

Institut für Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Axel R. Pries

**Wandschubspannungsregulierte Expression von
Proteinen der Thrombospondin type-1 Repeat (TSR)
Familie in Endothelzellen.**

Ein neuer Mechanismus zur Regulation von Endothelfunktionen.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Mauro Bongrazio

aus: Pescara (Italien)

Berlin, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel R. Pries
2. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl

Promoviert am: 26.10.2004

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	BLUTSTRÖMUNG, ENDOTHELZELLEN UND VASKULÄRE ADAPTATION	7
1.2	AUF ENDOTHELZELLEN WIRKENDE HÄMODYNAMISCHE KRÄFTE	8
1.3	WANDSCHUBSPANNUNG IM GEFÄßSYSTEM	10
1.4	KONZEPT UND MECHANISMEN DER STRÖMUNGSVERMITTELTEN ANGIOADAPTATION	11
1.4.1	<i>Angiogenese</i>	12
1.4.2	<i>Pruning</i>	14
1.4.3	<i>Arteriogenese</i>	14
1.5	MECHANOTRANSDUKTION IN ENDOTHELZELLEN	14
1.6	WANDSCHUBSPANNUNGSREGULIERTE GENEXPRESSION	17
1.7	THROMBOSPONDIN TYPE 1 REPEAT (TSR) FAMILIE	19
1.7.1	<i>Thrombospondine (TSP)</i>	22
1.7.2	<i>Metallospodine/ADAMTS</i>	28
1.7.3	<i>Brain Specific angiogenic inhibitor-1</i>	33
1.7.4	<i>Properdin</i>	33
1.8	FRAGESTELLUNG	34
2	MATERIAL UND METHODEN	36
2.1	MATERIAL	36
2.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	36
2.1.2	<i>Antikörper</i>	40
2.1.3	<i>Kits</i>	40
2.1.4	<i>Geräte</i>	41
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen</i>	42
2.2	METHODEN	44
2.2.1	<i>Zellkultur</i>	44
2.2.2	<i>Endothelzellenstimulation</i>	45
2.2.3	<i>Zellernte</i>	48
2.2.4	<i>RNA-Isolierung von Endothelzellen</i>	49
2.2.5	<i>Reverse Transkription</i>	49
2.2.6	<i>Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	49
2.2.7	<i>Semiquantitative PCR</i>	51
2.2.8	<i>Erstellung biotinylierten RNA-Sonden</i>	51
2.2.9	<i>Northern Blot</i>	53

2.2.10	<i>Echt-Zeit-PCR (Real-Time PCR)</i>	54
2.2.11	<i>Prazosin-Behandlung, Gewebeentnahme und Verarbeitung</i>	56
2.2.12	<i>Protein Analyse</i>	58
2.2.13	<i>Gene Array</i>	61
2.2.14	<i>Statistische Auswertung</i>	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	DAS KEGEL-PLATTE-SYSTEM ALS <i>IN VITRO</i> MODELL ZUR UNTERSUCHUNG DER EFFEKTE DER WANDSCHUBSPANNUNG AUF ENDOTHELZELLEN.....	63
3.1.1	<i>Änderung der Endothelzellmorphologie durch Wandschubspannung</i>	63
3.1.2	<i>Expression bekannter wandschubspannungsregulierter Gene</i>	64
3.2	WANDSCHUBSPANNUNGSABHÄNGIGE EXPRESSION VON GENEN DER THROMBOSPONDIN TYP 1 REPEAT (TSR) FAMILIE.....	65
3.2.1	<i>Thrombospondin 1 (TSP-1)</i>	66
3.2.2	<i>METH-1/ADAMTS-1</i>	74
3.2.3	<i>Properdin</i>	78
3.2.4	<i>Expression von TSP-1, METH-1 und Properdin nach Stimulation durch laminare oder turbulente Strömung</i>	81
3.3	PRAZOSIN-BEHANDLUNG ALS <i>IN VIVO</i> MODELL FÜR DIE UNTERSUCHUNG WANDSCHUBSPANNUNGSINDUZIERTER ANGIOGENESE	82
3.3.1	<i>Expression der RNA von TSP-1, CD36 und METH-1 im Skelettmuskel von Mäusen nach Prazosin-Behandlung</i>	84
3.3.2	<i>TSP-1 Protein Expression in der Endothelzellfraktion von Skelettmuskel nach Prazosin-Behandlung</i>	85
4	DISKUSSION	86
4.1	MODELLE ZUR UNTERSUCHUNG DER WANDSCHUBSPANNUNGSABHÄNGIGEN GENEXPRESSION.....	86
4.2	EXPRESSION VON GENEN DER THROMBOSPONDIN TYPE-1 REPEAT (TSR) FAMILIE NACH WANDSCHUBSPANNUNGSSTIMULATION.	88
4.2.1	<i>Angiogenese relevante Mitglieder der TSR Familie</i>	89
4.2.2	<i>Nicht Angiogenese relevante Mitglieder der TSR Familie</i>	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	SUMMARY	112
7	LITERATURVERZEICHNIS	114

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	132
ANHANG.....	134
DANKSAGUNG	138
LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	139