

3 Ergebnisse

3.1 TSP-1

3.1.1 Expression in Abhängigkeit von der Passage-Zahl

Vorversuche ergaben, dass die Expression von TSP-1 in HUVEC über die untersuchten ersten vier Passagen etwa gleich bleibt. Dennoch wurden für alle folgenden Versuche ausschließlich Zellen in der ersten Passage verwendet.

3.1.2 Expression als Funktion der Wandschubspannung

Bei einer Expositionszeit von 24 h wird die Expression der mRNA für TSP-1 durch laminare Strömung inhibiert (Abb. 11). Dieser Effekt ist von der Stärke der Wandschubspannung abhängig. Ab einer Wandschubspannung von $2,0 \text{ dyn/cm}^2$ ist die Inhibition statistisch signifikant. Bei höherer Wandschubspannung nimmt der Effekt nur unwesentlich zu.

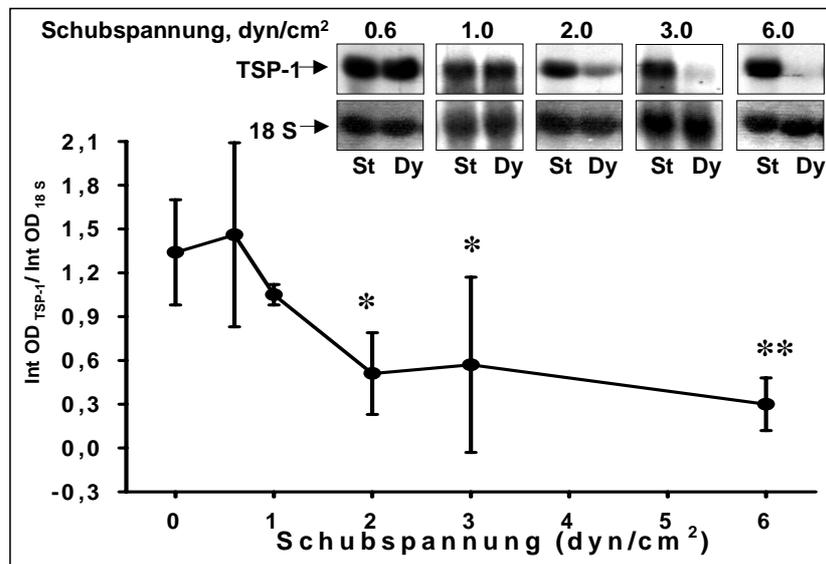


Abb. 11 Expression der mRNA von Thrombospondin-1 (TSP-1) in HUVEC als Funktion der Wandschubspannung.

HUVEC wurden für 24 h durch unterschiedlich starke Wandschubspannung stimuliert (Dy, dynamisch) oder blieben unbehandelt (St, statisch). Anschließend wurde die Expression von TSP-1 mittels Northern Blot analysiert. Graphisch sind die integrierten optischen Dichten (Int OD) der mit Wandschubspannung behandelten Proben als Quotient mit der 18 S-Bande derselben Probe aufgetragen. Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte \pm STD; n=3-5 ; * $p \leq 0.05$ und ** $p \leq 0.01$ gegenüber dem Wert bei 0 dyn/cm².

3.1.3 Expressionsinhibition als Funktion der Zeit

Bei laminarer Strömung und einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² ist die Inhibition der mRNA-Expression für TSP-1 zeitabhängig und erreicht nach 24 h statistische Signifikanz (Abb. 12). Auch nach längerer Expositionszeit bleibt die beschriebene Inhibition nahezu unverändert erhalten.

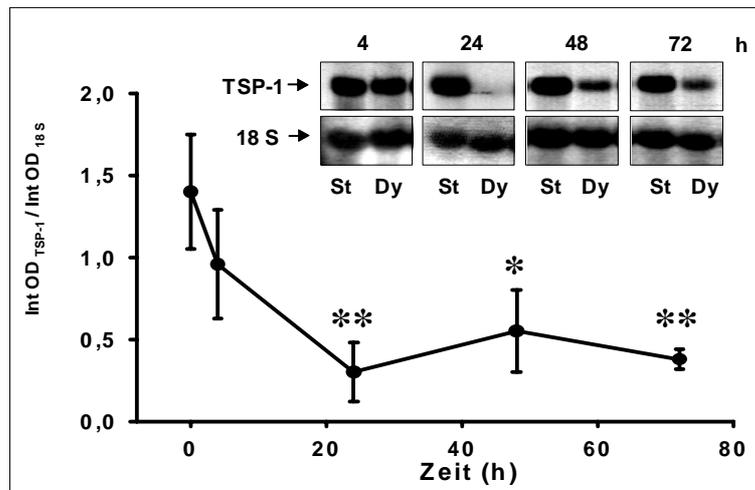


Abb. 12 Expression der mRNA von TSP-1 in wand Schubspannungsbehandelten HUVEC als Funktion der Zeit.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten unter statischen (St) oder unter dynamischen (Dy, 6 dyn/cm²) Bedingungen kultiviert und die mRNA-Expression mittels Northern Blot analysiert. Graphisch sind die integrierten optischen Dichten (Int OD) der mRNA-Banden dynamisch kultivierter Proben als Quotient der 18 S Bande derselben Probe aufgetragen. Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte \pm STD; n= 3-5; * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 gegenüber 0 h.

3.1.4 Expression nach Strömungsstillstand

Nachdem die Expression der mRNA für TSP-1 durch laminare Strömung supprimiert worden ist (6 dyn/cm², 24 h), führt ein Strömungsstillstand zu ihrem erneuten Anstieg (Abb. 13). Bereits nach vier Stunden kommt es zu einer statistisch signifikanten Induktion der mRNA-Expression für TSP-1, die nach 24 Stunden das Niveau der statischen Kontrolle erreicht.

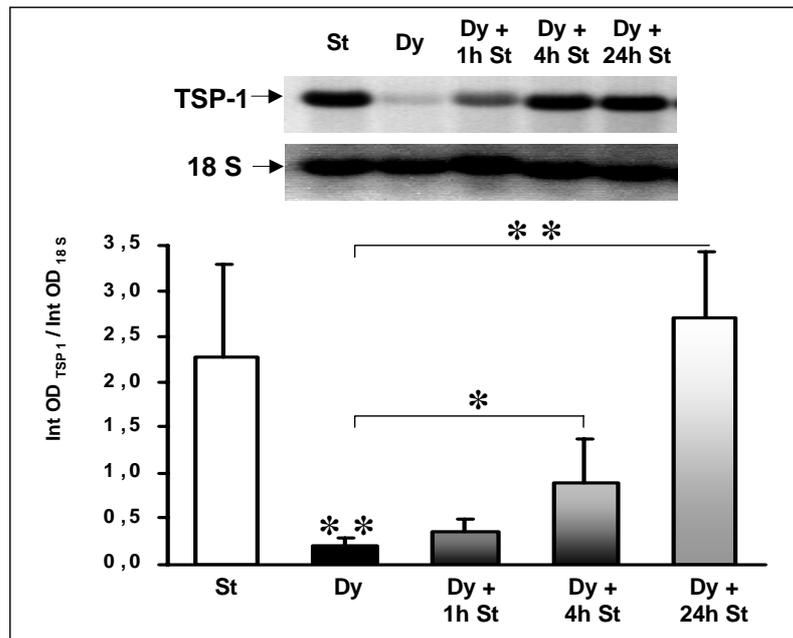


Abb. 13 Expression der mRNA von TSP-1 in strömungsexponierten HUVEC nach Strömungstillstand.

HUVEC wurden für 24 h ohne Strömung (statisch, St) oder unter einer Wandschub-spannung von 6 dyn/cm² (dynamisch, Dy) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen (St) für 1h, 4h, oder 24 h weiter kultiviert. Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte ± STD; n=3-7; ** p≤0.01 gegenüber statischer Kontrolle; * p ≤ 0.05 und ** p ≤ 0.01 zwischen den angezeigten Gruppen.

3.1.5 Auswirkung von VEGF auf die Expression von TSP-1

Die Zugabe von VEGF (40 ng/ml) für 24 Stunden führte weder bei statisch kultivierten Zellen noch bei strömungsexponierten Zellen zu einer im Northern Blot nachweisbaren Veränderung der mRNA-Expression für TSP-1 (Abb. 14). Auch im Zeitgang von 0,5 bis 48 Stunden ließ sich keine Veränderung der TSP-1 -Expression durch VEGF nachweisen (Abb. 15).

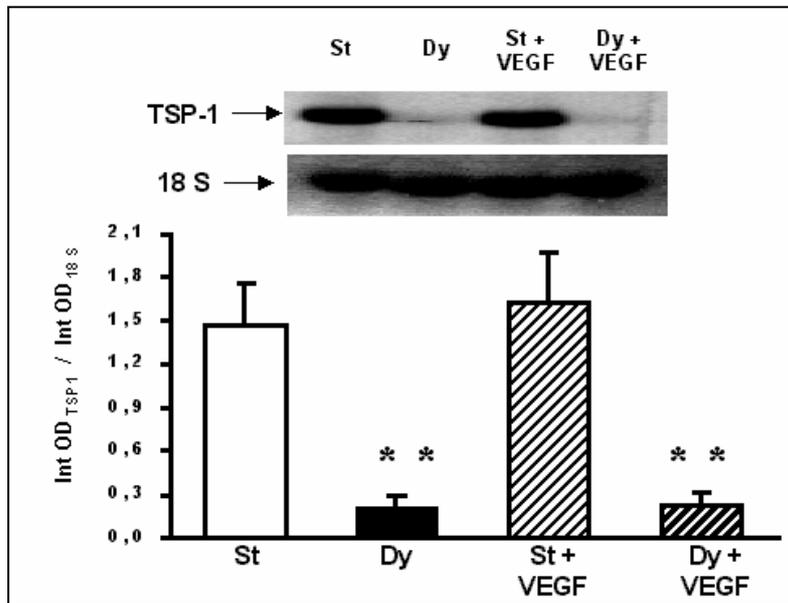


Abb. 14 Expression von TSP-1 in HUVEC unter statischen (St) und dynamischen (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) Kulturbedingungen mit oder ohne Zugabe von VEGF (40 ng/ml, 24 h). Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung; Mittelwerte \pm STD. n = 5-7; ** p \leq 0.01 gegenüber St.

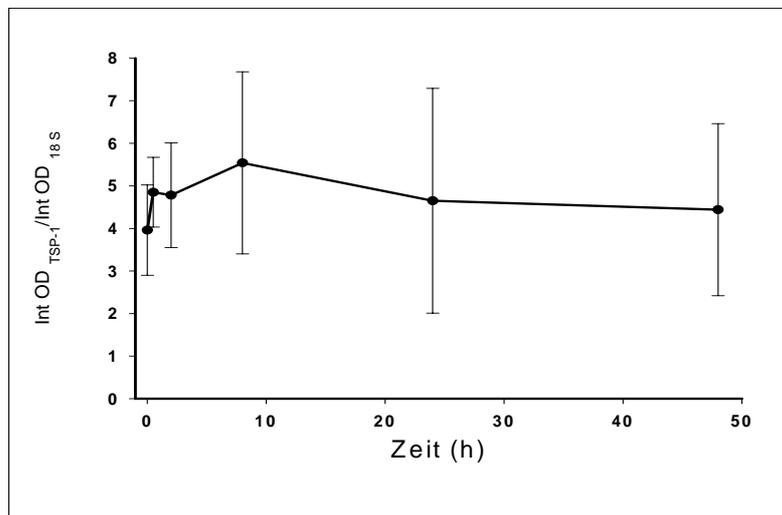


Abb. 15 Expression der mRNA von TSP-1 in VEGF (40 ng/ml)-behandelten HUVEC als Funktion der Zeit. Die Abbildung zeigt die graphisch-statistische Auswertung von northern Blots. Mittelwerte \pm SEM; n = 4-8

3.1.6 Auswirkung von Progesteron auf die Expression von TSP-1

Durch Progesteron (1 μ M und 10 nM i. A.) wird die mRNA-Expression für TSP-1 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert (Abb. 16).

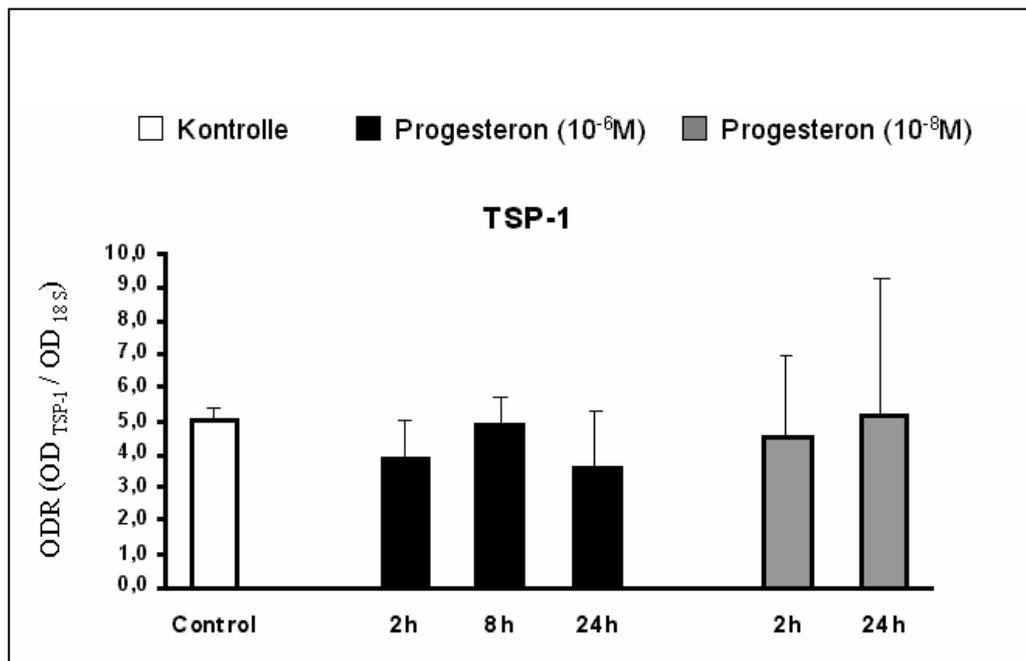


Abb. 16 Einfluß von Progesteron auf die Expression von TSP-1. HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten und unter Zugabe der angegebenen Progesteronkonzentrationen unter statischen Bedingungen kultiviert. Mittelwerte \pm STD. n = 3

3.1.7 Zelltypische Expressionsmuster von TSP-1

In primär kultivierten humanen Endothelzellen (HCEC, HCMEC, HUVEC, HUAEC) ist die Expression deutlich höher als in allen untersuchten Zell-Linien (Tab. 4). Lediglich in BT-549-Zellen, einem humanen duktalem Mammakarzinom, ließ sich eine deutliche Expression von TSP-1 nachweisen. Im direkten Vergleich zwischen makro- und mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Koronarsystems gibt es zwar keinen statistisch signifikanten Unterschied, doch ist die Expression von TSP-1 tendenziell in makrovaskulären Zellen höher (Abb. 17).

Tab. 4 Relative Höhe der mRNA-Expression von 9/B und TSP-1 in verschiedenen Zelllinien, primär kultivierten humanen Endothelzellen sowie mikro- und makrovaskulären Endothelzellen des humanen Koronarsystems. Die Zellen wurden zur Konfluenz kultiviert, aus den Zell-Lysaten wurde gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot analysiert.

Zelltypen	9/B	TSP-1
HCEC	++	++(+)
HCMEC	+++	++
HUVEC	++	++
HUAEC	+	++
BT-549	-	+
EA hy 926	-	-
ECV-304	-	-
HeLa	-	-
HL-60	-	-
HS 578	-	-
HT 29/26	-	-
NIH-3T3	-	-
RKO	-	-
SW 480	-	-

- +++** : sehr hohe Expression
- ++** : hohe Expression
- +** : Expression
- : keine detektierbare Expression

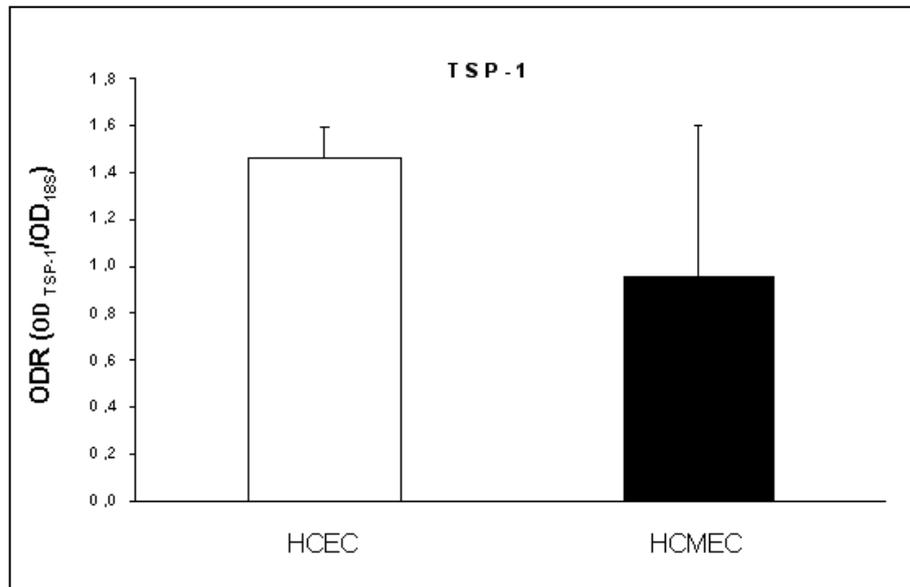


Abb. 17 Expression von TSP-1 in mikro- und makrovasculären Endothelzellen. Makro- (HCEC) und mikrovaskuläre (HCMEC) Endothelzellen wurden aus dem humanen Koronarsystem isoliert und zur Konfluenz kultiviert. Aus den Zell-Lysaten wurde gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot analysiert. Mittelwerte \pm STD. n = 4

3.1.8 Stabilität der TSP-1-mRNA

Die nach Transkriptionsblockade durch Actinomycin D messbare Halbwertszeit der TSP1-mRNA war in strömungsexponierten HUVEC (6 dyn/cm², 24 h) tendenziell kürzer als in statisch kultivierten Zellen (Abb. 18), jedoch erlauben die erhobenen Messwerte keine statistisch signifikante Aussage.

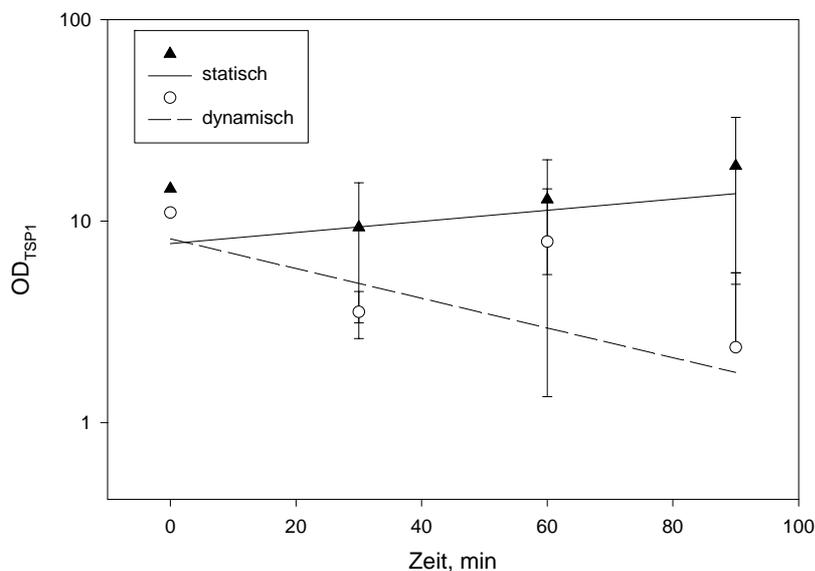


Abb. 18 Verlauf der mRNA-Konzentration für TSP-1 nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D. In strömungsexponierten HUVEC (6 dyn/cm², 24 h) ist die mRNA-Stabilität für TSP-1 gegenüber den statisch kultivierten Kontrollen tendenziell vermindert, jedoch erreichte keiner der Unterschiede statistische Signifikanz. n = 3

3.2 9/B (DEPP)

3.2.1 Expression in Abhängigkeit von der Passage-Zahl

Vorversuche ergaben, dass die Expression von 9/B in HUVEC über die untersuchten ersten vier Passagen etwa gleich bleibt. Dennoch wurden für alle folgenden Versuche ausschließlich Zellen in der ersten Passage verwendet.

3.2.2 Expression als Funktion der Wandschubspannung

Bei einer Expositionszeit von 24 h wird die Expression der mRNA für 9/B durch laminare Strömung inhibiert (Abb. 19). Dieser Effekt ist von der Stärke der Wandschubspannung abhängig. Ab einer Wandschubspannung von $2,0 \text{ dyn/cm}^2$ ist die Inhibition statistisch signifikant. Bei höherer Wandschubspannung nimmt der Effekt zu.

3.2.3 Expressionsinhibition als Funktion der Zeit

Bei laminarer Strömung und einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm^2 ist die Inhibition der mRNA-Expression für 9/B zeitabhängig und hat nach 24 h ihr Maximum und statistische Signifikanz erreicht (Abb. 20). Nach längerer Expositionszeit bleibt die beschriebene Inhibition unverändert erhalten.

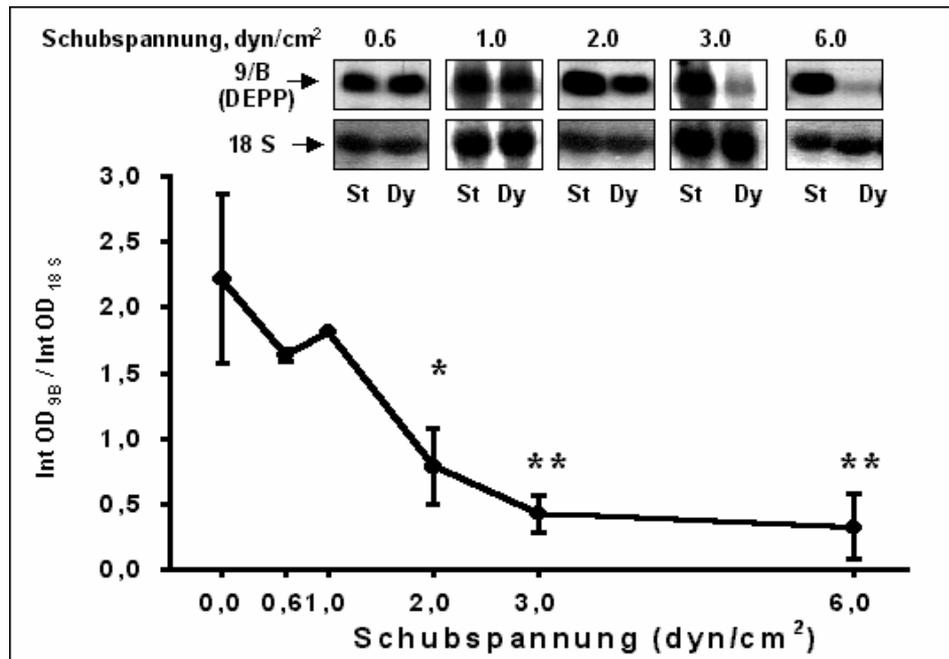


Abb. 19 Expression der mRNA von 9B (DEPP) in HUVEC als Funktion der Wandschubspannung.

HUVEC wurden für 24 h durch unterschiedlich hohe Wandschubspannung stimuliert (Dy) oder blieben unbehandelt (St). Anschließend wurde die Expression von 9/B mittels Northern Blot analysiert. Graphisch sind die optischen Dichten der mit Wandschubspannung behandelten Proben gegen die 18 S-Banden derselben Probe aufgetragen (ODR). Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte \pm STD; n=3-5; * $p \leq 0.05$ und ** $p \leq 0.01$ gegenüber dem Wert bei 0 dyn/cm².

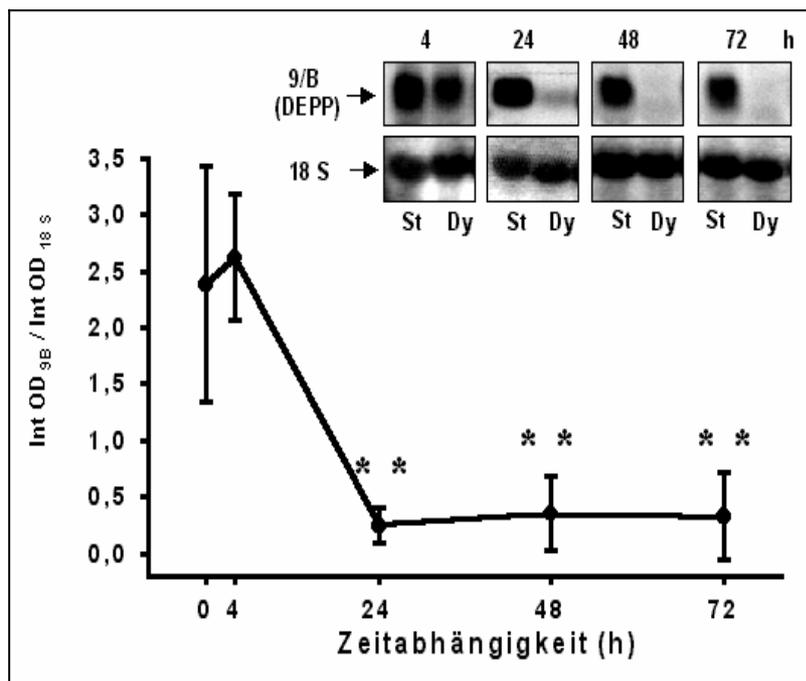


Abb. 20

Expression der mRNA von 9/B (DEPP) in wandschubspannungsbehandelten HUVEC als Funktion der Zeit.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten unter statischen (St) oder unter dynamischen (Dy, 6 dyn/cm²) Bedingungen kultiviert und die mRNA-Expression mittels Northern Blot analysiert. Graphisch sind die optischen Dichten der mRNA-Banden dynamisch kultivierter Proben gegen die 18 S-Bande derselben Probe (Optical Density Ratio) aufgetragen. Die Abb. zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung.

Mittelwerte \pm STD; n=3-5; * * $p \leq 0.01$ gegenüber 0 h.

3.2.4 Expression nach Strömungsstillstand

Nachdem die Expression der mRNA für 9/B durch laminare Strömung supprimiert worden ist (6 dyn/cm^2 , 24 h), führt ein Strömungsstillstand zu ihrem erneuten Anstieg (Abb. 21). Nach 24 Stunden kommt es zu einer statistisch signifikanten Induktion der mRNA-Expression für 9/B, die das Niveau der statischen Kontrolle erreicht.

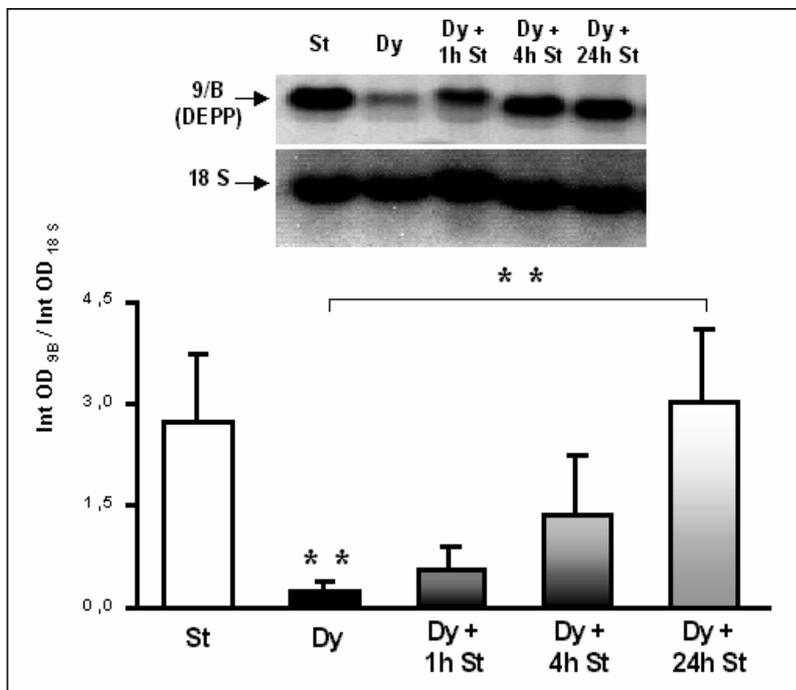


Abb. 21

Expression der mRNA von 9/B (DEPP) in strömungsexponierten HUVEC nach Strömungsstillstand.

HUVEC wurden für 24 h ohne Strömung (statisch, St) oder unter einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm^2 (dynamisch, Dy) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen für 1, 4, oder 24 h (1h St, 4h St, 24h St) weiter kultiviert. Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung.

Mittelwerte \pm -STD; $n=3-7$; ** $p \leq 0.01$ gegenüber statischer Kontrolle oder zwischen den angezeigten Gruppen.

3.2.5 Auswirkung von VEGF auf die Expression von 9/B

Die Zugabe von VEGF (40 ng/ml) für 24 Stunden führte bei statisch kultivierten Zellen und bei strömungsexponierten Zellen zu einer im Northern Blot nachweisbaren geringfügigen Erhöhung der mRNA-Expression für 9/B (Abb. 22). Im Zeitgang von 0,5 bis 48 Stunden ließ sich eine deutliche Suppression der 9/B-Expression durch VEGF nach zwei Stunden nachweisen (Abb. 23). Zu allen übrigen Zeitpunkten dieser Versuchsreihe, hatte VEGF keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von 9/B.

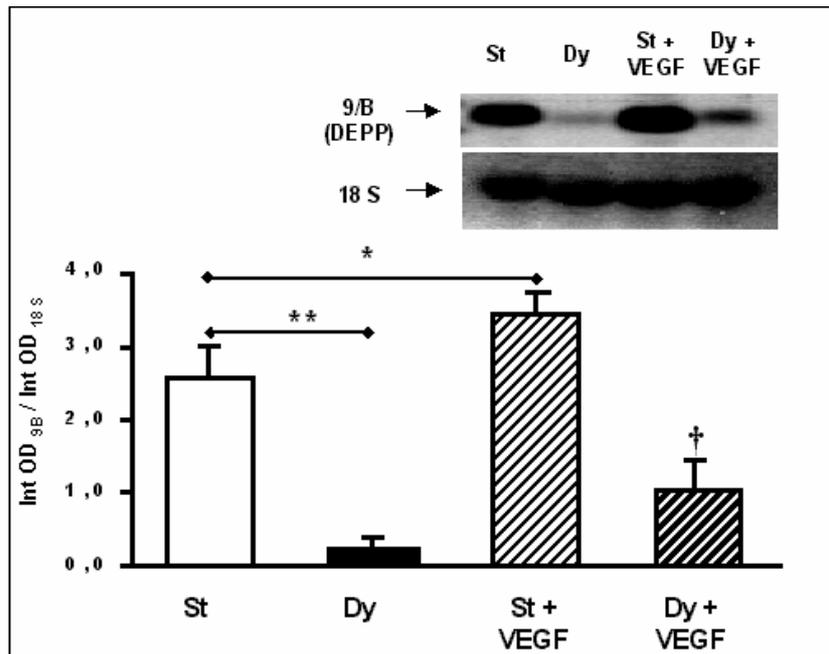


Abb. 22 Expression von 9/B (DEPP) in HUVEC unter statischen (St) und dynamischen (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) Kulturbedingungen mit/ohne Zugabe von VEGF (40 ng/ml, 24 h).

Die Abbildung zeigt repräsentative Northern Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung;

Mittelwerte \pm STD; n = 4-7; * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01; †: p \leq 0.01 gegenüber St und p \leq 0.05 gegenüber Dy

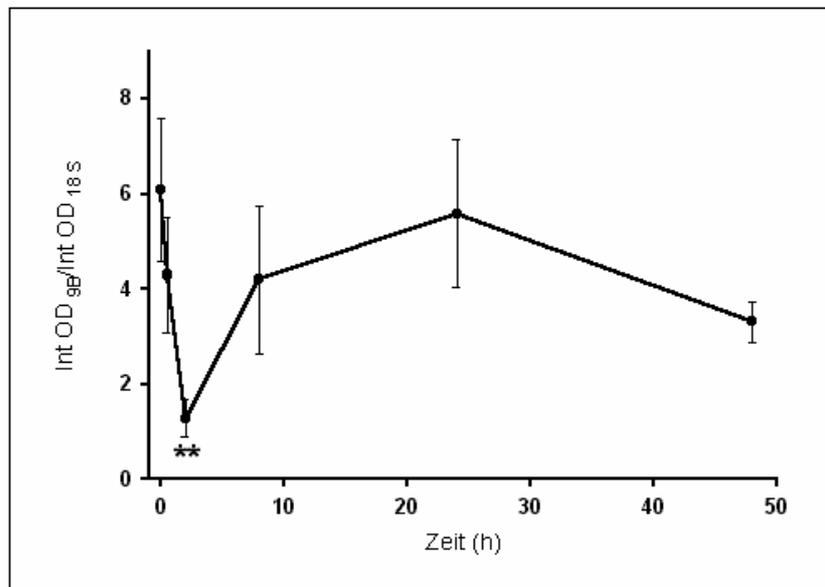


Abb. 23 Expression der mRNA von 9/B (DEPP) von mit VEGF (40 ng/ml) behandelten HUVEC als Funktion der Zeit.

Eine signifikante Suppression von 9/B wurde nach zwei Stunden beobachtet. Die Abbildung zeigt die graphisch-statistische Auswertung von northern Blots. Mittelwerte \pm SEM; n = 5-7;

** p \leq 0.01 gegenüber dem Null-Stunden-Wert.

3.2.6 Auswirkung von Progesteron auf die Expression von 9/B

Durch Progesteron wird bei einer Konzentration von 10^{-6} molar ($1 \mu\text{M}$ i. A.) eine signifikante Inhibition der mRNA-Expression nach zwei Stunden für 9/B bewirkt (Abb. 24). Für die übrigen Zeiten (8, 24 h) ergaben sich keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation ist tendenziell eine Induktion der Expression von 9/B nachweisbar.

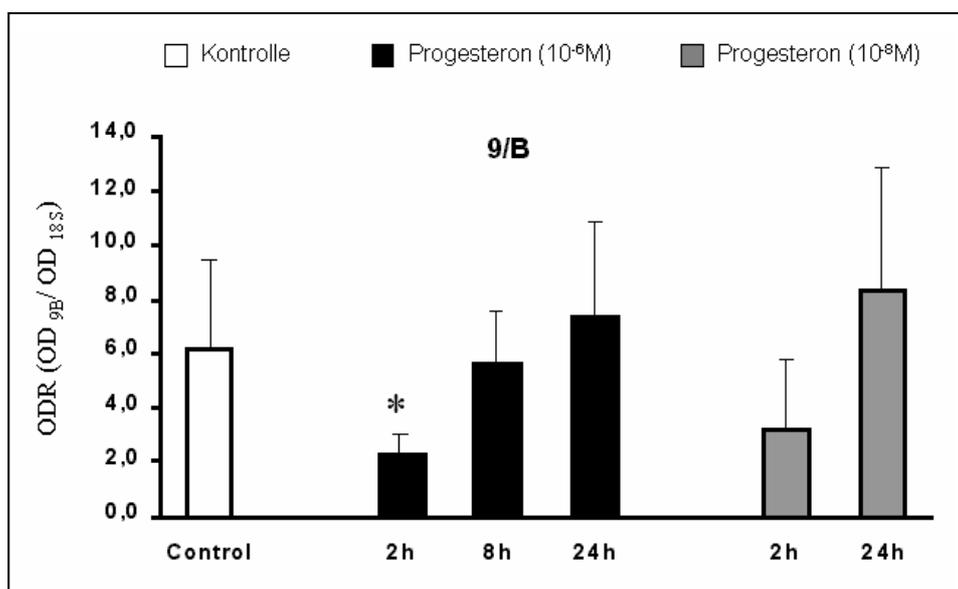


Abb. 24 Einfluß von Progesteron auf die Expression von 9/B.

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiten und unter Zugabe der angegebenen Progesteronkonzentrationen unter statischen Bedingungen kultiviert. Mittelwerte + STD * $p < 0.05$; $n = 3$

3.2.7 Gewebe- und zelltypische Expressionsmuster von 9/B

9/B ließ sich in humanen cDNA-Pools aus Lunge, Plazenta und Pankreas nachweisen (Abb. 25). In primär kultivierten humanen Endothelzellen ist die Expression deutlich höher als in allen untersuchten Zell-Linien. HUVEC weisen gegenüber HUAEC eine höhere Expression von 9/B auf (Tab. 5).

Im direkten Vergleich zwischen makro- und mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Koronarsystems ist die Expression von 9/B in mikrovaskulären Zellen signifikant höher (Abb. 26).

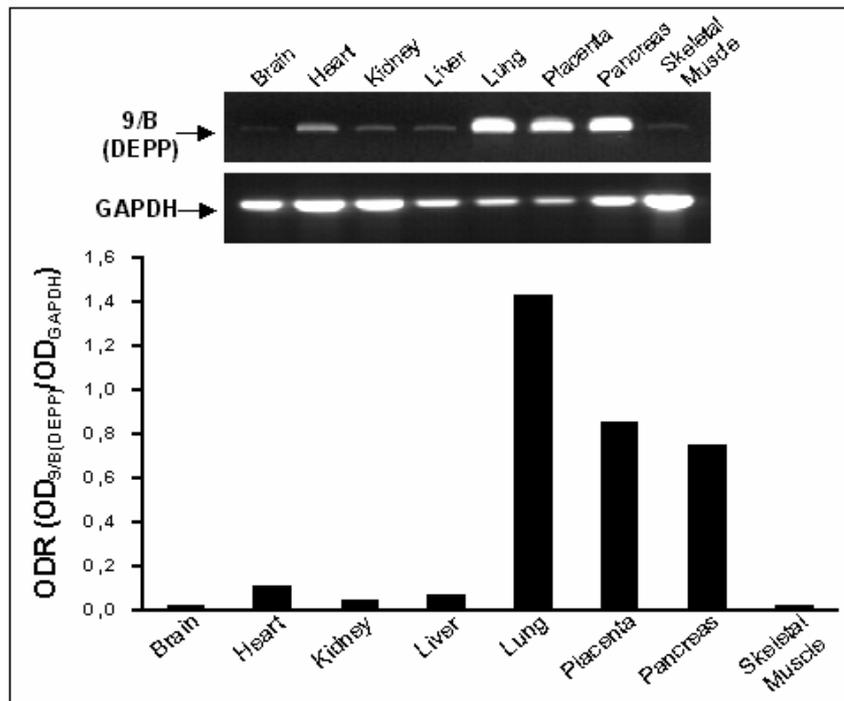


Abb. 25 RT-PCR zum Nachweis der Expression von 9/B (DEPP) in humanen cDNA pools unterschiedlicher Gewebe.

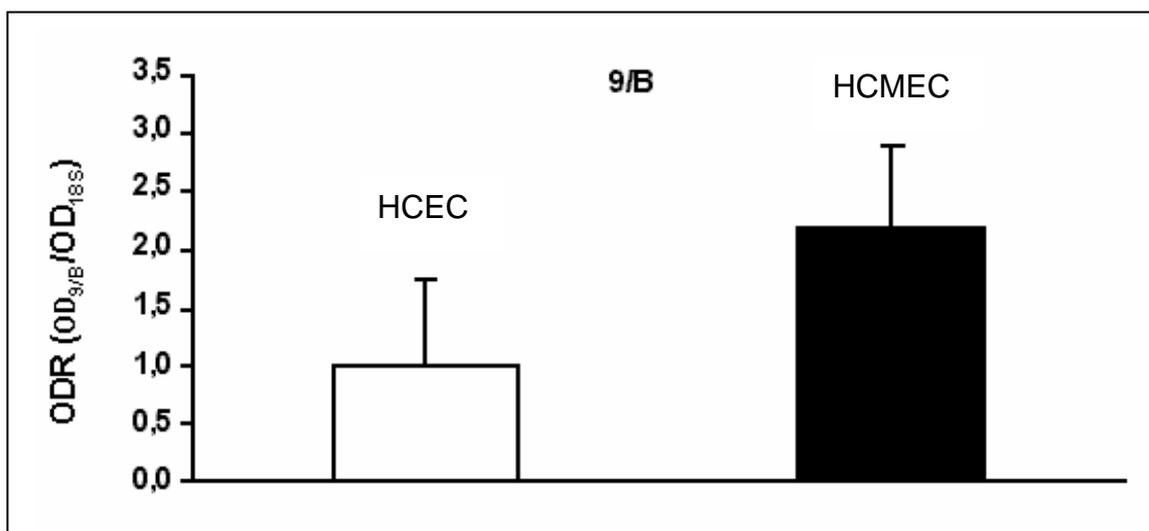


Abb. 26 Expression von 9/B in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen. Makro- (HCEC) und mikrovaskuläre (HCMEC) Endothelzellen wurden aus dem humanen Koronarsystem isoliert und zur Konfluenz kultiviert. Aus den Zell-Lysaten wurde gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot analysiert. Mittelwerte \pm STD. n = 4

Tab. 5 Relative Höhe der mRNA-Expression von 9/B und TSP-1 in verschiedenen Zelllinien, primär kultivierten humanen Endothelzellen sowie mikro- und makrovaskulären Endothelzellen des humanen Koronarsystems. Die Zellen wurden zur Konfluenz kultiviert, aus den Zell-Lysaten wurde gesamt-RNA isoliert und im Northern Blot analysiert.

Zelltypen	9/B	TSP-1
HCEC	++	++(+)
HCMEC	+++	++
HUVEC	++	++
HUAEC	+	++
BT-549	-	+
EA hy 926	-	-
ECV-304	-	-
HeLa	-	-
HL-60	-	-
HS 578	-	-
HT 29/26	-	-
NIH-3T3	-	-
RKO	-	-
SW 480	-	-

- +++ : sehr hohe Expression
- ++ : hohe Expression
- + : Expression
- : keine detektierbare Expression

3.2.8 Stabilität der 9/B-mRNA

Die nach Transkriptionsblockade durch Actinomycin D messbare Halbwertszeit der 9/B-mRNA war in strömungsexponierten HUVEC (6 dyn/cm², 24 h) und in statisch kultivierten Zellen gleich lang (Abb. 27).

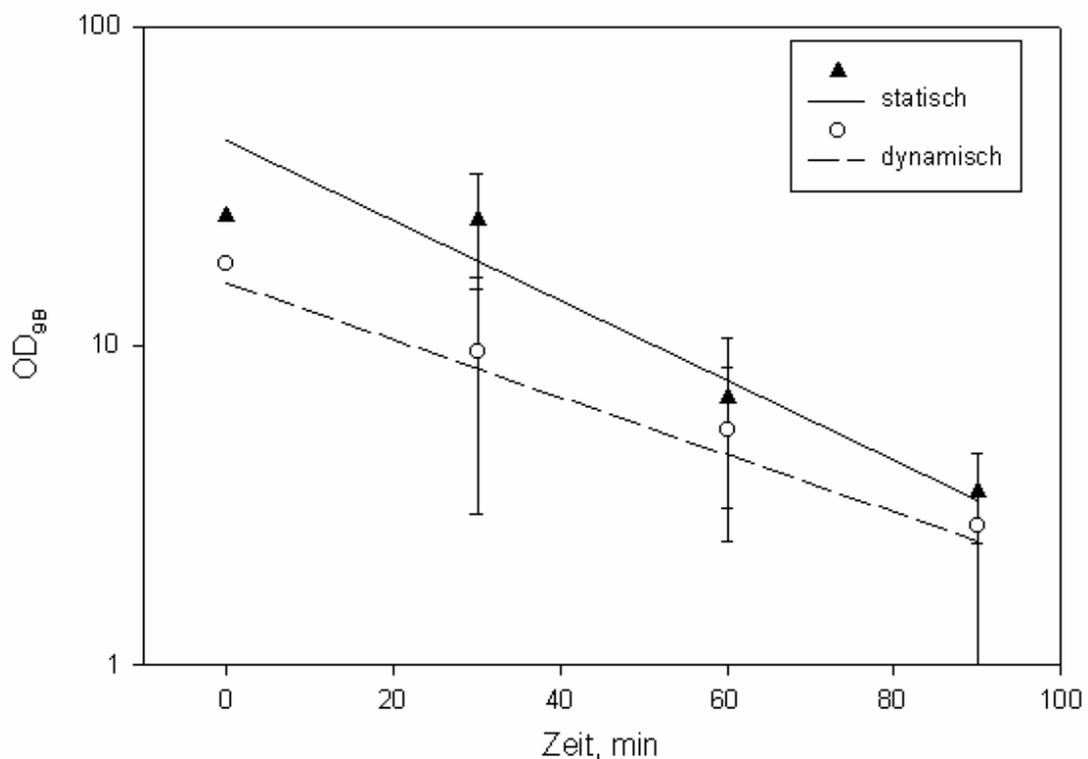


Abb. 27 Verlauf der mRNA-Konzentration für 9/B nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D.

In strömungsexponierten HUVEC (6 dyn/cm², 24 h) ist die mRNA-Stabilität für 9/B gegenüber den statisch kultivierten Kontrollen nicht signifikant verändert. n = 3