblingen
1984 – 1987: Adalbert-Stifter Grund- und Hauptschule Ulm
1987 – 1996: Humboldt-Gymnasium Ulm
1996: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1997 – 2004: Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
seit 11/1999: Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. med. D. Drenckhahn

Ärztliche Prüfungen

8/1999: Ärztliche Vorprüfung
8/2000: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3/2003: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
6/2004: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
7/2004: Vorlage der Dissertation

Würzburg, Juli 2004

Michael Zeller