

**Identifizierung neuer Schubspannungs-regulierter Gene
mittels „Atlas cDNA Expression Array“: Bedeutung für die
Funktion von Endothelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Carmen Urbich
aus Böblingen

Frankfurt 2001

(DF1)¹

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Entian

Gutachter: Prof. Dr. Starzinski-Powitz und Prof. Dr. Zeiher

Datum der Disputation: 22.03.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1998 bis November 2000 in der Abteilung Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik IV an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt und von Prof. Dr. A. M. Zeiher und PD Dr. S. Dimmeler betreut. Herrn Professor Zeiher danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, viele produktive Ideen und Ratschläge und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Stefanie Dimmeler. Ihr Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit hat mir sehr geholfen und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit und ihre persönlichen Ratschläge im Laufe meines Studiums bedanken.

Herrn Prof. R. Busse und Herrn Dr. R. Popp danke ich für die Bereitstellung der Shear Stress-Kammern.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und ihren Einsatz möchte ich mich bei Iris Henkel, Melanie Näher und Dr. Michael Fritzenwanger bedanken. Susanne Ficus danke ich für die Durchführung der Klonierungen. Mein großer Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. Mariuca Vasa, Christiane Mildner-Rihm, Elisabeth Dernbach und Agnes Reißner für ihre Unterstützung und Spaß bei der Arbeit, sowie Dr. Judith Haendeler und Jörg Hoffmann für ihre Hilfsbereitschaft und vielen Ratschläge, Barbara Lafferton, Rebeca Salguero-Palacios und Meike Stahmer für die nette Zusammenarbeit, und Dr. Corinna Hermann und Dr. Lothar Rössig für die persönliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an meine Eltern, die mich im Laufe dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Arbeiten publiziert bzw. zur Publikation eingereicht:

Urbich C, Fritzenwanger M, Zeiher AM and Dimmeler S (2000)

Laminar shear stress upregulates the complement-inhibitory protein clusterin: a novel potent defense mechanism against complement-induced endothelial cell activation.

Circulation 101(4): 352-355

Urbich C, Walter DH, Zeiher AM and Dimmeler S (2000)

Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis.

Circ Res 87(8): 683-689

Hermann C, Assmus B, **Urbich C**, Zeiher AM and Dimmeler S (2000)

Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(2): 402-409

Rössig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, **Urbich C**, Zeiher AM and Dimmeler S (2000)

Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis.

J Biol Chem 275(33): 25502-25507

Dimmeler S, Rössig L, Jadidi AS, **Urbich C** and Zeiher AM (2000)

Akt phosphorylates and inactivates the cell cycle inhibitor p21^{Waf1/Cip1} and promotes endothelial cell proliferation (eingereicht).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Atherosklerose	1
1.1.1. Aufbau und Funktion der Gefäßwand	1
1.1.2. Definition der Atherosklerose	1
1.1.3. Pathogenese der Atherosklerose	2
1.1.4. Aktivierung des Endothels.....	3
1.1.5. Endothel-aktivierende Faktoren	5
1.1.5.1. Das Komplementsystem.....	5
1.1.5.1.1. Aktivierung des Komplementsystems	7
1.1.5.1.2. Inhibitoren des Komplementsystems.....	7
1.1.5.2. Das CD40/CD40L-System.....	8
1.1.5.2.1. TRAFs (“tumor necrosis factor receptor-associated factors”)....	9
1.1.5.2.2. TRAF-Signaltransduktion.....	10
1.2. Shear Stress	12
1.2.1. Definition der laminaren Schubspannung (Shear Stress)	12
1.2.2. Einfluß von Shear Stress auf das Endothel.....	13
1.2.2.1. Der antithrombotische Effekt von Shear Stress.....	14
1.2.2.2. Der antiinflammatorische Effekt von Shear Stress	15
1.2.2.3. Der antiapoptotische Effekt von Shear Stress	15
1.2.2.4. Der antiproliferative Effekt von Shear Stress.....	15
1.2.3. Signaltransduktion von Shear Stress	16
1.2.3.1. Stickstoffmonoxid (NO).....	18
1.2.4. Mechanotransduktion	19
1.2.4.1. Rolle der Integrine in der Mechanotransduktion von Shear Stress.....	20
1.3. Fragestellung	23

2. Material und Methoden	24
2.1. Kultivieren von Endothelzellen	24
2.2. Zellinkubation	25
2.2.1. Inkubation mit chemischen Substanzen	25
2.2.2. Shear Stress-Exposition	25
2.3. Untersuchung der Genexpression	26
2.3.1. Untersuchung der RNA-Expression	26
2.3.1.1. Northern Blot-Analyse	26
2.3.1.1.1. RNA-Präparation	26
2.3.1.1.2. Denaturierende Gelelektrophorese und Northern Blot	27
2.3.1.1.3. Radioaktive Markierung von DNA	27
2.3.1.1.4. Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren	28
2.3.1.2. "RNase Protektion Assay" (RPA)	28
2.3.1.3. "Atlas cDNA Expression Array"	29
2.3.1.4. "Nuclear run on"-Experimente	30
2.3.1.4.1. Isolierung der Kerne	30
2.3.1.4.2. <i>In vitro</i> Transkription	31
2.3.2. Untersuchung der Protein Expression	31
2.3.2.1. Protein-Präparation zytoplasmatischer Proteine	31
2.3.2.2. Protein-Präparation phosphorylierter Proteine	32
2.3.2.3. Extraktion von Kern- und Zytoplasma-Proteinen	32
2.3.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.3.2.5. Immunpräzipitation	33
2.3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.3.2.7. Transfer von Proteinen (Western Blot)	33
2.3.2.7.1. „Semi-Dry-Blot“	34
2.3.2.7.2. „Wet-Blot“	34
2.3.2.8. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	34
2.3.3. Untersuchung der Zelloberflächen-Expression mittels FACS-Analyse	36
2.4. Immunhistochemische Analyse	36
2.5. Immunfärbung von Zellen	36
2.6. Morphologischer Nachweis apoptotischer Zellen nach Kernfärbung	37

2.7. Transfektion	37
2.7.1. Transfektion von Oligonukleotiden	37
2.7.2. Transfektion von Plasmid-DNA	38
2.7.2.1. Klonierung von DNA-Molekülen	38
2.8. "Tissue Factor"-Aktivitätsnachweis ("Clotting assay")	39
2.9. Interleukin-8-ELISA.....	39
2.10. Untersuchung der Zelladhäsion	39
2.11. Thrombozyten-Isolierung und -Aktivierung	40
2.12. Statistik.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen:	
"Atlas cDNA Expression Array"	41
3.2. Shear Stress erhöht die Expression des Komplement-Inhibitors	
Clusterin.....	46
3.2.1. Shear Stress hemmt die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen.....	47
3.2.2. Rolle des Komplement-Inhibitors Clusterin	49
3.3. Shear Stress erhöht die Expression des Adapterproteins TRAF3	52
3.3.1. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte MCP-1 Expression	54
3.3.2. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte "Tissue Factor" Expression	55
3.3.3. Shear Stress reduziert die Thrombozyten-induzierte MCP-1 Expression	56
3.3.4. TRAF3 hemmt die CD40-Signalkaskade	57
3.3.5. Bedeutung der Shear Stress-induzierten TRAF3 Expression in der Hemmung der CD40-Signalkaskade.....	58
3.3.6. TRAF3 Expression <i>in vivo</i>	60
3.3.7. Mechanismus des inhibitorischen Effektes von TRAF3 auf die CD40-Signalkaskade	61
3.4. Shear Stress erhöht die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$...	65
3.4.1. Mechanismus der Shear Stress-induzierten Integrin Expression	71
3.4.1.1. Rolle von NO in der Shear Stress-induzierten Integrin Expression	71

3.4.1.2. Rolle von Wachstumsfaktoren in der Shear Stress-induzierten Integrin-Expression	72
3.4.2. Shear Stress induziert Endothelzell-Adhäsion	73
3.4.3. Der antiapoptotische Effekt von Shear Stress ist Integrin-abhängig	76
4. Diskussion	78
4.1. Die Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen	78
4.2. Bedeutung der Shear Stress-induzierten Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin.....	80
4.2.1. Shear Stress stimuliert die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin.....	80
4.2.2. Die Regulation von Clusterin	81
4.2.3. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Clusterin Expression	82
4.3. Bedeutung der Shear Stress-induzierten Expression des Adapterproteins TRAF3	84
4.3.1. Shear Stress stimuliert die Expression des Adapterproteins TRAF3	84
4.3.2. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Expression des Adapterproteins TRAF3	85
4.4. Die Shear Stress-induzierte Expression der Fibronektin-Rezeptor- Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$	89
4.4.1. Die Regulation des Fibronektin-Rezeptors $\alpha 5 \beta 1$	89
4.4.2. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Fibronektin-Rezeptor Expression	91
4.5. Ausblick	94
5. Zusammenfassung	96
6. Literatur	98

Abkürzungen

AcDEVD-CHO	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde
Ang II	Angiotensin II
AP-1	"Activator protein-1"
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	"Cluster of differentiation"
CD40L	CD40 Ligand
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4,6 Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	" Extracellular Signal-Regulated Kinase"
FACS	"Fluorescence-Activated Cell Sorting"
FAK	"Focal adhesion kinase"
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
Grb2	"Growth factor receptor-bound protein 2"
HUVEC	"Human Umbilical Venous Endothelial Cell"
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JNK	"c-Jun N-Terminal-Kinase"
LDL	"Low-Density-Lipoprotein"
LNMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginine
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	"Monocyte chemoattractant protein-1"
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MP	Milchpulver
n	Anzahl der Versuche
n.s.	nicht signifikant
NFκB	"Nuclear factor kappa B"
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDTC	Pyrrolidinedithiocarbamate
RGD	Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Prol-Peptid
RGE	Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Prol-Peptid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SNP	Sodium Nitroprussid
SOD	Superoxid-Dismutase
SOS	"Son of Sevenless"
TF	"Tissue Factor"
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TRAF	"TNF receptor-associated factor"
WHO	World Health Organisation
wt	wild-typ

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

1.1.1. Aufbau und Funktion der Gefäßwand

Blutgefäße sind aus drei Schichten aufgebaut, der Intima, Media und Adventitia. Die Intima besteht aus einer einzelligen Schicht aus Endothelzellen, die von Kollagen und einer Membran umgeben ist. Diese Endothelzellschicht bildet die Barriere zwischen dem fließenden Blut und der Media, die aus spiralförmig angeordneten glatten Gefäßmuskelzellen aufgebaut ist. Die glatten Muskelzellen beeinflussen den Gefäßradius über Relaxation und Konstriktion. Die Adventitia setzt sich aus Kollagenfasern und glatten Muskelzellen zusammen und stellt den Kontakt zur Umgebung des Gefäßes dar (Abb. 1.1.).

Aufgrund ihrer Lokalisation zwischen der luminalen Gefäßinnenseite und den äußeren Schichten der Gefäßwand erfüllen Endothelzellen wichtige Funktionen, wie den Transport bioaktiver Moleküle und die Regulation der Adhäsion und Transmigration von Blutzellen (1). Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus. Endothelzellen setzen Mediatoren frei, die über die glatten Muskelzellen entweder Vasodilatation (z.B. Stickstoffmonoxid (NO) oder Prostacyclin) oder Vasokonstriktion (z.B. Endothelin oder "Platelet-Activating Factor") bewirken und somit den Blutfluß und Blutdruck beeinflussen (1).

1.1.2. Definition der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird von der WHO als eine variable Intimaveränderung arterieller Blutgefäße, bestehend aus fokaler Ansammlung von Lipiden, Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen definiert, die mit Veränderungen der Media einhergeht. Diese Gefäßwandveränderungen führen zu Lumeneinengung, Verhärtung, Elastizitätsverlust und Thrombosierung des Gefäßlumens. Die Folgen der Atherosklerose sind arterielle Durchblutungsstörungen, die zu Myokard- und Zerebralinfarkt führen können und die Haupttodesursache (ca. 50%) in den Industrieländern darstellen. Risikofaktoren, wie Hyperlipoproteinämie,

Rauchen, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperurikämie begünstigen die Pathogenese der Atherosklerose (2-5).

1.1.3. Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose wird inzwischen nicht nur als degenerativer Prozeß, sondern als inflammatorische Krankheit angesehen (5). Die "response-to-injury"-Hypothese besagt, daß die Atherosklerose durch eine Verletzung des Endothels initiiert wird (6). Dabei führt die Aktivierung von Endothelzellen durch verschiedene Faktoren zur Einschränkung der Funktion des Endothels ("Endotheldysfunktion") (7). Diese endotheliale Aktivierung ist charakterisiert durch frühe Läsionen, die durch veränderte Adhäsivität und Permeabilität des Endothels zu Thrombozyten-Anlagerung führen. Außerdem kommt es zur Proliferation der glatten Muskelzellen (Neointima-Bildung), die zusätzlich eine erhöhte Synthese von extrazellulärer Matrix, überwiegend bestehend aus Kollagen, bewirkt. Die Thrombozyten und die aktivierten Endothelzellen setzen chemotaktische Substanzen frei, die die Einwanderung von Entzündungszellen (Makrophagen und T-Lymphozyten) nach sich ziehen. "Low Density Lipoproteine" (LDL) können das geschädigte Endothel passieren und als oxidiertes LDL (oxLDL) von Makrophagen aufgenommen werden, die sich dadurch zu Schaumzellen verwandeln. Die Infiltration von Entzündungszellen und Lipiden führt zur Bildung der atherosklerotischen Plaques (Atherome). Zu den Komplikationen der Atherosklerose gehören Plaque-Destabilisierung und -Ruptur oder -Erosion, die zu Thrombus-Bildung, Gefäßverschuß und letztendlich Infarkt führen können (5,8). Die verschiedenen Stadien der Pathogenese der Atherosklerose sind in Abb. 1.1. schematisch zusammengefaßt.

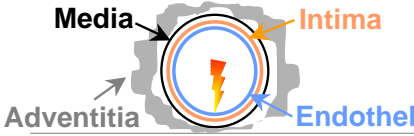





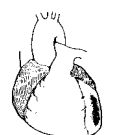
Schema	Stadien der Atherosklerose
	<p>Verletzung des Endothels führt zu Endothelzellapoptose und Endotheldysfunktion</p>
	<p>Proliferation der glatten Muskelzellen führt zur Bildung der Neointima</p>
	<p>Entstehung der Plaques durch infiltrierende Immunzellen und Einlagerung von Lipiden</p>
	<p>Destabilisierung der Plaques durch Apoptose von glatten Muskelzellen und Bildung von Schaumzellen</p>
	<p>Plaque-Ruptur/-Erosion durch Endothelzellapoptose</p>
	<p>Lumen Thrombose</p>
	<p>Infarkt</p>

Abbildung 1.1. Pathogenese der Atherosklerose
(modifiziert nach Rössig et al., 2001; (9))

1.1.4. Aktivierung des Endothels

Die Aktivierung von Endothelzellen spielt eine entscheidende Rolle in der Initiation der Atherosklerose. Dabei handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, das z.B. durch das Komplementsystem oder das CD40-System ausgelöst wird (Kap. 1.1.5.1. und 1.1.5.2.) (5,10,11). Die Funktionalität des Endothels wird dabei beeinträchtigt, da die Aktivierung der Endothelzellen zur Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. "intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1), "vascular cell adhesion molecule-1" (VCAM-1)), Zytokinen (z.B. Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)), Wachstumsfaktoren und

chemotaktischen Proteinen (z.B. "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1)) führt, die die Permeabilität, Adhäsivität und koagulatorische Aktivität des Endothels erhöhen (Abb. 1.2.). Die Synthese proinflammatorischer Moleküle (z.B. TNF α , Interleukine, MCP-1 und "Tissue Factor" (TF)) in aktivierten vaskulären Zellen bewirkt über die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Immunzellen ein Fortschreiten der Entzündungsreaktion und somit die Progression der Atherosklerose. Ein wichtiges chemotaktisches Protein in der Entzündungsreaktion des Endothels ist das "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1). Die bedeutende Rolle von MCP-1 in der Atherogenese konnte im Tiermodell gezeigt werden. In MCP-1- oder MCP-1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ist die Cholesterin-induzierte Bildung von atherosklerotischen Läsionen deutlich (12,13). MCP-1 ist ein CC Chemokin, das hauptsächlich über den CC Chemokin Rezeptor-2 (CCR2) wirkt (14). Dieser Rezeptor wird in großen Mengen von Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert. MCP-1 wird nach Stimulation von vaskulären Zellen (Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen) mit verschiedenen proatherosklerotischen Faktoren, wie z.B. Komplement, CD40L oder oxLDL, sezerniert und induziert dadurch die Aktivierung und Migration von Monozyten (15,16). Neben MCP-1, sind die inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) ebenfalls wichtige Entzündungsmediatoren in der Atherogenese (1,17). IL-6 und IL-8, die in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen exprimiert werden, sind mitogene Stimuli für glatte Muskelzellen (18,19). Desweiteren werden Lymphozyten und Makrophagen durch IL-6 aktiviert, während IL-8 chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile wirkt (1,20).

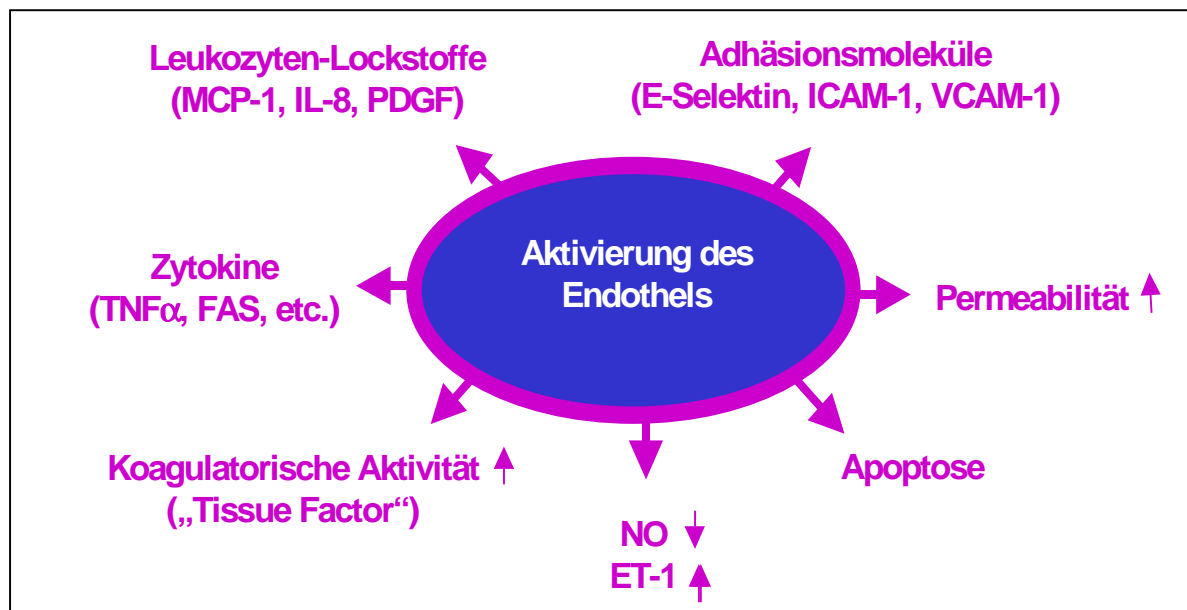


Abbildung 1.2. Aktivierung des Endothels
(modifiziert nach Fichtlscherer und Zeiher, 1999; (21))

(ET-1, Endothelin-1; ICAM-1, "intercellular adhesion molecule-1"; IL-8, Interleukin-8; MCP-1, "monocyte chemoattractant protein-1"; NO, Stickstoffmonoxid; PDGF, "platelet-derived growth factor"; TNF α , Tumor Nekrose Faktor α ; VCAM-1, "vascular cell adhesion molecule-1")

1.1.5. Endothel-aktivierende Faktoren

1.1.5.1. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose, da es die Aktivierung von Endothelzellen induziert (11). Das Komplementsystem ist Teil der humoralen Immunantwort, das die Antikörper-vermittelte Abwehr nach Eindringen von Antigenen in den Organismus verstärkt bzw. ergänzt (lat. complementum = Ergänzung). Das Komplementsystem besteht aus thermolabilen Komplementfaktoren, die im Serum und auf Zelloberflächen vorkommen, sich nacheinander durch proteolytische Spaltung aktivieren und somit eine Komplementkaskade bilden (22,23). Man unterscheidet zwei Wege der Komplementaktivierung. Diese sind die klassische Aktivierung über Antigen-Antikörper-Komplexe und die alternative Aktivierung, die unabhängig von Antikörpern unspezifisch an der Oberfläche von Fremdkörpern aktiviert wird. Beide Wege führen über die Spaltung des Komplementfaktors C3 zur Bildung des Membran-angreifenden Komplexes C5b-9, der an der Zelloberfläche Poren bildet und die Lyse der

Fremdorganismen durch Osmose induziert. Zu den Hauptaufgaben des Komplementsystems gehören neben der Lyse fremder Zellen die Aktivierung immunkompetenter Zellen und die Opsonisierung von Antigen-Antikörper-Komplexen (23). Die Komplementkaskade ist schematisch in Abbildung 1.3. dargestellt.

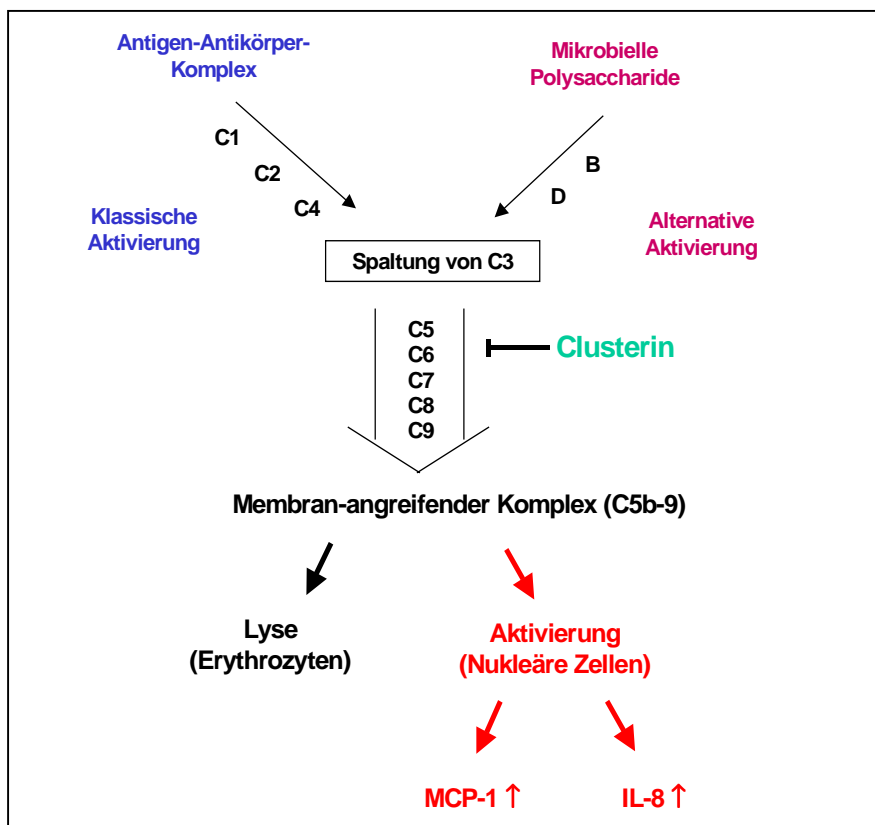


Abbildung 1.3. Die Komplementkaskade

(IL-8, Interleukin-8; MCP-1, "monocyte chemoattractant protein-1")

Die Aktivierung des Komplementsystems ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (11,24). Ein Hinweis hierfür ist die Lokalisation von Komplementkomplexen in atherosklerotischen Läsionen (25). Desweiteren wird die Cholesterol-induzierte Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in Komplement (C6)-defizienten Kaninchen verhindert (26). Im Gegensatz zur Lyse von z.B. Erythrozyten, führt die Inkubation von nukleären Zellen mit subletalen Konzentrationen von C5b-9 zu einer Aktivierung verschiedener zellulärer Prozesse, z.B. zu Entzündungsreaktionen in Endothelzellen (27,28).

Der terminale Komplementkomplex (C5b-9) und Komplementfaktoren (C1q) aktivieren Endothelzellen, indem sie eine inflammatorische Reaktion, d.h. die Synthese von Entzündungsmediatoren, wie z.B. IL-6, IL-8 und MCP-1, in diesen Zellen induzieren (12,27,29,30). Die Freisetzung der proatherosklerotischen Zytokine und Chemokine stimuliert in der frühen Phase der Atherogenese die Adhäsion von Immunzellen an das Endothel. Die Aktivierung der Endothelzellen durch das Komplementsystem führt weiterhin zur Expression von Zelloberflächenproteinen wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, die die endotheliale Transmigration von Leukozyten fördern (31).

1.1.5.1.1. Aktivierung des Komplementsystems

Die Ätiologie der Komplementaktivierung in der Atherogenese ist bislang noch nicht geklärt. Als pathophysiologische Aktivatoren des Komplementsystems im Rahmen der Atherosklerose werden *Chlamydia pneumoniae*-Infektionen, enzymatisch modifiziertes LDL (E-LDL) und das Akut-Phase Protein "C-reaktives Protein" (CRP) diskutiert (24,25,32). Das enzymatisch modifizierte (nicht oxidierte) LDL entsteht durch Degradation von LDL in ein atherogenes, proinflammatorisches Protein, das zur Aktivierung des Komplementsystems und Makrophagen führt (33,34). E-LDL kolokalisiert mit dem terminalen Komplementkomplex C5b-9 in atherosklerotischen Läsionen (25).

Das Akut-Phase-Protein CRP, ein kardiovaskulärer Risikofaktor, aktiviert das Komplementsystem über den klassischen Weg nach Bindung von CRP an den Liganden (32,35). Die Kolokalisation von CRP und aktivierten Komplementkomponenten konnte sowohl im Myokardinfarkt, als auch in humanen atherosklerotischen Läsionen gezeigt werden (32,36,37).

1.1.5.1.2. Inhibitoren des Komplementsystems

Das Komplementsystem wird durch Komplement-Inhibitoren reguliert, um eine Überreaktion der Immunantwort zu verhindern. Dazu gehören u.a. MCP ("membrane cofactor protein"), DAF ("decay-accelerating factor"), CD46, CD59 und Clusterin (38). Endothelzellen schützen sich vor zirkulierenden, aktivierten Komplementfaktoren durch Freisetzung von Komplement-Inhibitoren, wie z.B. Clusterin und CD59 (39,40). CD59

verhindert die Zusammensetzung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9, indem es die Interaktion von C9 an den Komplex C5b-8 inhibiert. Clusterin ist ein heterodimeres Glykoprotein, das an die Komplement-Komponenten C7, C8 und C9 bindet und somit die Bildung des Membran-angreifenden Komplexes C5b-9 verhindert (Abb. 1.3.) (41,42). Clusterin ist ein multifunktionelles Protein, das, neben seiner Eigenschaft als Komplement-Inhibitor, am Transport von Lipoproteinen beteiligt ist, Zellüberleben fördert und zusätzlich eine Chaperone-ähnliche Aktivität besitzt (41,43,44).

1.1.5.2. Das CD40/CD40L-System

Ein wesentlicher Regulator von Immunantworten und Entzündungsreaktionen im Rahmen der Atherosklerose ist das CD40/CD40 Ligand-System (10). Der transmembrane CD40 Rezeptor (CD40), der zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehört, wurde erstmals in B-Lymphozyten beschrieben. Nach Bindung des CD40 Liganden (CD40L oder CD154) auf aktivierten T-Lymphozyten an CD40 auf B-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung der B-Zellen, d.h. zu Proliferation, Antikörper-Produktion und Reifung zu Gedächtnis-Zellen (45). Die Expression des CD40-Systems ist jedoch nicht nur auf Immunzellen beschränkt. Sowohl CD40 als auch CD40L werden in vaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen *in vitro* und in atherosklerotischen Läsionen *in situ* exprimiert (46). Die Expression des CD40L konnte auch in Thrombozyten nachgewiesen werden, die im Inneren der Zellen einen Vorrat an CD40L ansammeln. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin wird der CD40L in kurzer Zeit (ca. 1 min) an die Zelloberfläche transportiert, wo er inflammatorische Prozesse in Zellen des Gefäßsystems, z.B. Expression von IL-8, MCP-1, Adhäsionsmolekülen und "Tissue Factor" in Endothelzellen, induziert (47,48). Die Aktivierung des CD40-Systems in Endothelzellen und glatten Muskelzellen führt ebenfalls zur Synthese von Matrix-Metalloproteinasen, die v.a. Kollagen degradieren und somit Plaque-Instabilität fördern (49). Desweiteren induziert die Inkubation von vaskulären Zellen mit rekombinantem CD40L oder mit Membranpartikeln aktivierter T-Lymphozyten die Synthese von Zytokinen, Chemokinen, Matrix-Metalloproteinasen, TF und Adhäsionsmolekülen, die an der Progression atherosklerotischer Läsionen und Plaque-Destabilisierung beteiligt sind (46,50). *In vivo* Studien haben gezeigt, daß

inhibierende CD40L-Antikörper im Tiermodell (LDL-Rezeptor-Knockout-Mäuse oder ApoE-Knockout-Mäuse) sowohl die Entstehung atherosklerotischer Läsionen als auch das Fortschreiten der Atherosklerose (Plaque-Destabilisierung und Plaque-Ruptur) durch einen veränderten Plaque-Phänotyp, d.h. einen reduzierten Gehalt an Lipiden, T-Lymphozyten und Makrophagen, drastisch reduzieren (51-53). Diese Ergebnisse konnten auch in CD40L/ApoE-Knockout-Mäusen bestätigt werden (54). Weiterhin deuten erhöhte Mengen an CD40L im Blut von Patienten mit instabiler Angina Pectoris darauf hin, daß das CD40-System an der Pathophysiologie akuter Koronarsyndrome beteiligt ist (55). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die Hemmung des CD40-Systems von großem therapeutischen Nutzen bei der Reduktion von Inflammation in der Atherosklerose, Transplantationsabstoßung und weiteren Entzündungsprozessen sein könnte.

1.1.5.2.1. TRAFs ("tumor necrosis factor receptor-associated factors")

Die CD40-Signalkaskade wird durch zytoplasmatische Adapterproteine, TRAFs ("tumor necrosis factor receptor-associated factors"), vermittelt, da die Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (z.B. CD40) keine enzymatische Aktivität in der zytoplasmatischen Domäne besitzen (Abb. 1.4.). Bislang wurden 6 verschiedene TRAFs (TRAF1-6) identifiziert (56,57). Einige Interaktionen der TRAF-Proteine mit den jeweiligen Rezeptoren sind in Tabelle 1.1. zusammengefaßt.

TRAF	Rezeptor
TRAF1	TNFR II; CD30; LMP-1
TRAF2	TNFR II; CD27; CD30; CD40; LMP-1
TRAF3	CD27; CD30; CD40; LMP-1
TRAF4	Lokalisation im Nukleus
TRAF5	CD27; CD30; CD40; LMP-1
TRAF6	CD40; IL-1R

Tabelle 1.1. Interaktionen der TRAF-Proteine mit verschiedenen Rezeptoren

(IL-1R, Interleukin-1 Rezeptor; LMP-1, "latent membrane protein-1"; TNFR, "tumor necrosis factor receptor"; TRAF, "tumor necrosis factor receptor-associated factor")

TRAF1 und TRAF2 assoziieren u.a. mit dem TNFRII (58). TRAF3, auch als CRAF1, CD40bp oder LAP-1 bezeichnet, wird ubiquitär exprimiert und bindet an die zytoplasmatische Domäne des CD40 und des Epstein-Barr Virus-Rezeptor LMP-1 (59-62). TRAF4 ist als einziges TRAF-Protein im Nukleus lokalisiert, wobei die Funktion nicht geklärt ist (63). TRAF5 und TRAF6 wurden in einem "Yeast-Two-Hybrid-Screen" mit der zytoplasmatischen Domäne des CD40 als "bait" gefunden (64,65). Alle TRAF-Proteine besitzen am C-Terminus eine TRAF-Domäne, die wiederum in TRAF-N und TRAF-C-Subdomänen unterteilt wird (58). Die konservierte TRAF-C-Subdomäne vermittelt sowohl Homo- und Heterodimerisierung der TRAFs als auch die Interaktion mit den Rezeptoren (60). Die physiologische Bedeutung der TRAF-Proteine wurde *in vivo* im Knockout-Modell untersucht. TRAF3-defiziente Mäuse erschienen bei der Geburt zunächst normal, entwickelten sich zunehmend schlecht und starben durchschnittlich am Tag 10 an Defekten des Immunsystems (T-Lymphozyten) (66).

1.1.5.2.2. TRAF-Signaltransduktion

Die Rolle der TRAFs für die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in den Zellkern ist sehr komplex und bislang nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, daß TRAFs die Signaltransduktion über die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und I κ B Kinasen (IKK) vermitteln, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 führen. Desweiteren wurden verschiedene Proteine gefunden, die mit den TRAF-Proteinen interagieren. Dazu gehören u.a. TANK ("TRAF family member-associated NF κ B activator") und I-TRAF ("TRAF-interacting protein"), die an TRAF-Proteine binden und möglicherweise an der Aktivierung von NF κ B beteiligt sind (67,68). Die Bindung der TRAF-Proteine an die Rezeptoren und Bildung verschiedener intrazellulärer Komplexe mit assoziierten Proteinen führt zur Aktivierung von Kinasen und schließlich zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren (Abb. 1.4.). Dazu gehört z.B. die TNF α -induzierte Aktivierung der MAPK "c-Jun N-terminal kinase" (JNK) über TRAF2, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B führt (69-72). Der Transkriptionsfaktor NF κ B liegt im Zytoplasma, gebunden an seinen Inhibitor I κ B, als inaktives Heterotrimer vor (73). Nach Phosphorylierung durch I κ B Kinasen wird der Inhibitor I κ B degradiert und das aktive NF κ B kann in den Nukleus translozieren und dort die Transkription spezifischer Gene regulieren. Verschiedene Studien haben gezeigt,

daß die Überexpression von TRAF2, TRAF5 und TRAF6 zur Aktivierung von NFκB führt, während TRAF1, TRAF3 und TRAF4 nicht aktivierend wirken (71,72,74-78). Zusätzlich ist bekannt, daß TRAF3 die CD40- und OX40-induzierte Aktivierung von NFκB inhibiert, wobei der genaue Mechanismus nicht geklärt ist (64,71) (79) (80).

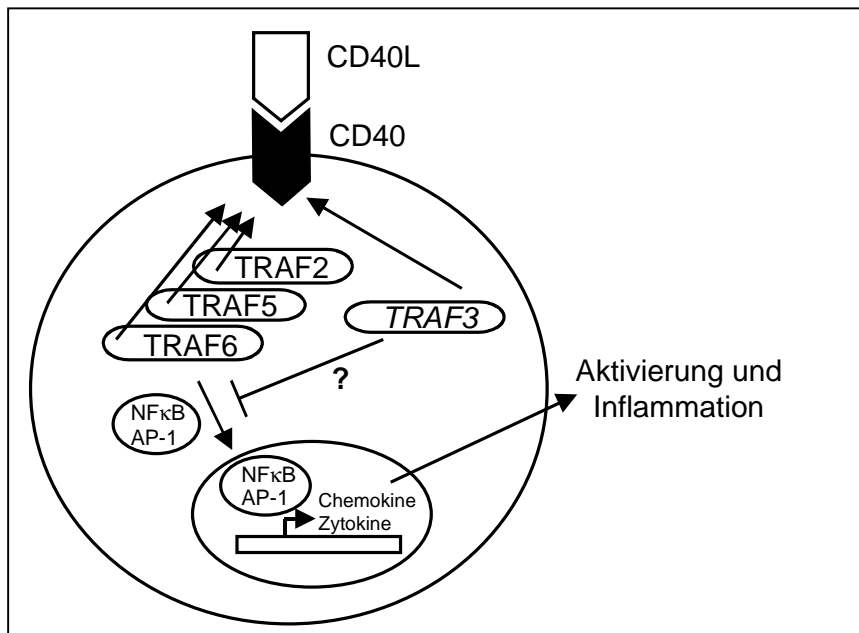


Abbildung 1.4.
TRAF-Signaltransduktion

1.2. Shear Stress

Einer der wichtigsten endogenen atheroprotektiven Faktoren im kardiovaskulären System ist die laminare Schubspannung des fließenden Blutes, der sogenannte Shear Stress (81). Das fließende Blut erzeugt im linearen Teil der Gefäße laminaren Shear Stress, während niedriger oder turbulenter Fluß hauptsächlich in Gefäßgabelungen und Biegungen auftritt (Abb. 1.5.). In diesen Regionen entstehen bevorzugt atherosklerotische Läsionen unabhängig von Risikofaktoren (82) (Abb. 1.5.). Durch den protektiven laminaren Shear Stress wird gewährleistet, daß das Endothel wichtige Prozesse im Gefäßsystem, wie z.B. Koagulation, Wachstum von glatten Muskelzellen, Adhäsion und Transmigration von Leukozyten und den Fettstoffwechsel reguliert und der Pathogenese der Atherosklerose entgegenwirkt (6).

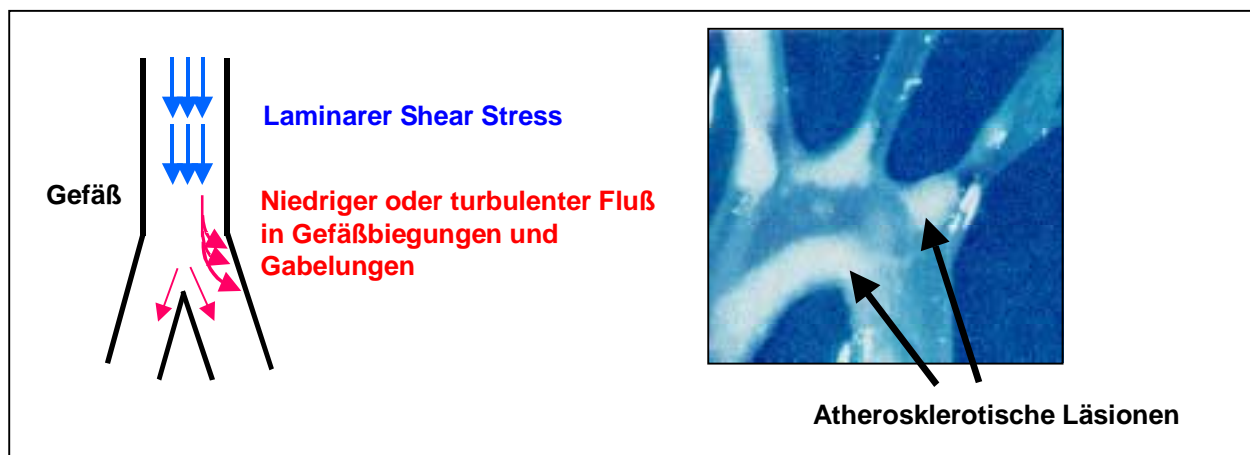


Abbildung 1.5. Laminare Schubspannung des Blutes (Shear Stress)
(modifiziert nach Park et al., 1998; (83))

1.2.1. Definition der laminaren Schubspannung (Shear Stress)

Endothelzellen kleiden die innere Schicht der Blutgefäße aus. Aufgrund ihrer Lokalisation im Inneren der Gefäße sind Endothelzellen konstant hämodynamischen Kräften, resultierend aus Blutfluß, Blutdruck und dem kardialen Zyklus, ausgesetzt. Man unterscheidet hierbei zum einen die tangentielle und radiale Dehnung des Gefäßes und zum anderen die laminare Schubspannung des Blutes. Die tangentielle und radiale

Dehnung des Gefäßes ist eine Folge des Blutdrucks und beeinflusst alle Zellen des Gefäßes (Muskel- und Endothelzellen). Die laminare Schubspannung des Blutes (Shear Stress) resultiert aus der Reibungskraft des viskösen Blutflusses an der luminalen Seite des Gefäßes und wirkt parallel zur Gefäßoberfläche auf die Endothelzellen. Laut Definition wirkt Shear Stress (τ) als Kraft pro Flächeneinheit in der Richtung des Blutflusses auf die Endotheloberfläche und wird durch die Viskosität des Blutes (μ), das Volumen des Blutflusses (Q) und den inneren Gefäßradius (R) bestimmt und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Shear Stress } \tau = 4\mu Q / \pi R^3$$

Die Größe des Shear Stress (τ) ist demnach proportional zum Volumen des Blutflusses (Q) und umgekehrt proportional zur dritten Potenz des inneren Gefäßradius (R) (84). Der physiologische Shear Stress in arteriellen Gefäßen liegt bei ca. 15 dynes/cm², während im venösen System der Shear Stress mit ungefähr 4 dynes/cm² berechnet wurde (84).

1.2.2. Einfluß von Shear Stress auf das Endothel

Wie bereits in Kapitel 1.1.1. und 1.1.3. beschrieben, sind die Integrität und Funktionalität der Endothelzellschicht für das kardiovaskuläre System von entscheidender Bedeutung. Dagegen sind Störungen der lokalen Hämodynamik im Blutgefäß mit endothelialer Dysfunktion und dem Auftreten von atherosklerotischen Läsionen assoziiert (6,85,86). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Gefäßregionen mit niedrigem oder turbulentem Fluß eine erhöhte Permeabilität von Makromolekülen und eine erhöhte Akkumulation von LDL aufweisen (87,88). Shear Stress übt einen atheroprotektiven Effekt auf Endothelzellen aus, indem vasoaktive Substanzen freigesetzt und sowohl die Genexpression als auch Zellmorphologie und Metabolismus verändert werden (81,89). Morphologisch induziert Shear Stress die Reorientierung der Endothelzellen parallel zur Blutflußrichtung mit einer langgestreckten Zellform (90,91). Die Veränderung von hämodynamischen Kräften führt zu einer Umstrukturierung ("Remodeling") der Gefäße, charakterisiert durch modifizierte Gefäßmorphologie und Funktion, z.B. zelluläre

Hypertrophie und Hyperplasie, erhöhte Proteinbiosynthese oder Reorganisation der extrazellulären Matrix (92,93). Durch diese Umstrukturierung können die Gefäße sowohl auf physiologische als auch auf pathophysiologische Änderungen reagieren.

Die in den folgenden Abschnitten (1.2.2.1. - 1.2.2.4.) beschriebenen Effekte von Shear Stress auf Endothelzellen sind in Abbildung 1.6. zusammengefaßt.

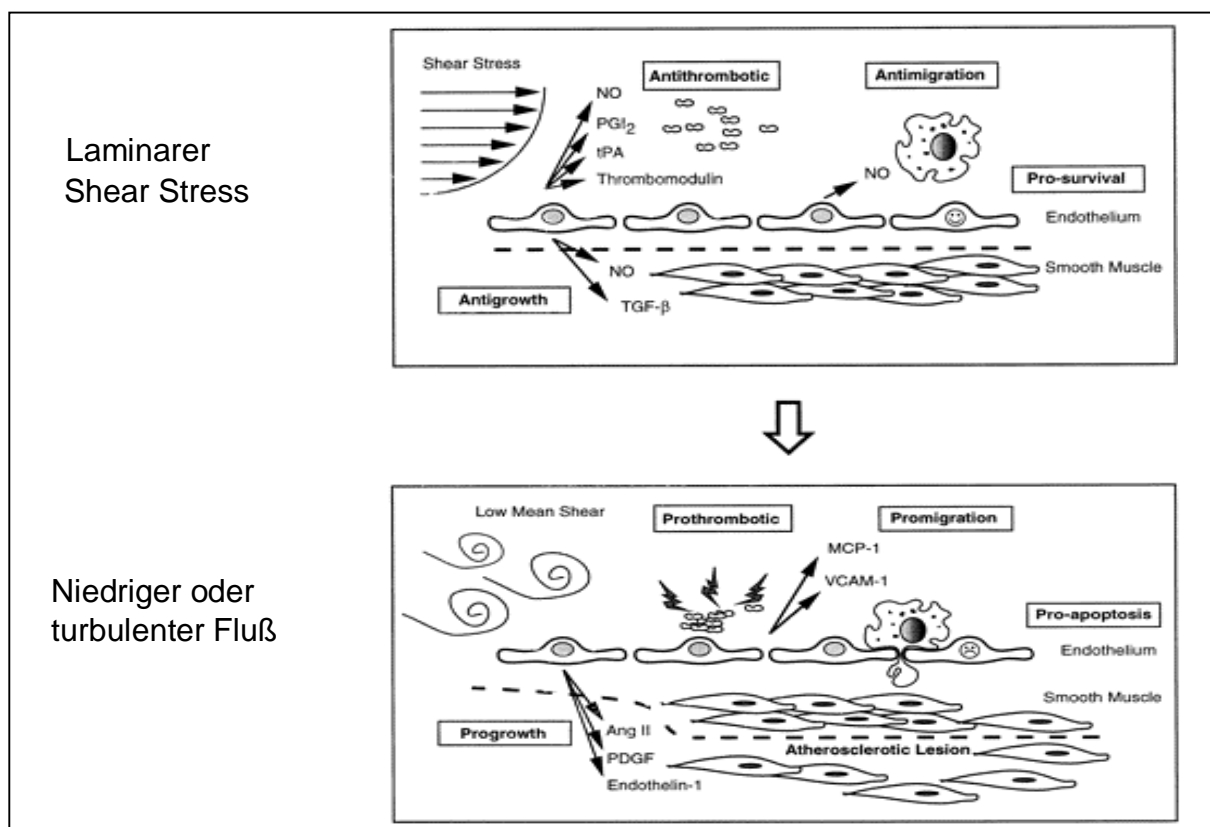


Abbildung 1.6. Effekte von Shear Stress auf Endothelzellen (modifiziert nach Traub und Berk, 1998; (81))

(Ang II, Angiotensin II; MCP-1, "monocyte chemoattractant protein-1"; NO, Stickstoffmonoxid; PDGF, "platelet-derived growth factor"; PGI₂, Prostacyclin; TGF-β, "transforming growth factor-β"; tPA, "tissue plasminogen activator"; VCAM-1, "vascular cell adhesion molecule-1")

1.2.2.1. Der antithrombotische Effekt von Shear Stress

Die antithrombotische Wirkung von Shear Stress basiert auf der Freisetzung von Prostacyclin und NO aus Endothelzellen (94-96). Sowohl Prostacyclin als auch NO hemmen die Aggregation von Thrombozyten. Zusätzlich inaktiviert Shear Stress die

Gerinnungskaskade durch erhöhte Expression der antikoagulatorischen Proteine Thrombomodulin und "tissue plasminogen activator" (Abb. 1.6.) (97-99).

1.2.2.2. Der antiinflammatorische Effekt von Shear Stress

Eine weitere wichtige Funktion der Endothelzellen ist die Regulation der Adhäsion und Migration von Leukozyten und Monozyten durch Sekretion von chemotaktischen Faktoren und Expression von Adhäsionsmolekülen. Langfristig reduziert Shear Stress die Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, wohingegen die kurzfristigen Effekte von Shear Stress auf die Genexpression dieser Moleküle kontrovers diskutiert wird (100-104). Die erhöhte Expression von VCAM-1 in den Initialstadien atherosklerotischer Läsionen, weist darauf hin, daß laminarer Shear Stress die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel inhibiert und demnach antiinflammatorisch wirksam ist (Abb. 1.6.) (105).

1.2.2.3. Der antiapoptotische Effekt von Shear Stress

Shear Stress hemmt den programmierten Zelltod (Apoptose) von Endothelzellen, induziert durch proatherosklerotische Faktoren (oxLDL, TNF α , Ang II), über NO-abhängige und NO-unabhängige Mechanismen (106,107). Dazu gehört beispielsweise die Shear Stress-induzierte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) über die Protein-Kinase Akt, die zu erhöhter NO-Produktion in Endothelzellen führt (108). NO wiederum ist antiapoptotisch wirksam, indem es z.B. direkt die Caspase-Kaskade hemmt (109,110). Ein weiterer Mechanismus ist die Shear Stress-stimulierte Expression von endothelialen Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF), die Endothelzellen vor Apoptose schützen (111,112).

1.2.2.4. Der antiproliferative Effekt von Shear Stress

In atherosklerotischen Läsionen ist die Proliferation von glatten Muskelzellen erhöht (6). Shear Stress wirkt der Proliferation von glatten Muskelzellen durch die Hemmung der Expression von Endothelin-1 und Angiotensin II, die das Wachstum von glatten Muskelzellen stimulieren, entgegen (113,114). Zusätzlich wird das Wachstum von

glatten Muskelzellen durch die Shear Stress-induzierte Freisetzung von NO and TGF β gehemmt (Abb. 1.6.) (115,116).

1.2.3. Signaltransduktion von Shear Stress

Einige der bereits beschriebenen Effekte von Shear Stress auf Endothelzellen (Kap. 1.2.2.) werden über die Regulation der Genexpression vermittelt. Beispielsweise reguliert Shear Stress die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und BMK-1, die durch die Phosphorylierung von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren sowohl transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Effekte von Shear Stress vermitteln können (81). Die Regulation der Genexpression wird durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an *cis*-Elemente in den Promoter-Regionen der entsprechenden Gene vermittelt. Verschiedene Shear Stress-regulierte *cis*-Elemente konnten bereits identifiziert werden (117). Beispielsweise ist das "Shear Stress Responsive Element" (SSRE) mit der Sequenz GAGACC im Promoter von PDGF ("platelet-derived growth factor") an der Induktion durch Shear Stress beteiligt (118). NF κ B bindet an diese SSRE und aktiviert die Expression von PDGF (119). Auch die Transkriptionsfaktoren Egr-1 and Sp-1 vermitteln die Shear Stress-induzierte Expression verschiedener Gene (z.B. "Tissue Factor") (120). Das transmembrane Glykoprotein "Tissue Factor" (TF) ist an der Initiation der Gerinnungskaskade beteiligt, indem es an Faktor VII bindet und über Aktivierung von Faktor X die Umsetzung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert (121). In Endothelzellen ist die geringe Expression des TF unter physiologischen Bedingungen nicht detektierbar. In atherosklerotischen Plaques oder nach Stimulation der Zellen mit Zytokinen (z.B. TNF α) zeigt sich eine erhöhte TF Expression (122,123). Shear Stress erhöht transient die Expression der TF mRNA in Endothelzellen mit einem maximalen Anstieg nach 2 h. Infolgedessen steigt die maximale TF Aktivität nach 4 bis 6 h Shear Stress-Exposition auf einen Maximalwert, gefolgt von einer Reduktion der TF mRNA bzw. Aktivität auf Basalniveau nach 6 h bzw. 10-12 h Shear Stress-Exposition. Die Shear Stress-induzierte Expression des TF wird über das *cis*-Element Sp-1 im Promoter des Genes und die Hyperphosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sp-1 vermittelt (120).

Auch die Expression des chemotaktischen Proteins MCP-1 (Kap. 1.1.4.), das als "Lockstoff" für Monozyten in der Entzündungsreaktion des Endothels eine wichtige Rolle spielt, wird durch Shear Stress reguliert. Kurzfristige Shear Stress-Exposition führt zu einem maximalen Anstieg von MCP-1 nach 1,5 h, im weiteren Verlauf (4-5 h) geht die MCP-1 Expression auf den Ausgangswert zurück und bleibt langfristig unterdrückt. Die Bestimmung der MCP-1 Transkriptionsrate mit Hilfe von "Nuclear run on"-Experimenten hat gezeigt, daß die Shear Stress-induzierte MCP-1 Expression auf Ebene der Transkription reguliert wird (124). Zusätzlich haben Promoteranalysen ergeben, daß die "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-responsive elements" (TRE) über die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 für die Induktion von MCP-1 durch Shear Stress verantwortlich sind (124). Stickstoffmonoxid (NO) reguliert ebenfalls die Expression von MCP-1. Sowohl endogenes als auch exogenes NO reduzieren die Expression von MCP-1 über die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B in Endothelzellen (125).

Die Shear Stress-induzierte Genexpression in Endothelzellen ist in Tabelle 1.2. zusammengefaßt.

Gen	Genexpression	Shear Stress
Vasoaktivität:		
NOS, CNP, Adrenomedullin	↑, langfristig	Dosisabhängig
Prostacyclin	↑, kurzfristig	Dosisabhängig
ET-1	↓, langfristig	Dosisabhängig
Wachstum:		
PDGF, bFGF	↑, kurzfristig	Dosisabhängig
TGFβ1	↑, langfristig	Dosisabhängig
Adhäsion:		
ICAM-1	↑, ?	Dosisabhängig
VCAM-1	↓, langfristig	Mittlerer Shear Stress
MCP-1	↑, kurzfristig	Mittlerer Shear Stress
Koagulation:		
TF	↑, kurzfristig	Mittlerer Shear Stress
COX-2	↑, langfristig	Mittlerer Shear Stress
Antioxidative Enzyme:		
Mn-SOD, Cu/Zn-SOD	↑, langfristig	Mittlerer Shear Stress

**Tabelle 1.2. Shear Stress-induzierte Genexpression in Endothelzellen
(modifiziert nach Chien et al., 1998; (117))**

(bFGF, "basic fibroblast growth factor"; CNP, "C-type natriuretic peptide"; COX-2, Zyklooxygenase-2; Cu/Zn-SOD, Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase; ET-1, Endothelin-1; ICAM-1, "intercellular adhesion molecule-1"; MCP-1, "monocyte chemoattractant protein-1"; Mn-SOD, Mangan-Superoxid-Dismutase; NOS, NO-Synthase; PDGF, "platelet-derived growth factor"; TF, "Tissue Factor"; TGFβ1, "transforming growth factor 1"; VCAM-1, "vascular cell adhesion molecule-1")

1.2.3.1. Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein bedeutender Mediator des protektiven Effektes von Shear Stress im kardiovaskulären System. Einige Shear Stress-regulierte Prozesse, wie z.B. Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und Leukozyten-Adhäsion, werden über NO vermittelt. NO wird von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) produziert (126-128). Shear Stress ist der stärkste physiologische Stimulus der NO-Synthese in Endothelzellen. Man unterscheidet hierbei zwei verschiedene Signaltransduktionswege

(Ca²⁺-abhängig und Ca²⁺-unabhängig) (129,130). Die kurzfristige Erhöhung der NO-Produktion durch Shear Stress ist Ca²⁺-abhängig und basiert auf der posttranslationalen Aktivierung der eNOS. Der langfristige, Ca²⁺-unabhängige Anstieg der NO-Produktion ist auf eine erhöhte Genexpression der eNOS durch Shear Stress zurückzuführen (107). Desweiteren wird die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung am Serin 1177 durch die Protein-Kinase B (Akt) stimuliert (108,131). Weiterhin stimuliert Shear Stress die Expression der Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD), die durch ihre antioxidativen Eigenschaften als Radikalfänger wiederum die Bioverfügbarkeit von NO erhöht (107).

1.2.4. Mechanotransduktion

Die Umsetzung von mechanischen Kräften an der Zellmembran in biochemische Signale im Zytoplasma ist Voraussetzung für den protektiven Effekt von Shear Stress in Endothelzellen. Der zugrunde liegende Mechanismus der Mechanotransduktion von Shear Stress ist bislang nicht vollständig geklärt. Als mögliche Mechanosensoren werden Membran-Mikrodomänen (Caveoli), Ionenkanäle, G-Proteine und Integrine diskutiert (Abb. 1.7.) (81). Caveoli sind cholesterinreiche Domänen der Plasmamembran, die in Endothelzellen in großen Mengen exprimiert werden und an Endozytose, Transzytose, Ionenaustausch an der Zellmembran und Signaltransduktion beteiligt sind (132). Caveolin, ein integrales Membranprotein, ist der Hauptbestandteil der Caveoli. Es bindet an intrazelluläre Signalmoleküle, wie z.B. Adapterproteine und Kinasen, und könnte demnach mechanische Stimuli in das Zellinnere weiterleiten. Desweiteren werden mechanosensitive Ionenkanäle, wie Kalium- und Kalziumkanäle, als Mediatoren des Shear Stress-Effektes in Endothelzellen diskutiert, da die Blockierung dieser Kanäle zu einer Inhibierung der Shear Stress-induzierten NO- und TGF β -Freisetzung führt (116,133).

Die Hemmung der Shear Stress-induzierten ERK1/2-Aktivierung durch Inkubation von Endothelzellen mit Pertussistoxin, einem Inhibitor von G-Proteinen, hat die Beteiligung von G-Proteinen an der Umsetzung von Shear Stress in biochemische Signale gezeigt (134). Desweiteren wurde die unmittelbare Aktivierung von G-Proteinen nach einer Sekunde Shear Stress-Exposition mit Hilfe eines photoreaktiven GTP-Analogs in humanen Endothelzellen nachgewiesen (135).

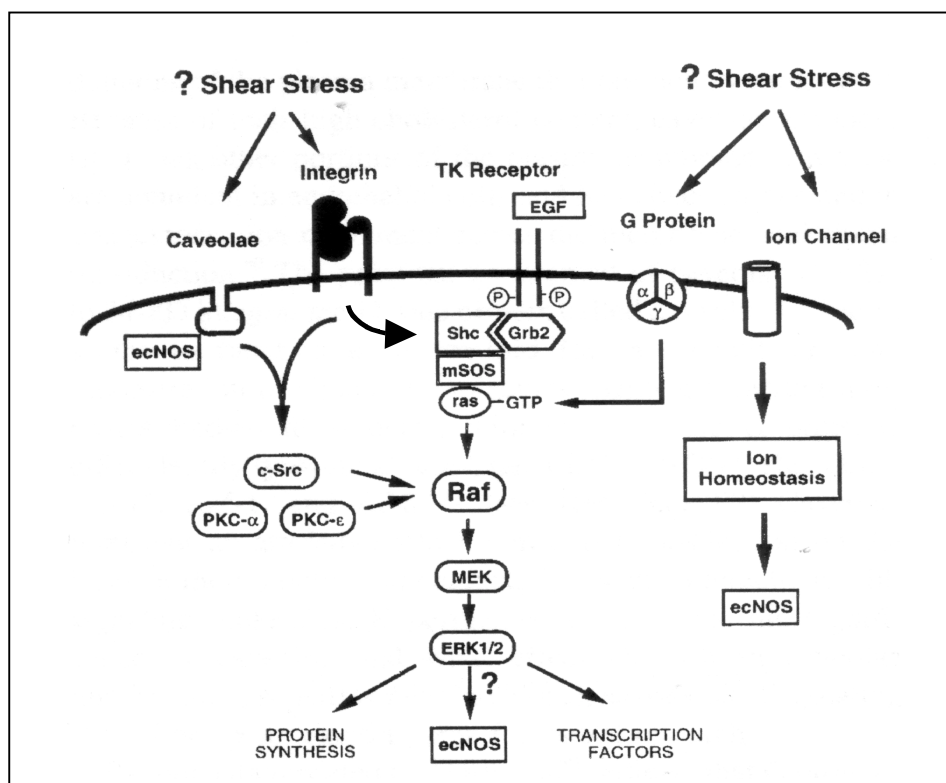


Abbildung 1.7. Modell der Mechanotransduktion in Endothelzellen (modifiziert nach Traub und Berk, 1998; (81))

1.2.4.1. Rolle der Integrine in der Mechanotransduktion von Shear Stress

Neben den beschriebenen potentiellen Mechanosensoren (Kap. 1.2.4.), sind Integrine von zentraler Bedeutung für die Mechanotransduktion von Shear Stress, da sie eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und den Proteinen der extrazellulären Matrix, z.B. Fibronectin, Vitronectin und Laminin, herstellen (136-139). Integrine, eine Familie von Zelloberflächenproteinen, sind heterodimere Transmembran-Glykoproteine, die aus verschiedenen α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt sind (140). Bislang wurden 17 α - und 8 β -Untereinheiten charakterisiert, die in unterschiedlicher Kombination mehr als 20 verschiedene Integrin-Rezeptoren bilden (141). Nach Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix kommt es zur Bildung der sog. Fokalkontakte, bestehend aus Integrinen, Adapterproteinen, zytoplasmatischen Kinasen und Zytoskelett-Proteinen (142-144). Die zytoplasmatische Domäne der β -Integrin-Untereinheiten bindet direkt an Aktin. Zusätzlich vermitteln Aktin-bindende Proteine wie Talin, α -Actinin und Vinculin die Integrin-Zytoskelett-Assoziation (Abb. 1.8.) (143,145). Die Weiterleitung der Signale von

der Zellmembran ins Zellinnere wird über Tyrosin-Phosphorylierungen verschiedener Proteine in den Fokalkontakten im wesentlichen durch zwei Signaltransduktionswege vermittelt: zum einen über die "focal adhesion kinase" (FAK) und zum anderen über das Adapterprotein Shc. Sowohl der FAK- als auch der Shc-Signaltransduktionsweg führen über verschiedene Kinasen und Adapterproteine zur Aktivierung der MAPK-Kaskade, an deren Ende die MAP-Kinase ERK1/2 auf Transkriptionsfaktoren und Regulatorproteine wirkt (Abb. 1.7.).

Die bedeutende Rolle der Integrine in der Mechanotransduktion von Shear Stress wurde u.a. von Muller und Mitarbeitern gezeigt. So konnte die Fluß-induzierte, NO-abhängige Vasodilatation in Koronararterien durch Zugabe von RGD-Peptiden, die die Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix blockieren, gehemmt werden (146). Die Shear Stress-induzierte ERK1/2- und Akt-Aktivierung benötigt ebenfalls die intakte Integrin-Signalkaskade, da die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt in Shear Stress-exponierten Endothelzellen durch Inkubation mit RGD-Peptiden gehemmt werden kann (147,148). Die Inkubation von humanen Endothelzellen mit einem aktivierenden Integrin β 1-Antikörper oder Shear Stress stimuliert die Tyrosin-Phosphorylierung, sowie die Aktivierung von FAK und MAPK (149). Li und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Shear Stress die Tyrosin-Phosphorylierung und FAK-Aktivierung über den Vitronektin-Rezeptor (α v β 3) in bovinen Endothelzellen erhöht. Außerdem induziert Shear Stress die Bindung von FAK an den Grb2-SOS-Komplex und somit die Aktivierung der MAPK-Kaskade (ERK und JNK) in diesen Zellen (150). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß Integrine an der Signaltransduktion von Shear Stress in Endothelzellen beteiligt sind.

Die Regulation der Integrin-Expression durch Shear Stress in Endothelzellen wurde bislang nicht untersucht. Es wurde jedoch gezeigt, daß die Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch LNMA die Zelloberflächenexpression von Integrin α v β 3, das an Endothelzellüberleben, Migration und Angiogenese beteiligt ist, reduziert (151). Da Shear Stress die eNOS aktiviert und die daraus resultierende NO-Freisetzung induziert, könnte Shear Stress einen stimulatorischen Effekt auf die Integrin-Expression haben.

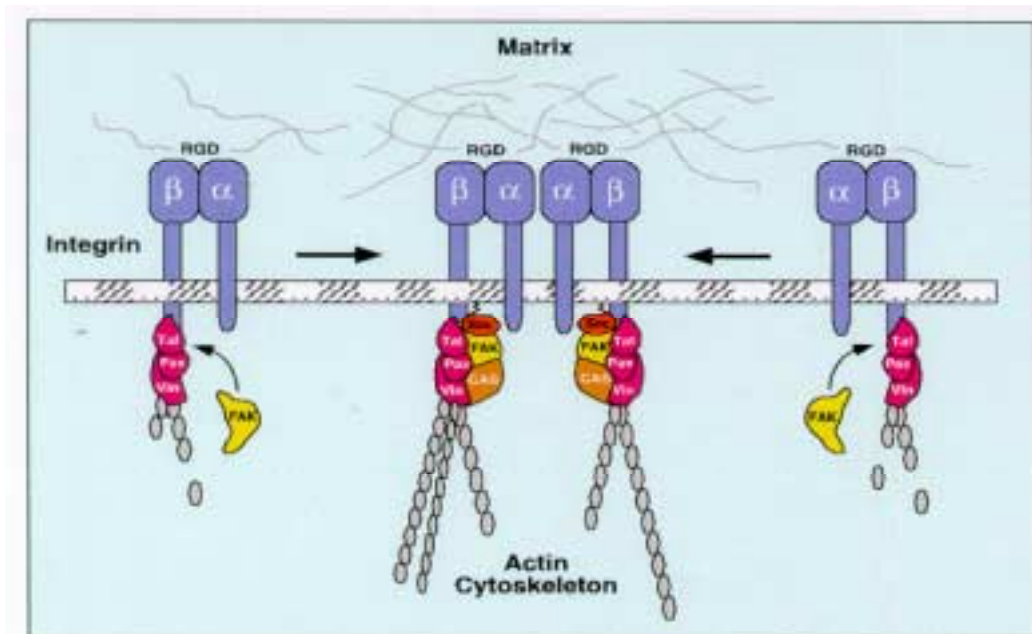


Abbildung 1.8. Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix und Bildung von Fokalkontakten (Giancotti und Ruoslahti, 1999; (144))

Neben der Rolle der Integrine in der Shear Stress-induzierten Mechanotransduktion, sind Integrine an der Regulation von Zelladhäsion, Migration, Wachstum, Differenzierung, Genexpression, Inflammation und Blutgerinnung beteiligt (152,153). Viele Integrine erkennen und binden mehrere verschiedene Liganden (Tabelle 1.3.). Die Integrin-Erkennungssequenz Arg-Gly-Asp (RGD) wurde ursprünglich in Fibronektin als Bindungsmotiv für den Fibronektin-Rezeptor $\alpha 5 \beta 1$ identifiziert. Diese Aminosäuresequenz findet sich auch in anderen Liganden (z.B. Vitronektin, Kollagen) als Erkennungsmotiv für verschiedene Rezeptoren (z.B. $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$) (136). Inzwischen werden synthetische RGD-Peptide zur Blockierung bestimmter Integrin-Ligand-Interaktionen in experimentellen Ansätzen verwendet.

Integrin	Ligand
$\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$	Fibronektin
$\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$	Vitronektin
$\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 4$, $\alpha 7 \beta 1$	Laminin
$\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$	Kollagen

Tabelle 1.3. Bindung verschiedener Integrine an Proteine der extrazellulären Matrix

1.3. Fragestellung

Wie bereits ausgeführt, sind die Funktionalität und Integrität des Endothels von zentraler Bedeutung für das kardiovaskuläre System. Die laminare Schubspannung des Blutes, Shear Stress, ist einer der wichtigsten atheroprotektiven Faktoren. Bereits 1969 konnte gezeigt werden, daß atherosklerotische Läsionen unabhängig von Risikofaktoren bevorzugt in Gefäßregionen mit niedrigem oder turbulentem Fluß entstehen (82). Der Endothel-protective Effekt von Shear Stress beruht u.a. auf der Regulation der Genexpression in Endothelzellen. Einige Shear Stress-vermittelte Mechanismen, die Endothelzellen vor Inflammation und Apoptose im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose schützen, sind bereits bekannt. Dazu gehört z.B. die Shear Stress-induzierte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) über die Protein-Kinase B (Akt) (108). Zur Aufklärung weiterer atheroprotektiver Mechanismen sollte im Rahmen dieser Arbeit die Shear Stress-vermittelte Genexpression in humanen Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Untersuchung der Genexpression in Shear Stress-exponierten Endothelzellen mittels "Atlas cDNA Expression Array", der die Analyse differentieller Expression von 588 Genen in einem Hybridisierungsexperiment ermöglicht.
2. Bestätigung der differentiellen Expression der Shear Stress-regulierten Kandidatengene mittels Northern Blot-, Western Blot- und FACS-Analysen.
3. Untersuchung der physiologischen Relevanz der Shear Stress-induzierten Regulation der Kandidatengene für die Funktionalität des Endothels.
4. Aufklärung der möglichen Mechanismen der Shear Stress-regulierten Expression der Kandidatengene. Hierbei sollte u.a. die NO-abhängige Genexpression untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Kultivieren von Endothelzellen

Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC; Clonetics, Cell Systems, St. Katharinen) wurden in Endothelzellmedium (EBM; Clonetics) mit Hydrocortison (1 µg/ml), Rinderhirnextrakt (3 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml), Amphotericin B (50 µg/ml), epidermalem Wachstumsfaktor (10 µg/ml) und 10% fötalem Kälberserum (FCS; Boehringer Mannheim, Mannheim) in 250 ml-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur 3. Passage kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 7 ml Phosphatpuffer (PBS; GibcoBRL, Karlsruhe) gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin/EDTA (Boehringer Mannheim) bis zum Abrunden der Zellen inkubiert. Nach Entfernen des Trypsins, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Greiner) in 10 ml Medium abgelöst und zur Zellerhaltung in 250 ml-Zellkulturflaschen ausgebracht und für 18 h kultiviert. Zur Durchführung der Versuche wurde die Zellzahl bestimmt und je nach Versuchsansatz 3,5 - 4,5 x 10⁵ Zellen in 6 cm-Zellkulturschalen (Greiner) ausgebracht und für 18 h kultiviert.

2.2. Zellinkubation

2.2.1. Inkubation mit chemischen Substanzen

Die folgenden kommerziell erhältlichen Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen zur Inkubation von HUVEC verwendet:

Substanz	Abkürzung	Konz.	Hersteller
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehyde	Ac-DEVD-CHO	100 μ M	Bachem, Heidelberg
N ^G -Monomethyl-L-Arginine	LNMA	1 mM	Alexis, Grünberg
Tumor Nekrose Faktor α	TNF α	50 ng/ml	Sigma, Deisenhofen
2'-Amino-3'-methoxyflavone	PD98059	10 μ M	BIOMOL
Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Prol-Peptid	RGD-Peptid	0,5 mM	GibcoBRL, Karlsruhe
Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Prol-Peptid	RGE-Peptid	0,5 mM	GibcoBRL
Sodium nitroprusside	SNP	50 μ M	Sigma
(Z)-[N-(3-Ammoniopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolate]	PAPA NONOate	50 μ M	Alexis
Trimeric human CD40 ligand	CD40L	0,5 μ g/ml	Immunex, Washington
Humanes Komplement Serum	KS	0,2 U/ml	Sigma
Anti-Human Integrin α 5	anti- α 5	1 μ g/ml	Dianova
Anti-Human Integrin β 1	anti- β 1	1:100	GibcoBRL
Pyrrolidinedithiocarbamate	PDTC	100 μ M	Sigma

Tabelle 2.1. Inkubation mit chemischen Substanzen

2.2.2. Shear Stress-Exposition

HUVEC (4×10^5 Zellen) wurden in 6 cm Kulturschalen ausgebracht und in einem konischen Kegelplattenviskosimeter laminarer Schubspannung von 5, 15 oder 45 dynes/cm² für verschiedene Zeitpunkte exponiert. Durch die gleichmäßige Rotation des Konus im Kulturmedium entsteht eine definierte laminare Schubspannung τ (Shear

Stress), die auf die Endothelzelleinzelschicht wirkt. Die verwendeten Apparaturen wurden von Dr. R. Popp und Prof. R. Busse (Universität Frankfurt, Physiologie) zur Verfügung gestellt (Abb. 2.1.).

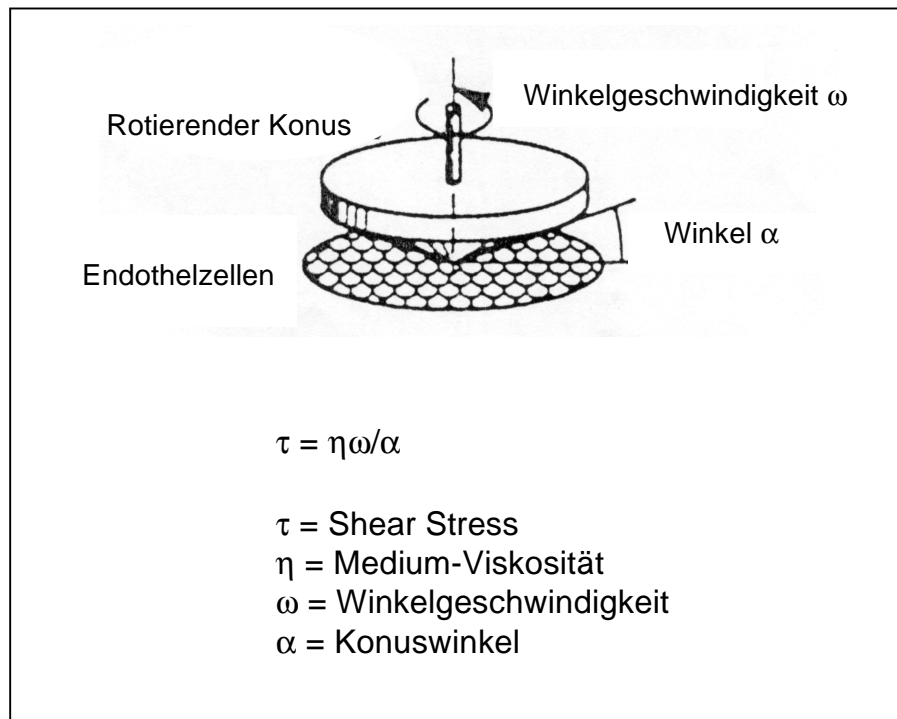


Abbildung 2.1. Konisches Kegelplattenviskosimeter
(modifiziert nach Noris et al., 1995; (154))

2.3. Untersuchung der Genexpression

2.3.1. Untersuchung der RNA-Expression

2.3.1.1. Northern Blot-Analyse

2.3.1.1.1. RNA-Präparation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus HUVEC erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion nach Liu und Mitarbeitern (155). Dazu wurden HUVEC mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale entfernt und 10 min bei 700 g (4°C) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml PBS (4°C) gewaschen und

erneut zentrifugiert (5 min, 20000 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 75 µl PBS, 600 µl Lösung A (10 mM EDTA, pH 8; 1% SDS) und 225 µl Lösung B (50 ml: 21,5 g Natriumacetat, 5,6 ml Eisessig, 10 mM EDTA, pH 8) gelöst und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 20000 g) wurde die RNA (im Überstand) zunächst mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) und anschließend mit 500 µl Chloroform durch Zentrifugation (5 min, 20000 g) extrahiert. Nach Fällen der RNA in Isopropanol (600 µl) wurde das RNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet (30 min, RT), anschließend in RNase-freiem DEPC-H₂O aufgenommen und bei 260 nm vermessen (OD₂₆₀ = 1 entspricht 40 µg/ml RNA).

Zur Herstellung des RNase-freien DEPC-H₂O wurde H₂O mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC; AppliChem) versetzt und 12 h nach Zugabe dreimal autoklaviert. Die zur Isolierung von RNA verwendeten Lösungen wurden in 0,1% DEPC-H₂O angesetzt.

2.3.1.1.2. Denaturierende Gelelektrophorese und Northern Blot

Zur Auftrennung der RNA im Agarosegel wurden 10 µg Gesamt-RNA im Verhältnis 1:1 mit RNA-Probenpuffer (80 µl 10 x MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure); 160 µl 37% Formaldehyd; 400 µl Formamid; 80 µl 10 x Bromphenolblau in Glycerin; 50 µg Ethidiumbromid) versetzt und 10 min bei 65°C gekocht. Die Elektrophorese (Electrophoresissystems/Angewandte Gentechnologie GmbH, Heidelberg) erfolgte über Nacht bei 20 V in einem 0,8% Agarosegel (1 x MOPS, 2,75% Formaldehyd) mit 1 x MOPS (0,2 M MOPS; 50 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7) als Laufpuffer. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Gesamt-RNA durch Kapillarkräfte aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitrat; pH 7) als Transferpuffer. Die auf der Nylonmembran gebundene RNA wurde durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 2400, Stratagene) immobilisiert und anschließend mit einer radioaktiv-markierten Probe hybridisiert (Kap. 2.3.1.1.3.).

2.3.1.1.3. Radioaktive Markierung von DNA

Die zu markierenden DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsspaltung aus den entsprechenden Plasmiden isoliert und nach Gelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Für die radioaktive Markierung von DNA wurde

die vollständige humane cDNA ("full-length") von MCP-1, Clusterin, CD59 und GAPDH verwendet.

Nach Denaturieren der DNA (50 ng) bei 100°C für 2 min wurde diese mit 6 µl 5 x Markierungslösung (16,5 µl pdN6 (10 µg/ml, Pharmacia); 5 µl 1 M MgCl₂; 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8; 2 µl 1 M DTT; 0,8 µl dNTPs (25 mM ohne dCTP, Boehringer Mannheim); 125,7 µl H₂O), 0,1 mg/ml BSA, [³²P]-dCTP (50-100 µCi) und Klenow Polymerase (1 U, Boehringer Mannheim) für 1,5 h bei RT inkubiert. Die radioaktiv-markierte DNA-Sonde wurde anschließend durch Sephadex G50-Säulenchromatographie von ungebundenen Nukleotiden und freier Radioaktivität getrennt und mit der Northern Blot-Membran inkubiert (Kap. 2.3.1.1.4.).

2.3.1.1.4. Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren

Zur Prähybridisierung der Nylonmembran wurden 125 µl Lachssperm-DNA (20 mg/ml) und 125 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) 2 min bei 100°C gekocht, mit 10 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung (1 l: 75 g Dextranblau; 39,4 g NaCl; 19,8 g Na₃Citrat x 2 H₂O; 3,74 g SDS; 37,5 ml 100 x Denhardts (50 ml: 1 g Ficoll, 1 g Polyvinylpyrrolidon, 1 g BSA)) gemischt und mit der Membran für 1,5 h bei 65°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Die aufgereinigte, radioaktiv-markierte DNA-Sonde (Kap. 2.3.1.1.3.) wurde mit 125 µl Lachssperm-DNA (20 mg/ml) und 125 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5) 2 min bei 100°C denaturiert, mit 10 ml Hybridisierungslösung gemischt und, nach Entfernen der Prähybridisierungslösung, mit der Northern Blot-Membran über Nacht bei 65°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran (0,1% SDS; 0,2 x SSC) wurde das Expressionsmuster mittels Autoradiographie oder Phosphoimaging ausgewertet.

2.3.1.2. "RNase Protektion Assay" (RPA)

Der "Ribonuklease Protektion Assay" (RPA) wird zur Detektion und Quantifizierung der Expression verschiedener mRNA Spezies in einem Hybridisierungsexperiment eingesetzt. Dazu wird vom Hersteller ein Template Set aus 5 bis 12 verschiedenen cDNA Fragmenten zusammengestellt, das zur Synthese der radioaktiv-markierten Probe verwendet wird. Die cDNA Fragmente sind nach biologischer Relevanz zusammengestellt. Das verwendete Template Set hAPO-5 (Pharmingen, Hamburg)

beinhaltet die cDNA Fragmente folgender Gene: XIAP, TRAF1, TRAF2, CART, NAIP, MIHC, MIHB, TRPM2, CRAF, L32, GAPDH. Die durch die T7 RNA-Polymerase mit ^{32}P -UTP markierten Proben wurden mit der extrahierten Gesamt-RNA (Kap. 2.3.1.1.1.) der zu untersuchenden Zellen inkubiert. Anschließend wurden nicht-hybridisierte Probe und einzelsträngige RNA Moleküle mittels RNasen verdaut, während die doppelsträngigen "RNase-geschützten" Moleküle aufgereinigt und in einem denaturierenden Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Das Expressionsmuster wurde mittels Autoradiographie oder Phosphoimaging ausgewertet. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers (Pharmingen) durchgeführt.

2.3.1.3. "Atlas cDNA Expression Array"

Der "Atlas cDNA Expression Array" ermöglicht die Analyse differentieller Expression von 588 Genen in einem Hybridisierungsexperiment. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg; # 7740-1) durchgeführt (Abb. 2.2.).

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus Endothelzellen isoliert (Kap. 2.3.1.1.1.) und mit RNase-freier DNase behandelt. Die RNA wurde erneut über Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Mittels Gelelektrophorese und PCR wurde die Qualität der RNA (Reinheit, Degradation und DNA-Kontamination) überprüft. Die reverse Transkription erfolgte mit einem spezifischen Primer-Set (Clontech), wobei die cDNA mit $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$ radioaktiv markiert wurde. Da das spezifische Primer-Set, im Vergleich zu oligo(dT)-Primern, nur die zu untersuchenden cDNAs synthetisiert, wird der unspezifische Hintergrund reduziert und die Sensitivität der Methode erhöht. Die radioaktiv-markierte cDNA wurde durch Säulenchromatographie aufgereinigt und mit insgesamt 588 cDNAs, die jeweils zweifach auf einer Nylonmembran (Clontech) immobilisiert sind, hybridisiert. Die auf der Membran immobilisierten cDNA-Fragmente haben eine Länge von 200-600 bp und sind aus Regionen ohne PolyA⁺-Sequenzen, repetitive Elemente oder homologen Sequenzen gewählt, wodurch die Spezifität der Methode erhöht wird. Auf der Nylonmembran befinden sich ebenfalls 9 Haushaltsgene als Positivkontrolle und Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativkontrolle. Nach mehrmaligem Waschen der Membranen wurde das Expressionsmuster der verschiedenen Proben mittels Phosphoimaging ausgewertet.

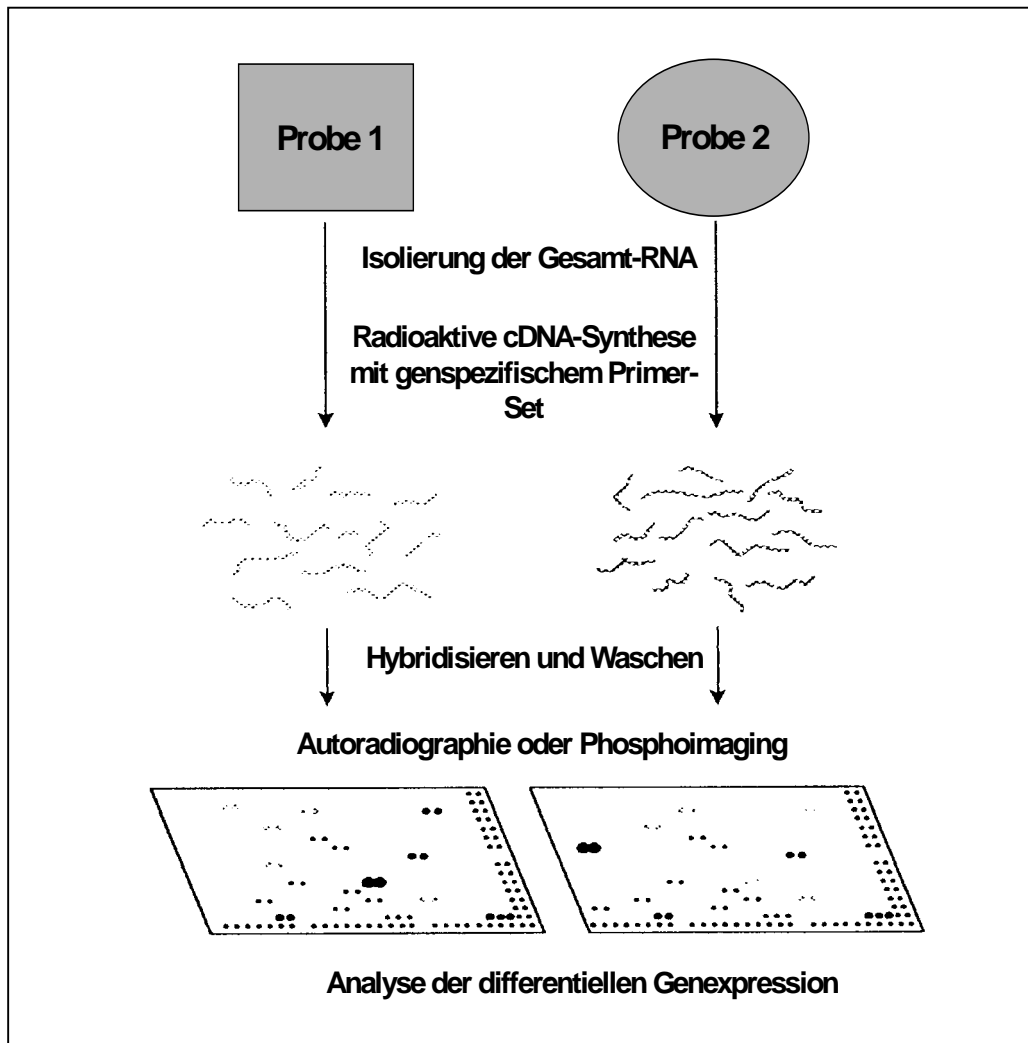


Abbildung 2.2. Durchführung des "Atlas cDNA Expression Array"

2.3.1.4. "Nuclear run on"-Experimente

2.3.1.4.1. Isolierung der Kerne

Mit Hilfe der "Nuclear run on"-Experimente ist es möglich, die transkriptionelle Regulation von Genen zu untersuchen (156). Zuerst wurden die Kerne aus den zu untersuchenden Zellen über einen Sucrose-Gradienten isoliert. Dazu wurden HUVEC (2×10^6 Zellen pro Ansatz) mit Trypsin von der Kulturschale entfernt und 10 min bei 500 g (4°C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Lösung 1 (150 mM KCl; 8 mM MgAc; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 500 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 2 ml Lösung 2 (150 mM KCl; 8 mM MgAc; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 0,5% Nonidet P-40) lysiert und 3 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde

anschließend auf 4 ml Lösung 3 (100 mM Tris-HCl (pH 7,4); 5 mM MgCl₂; 600 mM Sucrose) vorsichtig aufgeschichtet und 10 min bei 500 g (4°C) zentrifugiert. Die isolierten Kerne wurden in 260 µl Lösung 4 (50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 5 mM MgCl₂; 40% Glycerol; 0,1 mM EDTA) aufgenommen und die Anzahl der Kerne mit einer Zählkammer bestimmt.

2.3.1.4.2. *In vitro* Transkription

Die Kerne (2 x 10⁶ pro Ansatz) wurden in Lösung 5 (5 mM Tris-HCl (pH 7,4); 2,5 mM MgCl₂; 150 mM KCl) mit ATP, GTP, CTP (je 2 mM; Boehringer Mannheim) und 100 µCi [α^{32} P]-UTP (Hartmann Analytic; Braunschweig) 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 2000 U RNase-freier DNase (GibcoBRL) wurde die Reaktion 5 min bei 37°C inkubiert. Die Kerne wurden mit SET-Puffer (10% SDS; 5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)) lysiert und mit 200 µg Proteinase K (Merck) 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA wie in Kapitel 2.3.1.1.1. beschrieben isoliert.

Humane cDNA-Fragmente (je 1 µg) von Integrin α 5 (880-1443 bp der Originalsequenz), Integrin β 1 (100-1500 bp) und GAPDH (660-870 bp) wurden nach Denaturierung (5 min bei 96°C) mit einem Dot-Blot-Gerät (Scotlab, Coatbridge, UK) auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe, BIO-RAD) transferiert und durch UV-Crosslinking (UV Stratalinker 2400, Stratagene) immobilisiert. Nach Prähybridisierung der Membran (3 h bei 65°C) mit 3 ml Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech) wurde die Membran mit den [α^{32} P]-UTP-markierten RNA-Transkripten in 2 ml Hybridisierungslösung (Clontech) 36 h bei 65°C hybridisiert, anschließend 30 min bei 55°C gewaschen (0,1% SDS; 2 x SSC) und mittels Autoradiographie ausgewertet.

2.3.2. Untersuchung der Protein-Expression

2.3.2.1. Protein-Präparation zytoplasmatischer Proteine

Die Zellen (4,0 x 10⁵ Zellen/Kulturschale) wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturschale entfernt und 10 min bei 700 g (4°C) zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml PBS (4°C) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 20000 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 0,32 M Sucrose; 1% Triton X-100; 2 mM DL-Dithiothreitol (DTT,

Sigma); 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid, (PMSF, AppliChem, Darmstadt)) 25 min bei 4°C lysiert. Dieses Lysat wurde bei 20000 g, 4°C, 15 min zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford ("BIO-RAD Protein Assay", BIO-RAD, München) bestimmt.

2.3.2.2. Protein-Präparation phosphorylierter Proteine

Die Zellen ($4,0 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) wurden auf Eis mit PBS (4°C) gewaschen und 5 min in 200 µl Lysispuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA, 1% Triton; 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Leupeptin) inkubiert. Nach Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde das Lysat in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert (20000 g, 4°C, 15 min) und die Proteinkonzentration im Überstand nach Bradford bestimmt (Kap. 2.3.2.4.).

2.3.2.3. Extraktion von Kern- und Zytoplasma-Proteinen

Die Fraktionierung von Kern- und Zytoplasma-Proteinen aus HUVEC ($4,0 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) wurde mit dem kommerziellen Kit "NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents" der Firma Pierce (Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinproben (je 2 µl) wurden mit 798 µl H_2O und 200 µl Protein-Färbereagenz (BIO-RAD) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Als Referenz wurden 800 µl H_2O mit 200 µl Protein-Färbereagenz verwendet. Die Messung der Absorption des entstandenen Protein-Farbstoffkomplexes erfolgte im Spektralphotometer bei $\lambda = 595$ nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Rinderserumalbumin (BSA)-Eichkurve errechnet.

2.3.2.5. Immunpräzipitation

Von den aus Kapitel 2.3.2.2. isolierten Proteinen wurden 500 µg in 500 µl Puffer (Kap. 2.3.2.2.) mit einem Antikörper (1 µg/ml) gegen das zu präzipitierende Protein über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe der Agarose-Beads (Santa Cruz) wurden die Proben 2 h bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert, anschließend 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proben mit 2 x Probenpuffer 5 min bei 100°C gekocht und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Kap. 2.3.2.6.).

2.3.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proteine (Kap. 2.3.2.1. - 2.3.2.3.) wurden in 2 x Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 10 mM DTT; 0,02% Bromphenolblau) 5 min bei 100°C gekocht und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe des sogenannten Laemmli-Systems wurden die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht (1 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS) konzentriert und anschließend im Trenngel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS) separiert. Nach Polymerisation des Geles wurden die Proteinproben geladen und bei maximal 100 Volt ca. 1,5 h aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,25 M Tris; 0,96 M Glycin und 1% SDS verwendet.

2.3.2.7. Transfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot ermöglicht den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus einem Trenngel auf eine geeignete Membran. Dabei werden die Proteine durch eine quer zum Gel verlaufende Elektrophorese auf die Membran übertragen, immobilisiert und anschließend durch Immunodetektion nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine wurden Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) verwendet. Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 40 kDa wurden durch den sog. "Semi-Dry-Blot", bei dem nur wenig Puffer benötigt wird und die Transferzeiten sehr kurz (ca. 45 min) sind, übertragen. Größere Proteine (> 40 kDa) wurden mit Hilfe des "Wet Blot" transferiert.

2.3.2.7.1. „Semi-Dry-Blot“

Zur Vorbehandlung wurden die PVDF-Membran 2 sec in Methanol, 2 min in H₂O und anschließend in Semi-Dry-Blotting-Puffer (0,048 M Tris; 0,039 M Glycin; 0,037% SDS; 20% Methanol) getränkt. Das Polyacrylamidgel und 6 Whatman 3MM Papiere (Whatman International, Maidstone, England) wurden ebenfalls in Semi-Dry-Blotting-Puffer vorbehandelt. Der Aufbau des Blottes (luftblasenfrei) erfolgte horizontal nach dem „Sandwich-Prinzip“ von der Anode zur Kathode, bestehend aus drei Whatman 3MM Papieren, der PVDF-Membran, dem Gel und drei Whatman 3MM Papieren. In der Semi-Dry-Blot-Apparatur (BIO-RAD) wurde der Transfer 45 min bei einem Stromfluß von 3 mA/cm² durchgeführt.

2.3.2.7.2. „Wet-Blot“

Nach Vorbehandlung der PVDF-Membran in Methanol und H₂O (Kap. 2.3.2.7.1) wurde die Membran, das Gel und die 6 Whatman 3MM Papiere in Wet-Blotting-Puffer (0,05 M Tris; 0,038 M Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol) getränkt. Der Aufbau des Blottes erfolgte wie bereits in Kap. 2.3.2.7.1. beschrieben. Anschließend wurde der Wet-Blot zwischen zwei „scotch pads“ aufgebaut und vertikal in die mit Puffer gefüllte Wet-Blot-Kammer (BIO-RAD) gehängt. Der Proteintransfer erfolgte 1,5 h bei 20 mA und 4°C.

2.3.2.8. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Die Detektion der auf Membranen immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Hierfür wurden die durch elektrophoretischen Proteintransfer (Western Blot) hergestellten Membranen zuerst mit 3% Rinderserumalbumin (BSA, Merck) oder 5% Magermilchpulver (MP, Töpfer, Dietmannsried) in TBS /Tween (50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,1% Tween-20) 2 h blockiert, um alle Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen. Danach wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper (Tabelle 2.2.), der an das zu untersuchende Protein bindet, 2 h inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran 3 x 15 min mit TBS /Tween gewaschen und anschließend 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten IgG-Zweitantikörper (Tabelle 2.2.), der den konstanten Teil des Erstantikörpers erkennt,

inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3 x 15 min) wurde die gebundene Peroxidase mittels ECL-Systems (Amersham) detektiert und auf Chemilumineszenz-Filmen (ECL-Hyperfilm, Amersham) sichtbar gemacht. Die Inkubationen der Membran mit Blockierungsreagenzien und den entsprechenden Antikörpern wurden bei RT auf einem Schüttelinkubator (IKA-Labortechnik, Staufen) durchgeführt.

1. AK	Hersteller	Blockierung	1. AK	2. AK	2. AK
Aktin	Boehringer Mannheim	3% BSA	1:4000 3% BSA	Anti-Mouse (Amersham)	1:4000 3% BSA
CD40	Upstate Biotechnology	5% MP	1:1000 5% MP	Anti-Rabbit (Amersham)	1:4000 5% MP
Clusterin	Santa Cruz	3% BSA	1:200 3% BSA	Anti-Goat (Santa Cruz)	1:6000 3% BSA
ERK1/2	New England Biolabs	3% BSA	1:1000 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA
IκBα	Santa Cruz	3% BSA	1:400 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA
Integrin α5	Transduction laboratories	3% BSA	1:6000 3% BSA	Anti-Mouse	1:4000 3% BSA
Integrin β1	Transduction laboratories	3% BSA	1:3500 3% BSA	Anti-Mouse	1:4000 3% BSA
<i>myc</i>	Santa Cruz	5% MP	1:200 1% MP	Anti-Mouse	1:4000 3% MP
Phospho-ERK1/2	New England Biolabs	3% BSA	1:2000 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA
Topoisomerase I	Santa Cruz	5% MP	1:100 5% MP	Anti-Goat	1:6000 5% MP
TRAF2	Santa Cruz	3% BSA	1:500 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA
TRAF3	Santa Cruz	3% BSA	1:500 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA
TRAF5	Santa Cruz	3% BSA	1:500 3% BSA	Anti-Rabbit	1:4000 3% BSA

Tabelle 2.2. Antikörper und Inkubationsbedingungen

2.3.3. Untersuchung der Zelloberflächen-Expression mittels FACS-Analyse

Für die FACS ("fluorescence activated cell sorter")-Analyse wurden die Endothelzellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 mM EDTA (pH 7.4) in PBS für 20 min bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. Nach Zentrifugation (8 min, 700 g, RT) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (8 min, 700 g, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 100 µl PBS/10% FCS resuspendiert und 30 min bei 4°C mit 10 µl FITC-konjugierten Antikörpern (Dianova, Hamburg) inkubiert. Die fluoreszenz-markierten Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und die Zelloberflächen-Expression der zu untersuchenden Proteine mittels FACS (FACS Calibur™, Perkin Elmer; CellQuest Software) analysiert.

2.4. Immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Analyse der TRAF3 Expression in humanen atherosklerotischen Plaques wurde im Labor von Prof. A. Tedgui (INSERM U141, Hopital Lariboisiere) in Paris durchgeführt. Die atherosklerotischen Plaques wurden im Rahmen von Endarterektomien von Patienten mit koronarer Herzkrankheit entnommen und mit einem spezifischen TRAF3-Antikörper (Santa Cruz) gefärbt. Weitere serielle Schnitte des Plaques wurden mit einem CD31-Antikörper, einem spezifischen Marker für Endothelzellen, gefärbt.

2.5. Immunfärbung von Zellen

Für das Färben von Zellen wurden HUVEC ($4,0 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) zweimal mit PBS gewaschen und 10 min bei RT in 2% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 min bei RT in 0,25% Triton X permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min bei RT in 10% FCS inkubiert. Der Erstantikörper (TRAF3 bzw. TRAF5 von Santa Cruz oder phospho-c-jun von Upstate Biotechnology) wurde 1:50 in 5% FCS 1,5 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit

dem Zweitantikörper (1:20, FITC-konjugierter Anti-Rabbit-Antikörper, Dako, Hamburg) im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI-Lösung (Kap. 2.6.) gegengefärbt.

2.6. Morphologischer Nachweis apoptotischer Zellen nach Kernfärbung

Nach Zentrifugation der Zellen bei 700 g für 10 min wurden diese in 4% Formaldehyd/PBS für 15 min bei RT fixiert. Danach erfolgte die Färbung der Zellkerne mit 4,6 Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Boehringer Mannheim; 1 µg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl) für mindestens 30 min. Die Analyse der apoptotischen Zellkerne erfolgte dann am Fluoreszenzmikroskop bei 486 nm. Der Anteil apoptotischer Zellkerne wurde aus 500 Zellen ausgezählt.

2.7. Transfektion

2.7.1. Transfektion von Oligonukleotiden

Zur Transfektion von HUVEC ($4,0 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) mit phosphothiolierten Sense- oder Antisense-Oligonukleotiden (Tabelle 2.3.; Roth, Karlsruhe) wurden je 1,5 µg Oligonukleotide mit 5 µl Lipofektamin (GibcoBRL) und 100 µl RPMI-Medium (GibcoBRL) für 30 min bei RT inkubiert. Zum Entfernen des Serums wurden die Zellen mit 2 ml RPMI-Medium gewaschen und mit der Oligonukleotid/Lipofektamin-Mischung in 2 ml RPMI-Medium für 5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml EBM mit allen Zusätzen plus 10% FCS zugegeben und je nach Experiment für 12 bis 18 h inkubiert und zusätzlich stimuliert oder Shear Stress exponiert.

Oligonukleotide	Sequenz der Oligonukleotide
Clusterin-Sense	5' ATGATGAAGACTCTGCTGCTG 3'
Clusterin-Antisense	5' ATTGTCTGAGACCGTCTGGTC 3'

Tabelle 2.3. Oligonukleotide

2.7.2. Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Plasmiden wurden je 3 µg Plasmid-DNA in 150 µl EBM (ohne Zusätze und FCS) mit 25 µl Superfect (Qiagen) für 10 min bei RT inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von EBM (mit Zusätzen und 10% FCS) gestoppt. Die Zellen (HUVEC: $3,5 \times 10^5$ Zellen/Kulturschale) wurden mit PBS gewaschen und für 3 h bei 37°C mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz entfernt und 3 ml EBM (mit Zusätzen und 10% FCS) zugegeben. Nach 18 bis 24 h Inkubation konnte eine maximale Protein Expression des Plasmides mit einer Transfektionseffizienz von 30-40% erzielt werden.

2.7.2.1. Klonierung von DNA-Molekülen

Die verwendeten Plasmide (Tabelle 2.4.) wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Stefanie Dimmeler zur Verfügung gestellt. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde aus humanen cDNA-Banken (Invitrogen, Niederlande) mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden mutagenisierende Primer verwendet, die geeignete Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt einfügen. Nach Restriktionsspaltung des Vektors (pcDNA3.1-*myc*-His; Invitrogen) wurde das DNA-Fragment über die entsprechenden Schnittstellen kloniert. Nach Transformation der Plasmid-DNA in kompetente *E.coli* Bakterienzellen (DH5α) wurden ausreichende Mengen DNA mittels "Qiagen Plasmid Maxi Kit" (Qiagen) isoliert.

Plasmid	Schnittstelle	Vektor	Mutation	Eigenschaft
Clusterin	BamHI/EcoRV	pcDNA3.1- <i>myc</i> -His	-	wild-typ
TRAF3		pcDNA3.1-HA	-	wild-typ
TRAF3 dn	BamHI/EcoRV	pcDNA3.1- <i>myc</i> -His	AS 1-339 wurden deletiert	dominant- negativ

Tabelle 2.4. Plasmide

2.8. "Tissue Factor"-Aktivitätsnachweis ("Clotting assay")

Zum Nachweis der "Tissue Factor" (TF)-Aktivität wurden die Zellen mit PBS (4°C) gewaschen und in PBS von der Kulturschale mittels Zellschaber entfernt. Nach Zentrifugation (1000 g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 100 µl 1 x Clotting-Puffer (8 mM Natriumacetat; 8 mM Nabarbital; 140 mM NaCl) gelöst und bei -80°C bis zur Messung gelagert. Zur Messung wurden die Zellen in einem Glasröhrchen (Becton Dickinson) im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach Inkubation der Zellen mit 100 µl humanem Citrat-Plasma (37°C) für 1 min wurde die Gerinnung des Plasmas durch Zugabe von 100 µl CaCl₂ (25 mM) induziert und die Zeit bis zur Bildung des Fibrinpfropfes gemessen. Aus der gemessenen Gerinnungszeit kann mit Hilfe einer Standardkurve die Menge des funktionellen TF ermittelt werden.

2.9. Interleukin-8-ELISA

Die Interleukin-8 (IL-8) Freisetzung aus Endothelzellen wurde im Zellkulturüberstand mittels "Quantikine Human IL-8-Immunoassay" (R&D Systems, Wiesbaden) gemessen. Die Methode wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des IL-8-ELISA beruht auf der Bindung des freigesetzten IL-8 im Zellkulturüberstand (Verdünnung 1:100) mit einem spezifischen IL-8 Antikörper, der auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert wurde und einem zusätzlichen, Peroxidase-konjugierten IL-8 Antikörper. Nach dem Waschen der Mikrotiterplatte wurde ein Substrat zugegeben, das durch die Peroxidase umgesetzt wird. Die Menge der IL-8 Freisetzung wurde anhand der Farbreaktion im ELISA-Meßgerät bei einer Wellenlänge von 450 nm nach Erstellen einer Standardkurve bestimmt.

2.10. Untersuchung der Zelladhäsion

HUVEC wurden mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 mM EDTA (pH 7,4) in PBS für 20 min bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. Nach Zentrifugation (8 min, 700 g, RT) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (8 min, 700 g, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in EBM-Medium resuspendiert, die Zellzahl

bestimmt und gleiche Anzahl von Zellen auf Kulturschalen ausplattiert. Nach Inkubation (20 min bei 37°C) wurden die adhärennten Zellen gezählt oder für die Western Blot Analyse in Puffer lysiert (Kap. 2.3.2.2.).

2.11. Thrombozyten-Isolierung und -Aktivierung

Nach der Blutentnahme von gesunden Probanden wurde das Blut (ca. 80 ml pro Versuch) zentrifugiert (20 min, 180 g, RT), um das „Platelet-Rich-Plasma“ zu gewinnen. Dieses Plasma wurde mit ACD-Puffer („Antikoagulant citrate dextrose“: 38 mM Citronensäure, 75 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 124 mM Glucose; pH 4,5) gemischt (1:1) und erneut zentrifugiert (10 min, 700 g, RT). Das Pellet wurde in 4 ml HEPES-Tyrode-Puffer (GibcoBRL; 1,8 mM CaCl₂, 2,7 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 137 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0,36 NaH₂PO₄·H₂O, 5 mM Glucose; pH 7,35) vorsichtig gelöst und zentrifugiert (10 min, 700 g, RT). Die isolierten Thrombozyten wurden in 500 µl HEPES-Tyrode-Puffer gelöst und die Zellzahl bestimmt. Für die Koinkubation (6 h, 37°C) wurden 1,5 x 10⁸ Thrombozyten mit 4 x 10⁵ HUVEC inkubiert. Die Thrombozyten wurden mit 0,2 U/ml α-Thrombin (Boehringer Mannheim) aktiviert und 5 min bei 37°C inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurden die Zellkulturschalen 2 min bei 700 g zentrifugiert, um die Thrombozyten näher an die Endothelzellen zu bringen. Anschließend wurde das α-Thrombin mit Hirudin (2 U/ml; Boehringer Mannheim) neutralisiert, um eine Aktivierung der Endothelzellen durch α-Thrombin zu verhindern.

2.12. Statistik

Die erhobenen Daten sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Die n-Zahlen beziehen sich auf die jeweilige Anzahl an unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test mit der Software von Excel bei Vergleich zweier Werte oder einer Varianzanalyse mit ANOVA und folgendem LSD („Least Significant Difference“)-Test mit der Software von SPSS bei Signifikanzberechnungen zwischen mehreren Werten. Ein p-Wert von weniger als 0,05 (*) wurde als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen: "Atlas cDNA Expression Array"

Zur Untersuchung atheroprotektiver Mechanismen, sollte die Shear Stress-regulierte Genexpression in humanen Endothelzellen (HUVEC) analysiert werden. Dazu wurden HUVEC in einem konischen Kegelplattenviskosimeter für 3 h, 6 h und 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert. Die differentielle Genexpression wurde mittels "Atlas cDNA Expression Array", der die Analyse von 588 Genen in einem Hybridisierungsexperiment ermöglicht, untersucht. Der humane "Atlas cDNA Expression Array" beinhaltet die cDNAs verschiedener Genfamilien, wie Onkogene, Tumorsuppressorgene, Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen, intrazellulären Signalmolekülen und Apoptose-relevanten Genen. Ein beispielhafter "Atlas cDNA Expression Array" ist in Abbildung 3.1. gezeigt. Die Analyse der Genexpression nach 3-facher Wiederholung des Experimentes ergab folgendes Ergebnis: insgesamt wurden 274 Gene von den 588 untersuchten Genen durch Shear Stress-Exposition nicht reguliert (Abb. 3.2.). Die Expression von 30 Genen wurde durch Shear Stress-Exposition reduziert, während 14 Gene eine biphasische Regulation zeigten. Die Expression von 270 Genen wurde durch Shear Stress erhöht, wobei die mRNA von 215 Genen leicht erhöht wurde und nur 55 Gene auf mehr als 200% der Kontrolle hochreguliert wurden.

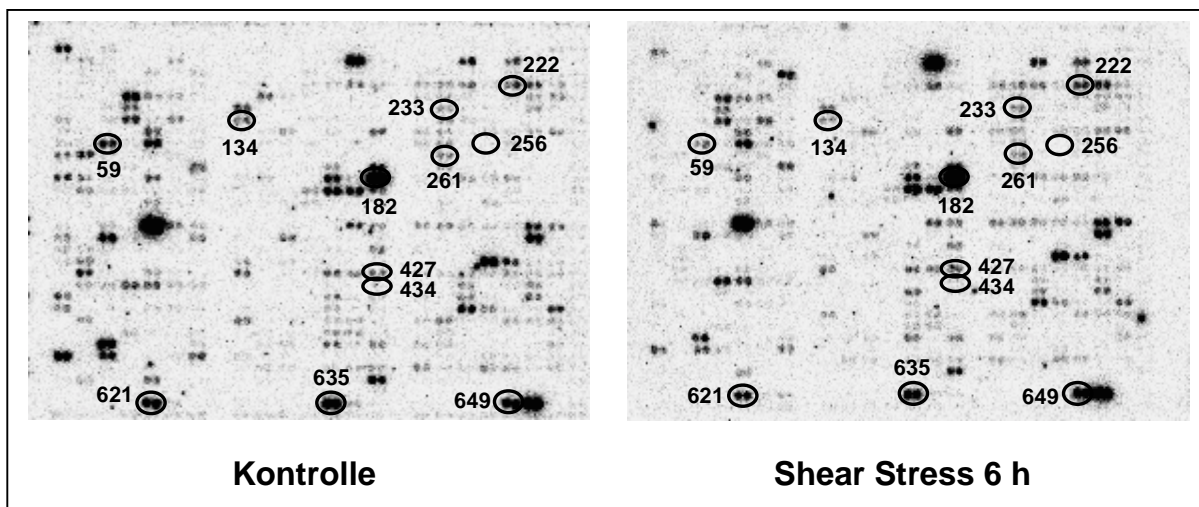
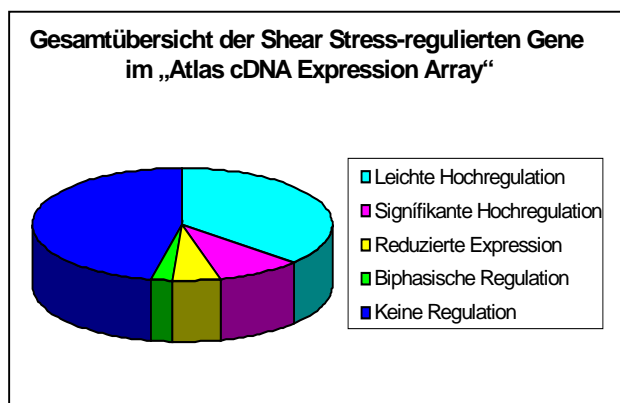


Abbildung 3.1. "Atlas cDNA Expression Array"

HUVEC wurden für 3 h, 6 h und 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert und die Genexpression mittels "Atlas cDNA Expression Array" untersucht. Die nummerierten Markierungen heben einige Gene, die für die Endothelzellbiologie von Interesse sind, hervor. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Expression der Haushaltsgene Ubiquitin, GAPDH und Aktin untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von statischen Kontrollen und Shear Stress-exponierten Zellen (6 h) aus n=3 Versuchen. 59 = rhoA; 134 = Thrombin Rezeptor; 182 = „Heat Shock Protein 27“; 222 = TRAF3; 233 = DAD-1 („defender against cell death-1“); 256 = „Apoptosis inhibitor IAP1“; 261 = Clusterin; 427 = Integrin α5; 434 = Integrin β1; 621 = Ubiquitin; 635 = GAPDH; 649 = Aktin.



	Anzahl der Gene	%
Gesamt	588	100
Leichte Hochregulation (≤ 200% der Kontrolle)	215	37
Signifikante Hochregulation (≥ 200% der Kontrolle)	55	9
Reduzierte Expression	30	5
Biphasische Regulation	14	2
Keine Regulation (70-130% der Kontrolle)	274	47

Abbildung 3.2. Shear Stress-regulierte Genexpression

HUVEC wurden für 3 h, 6 h und 12 h laminarem Shear Stress exponiert (15 dynes/cm²) und die Genexpression mittels "Atlas cDNA Expression Array" untersucht. Die Gesamtauswertung zeigt die Regulation der 588 Gene in absoluten Zahlen und in Prozent der untersuchten Gene.

Zur Überprüfung des „Atlas cDNA Expression Array“ wurde die Expression von bekannten Shear Stress-regulierten Genen untersucht. Die Shear Stress-induzierte Expression des antioxidativen Enzyms Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD), die bereits von Inoue und Mitarbeitern gezeigt wurde (157), konnte mittels „Atlas cDNA Expression Array“ bestätigt werden (Shear Stress 12 h: $182 \pm 6\%$ der Kontrolle). Die publizierte Shear Stress-induzierte Expression von TGF β 1 (116), konnte ebenfalls nachgewiesen werden (SS 12 h: $184 \pm 23\%$ der Kontrolle). Desweiteren konnte die gleichbleibende Expression von E-Selektin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) (158). Da Shear Stress antiinflammatorisch wirksam ist, wurden zunächst die Gene untersucht, die möglicherweise zu den entzündungshemmenden Effekten von Shear Stress beitragen könnten. Wie in Tabelle 3.1. und Abbildung 3.1. gezeigt, stimulierte Shear Stress die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin (siehe Kap. 3.2.). Weiterhin induzierte Shear Stress die Expression des zytoplasmatischen Adapterproteins TRAF3, das an der CD40-Signaltransduktion beteiligt ist, während die mRNA des CD40 Rezeptors (CD40) reduziert und der CD40 Ligand (CD40L) durch Shear Stress-Exposition nicht reguliert wurde (Tabelle 3.1. und Daten nicht gezeigt). Die Expression des Thrombin Rezeptors, der proinflammatorisch wirksam ist, blieb durch Exposition mit laminaem Shear Stress unverändert, ebenso die Chemokine Interleukin-8 und RANTES und das Zytokin Interferon γ . Auch der OX40 Ligand (gp34), der zur TNF-Familie gehört, wurde durch Shear Stress Exposition nicht reguliert.

Da Shear Stress die Apoptose von Endothelzellen inhibiert, wurden zusätzlich die Apoptose-regulierenden Gene analysiert (Tabelle 3.1. und Abbildung 3.1.). Beispielsweise wurde die mRNA des antiapoptotischen Proteins DAD-1 („defender against cell death-1“) durch Shear Stress-Exposition erhöht. Die Expression der Apoptose-Inhibitoren IAP1, IAP2 und XIAP, die ihren antiapoptotischen Effekt durch direkte Hemmung der Caspase-Kaskade vermitteln, konnte mittels „Atlas cDNA Expression Array“ nicht detektiert werden, was auf eine sehr geringe Expression schließen lässt. Shear Stress-Exposition erhöhte ebenfalls die mRNA Expression der „Heat Shock Proteine“ Hsp 27 und Hsp 70. Es konnte jedoch auch eine Hochregulation von proapoptotischen Genen wie z.B. die Mitglieder der Bcl-2-Familie Bak und Bax gezeigt werden, wohingegen die Expression von Bcl-X unverändert blieb. Shear Stress erhöhte die Expression des antiapoptotischen Proteins A1, das ebenfalls zur Familie der Bcl-2-Proteine gehört. Die Familie der Cystein-Proteasen (Caspasen) wurde durch

Shear Stress-Exposition unterschiedlich reguliert. Beispielsweise wurde die Expression der Caspase-9 durch Shear Stress erhöht, während die Caspasen-3 und -7 nicht reguliert wurden. Auch die Expression des Zytokins $\text{TNF}\alpha$, das in Endothelzellen Apoptose auslöst, und des Fas Ligand Rezeptors blieben unverändert (Tabelle 3.1.).

Die Exposition von Endothelzellen mit laminarem Shear Stress verändert auch die Morphologie der Zellen. Daher wurden Proteine, die potentiell an der Mechanotransduktion von hämodynamischen Kräften beteiligt sein könnten, untersucht. Die Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ (Integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 1$), die die Mechanotransduktion, Adhäsion und Migration von Endothelzellen vermitteln, wurden durch Shear Stress-Exposition erhöht, während die Expression von Integrin αv , einer Vitronektin-Rezeptor-Untereinheit, unverändert blieb. Die Integrine $\alpha 6$, $\beta 4$ und $\beta 6$ wurden durch Shear Stress-Exposition ebenfalls nicht signifikant reguliert. Im Gegensatz dazu, reduzierte Shear Stress die Expression der GTPase rhoA (Tabelle 3.1.).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Shear Stress-induzierte Expression der potentiell antiinflammatorisch wirksamen Proteine Clusterin und TRAF3 und der möglichen Mechanotransduktoren Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 1$ untersucht. Desweiteren wurde sowohl die physiologische Relevanz als auch der Mechanismus der Shear Stress-induzierten Genexpression dieser Proteine in Endothelzellen analysiert (Kap. 3.2. - 3.4).

Protein bzw. Gen	Regulation durch Shear Stress nach 6 h (% Kontrolle)
Inflammation:	
CD40 Rezeptor (CD40)	56 ± 13
Clusterin	225 ± 54
Interferon γ	147 ± 62
Interleukin-8	105 ± 45
OX40 Ligand (gp34)	115 ± 36
RANTES	73 ± 16
Thrombin Rezeptor	164 ± 79
TRAF3	315 ± 132
Apoptose:	
A1 Protein	250 ± 98
„Apoptosis inhibitors“ IAP1, IAP2, XIAP	nicht detektierbar
Bak	378 ± 65
Bax	369 ± 226
Bcl-X	130 ± 84
Caspase-3	182 ± 99
Caspase-7	105 ± 22
Caspase-9	238 ± 116
DAD-1 (“defender against cell death-1”)	280 ± 143
Fas Ligand Rezeptor	113 ± 14
Heat Shock Proteine Hsp 27 und Hsp70	207 ± 101 bzw. 218 ± 47
TNF α	156 ± 51
Zytoskelett/Mechanotransduktion:	
Integrin α 3	163 ± 25
Integrin α 5	283 ± 41
Integrin α 6	150 ± 30
Integrin α v	133 ± 71
Integrin β 1	215 ± 27
Integrin β 4	60 ± 52
Integrin β 6	166 ± 99
RhoA	61 ± 40

Tabelle 3.1. Die Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen

3.2. Shear Stress erhöht die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin

Die Aktivierung des Komplementsystems ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (11,24). Sowohl der terminale Komplementkomplex C5b-9 als auch Komplementfaktoren aktivieren Endothelzellen, indem sie eine inflammatorische Reaktion auslösen. Das Komplementsystem wird durch Inhibitoren, wie Clusterin und CD59, reguliert, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern (39). Daher könnte die Shear Stress-induzierte Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin für die antiinflammatorische Wirkung von Shear Stress auf Endothelzellen von Bedeutung sein.

Die Ergebnisse des "Atlas cDNA Expression Array" haben gezeigt, daß die mRNA Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin durch Shear Stress-Exposition nach 6 h auf $225\pm 54\%$ der Kontrolle erhöht wurde. Zur Bestätigung dieser erhöhten mRNA Expression wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 3.3.A gezeigt, induzierte Shear Stress auch in der Analyse der mRNA mittels Northern Blot zeit-abhängig die Expression von Clusterin. Als weiteres Komplement-inhibitorisches Protein wurde die Expression von CD59 untersucht. Im Gegensatz zur Shear Stress-induzierten Expression von Clusterin, blieb die mRNA Expression des Komplement-Inhibitors CD59 durch Shear Stress-Exposition unverändert (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestätigung der erhöhten Clusterin Expression auf Protein-Ebene wurde ein Western Blot durchgeführt. Shear Stress induzierte zeit-abhängig die Clusterin Protein Expression mit einem maximalen Anstieg auf $164\pm 22\%$ der Kontrolle nach 18 h Exposition (Abb. 3.3.B). Diese Ergebnisse zeigen, daß Shear Stress spezifisch die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin auf mRNA- und Proteinebene erhöht, während die Expression des Komplement-Inhibitors CD59 unverändert blieb.

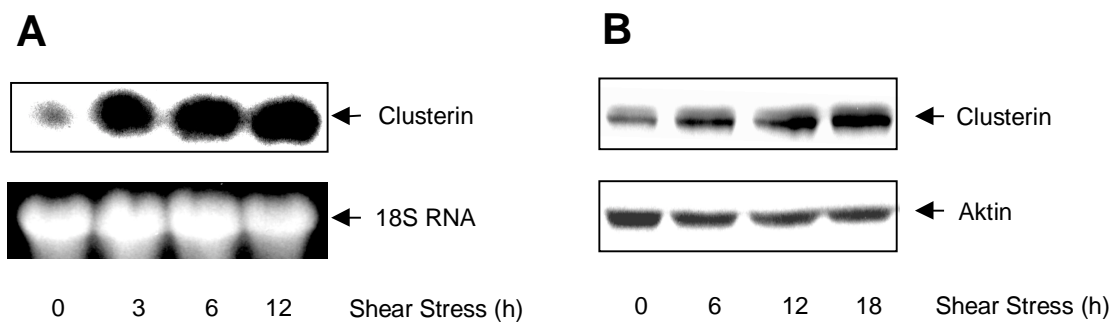


Abbildung 3.3. Shear Stress erhöht die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert. (A) Nach RNA-Isolation wurde die Clusterin mRNA Expression mittels Northern Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 18S RNA dargestellt. (B) Nach Protein-Präparation wurde die Clusterin Expression mittels Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression untersucht. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=3.

3.2.1. Shear Stress hemmt die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen

Da Shear Stress die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin erhöht (Kap. 3.2.), sollte untersucht werden, ob Shear Stress die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen durch Erhöhung der Clusterin Expression inhibiert. Als funktionelle Relevanz für die Aktivierung von Endothelzellen wurde die MCP-1 Expression mittels Northern Blot-Analyse und die IL-8 Freisetzung im ELISA bestimmt.

Wie in Abbildung 3.4. gezeigt, führte die Inkubation von HUVEC mit humanem Komplementserum, das alle Komplementfaktoren zur Aktivierung des Komplementsystems enthält, zu einer zeit- und dosis-abhängigen Erhöhung der MCP-1 Expression in Endothelzellen. Auch die Expression von IL-8 wurde durch Stimulation mit Komplementserum zeit- und dosis-abhängig induziert (Abb. 3.5.B und Daten nicht gezeigt). Die Inkubation der Endothelzellen mit Komplementserum wurde in Endothelzell-Medium mit 1% BSA (ohne Zusätze und FCS) durchgeführt, da Komplementfaktoren und -inhibitoren, die im FCS enthalten sind, die Wirkung des eingesetzten humanen Komplementserums beeinflussen könnten. Um den Effekt von Shear Stress auf die MCP-1 und IL-8 Expression zu untersuchen, wurden HUVEC für 18 h Shear Stress präexponiert, mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 U/ml; 0,2 U/ml;

0,5 U/ml) Komplementserum stimuliert und für weitere 6 h Shear Stress exponiert. Wie in Abbildung 3.5. dargestellt, reduzierte Shear Stress signifikant die Komplement-induzierte MCP-1 und IL-8 Expression in Endothelzellen.

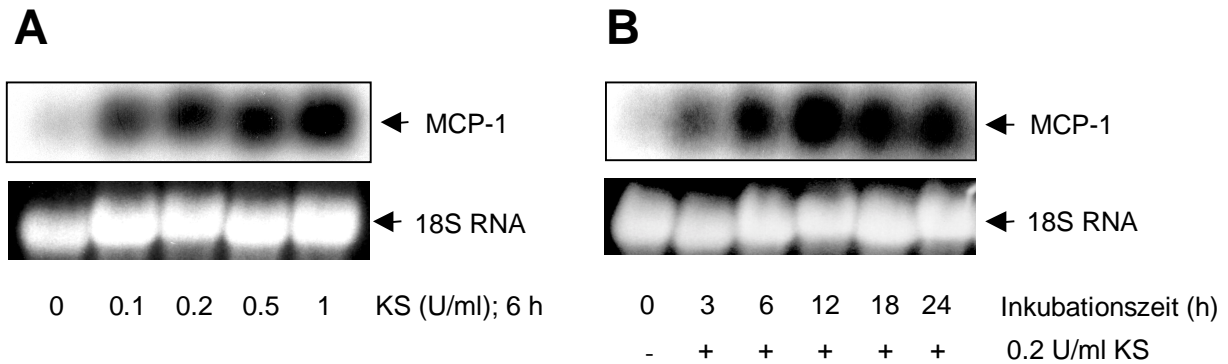


Abbildung 3.4. Komplementserum induziert zeit- und dosis-abhängig die MCP-1 Expression

A/B, HUVEC wurden für 6 h mit den angegebenen Konzentrationen humanem Komplementserum (KS) in EBM-Medium + 1% BSA inkubiert (A) oder mit 0,2 U/ml Komplementserum für die angegebenen Zeiträume in EBM-Medium + 1% BSA inkubiert (B) und die MCP-1 Expression mittels Northern Blot analysiert. Zum Nachweis der Gleichladung ist die 18S RNA gezeigt. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=3.

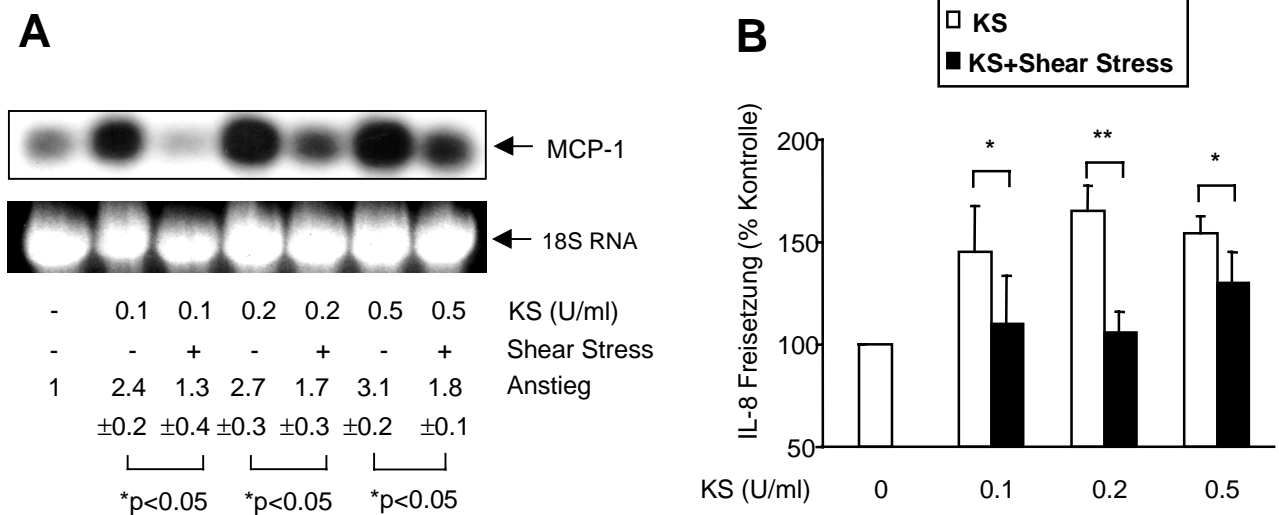


Abbildung 3.5. Shear Stress inhibiert die Komplement-induzierte MCP-1 und IL-8 Expression

HUVEC wurden für 18 h laminarem Shear Stress in EBM-Medium + 1% BSA exponiert (15 dynes/cm²), mit den angegebenen Konzentrationen humanem Komplementserum (KS) stimuliert und für weitere 6 h Shear Stress exponiert. (A) Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot untersucht und densitometrisch ausgewertet. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 18S RNA dargestellt. (B) Die IL-8 Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, (A) n=4 und (B) n=5, *p<0,05; **p<0,001 versus KS).

3.2.2. Rolle des Komplement-Inhibitors Clusterin

Die in Kapitel 3.2.1. beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen, gemessen an der MCP-1 und IL-8 Expression, durch Shear Stress-Exposition gehemmt werden kann. Da Shear Stress die mRNA- und Protein Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin erhöht, sollte nun die Beteiligung von Clusterin an dem protektiven Effekt von Shear Stress auf die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Wirkung von Clusterin durch Überexpression untersucht. Abbildung 3.6.A zeigt das überexprimierte *myc*-markierte Clusterin im Vergleich zu endogenem Clusterin. Die Überexpression der Clusterin-cDNA (wt) in Endothelzellen reduzierte signifikant die Komplement-induzierte Expression von MCP-1 und IL-8, im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zellen (Abb. 3.6.B und Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Expression von Clusterin spezifisch durch Transfektion von Clusterin-Antisense-Oligonukleotiden gehemmt. Der Western Blot in Abb. 3.7.A zeigt, daß die Transfektion von Clusterin-Antisense-Oligonukleotiden die Expression von Clusterin deutlich reduzierte, während Sense-Oligonukleotide keinen Effekt hatten. Nach der Oligonukleotid-Transfektion wurden die Zellen für 18 h Shear Stress exponiert, mit Komplementserum stimuliert und für weitere 6 h Shear Stress exponiert. In Sense-Oligonukleotid-transfizierten Zellen reduzierte Shear Stress signifikant die Komplement-induzierte MCP-1 und IL-8 Expression (Abb. 3.7.B/C). Als Kontrolle wurden zusätzlich zufällig gemischte Oligonukleotide ("scrambled") transfiziert, die einen ähnlichen Effekt erzielten wie die Sense-Oligonukleotid-Transfektion (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu, wurde der Komplement-inhibitorische Effekt von Shear Stress auf die MCP-1 Expression in Clusterin-Antisense-transfizierten Zellen geringfügig, aber signifikant reduziert (Abb. 3.7.B). Weiterhin konnte eine geringe Reduktion des inhibitorischen Effektes von Shear Stress auf die Komplement-induzierte IL-8 Freisetzung gezeigt werden (Abb. 3.7.C). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Shear Stress über die Erhöhung der Clusterin Expression die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen hemmt.

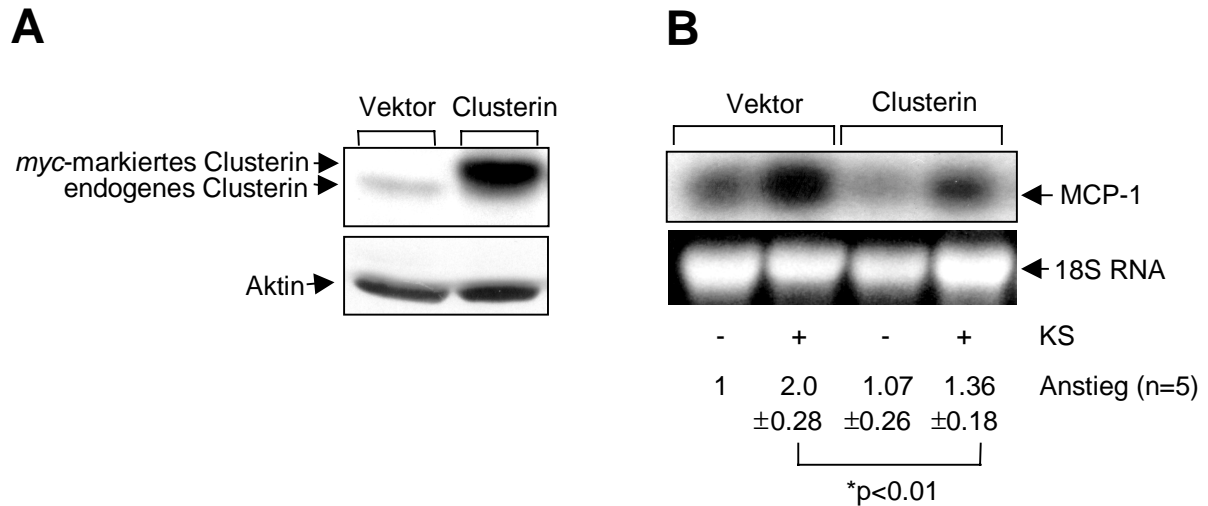


Abbildung 3.6. Clusterin hemmt die Komplement-induzierte MCP-1 Expression

A, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder Clusterin (wt) transfiziert. Die Expression des endogenen Clusterin und des transfizierten *myc*-markierten Clusterin wurde mittels Western Blot nach 24 h untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

B, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder Clusterin (wt) transfiziert und nach 18 h mit humanem Komplementserum (KS: 0,2 U/ml) für 6 h in EBM-Medium + 1% BSA inkubiert. Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot untersucht und densitometrisch ausgewertet. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 18S RNA dargestellt. Die Ergebnisse sind als Prozent der "Leervektor-Kontrolle" angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=5).

3.3. Shear Stress erhöht die Expression des Adapterproteins TRAF3

Das CD40/CD40L-System ist an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (10). Die bedeutende Rolle des CD40-Systems konnte im Tiermodell gezeigt werden. Sowohl frühe atherosklerotische Läsionen als auch das Fortschreiten der Atherosklerose sind in CD40L/ApoE-Knockout-Mäusen deutlich reduziert (51,54). Die CD40-Signalkaskade wird durch zytoplasmatische Adapterproteine, TRAFs, vermittelt. TRAF3 ist dabei von besonderem Interesse, da es über die Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B potentiell antiinflammatorisch wirksam ist und möglicherweise die CD40-Signaltransduktion hemmt.

Mittels "Atlas cDNA Expression Array" wurde die mRNA Expression des zytoplasmatischen Adapterproteins TRAF3 untersucht. Wie in Kapitel 3.1. bereits beschrieben, erhöhte Shear Stress-Exposition die TRAF3 mRNA Expression. Zur Bestätigung der Shear Stress-induzierten TRAF3 mRNA Expression wurde ein "RNase Protektion Assay" (RPA) durchgeführt. Wie in Abbildung 3.8. gezeigt, erhöhte die Exposition von Endothelzellen mit Shear Stress zeit-abhängig die mRNA Expression des Adapterproteins TRAF3 mit einem maximalen Anstieg von $256\pm 31\%$ der Kontrolle nach 12 h. Desweiteren wurde die TRAF3 Expression auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Shear Stress induzierte die TRAF3 Proteinexpression mit einem Maximum nach 18 h ($188\pm 14\%$ der Kontrolle; Abb. 3.9.A). Zusätzlich induzierte Shear Stress dosis-abhängig die TRAF3 Protein Expression nach 18 h Shear Stress-Exposition mit 5, 15 und 45 dynes/cm² (Abb. 3.9.B). Im Gegensatz dazu, blieb die Protein Expression der homologen Proteine TRAF2 und TRAF5 nach Shear Stress-Exposition unverändert (Abb. 3.10.A/B). Auch der CD40 Rezeptor, der über die zytoplasmatische Domäne mit TRAF3 assoziiert ist, wird durch Shear Stress auf Proteinebene nicht reguliert, obwohl eine Reduktion der mRNA des CD40 Rezeptors gezeigt wurde (Tabelle 3.1. und Abb. 3.10.C). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß Shear Stress spezifisch die CD40-Signalkaskade über die Erhöhung der TRAF3 Expression beeinflusst.

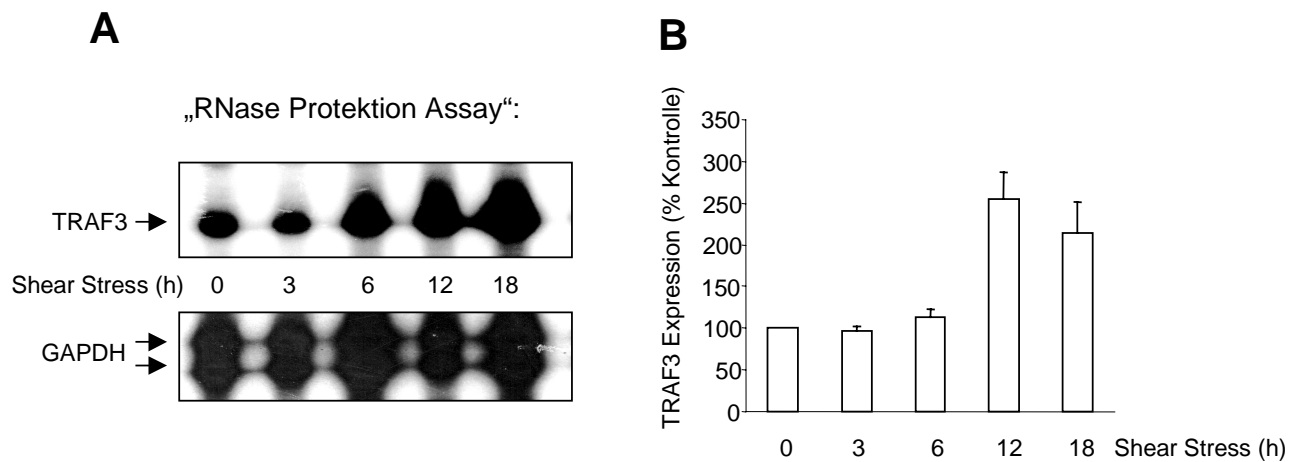


Abbildung 3.8. Shear Stress induziert die mRNA Expression des zytoplasmatischen Adapterproteins TRAF3

A, HUVEC wurden für 3 h, 6 h, 12 h, 18 h laminarem Shear Stress exponiert (15 dynes/cm^2) und die mRNA Expression mittels "RNase Protektion Assay" untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Expression der GAPDH dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n=3$. (B) Die TRAF3 mRNA Expression wurde densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$).

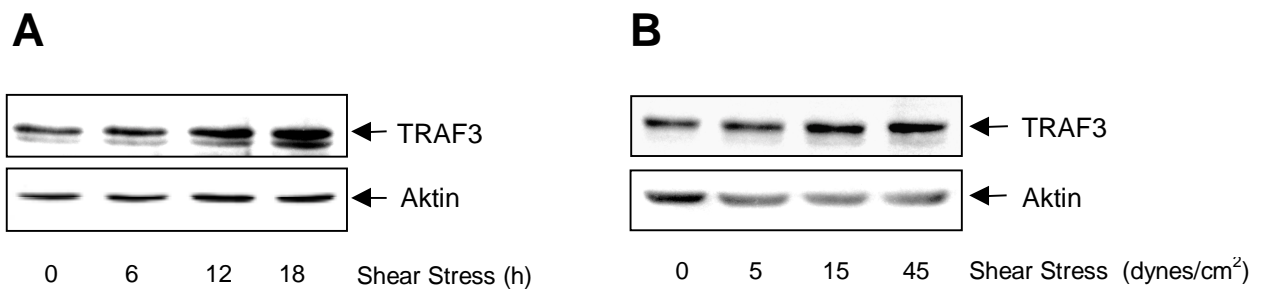


Abbildung 3.9. Shear Stress erhöht zeit- und dosis-abhängig die Protein Expression von TRAF3

A, Die TRAF3 Protein Expression wurde nach 6 h, 12 h, 18 h Shear Stress-Exposition (15 dynes/cm^2) oder (B) nach 18 h Shear Stress-Exposition ($5, 15, 45 \text{ dynes/cm}^2$) mittels Western Blot analysiert. Die Expression von Aktin wurde zum Nachweis der Ladungsgleichheit verwendet. Gezeigt sind repräsentative Experimente aus $n=3$.

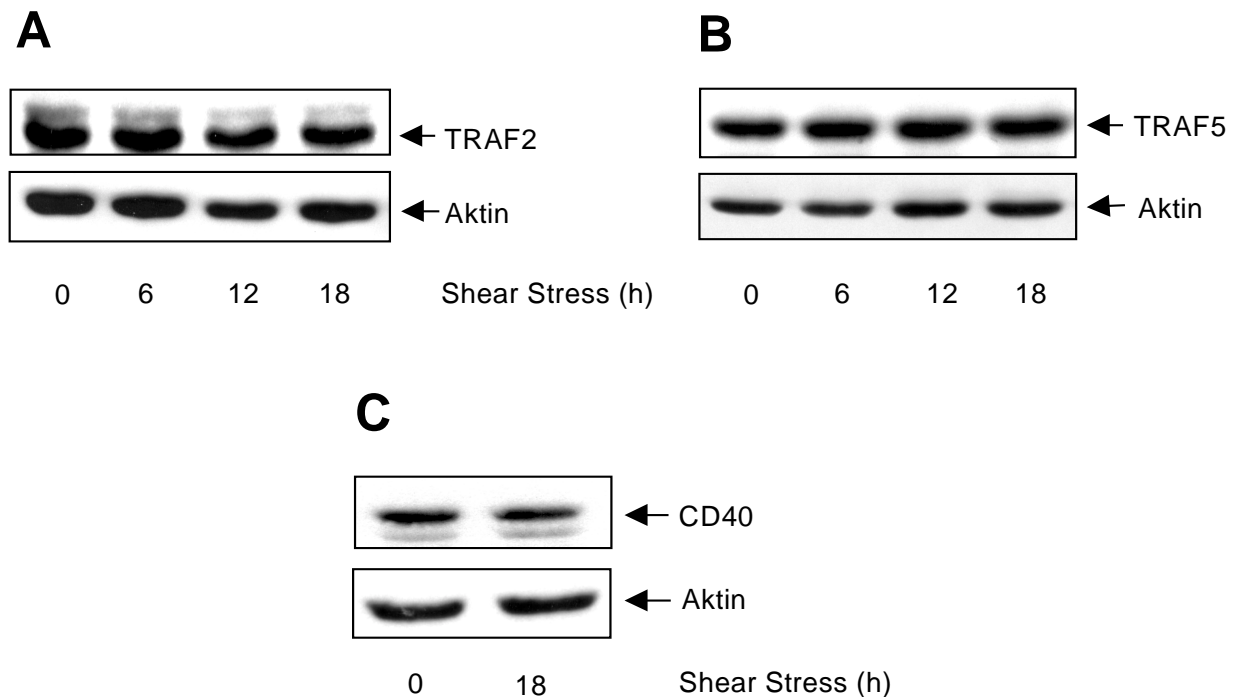


Abbildung 3.10. Effekt von Shear Stress auf die TRAF2, TRAF5 und CD40 Expression

A/B, HUVEC wurden für 6 h, 12 h, 18 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert und (A) die TRAF2 und (B) TRAF5 Protein Expression mittels Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde Aktin dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Experimente aus $n=3$.

C, Der Effekt von Shear Stress auf die CD40 Expression wurde mittels Western Blot nach 18 h Shear Stress-Exposition (15 dynes/cm^2) untersucht. Zum Nachweis der Ladungsgleichheit wurde die Expression von Aktin dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n=3$.

3.3.1. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte MCP-1 Expression

Da Shear Stress atheroprotektiv wirksam ist und das potentiell inhibitorische Protein TRAF3 erhöht, sollte der Effekt von Shear Stress auf die CD40 Liganden (CD40L)-induzierte Aktivierung von Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurde die CD40L-induzierte MCP-1 Expression mittels Northern Blot analysiert. HUVEC wurden für 12 h mit laminarem Shear Stress exponiert, mit verschiedenen Konzentrationen des rekombinanten, humanen CD40L inkubiert und erneut für 6 h Shear Stress exponiert. Wie in Abb. 3.11. gezeigt, reduzierte Shear Stress-Exposition signifikant die CD40L-induzierte MCP-1 Expression.

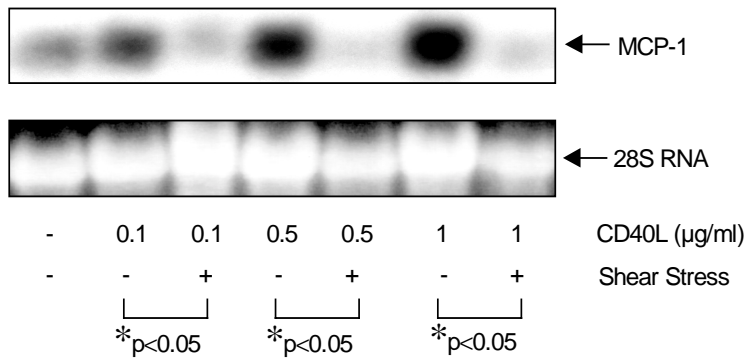


Abbildung 3.11. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte MCP-1 Expression

HUVEC wurden für 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert, mit den angegebenen Konzentrationen humanem CD40 Liganden (CD40L) stimuliert und für weitere 6 h Shear Stress exponiert. Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 28S RNA dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=4.

3.3.2. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte "Tissue Factor" Expression

Die "Tissue Factor" (TF) Aktivität ist an der Entzündungsreaktion von Endothelzellen beteiligt, da es die Initiation der Gerinnungskaskade katalysiert und somit prothrombotisch wirksam ist. Die Ergebnisse in Kapitel 3.3.1. haben gezeigt, daß Shear Stress die CD40L-induzierte MCP-1 Expression hemmt. Daher stellte sich die Frage, ob Shear Stress die CD40L-induzierte TF Expression inhibiert. Die TF Aktivität bzw. Expression wurde mit Hilfe eines Gerinnungs-Nachweises („Clotting assay“) bestimmt. Dabei wurde die Koagulationsaktivität von Endothelzellen aufgrund ihrer TF Expression in Citrat-Plasma nach Zugabe von Kalziumchlorid bestimmt. HUVEC wurden für 12 h mit laminarem Shear Stress exponiert, mit humanem CD40L (0,5 µg/ml) inkubiert und erneut für 6 h Shear Stress exponiert. Wie in Abb. 3.12. gezeigt, reduzierte Shear Stress-Exposition signifikant die CD40L-induzierte TF Expression.

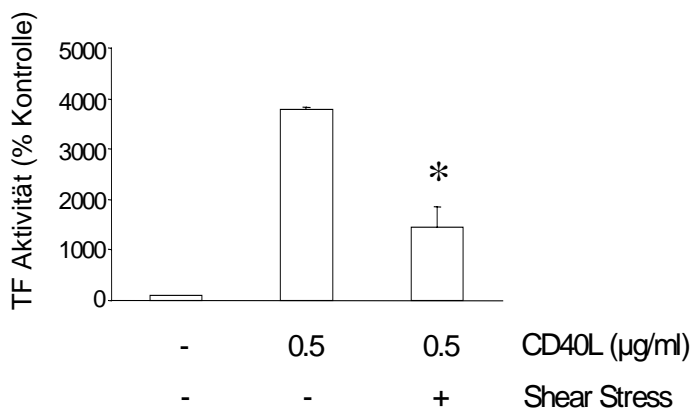


Abbildung 3.12. Shear Stress hemmt die CD40L-induzierte "Tissue Factor" Aktivität

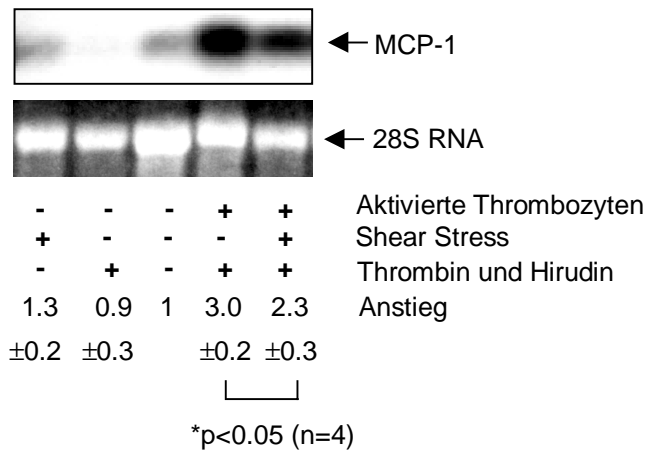
HUVEC wurden für 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert, mit 0,5 µg/ml humanem CD40L stimuliert und für weitere 6 h Shear Stress exponiert. Die "Tissue Factor" (TF) Aktivität wurde mit Hilfe eines "Clotting assay" bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=3).

3.3.3. Shear Stress reduziert die Thrombozyten-induzierte MCP-1 Expression

Unter pathophysiologischen Bedingungen sind aktivierte Thrombozyten die wesentlichen Aktivatoren des CD40-Systems. Dabei führt die Aktivierung von Thrombozyten innerhalb einer Minute zur Expression eines Membran-ständigen CD40 Liganden, der dann den endothelialen CD40 Rezeptor stimuliert. Diese Aktivierung des CD40-Systems durch Thrombozyten induziert inflammatorische Prozesse in Zellen des Gefäßsystems, z.B. die Expression von IL-8, MCP-1 und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen (47,48). Da Shear Stress die CD40L-induzierte MCP-1 Expression hemmt (Kap. 3.3.1.), sollte der Effekt von Shear Stress auf die Thrombozyten-induzierte Endothelzell-Aktivierung untersucht werden. Dazu wurden Thrombozyten aus dem Blut gesunder Probanden isoliert, gezählt und mit Endothelzellen koinkubiert. Die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin wurde erst nach der Koinkubation mit den Endothelzellen durchgeführt, da Thrombozyten unmittelbar nach der Aktivierung aggregieren und dadurch eine gleichmäßige Verteilung der Thrombozyten auf den Endothelzellen nicht möglich wäre. Die Wirkung von Thrombin wurde nach 5 min mit Hirudin inaktiviert, da Thrombin auch Endothelzellen nach längerer Inkubation aktiviert (159). Die Endothelzellen wurden mit Shear Stress für 12 h präexponiert und nach Koinkubation mit den Thrombozyten für weitere 6 h Shear Stress exponiert. Wie in Abb. 3.13. gezeigt, induzierte die Inkubation mit aktivierten Thrombozyten die MCP-1 Expression in Endothelzellen ($302 \pm 11\%$ der Kontrolle). Die Präexposition von Endothelzellen mit laminarem Shear Stress reduzierte signifikant die Thrombozyten-induzierte MCP-1 Expression ($228 \pm 18\%$ der Kontrolle; Abb. 3.13.). Bei Inkubation der Endothelzellen mit Thrombin, das zur Aktivierung der Thrombozyten eingesetzt wurde, und Hirudin, das zur Neutralisierung von Thrombin verwendet wurde, blieb die MCP-1 Expression auf Kontrollniveau ($89 \pm 17\%$ der Kontrolle). Als weitere Kontrolle wurde der Effekt von nicht aktivierten Thrombozyten auf die MCP-1 Expression in Endothelzellen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, daß Shear Stress sowohl die CD40L-induzierte Expression von inflammatorischen Molekülen als auch die durch physiologische Stimuli, z.B. Thrombozyten, induzierte Aktivierung von Endothelzellen hemmt.

Abbildung 3.13. Shear Stress reduziert die Thrombozyten-induzierte MCP-1 Expression

HUVEC wurden für 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert. Danach wurden die Zellen mit aktivierten Thrombozyten, die aus dem Blut gesunder Probanden isoliert und für 5 min mit Thrombin (0,2 U/ml) aktiviert wurden, und laminarem Shear Stress für weitere 6 h inkubiert. Zum Neutralisieren des Thrombins wurde Hirudin (2 U/ml) verwendet. Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot analysiert. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 28S RNA dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=4. Die Northern Blots wurden densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse als Anstieg der Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=4).



3.3.4. TRAF3 hemmt die CD40-Signalkaskade

Die Bedeutung von TRAF3 in der Hemmung der CD40-Signalkaskade sollte durch TRAF3 Überexpression untersucht werden. Abbildung 3.14.A zeigt das überexprimierte HA-markierte TRAF3 im Vergleich zu endogenem TRAF3. In Leervektor-transfizierten Zellen induzierte die Stimulation mit rekombinantem humanem CD40L die Expression von MCP-1 und TF (Abb. 3.14.B/C). Im Gegensatz dazu, führte die Überexpression der TRAF3 cDNA (wt) zu einer signifikanten Reduktion der MCP-1 und TF Expression (Abb. 3.14.B/C). Auch die CD40L-induzierte Interleukin-8 (IL-8) Freisetzung wurde durch Überexpression von TRAF3 signifikant gehemmt (Abb. 3.14.D). Diese Ergebnisse zeigen, daß TRAF3 die CD40L-induzierte Aktivierung von Endothelzellen hemmt. Dabei wird die Synthese von proinflammatorischen Molekülen, wie MCP-1, TF und IL-8 in Endothelzellen inhibiert.

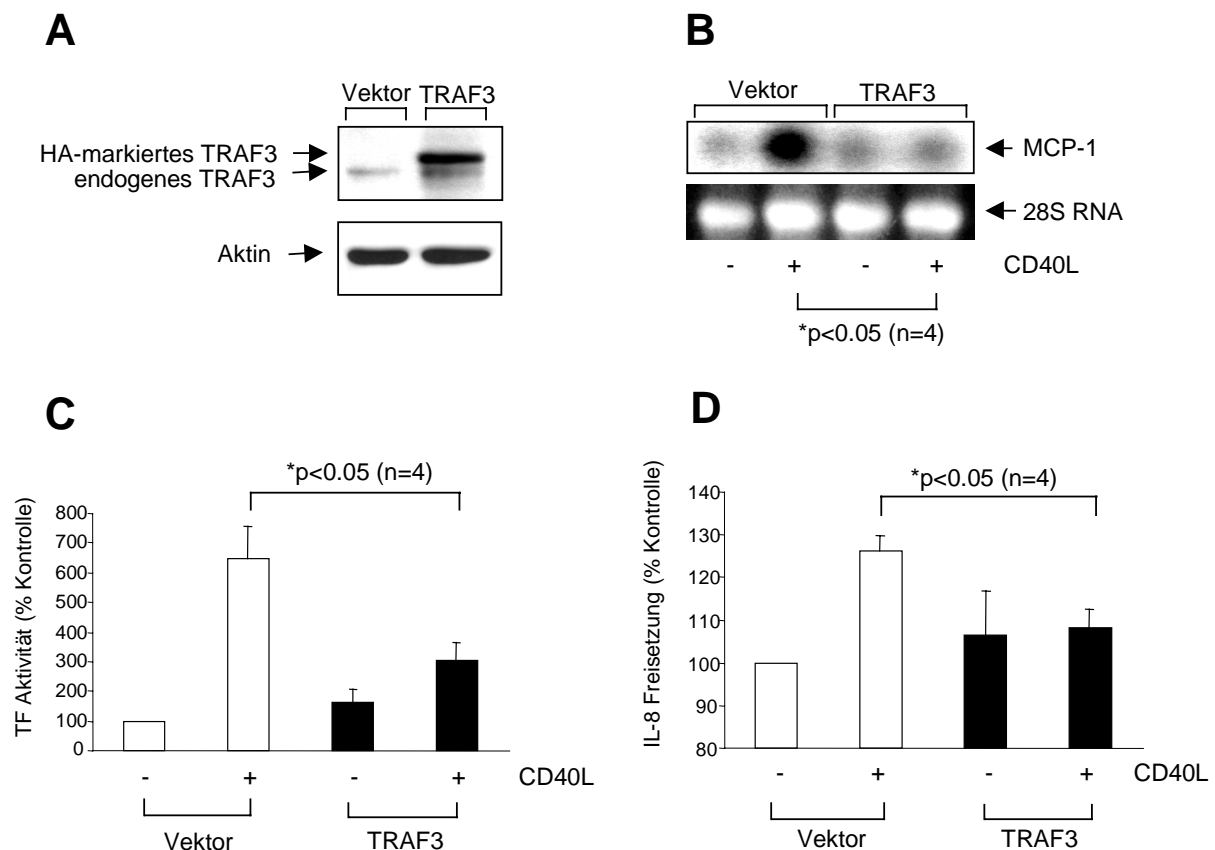


Abbildung 3.14. TRAF3 hemmt die CD40L-induzierte MCP-1, "Tissue factor" und IL-8 Expression

A, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder TRAF3 (wt) transfiziert. Die Expression des endogenen TRAF3 und des transfizierten HA-markierten TRAF3 wurde mittels Western Blot nach 24 h untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

B/C/D, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder TRAF3 (wt) transfiziert und nach 18 h mit humanem CD40L (0,5 µg/ml) für 6 h inkubiert. (B) Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot untersucht und densitometrisch ausgewertet. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 28S RNA dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=4. (C) Die "Tissue Factor" (TF) Aktivität wurde mit Hilfe eines "Clotting assay" nachgewiesen und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle dargestellt (Mittelwerte ± SEM, n=4). (D) Die IL-8 Freisetzung wurde mit einem ELISA bestimmt und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=4).

3.3.5. Bedeutung der Shear Stress-induzierten TRAF3 Expression in der Hemmung der CD40-Signalkaskade

Die Beteiligung der Shear Stress-stimulierten TRAF3 Expression in der Hemmung der CD40L-induzierten Aktivierung von Endothelzellen wurde durch Transfektion einer

dominant-negativen TRAF3-Mutante (dnTRAF3), die N-terminal deletiert wurde und die Aminosäuren 340 - 568 der Originalsequenz enthält, untersucht. Abbildung 3.15.A zeigt die Überexpression der *myc*-markierten dominant-negativen TRAF3 Mutante. Nach der Transfektion wurden die Endothelzellen für 12 h Shear Stress exponiert, mit rekombinantem CD40L stimuliert und weitere 6 h mit Shear Stress exponiert. Wie in Abbildung 3.15.B gezeigt, wurde die CD40L-induzierte MCP-1 Expression in Leervektor-transfizierten Zellen durch Shear Stress-Präexposition signifikant reduziert. Der inhibitorische Effekt von Shear Stress in dnTRAF3-transfizierten Zellen konnte jedoch nur partiell reduziert werden (Abb. 3.15.B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß TRAF3 einen Teil des inhibitorischen Effektes von Shear Stress auf das CD40-System vermittelt, möglicherweise jedoch zusätzliche protektive Mechanismen durch Shear Stress aktiviert werden.

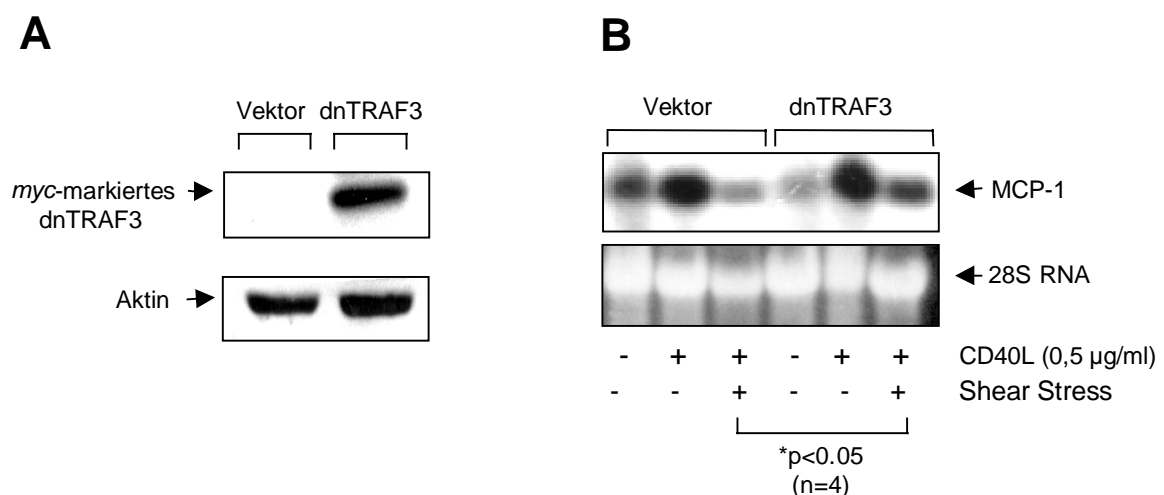


Abbildung 3.15. Dominant-negatives TRAF3 reduziert den protektiven Effekt von Shear Stress

A, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder einer dominant-negativen TRAF3-Mutante (dnTRAF3: AS 340-568) transfiziert. Die Expression des transfizierten *myc*-markierten TRAF3 wurde mittels Western Blot nach 24 h untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

B, HUVEC wurden mit einem Leervektor (pcDNA3.1) oder einer dominant-negativen TRAF3-Mutante (dnTRAF3: AS 340-568) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 12 h laminarem Shear Stress exponiert (15 dynes/cm²), anschließend mit humanem CD40L (0,5 µg/ml) und Shear Stress für weitere 6 h kokubiert. Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot analysiert. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 28S RNA dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=4.

3.3.6. TRAF3 Expression *in vivo*

Um die Bedeutung der Shear Stress-regulierten TRAF3 Expression *in vivo* zu untersuchen, wurden humane atherosklerotische Plaques von Patienten mit koronarer Herzkrankheit im Rahmen einer Endarterektomie entnommen und mit einem spezifischen Antikörper gegen TRAF3 gefärbt. Wie in Abbildung 3.16. gezeigt, wurde die TRAF3 Expression in Endothelzellen in Gefäßabschnitten über dem Plaque und in der maximalen Stenose, beides Regionen mit hohem laminarem Shear Stress, signifikant erhöht. In dem Gefäßabschnitt unterhalb des Plaques, wo niedriger oder turbulenter Fluß herrscht, wurde eine schwache TRAF3 Expression detektiert. Zusätzlich wurden weitere serielle Schnitte des Plaques mit einem CD31 Antikörper, einem spezifischen Marker für Endothelzellen, gefärbt. Zur Quantifizierung der TRAF3 Expression wurde die Intensität der Färbung von 0 (keine Färbung) bis 4 (maximale Färbung) eingestuft. Die Endothelzellen in den Gefäßregionen oberhalb des Plaques wiesen eine TRAF3 Expression von $2,56 \pm 0,22$ auf im Vergleich zu Regionen unterhalb des Plaques ($1,4 \pm 0,4$; $p=0,0045$; $n=9$). Diese Ergebnisse bestätigen, daß der Blutfluß tatsächlich auch *in vivo* die TRAF3 Expression reguliert.

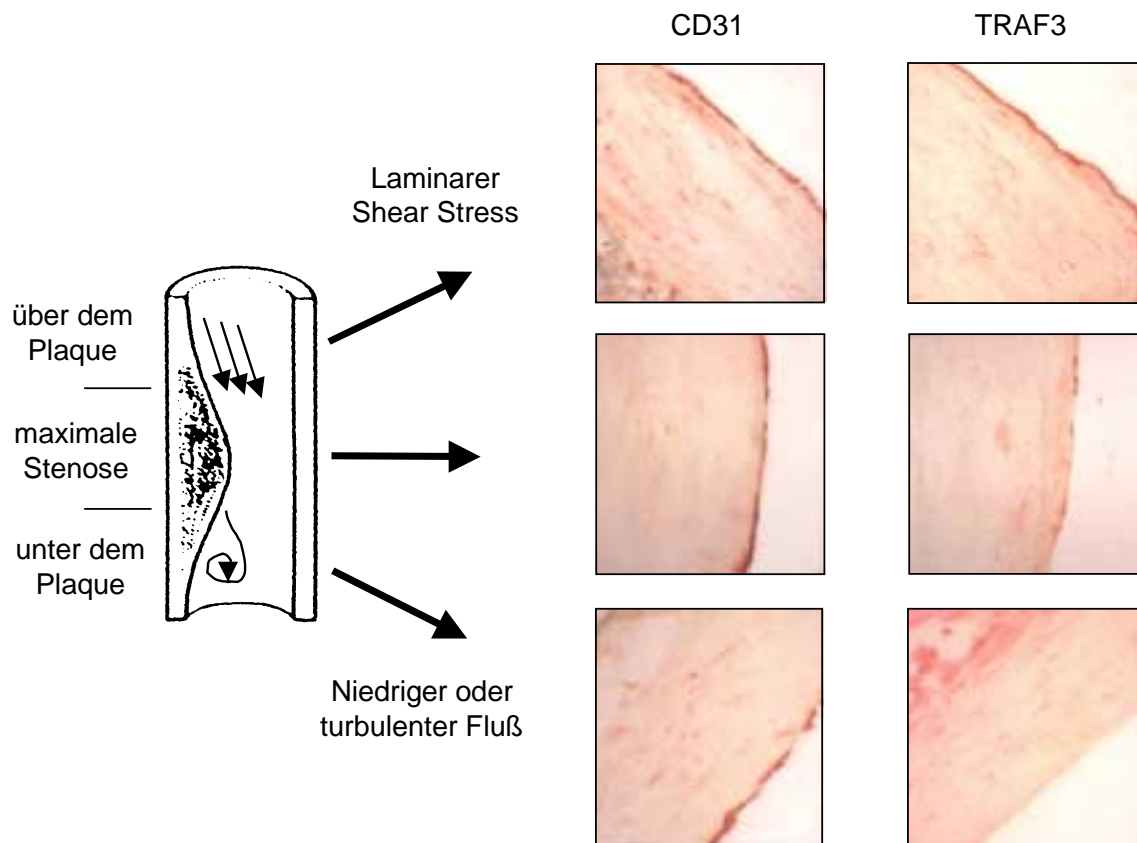


Abbildung 3.16. Shear Stress induziert die Expression von TRAF3 *in vivo*

Die immunhistochemische Analyse der TRAF3 Expression in humanen atherosklerotischen Plaques wurde im Labor von Prof. A. Tedgui (INSERM U141, Hopital Lariboisiere) in Paris durchgeführt. Humane atherosklerotische Plaques von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurden im Rahmen einer Endarterektomie entnommen und mit einem spezifischen Antikörper gegen TRAF3 gefärbt. Zum Nachweis der Endothelzellen wurden weitere serielle Schnitte des Plaques mit einem CD31 Antikörper, einem spezifischen Marker für Endothelzellen, gefärbt. Die linke Abbildung zeigt schematisch einen atherosklerotischen Plaque im Gefäß. Die Regionen, die immunhistochemisch analysiert wurden, sind markiert. Die Pfeile deuten auf die Strömungsbedingungen des Blutflusses in den Gefäßabschnitten hin. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=9.

3.3.7. Mechanismus des inhibitorischen Effektes von TRAF3 auf die CD40-Signalkaskade

Zur Untersuchung des inhibitorischen Effektes von TRAF3 auf die CD40-Signalkaskade wurde die Lokalisation von TRAF3 in Endothelzellen analysiert. Um die bereits beschriebene Interaktion von TRAF3 mit der zytoplasmatischen Domäne des CD40 Rezeptors zu untersuchen, wurden HUVEC mit TRAF3 cDNA (wt) transfiziert. Nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen den CD40 Rezeptor wurde die Bindung

von TRAF3 mittels Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 3.17. gezeigt, konnte keine Interaktion von TRAF3 mit dem CD40 Rezeptor mittels Immunpräzipitation detektiert werden. Der Western Blot wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD40 entwickelt, um sicherzustellen, daß CD40 immunpräzipitiert wurde. Als weitere Kontrolle wurde die TRAF3 Expression im Kontrollextrakt nachgewiesen. Um unspezifische Banden des CD40 Rezeptor-Antikörpers auszuschließen, wurde der Antikörper in Lysispuffer inkubiert und ebenfalls dargestellt (Abb. 3.17.).

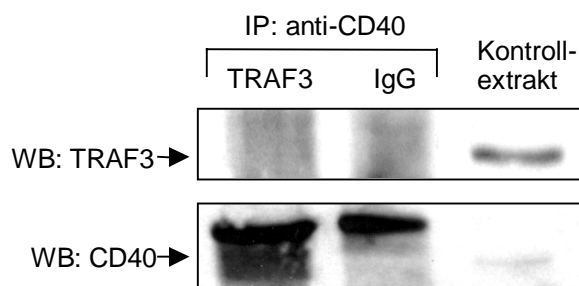


Abbildung 3.17. TRAF3 interagiert nicht mit dem CD40 Rezeptor

HUVEC wurden mit TRAF3 (wt) transfiziert. CD40 wurde immunpräzipitiert und TRAF3 im Western Blot untersucht. Der Western Blot wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen CD40 entwickelt, um das immunpräzipitierte CD40 nachzuweisen. Die TRAF3 Expression wurde im Kontrollextrakt detektiert. Zusätzlich wurde der CD40 Antikörper in Lysispuffer inkubiert und aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

Da die Interaktion von TRAF3 mit dem CD40 Rezeptor nicht gezeigt werden konnte, sollte nun die Lokalisation von TRAF3 in Endothelzellen mittels Immunfärbung untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, daß TRAF3 hauptsächlich im oder am Kern lokalisiert ist, während TRAF5 gleichmäßig im Zytoplasma und Kern verteilt ist (Abb. 3.18.). Zum Nachweis der Kerne wurden die Zellen mit DAPI gefärbt. Die Lokalisation von TRAF3 im Kern konnte ebenfalls in der Western Blot Analyse bestätigt werden. Dazu wurden HUVEC mit humanem CD40L für 6 h stimuliert, die Proteine der Kern- und Zytoplasmafraktion isoliert und die TRAF3 Expression im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 3.19. dargestellt, lokalisiert TRAF3 hauptsächlich in der Kernfraktion. Zum Nachweis der Kern-Zytoplasma-Separation wurde die Expression der Topoisomerase I, die sich ausschließlich im Kern befindet, gezeigt (Abb. 3.19.).

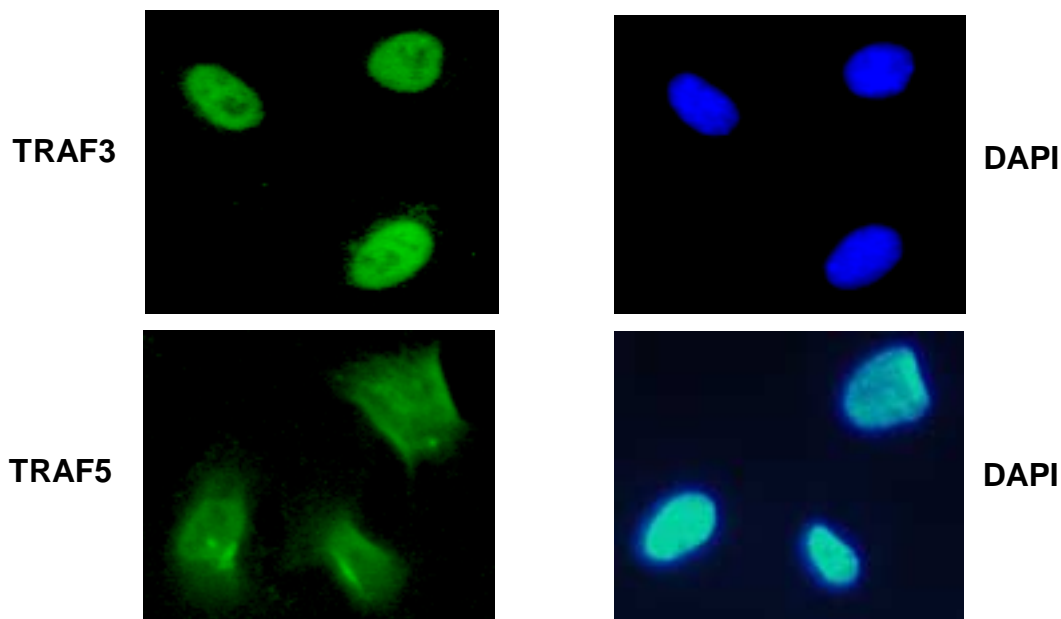


Abbildung 3.18. Lokalisation von TRAF3 und TRAF5 in Endothelzellen

HUVEC wurden mit einem Antikörper gegen TRAF3 oder TRAF5 und einem FITC-konjugierten Zweitantikörper gefärbt und photographiert. Zum Nachweis der Kerne wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=3.

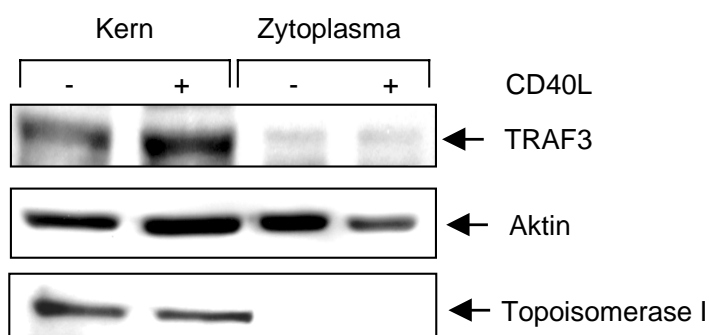


Abbildung 3.19. TRAF3 lokalisiert hauptsächlich im Zellkern

HUVEC wurden mit humanem CD40L (0,5 µg/ml) für 6 h inkubiert. Nach Separation der Kern- und Zytoplasma-Proteine wurde die TRAF3 Expression im Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression gezeigt. Die Isolierung der Kern-Proteine wurde durch Expression der Topoisomerase I nachgewiesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

Die Expression von proinflammatorischen Molekülen, wie MCP-1, IL-8 und TF, kann über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFκB, AP-1 und SP-1 vermittelt werden (160,161). Da NFκB der klassische inflammatorische Transkriptionsfaktor ist, der eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen aktiviert, sollte zunächst die Beteiligung von NFκB an der CD40-induzierten Aktivierung von Endothelzellen untersucht werden. Die CD40-vermittelte Aktivierung von NFκB erfolgt

über die Phosphorylierung und Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α (56,57). Aus diesem Grund wurden HUVEC für verschiedene Zeitpunkte mit CD40L stimuliert und die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Expression von I κ B α blieb nach Inkubation mit CD40L zu den angegebenen Zeitpunkten unverändert (Abb. 3.20.A). Auch die Koinkubation der Endothelzellen mit CD40L und Shear Stress hatte keinen Einfluß auf die Stabilität von I κ B α (Abb. 3.20.A). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit TNF α stimuliert. Wie in Abbildung 3.20.A gezeigt, induzierte TNF α die Degradation von I κ B α . Zum Nachweis, daß die CD40-vermittelte MCP-1 Expression tatsächlich nicht über NF κ B mediert wird, wurde der NF κ B-Inhibitor PDTC eingesetzt. Die Koinkubation mit PDTC hatte keinen Effekt auf die CD40L-induzierte MCP-1 Expression (Abb. 3.20.B). Auch die alleinige Inkubation mit PDTC hatte keinen Einfluß auf die MCP-1 Expression (Daten nicht gezeigt). Zusätzliche Kontrollexperimente bestätigten die inhibitorische Wirkung von PDTC auf die TNF α -induzierte MCP-1 Expression (Daten nicht gezeigt). Da die Stimulation mit CD40L keinen Einfluß auf die Degradation von I κ B α hatte und der NF κ B-Inhibitor PDTC die CD40L-induzierte MCP-1 Expression nicht inhibierte, kann eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B ausgeschlossen werden.

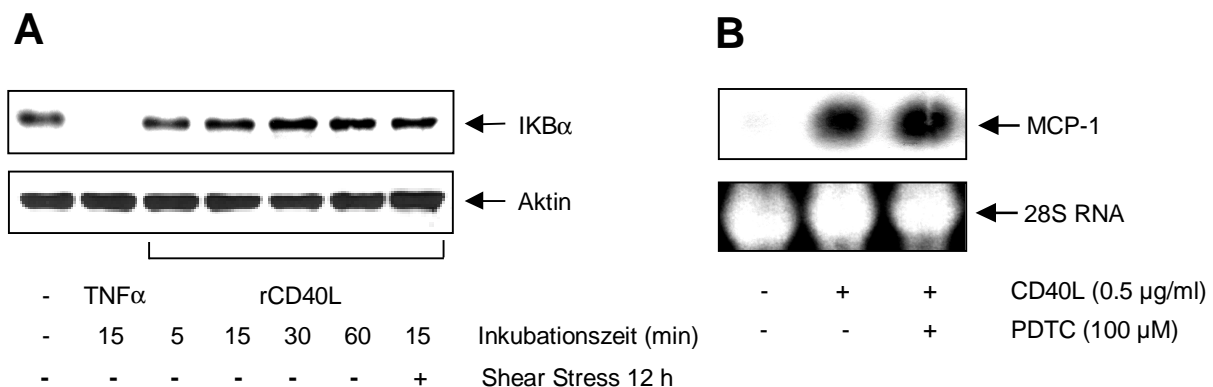


Abbildung 3.20. Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF κ B an der CD40-Signalkaskade

A, HUVEC wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit humanem CD40L (0,5 μ g/ml) oder 15 min mit TNF α (50 ng/ml) inkubiert. Shear Stress-präexponierte (12 h) HUVEC wurden ebenfalls 15 min mit humanem CD40L (0,5 μ g/ml) stimuliert. Die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α wurde im Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

B, HUVEC wurden mit humanem CD40L (0,5 μ g/ml) für 6 h inkubiert. Der NF κ B-Inhibitor PDTC (100 μ M) wurde 30 min vor Zugabe des CD40L inkubiert. Die MCP-1 Expression wurde mittels Northern Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die 28S RNA dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus n=3.

3.4. Shear Stress erhöht die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

Integrine, heterodimere Transmembran-Glykoproteine, sind von zentraler Bedeutung für die Mechanotransduktion von Shear Stress, da sie das Zytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden (137,138). Muller und Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Shear Stress-induzierte, NO-abhängige Vasodilatation in Koronararterien durch Zugabe von RGD-Peptiden, die die Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix blockieren, gehemmt wird (146). Da Integrine auch an anderen wichtigen Prozessen, wie Adhäsion und Überleben von Endothelzellen, beteiligt sind, sollte der Effekt von Shear Stress auf die Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten analysiert werden (152,162).

Wie in Kapitel 3.1. bereits beschrieben, erhöhte Shear Stress die Expression der Fibronectin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ mit einem Maximum nach 6 h Shear Stress-Exposition (Abb. 3.21.). Im Gegensatz dazu, wurde die Expression der Vitronectin-Rezeptor-Untereinheit αv nicht reguliert (Shear Stress 12 h: $95 \pm 27\%$ der Kontrolle). Da Shear Stress die Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ um das 2-fache erhöhte, wurde im folgenden die Expression und Funktion der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ näher untersucht.

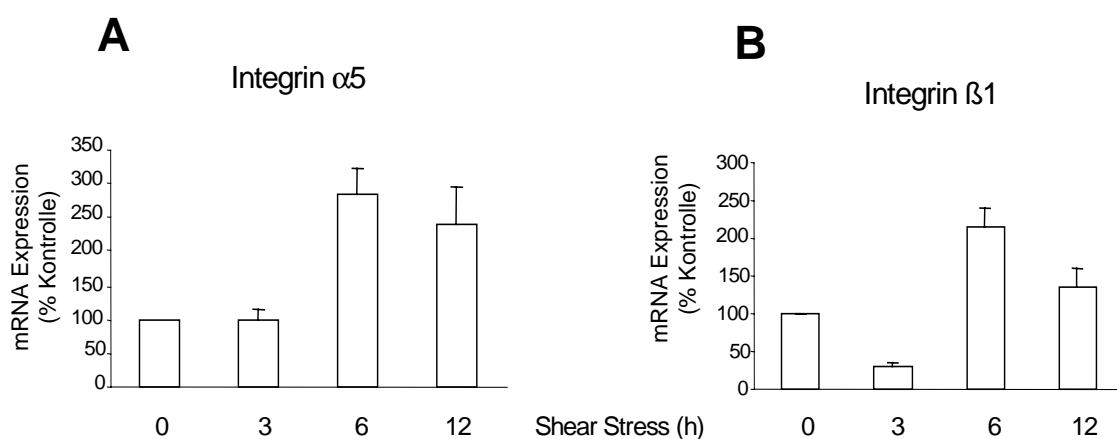


Abbildung 3.21. Shear Stress induziert die mRNA Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

A/B, HUVEC wurden für 3 h, 6 h und 12 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert. Die mRNA Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ (A) und $\beta 1$ (B) wurde mittels "Atlas cDNA Expression Array" untersucht. Die Ergebnisse sind als Prozent der Kontrolle graphisch dargestellt (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$).

Der Shear Stress-induzierte Anstieg der mRNA der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ kann sowohl auf einer transkriptionellen Aktivierung als auch auf Erhöhung der mRNA Stabilität beruhen. Zur Klärung dieser Frage wurden "Nuclear run on"-Experimente durchgeführt. Dazu wurden HUVEC 6 h laminarem Shear Stress exponiert, die Kerne über einen Sucrose-Gradienten isoliert und die mRNA mit ^{32}P -UTP *in vitro* transkribiert. Die radioaktiv-markierte RNA wurde mit der auf einer Nylonmembran immobilisierten cDNA von Integrin $\alpha 5$, $\beta 1$ und GAPDH hybridisiert. Wie in Abbildung 3.22. gezeigt, blieb die transkriptionelle Expression von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ nach Shear Stress-Exposition (6 h) unverändert, was darauf hindeutet, daß Shear Stress die mRNA Stabilität der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ erhöht.

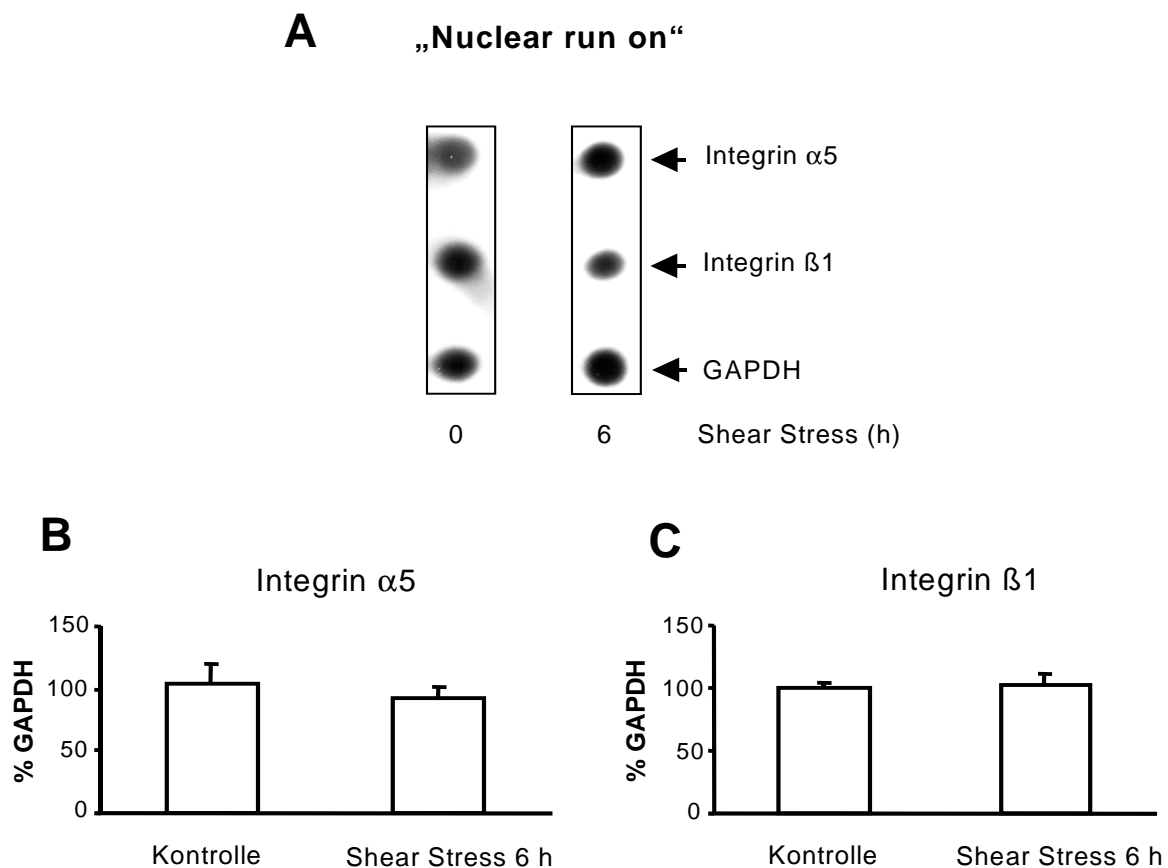


Abbildung 3.22. Effekt von Shear Stress auf die Integrin Transkription

A/B/C, HUVEC wurden für 6 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert. Nach Isolierung der Zellkerne wurden diese *in vitro* transkribiert und mit einer Nylonmembran, auf der die cDNA der Integrine $\alpha 5$, $\beta 1$ und GAPDH immobilisiert wurde, hybridisiert. Zum Nachweis der Ladungsgleichheit wurde die Transkription der GAPDH gezeigt. (A) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus $n=4$. (B/C) Die "Nuclear run on"-Experimente wurden densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse als Prozent der GAPDH graphisch dargestellt (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$).

Zur Bestätigung der erhöhten mRNA Expression wurde die Protein Expression der Fibronectin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ mittels Western Blot-Analyse nach Shear Stress-Exposition untersucht. Shear Stress induzierte zeit-abhängig die Expression von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ (Abb. 3.23.A-D). Auch nach langfristiger Shear Stress-Exposition (24 h bis 48 h) blieb die Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression erhöht (Abb. 3.24.). Zur Untersuchung des dosis-abhängigen Effektes von Shear Stress auf die Expression der Integrin-Untereinheiten wurden HUVEC für 18 h mit einer Shear Stress-Stärke von 5, 15 oder 45 dynes/cm² inkubiert. Abb. 3.23.E/F zeigt die dosis-abhängige Erhöhung der Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Protein Expression durch Shear Stress.

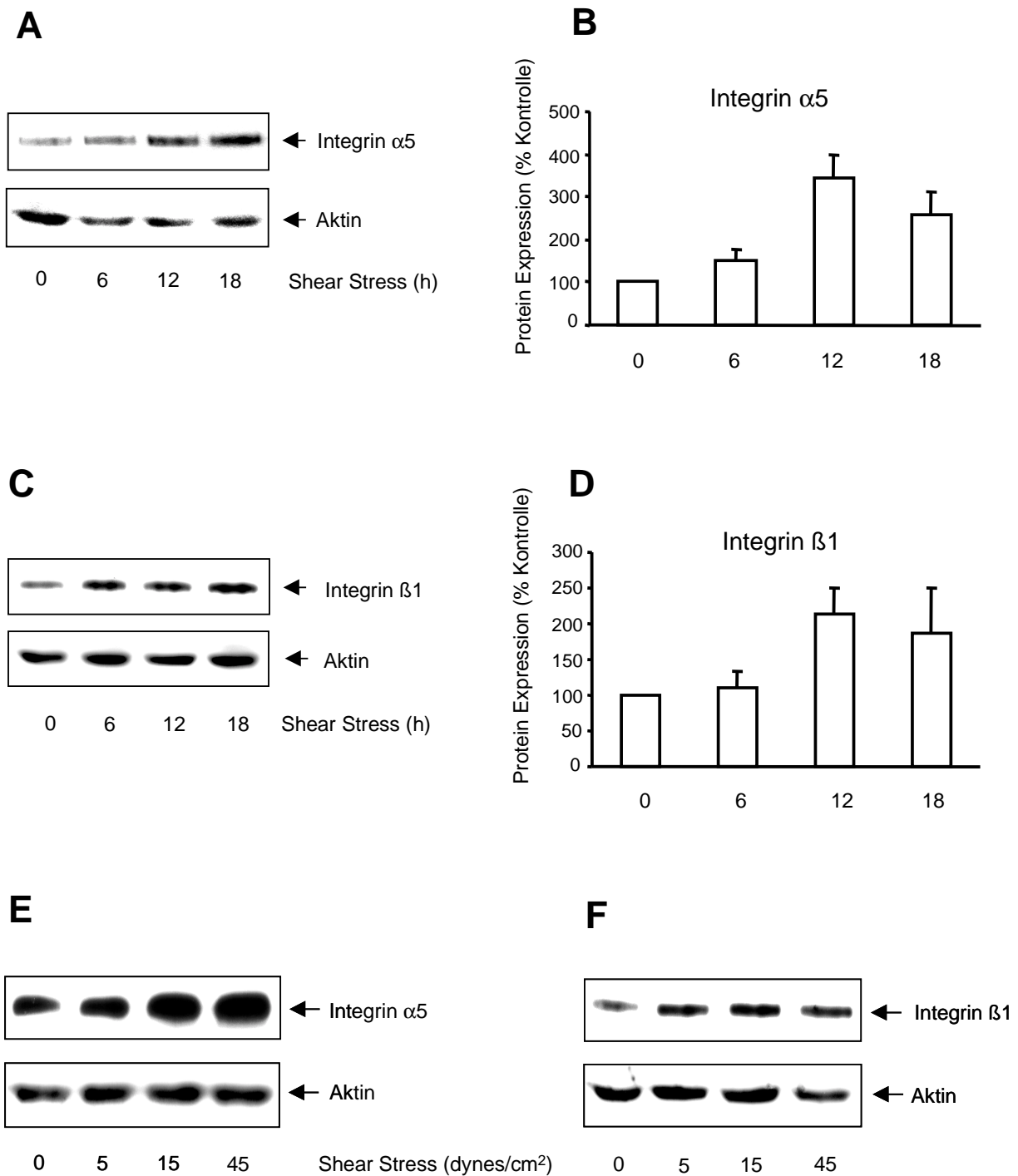


Abbildung 3.23. Shear Stress induziert zeit- und dosis-abhängig die Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

A/B/C/D, HUVEC wurden für 6 h, 12 h und 18 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) exponiert und die Expression der Integrine $\alpha 5$ (A) und $\beta 1$ (C) mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Expression von Aktin untersucht. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=4. (B/D) Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle graphisch darstellt (Mittelwerte \pm SEM, n=4). (E/F), HUVEC wurden mit 5, 15 und 45 dynes/cm² laminarem Shear Stress (18 h) exponiert und die Expression der Integrine $\alpha 5$ (E) und $\beta 1$ (F) mittels Western Blot analysiert. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Expression von Aktin untersucht. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus n=4.

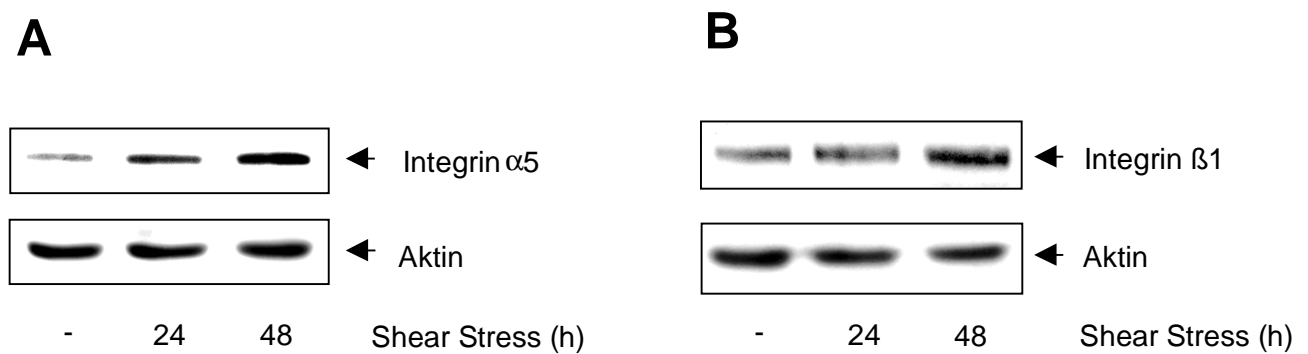


Abbildung 3.24. Shear Stress induziert langfristig die Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

A/B, HUVEC wurden für 24 h und 48 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert und die Expression der Integrine $\alpha 5$ (A) und $\beta 1$ (B) mittels Western Blot untersucht. Die Aktin Expression wurde zum Nachweis der Gleichladung gezeigt. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus $n=3$.

Die funktionelle Relevanz der erhöhten mRNA und Protein Expression wurde durch Nachweis der Oberflächenexpression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ mittels FACS-Analyse bestätigt. Wie in Abbildung 3.25.A-D dargestellt, erhöhte Shear Stress-Exposition die Zelloberflächenexpression von Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ nach 24 h. Im Gegensatz dazu, ist die Expression anderer Integrin-Untereinheiten, z.B. Integrin $\beta 4$, nach Shear Stress-Exposition nicht reguliert (Abb. 3.25.E). Diese Ergebnisse zeigen, daß Shear Stress spezifisch die Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ in Endothelzellen reguliert.

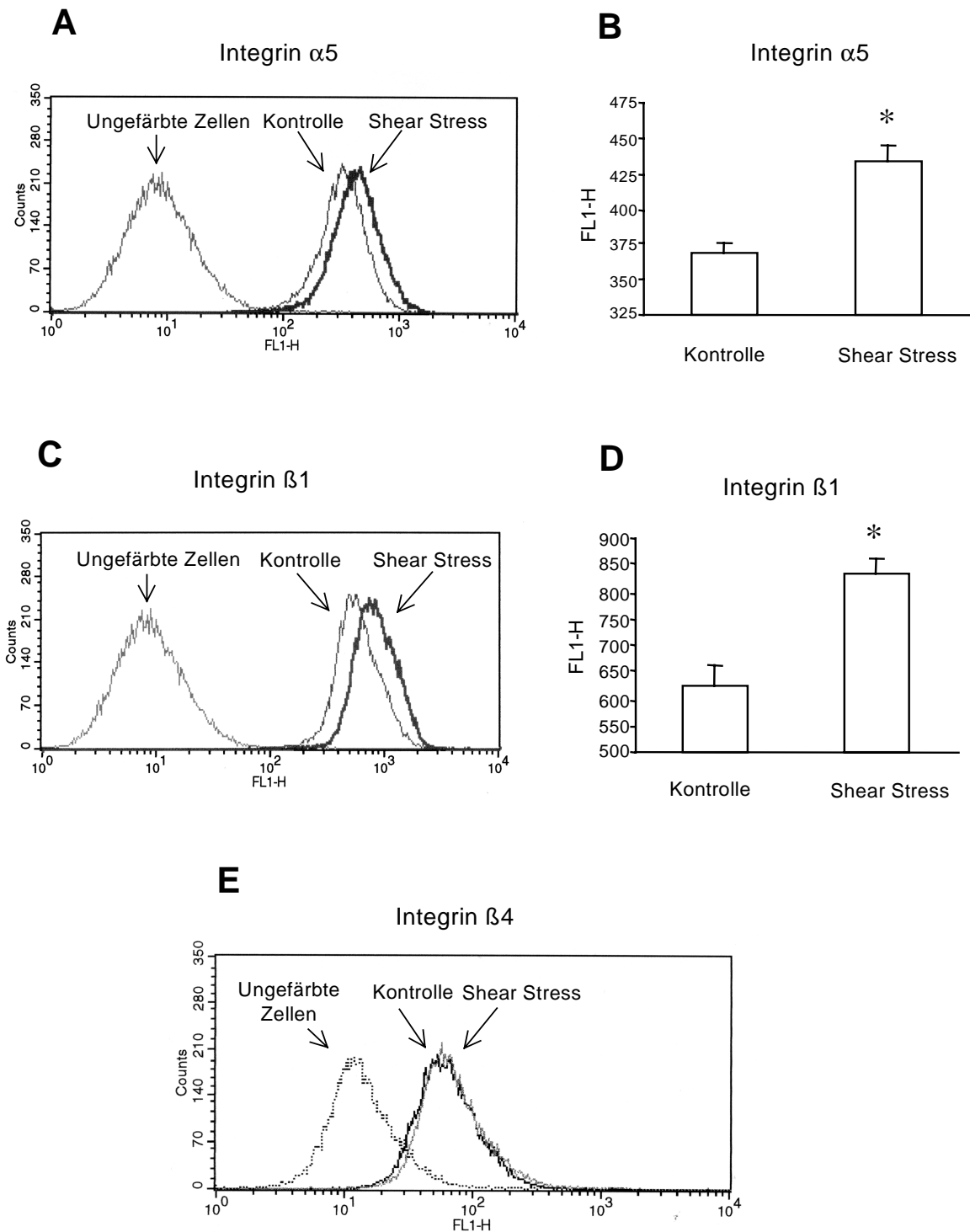


Abbildung 3.25. Shear Stress induziert die Zelloberflächen Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

A/B/C/D/E, HUVEC wurden für 24 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) in EBM-Medium + 1% BSA exponiert und die Zelloberflächen Expression der Integrine $\alpha 5$ (A) und $\beta 1$ (C) und $\beta 4$ (E) mittels FACS-Analyse untersucht. Die Pfeile markieren die ungefärbten Zellen, die statischen Kontrollen und die Shear Stress-exponierten Zellen. (A/C/E) Gezeigt sind repräsentative Histogramme aus n=5. (B/D) Die Fluoreszenz-Intensität (FL1-H) der Kontrollen im Vergleich zu Shear Stress-exponierten Zellen wurde graphisch dargestellt (Mittelwerte \pm SEM, n=5, *p<0,01 versus Kontrolle).

3.4.1. Mechanismus der Shear Stress-induzierten Integrin Expression

3.4.1.1. Rolle von NO in der Shear Stress-induzierten Integrin Expression

Murohara und Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit L-NAME die Zelloberflächenexpression des Vitronektin-Rezeptors $\alpha v\beta 3$ in Endothelzellen reduziert (151). Da Shear Stress die Aktivität der eNOS stimuliert, könnte NO an der Regulation der Shear Stress-induzierten Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ beteiligt sein (108,133).

Zur Aufklärung des Mechanismus der Shear Stress-induzierten Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression wurde der Effekt von NO untersucht. Dazu wurden HUVEC mit den NO-Donoren SNP oder PAPA NONOate (50 μ M) für 12 h inkubiert und die Integrin Expression mittels Western Blot-Analyse untersucht. Sowohl SNP als auch PAPA NONOate erhöhten signifikant die Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$, ähnlich der Shear Stress-stimulierten Integrin Expression (Abb. 3.26. und Daten nicht gezeigt). Durch die Hemmung der eNOS mit LNMA (1 mM) konnte die Shear Stress-induzierte Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression nach 12 h Inkubation allerdings nicht inhibiert werden (Abb. 3.26.). Demnach wird die Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression durch NO stimuliert, wobei die Shear Stress-induzierte Erhöhung der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ unabhängig von NO ist und vermutlich über einen anderen Signaltransduktionsweg vermittelt wird.

Zur Klärung dieser Hypothese wurde der Effekt von konditioniertem Medium auf die Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression untersucht. HUVEC wurden 24 h mit laminarem Shear Stress exponiert. Anschließend wurden Endothelzellen, die unter statischen Bedingungen gehalten wurden, mit dem Medium der statischen Kontrolle bzw. der Shear Stress-exponierten Zellen für weitere 24 h inkubiert. Wie in Abbildung 3.27. gezeigt, blieb die Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression nach Inkubation mit konditioniertem Medium von Shear Stress-exponierten Zellen unverändert. Somit ist die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Shear Stress-exponierten Endothelzellen nicht an der Shear Stress-induzierten Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ beteiligt.

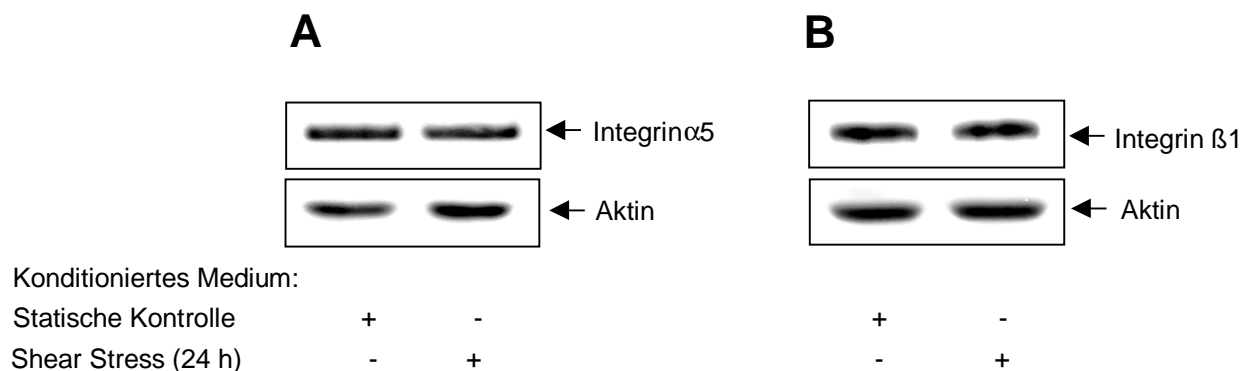


Abbildung 3.27. Effekt von konditioniertem Medium

A/B, HUVEC wurden für 24 h laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) exponiert oder unter statischen Bedingungen gehalten. Das konditionierte Medium wurde entnommen, auf statische Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Die Expression der Integrine $\alpha 5$ (A) und $\beta 1$ (B) wurde mittels Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die Aktin Expression gezeigt. Dargestellt sind repräsentative Experimente aus $n=3$.

3.4.2. Shear Stress induziert Endothelzell-Adhäsion

Die Adhäsion von Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix ist eine wichtige Voraussetzung für das Überleben der Zellen. Verlieren adhärente Zellen den Kontakt zur extrazellulären Matrix, gehen sie in Apoptose über, einen Vorgang, der auch als "anoikis" bezeichnet wird (162,164). Da Integrine die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix vermitteln, sollte der Effekt der Shear Stress-induzierten Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression auf die Adhäsion von Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurden HUVEC für 24 h mit laminarem Shear Stress exponiert, mit EDTA von der Zellkulturschale abgelöst und erneut für 20 min ausplattiert. Die Shear Stress-

Präinkubation (24 h) erhöhte signifikant die Anzahl der adhärenen Zellen nach erneutem Ausplattieren für 20 min ($178 \pm 10\%$ versus statische Kontrolle; Abb. 3.28.A). Weiterhin blieb die Anzahl der adhärenen Zellen, die für 24 h Shear Stress präexponiert wurden, nach erneutem Ausplattieren im Verlauf bis zu 120 min erhöht (Abb. 3.28.C).

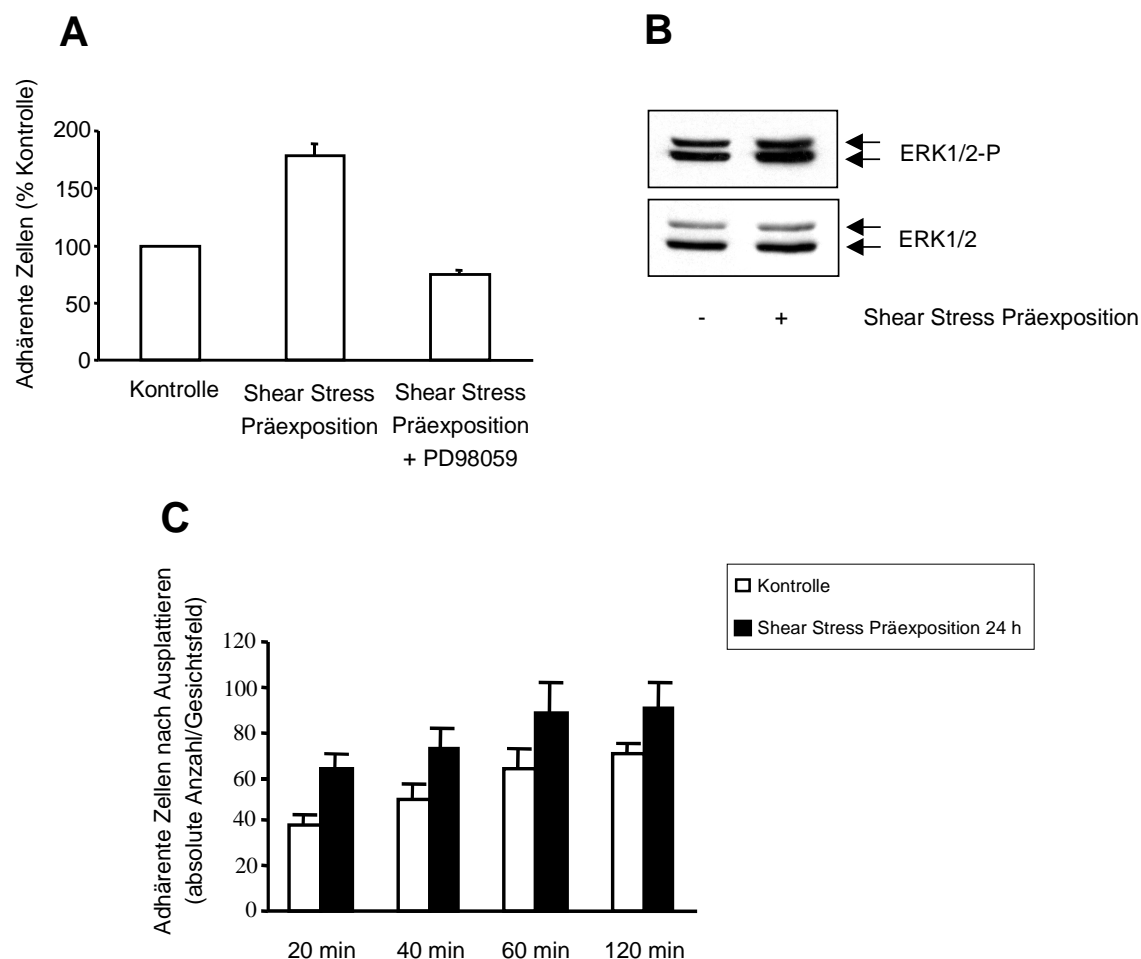


Abbildung 3.28. Shear Stress induziert die Adhäsion von Endothelzellen

A/B, HUVEC wurden unter statischen Bedingungen gehalten oder für 24 h mit laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) präexponiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese gezählt und erneut auf Zellkulturschalen für 20 min ausplattiert. Der MEK-1-Inhibitor PD98059 ($10 \mu\text{M}$) wurde 5 min vor erneutem Ausplattieren zugegeben. (A) Die ausplattierten adhärenen Zellen wurden gezählt und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$). (B) Die ausplattierten adhärenen Zellen wurden in Puffer lysiert und die ERK1/2-Phosphorylierung mittels phosphospezifischem ERK1/2 Antikörper im Western Blot untersucht. Zum Nachweis der Gleichladung wurde die ERK1/2 Expression dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus $n=3$. (C) HUVEC wurden unter statischen Bedingungen gehalten oder für 24 h mit laminarem Shear Stress (15 dynes/cm^2) präexponiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese gezählt und erneut auf Zellkulturschalen für 20, 40, 60 und 120 min ausplattiert. Die ausplattierten adhärenen Zellen wurden gezählt und die Ergebnisse als absolute Anzahl pro Gesichtsfeld angegeben (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$).

Die Blockierung der Integrin-Matrix-Interaktion, v.a. die Bindung an Fibronectin und Vitronectin, durch RGD-Peptide (0,5 mM) hemmte signifikant die Shear Stress-induzierte Zelladhäsion (Abb. 3.29.), während Kontroll-Peptide (RGE) keinen Effekt hatten (Daten nicht gezeigt). Um die spezifische Beteiligung der Shear Stress-induzierten Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression an der Erhöhung der Zelladhäsion zu untersuchen, wurden die Shear Stress präexponierten Endothelzellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ inkubiert. Wie in Abbildung 3.29. gezeigt, konnte die Shear Stress-induzierte Zelladhäsion durch neutralisierende Antikörper gegen Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ signifikant gehemmt werden. Weiterhin führte die Inhibition der MAP-Kinase ERK1/2 durch PD98059 (10 μ M) zu einer Blockade der Zelladhäsion unter Kontrollniveau (Abb. 3.28.A).

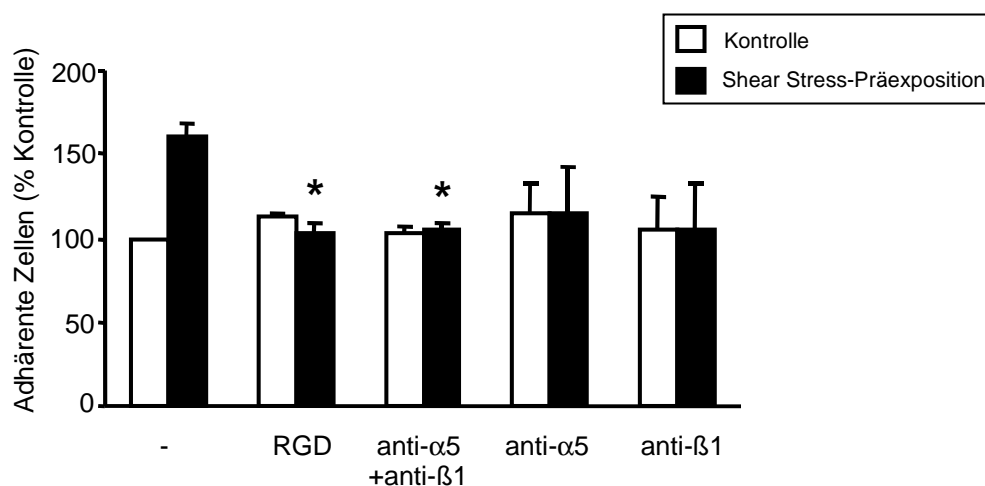


Abbildung 3.29. Shear Stress induziert über Integrine die Adhäsion von Endothelzellen

HUVEC wurden unter statischen Bedingungen gehalten oder für 24 h mit laminarem Shear Stress (15 dynes/cm²) präexponiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese gezählt und erneut auf Zellkulturschalen für 20 min ausplattiert. Die RGD-Peptide (0,5 mM) und die neutralisierenden Antikörper gegen Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ (Verdünnung 1:100) wurden 5 min vor Ausplattieren zugegeben. Die ausplattierten adhären Zellen wurden gezählt und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05 versus Shear Stress Präexposition).

Die Adhäsion von Endothelzellen auf eine Fibronectin-Matrix stimuliert die Aktivierung der zellprotektiven MAP-Kinase ERK1/2 (147,149). Da Shear Stress die Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ erhöht, sollte der Effekt der Shear Stress Präexposition auf die Adhäsions-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 nach erneutem Ausplattieren untersucht werden. Dazu wurden HUVEC für 24 h laminarem Shear Stress

präexponiert, von der Kulturschale abgelöst, erneut für 20 min ausplattiert und die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 mittels phosphospezifischem Antikörper nachgewiesen. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde in ausplattierten Endothelzellen, die zuvor für 24 h Shear Stress-präexponiert wurden, deutlich erhöht ($206 \pm 77\%$ der Kontrolle, Abb. 3.28.B). Im Gegensatz dazu, blieb die ERK1/2-Aktivierung nach erneutem Ausplattieren durch kurzfristige Shear Stress Präexposition für 20 min unverändert (Daten nicht gezeigt).

3.4.3. Der antiapoptotische Effekt von Shear Stress ist Integrin-abhängig

Laminarer Shear Stress hemmt die Apoptose von Endothelzellen, die durch verschiedene proatherosklerotische Faktoren, wie $\text{TNF}\alpha$, oxLDL und AngII, induziert wird (106,107). Verschiedene Studien haben gezeigt, daß Integrine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$) ebenfalls antiapoptotisch wirksam sind (165-167). Daher sollte die Beteiligung der Integrine an dem antiapoptotischen Effekt von Shear Stress durch Inkubation mit RGD-Peptiden, die die Bindung an die Matrix (v.a. Fibronectin und Vitronectin) blockieren, untersucht werden. Die Apoptose von Endothelzellen wurde durch Analyse der kondensierten Zellkerne, ein charakteristisches Merkmal der Apoptose, nach Kernfärbung mit DAPI im Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Die Inkubation von HUVEC mit RGD-Peptiden (0,5 mM) für 18 h induzierte Apoptose ($316 \pm 87\%$ der Kontrolle), während Kontroll-Peptide (RGE; 0,5 mM) keinen Effekt hatten (Abb. 3.30. und Daten nicht gezeigt). Die Koinkubation von Endothelzellen mit RGD-Peptiden und einem spezifischen Caspase-3-Inhibitor (AcDEVD-CHO; 100 μM) hemmte signifikant die RGD-Peptid-induzierte Apoptose ($183 \pm 55\%$ der Kontrolle; Abb. 3.30.). Dieses Ergebnis läßt eine Beteiligung der Caspase-Kaskade an der RGD-Peptid-induzierten Apoptose vermuten. Die Exposition der Endothelzellen mit laminaem Shear Stress für 18 h konnte die RGD-Peptid-induzierte Apoptose nicht hemmen ($326 \pm 61\%$ der Kontrolle, Abb. 3.30.), was darauf hindeutet, daß Shear Stress RGD-sensitive Integrine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$) benötigt, um den antiapoptotischen Effekt auf Endothelzellen zu vermitteln.

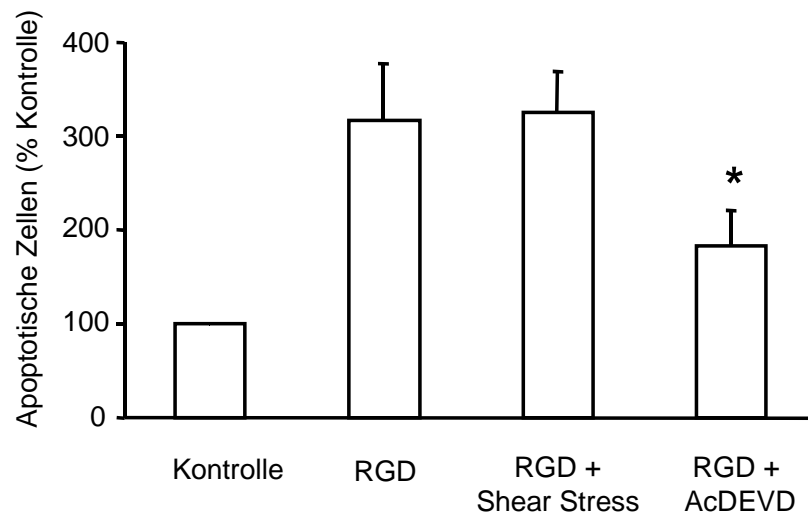


Abbildung 3.30. Der antiapoptotische Effekt von Shear Stress ist Integrin-abhängig

HUVEC wurden 18 h mit RGD-Peptiden (0,5 mM) inkubiert oder mit RGD-Peptiden (0,5 mM) und Shear Stress (15 dynes/cm²) oder AcDEVD-CHO (100 µM) koinkubiert. Nach Färbung der Zellkerne wurde der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle angegeben (Mittelwerte ± SEM, n=3, *p<0,05 versus RGD). Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit von Dr. D.H. Walter durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. Die Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen

Die laminare Schubspannung des Blutes, Shear Stress, ist einer der wichtigsten endogenen atheroprotektiven Faktoren im kardiovaskulären System. Da Shear Stress über verschiedene Mechanismen antiinflammatorisch, antithrombotisch und antiapoptotisch wirksam ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Shear Stress-induzierte Genexpression in Endothelzellen untersucht werden, um weitere Endothel-protective Effekte von Shear Stress zu identifizieren. Die Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen wurde mittels "Atlas cDNA Expression Array", der die Analyse von 588 Genen verschiedener Genfamilien ermöglicht, untersucht. Zusammenfassend wurde eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlichsten Funktionen durch Shear Stress reguliert, die jedoch in dieser Arbeit nicht alle näher analysiert wurden. Als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Shear Stress-induzierten Hochregulation der Proteine Clusterin, TRAF3 und Integrine untersucht und deren Bedeutung für Endothelzellen geklärt. Diese Daten sind in den Kapiteln 4.2. – 4.4. ausführlich diskutiert. Die Auswertung des "Atlas cDNA Expression Array" ergab darüberhinaus Informationen über die Shear Stress-induzierte Expression verschiedener Apoptose-regulierender Gene. Die Bedeutung für die antiapoptotische Wirkung von Shear Stress ist in dem folgenden Abschnitt diskutiert.

Die Shear Stress-induzierte Expression der "Heat Shock Proteine" Hsp 27 und Hsp 70, die eine wichtige Funktion bei der Hemmung der Apoptose von Endothelzellen ausüben (168,169), trägt möglicherweise zu den antiapoptotischen Eigenschaften von Shear Stress bei. Hsp70 hemmt die Apoptose, indem es an Caspasen bindet und die Bildung des Apoptose-Komplexes verhindert (169). Für Hsp90 konnte bereits eine Interaktion mit der antiapoptotischen Protein-Kinase Akt gezeigt werden, die durch Bindung an Hsp90 vor Dephosphorylierung und Inaktivierung geschützt wird (170). Ähnliche Mechanismen könnten auch für Hsp27 und Hsp70 angenommen werden und in weiteren Versuche untersucht werden. Da NO die Expression von Hsp70 über den

„Heat Shock Faktor 1“ in glatten Muskelzellen induziert (171), könnte die erhöhte Expression von Hsp27 und Hsp70 über die Shear Stress-induzierte NO-Freisetzung vermittelt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die Expression von Hsp60 in Endothelzellen induziert (172). Auch das antiapoptotische Protein DAD-1 ("defender against cell death-1") wurde durch Shear Stress-Exposition in Endothelzellen erhöht und ist möglicherweise protektiv wirksam, da DAD-1^{-/-}-Maus-Embryonen eine erhöhte Apoptose verschiedener Zellen aufweisen (173). Im Gegensatz dazu, wurden auch proapoptotische Proteine, wie z.B. Caspase-9, Bak und Bax durch Shear Stress induziert. Die erhöhte mRNA Expression der Caspase-9, die an der Apoptose-Signalkaskade in Endothelzellen beteiligt ist, deutet jedoch nicht automatisch auf eine erhöhte Aktivität hin, da Caspasen erst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (174,175). Desweiteren ist das Apoptose-Programm in Endothelzellen ein komplexes Zusammenspiel pro- und antiapoptotischer Faktoren, die sich gegenseitig unterstützen oder inhibieren (176,177). Beispielsweise könnte die Shear Stress-induzierte Expression des antiapoptotischen Proteins A1, die erhöhte Expression von Bak und Bax, die ebenfalls zur Familie der Bcl-2-Proteine gehören, kompensieren. Weitere Versuche wären sinnvoll, um die Regulation einzelner Proteine im Zusammenspiel mit allen Apoptose-relevanten Proteinen in der Zelle zu untersuchen. Die Analyse der Expression der Apoptose-Inhibitoren IAP1, IAP2 und XIAP, die durch direkte Hemmung der Caspase-Kaskade antiapoptotisch wirksam sind, war aufgrund der niedrigen Expression nicht möglich.

4.2. Bedeutung der Shear Stress-induzierten Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin

Das Komplementsystem stimuliert die Aktivierung von Endothelzellen, die in der initialen Phase der Atherosklerose zu endothelialer Dysfunktion führt (7,11,24). Im Gegensatz dazu, ist die laminare Schubspannung des Blutes, der Shear Stress, atheroprotektiv wirksam (81). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen über die erhöhte Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin hemmt. Die Beteiligung des Komplementsystems an der Atherogenese wurde bereits mehrfach beschrieben (11,24,25). Beispielsweise wird die Entstehung atherosklerotischer Läsionen in Komplement-defizienten Kaninchen verhindert (26). Desweiteren führt die Inkubation von Endothelzellen mit dem terminalen Komplementkomplex oder Komplementfaktoren zur Synthese von Entzündungsmediatoren wie z.B. Interleukinen und MCP-1 (12,27,29,30). Zu den Faktoren, die zur Aktivierung des Komplementsystems im Rahmen der Atherogenese führen, gehören *Chlamydia pneumoniae*-Infektionen, enzymatisch modifiziertes LDL, das Akut-Phase Protein "C-reaktives Protein" (CRP) und Phosphatidylserin, ein Phospholipid, das nach Induktion der Apoptose an die Zelloberfläche transloziert (8,11,25,32-37,178,179). Die Aktivierung des Komplementsystems durch das Phosphatidylserin apoptotischer Zellen erklärt möglicherweise die Beteiligung des Komplementsystems an der Pathogenese der Atherosklerose und anderen Apoptose-assoziierten Krankheiten wie AIDS und Myokardinfarkt (180,181).

4.2.1. Shear Stress stimuliert die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin

Clusterin ist ein heterodimeres Glykoprotein, das, neben seiner Funktion als Komplement-Inhibitor, Chaperone-ähnliche Aktivität besitzt, Zellüberleben reguliert und zusätzlich am Transport von Lipoproteinen beteiligt ist (41,43,44). Clusterin bindet an die Komplement-Komponenten C7, C8 und C9 und verhindert die Bildung des

membran-angreifenden Komplexes C5b-9 (42). Das Komplementsystem wird durch verschiedene Komplement-Inhibitoren, wie Clusterin, CD59, MCP und DAF, reguliert, um eine permanente Aktivierung zu verhindern. Im Gegensatz zur spezifischen Shear Stress-induzierten Erhöhung von Clusterin, blieb die Expression des Komplement-Inhibitors CD59 durch Shear Stress-Exposition unverändert (Daten nicht gezeigt). Auch in der Literatur gibt es keine Hinweise auf die Regulation von Komplement-Inhibitoren durch Shear Stress. Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde, schützen sich Endothelzellen vor aktiviertem Komplement durch die Synthese und Freisetzung von Komplement-Inhibitoren (z.B. Clusterin) (39). Shear Stress stimuliert diesen Schutzmechanismus der Zellen durch spezifische Erhöhung der Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin. Da Clusterin, wie bereits beschrieben, ein multifunktionelles Protein ist, könnte die Shear Stress-induzierte Expression von Clusterin weitere protektive Effekte auf Endothelzellen ausüben, indem z.B. die Apoptose von Zellen oder die Degradation von Proteinen durch die Chaperone-ähnliche Aktivität verhindert wird (43,44). Desweiteren könnte die Umwandlung von Makrophagen zu Cholesterin-beladenen Schaumzellen, ein charakteristisches Merkmal atherosklerotischer Läsionen, durch die erhöhte Clusterin Expression reduziert werden, da Clusterin die Cholesterin-Freisetzung aus Schaumzellen induziert (182). Um diese potentiell protektiven Effekte von Clusterin in Endothelzellen zu untersuchen, sind jedoch weitere Versuche notwendig.

4.2.2. Die Regulation von Clusterin

Zur Aufklärung der Shear Stress-induzierten Expression von Clusterin, wurde zunächst der Effekt von Stickstoffmonoxid (NO) untersucht, da Shear Stress die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert und einige atheroprotektive Effekte von Shear Stress über die Freisetzung von NO vermittelt werden. Die Beteiligung von NO an der Regulation von Clusterin konnte ausgeschlossen werden, da die Hemmung der eNOS durch LNMA keinen Einfluß auf die Shear Stress-induzierte Clusterin Expression hatte (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch bekannt, daß der Wachstumsfaktor TGF β die Expression von Clusterin in verschiedenen Zellen über den Transkriptionsfaktor AP-1 induziert (183,184). Da Shear Stress die Expression von TGF β stimuliert (116), könnte die erhöhte Clusterin Expression über TGF β vermittelt werden. Es besteht prinzipiell auch

die Möglichkeit, daß Shear Stress die Stabilität der Clusterin mRNA fördert und dadurch die Clusterin Expression posttranskriptionell erhöht. Zur Klärung dieser Frage könnte die transkriptionelle Regulation von Clusterin mittels "Nuclear run on-Experimenten" untersucht werden. Die Regulation von Clusterin über die Aktivierung von AP-1 könnte jedoch auch durch die Shear Stress-induzierte Stimulierung der MAP-Kinase ERK1/2, die c-jun phosphoryliert, vermittelt werden. In PC12-Zellen konnte gezeigt werden, daß Wachstumsfaktoren wie NGF und EGF die Expression von Clusterin über den Transkriptionsfaktor AP-1 induzieren (185). Aus diesen Daten ergibt sich die Hypothese, daß die Induktion der Clusterin Expression möglicherweise über die Shear Stress-induzierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren vermittelt wird. Neben AP-1 sind weitere Transkriptionsfaktoren wie „nuclear factor 1“ und „heat-shock transcription factor 1“ an der Stress-induzierten Expression (z.B. „heat shock“) von Clusterin in verschiedenen Zelltypen beteiligt (186,187). Weitere Experimente sind von Interesse, da die Aufklärung der Shear Stress-induzierten Expression von Clusterin von therapeutischem Nutzen sein könnte, um die Komplement-induzierte Entzündungsreaktion in der Atherogenese zu hemmen.

4.2.3. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Clusterin Expression

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß sowohl Shear Stress-Exposition als auch die Überexpression von Clusterin die Komplement-induzierte Expression der Entzündungsmediatoren MCP-1 und IL-8 signifikant inhibiert. Die Hemmung der Clusterin Expression durch Transfektion von Clusterin-Antisense-Oligonukleotiden reduzierte partiell, jedoch signifikant den inhibitorischen Effekt von Shear Stress auf die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen. Diese partielle Reduktion des inhibitorischen Effektes von Shear Stress ist möglicherweise auf die begrenzte Transfektionseffizienz zurückzuführen. Weiterhin wäre es denkbar, daß die Funktion von Clusterin durch andere Komplement-Inhibitoren ersetzt werden kann. Bekannt ist, daß Endothelzellen die Komplement-Inhibitoren DAF, MCP, Clusterin und CD59 exprimieren und sich somit vor der Aktivierung des Komplementsystems schützen (39,188,189). Da diese Komplement-Inhibitoren an verschiedenen Stellen der Komplementkaskade angreifen, wäre es durchaus denkbar, daß mehrere additive

Effekte zur Hemmung des Komplementsystems beitragen. Die partielle Reduktion des protektiven Effektes von Shear Stress in Clusterin-Antisense-transfizierten Zellen könnte jedoch auch dadurch begründet sein, daß Shear Stress andere inhibitorische Effekte, die unabhängig von der erhöhten Clusterin Expression sind, auf Endothelzellen ausübt. Da NO den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF κ B, der eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen reguliert, inhibiert (125,190), wäre es möglich, daß Shear Stress die Komplement-induzierte Expression von MCP-1 und IL-8 zusätzlich über die erhöhte NO-Freisetzung beeinflusst. Um diese Hypothese zu untersuchen, müßte die NO-Freisetzung in Clusterin-Antisense-transfizierten Zellen durch LNMA gehemmt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß Shear Stress die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen über die erhöhte Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin hemmt (Abb. 4.1.). Diese Shear Stress-induzierte Clusterin Expression ist für die antiinflammatorische Wirkung von Shear Stress auf Endothelzellen von großer Bedeutung.

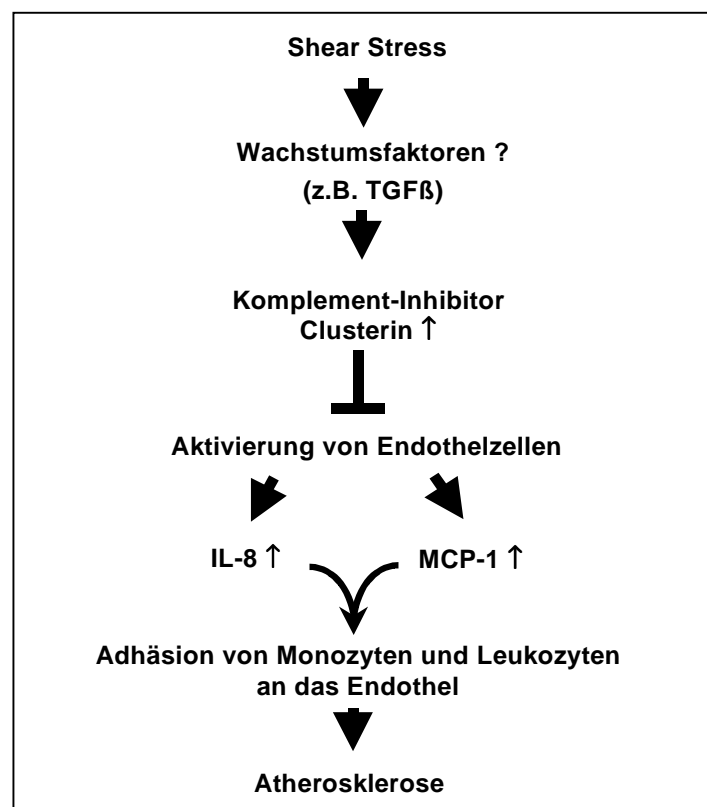


Abbildung 4.1. Shear Stress inhibiert die Komplement-induzierte Aktivierung von Endothelzellen über die erhöhte Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin

4.3. Bedeutung der Shear Stress-induzierten Expression des Adapterproteins TRAF3

Das CD40/CD40 Ligand-System ist ein wesentlicher Regulator von Immunantworten und inflammatorischen Reaktionen im Rahmen der Atherogenese (10). Verschiedene Studien haben gezeigt, daß das CD40-System die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen durch die Aktivierung vaskulärer Zellen fördert (46,51). In der Progression der Atherosklerose hat das CD40-System Einfluß auf die Plaque-Destabilisierung und -Ruptur (52,53). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß laminarer Shear Stress spezifisch die Expression des zytoplasmatischen Adapterproteins TRAF3 *in vitro* und *in vivo* stimuliert und die CD40-induzierte Expression der proatherogenen Moleküle MCP-1 und TF hemmt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß das kernständige TRAF3 die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen inhibiert (Abb. 4.2.).

4.3.1. Shear Stress stimuliert die Expression des Adapterproteins TRAF3

Die intrazelluläre CD40-Signaltransduktion wird durch die zytoplasmatischen Adapterproteine TRAFs ("TNF receptor-associated factors"), die an den CD40 Rezeptor binden, vermittelt (56). Für TRAF2, TRAF5 und TRAF6 konnte ein stimulatorischer Effekt auf die CD40-Signalkaskade gezeigt werden, während für TRAF3 ein inhibitorischer Effekt postuliert wird (76-78). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die Expression des Adapterproteins TRAF3 induziert, während TRAF2 und TRAF5 durch Shear Stress nicht reguliert wurden. Die reduzierte mRNA Expression des CD40 Rezeptors durch Shear Stress, konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden, was eine inhibitorische Wirkung von Shear Stress über die Reduktion des CD40 Rezeptors ausschließt. Auch die Expression des CD40 Ligands blieb nach Shear Stress-Exposition unverändert (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, daß der Effekt von Shear Stress auf das CD40-System durch die spezifische Erhöhung der TRAF3 Expression vermittelt wird. Da bislang keine Daten über die Shear Stress-induzierte Expression der TRAF-Proteine bekannt sind, stellt dieses Ergebnis einen neuartigen Shear Stress-vermittelten Mechanismus in Endothelzellen dar. Die

immunhistochemische Analyse der TRAF3 Expression in humanen atherosklerotischen Plaques bestätigte die *in vivo* Relevanz der Shear Stress-induzierte TRAF3 Expression. Der Mechanismus der Shear Stress-induzierten TRAF3 Expression konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Die Beteiligung der Protein-Kinase Akt und der endothelialen NO-Synthase (eNOS), zwei wichtige Mediatoren des protektiven Effektes von Shear Stress konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die Hemmung der eNOS bzw. Akt keinen Effekt auf die Shear Stress-induzierte TRAF3 Expression hatte (Daten nicht gezeigt). Auch über die Promoterregion von TRAF3 gibt es bislang keine Daten in der Literatur. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß die Zytokin-induzierte Expression von TRAF1 über NF κ B-Bindungsstellen im Promoter vermittelt wird (191). Zur Aufklärung der Shear Stress-induzierten Hochregulation von TRAF3 sollte zunächst die transkriptionelle Regulation untersucht werden. Zusätzlich könnte die Analyse des TRAF3 Promoters Hinweise auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise durch Shear Stress aktiviert werden, geben.

4.3.2. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Expression des Adapterproteins TRAF3

Das CD40-System aktiviert Endothelzellen, indem die Synthese von Zytokinen, Chemokinen, "Tissue Factor" (TF), Matrix-Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen induziert wird, die die Entzündungsreaktion vaskulärer Zellen in der Atherogenese fördert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die CD40L-induzierte Expression der proatherogenen Faktoren MCP-1 und TF, die initial an der Entstehung atherosklerotischer Läsionen beteiligt sind, hemmt. Unter pathophysiologischen Bedingungen stimulieren aktivierte Thrombozyten, die den CD40L exprimieren, die Entzündungsreaktion von Endothelzellen (47,48). Auch die durch aktivierte Thrombozyten induzierte MCP-1 Expression konnte durch Shear Stress-Exposition gehemmt werden. Da Shear Stress die Expression des zytoplasmatischen Adapterproteins TRAF3 induziert, wurde der Effekt von TRAF3 auf die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Überexpression von TRAF3 die Synthese der proinflammatorischen Moleküle MCP-1, IL-8 und TF inhibierte. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß TRAF3, im

Gegensatz zu TRAF2, TRAF5 und TRAF6, inhibitorisch wirksam ist. Die Beteiligung der Shear Stress-induzierten TRAF3 Expression an dem inhibitorischen Effekt von Shear Stress auf die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen wurde durch Transfektion einer dominant-negativen TRAF3 Mutante untersucht. Da der inhibitorische Effekt von Shear Stress auf die CD40-induzierte MCP-1 Expression durch die dominant-negative TRAF3 Mutante nur geringfügig gehemmt wurde, wäre es denkbar, daß ein weiterer, inhibitorischer Mechanismus durch Shear Stress aktiviert wird. Die Shear Stress-induzierte NO-Freisetzung konnte als zusätzlicher Mechanismus ausgeschlossen werden, da die Hemmung der eNOS durch LNMA keinen additiven Effekt hatte (Daten nicht gezeigt). Denkbar wäre auch, daß die Funktion von TRAF3 durch ein anderes Protein, z.B. das antiapoptotische TRAF1 oder das kernständige TRAF4, ersetzt wird. TRAF4 vermittelt vermutlich die Signale anderer TRAF-Proteine in den Kern, wobei die genaue Funktion bislang nicht geklärt wurde.

Einige Hinweise aus der Literatur deuten bereits auf einen inhibitorischen Effekt von TRAF3 hin, wobei es keine Daten in Bezug auf die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen gibt und der Mechanismus bislang ungeklärt ist. Möglicherweise blockiert TRAF3 die stimulatorischen Effekte von TRAF2, 5 und 6. Untersuchungen hierzu zeigen, daß TRAF3 die OX40-induzierte Aktivierung von NF κ B in T-Zellen inhibiert (192). In Endothelzellen könnte die Hemmung durch TRAF3 direkt am CD40 Rezeptor stattfinden oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde zunächst die Lokalisation von TRAF3 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß TRAF3 hauptsächlich kernständig ist. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da TRAF3 ursprünglich als Rezeptor-bindendes zytoplasmatisches Adaptermolekül identifiziert wurde. Gamper und Mitarbeiter konnten jedoch mittels "Yeast-Two-Hybrid-System" die Interaktion von TRAF3 mit dem Kernmembran-Protein p62 Nucleoporin nachweisen (193). Demzufolge könnte TRAF3 über die Interaktion mit p62 Nucleoporin eine Funktion als Adapterprotein an der Kernmembran ausüben, indem es z.B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflusst. Nach Rezeptor-Stimulation aktivieren TRAF2, 5 und 6 die Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 (56,57). Weiterhin ist bekannt, daß sich in der Promoterregion von MCP-1 Bindungsstellen für NF κ B, AP-1 und SP-1 befinden (194). Um den inhibitorischen Effekt

von TRAF3 näher zu untersuchen, wurden die beteiligten Transkriptionsfaktoren, die die CD40L-induzierte MCP-1 und TF Expression induzieren, in der vorliegenden Arbeit analysiert. Die Beteiligung des klassischen proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B, der eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen reguliert, konnte ausgeschlossen werden, da weder die Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α durch CD40L induziert wurde, noch die CD40L-induzierte MCP-1 Expression durch den pharmakologischen NF κ B-Inhibitor PDTC gehemmt werden konnte. Als weitere Möglichkeit könnte die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1, der sich aus *jun* und *fos* zusammensetzt, untersucht werden. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß CD40L-Stimulation die Phosphorylierung von c-jun, die zur Aktivierung von AP-1 führt, induziert (Daten nicht gezeigt). Die kausale Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der CD40-induzierten Aktivierung von Endothelzellen sollte jedoch durch AP-1-Decoy-Oligonukleotide und Gel-Shift-Analysen bestätigt werden. Auch der kombinierte Effekt von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, SP-1 und NF κ B an der CD40-induzierten MCP-1 Expression sollte näher untersucht werden, da die Funktion eines einzelnen Transkriptionsfaktors möglicherweise durch andere ersetzt werden kann.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, daß TRAF3 möglicherweise die Translokation von MAP-Kinasen, die wiederum Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren, vom Zytoplasma in den Kern verhindert. Diese Hypothese könnte durch Immunfärbung von Endothelzellen oder durch Kern-Zytoplasma-Fraktionierung im Western Blot untersucht werden. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Kinasen p38 und ERK1/2 nicht an der CD40-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, da die CD40-induzierte Expression von MCP-1 durch Hemmung der Kinasen p38 und ERK1/2 nicht beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt). Verschiedene Hinweise aus der Literatur lassen vermuten, daß die MAPK "c-jun N-terminal kinase" (JNK) die CD40-induzierte Aktivierung von AP-1 vermittelt, da beispielsweise die TNF α -induzierte Aktivierung von JNK über TRAF2 zur Aktivierung von AP-1 und NF κ B führt (69,70). Zur Untersuchung dieser Hypothese müßte eine dominant-negative Mutante von JNK kloniert werden, da bislang keine pharmakologischen Inhibitoren zur Verfügung stehen. Zur Aufklärung der gesamten Signaltransduktion von der Stimulation des CD40 Rezeptors über verschiedene TRAF-Proteine und Kinasen, die über

Transkriptionsfaktoren die Expression von Chemokinen und Zytokinen induzieren, sind noch weitere Versuche erforderlich.

Die Ergebnisse dieses Kapitels sind in Abbildung 4.2. zusammengefaßt. Shear Stress induziert die Expression des inhibitorischen Adapterproteins TRAF3, das hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen hemmt, indem die Expression von Entzündungsmediatoren (z.B. MCP-1 und TF) inhibiert wird. Über die erhöhte Expression von TRAF3, das die CD40-Signaltransduktion blockiert, vermittelt Shear Stress antiinflammatorische Effekte auf Endothelzellen und wirkt dem Fortschreiten der Entzündung in der Atherosklerose entgegen.

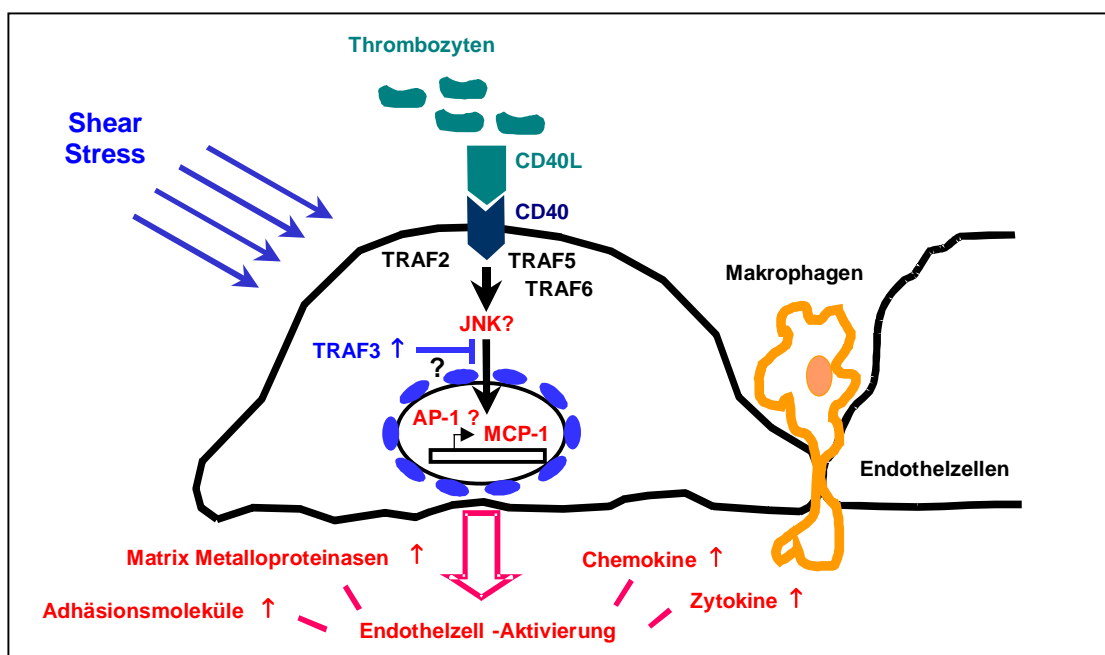


Abbildung 4.2. Shear Stress inhibiert die CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen und induziert die Expression des inhibitorischen kernständigen Proteins TRAF3

4.4. Die Shear Stress-induzierte Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$

Eine Voraussetzung für den protektiven Effekt von Shear Stress auf Endothelzellen ist die Umsetzung von mechanischen Kräften an der Zellmembran in biochemische Signale im Inneren der Zelle. Integrine werden als potentielle Mechanotransduktoren diskutiert, da sie das Zytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix verbinden (138,139). Beispielsweise wird die Fluß-induzierte, NO-abhängige Vasodilatation in Koronararterien durch Integrin-blockierende RGD-Peptide, gehemmt (146). Auch die Shear Stress-induzierte Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und Akt, zwei wichtige Überlebenssignale in Endothelzellen, wird über Integrine vermittelt (147,148). Der Mechanismus der Mechanotransduktion von Shear Stress in Endothelzellen ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Shear Stress spezifisch die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 1$, die in Kombination den Fibronektin-Rezeptor bilden, induziert, was darauf hindeutet, daß der Fibronektin-Rezeptor von besonderer Bedeutung für Endothelzellen ist. Als physiologische Relevanz wird die Adhäsion der Endothelzellen nach Shear Stress-Exposition erhöht. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß der antiapoptotische Effekt von Shear Stress durch Integrin-blockierende RGD-Peptide aufgehoben wird (Abb. 4.3.).

4.4.1. Die Regulation des Fibronektin-Rezeptors $\alpha 5 \beta 1$

Zur Aufklärung der Shear Stress-induzierten Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ wurde der Effekt von NO untersucht. Die Expression des Fibronektin-Rezeptors $\alpha 5 \beta 1$ wurde durch NO und Shear Stress gleichermaßen induziert. Diese Ergebnisse bestätigen die NO-induzierte Expression von Integrinen, die bereits von Murohara und Mitarbeitern gezeigt werden konnte. Die Hemmung der eNOS durch Zugabe von L-NAME reduzierte die Zelloberflächenexpression des Vitronektin-Rezeptors $\alpha v \beta 3$, während die absolute Proteinmenge des Rezeptors gleich blieb (151). In Übereinstimmung hiermit, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine gleichbleibende mRNA Expression der Vitronektin-

Rezeptor-Unterheit αv durch Shear Stress-Exposition. Da die Hemmung der eNOS mit LNMA jedoch keinen Effekt auf die erhöhte Expression der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ durch Shear Stress hatte, kann postuliert werden, daß Shear Stress die Expression des Fibronektin-Rezeptors über einen zusätzlichen NO-unabhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF β und bFGF die Expression von Integrinen induzieren (163,195). Da Shear Stress die Freisetzung von Wachstumsfaktoren stimuliert (117), wurde als weiterer möglicher Mechanismus untersucht, ob Shear Stress die Expression der Integrine über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren induziert. Die Inkubation mit konditioniertem Medium von Shear Stress-exponierten Endothelzellen hatte jedoch keinen Effekt auf die Expression des Fibronektin-Rezeptors $\alpha 5\beta 1$, wodurch die Beteiligung von Wachstumsfaktoren ausgeschlossen werden konnte.

Nach Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix entstehen Fokalkontakte, die aus Integrinen, Adapterproteinen, zytoplasmatischen Kinasen und Zytoskelett-Proteinen zusammengesetzt sind. Die Bildung der Fokalkontakte führt außerdem zu einer Ansammlung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Immunpräzipitationsexperimente haben die Assoziation von Integrinen mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren gezeigt. Beispielsweise bildet Integrin $\alpha v\beta 3$ einen Komplex mit den Insulin-, PDGF- und VEGF-Rezeptoren, während Integrin $\alpha 5\beta 1$ mit dem EGF-Rezeptor assoziiert ist (196,197). Shear Stress kann direkt die Tyrosin-Phosphorylierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren stimulieren und aktiviert z.B. den VEGF-Rezeptor Flk-1 sogar in Gegenwart neutralisierender Antikörper gegen den Liganden VEGF (198). Möglicherweise stimuliert Shear Stress über diesen Weg die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die wiederum Signale ins Zellinnere weiterleiten und die Expression der Integrine induzieren. Zur Überprüfung der Hypothese, daß die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in der Shear Stress-induzierten Integrin Expression eine Rolle spielt, sind jedoch weitere Versuche nötig. Da die transkriptionelle Expression der Integrine durch Shear Stress-Exposition nicht reguliert wurde, wäre die Aufklärung posttranskriptioneller Effekte auf die Integrin Expression von Interesse. Dabei könnte es sich um die Stabilisierung der mRNA oder um die Kontrolle der Protein-Aktivität handeln. Beispielsweise reguliert die ZAP-70 Kinase die Integrin $\beta 1$ Aktivität in T-Zellen (199). Denkbar wäre, daß Shear Stress die Aktivität von Protein-Kinasen induziert, die

wiederum Integrine durch Phosphorylierung aktivieren. Auch die Interaktion mit anderen zytoplasmatischen Proteinen könnte zur Aktivierung der Integrine und Assoziation mit dem Zytoskelett führen.

4.4.2. Physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Fibronektin-Rezeptor Expression

Die Exposition von Endothelzellen mit laminarem Shear Stress erhöhte spezifisch die Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten α_3 , α_5 und β_1 . Im Gegensatz dazu, blieb die Expression der Vitronektin-Rezeptor-Untereinheit α_v und der Laminin-Rezeptor-Untereinheiten α_6 und β_4 durch Shear Stress unverändert. Andere Arbeiten haben bereits gezeigt, daß der Fibronektin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$ für das Überleben von Endothelzellen von Bedeutung ist (165,200). Weiterhin ist bekannt, daß der Fibronektin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$, im Vergleich zu verschiedenen Vitronektin-Rezeptoren, spezifisch die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 induziert und somit die Zellen vor Apoptose, z.B. induziert durch Entzug von Wachstumsfaktoren, schützt (165). Desweiteren haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, daß Shear Stress-Präexposition die Adhäsion von Endothelzellen nach erneutem Ausplattieren stimuliert. Auch die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 wurde durch Adhäsion nach erneutem Ausplattieren von Shear Stress präexponierten Zellen induziert. Da bereits bekannt ist, daß kurzfristige Shear Stress-Exposition von 20 min die Adhäsions-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung stimuliert, wurde der Kurzzeiteffekt von Shear Stress auf die Endothelzell-Adhäsion untersucht (147). Shear Stress-Präexposition für 20 min hatte jedoch keinen Effekt auf die Adhäsion von Endothelzellen nach erneutem Ausplattieren. Demnach ist eine langfristige Exposition der Endothelzellen mit Shear Stress notwendig, um eine erhöhte Zelladhäsion und Adhäsions-induzierte ERK1/2-Aktivierung über die Stimulation der Expression der Integrine α_5 und β_1 zu erhalten. Ähnliche Daten von Palecek und Mitarbeitern zeigen, daß eine Induktion der Integrin α_5 Expression zu einer dosis-abhängigen Erhöhung der Adhäsion und Migration führt (201). In Übereinstimmung hiermit konnte die spezifische Beteiligung der Integrine α_5 und β_1 an der erhöhten Zelladhäsion nach Ausplattieren von Shear Stress-präexponierten Endothelzellen in dieser Arbeit durch inhibierende Antikörper gegen

Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ gezeigt werden. Da die Adhäsion von Endothelzellen über RGD-sensitive Integrine vermittelt wird und die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 nach Adhäsion vermutlich durch Integrin $\beta 1$ induziert wird, könnte die Shear Stress-induzierte Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ Expression die Bindung der Zellen an die Matrix und damit die Aktivierung von ERK1/2 stimulieren. Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der Zelladhäsion durch Hemmung von ERK1/2 mit PD98059 unterstützt diese Hypothese.

Adhärente Zellen, die den Kontakt zur extrazellulären Matrix verlieren, gehen in Apoptose über. Dieser Vorgang wird als "anoikis" (griechisch für "homelessness") bezeichnet. Die Integrin-medierte Adhäsion bestimmter Zelltypen an die Matrix stellt also eine Voraussetzung für das Überleben dieser Zellen dar (162,164). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Inkubation von Endothelzellen mit RGD-Peptiden, die die Integrine $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha v \beta 3$ blockieren, Apoptose induziert. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte bereits gezeigt werden, daß die Adhäsion von Endothelzellen auf eine Fibronectin-Matrix das Überleben von Endothelzellen fördert, indem die zellprotektive MAPK-Kaskade aktiviert wird (200). Die molekularen Grundlagen dieses antiapoptotischen Effektes sind bislang nicht geklärt, vermutlich spielen die Protein-Kinasen Akt und ERK1/2 eine entscheidende Rolle (148,202,203). Integrin $\alpha v \beta 3$ verhindert ebenfalls die Apoptose von Endothelzellen durch die Hemmung von p53 und Aktivierung von NF κ B (166,167). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß der antiapoptotische Effekt von Shear Stress, der bereits mehrfach beschrieben wurde (106,107), durch RGD-Peptide aufgehoben wurde. Demnach benötigt Shear Stress RGD-sensitive Integrine (Fibronectin- und Vitronectin-Rezeptor) für den protektiven Effekt auf Endothelzellen. Die Hemmung der Caspase-Kaskade, die durch proapoptotische Stimuli aktiviert wird, reduzierte die Induktion der Apoptose durch RGD-Peptide, was auf eine Beteiligung der Caspase-Kaskade hinweist. Zusammenfassend läßt sich aus diesen Daten schließen, daß die intakte Integrin-Signalkaskade sowohl für das Überleben von Endothelzellen, als auch für den protektiven Effekt von Shear Stress benötigt wird (Abb. 4.3.).

Das Überleben von Endothelzellen ist für die Integrität der Endothels, die Funktionalität der Blutgefäße und die Gefäßneubildung (Angiogenese) von großer Bedeutung. Wie kürzlich in Gefäßen alter Affen (*Macaca fascicularis*) gezeigt wurde, korreliert die

Endothelzellapoptose mit endothelialer Dysfunktion noch vor dem Auftreten manifester Läsionen (204). Die Shear Stress-induzierte Integrin Expression stellt möglicherweise einen atheroprotektiven Mechanismus dar, der die Integrin-Signalkaskade stimuliert und somit das Überleben von Endothelzellen fördert. Albuquerque und Mitarbeiter haben gezeigt, daß Shear Stress die Regeneration von verletztem Endothel über erhöhte Migration von Endothelzellen *in vitro* stimuliert (205). Da Integrine auch bei der Migration von Endothelzellen eine große Rolle spielen, könnte man postulieren, daß Shear Stress über die erhöhte Integrin Expression die Reendothelialisierung, d.h. die Regeneration von verletztem Endothel, z.B. nach Balloon-Dilatation, fördert. Interessant wäre es in weiteren Versuchen die spezifische Beteiligung der Integrine $\alpha 5$ und $\beta 1$ an der Shear Stress-induzierten Migration von Endothelzellen zu untersuchen.

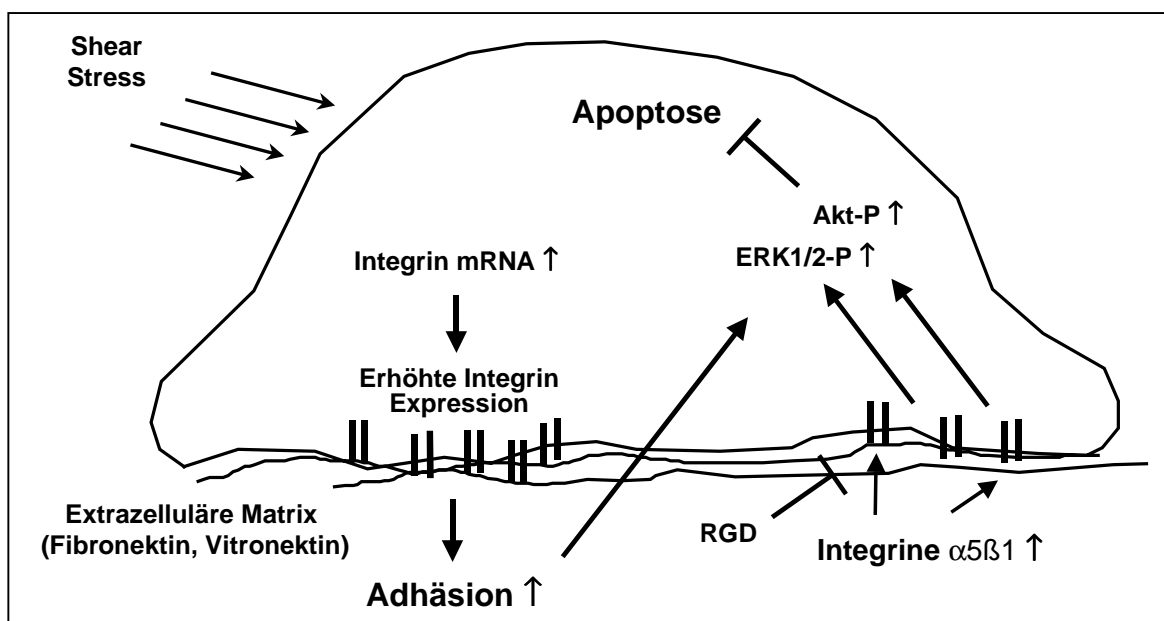


Abbildung 4.3. Shear Stress stimuliert die Expression der Fibronektin-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ und fördert die Adhäsion und die Adhäsions-induzierte ERK1/2-Aktivierung in Endothelzellen

4.5. Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß Shear Stress über die Induktion der Clusterin und TRAF3 Expression antiinflammatorische Effekte auf Endothelzellen ausübt, indem die Komplement- bzw. CD40-induzierte Aktivierung von Endothelzellen gehemmt wird (Abb. 4.4.). Im Gegensatz dazu, wurde die Expression der Entzündungsmediatoren Interleukin-8, Interferon γ , RANTES und gp34 und des proinflammatorischen Thrombin-Rezeptors durch Shear Stress nicht reguliert. Diese Ergebnisse ergänzen den bereits beschriebenen antiinflammatorischen Effekt von Shear Stress auf Endothelzellen, wodurch die Adhäsion und Migration von Immunzellen an das Endothel inhibiert wird (81,117). Desweiteren erhöht Shear Stress die Adhäsion von Endothelzellen, eine Voraussetzung für das Überleben adhärenter Zellen, über die spezifische Induktion der Expression des Fibronectin-Rezeptors $\alpha 5\beta 1$ (Abb. 4.4.). Die Ergebnisse des „Atlas cDNA Expression Array“, der zur Untersuchung der Shear Stress-regulierten Genexpression in Endothelzellen verwendet wurde, lassen darüberhinaus noch weitere interessante Fragen offen. Beispielsweise wurde die Expression der GTPase RhoA durch Shear Stress-Exposition reduziert. RhoA ist an der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und an der Bildung von Fokalkontakten in verschiedenen Zellen beteiligt (206-208). In Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß RhoA die Shear Stress-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts und die Aktivierung von AP-1 vermittelt (209). Eine Erklärung für die reduzierte Expression von RhoA wäre, daß der Prozeß der Umstrukturierung des Zytoskeletts nach 6 h Shear Stress-Exposition bereits abgeschlossen ist oder die Funktion von RhoA durch eine andere GTPase, wie z.B. Cdc42 oder Rac, ersetzt werden kann. Andererseits konnte gezeigt werden, daß die Adhäsion von Monozyten an aktivierten Endothelzellen über die Regulation der Monozyten-Rezeptoren E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 durch Rho vermittelt wird (210). Zusätzlich ist bekannt, daß RhoA an der Thrombin-induzierten Permeabilität des Endothels beteiligt ist (211) und oxidiertes LDL die Rho-Signalkaskade in Endothelzellen aktiviert (212). Daraus ergibt sich die Frage, ob Shear Stress über die reduzierte Expression von RhoA atheroprotektiv wirksam ist.

Weitere Experimente sind erforderlich, um die Shear Stress-regulierte Expression verschiedener Gene, die in dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten, zu

bestätigen und die physiologische Relevanz zu untersuchen. Die Aufklärung weiterer Mechanismen, die das Überleben von Endothelzellen und die Aufrechterhaltung ihrer Funktion gewährleisten, sind eine wichtige Voraussetzung, um der Atherogenese und den daraus resultierenden Komplikationen entgegen zu wirken.

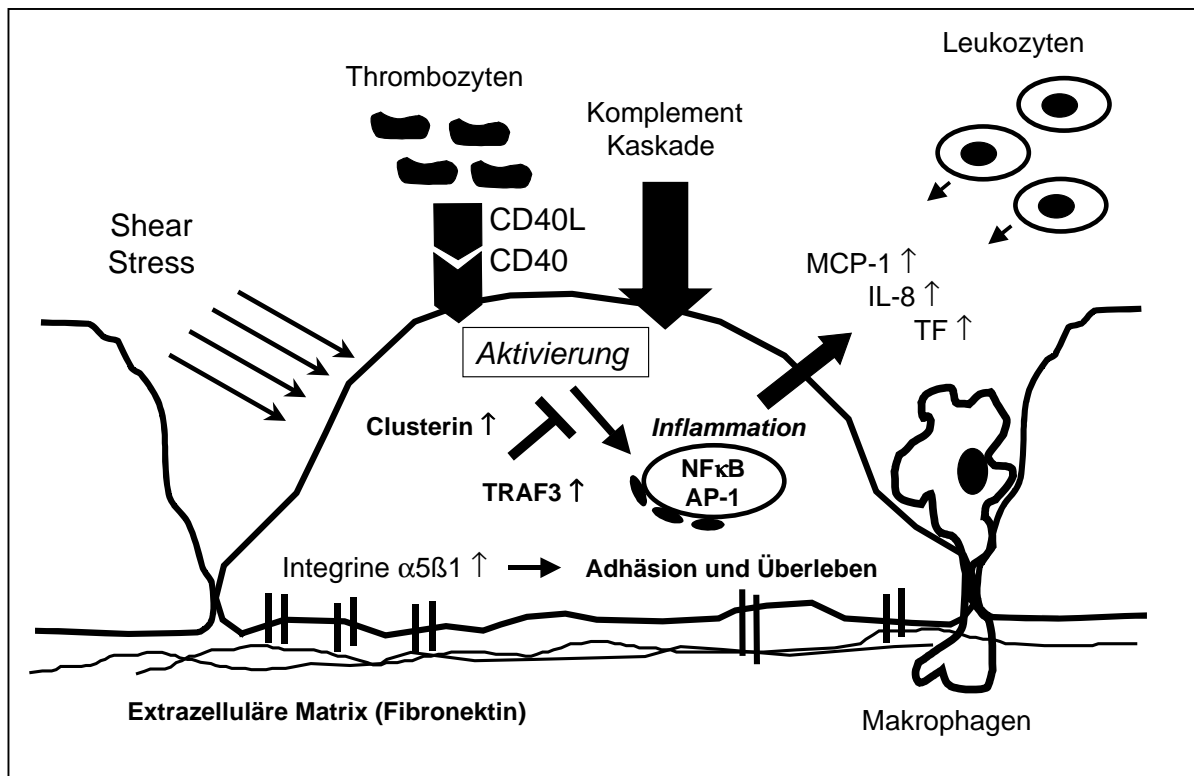


Abbildung 4.4. Zusammenfassung der protektiven Effekte von Shear Stress auf Endothelzellen über die Regulation der Genexpression

5. Zusammenfassung

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Blutgefäße, die nach der "response-to-injury"-Hypothese durch die Verletzung des Endothels initiiert wird. Dabei führt die Aktivierung von Endothelzellen durch verschiedene proatherosklerotische Faktoren, wie z.B. das Komplementsystem oder das CD40-System, zur "Endotheldysfunktion". In den betroffenen Bereichen des Gefäßes entstehen frühe atherosklerotische Läsionen, die durch veränderte Adhäsivität und Permeabilität des Endothels zur Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Entzündungszellen und somit zum Fortschreiten der inflammatorischen Reaktion und zur Progression der Atherosklerose führen. Die laminare Schubspannung des fließenden Blutes (Shear Stress) ist einer der wichtigsten endogenen atheroprotektiven Faktoren im kardiovaskulären System. Dagegen sind Störungen der lokalen Hämodynamik im Blutgefäß mit endothelialer Dysfunktion und dem Auftreten von atherosklerotischen Läsionen assoziiert. Zur Identifizierung atheroprotektiver Mechanismen wurde die Shear Stress-regulierte Genexpression in Endothelzellen mittels „Atlas cDNA Expression Array“ im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Von den 55 Shear Stress-induzierten Genen, wurde die Expression der potentiell antiinflammatorischen Proteine Clusterin und TRAF3 und der möglichen Mechanotransduktoren Integrin $\alpha 5$ und Integrin $\beta 1$ analysiert und die Bedeutung für die Funktion von Endothelzellen untersucht.

Shear Stress-Exposition erhöhte spezifisch die Expression des Komplement-Inhibitors Clusterin. Zusätzlich inhibierte Shear Stress, über die erhöhte Clusterin Expression, die Komplement-induzierte Expression der proinflammatorischen Chemokine MCP-1 („Monocyte chemoattractant protein-1“) und Interleukin-8, die Monozyten und Leukozyten anlocken und die Entzündungsreaktion der Endothelzellen vorantreiben.

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß Shear Stress die Expression des inhibitorischen Proteins TRAF3 („tumor necrosis factor receptor-associated factor 3“), das an der CD40-Signalkaskade beteiligt ist, erhöht. Im Gegensatz dazu, wurden weder die homologen Proteine TRAF2 und TRAF5, noch der CD40 Rezeptor oder CD40 Ligand durch Shear Stress reguliert. Sowohl Shear Stress als auch TRAF3 hemmen die CD40-induzierte Expression des proinflammatorischen Proteins MCP-1 und des

prothrombotischen Proteins "Tissue Factor". Entgegen den Erwartungen lokalisierte TRAF3, das ursprünglich als Rezeptor-assoziiertes Adapterprotein identifiziert wurde, hauptsächlich im Zellkern. Demzufolge könnte TRAF3 eine inhibitorische Funktion im Zellkern ausüben, indem es beispielsweise die Translokation von MAP-Kinasen oder die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA beeinflusst.

Die Umsetzung von mechanischen Kräften in biochemische Signale im Zytoplasma ist Voraussetzung für den protektiven Effekt von Shear Stress auf Endothelzellen. Als Mechanotransduktoren sind Integrine von zentraler Bedeutung, da sie eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix herstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Shear Stress die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$, die zusammen den Fibronectin-Rezeptor bilden, erhöht. Dabei konnte die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) und Wachstumsfaktoren, die durch Shear Stress-Exposition freigesetzt werden und die Expression von Integrinen stimulieren, ausgeschlossen werden. Andere Integrine, wie z.B. der Laminin-Rezeptor $\alpha 6 \beta 4$, wurden durch Shear Stress nicht reguliert. Als physiologische Relevanz der Shear Stress-induzierten Integrin Expression wurde die Adhäsion von Endothelzellen erhöht. Weiterhin induzierte die Präexposition von Endothelzellen mit Shear Stress die Adhäsions-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2, die wichtige Überlebenssignale in Endothelzellen vermittelt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß Shear Stress die Expression der antiinflammatorischen Proteine Clusterin und TRAF3 sowie der Mechanotransduktoren Integrin $\alpha 5$ und $\beta 1$ erhöht. Die Hemmung der Komplement- und CD40-induzierten Aktivierung von Endothelzellen durch Shear Stress ist von Bedeutung, um sowohl der Initiation als auch der Progression der Atherosklerose entgegen zu wirken. Die Shear Stress-induzierte Adhäsion, die über die Stimulation der Expression des Fibronectin-Rezeptors $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt wird, ist eine wichtige Voraussetzung für die Mechanotransduktion von Shear Stress und das Überleben von Endothelzellen. Die Identifizierung und Aufklärung atheroprotektiver Mechanismen, die durch die laminare Schubspannung des Blutes aktiviert werden, könnten dazu beitragen, die Integrität des Endothels und die Funktionalität der Blutgefäße im Rahmen der Atherosklerose zu schützen.

6. Literatur

1. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**, 3527-61
2. Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* **14**, 840-56
3. Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1512-31
4. Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**, 791-804
5. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26
6. Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis - a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809
7. Zeiher, A. M. (1996) Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon ? *Lancet* **348**, S10-S12
8. Noll, G. (1998) Pathogenesis of atherosclerosis: a possible relation to infection. *Atherosclerosis* **140 Suppl 1**, S3-9
9. Rössig, L., Dimmeler, S., and Zeiher, A. (2001) Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Research in Cardiology in press*
10. Phipps, R. P. (2000) Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6930-2
11. Bhakdi, S. (2000) Pathogenesis of atherosclerosis: infectious versus immune pathogenesis. A new concept. *Herz* **25**, 84-6
12. Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P., and Rollins, B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **2**, 275-81
13. Dawson, T. C., Kuziel, W. A., Osahar, T. A., and Maeda, N. (1999) Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **143**, 205-11

14. Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J., and Coughlin, S. R. (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2752-6
15. Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J., and Fogelman, A. M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5134-8
16. Wang, G. P., Deng, Z. D., Ni, J., and Qu, Z. L. (1997) Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis* **133**, 31-6
17. Rus, H. G., Vlaicu, R., and Niculescu, F. (1996) Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* **127**, 263-71
18. Ikeda, U., Ikeda, M., Oohara, T., Oguchi, A., Kamitani, T., Tsuruya, Y., and Kano, S. (1991) Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* **260**, H1713-7
19. Yue, T. L., McKenna, P. J., Gu, J. L., and Feuerstein, G. Z. (1993) Interleukin-8 is chemotactic for vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **240**, 81-4
20. Rollins, B. J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-28
21. Fichtlscherer, S., and Zeiher, A. M. (1999) Endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome. *Herz* **24**, 534-43
22. Kinoshita, T. (1991) Biology of complement: the overture. *Immunol Today* **12**, 291-5
23. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (1997) *Cellular and Molecular Immunology*, Third edition Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia
24. Bhakdi, S. (1998) Complement and atherogenesis: the unknown connection. *Ann Med* **30**, 503-7
25. Torzewski, M., Klouche, M., Hock, J., Messner, M., Dorweiler, B., Torzewski, J., Gabbert, H. E., and Bhakdi, S. (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 369-78
26. Schmiedt, W., Kinscherf, R., Deigner, H. P., Kamencic, H., Nauen, O., Kilo, J., Oelert, H., Metz, J., and Bhakdi, S. (1998) Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1790-5
27. Kilgore, K. S., Schmid, E., Shanley, T. P., Flory, C. M., Maheswari, V., Tramontini, N. L., Cohen, H., Ward, P. A., Friedl, H. P., and Warren, J. S. (1997) Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. *Am J Pathol* **150**, 2019-31

28. Christiansen, V. J., Sims, P. J., and Hamilton, K. K. (1997) Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 164-71
29. Kilgore, K. S., Flory, C. M., Miller, B. F., Evans, V. M., and Warren, J. S. (1996) The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* **149**, 953-61
30. van den Berg, R. H., Faber-Krol, M. C., Sim, R. B., and Daha, M. R. (1998) The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* **161**, 6924-30
31. Lozada, C., Levin, R. I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., Recht, P. A., Golden, B., and Cronstein, B. N. (1995) Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8378-82
32. Lagrand, W. K., Visser, C. A., Hermens, W. T., Niessen, H. W., Verheugt, F. W., Wolbink, G. J., and Hack, C. E. (1999) C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? *Circulation* **100**, 96-102
33. Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M., and Hemmes, M. (1999) Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2348-54
34. Bhakdi, S., Dorweiler, B., Kirchmann, R., Torzewski, J., Weise, E., Trantum-Jensen, J., Walev, I., and Wieland, E. (1995) On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med* **182**, 1959-71
35. Volanakis, J. E. (1982) Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci* **389**, 235-50
36. Lagrand, W. K., Niessen, H. W., Wolbink, G. J., Jaspars, L. H., Visser, C. A., Verheugt, F. W., Meijer, C. J., and Hack, C. E. (1997) C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation* **95**, 97-103
37. Hatanaka, K., Li, X. A., Masuda, K., Yutani, C., and Yamamoto, A. (1995) Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method. *Pathol Int* **45**, 635-41
38. Carrington, C. A., Richards, A. C., van den Bogaerde, J., Tucker, A. W., and White, D. J. (1997) Complement activation, its consequences, and blockade by gene transfer. *World J Surg* **21**, 907-12
39. Berge, V., Johnson, E., and Hogasen, K. (1997) Clusterin and the terminal complement pathway synthesized by human umbilical vein endothelial cells are closely linked when detected on co-cultured agarose beads. *Apmis* **105**, 17-24

40. Hamilton, K. K., Ji, Z., Rollins, S., Stewart, B. H., and Sims, P. J. (1990) Regulatory control of the terminal complement proteins at the surface of human endothelial cells: neutralization of a C5b-9 inhibitor by antibody to CD59. *Blood* **76**, 2572-7
41. Jenne, D. E., and Tschopp, J. (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* **17**, 154-9
42. Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S., and French, L. E. (1993) Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol* **151**, 2159-65
43. Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., and Wilson, M. R. (1999) Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* **274**, 6875-81
44. Koch-Brandt, C., and Morgans, C. (1996) Clusterin: a role in cell survival in the face of apoptosis? *Prog Mol Subcell Biol* **16**, 130-49
45. Kehry, M. R. (1996) CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* **156**, 2345-8
46. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Bourcier, T., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S., and Libby, P. (1997) Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1931-6
47. Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., and Kroczeck, R. A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591-4
48. Slupsky, J. R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Kroczeck, R. A., and Muller-Berghaus, G. (1998) Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* **80**, 1008-14
49. Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Atkinson, E., Levesque, E., Herman, M., Graber, P., Basset, P., and Libby, P. (1999) Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med* **189**, 843-53
50. Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S., and Libby, P. (1997) Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* **96**, 396-9
51. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Atkinson, E., and Libby, P. (1998) Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* **394**, 200-3
52. Lutgens, E., Cleutjens, K. B., Heeneman, S., Koteliansky, V. E., Burkly, L. C., and Daemen, M. J. (2000) Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment induces a stable plaque phenotype [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7464-9
53. Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Shimizu, K., Mach, F., and Libby, P. (2000) Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7458-63

54. Lutgens, E., Gorelik, L., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., Grewal, I. S., Koteliansky, V. E., and Flavell, R. A. (1999) Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* **5**, 1313-6
55. Aukrust, P., Muller, F., Ueland, T., Berget, T., Aaser, E., Brunsvig, A., Solum, N. O., Forfang, K., Froland, S. S., and Gullestad, L. (1999) Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* **100**, 614-20
56. Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* **254**, 14-24
57. Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (1998) Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* **12**, 2821-30
58. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., and Goeddel, D. V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-92
59. Hu, H. M., O'Rourke, K., Boguski, M. S., and Dixit, V. M. (1994) A novel RING finger protein interacts with the cytoplasmic domain of CD40. *J Biol Chem* **269**, 30069-72
60. Cheng, G., Cleary, A. M., Ye, Z. S., Hong, D. I., Lederman, S., and Baltimore, D. (1995) Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling. *Science* **267**, 1494-8
61. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* **80**, 389-99
62. Sato, T., Irie, S., and Reed, J. C. (1995) A novel member of the TRAF family of putative signal transducing proteins binds to the cytosolic domain of CD40. *FEBS Lett* **358**, 113-8
63. Regnier, C. H., Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Chenard, M. P., Wendling, C., Basset, P., and Rio, M. C. (1995) Presence of a new conserved domain in CART1, a novel member of the tumor necrosis factor receptor-associated protein family, which is expressed in breast carcinoma. *J Biol Chem* **270**, 25715-21
64. Ishida, T. K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996) TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9437-42
65. Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T., and Inoue, J. (1996) Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* **271**, 28745-8
66. Xu, Y., Cheng, G., and Baltimore, D. (1996) Targeted disruption of TRAF3 leads to postnatal lethality and defective T-dependent immune responses. *Immunity* **5**, 407-15

67. Cheng, G., and Baltimore, D. (1996) TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev* **10**, 963-73
68. Rothe, M., Xiong, J., Shu, H. B., Williamson, K., Goddard, A., and Goeddel, D. V. (1996) I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8241-6
69. Reinhard, C., Shamon, B., Shyamala, V., and Williams, L. T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *Embo J* **16**, 1080-92
70. Song, H. Y., Regnier, C. H., Kirschning, C. J., Goeddel, D. V., and Rothe, M. (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9792-6
71. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., and Goeddel, D. V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**, 1424-7
72. Arch, R. H., and Thompson, C. B. (1998) 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* **18**, 558-65
73. Baldwin, A. S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-83
74. Liu, Z., Hsu, H., Goeddel, D. V., and Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kB activation prevents cell death. *Cell* **87**, 565-576
75. Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H., and Okumura, K. (1996) TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* **271**, 14661-4
76. Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* **2**, 389-95
77. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-6
78. Lee, H. H., Dempsey, P. W., Parks, T. P., Zhu, X., Baltimore, D., and Cheng, G. (1999) Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1421-6
79. VanArsdale, T. L., VanArsdale, S. L., Force, W. R., Walter, B. N., Mosialos, G., Kieff, E., Reed, J. C., and Ware, C. F. (1997) Lymphotoxin-beta receptor signaling complex: role of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 recruitment in cell death and activation of nuclear factor kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2460-5
80. Kawamata, S., Hori, T., Imura, A., Takaori-Kondo, A., and Uchiyama, T. (1998) Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **273**, 5808-14

81. Traub, O., and Berk, B. C. (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 677-85
82. Caro, C. G., Fitz-Gerald, J. M., and Schroter, R. C. (1969) Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature* **223**, 1159-60
83. Park, L., Raman, K. G., Lee, K. J., Lu, Y., Ferran, L. J., Jr., Chow, W. S., Stern, D., and Schmidt, A. M. (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* **4**, 1025-31
84. Malek, A. M., and Izumo, S. (1994) Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *J Hypertens* **12**, 989-99
85. Ku, D. N., Giddens, D. P., Zarins, C. K., and Glagov, S. (1985) Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* **5**, 293-302
86. Asakura, T., and Karino, T. (1990) Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* **66**, 1045-66
87. Berceli, S. A., Warty, V. S., Shepeck, R. A., Mandarino, W. A., Tanksale, S. K., and Borovetz, H. S. (1990) Hemodynamics and low density lipoprotein metabolism. Rates of low density lipoprotein incorporation and degradation along medial and lateral walls of the rabbit aorto-iliac bifurcation. *Arteriosclerosis* **10**, 686-94
88. Weinbaum, S., and Chien, S. (1993) Lipid transport aspects of atherogenesis. *J Biomech Eng* **115**, 602-10
89. Gimbrone, M. A., Nagel, T., and Topper, J. N. (1997) Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* **99**, 1809-1813
90. Dewey, C. F., Jr., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A., Jr., and Davies, P. F. (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* **103**, 177-85
91. Flaherty, J. T., Pierce, J. E., Ferrans, V. J., Patel, D. J., Tucker, W. K., and Fry, D. L. (1972) Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res* **30**, 23-33
92. Davies, P. F. (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**, 519-60
93. Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S., and Tedgui, A. (1996) Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1256-62
94. Frangos, J. A., Eskin, S. G., McIntire, L. V., and Ives, C. L. (1985) Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* **227**, 1477-9
95. Grabowski, E. F., Jaffe, E. A., and Weksler, B. B. (1985) Prostacyclin production by cultured endothelial cell monolayers exposed to step increases in shear stress. *J Lab Clin Med* **105**, 36-43
96. Rubanyi, G. M., Romero, J. C., and Vanhoutte, P. M. (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* **250**, H1145-H1149

97. Malek, A. M., Jackman, R., Rosenberg, R. D., and Izumo, S. (1994) Endothelial expression of thrombomodulin is reversibly regulated by fluid shear stress. *Circ Res* **74**, 852-60
98. Takada, Y., Shinkai, F., Kondo, S., Yamamoto, S., Tsuboi, H., Korenaga, R., and Ando, J. (1994) Fluid shear stress increases the expression of thrombomodulin by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **205**, 1345-52
99. Diamond, S. L., Sharefkin, J. B., Dieffenbach, C., Frasier-Scott, K., McIntire, L. V., and Eskin, S. G. (1990) Tissue plasminogen activator messenger RNA levels increase in cultured human endothelial cells exposed to laminar shear stress. *J Cell Physiol* **143**, 364-71
100. Walpola, P. L., Gotlieb, A. I., Cybulsky, M. I., and Langille, B. L. (1995) Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress [published erratum appears in *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 Mar; 15(3):429]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 2-10
101. Ando, J., Tsuboi, H., Korenaga, R., Takada, Y., Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M., and Kamiya, A. (1994) Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am J Physiol* **267**, C679-87
102. Ando, J., Tsuboi, H., Korenaga, R., Takada, Y., Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M., and Kamiya, A. (1995) Down-regulation of vascular adhesion molecule-1 by fluid shear stress in cultured mouse endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* **748**, 148-56
103. Tsao, P. S., Buitrago, R., Chan, J. R., and Cooke, J. P. (1996) Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness: Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* **94**, 1682-1689
104. Morigi, M., Zoja, C., Figliuzzi, M., Foppolo, M., Micheletti, G., Bontempelli, M., Saronni, M., Remuzzi, G., and Remuzzi, A. (1995) Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* **85**, 1696-703
105. Cybulsky, M. I., and Gimbrone, M. A. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791
106. Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., and Zeiher, A. M. (1996) Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.* **399**, 71-74
107. Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J., and Zeiher, A. M. (1999) Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 656-64
108. Dimmeler, S., Fisslthaler, B., Fleming, I., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells via Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605
109. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., and Zeiher, A. M. (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP32-like proteases. *J. Exp. Med.* **185**, 601-608

110. Rössig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mülsch, A., and Dimmeler, S. (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* **274**, 6823-6826
111. Malek, A. M., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., and Izumo, S. (1993) Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest* **92**, 2013-21
112. Araki, S., Simada, Y., Kaji, K., and Hayashi, H. (1990) Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **172**, 1081-5
113. Sharefkin, J. B., Diamond, S. L., Eskin, S. G., McIntire, L. V., and Dieffenbach, C. W. (1991) Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J Vasc Surg* **14**, 1-9
114. Rieder, M. J., Carmona, R., Krieger, J. E., Pritchard, K. A., Jr., and Greene, A. S. (1997) Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circ Res* **80**, 312-9
115. Buga, G. M., Gold, M. E., Fukuto, J. M., and Ignarro, L. J. (1991) Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* **17**, 187-93
116. Ohno, M., Cooke, J. P., Dzau, V. J., and Gibbons, G. H. (1995) Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* **95**, 1363-9
117. Chien, S., Li, S., and Shyy, Y. J. (1998) Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* **31**, 162-9
118. Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D. T., Dewey, C. F., Jr., and Gimbrone, M. A., Jr. (1993) Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7908
119. Khachigian, L. M., Resnick, N., Gimbrone, M. A., Jr., and Collins, T. (1995) Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* **96**, 1169-75
120. Lin, M. C., Almus-Jacobs, F., Chen, H. H., Parry, G. C., Mackman, N., Shyy, J. Y., and Chien, S. (1997) Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* **99**, 737-44
121. Nemerson, Y. (1992) The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol* **29**, 170-6
122. Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., and Gordon, D. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2839-43
123. Conway, E. M., Bach, R., Rosenberg, R. D., and Konigsberg, W. H. (1989) Tumor necrosis factor enhances expression of tissue factor mRNA in endothelial cells. *Thromb Res* **53**, 231-41

124. Shyy, J. Y., Lin, M. C., Han, J., Lu, Y., Petrim, M., and Chien, S. (1995) The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"- responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8069-73
125. Zeiher, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., and Busse, R. (1995) Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* **76**, 980-6
126. Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fisher, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R. M., Alexander, R. W., and Murphy, T. J. (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **90**, 2092-6
127. Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., and Bloch, K. D. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase [published erratum appears in *J Biol Chem* 1992 Nov 5;267(31):22694]. *J Biol Chem* **267**, 14519-22
128. Sessa, W. C., Harrison, J. K., Barber, C. M., Zeng, D., Durieux, M. E., D'Angelo, D. D., Lynch, K. R., and Peach, M. J. (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**, 15274-6
129. Kuchan, M. J., and Frangos, J. A. (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol* **266**, C628-C636
130. Fleming, I., Bauersachs, J., and Busse, R. (1997) Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res* **34**, 165-74
131. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601
132. Schnitzer, J. E., Liu, J., and Oh, P. (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem* **270**, 14399-404
133. Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M., and Harrison, D. G. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* **269**, C1371-1375
134. Jo, H., Sipos, K., Go, Y.-M., Law, R., Rong, J., and McDonald, J. M. (1997) Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 1395-1401
135. Gudi, S. R., Clark, C. B., and Frangos, J. A. (1996) Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res* **79**, 834-9
136. D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., and Plow, E. F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci* **16**, 246-50
137. Ingber, D. (1991) Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 841-8
138. Shyy, J. Y., and Chien, S. (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 707-13

139. Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E. (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 849-54
140. Hynes, R. O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-54
141. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000) Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-21788
142. Yamada, K. M., and Miyamoto, S. (1995) Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 681-9
143. Burridge, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 463-518
144. Giancotti, F. G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32
145. Calderwood, D. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2000) Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling. *J Biol Chem*
146. Muller, J. M., Chilian, W. M., and Davies, M. J. (1997) Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ Res* **80**, 320-326
147. Takahashi, M., and Berk, B. C. (1996) Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* **98**, 2623-31
148. Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J., and Zeiher, A. M. (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* **83**, 334-342
149. Ishida, T., Peterson, T. E., Kovach, N. L., and Berk, B. C. (1996) MAP kinase activation by flow in endothelial cells - Role of β 1 integrins and tyrosine kinases. *Circ Res* **79**, 310-316
150. Li, S., Kim, M., Hu, Y.-L., Jalali, S., Schlaepfer, D. D., Hunter, T., Chien, S., and Shyy, J. Y.-J. (1997) Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **272**, 30455-30462
151. Murohara, T., Witzenbichler, B., Spyridopoulos, I., Asahara, T., Ding, B., Sullivan, A., Losordo, D. W., and Isner, J. M. (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1156-61
152. Schwartz, M. A., Schaller, M. D., and Ginsberg, M. H. (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 549-99
153. Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P. (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* **88**, 39-48
154. Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G., and Remuzzi, A. (1995) Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* **76**, 536-43
155. Liu, Z., Batt, D. B., and Carmichael, G. G. (1994) An improved rapid method of isolating RNA from cultured cells by SDS-acid phenol/chloroform extraction. *BioTechniques* **16**, 56-57

156. Ramasamy, S., Parthasarathy, S., and Harrison, D. G. (1998) Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res* **39**, 268-76
157. Inoue, N., Ramasamy, S., Fukai, T., Nerem, R. M., and Harrison, D. G. (1996) Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res* **79**, 32-37
158. Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W. J., Dewey, C. F., Jr., and Gimbrone, M. A., Jr. (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **94**, 885-91
159. Colotta, F., Sica, F. L., Sironi, M., Luini, W., Rabiet, M. J., and Mantovani, A. (1994) Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol* **144**, 975-85
160. Roebuck, K. A., Carpenter, L. R., Lakshminarayanan, V., Page, S. M., Moy, J. N., and Thomas, L. L. (1999) Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *J Leukoc Biol* **65**, 291-8
161. Lentsch, A. B., and Ward, P. A. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* **190**, 343-8
162. Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., and Colotta, F. (1994) Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* **127**, 537-46
163. Platten, M., Wick, W., Wild-Bode, C., Aulwurm, S., Dichgans, J., and Weller, M. (2000) Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 607-11
164. Frisch, S. M., and Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**, 619-26
165. Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J. C., and Ruoslahti, E. (1995) The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6161-5
166. Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M. L., Fausto, N., Nicosia, R. F., and Giachelli, C. M. (1998) NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* **141**, 1083-93
167. Stromblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C., and Cheresh, D. A. (1996) Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J Clin Invest* **98**, 426-33
168. Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Meriin, A. B., Sherman, M. Y., Morimoto, R. I., and Massie, B. (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**, 7146-59
169. Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., and Green, D. R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**, 469-75

170. Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10832-10837
171. Xu, Q., Hu, Y., Kleindienst, R., and Wick, G. (1997) Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. *J Clin Invest* **100**, 1089-97
172. Hochleitner, B. W., Hochleitner, E. O., Obrist, P., Eberl, T., Amberger, A., Xu, Q., Margreiter, R., and Wick, G. (2000) Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in endothelial cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 617-23
173. Hong, N. A., Flannery, M., Hsieh, S. N., Cado, D., Pedersen, R., and Winoto, A. (2000) Mice lacking Dad1, the defender against apoptotic death-1, express abnormal N-linked glycoproteins and undergo increased embryonic apoptosis. *Dev Biol* **220**, 76-84
174. Ekert, P. G., Silke, J., and Vaux, D. L. (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**, 1081-6
175. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424
176. Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10
177. Vander Heiden, M. G., and Thompson, C. B. (1999) Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* **1**, E209-16
178. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-56
179. Mevorach, D., Mascarenhas, J. O., Gershov, D., and Elkon, K. B. (1998) Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med* **188**, 2313-20
180. Stoiber, H., Clivio, A., and Dierich, M. P. (1997) Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol* **15**, 649-74
181. Vakeva, A., Morgan, B. P., Tikkanen, I., Helin, K., Laurila, P., and Meri, S. (1994) Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium. *Am J Pathol* **144**, 1357-68
182. Gelissen, I. C., Hochgrebe, T., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., Jessup, W., Dean, R. T., and Brown, A. J. (1998) Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J* **331**, 231-7
183. Jin, G., and Howe, P. H. (1997) Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta. *J Biol Chem* **272**, 26620-6
184. Jin, G., and Howe, P. H. (1999) Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos. *Eur J Biochem* **263**, 534-42

185. Gutacker, C., Klock, G., Diel, P., and Koch-Brandt, C. (1999) Nerve growth factor and epidermal growth factor stimulate clusterin gene expression in PC12 cells. *Biochem J* **339**, 759-66
186. Furlong, E. E. M., Keon, N. K., Thornton, F. D., Rein, T., and Martin, F. (1996) Expression of a 74-kDa nuclear factor 1 (NF1) protein is induced in mouse mammary gland involution. Involution-enhanced occupation of a twin NF1 binding element in the testosterone-repressed prostate message-2/clusterin promoter. *J Biol Chem* **271**, 29688-97
187. Michel, D., Chatelain, G., North, S., and Brun, G. (1997) Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* **328**, 45-50
188. Miyagawa, S., Shirakura, R., Iwata, K., Nakata, S., Matsumiya, G., Izutani, H., Matsuda, H., Terado, A., Matsumoto, M., Nagasawa, S., and et al. (1994) Effects of transfected complement regulatory proteins, MCP, DAF, and MCP/DAE hybrid, on complement-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* **58**, 834-40
189. Carrington, C. A., Richards, A. C., Cozzi, E., Langford, G., Yannoutsos, N., and White, D. J. (1995) Expression of human DAF and MCP on pig endothelial cells protects from human complement. *Transplant Proc* **27**, 321-3
190. Tsao, P. S., Wang, B., Buitrago, R., Shyy, J. Y., and Cooke, J. P. (1997) Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* **96**, 934-40
191. Schwenzler, R., Siemienski, K., Liptay, S., Schubert, G., Peters, N., Scheurich, P., Schmid, R. M., and Wajant, H. (1999) The human tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 1 gene (TRAF1) is up-regulated by cytokines of the TNF ligand family and modulates TNF-induced activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **274**, 19368-74
192. Takaori-Kondo, A., Hori, T., Fukunaga, K., Morita, R., Kawamata, S., and Uchiyama, T. (2000) Both amino- and carboxyl-terminal domains of TRAF3 negatively regulate NF-kappaB activation induced by OX40 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 856-63
193. Gamper, C., van Eyndhoven, W. G., Schweiger, E., Mossbacher, M., Koo, B., and Lederman, S. (2000) TRAF-3 interacts with p62 nucleoporin, a component of the nuclear pore central plug that binds classical NLS-containing import complexes. *Mol Immunol* **37**, 73-84
194. Marchand, P., Resch, K., and Radeke, H. H. (2000) Selective inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human embryonal kidney cells by specific triple helix-forming oligonucleotides. *J Immunol* **164**, 2070-6
195. Klein, S., Giancotti, F. G., Presta, M., Albelda, S. M., Buck, C. A., and Rifkin, D. B. (1993) Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* **4**, 973-82
196. Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J. S., and Yamada, K. M. (1996) Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* **135**, 1633-42
197. Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., and Defilippi, P. (1998) Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *Embo J* **17**, 6622-32

198. Chen, K. D., Li, Y. S., Kim, M., Li, S., Yuan, S., Chien, S., and Shyy, J. Y. (1999) Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem* **274**, 18393-400
199. Epler, J. A., Liu, R., Chung, H., Ottoson, N. C., and Shimizu, Y. (2000) Regulation of beta(1) Integrin-Mediated Adhesion by T Cell Receptor Signaling Involves ZAP-70 but Differs from Signaling Events That Regulate Transcriptional Activity. *J Immunol* **165**, 4941-4949
200. Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J., Marcantonio, E. E., and Giancotti, F. G. (1996) The adapter protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**, 733-743
201. Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness [published erratum appears in Nature 1997 Jul 10;388(6638):210]. *Nature* **385**, 537-40
202. Eliceiri, B. P., Klemke, R., Stromblad, S., and Cheresh, D. A. (1998) Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* **140**, 1255-63
203. Fujio, Y., and Walsh, K. (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* **274**, 16349-54
204. Asai, K., Kudej, R. K., Shen, Y. T., Yang, G. P., Takagi, G., Kudej, A. B., Geng, Y. J., Sato, N., Nazareno, J. B., Vatner, D. E., Natividad, F., Bishop, S. P., and Vatner, S. F. (2000) Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1493-9
205. Albuquerque, M. L., Waters, C. M., Savla, U., Schnaper, H. W., and Flozak, A. S. (2000) Shear stress enhances human endothelial cell wound closure in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H293-302
206. Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14
207. Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**, 2295-322
208. Ridley, A. (2000) Rho GTPases. Integrating integrin signaling [comment]. *J Cell Biol* **150**, F107-9
209. Li, S., Chen, B. P., Azuma, N., Hu, Y. L., Wu, S. Z., Sumpio, B. E., Shyy, J. Y., and Chien, S. (1999) Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest* **103**, 1141-50
210. Wojciak-Stothard, B., Williams, L., and Ridley, A. J. (1999) Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol* **145**, 1293-307
211. van Nieuw Amerongen, G. P., van Delft, S., Vermeer, M. A., Collard, J. G., and van Hinsbergh, V. W. (2000) Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* **87**, 335-40

-
212. Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J. W., Aepfelbacher, M., and Siess, W. (1999) Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* **274**, 30361-4

Lebenslauf

Name: Urbich
Vorname: Carmen
Geburtstag: 18.03.1973
Geburtsort: Böblingen

Staatsangehörigkeit: Deutsch
Wohnort: Ziegelhüttenweg 82, 60598 Frankfurt

Schulische Ausbildung:

1979 - 1983: Grundschule in Nieder-Roden
1983 - 1985: Josef-v.-Eichendorff-Schule in Obertshausen
1985 - 1989: Gymnasialzweig der Hermann-Hesse-Schule in Obertshausen
1989 - 1992: Abitur an der Rudolf-Koch-Schule in Offenbach mit der Gesamtnote 1,8

Hochschulausbildung:

Okt. 1992 - Feb. 1998: Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

November 1994: Diplomvorprüfung in Biologie mit der Gesamtnote "gut"

März 1997: Diplomhauptprüfung in Biologie mit der Gesamtnote "sehr gut"
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik bei Prof. Dr. Starzinski-Powitz und Prof. Dr. Protsch von Zieten
1. Nebenfach: Mikrobiologie bei Prof. Dr. Pons
2. Nebenfach: Biophysik bei Prof. Dr. Schubert

- April 1997: Beginn der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Starzinski-Powitz in der Humangenetik zum Thema: "Molekulare Charakterisierung zellulärer Protein-Bindungspartner des M-Cadherin-Catenin-Komplexes"
- Februar 1998: Abschluß des Biologiestudiums als Diplombiologin mit der Gesamtnote "sehr gut"
- April 1998: Beginn des Promotionsstudiums unter der Betreuung von Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz. Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik in Frankfurt am Main in der Abteilung Molekulare Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. A. M. Zeiher und PD Dr. S. Dimmeler zum Thema: "Identifizierung neuer Schubspannungs-regulierter Gene mittels "Atlas cDNA Expression Array": Bedeutung für die Funktion von Endothelzellen" durchgeführt.
- November 2000: Einreichung der Promotionsarbeit