

Aus dem Institut für Physiologie
der Freien Universität Berlin

Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Axel R. Pries

Abteilung für Vegetative Physiologie

Abteilungsleiter: Professor Dr. Axel R. Pries

Genexpression von Endothelzellen unter Wandschubspannung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

des Fachbereiches Humanmedizin

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von : Clemens Baumann

aus : München

Referent : Professor Dr. Axel R. Pries

Koreferent : Priv.-Doz. Dr. St.-M. Herrmann

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 13.September 2002

Zusammenfassung

Angiogenese und vaskuläres Remodeling sind nur unzureichend verstanden. Gesichert ist jedoch, daß die auf die Gefäßendothelzellen wirkende Blutströmung Morphologie, Neogenese und Regression von Gefäßen entscheidend mitbestimmt. Um dieser Angioadaptation zugrunde liegende Mechanismen zu identifizieren, war es das Ziel der vorliegenden Untersuchung, endotheliale Gene mit strömungsabhängiger Expression zu finden.

Hierzu wurden Endothelzellen aus Nabelschnurvenen in einem Kegel-Platte-System 24 Stunden einer nicht-laminaren Strömung von $5,4 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt. Die Genexpression wurde mittels Differential Display RT-PCR analysiert, die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte durch semiquantitative RT-PCR und northern blot.

Von 33 differentiell exprimierten mRNA-Fragmenten konnten 16 reamplifiziert und sequenziert werden. Sechs Sequenzen sind homolog zu den publizierten mRNA-Sequenzen der Gene Angiopoietin-2, Decidual proteine induced by progesterone, METH-1, gas-3/PMP-22 und h-Calpactin-1/p11. Durch Wandschubspannung wurde die Expression der mRNAs für Angiopoietin-2 inhibiert, die Expression der mRNAs für Decidual proteine induced by progesterone, METH-1, gas-3/PMP-22 und h-Calpactin-1/p11 wurde dagegen induziert.

Die Produkte der aufgezählten mRNAs haben bekannterweise antiangiogene, adhäsive, proteolytische und zellregulatorische sowie zahlreiche weitere funktionelle Eigenschaften. Obgleich die Beteiligung einiger dieser Substanzen bei der Angioadaptation bereits vermutet wurde, erfolgt in der vorliegenden Arbeit der erstmalige Nachweis der Aktivierung bzw. Deaktivierung ihrer Gene durch Strömung.

Die Resultate stellen eine wichtige Innovation für das Verständnis verschiedener hämodynamischer Situationen (z.B. Wundheilung, Stenose und Shuntbildung) dar und legen neue Prinzipien bei der physiologischen und pathophysiologischen vaskulären Adaptation nahe.

Zusammenfassung	3
1. Einleitung	7
1.1. Blutströmung, Endothelzelle und Gefäßadaptation	7
1.1.1. Auf die Endothelzelle wirkende biomechanische Kräfte.....	7
1.1.2. Modelle zur Untersuchung wandschubspannungsabhängiger Effekte	9
1.1.3. Kurzfristige strömungsvermittelte Anpassungsvorgänge.....	10
1.1.4. Langfristige strömungsvermittelte Anpassungsvorgänge	12
1.1.4.1. Remodeling	12
1.1.4.2. Angiogenese und kapilläres Remodeling.....	13
1.1.5. Optimierung realer Gefäßnetzwerke.....	14
1.1.5.1. Murray`s Law.....	15
1.1.5.2. Pressure-Shear Hypothese.....	15
1.2. Häodynamik und Genexpression	16
1.2.1. Mechanotransduktion in Endothelzellen	16
1.2.2. Mechanosensitive Genexpression in Endothelzellen.....	19
1.3. Strömungsinduzierte Gene	22
1.4. Fragestellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	27
2.1.2. Geräte.....	29
2.1.3. Kits	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Isolierung und Kultivierung von HUVEC.....	31
2.2.2. Stimulation der Endothelzellen durch Wandschubspannung	34
2.2.3. Zellernte	42

2.2.4. RNA-Isolierung.....	42
2.2.5. Differential Display RT-PCR	43
2.2.5.1. Reverse Transkription (RT).....	44
2.2.5.2. PCR.....	44
2.2.6. Isolierung und Reamplifikation differentiell exprimierter Banden	47
2.2.7. Sequenzierung der Amplifikationsprodukte.....	49
2.2.8. Semiquantitative RT-PCR	52
2.2.9. Northern blot	54
2.2.9.1. RNA-Sonden	55
2.2.9.2. Auftrennung, Übertragung und Hybridisierung von RNA.....	56
2.2.9.3. Nachweis der Sonden	56
2.2.10. Statistische Auswertung.....	59
3. Ergebnisse	60
3.1. Reaktion von Endothelzellkulturen auf Wandschubspannung	60
3.2. Nach Strömungsexposition differentiell exprimierte mRNA in Endothelzellen	62
3.3. Reamplifikation differentiell exprimierter mRNA-Fragmente.....	67
3.4. Sequenzanalysen differentiell exprimierter mRNA-Fragmente	69
3.5. Homologien der mRNA-Fragmente zu publizierten Sequenzen	78
3.6. Verifizierung der Ergebnisse durch semiquantitative RT-PCR.....	87
3.7. Verifizierung der Ergebnisse durch northern blot	94
4. Diskussion.....	96
4.1. Simulation vaskulärer Flußbedingungen.....	96
4.2. Analyse differentieller Genexpression durch Differential Display RT-PCR	98
4.3. Strömungsregulierte Gene	100
4.3.1. Angiopoietin-2.....	100
4.3.2. Decidual protein induced by progesterone (DEPP)	107

4.3.3. METH-1.....	107
4.3.4. gas-3/PMP-22	112
4.3.5. p11	117
4.4. Ausblick	120
Abkürzungsverzeichnis	121
Abbildungsverzeichnis	123
Tabellenverzeichnis	124
Literaturverzeichnis	125
Lebenslauf	143
Danksagung	144