

3 Ergebnisse

3.1 Das Kegel-Platte-System als *in vitro* Modell zur Untersuchung der Effekte der Wandschubspannung auf Endothelzellen.

3.1.1 Änderung der Endothelzellmorphologie durch Wandschubspannung

In einem Kegel-Platte-System wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) für 24 Stunden einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm^2 (laminare Strömung) ausgesetzt. Nach der Stimulation ließ sich bei lichtmikroskopischer Untersuchung eine der Strömung folgende Ausrichtung der Endothelzellen erkennen (Abb. 3-1).

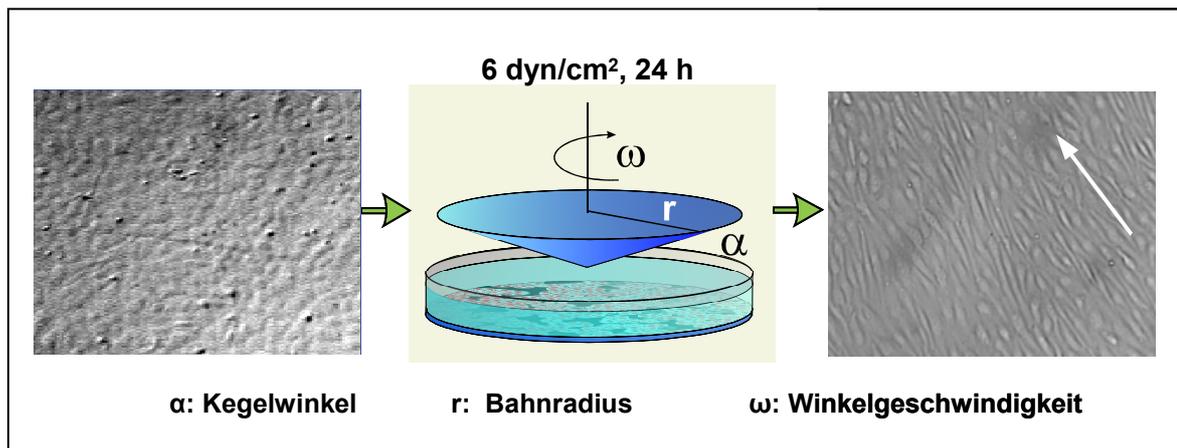


Abb. 3-1 Änderung der Zellmorphologie unter Wandschubspannung.

Endothelzellen wurden in Petrischalen kultiviert und in einem Kegel-Platte-System durch Wandschubspannung stimuliert (6 dyn/cm^2). In der Kontrollgruppe liegt eine diffuse Anordnung der Zellen vor. Nach der Einwirkung von Strömung ist eine Ausrichtung der Zellen in Strömungsrichtung (Pfeil) erkennbar.

Die Zellen der Kontrollgruppe zeigten dagegen keine bevorzugte Orientierung sondern eine typische diffuse Anordnung, die in der Literatur als Kopfsteinpflaster-Muster („cobble stone pattern“) bezeichnet wird. Die beobachtete Morphologie der Endothelzellen nach Stimulation durch Wandschubspannung stimmt mit zahlreichen publizierten Untersuchungen überein (Malek und Izumo, 1996; Skalak und Price, 1996).

3.1.2 Expression bekannter wandschubspannungsregulierter Gene

Die Eignung dieses experimentellen Systems für die Untersuchung der strömungsabhängigen Genexpression wurde anhand von Genen überprüft, deren differentielle Expression in Endothelzellen bei Strömung bereits publiziert war. Hierfür boten sich Endothelin-1 (ET-1) und C-type natriuretic peptide (CNP) an. Während die Wandschubspannung die Expression von Endothelin-1 langfristig reduziert, wird die Expression von CNP verstärkt (Chun et al., 1997; Sharefkin et al., 1991). In dieser Studie wurden HUVEC in einem Kegel-Platte-System einer laminaren Strömung (6 dyn/cm²; 24 h) ausgesetzt oder unter statischen Bedingungen kultiviert. Die wandschubspannungsabhängige Expression von CNP und ET-1 wurde durch RT-PCR bestimmt. Das Expressionsmuster beider Gene (Abb. 3-2) steht mit den vorherigen publizierten Untersuchungen in Einklang. Die Expression des „housekeeping“ Genes Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Wang et al., 1989) wird durch Wandschubspannung nicht verändert und für die Normierung unterschiedlicher cDNA Pools eingesetzt.

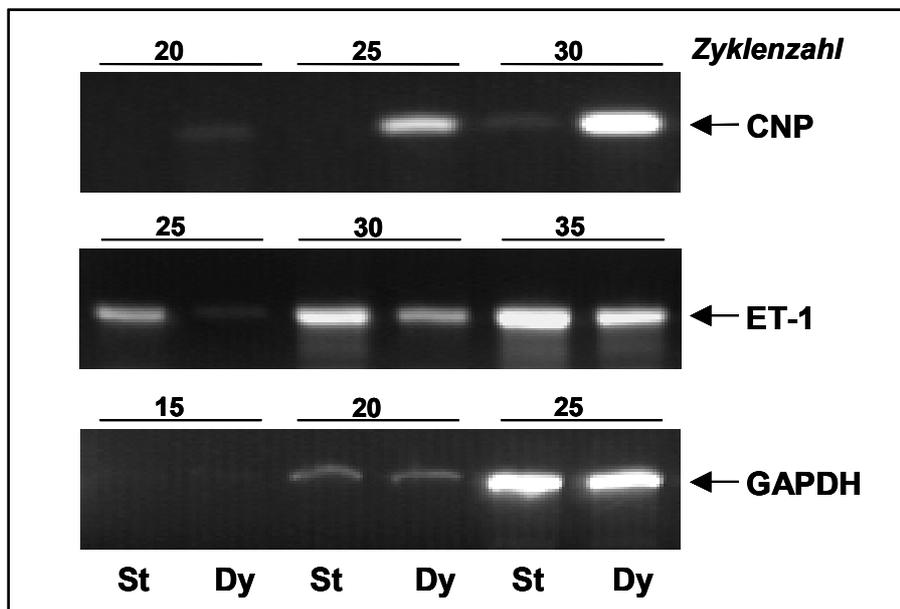


Abb. 3-2 Untersuchung der Expression von CNP und ET-1 zur Überprüfung der Wandschubspannungsstimulation .

Die Expression von C-type natriuretic peptide (CNP) wird bekanntermaßen durch Strömung induziert (Chun et al., 1997), die von Endothelin-1 (ET-1) inhibiert (Sharefkin et al., 1991). In diesem Versuch wurde die Expression von CNP und ET-1 in unbehandelten (St: statisch) und wandschubspannungsstimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC mittels RT-PCR bei verschiedenen Zyklenzahlen analysiert. Die Abbildung zeigt eine durch Strömung modulierte Expression der mRNAs der beiden Gene, die mit den publizierten Beobachtungen übereinstimmt. GAPDH wurde als „housekeeping“ Gen benutzt und blieb unverändert.

3.2 Wandschubspannungsabhängige Expression von Genen der Thrombospondin Typ 1 Repeat (TSR) Familie

Das Kegel-Platte-System wurde für die Untersuchung wandschubspannungsabhängiger Expression von ausgewählten Genen der Thrombospondin Typ 1 Repeat (TSR) Familie eingesetzt (Tab. 3-1).

Tab. 3-1 RT-PCR Analyse der Expression Thrombospondin Type 1 Repeat (TSR)-haltiger Proteine in HUVEC nach Strömungsexposition (6 dyn/cm²; 24 h; laminare Strömung)

| | Angiogenese Inhibitor | Expression unter statischen Bedingungen | Modulation durch Wandschubspannung |
|---|-----------------------|---|------------------------------------|
| Thrombospondin-1 (TSP-1) | Ja | Hoch | Ja (Suppression) |
| Thrombospondin-2 (TSP-2) | Ja | n. d. | Nein |
| METH-1/ADAMTS-1 | Ja | Gering | Ja (Induktion) |
| METH-2/ADAMTS-8 | Ja | n. d. | Nein |
| Brain-specific angiogenesis inhibitor (BAI-1) | Ja | n. d. | Nein |
| Prokollagen I N-proteinase (pNP) | Ja (?) | Gering | Nein |
| Properdin | Nein | Gering | Ja (Induktion) |

HUVEC wurden unter laminaren Strömungsbedingungen einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² für 24 Stunden ausgesetzt oder unter statischen Bedingungen kultiviert. Die Expression TSR-haltiger Gene wurde durch semi-quantitative RT-PCR untersucht. Thrombospondin (TSP)-1, METH-1/ADAMTS-1 und Properdin wurden durch Wandschubspannung moduliert, während Thrombospondin (TSP)-2, METH-2/ADAMTS-8, „brain-specific angiogenesis inhibitor“ (BAI)-1 und Prokollagen I N-Proteinase (pNPI) unverändert blieben. TSP-1 wird unter statischen Bedingungen stark exprimiert und durch Wandschubspannung supprimiert. Hingegen wird die Expression von METH-1/ADAMTS-1 und Properdin nach Strömungsexposition verstärkt.

3.2.1 Thrombospondin 1 (TSP-1)

3.2.1.1 Hemmung der Expression durch Wandschubspannung

Die Hemmung der Expression von TSP-1 durch Wandschubspannung wurde in HUVEC und humanen koronaren microvasculären Endothelzellen (HCMEC) mittels Northern Blot analysiert. (Abb. 3-3a). Unter statischen Bedingungen ist TSP-1 stark exprimiert. Durch Strömungsexposition (laminare Strömung, 6 dyn/cm², 24 h) wird die Expression von TSP-1 in beiden Endothelzelltypen fast vollständig gehemmt.

Die strömungsabhängige Hemmung von TSP-1 wurde in HUVEC auch auf Proteinebene untersucht (Abb. 3-3b). Sowohl intrazellulär als auch extrazellulär wird TSP-1 nach Strömungsexposition stark reduziert.

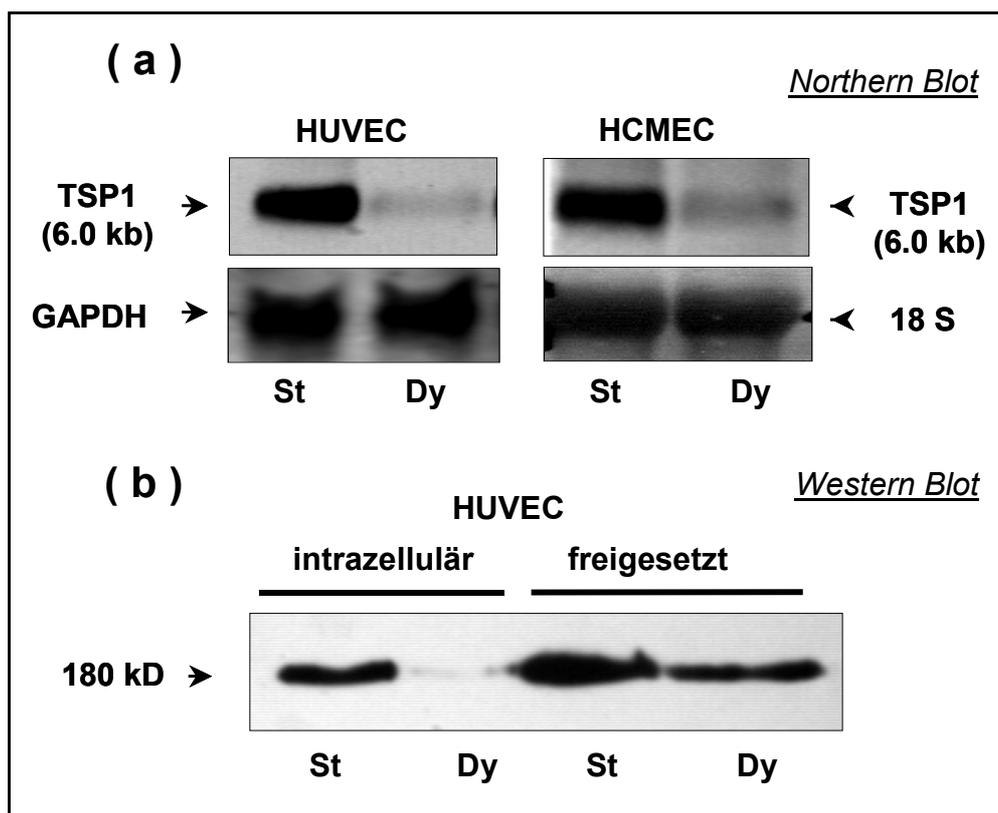


Abb. 3-3 Inhibition der Expression von TSP-1 in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung.

(a) Die mRNA Expression von TSP-1 in unstimulierten (St, statisch) und durch Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) stimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC und HCMEC wurde mittels Northern Blot analysiert. GAPDH und 18S wurden als interne Kontrolle benutzt. (b) Western Blot Analyse von TSP-1 Protein vor und nach Strömungsexposition in Zelllysat (intrazellulär) und Überstand (freigesetzt) von HUVEC.

3.2.1.2 Expression als Funktion der Wandschubspannung

HUVEC wurden unter laminaren Strömungsbedingungen für 24 Stunden Wandschubspannungen unterschiedlicher Stärke (0.6, 1, 2, 3, 6 dyn/cm²) ausgesetzt. Die Expression von TSP-1 wurde durch Northern Blot untersucht. Die Abbildung 3-4 zeigt, dass die strömungsabhängige Reduzierung von TSP-1 von der Stärke der Wandschubspannung abhängig ist. Erst ab einer Wandschubspannung von 2,0 dyn/cm² ist die Inhibition statistisch signifikant. Bei höherer Wandschubspannung nimmt der Effekt weiter zu.

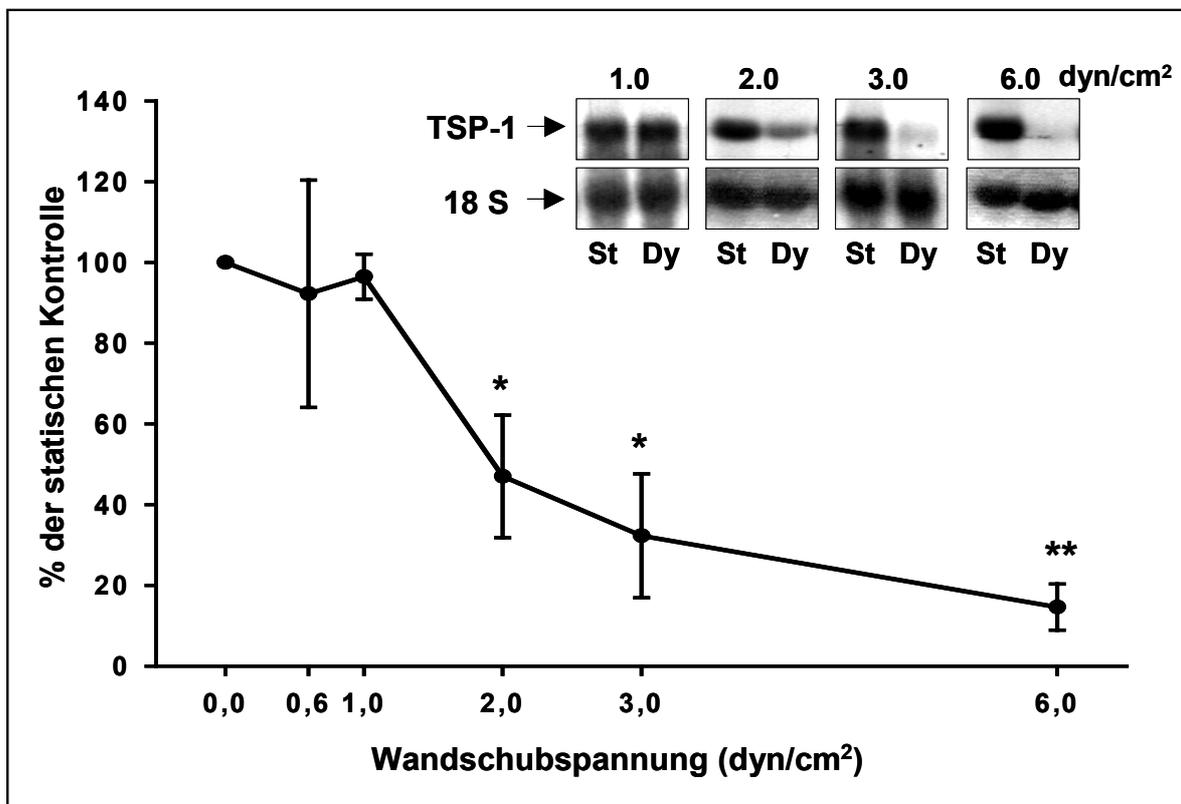


Abb. 3-4 Expression von Thrombospondin-1 als Funktion der Wandschubspannung. HUVEC wurden für 24 h einer laminaren Strömung der angegebenen Stärke ausgesetzt und die Expression der mRNA im Northern Blot untersucht. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{TSP-1}}/\text{IntOD}_{18\text{S}}$ als % der statischen Kontrolle (0,0 dyn/cm²). n=3-5; **p<0.01 und *p<0.05 vs. Stat. Ktrl. St: statisch; Dy: dynamisch

3.2.1.3 Expression als Funktion der Zeit

HUVEC wurden einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² für verschiedene Zeiten (4, 24, 48, 72 h) ausgesetzt und die Expression von TSP-1 durch Northern

Blot untersucht (Abb. 3-5). Die Hemmung von TSP-1 erreichte nach 24 Stunden statistische Signifikanz und blieb auch nach längerer Expositionszeit (bis 72 h) nahezu unverändert erhalten.

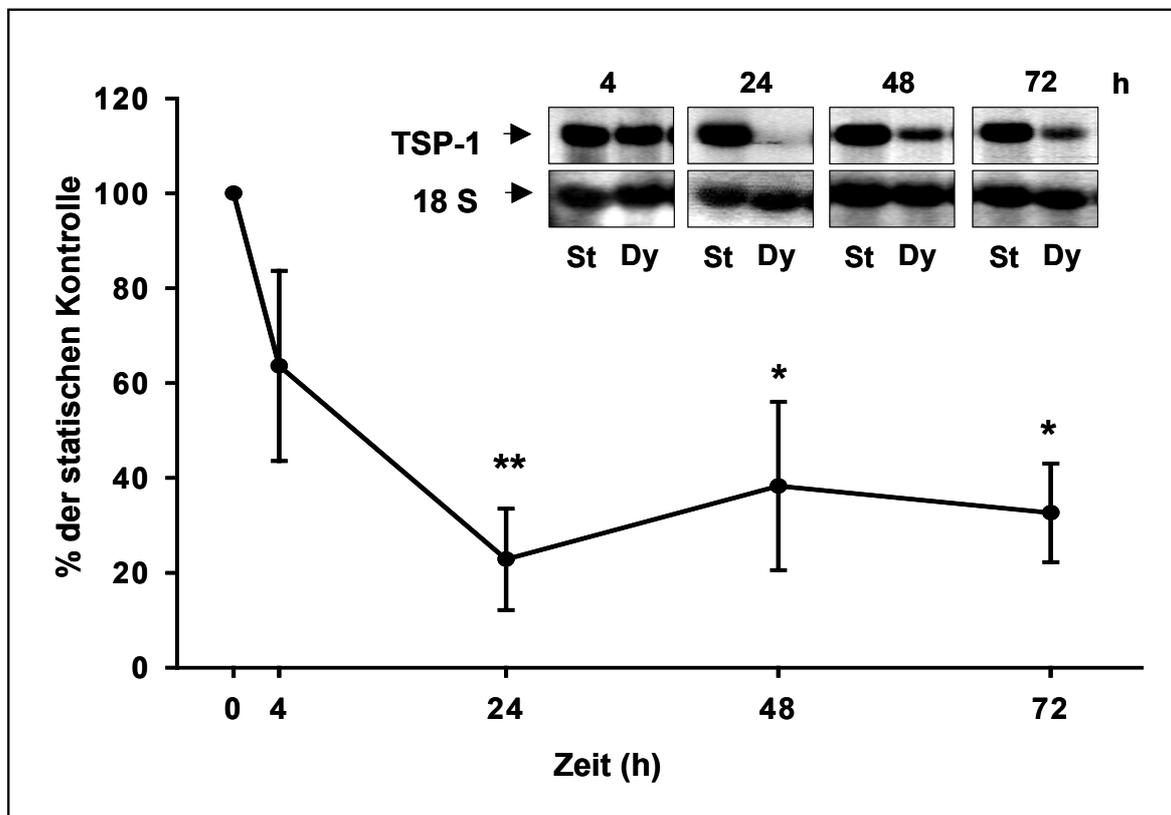


Abb. 3-5 Zeitgang der TSP-1 Suppression durch Wandschubspannung.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten einer laminaren Strömung ausgesetzt (6 dyn/cm²) und die mRNA Expression für TSP-1 im Northern Blot analysiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{TSP-1}}/\text{IntOD}_{18\text{S}}$ als % der statischen Kontrolle (0 h). n=3-5; ** p<0.01, * p<0.05 vs. Stat. Ktrl. St: statisch; Dy: dynamisch

3.2.1.4 Expression nach Strömungsstillstand

HUVEC wurden durch Wandschubspannung stimuliert (laminare Strömung; 6 dyn/cm²; 24 h) und anschließend für verschiedene Zeiten (1, 4, 24 h) unter statischen Bedingungen weiter kultiviert. Die Northern Blot Analyse zeigte, dass ein Strömungsstillstand, nachdem die TSP-1 Expression zuvor durch Wandschubspannung supprimiert worden war, zu einem erneuten Expressionsanstieg führte (Abb. 3-6). Dieser Effekt war bereits nach 4 Stunden

erkennbar und nach 24 Stunden erreichte die TSP-1 Expression das Niveau der statischen Kontrolle.

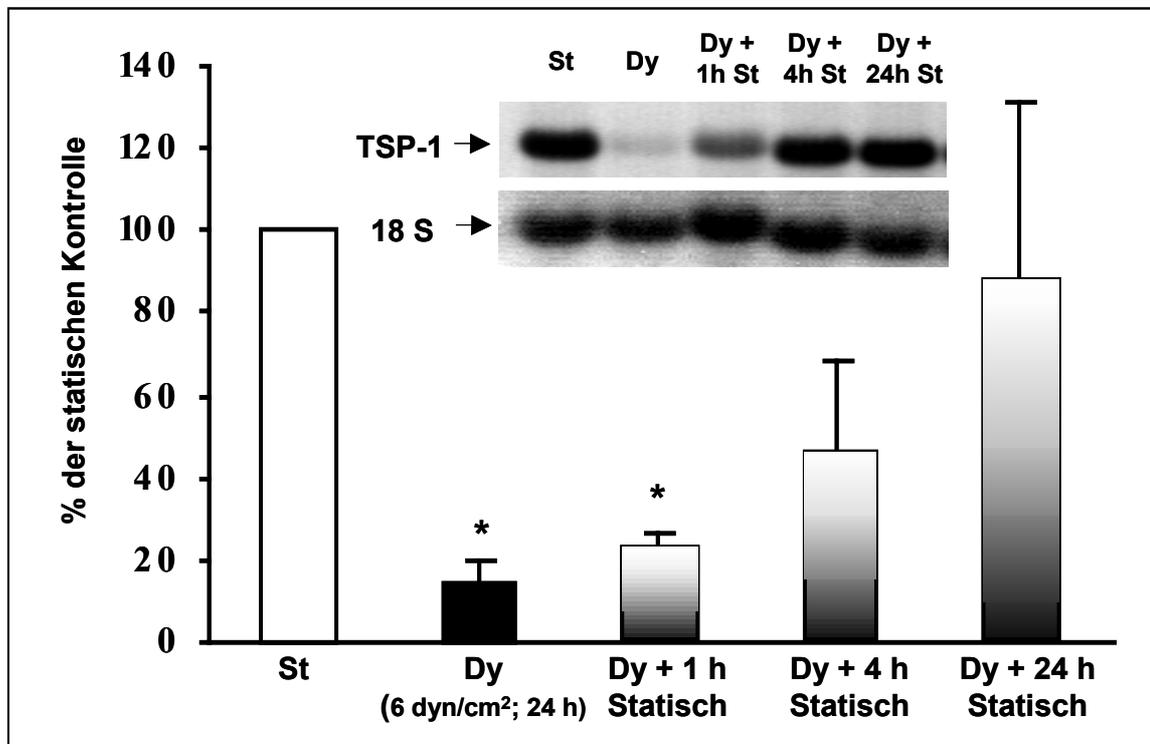


Abb. 3-6 Reversibilität der wand Schubspannungsabhängigen Suppression von TSP-1 nach Wiederherstellung von statischen Kulturbedingungen.

Die Suppression der Expression von TSP-1 in EC durch Wand Schubspannung ist innerhalb von 24 h voll reversibel. HUVEC wurden für 24 h ohne Strömung (St) oder unter einer Wand Schubspannung von 6 dyn/cm² (Dy) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen für 1 h, 4 h, oder 24 h weiter kultiviert. Die Abbildung zeigt repräsentative Blots und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{TSP-1}}/\text{IntOD}_{18\text{S}}$ als % der statischen Kontrolle. n=3-7; *p<0.01 vs. Stat. Ktrl.

3.2.1.5 Expression nach "vascular endothelial growth factor" (VEGF)-Stimulation

HUVEC wurden unter statischen oder dynamischen (laminare Strömung; 6 dyn/cm²) Bedingungen mit oder ohne VEGF (40 ng/ml) für 24 Stunden kultiviert. VEGF führte weder bei statischen noch bei strömungsexponierten Zellen zu einer im Northern Blot nachweisbaren Veränderung der mRNA-Expression für TSP-1 (Abb. 3-7).

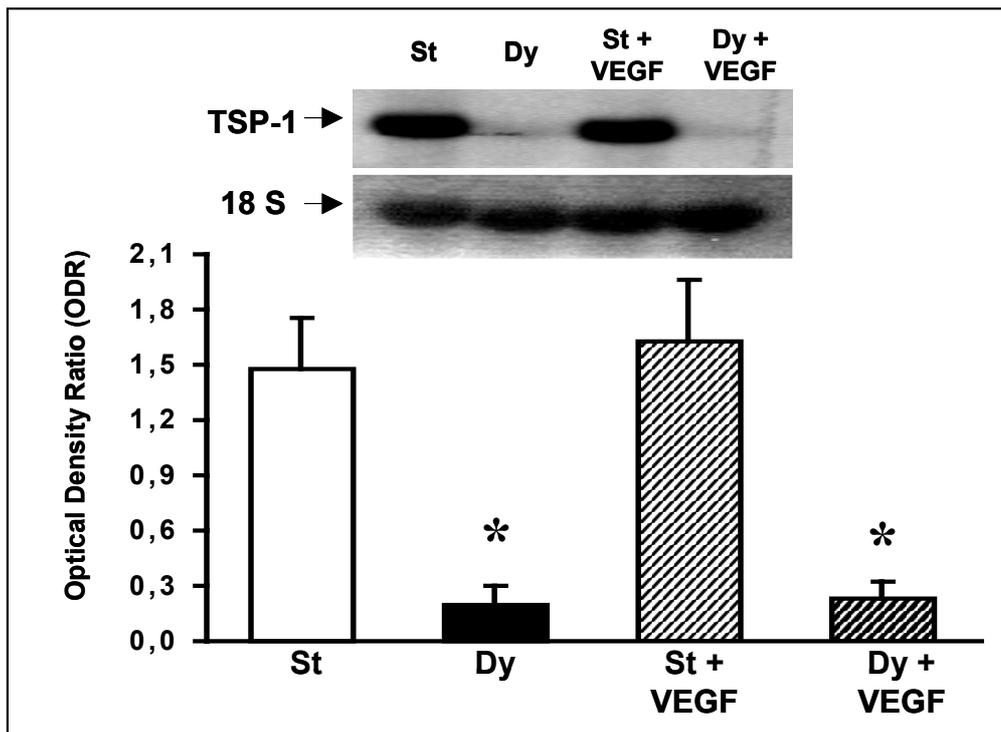


Abb. 3-7 TSP-1 Expression nach VEGF Behandlung

HUVEC wurden unter statischen (St) oder dynamischen (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) Kulturbedingungen mit VEGF (40 ng/ml, 24 h) stimuliert und die Expression von TSP-1 durch Northern Blot Analyse untersucht. Mittelwerte \pm STD. n = 4-7; * p < 0,01 vs. Static

3.2.1.6 Strömungsabhängige Expression des TSP-1 Rezeptors CD36

Hemmung der Expression durch Wandschubspannung

Die wandschubspannungsabhängige Expression von CD36 wurde in HUVEC und HCMEC durch RT-PCR untersucht (Abb. 3-8a). In beiden Endothelzelltypen wurde die Expression von CD36 durch Wandschubspannungsexposition (laminare Strömung; 6 dyn/cm²; 24 h) stark gehemmt. Diese Ergebnisse wurden in HUVEC auch durch Real-Time PCR Analyse bestätigt (Abb. 3-8b).

Expression als Funktion der Wandschubspannung

HUVEC wurden unter laminaren Bedingungen für 24 Stunden Wandschubspannung unterschiedlicher Stärke (0,6, 1, 2, 3, 6 dyn/cm²) ausgesetzt. Die Expression von CD36 (RT-PCR Analyse) erreicht schon ab einer

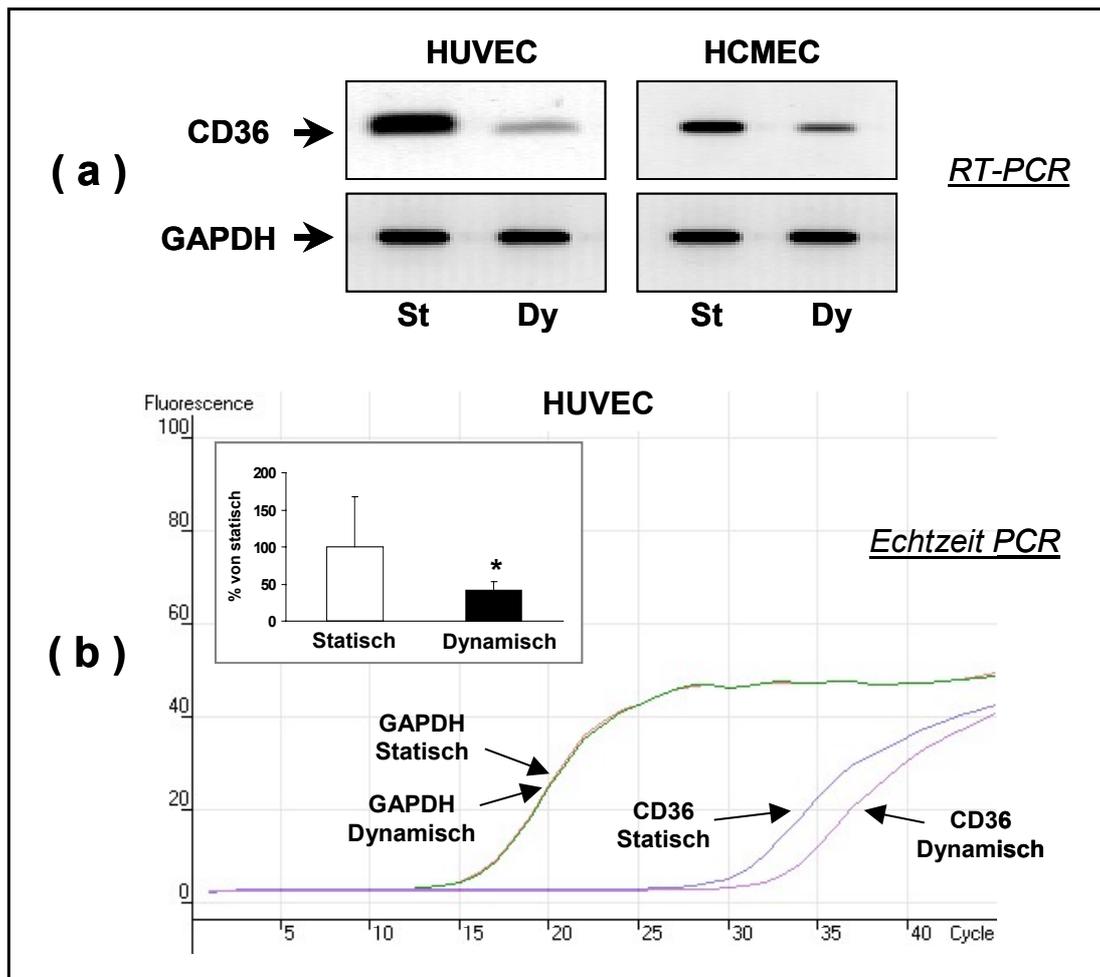


Abb. 3-8 Inhibition der Expression von CD36 in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung.

Die mRNA Expression von CD36 in unstimulierten (St, statisch) und durch Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) stimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC und HCMEC wurde mittels RT-PCR analysiert (a). Die Strömungs-abhängige Inhibition von CD36 in HUVEC wurde zusätzlich durch Echtzeit PCR bestätigt (b). Die Abbildung zeigt repräsentative Echtzeit PCR Profile und ihre graphisch-statistische Auswertung. Mittelwerte±STD des Quotienten CD36/GAPDH als % der statischen Kontrolle. n=6; *p<0.05 vs. Statisch.

Wandschubspannung von 1 dyn/cm² ihren minimalen Wert (Abb. 3-9). Für TSP-1 war erst ab 2,0 dyn/cm² eine Hemmung zu verzeichnen.

Expression als Funktion der Zeit

HUVEC wurden einer laminaren Wandschubspannung von 6 dyn/cm² für verschiedene Zeiten (4, 24, 48, 72 h) ausgesetzt. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass die wandschubspannungsabhängige Hemmung von CD36 schon nach 4 Stunden zu verzeichnen ist und auch nach längerer Expositionszeit (bis 72 h)

nahezu unverändert erhalten bleibt (Abb. 3-10). Dagegen wurde die Expression von TSP-1 erst nach 24 Stunden signifikant gehemmt.

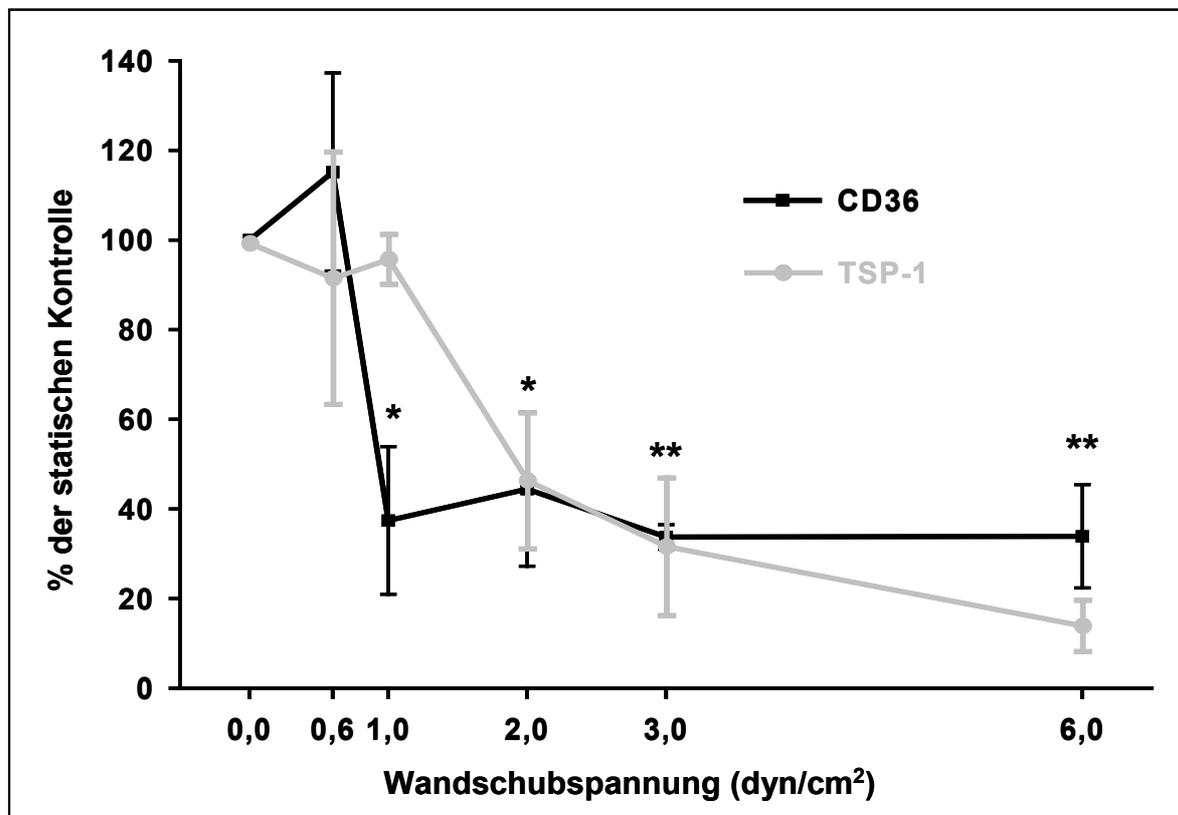


Abb. 3-9 Suppression der CD36 Expression als Funktion der Wandschubspannung. HUVEC wurden 24 Stunden einer laminaren Strömung der angegebenen Stärke ausgesetzt und die Expression der mRNA für CD36 durch RT-PCR untersucht. Die Kurve für TSP-1 ist zum Vergleich gezeigt. Mittelwerte \pm STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{CD36}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle (0,0 dyn/cm²). n=3-6; **p<0.01 und *p< 0.05 vs. Stat. Ktrl.

Expression nach Strömungsstillstand

Nachdem sie 24 Stunden einer Wandschubspannung (laminare Strömung; 6 dyn/cm²) ausgesetzt waren, wurden HUVEC für verschiedene Zeiten (1, 4, 24 h) unter statischen Bedingungen weiter kultiviert. Die strömungsabhängige Hemmung der CD36-Expression (RT-PCR Analyse) war im Unterschied zu TSP-1 nach 4 Stunden Strömungsstillstand noch vollständig erhalten und nach 24 Stunden komplett reversibel (Abb. 3-11).

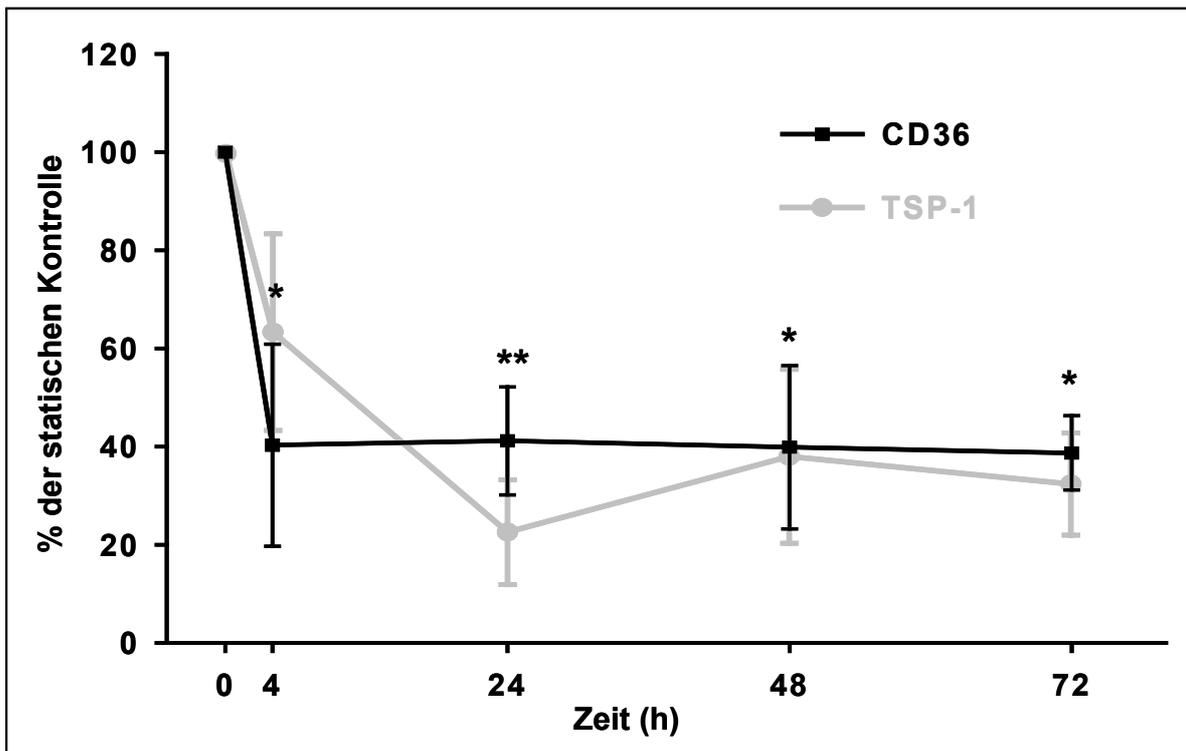


Abb. 3-10 Zeitgang der CD36 Suppression durch Wandschubspannung.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten einer laminaren Strömung ausgesetzt (6 dyn/cm²) und die mRNA Expression für CD36 durch RT-PCR untersucht. Zum Vergleich ist die Kurve für TSP-1 gezeigt. Mittelwerte±STD des Quotienten IntOD_{CD36}/IntOD_{GAPDH} als % der statischen Kontrolle (0 h). n=4-6; ** p<0.01 und * p<0.05 vs. Stat. Ktrl

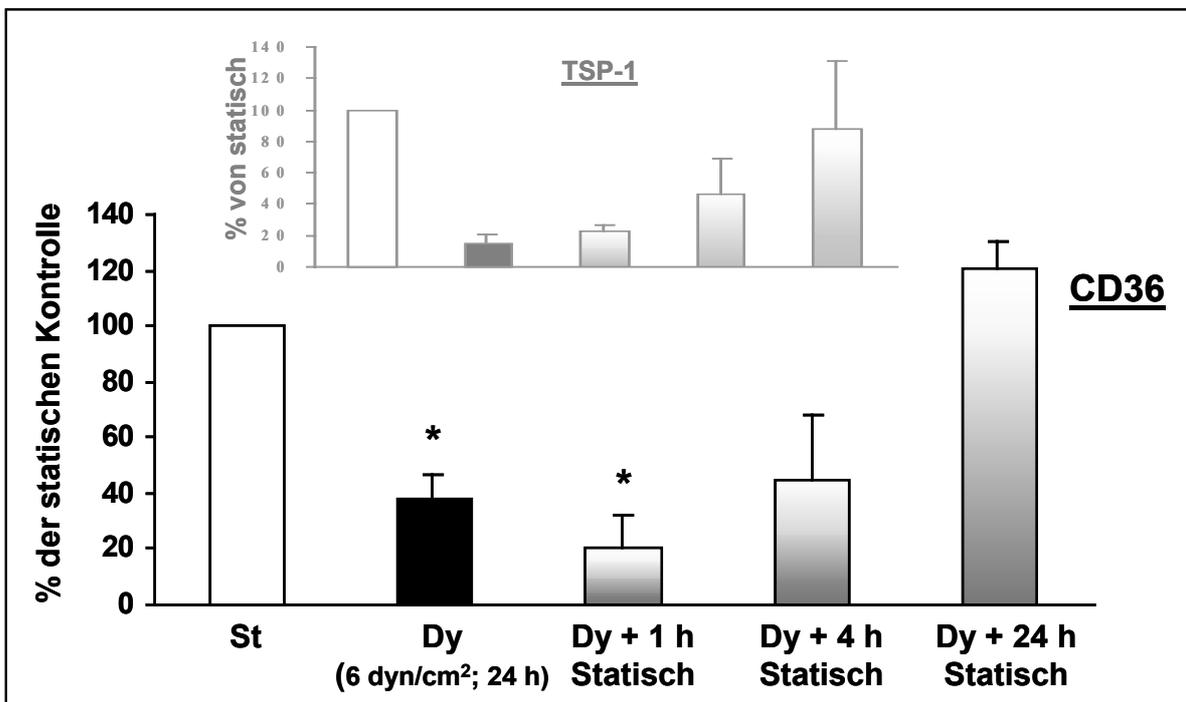


Abb. 3-11 Reversibilität der wandschubspannungsabhängigen Suppression von CD36 nach Wiederherstellung von statischen Kulturbedingungen.

HUVEC wurden ohne Strömung (St) oder unter Wandschubspannung (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen für 1 h, 4 h, oder 24 h weiter kultiviert. Die Expression der mRNA wurde durch RT-PCR untersucht. Die Grafik für TSP-1 ist zum Vergleich gezeigt. Mittelwerte±STD des Quotienten IntOD_{CD36}/IntOD_{GAPDH} als % der statischen Kontrolle. n=3-7; *p<0.01 vs. Stat. Ktrl.

3.2.2 METH-1/ADAMTS-1

3.2.2.1 Induktion der Expression durch Wandschubspannung

Die wandschubspannungsabhängige Induktion von METH-1 in HUVEC und HCMEC wurde mittels Northern Blot analysiert (Abb. 3-12). Unter statischen Bedingungen war METH-1 nur gering exprimiert. Nach 24 stündiger Strömungsexposition bei einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² wurde die Expression von METH-1 in beiden Endothelzelltypen stark induziert.

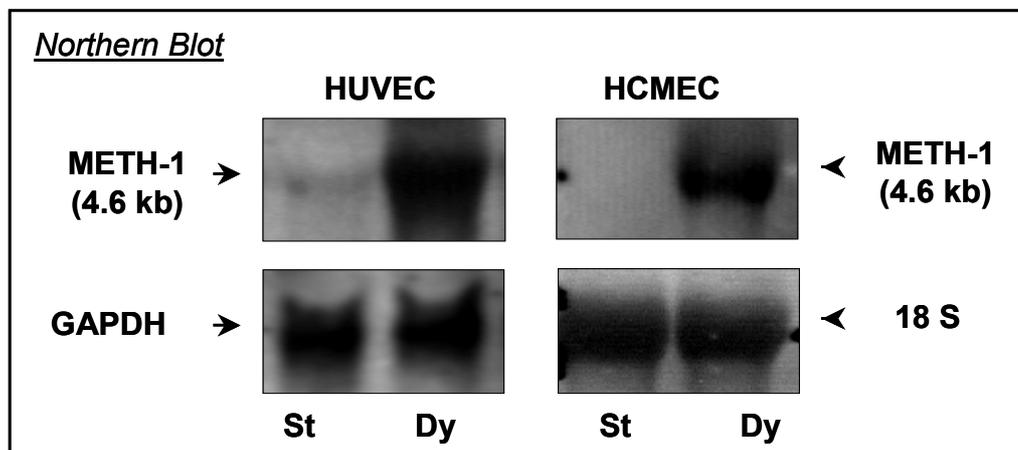


Abb. 3-12 Induktion der Expression von METH-1 in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung.

Die mRNA Expression von METH-1 in unstimulierten (St, statisch) und durch Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) stimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC und HCMEC wurde mittels Northern Blot analysiert. GAPDH oder 18S wurden als interne Kontrolle benutzt.

3.2.2.2 Expression als Funktion der Wandschubspannung

HUVEC wurden für 24 Stunden Wandschubspannung unterschiedlicher Stärke (0.6, 1, 3, 6 dyn/cm²; laminare Strömung) ausgesetzt. Die Expression von METH-1 (RT-PCR Analyse) wurde ab einer Wandschubspannung von 3 dyn/cm² signifikant induziert (Abb. 3-13). Bei höherer Wandschubspannung (6 dyn/cm²) nahm der Effekt weiter zu.

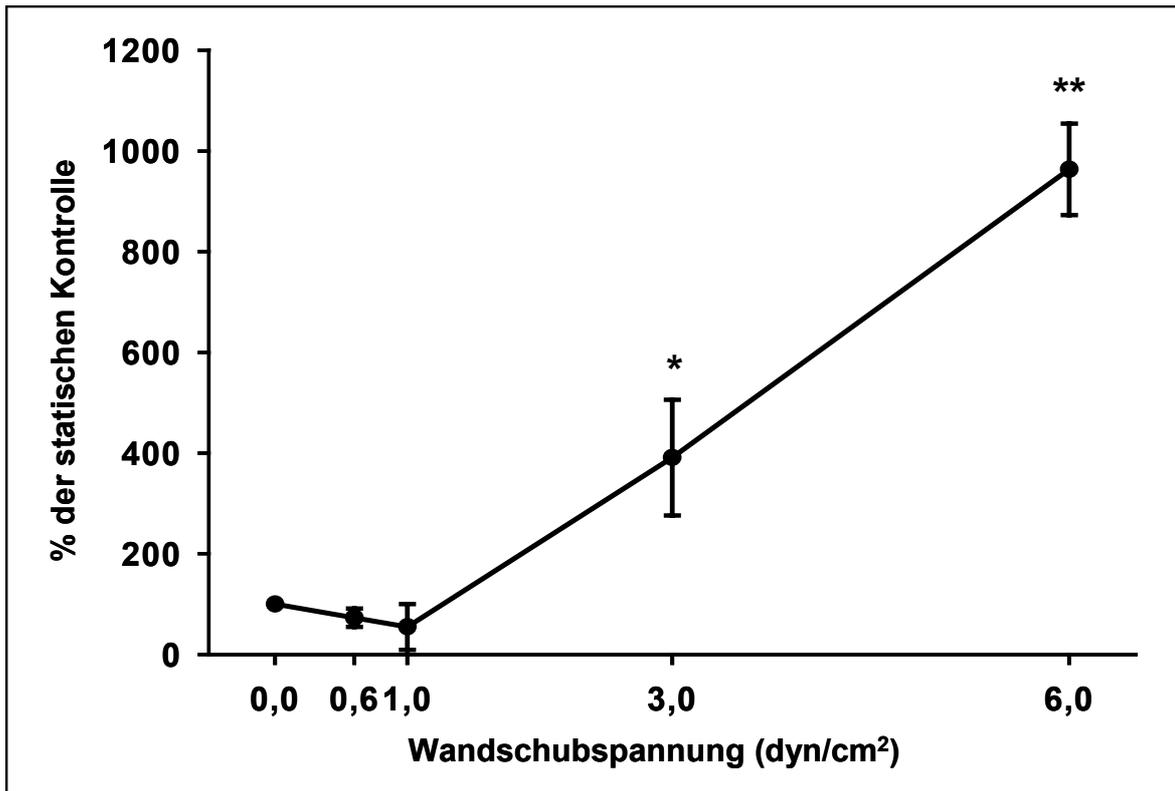


Abb. 3-13 Induktion der METH-1 Expression als Funktion der Wandschubspannung. HUVEC wurden 24 Stunden einer laminaren Strömung der angegebenen Stärke ausgesetzt und die Expression der mRNA für METH-1 durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte \pm STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{METH-1}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle (0,0 dyn/cm²). n=3-6; **p<0.01 und *p< 0.05 vs. Stat. Ktrl.

3.2.2.3 Expression als Funktion der Zeit

HUVEC wurden einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² für verschiedene Zeiten (4, 24, 48 h) ausgesetzt und die Expression von METH-1 durch RT-PCR untersucht (Abb. 3-14). Die Induktion von METH-1 ist schon ab 4 Stunden statistisch signifikant und bleibt auch nach längerer Expositionszeit (bis 48 h) nahezu unverändert erhalten.

3.2.2.4 Expression nach Strömungsstillstand

HUVEC wurden durch Wandschubspannung stimuliert (laminare Strömung; 6 dyn/cm²; 24 h) und anschließend für verschiedene Zeiten (1, 4, 24 h) unter

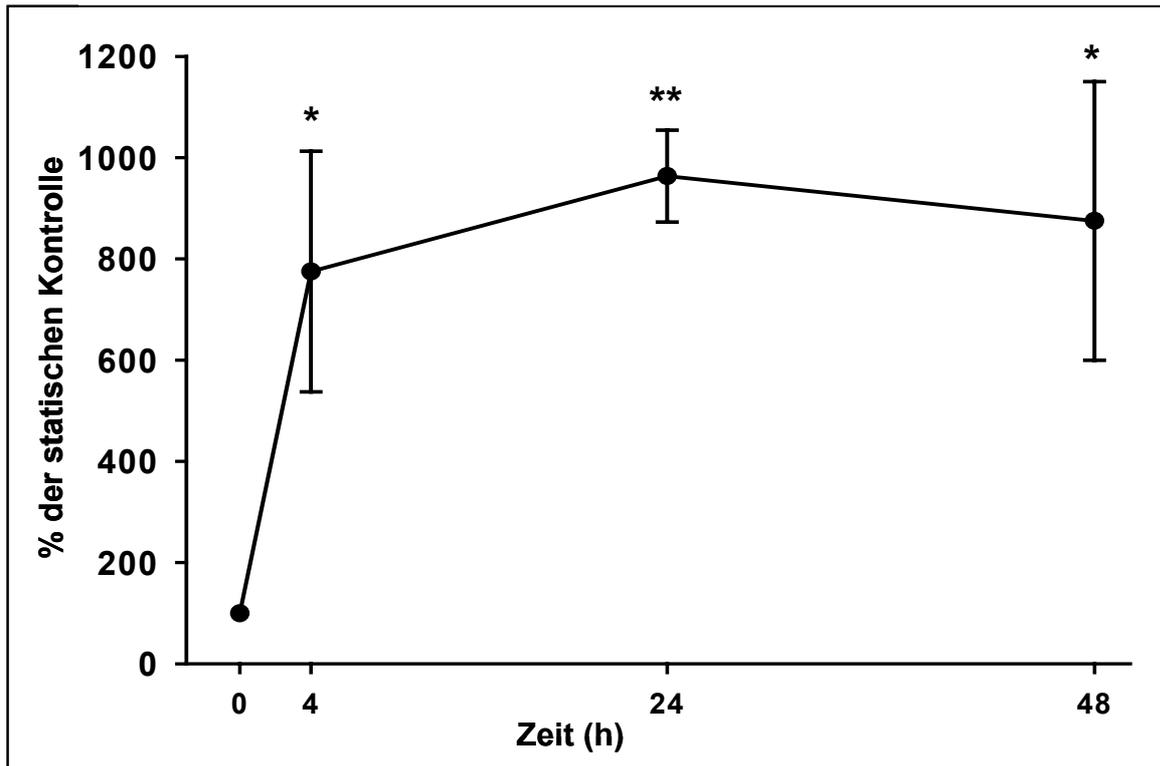


Abb. 3-14 Zeitgang der METH-1 Induktion durch Wandschubspannung.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten einer laminaren Strömung ausgesetzt (6 dyn/cm²) und die mRNA Expression für METH-1 wurde durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{METH-1}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle (0 h). n=4-6; ** p<0.01 und * p<0.05 vs. Stat. Ktrl.

statischen Bedingungen weiter kultiviert. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass die wandschubspannungsabhängige Induktion von METH-1 schon nach 4 Stunden Strömungsstillstand völlig reversibel war (Abb. 3-15).

3.2.2.5 Expression nach VEGF-Stimulation

HUVEC wurden unter statischen oder dynamischen (laminare Strömung; 6 dyn/cm²) Bedingungen mit oder ohne VEGF (40 ng/ml) für 24 Stunden behandelt und die Expression von METH-1 durch Northern Blot untersucht (Abb. 3-16). Unter statischen Bedingungen führte VEGF zu keiner Veränderung der Expression von METH-1, während die wandschubspannungsabhängige Induktion von METH-1 durch VEGF verstärkt wurde.

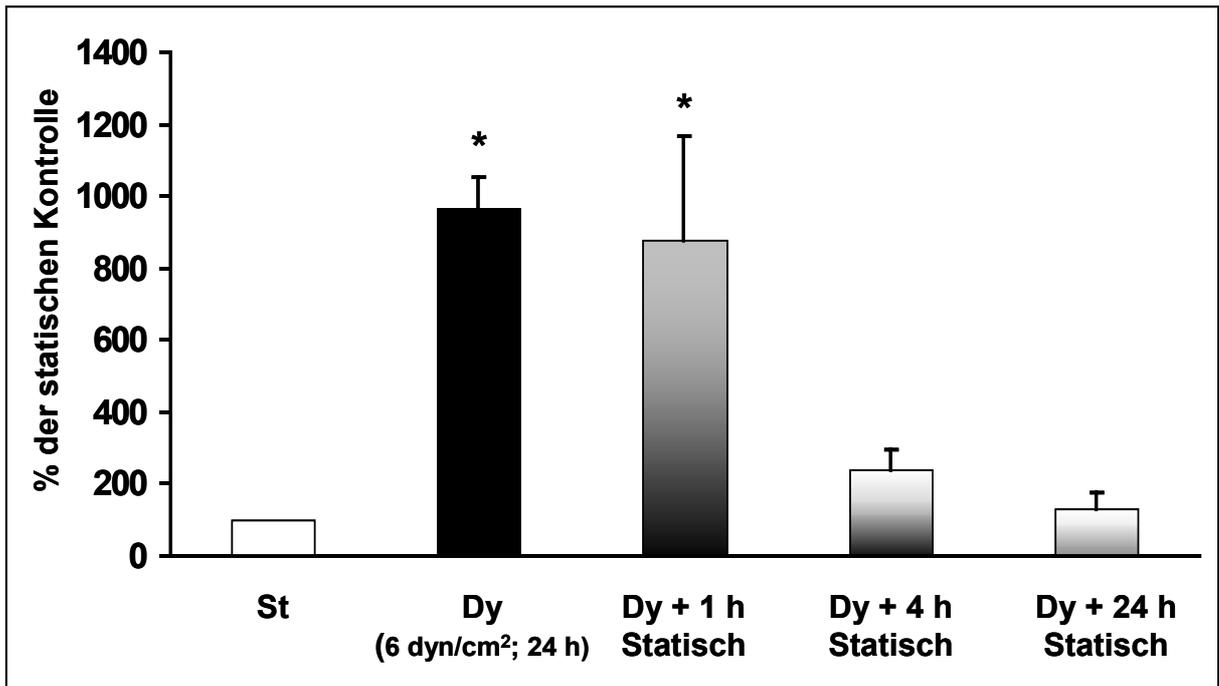


Abb. 3-15 Reversibilität der wandschubspannungsabhängigen Induktion von METH-1 nach Wiederherstellung von statischen Kulturbedingungen.

HUVEC wurden ohne Strömung (St) oder unter Wandschubspannung (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen für 1 h, 4 h, oder 24 h weiter kultiviert. Die Expression der mRNA für METH-1 wurde durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{METH-1}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle. n=3-7; *p<0.01 vs. Stat. Ktrl.

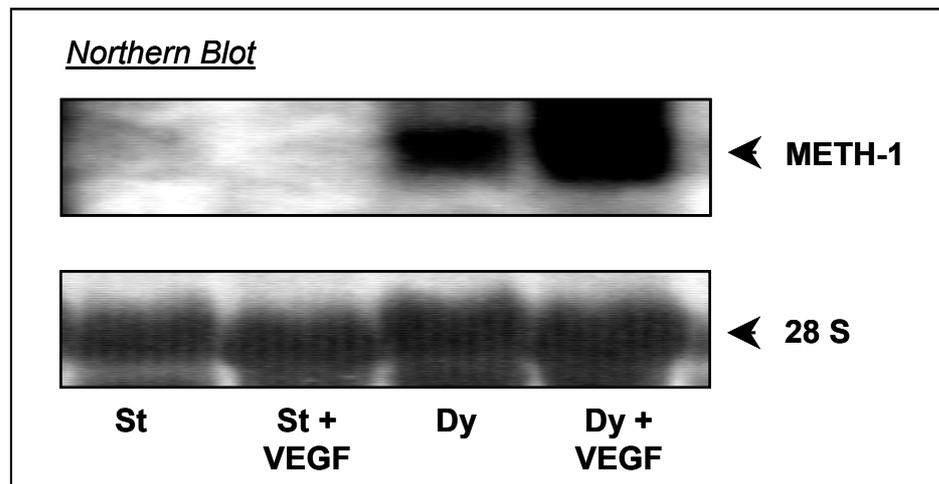


Abb. 3-16 METH-1 Expression nach VEGF Behandlung

HUVEC wurden unter statischen (St) oder dynamischen (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) Kulturbedingungen mit VEGF (40 ng/ml, 24 h) stimuliert und die Expression von METH-1 durch Northern Blot Analyse untersucht..

3.2.3 Properdin

3.2.3.1 Induktion der Expression durch Wandschubspannung

Endothelzellen-Monolayer wurden einer Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) ausgesetzt und die Expression von Properdin mittels Northern Blot (HUVEC) oder RT-PCR (HCMEC) analysiert (Abb. 3-17). Unter statischen Bedingungen ist Properdin in Endothelzellen kaum nachweisbar, wird aber nach Wandschubspannungsexposition stark induziert.

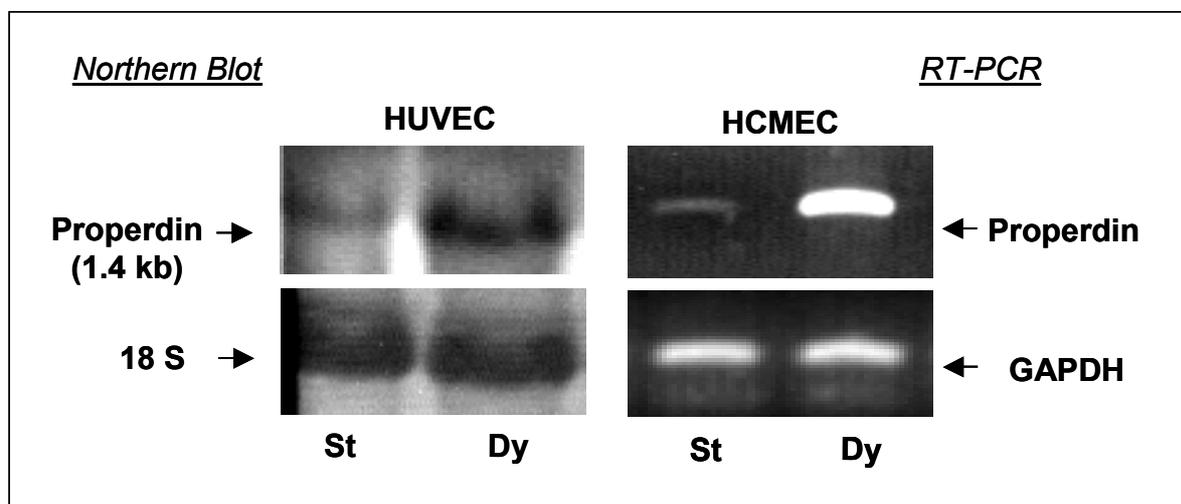


Abb. 3-17 Induktion der mRNA Expression von Properdin in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung.

Die mRNA Expression von Properdin in unstimulierten (St, statisch) und durch Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) stimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC und HCMEC wurde mittels Northern Blot oder RT-PCR analysiert. 18S und GAPDH wurden als interne Kontrolle benutzt.

Die wandschubspannungsabhängige Induktion von Properdin wurde in HUVEC auch auf Proteinebene untersucht. Nach 24 Stunden Stimulation bei einer laminaren Strömung von 6 dyn/cm² wurden Zellysate und Überstände durch Immunpräzipitation und Western Blot analysiert (Abb. 3-18). Properdin wird nach Wandschubspannungsexposition induziert und in den extrazellulären Bereich freigesetzt.

Immunpräzipitation und Western Blot

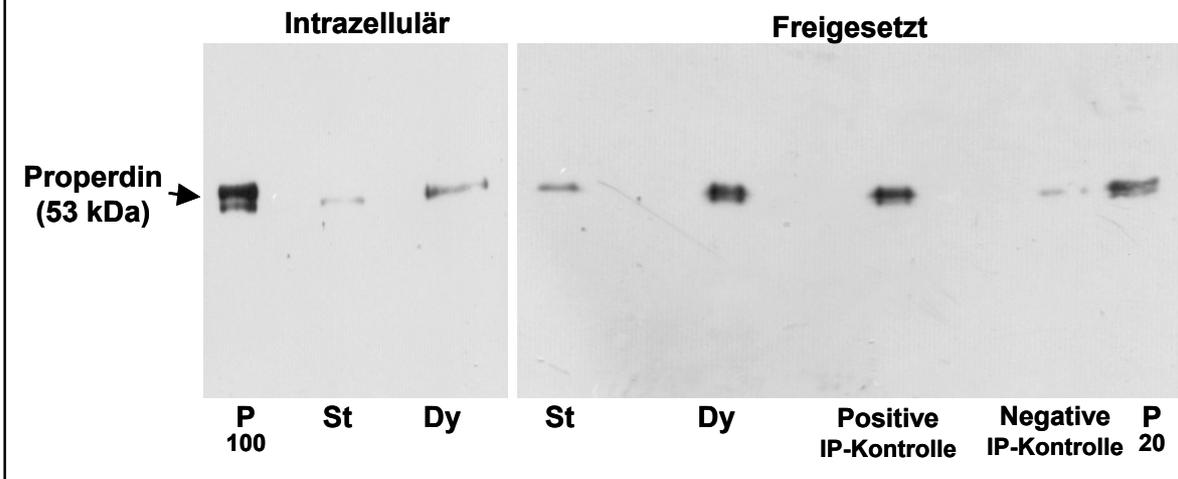


Abb. 3-18 Induktion und Freisetzung von Properdin in humanen Endothelzellen durch Wandschubspannung.

Die Proteinsynthese von Properdin in unstimulierten (St, statisch) und durch Wandschubspannung (6 dyn/cm²; 24 h) stimulierten (Dy: dynamisch) HUVEC wurde mittels Immunpräzipitation (IP) und Western Blot analysiert. Die Properdin Expression wurde in Zelllysate (Intrazellulär) und Überstand (Freigesetzt) von HUVEC untersucht. Ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Versuchen ist abgebildet. P: Properdin Standard (100 ng oder 20 ng)

3.2.3.2 Expression als Funktion der Wandschubspannung

HUVEC wurden für 24 Stunden unterschiedlich hoher Wandschubspannung (0.6, 1, 2, 3, 6 dyn/cm²; laminare Strömung) ausgesetzt und die Expression von Properdin durch RT-PCR analysiert. Die Induktion von Properdin stieg mit steigender Wandschubspannung und erreichte ein Plateau bei ca. 3 dyn/cm² (Abb. 3-19).

3.2.3.3 Expression als Funktion der Zeit

HUVEC wurden einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² für verschiedene Zeiten (4, 24, 48, 72 h) ausgesetzt. Die Induktion von Properdin (RT-PCR) war erst nach 24 Stunden statistisch signifikant und blieb auch nach längerer Expositionszeit (bis 72 h) nahezu unverändert erhalten (Abb. 3-20).

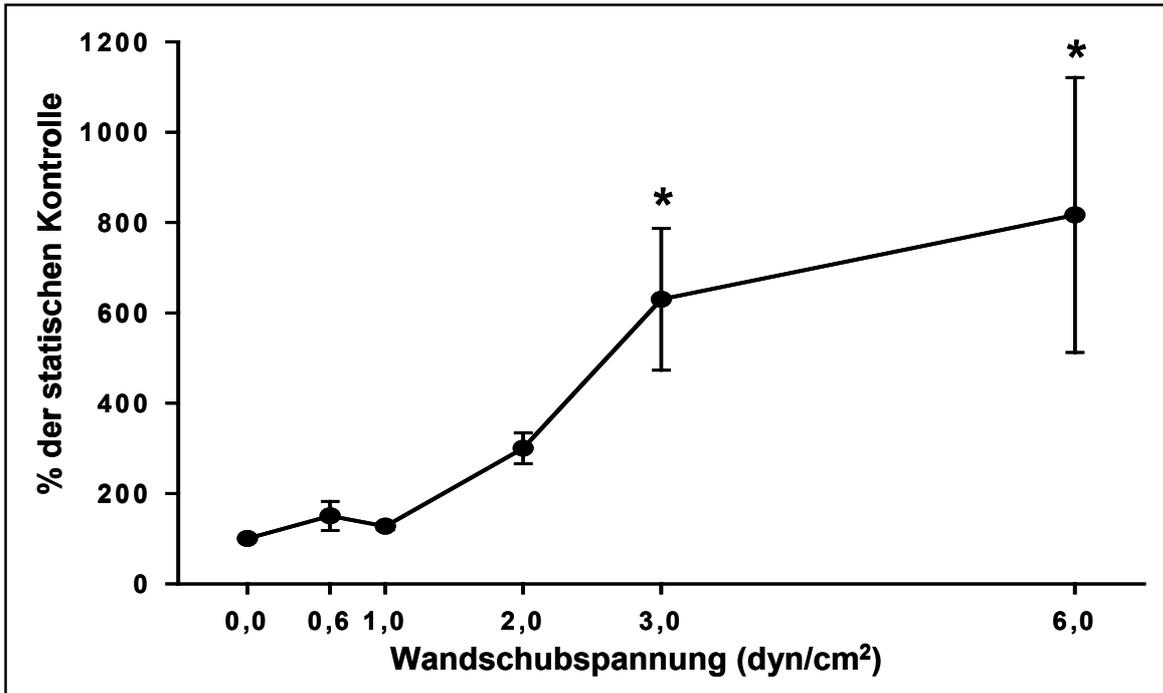


Abb. 3-19 Induktion der Properdin Expression als Funktion der Wandschubspannung.

HUVEC wurden 24 Stunden einer laminaren Strömung der angegebenen Stärke ausgesetzt und die Expression der mRNA für Properdin durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{PROPERDIN}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle (0,0 dyn/cm²). n=3-7; * p<0.05 vs. Stat. Ktrl.

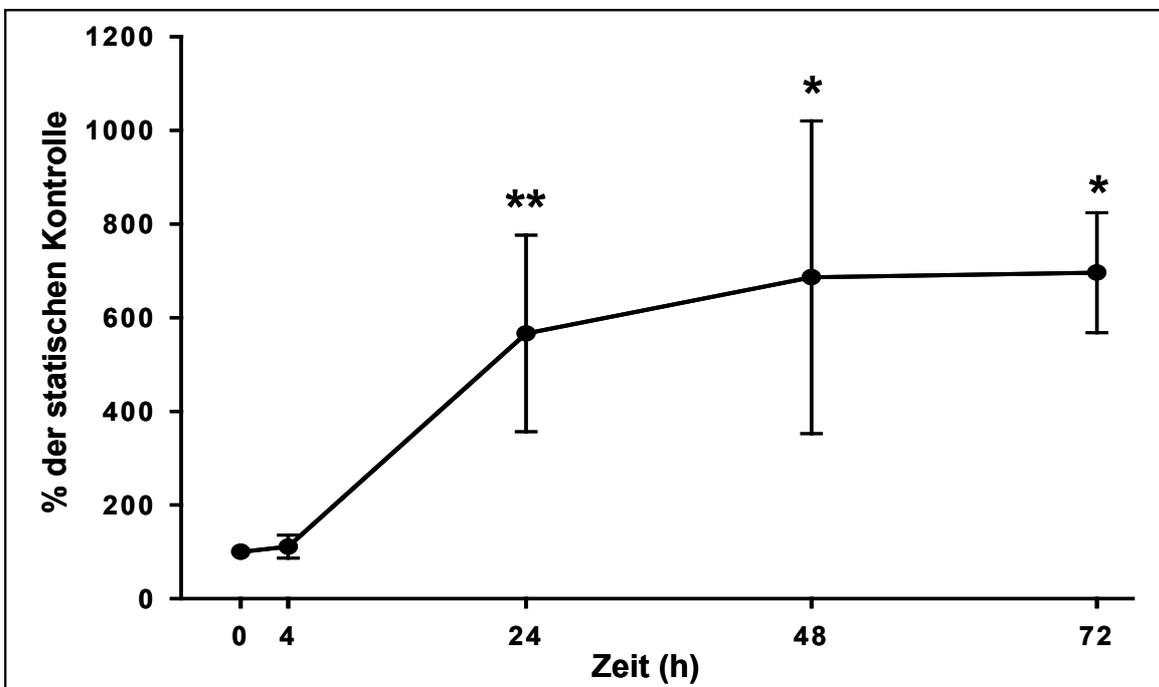


Abb. 3-20 Zeitgang der Properdin Induktion durch Wandschubspannung.

HUVEC wurden für verschiedene Zeiten einer laminaren Strömung ausgesetzt (6 dyn/cm²) und die mRNA Expression für Properdin wurde durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte±STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{PROPERDIN}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle (0 h). n=3-5; ** p<0.01, * p<0.05 vs. Stat. Ktrl.

3.2.3.4 Expression nach Strömungsstillstand

HUVEC wurden durch Wandschubspannung stimuliert (laminare Strömung; 6 dyn/cm²; 24 h) und anschließend für verschiedene Zeiten (1, 4, 24 h) unter statischen Bedingungen weiter kultiviert. Die RT-PCR Analyse zeigte, dass die wandschubspannungsabhängige Induktion von Properdin schon nach 4-24 Stunden Strömungsstillstand völlig reversibel war (Abb. 3-21).

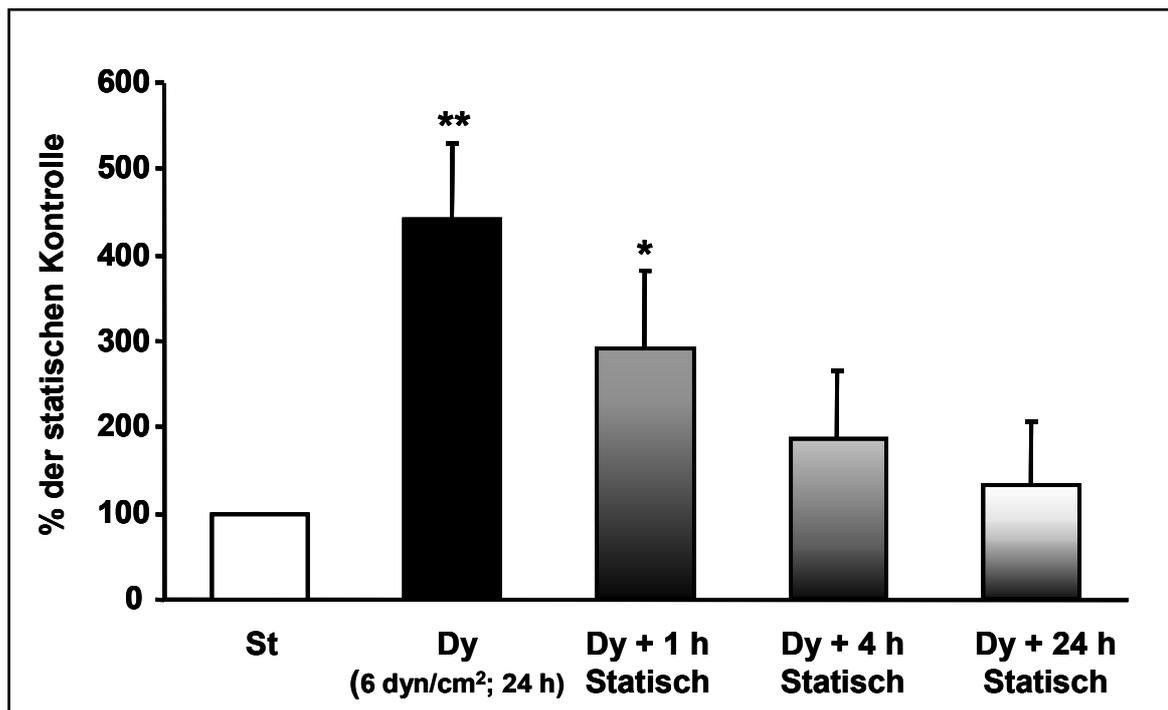


Abb. 3-21 Reversibilität der wandschubspannungsabhängigen Induktion von Properdin nach Wiederherstellung von statischen Kulturbedingungen.

HUVEC wurden ohne Strömung (St) oder unter Wandschubspannung (Dy: 6 dyn/cm², 24 h) kultiviert. Einige Zellkulturen wurden nach dieser Strömungsexposition unter statischen Bedingungen für 1 h, 4 h, oder 24 h weiter kultiviert. Die Expression der mRNA für Properdin wurde durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte \pm STD des Quotienten $\text{IntOD}_{\text{PROPERDIN}}/\text{IntOD}_{\text{GAPDH}}$ als % der statischen Kontrolle. n=3-6; **p<0.01 und *p<0.05 vs. Stat. Ktrl.

3.2.4 Expression von TSP-1, METH-1 und Properdin nach Stimulation durch laminare oder turbulente Strömung

HUVEC wurden für 24 Stunden einer laminaren oder turbulenten Strömung derselben mittleren Wandschubspannung (6 dyn/cm²) ausgesetzt und die

Expression von TSP-1, METH-1 und Properdin durch RT-PCR analysiert (Abb.3-22). Die durch laminare Strömung erzeugte TSP-1-Hemmung oder METH-1- und Properdin-Induktion waren auch bei turbulenter Strömungsbedingung zu verzeichnen. Das Ausmaß der Inhibition von TSP-1 war bei laminarer und turbulenter Strömung vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurde METH-1 bei laminarer Strömung stärker induziert während die höchste Expression von Properdin unter turbulenter Strömung erreicht wurde.

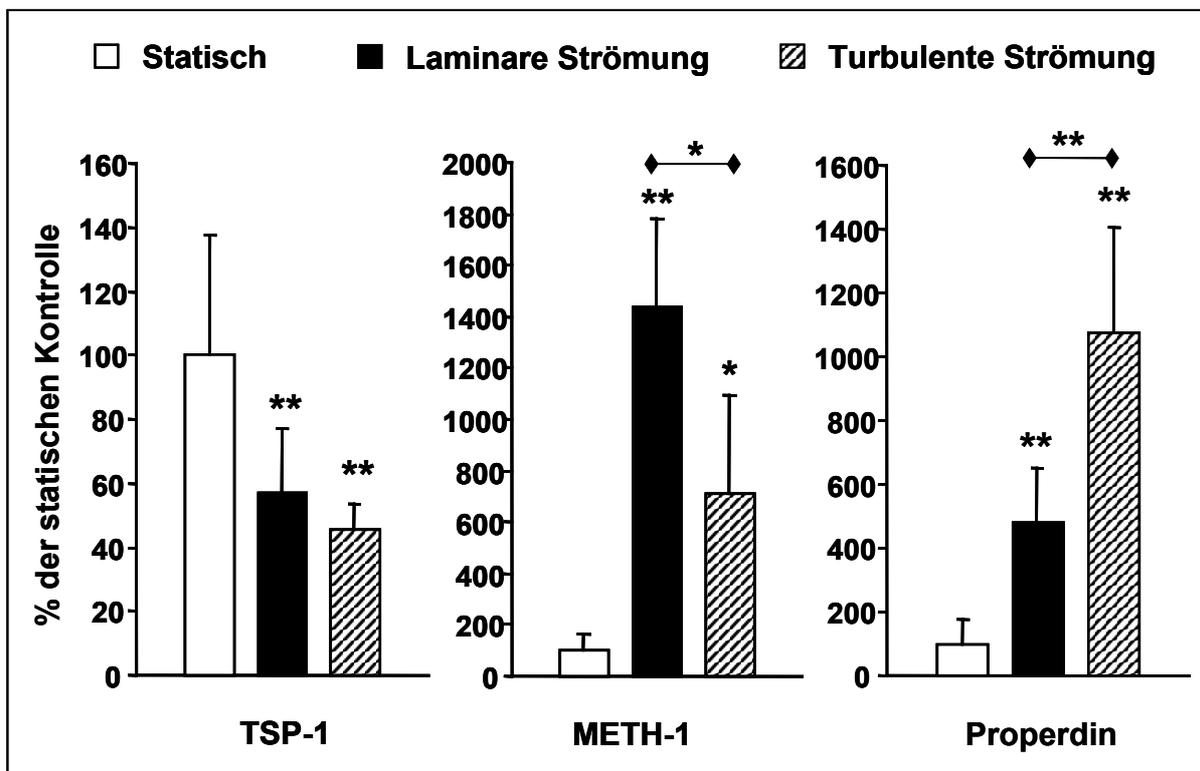


Abb. 3-22 Unterschiedliche Modulation von TSP-1, METH-1 und Properdin nach Einwirkung laminarer oder turbulenter Strömung.

HUVEC wurden laminarer und turbulenter Strömung derselben mittleren Wandschubspannung (6 dyn/cm², 24 h) ausgesetzt. Die Expression von TSP-1, METH-1 und Properdin wurde durch RT-PCR untersucht. Mittelwerte \pm STD; n=4-6; **p<0.01 vs. Static; *p<0.05

3.3 Prazosin-Behandlung als *in vivo* Modell für die Untersuchung wandschubspannungsinduzierter Angiogenese

Das Prazosin-Modell wurde nach der Beschreibung von Hudlicka (1992) in Mäusen etabliert. Acht Wochen alte, männliche Mäuse wurden für 3-14 Tage mit

50 mg/l Prazosin im Trinkwasser gefüttert. Der M. extensor digitorum longus wurde histologisch untersucht und die Kapillaren mittels Nachweis der unspezifischen alkalischen Phosphatase-Reaktion gefärbt (Abb. 3-23). Der Kapillar/Faser Quotient (K/F) war schon nach drei Tagen Prazosin-Behandlung erhöht und erreichte nach vier Tagen das Maximum. Bei verlängerter Behandlung (8-14 Tage) kehrte das K/F auf einen niedrigeren Wert zurück, blieb jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu dem K/F von unbehandelten Tieren.

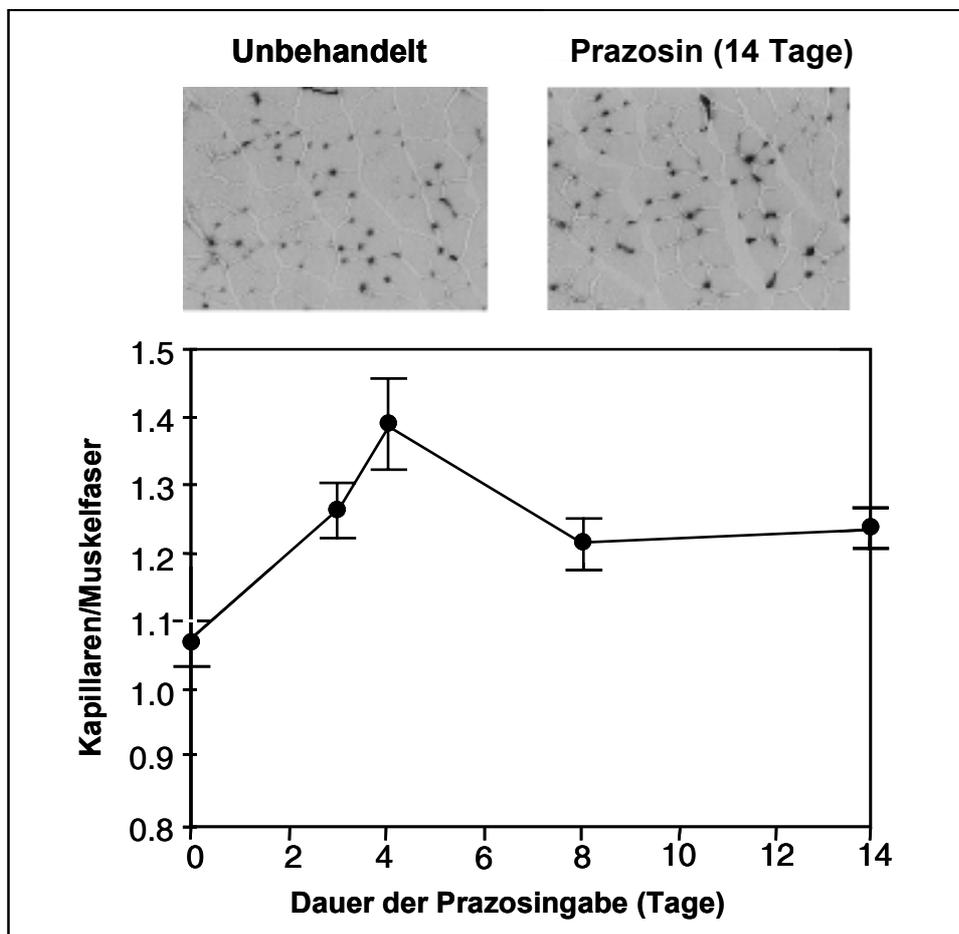


Abb. 3-23 Erhöhung des Kapillar-Faser-Quotienten (Angiogenese) durch Prazosinbehandlung.

Oben: Repräsentative histochemische Untersuchung (Alkalische Phosphatase-Färbung) des M. extensor digitorum longus in acht Wochen alten, männlichen Mäusen nach 14-tägiger Prazosinbehandlung (50 mg/l im Trinkwasser ad libitum). *Unten:* Auswertung des Kapillar-Faser-Quotienten (K/F) nach 3, 4, 8 und 14 Tagen Prazosin Behandlung. Mittelwerte \pm STD, n=5. Die Erhöhung des K/F nach Prazosin Zugabe ist gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt statistisch signifikant ($p < 0.05$).

3.3.1 Expression der RNA von TSP-1, CD36 und METH-1 im Skelettmuskel von Mäusen nach Prazosin-Behandlung

Gesamt RNA von Skelettmuskel (Tibialis anterioris und Extensor digitorum longus) unbehandelter und Prazosin-gefütterter (50 mg/l; drei Tage) Mäuse wurde für die Hybridisierung von Angiogenese-spezifischen Gen-Arrays eingesetzt (Abb. 3-24). Die Auswertung der Ergebnisse dieser Analyse zeigte eine Induktion von TSP-1 und METH-1 nach Prazosin-Behandlung während CD36 in unbehandelten Tieren höher exprimiert wurde.

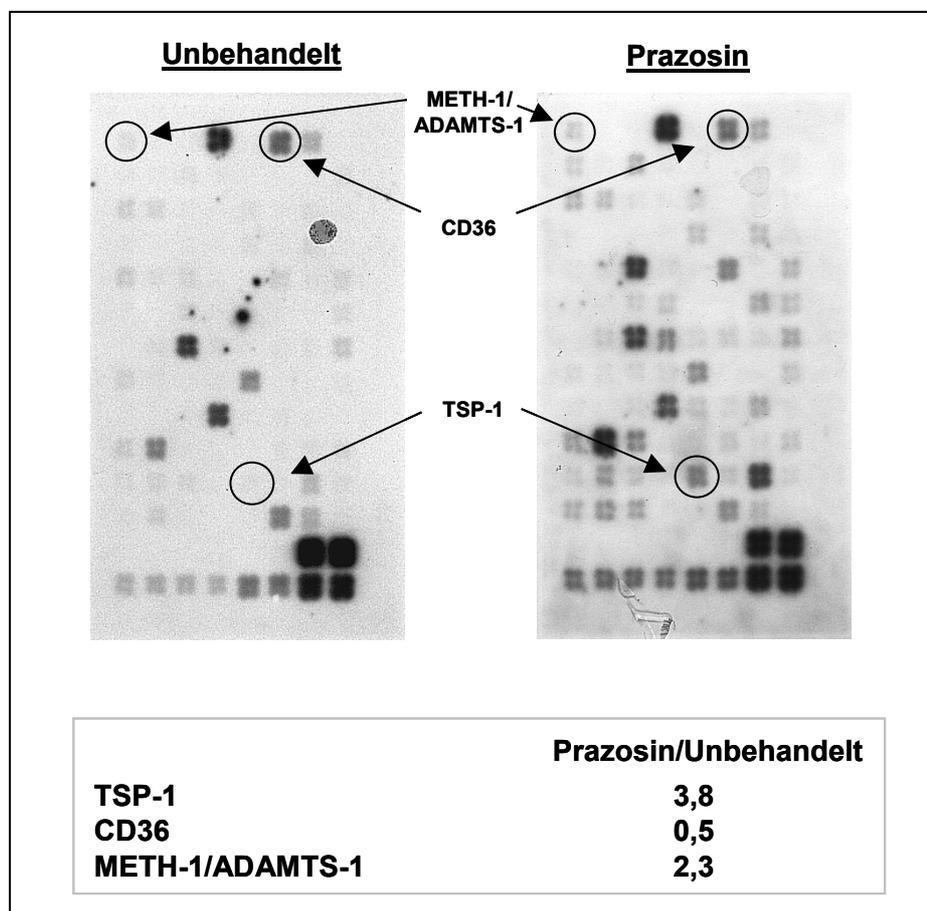


Abb. 3-24 Veränderung der RNA-Expression von TSP-1, CD36 und METH-1/ADAMTS-1 im Skelettmuskel von Mäusen nach Prazosin-Behandlung.

Oben: Repräsentative Gen-Array-Analyse angiogeneserelevanter Gene im Skelettmuskel (Tibialis anterioris und Extensor digitorum longus) unbehandelter und Prazosin-gefütterter (50 mg/l; drei Tage) Mäuse. Die Position von TSP-1, CD36 und METH-1/ADAMTS-1 ist hervorgehoben. *Unten:* Auswertung der Gen-Array-Analyse (3 verschiedene Arrays) für TSP-1, CD36 und METH-1/ADAMTS-1. Die Expression der Gene wurde zu GAPDH normalisiert und die Ergebnisse als Quotient zwischen den Werten für Prazosin-behandelte und -unbehandelte Mäuse dargestellt.

3.3.2 TSP-1 Protein Expression in der Endothelzellfraktion von Skelettmuskel nach Prazosin-Behandlung

Für die Untersuchung der Proteinexpression von TSP-1 in Prazosin-gefütterten Mäusen (50 mg/l; 4 Tage) wurden Gesamt-Muskelhomogenate oder die daraus gewonnenen Endothelzellfraktionen durch Immunpräzipitation und/oder Western Blot analysiert (Abb. 3-25).

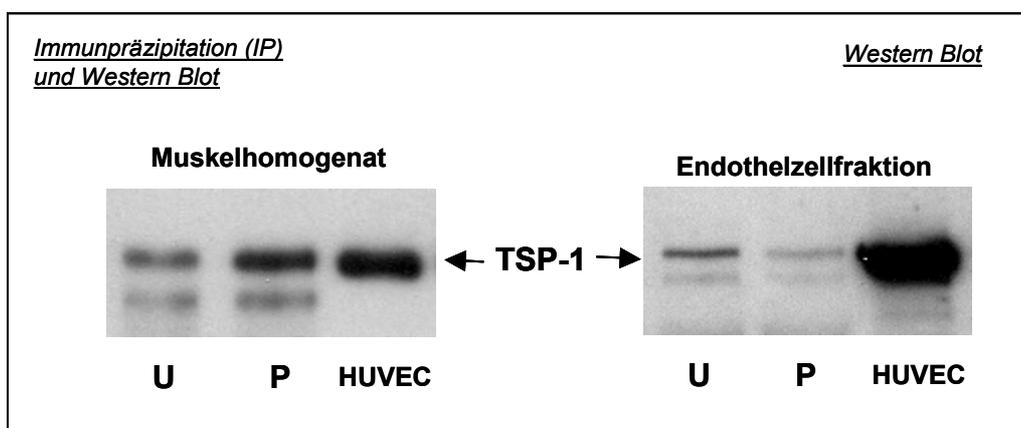


Abb. 3-25 TSP-1 Expression in Muskelhomogenat und Endothelzellfraktion nach Prazosinbehandlung

Repräsentative Western Blot Analyse von TSP-1 in Muskelhomogenat (IP von 2 mg Protein) und Endothelzellfraktion (50 µg Protein) von unbehandelten (U) oder mit Prazosin (P) gefütterten (50 mg/l; 4 Tage) Mäusen. HUVEC (20 µg Proteine) wurden als positive Kontrolle aufgetragen.

Die Expression von TSP-1 wurde durch Prazosin-Behandlung im Muskelhomogenat und in der Endothelzellfraktion gegensätzlich moduliert. Nach 4 Tagen Fütterung wurde TSP-1 im Muskelhomogenat induziert und in der Endothelzellfraktion supprimiert.