

Aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie
im Zentrum für Medizinische Forschung
der Universitätsmedizin Rostock
Leiterin: Prof. Dr. B. Nebe

Expression von Signal- und Adhäsionsmolekülen in
humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen
nach mechanischer Stimulation der Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin

Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Nis-Christian Nissen
aus
Heide (Holstein)

Rostock 2019

Dekan: Prof. Dr. med. univ. E. Reisinger

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. J. Rychly, Prof. Dr. B. Nebe

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. B. Nebe

Ko-Referent/in: Prof. Dr. G. Steinhoff

Drittreferent/in: Prof. Dr. B. Fabry

Datum der mündlichen Prüfung: 30.01.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Die mechanische Stimulation von Endothelzellen.....	3
1.2 Endothelzellen.....	4
1.3 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen: Vorkommen, Funktion.....	5
1.4 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen in der medizinischen Forschung.....	6
1.5 Signal- und Adhäsionsmoleküle.....	7
1.5.1 Integrine.....	7
1.5.2 Erk.....	8
1.5.3 Akt.....	10
1.5.4 Src.....	11
1.5.5 VE-Cadherin.....	13
1.5.6 Caveolin-1.....	14
1.5.7 Connexin43.....	15
2 Zielstellung	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Materialien.....	18
3.2 Chemikalien.....	18
3.3 Geräte.....	19
3.4 Software.....	19
3.5 Antikörper.....	20
3.6 Kits.....	20
3.7 Methoden.....	21
3.7.1 Zellen.....	21
3.7.2 Zellgewinnung.....	21
3.7.3 Medium.....	22
3.7.4 Zellpassage und –aussaat.....	22
3.7.5 Vorbereitung der Silikonkammern, Einsatz des APPJ.....	23
3.7.6 Mechanischer Reiz - Versuchsansatz mit paramagnetischen β 1-Integrin beschichteten Beads.....	25
3.7.7 Mechanischer Reiz - Versuchsansatz mit STREX-Zellstreckung.....	27
3.7.8 Zellyse.....	29
3.7.9 Lichtmikroskopie.....	29
3.7.10 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.7.11 Fluoreszenzmikroskopie.....	30
3.7.12 Proteinbestimmung mit dem Qubit® Fluorometer.....	31
3.7.13 Bio-Plex Assay.....	32

3.7.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
3.7.15 Western-Blot	33
3.8 Statistik.....	34
4 Ergebnisse	36
4.1 Einfluss der mechanischen Stimulation von β 1-Integrin auf die Zellen	36
4.1.1 Einfluss des mechanischen Integrinreizes auf pErk.....	36
4.1.2 Einfluss des mechanischen Integrinreizes auf pAkt.....	37
4.2 Einfluss der Plasmabehandlung auf die Silikonkammern und die Endothelzellverankerung.....	38
4.3 Mechanische Stimulation der Zellen mit dem STREX Cell Strain Instrument	42
4.3.1 Lichtmikroskopische Veränderungen der Zellen nach mechanischer Stimulation..	42
4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie von VE-Cadherin nach mechanischer Stimulation.....	44
4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie von Connexin43 nach mechanischer Stimulation.....	47
4.3.4 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Akt 51	
4.3.5 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Erk	52
4.3.6 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von VE- Cadherin.....	53
4.3.7 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Connexin43.....	54
4.3.8 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Caveolin-1	55
4.3.9 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Src	56
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	66
7 Abkürzungsverzeichnis	68
8 Abbildungsverzeichnis	71
9 Literaturverzeichnis.....	75

1 Einleitung

1.1 Die mechanische Stimulation von Endothelzellen

Der Einfluss exogener mechanischer Kräfte ist in der Entwicklung von Zellen und in deren Adaption an die Umgebung von zentraler Bedeutung. Dies hat eine große Bedeutung nicht nur bei Endothelzellen, die im Organismus einem ständigen pulsatilen Blutfluss ausgesetzt sind, auch bei anderen Zellen wie Knorpel- und Knochenzellen, die sich entsprechend der Richtung und Intensität äußerlicher mechanischer Reize anpassen können, prägen diese Reize essentiell die zelluläre Aktivität. Auf molekularbiologischer Ebene können Zellen von außen einwirkende mechanische Reize in chemische Signale umwandeln, die die zelluläre Aktivität weiter modulieren können. Dieser Vorgang wird als Mechanotransduktion bezeichnet (Kolahi et Mofrad, 2010).

In der Anpassung der Endothelzellen auf mechanische Kräfte sind unter anderem strukturelle Komponenten wie das Zytoskelett beteiligt, das die Zellmorphologie mitbestimmt. Ebenso werden zelluläre Adhäsionsmoleküle beeinflusst, sowie über Signalkaskaden aktivierte oder inhibierte zentrale Regulationsproteine. Diese können im weiteren Prozess auf die Expression von Genen einwirken (Lehoux et al., 2003).

Die Art und Weise des Blutstromes und der damit auf die Endothelzellen wirkenden mechanischen Kräfte verändert die molekularen Anpassungsvorgänge von Endothelzellen auf komplexe Weise.

So reagieren Endothelzellen beispielsweise unterschiedlich auf laminare und auf turbulente Flüsse. Dies hat in der Folge unter anderem Einfluss auf das Ausmaß atherosklerotischer beziehungsweise atheroprotektiver Gefäßwandveränderungen. Während laminare Flüsse eher letzteres befördern, bewirken turbulente Flüsse, wie sie in vivo zum Beispiel an Gefäßbifurkationen oder hinter Gefäßstenosen vorkommen, eher atherosklerotische Veränderungen. Obwohl die genauen Ursachen und Mechanismen hierfür trotz intensiver Forschung noch unklar sind, sind viele bekannte Faktoren beschrieben. Dazu gehören Veränderungen in der Expression von Zytokinen, zentralen Regulationsproteinen und Oberflächenrezeptoren, die die Zelldysfunktion, die Entzündungsaktivität sowie die Plaquebildung befördern (Berk et al., 2001; Yoshizumi et al., 2003; Heo et al., 2014).

Ein Einfluss mechanischer Kräfte auf die Genexpression von Endothelzellen wurde ebenso beschrieben. Die beeinflussten Gene wirken physiologisch unter anderem in der Regulierung

1 Einleitung

der Zellapoptose, des Zellzyklus, des oxidativen Stresses und der Entzündungsaktivität mit. Dies trägt wahrscheinlich auch an der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen bei (Brooks et al., 2004).

Flüssigkeitsströme, die den Blutstrom simulierten, konnten in mehreren Arbeiten die Angiogenese sowie die Aussprossung von Endothelzellen in die umgebende Matrix anregen. Dies ist beispielsweise in der Wundheilung bedeutend (Song et al., 2011; Galie et al., 2014). Eine Reaktivierung bestimmter Gene, die auf die Zellproliferation und -reparatur einwirken, wurde nachgewiesen (Lee et al., 2015)

Als Reaktion auf mechanischen Reiz können Endothelzellen über intrazelluläre Signalkaskaden Stickstoffmonoxid (NO) produzieren (Dragovich et al., 2016). Dieses kann über Rezeptoren von Muskelzellen, die sich ebenfalls in den Gefäßwänden befinden, eine Relaxierung dieser Zellen bewirken, was in vivo zu einer Dilatation des entsprechenden Blutgefäßes führt.

1.2 Endothelzellen

Die Blutgefäße des menschlichen Körpers sind von einer Wand umgeben, die aus drei Schichten aufgebaut ist. Diese werden von innen nach außen Intima (Tunica interna), Media (Tunica media) und Adventitia (Tunica externa) genannt. Ausnahme sind die Kapillaren, die kleinsten Gefäße, die nur von einer Intima mit einer Basalmembran umgeben sind.

Je nach Gefäßtyp, ihrer Beanspruchung und ihrer Funktion im Organismus variiert die Dicke der Gefäßschichten.

Die Adventitia verankert die Gefäße in ihre Umgebung und sorgt in größeren Gefäßen mit Hilfe eines eigenen Blutgefäßsystems für eine ausreichende Durchblutung der Gefäßwand. Die Media, bestehend aus glatten Muskelzellen, elastischen Fasern und Kollagen, widersteht dem Druck aus dem Gefäßlumen und reguliert ihn durch Kontraktion beziehungsweise Relaxation der Muskelzellen.

Das Endothel ist als innerste der drei Schichten verantwortlich für die Regulation der Gefäßwand. So nimmt es Druckveränderungen des intraluminalen Blutstromes und Konzentrationsveränderungen einer Vielzahl verschiedener Substanzen im Blut wahr und reagiert entsprechend. Beispielsweise kann das Endothel bei erhöhtem Blutdruck Substanzen

1 Einleitung

freisetzen, die eine Erschlaffung der glatten Muskulatur und somit eine Vergrößerung des Gefäßlumendurchmessers herbeiführen. Im Fall von Verletzungen des Gefäßes wirkt es, getriggert durch freigesetzte Mediatoren, auf die Gerinnung des Blutes ein um dort eine Stillung der Blutung zu ermöglichen. Ebenfalls kann das Endothel bei der Bekämpfung von Entzündungen beitragen, indem am Infektionsherd, nach Ausschüttung entsprechender Mediatoren, die Endothelzellen Leukozyten binden und ins Interstitium schleusen, wo diese zur Infektionsbekämpfung benötigt werden.

1.3 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen: Vorkommen, Funktion

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) gehören zur Gruppe der Endothelzellen. Diese bilden in den menschlichen Blutgefäßen die sogenannte Intima, die innerste Schicht der Gefäßwand, die sich direkt am Blutstrom befindet. Als mikrovaskuläre Gefäße bezeichnet man vor allem Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Die zu den mikrovaskulären Gefäßen gehörenden HDMEC befinden sich in der Lederhaut, auch Dermis genannt. Diese Hautschicht grenzt nach außen an die Epidermis, die Oberhaut, und nach innen an die Subcutis, die Unterhaut.

Die HDMEC haben unterschiedliche Funktionen. Die Hauptfunktion ist die Abgrenzung des Blutstroms vom Extravasalraum zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Blutflusses.

HDMEC tragen ebenfalls zu Entzündungsreaktionen bei, indem sie über diverse Mechanismen proinflammatorische Zytokine und Chemokine exprimieren, unter anderem über den Proteinase-aktivierten Rezeptor 2 (Shpacovitch et al., 2002) und NFκB (Castiglioni et al., 2014). Dies spielt auch bei allergischen Reaktionen der Haut eine Rolle, z.B. auf Hausstaubmilben (Arlian et al., 2009).

Auch eine potentiell prothrombotische Reaktion durch Expression von Gewebefaktor wurde nachgewiesen, hervorgerufen durch proinflammatorische Mediatoren wie TNFα und eine damit einhergehende erhöhte Aktivierung der Gerinnungskaskade (O'Reilly et al., 2003).

Ebenfalls nachgewiesen ist eine erhöhte Expression von intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) als Antwort auf Immunmediatoren wie Interleukin-1α (IL1α), IL1β, Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interferon-γ (IFNγ) (Swerlick et al., 1991; Detmar et al., 1992). ICAM-1 ist ein Molekül zur Leukozytenbindung und Teil der Leukodiapedese.

Andere experimentelle Untersuchungen mit HDMEC, die in Co-Kulturen mit dermalen

1 Einleitung

Fibroblasten gezüchtet wurden, zeigten bei Infektion mit dem Dengue-Virus gemeinsame reaktive Mediatorausschüttungen, die hemmend auf die Virusreplikation und aktivierend auf die Leukodiapedese wirkten (Bustos-Arriaga et al., 2016).

Eine weitere Rolle von HDMEC ist die hauptsächlich durch VEGF (vascular endothelial growth factor) vermittelte Angiogenese, also die Gefäßbildung aus bereits bestehenden Gefäßen, z.B. im Reparaturprozess nach Verletzungen (Ahluwalia et al., 2014).

Eine regulierende Wirkung auf den Gefäßtonus und damit auf den Blutdruck leisten HDMEC durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO wirkt auf die glatten Gefäßmuskelzellen, die durch Kontraktion den Gefäßtonus einstellen (Hoffmann et al., 1999; Bull et al., 1996).

In den mikrovaskulären Gefäßsystemen zeigen Endothelzellen eine Längsausrichtung entlang des Blutstroms, die sie unter Ruhebedingungen *in vitro* nicht ausprägen. Es wird angenommen, dass die Ausrichtung durch die ständigen mechanischen Scherkräfte zustande kommt, die durch den hydrostatischen Druck des intraluminalen Bluts verursacht werden, wie *in vitro* Versuche zeigen (Eskin et al., 1984; Levesque und Nerem, 1985; Remuzzi et al., 1984; Viggers et al., 1986). Zusätzlich zum hydrostatischen Druck werden die pulsatile, hydrodynamischen Dehnungsbeanspruchungen durch den zyklisch wirkenden, höheren systolischen Blutdruck dafür verantwortlich gemacht, wie in zahlreichen Studien mit zyklischen mechanischen Stimulationen belegt wurde (Shirinsky et al., 1989; Kanda et Matsuda, 1993; Naruse et al., 1998).

1.4 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen in der medizinischen Forschung

HDMEC kamen bisher bei Untersuchungen in der Malariaforschung zum Einsatz. Durch die Expression vom Oberflächenmolekül CD36 können HDMEC mit *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten erkennen, binden und Gefäßkomplikationen hervorrufen, die so nicht in größeren Gefäßen möglich sind, da dort keine CD36 Expression stattfindet (Swerlick et al., 1992).

Auch in der Erforschung des Morbus Behçet wurden Versuche mit HDMEC durchgeführt. Morbus Behçet ist eine rheumatische Erkrankung, welche auf einer Vaskulitis basiert. Mehrere Studien stellten eine für die Vaskulitis wahrscheinlich verantwortliche Bildung von Autoantikörpern gegen Oberflächenantigene von HDMEC fest (Lee et al., 1999; Lee et al.,

1 Einleitung

2003). Diese Autoantikörper verursachten unter anderem eine erhöhte T-Zell-Adhäsion an die HDMEC (Lee et al., 1999; Lee et al., 2002).

Die Purpura Schönlein-Henoch, eine immunologisch vermittelte Vaskulitis kleinerer Gefäße, ist mit der inflammatorischen Antwort von HDMEC assoziiert, die somit an der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf beteiligt sind (Chen et al., 2011; Chen et al., 2014).

In einer neueren Untersuchung des sekundären Morbus Raynaud, einer Krankheit, die auf einer Vielzahl von Kollagenosen basieren kann und in der sich die Blutgefäße der Haut durch kälteassoziierte Autoantigene verengen, wurden bei HDMEC nach Inkubation mit Patientenserum erhöhte Proteinvorkommen auf der Zelloberfläche beobachtet, darunter war das Protein hnRNP-K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K). Dieses als kälteassoziiertes Autoantigen geltende Protein könnte als möglicher Biomarker für sekundären Morbus Raynaud dienen (Yang et al., 2015).

Auch in anderen Erkrankungen wie dem Lupus erythematodes, der Endothelzellen des vaskulären Systems betrifft (Bando et al., 2003; Ciołkiewicz et al., 2010), können HDMEC eine Rolle spielen. Genauere Nachforschungen stehen noch aus.

1.5 Signal- und Adhäsionsmoleküle

1.5.1 Integrine

Als heterodimere Transmembranproteine befinden sich Integrine fest in der Zellmembran. Sie sind aus zwei nichtkovalent verbundenen Untereinheiten aufgebaut. 18 α - und 8 β -Untereinheiten sind bekannt, diese können sich zu insgesamt 24 verschiedenen Integrinrezeptoren zusammenfügen. Die unterschiedlichen Integrinrezeptoren interagieren dabei mit jeweils spezifischen Bindungspartnern.

Außerhalb der Zelle sind die Integrine an andere Zellen oder an die Extrazelluläre Matrix (EZM) gebunden, innerhalb der Zelle an Signalproteine bzw. über Adapterproteine an das Zytoskelett.

Zu den Aufgaben der Integrine zählen die mechanische Verankerung der Zelle an andere Zellen und in die Umgebung, die Zellmigration und die Signaltransduktion. Integrine haben unter anderem Einfluss auf Signalkaskaden, die auf die Zellproliferation und Apoptose wirken.

Integrine können äußere mechanische Reize auf Signalproteine ins Innere der Zelle übertragen und dort weitere Signalkaskaden in Gang setzen (Outside-In), zum Beispiel um die Zelle an

1 Einleitung

veränderte äußere Umstände zu adaptieren. Sie können aber auch Signale vom Inneren der Zelle in die Umgebung überleiten (Inside-Out).

Um ein Outside-In-Signal erfolgreich zu vermitteln, kann die extrazelluläre Domäne eines Integrins beispielsweise an Proteine der EZM binden, wie Fibronectin und Kollagen. Die intrazelluläre Domäne wiederum kann an Adapterproteine wie Talin und Filamin anheften, über die das Integrin an das Aktin-Zytoskelett angebracht wird und über die eine Signalweiterleitung aus dem Extrazellulärraum auf das Zytoskelett ermöglicht wird (Kiema et al., 2006; Wegener et al., 2007). Der sogenannte SHPS-1/SHP-2-Komplex ist ein Molekülkomplex, welches nach Integrinverankerung an die EZM biochemische Signalproteine wie die MAP-Kinase aktiviert und auf die morphologische Anpassung der Zelle wirkt (Tsuda et al., 1998; Oh et al., 1999).

Die Inside-Out Signalweiterleitung, also die Übertragung eines Signals aus dem Zellinneren in den Extrazellulärraum, findet über die intrazelluläre Bindung von Integrin an Talin statt. Dadurch wird das Integrin aktiviert und es kommt zu Veränderungen in der extrazellulären Domäne. Dies erhöht die Ligandenaffinität (Tadokoro et al., 2003). Dadurch entstehen unter anderem stärkere Interaktionen und eine verstärkte Adhäsion zwischen Integrinen und EZM-Proteinen.

Dass eine Stimulation biologischer Funktionen in Zellen durch magnetische und mechanische Reizung ihrer Integrine möglich ist, wurde unter anderem bei Stammzellen und HUVEC bereits erfolgreich nachgewiesen (Pommerenke et al., 1996; Fabry et al., 2001; Kasten et al., 2010).

1.5.2 Erk

Die extracellular-signal regulated kinase (Erk) ist eine intrazelluläre Proteinkinase, die als Signalmolekül unter anderem in der Proliferation, Differenzierung und Morphogenese von Zellen eine hohe Bedeutsamkeit besitzt. Erk gehört zu den mitogen-activated protein kinases (MAP-Kinasen).

Die relevantesten und zuerst entdeckten Erks sind die 44 kDa große Erk1 (auch MAPK3) und die 42 kDa große Erk2 (auch MAPK1) (Boulton et al., 1990; Boulton et al., 1991). Daneben sind noch andere alternativ gespleißte Formen beschrieben, darunter die 46 kDa große Erk1b (Yung et al., 2000), die 42kDa große Erk1c (Aebersold et al., 2004) und die Erk2b (Gonzalez et al., 1992).

Andere Erk-Isoformen sind Erk3 (Boulton et al., 1991), Erk4 (García et al., 1996), Erk5 (Zhou et al., 1995), Erk7 (Abe et al., 1999) und Erk8 (Abe et al., 2002).

Die Signalkaskade zur Aktivierung von Erk1/2 ist gut erforscht und bekannt. Die Erk1/2-

1 Einleitung

Kaskade kann durch verschiedene extrazelluläre Signale aktiviert werden, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine (Ishibe et al., 2004). Diese aktivieren einen Rezeptor durch Phosphorylierung seiner zytoplasmatischen Domäne. An diese bindet das Adapterprotein GRB2, woran der GTP-Austauschfaktor SOS anheftet. Dieses aktiviert durch Austausch von GDP zu GTP die GTPase Ras. Ras wiederum aktiviert die Kinase Raf, welche durch Phosphorylierung die MAPKK aktiviert. Die MAPKK phosphoryliert und aktiviert somit Erk1/2. Erk1/2 kann anschließend andere Signalmoleküle aktivieren beziehungsweise in den Nukleus translozieren, um dort die Transkription von Genen zu beeinflussen (Ranganathan et al., 2006).

Ein viel untersuchter Effekt ist die Veränderung der Zellmorphogenese durch Bildung eines Erk-Paxillin-Komplexes, ausgelöst durch den Wachstumsfaktor Hepatocyte Growth Factor. Dies führt zu einer Relokalisation vom Erk-Paxillin-Komplex zum Ort der Zell-Matrix-Interaktion. Paxillin aktiviert dort FAK und führt so zu einer gezielten Veränderung der Zellmorphologie (Liu et al., 2002; Ishibe et al., 2003; Ishibe et al., 2004).

Ein weiterer Effekt von Erk1/2 ist die Proliferation der Zelle durch Anregung des Zellzyklus. Dies wird einerseits ermöglicht durch einen Erk-vermittelten Anstieg der Genexpression von c-Fos (Gille et al., 1995). Dieses Protein ist über mehrere Zwischenschritte für die Expression von dem Zellzyklusprotein Cyclin D1 verantwortlich. Andererseits wird durch die direkte Phosphorylierung des c-Fos-Proteins durch Erk dieses stabilisiert und kann seine Funktion in der Zelle ausüben (Murphy et al., 2002).

Die Erk-Aktivierung wird auch durch intrazelluläre Faktoren beeinflusst. Zum Beispiel ist die durch Wachstumsfaktoren durchgeführte Erk5-Aktivierung zusätzlich abhängig vom cAMP-Spiegel in der Zelle. Erk1/2 werden jedoch nicht durch veränderte cAMP-Spiegel in ihrer Aktivierung beeinflusst (Pearson et al., 2006).

Anders ist dies bei Endothelzellen von Zystennieren. Die Zystennieren entstehen durch eine autosomal-dominante genetische Erkrankung. Bei den betroffenen Endothelzellen ist eine veränderte Interaktion zwischen Erk1/2 und cAMP zu beobachten. Dort stimuliert eine erhöhte cAMP-Konzentration die Aktivierung von Erk1/2 und die Proliferation der Zellen über eine alternative Kaskade (Yamaguchi et al., 2003).

1 Einleitung

1.5.3 Akt

Die Serin/Threoninkinase Akt, auch unter der Bezeichnung Proteinkinase B (PKB) bekannt, ist eine zentrale zelluläre Proteinkinase, die in nahezu allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Sie ist Teil vieler zellulärer Funktionen, unter anderem wirkt sie in der Proliferation, in der Apoptose, in der Motilität und im zellulären Metabolismus mit.

Es existieren 3 Akt-Isoformen: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ . Das Protein Akt ist sehr homolog zur Proteinkinase C (Jones et al., 1991).

Akt wird über einen Signalweg aktiviert, der beispielsweise durch den Wachstumsfaktor Fibroblast Growth Factor (FGF) oder Epidermal Growth Factor (EGF) aktiviert wird (Ojeda et al., 2011). Aber auch andere Proteine wie sonic hedgehog (shh) und insulin-like growth factor 1 (IGF-1) können den Signalweg aktivieren (Peltier et al., 2007). Der aktivierende Wachstumsfaktor bindet extrazellulär an einen transmembranösen Rezeptor. Dieser phosphoryliert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die daraufhin spezielle Phospholipide in der Zellmembran phosphoryliert, hauptsächlich Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3), an welches wiederum Akt bindet und durch die Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) aktiviert wird (Osaki et al., 2004).

Es wurde herausgefunden, dass die Substratspezifität von Akt auf ein spezielles Erkennungsmotiv von nur wenigen Aminosäuren zurückzuführen ist. Proteine mit diesem Erkennungsmotiv werden bevorzugt von Akt phosphoryliert (Alessi et al., 1996).

Akt verhindert die Apoptose der Zelle, indem es, aktiviert durch einen Wachstumsfaktor, proapoptotische Proteine wie BAD phosphoryliert und so in ihrer Funktion inhibiert (Datta et al., 1997). Ebenfalls ist es für Akt möglich, Transkriptionsfaktoren, die die Synthese proapoptotischer Proteine ermöglichen, beispielsweise FKHRL1, direkt zu phosphorylieren und zu inhibieren (Brunet et al., 1999). Akt greift außerdem in die Aktivität von mTOR ein, einem wichtigen Enzym im Zellwachstum und in der Zellproliferation. Dies geschieht, indem Akt das Tumorsuppressorprotein TSC2 phosphoryliert, welches durch diese Phosphorylierung inaktiviert wird und in seiner inhibierenden Funktion gehindert wird, die es auf mTOR ausübt. Die Aktivität von mTOR kann hierdurch steigen (Inoki et al., 2002).

Ein zweites Regulatorprotein namens PRAS40 ist, wie TSC2, ebenfalls ein Inhibitor von mTOR und kann seinerseits auch durch Akt phosphoryliert und inaktiviert werden (Vander Haar et al., 2007).

Akt spielt auch im Zellzyklus eine Rolle. Indem Akt den Zellzyklusinhibitor p27 einerseits

1 Einleitung

durch Phosphorylierung in seiner Funktion inhibiert, andererseits sein Vorkommen im Zellkern vermindert und im Zytosol erhöht, nimmt die Aktivität der für den Zellzyklus essentiellen Proteinkinase CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) und damit die Zellproliferation zu (Shin et al., 2002). Auch der Zellzyklusinhibitor p21 befindet sich nach Phosphorylierung durch Akt vermehrt im Zytosol, was zu der erhöhten Proliferation von Krebszellen beitragen kann (Zhou et al., 2001). Die Inhibierung der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) durch Akt (Cross et al., 1995) hat ebenfalls Einfluss auf den Zellzyklus, da GSK3 in der Konzentrationsabnahme von Cyclin D und Cyclin E involviert ist, zwei aktivierenden Steuerelementen des Zellzyklus (Welcker et al., 2003; Diehl et al., 1998).

In Endothelzellen hat Akt eine zusätzliche Funktion in der Angiogenese. Neben dem beschriebenen Zellüberleben und der Zellproliferation regt Akt die NO-Produktion an, indem es die endotheliale NO-Synthase (eNOS) durch Phosphorylierung aktiviert (Dimmeler et al., 1999). Das dabei entstehende NO fördert die Vasodilatation und die Angiogenese (Ziche et al., 2000).

Auch im Zellmetabolismus ist Akt von Belang. Es fördert die Glukoseaufnahme in Adipozyten, indem es die dafür notwendigen Glukosetransporter in die Plasmamembran befördert (Calera et al., 1998). Auch ist Akt für das Vorkommen diverser anderer, für Zellen essentieller Transporter in der Plasmamembran nötig, darunter Transporter für Aminosäuren, Eisen und Low Density Lipoprotein (Edinger et Thompson, 2002). In der Zelle selbst fördert Akt unter anderem die Glykolyse (Elstrom et al., 2004). Außerdem beeinträchtigt Akt die Gluconeogenese und die β -Oxidation durch Inhibierung des Co-Aktivators PGC-1 α (Li et al., 2007). Auch die Fettsäuresynthese wird beeinflusst durch Akt-abhängige Aktivierung eines zentralen Enzyms, der ATP-Citrat-Lyase (Berwick et al., 2002).

1.5.4 Src

Src (beziehungsweise c-Src) ist das am besten untersuchte Protein aus der Familie der Src-Kinasen. Insgesamt fasst diese Familie 9 Tyrosinkinasen, darunter das genannte Src, zusätzlich Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk und c-Yes. Src ist an vielen Signalkaskaden beteiligt und ist unter anderem in der Zellproliferation, der Zellmigration und in der Angiogenese von Wichtigkeit.

Src besitzt 4 SH-Domänen, einen N- und einen C-Terminus. Nahe des C-terminalen Endes befindet sich eine regulierende Aminosäure, Tyr527, die, im phosphorylierten Zustand, an die SH2-Domäne bindet und Src in eine inaktive Position bringt. Ist Tyr527 dephosphoryliert,

1 Einleitung

gelangt Src in die geöffnete, aktivierte Position (Liu et al., 1994).

Innerhalb der Zelle bindet Src an die Zellmembran oder an endosomale Membranen. Je nach zellulärer Lokalisation beeinflusst Src die Zelle auf unterschiedliche Art und Weise, dazu gehören beispielsweise Modifikationen am Aktinzytoskelett, der Membrantransport oder die Beteiligung an der Mitose (Bjorge et al., 2000). Src kann unter anderem mit diversen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und mit FAK interagieren (Parsons et al., 1997).

An der Zellmigration und der Zelladhäsion ist Src insofern beteiligt, als dass eine erhöhte Src-Aktivierung mit einer erhöhten Auflösung von Cadherin/Catenin-Komplexen und mit einer verminderten Zelladhäsion einhergeht (Irby et al., 2002).

Src kann durch ein Integrinsignal einen Komplex mit FAK eingehen. Dieser Komplex kann diverse Proteine wie Cas und Paxillin phosphorylieren und die Zellmotilität sowie das Zellüberleben beeinflussen (Mitra et al., 2006).

Auch beeinflusst Src das auf die Mitose der Zelle auswirkende Signal vom Platelet-derived growth factor (PDGF), indem es mit dem PDGF-Rezeptor interagiert (Twamley-Stein et al., 1993).

Im Zellzyklus hat Src einen direkten Einfluss. Beim Übergang in die Mitosephase wird Src vorübergehend aktiviert. Eine Blockierung der Src-Aktivierung in dieser Phase verhindert die Mitose der Zelle (Roche et al., 1995).

In der Angiogenese interagiert Src mit dem Aktinzytoskelett und hat dadurch Anteil an der Migration der Zelle. Eine Inhibierung von Src hat zur Folge, dass Angiogenese durch eine insuffiziente Organisation des Aktinzytoskeletts nicht stattfinden kann (Kilarski et al., 2003). Auch induziert Src die Aktivierung von dem Angiogenesefaktor Interleukin-8 (Yeh et al., 2004).

In VEGF-vermittelten proangiogenetischen Zellmodulationen spielt Src eine wichtige unterstützende Rolle, wie die gezielte Ausschaltung von Src in Versuchen gezeigt hat (Werdich et al., 2005).

Ein besonderes Interesse in der Forschung gilt Src insofern, als dass es das erste entdeckte Proto-Onkogen ist. Bis heute werden in der Tumorforschung die Rolle und das onkogene Potential von Src als zentrales Protein in der Zellproliferation, Migration, im Zellzyklus und in der Angiogenese untersucht. Unter anderem werden Src-Inhibitoren als Mittel zur Therapie von Tumoren untersucht (Elsberger et al., 2010).

Aufgrund seines vermehrten Vorkommens in gewissen Tumorzellen steht pSrc als potentieller Tumormarker in Diskussion (Yokoi et al., 2011).

1 Einleitung

1.5.5 VE-Cadherin

Vascular-endothelial Cadherin (VE-Cadherin) ist ein transmembranöses Adhäsionsprotein, welches gehäuft in Zell-Zell-Kontakten von Endothelzellen auftritt und dort einen wichtigen Stellenwert besitzt. VE-Cadherin ist Teil von Adherens Junctions und endothelialen desmosomalen Kontakten und damit essentiell für die Zelladhäsion benachbarter Zellen, die Kontrolle vaskulärer Permeabilität, die Morphogenese der Zelle und die Signaltransduktion.

Während die extrazelluläre Domäne von VE-Cadherin spezifisch ist, besitzt die intrazelluläre Domäne eine ähnliche Struktur wie die anderer klassischer Cadherine (Angst et al., 2001). Um an der Zelle Adherens Junctions zu bilden, können β -Catenin und Plakoglobin an die intrazelluläre Domäne von VE-Cadherin binden. Plakoglobin und β -Catenin verbinden sich weiterhin mit α -Catenin, welches über eine andere Verbindungsstelle den Cadherin/Catenin-Komplex mit α -Actinin und dem Zytoskelett verbinden kann (Nieset et al., 1997). Plakoglobin und β -Catenin können jedoch nicht nur mit α -Actinin, sondern ebenfalls mit Transkriptionsfaktoren im Zellkern interagieren und so die Genexpression in der Zelle modifizieren (Ben-Ze'ev et al., 1998).

Außerdem kann VE-Cadherin mit dem vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) einen Komplex bilden und mit diesem die Signaltransduktion in die Zelle hinein modulieren (Shay-Salit et al., 2002).

Ein weiteres Protein, mit dem VE-Cadherin interagieren kann, ist vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP). VE-Cadherin und VE-PTP können sich über ihre extrazellulären Domänen verankern. VE-PTP reduziert über seine Phosphatase-Aktivität die Tyrosin-Phosphorylierung von VE-Cadherin und beeinflusst somit die Funktion von VE-Cadherin als Adhäsionsprotein (Nawroth et al., 2002).

In Endothelzellen kommen keine klassischen Desmosomen vor. VE-Cadherin ersetzt diese funktionell, indem es neben seiner Funktion als Cadherin in Adherens Junctions zusätzlich die Rolle eines desmosomalen Cadherins einnehmen kann. Über seine Bindung an das desmosomale Protein Desmoplakin kann es so auch in der Endothelzelle an Intermediärfilamente binden und den sogenannten Complexus adhaerens herstellen, dessen Struktur einem Desmosomen ähnelt. Dies ist unter Cadherinen einzigartig (Kowalczyk et al., 1998).

1 Einleitung

1.5.6 Caveolin-1

Die Caveoline sind eine beim Menschen ubiquitär vorkommende Proteinfamilie, bestehend aus Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3. Die Caveoline kommen hauptsächlich in der zellulären Plasmamembran in den sogenannten Caveolae vor. Dies sind 50-100 nm große Einbuchtungen in der Plasmamembran und bestehen aus einer spezifischen Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden. Auch kommen Caveoline in diversen Zellkompartimenten wie dem Golgi-Apparat und in Vesikeln vor.

Caveolin-1 kann in Endothelzellen als Marker für Caveolae dienen, da es dort deren Hauptbestandteil ist. Es sind zwei Isoformen von Caveolin-1 bekannt: Die α - und die β -Isoform. Diese unterscheiden sich im N-Terminus. Während die N-terminale Proteinsequenz bei der α -Isoform vollständig ist, fehlt sie bei der β -Isoform (Scherer et al., 1995). Caveolin-1 ist mit 22 kDa ein relativ kleines Protein, es formt jedoch Oligomere, die ungefähr 400 kDa groß werden können und in der Form die Basis der Caveolae bilden. Der Oligomerisierungsprozess beginnt schon während der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum und schreitet im Zytosol beziehungsweise in der Plasmamembran weiter voran (Monier et al., 1995).

Caveoline sind als Teil der Caveolae unter anderem wichtig für den vesikulären Transport. Caveolae können über einen komplexen Auslösemechanismus sowohl Membrankomponenten und extrazelluläre Liganden, als auch manche Viren und Toxine endozytieren (Pelkmans et al., 2002).

In den Caveolae ist Caveolin-1 als Oligomer in der Signaltransduktion in der Hinsicht von Bedeutung, als dass es Transmembranmoleküle und Signalmoleküle binden kann. Diese kommen somit an den Caveolae in erhöhter Konzentration vor (Lisanti et al., 1994).

Caveolin-1 hat auch direkten Einfluss auf Signalmoleküle und Signalkaskaden, zum Beispiel vermindert es die Tyrosinkinaseaktivität von Src und reguliert die GTPase-Aktivität der α -Untereinheiten von G-Proteinen herab (Li et al., 1996).

Caveolin-1 wirkt auch auf den Cholesterolgehalt in den Caveolae. Cholesterollgehalt ist für eine korrekte Funktion von Caveolae notwendig (Hailstones et al., 1998). Caveolin-1 besitzt eine starke Cholesteroll-Bindungsstelle, mit der es an Cholesteroll bindet und daraufhin zu Oligomerbildung neigt (Murata et al., 1995).

In der aktuellen Forschung steht die Funktion von Caveolin-1 sowohl als Proto-Onkogen, als auch als Tumorsuppressor. So wurde die Überexpression von Caveolin-1 mit kanzerogenen Effekten assoziiert, eine fehlende Caveolin-1-Produktion mit einer erhöhten Krebsdisposition (Wang et al., 2015). Auch Kardiomyopathien können aufgrund einer veränderten Expression

1 Einleitung

von Caveolin-1 auftreten, weshalb auch in dem Bereich für therapeutische Zwecke geforscht wird (Panneerselvam et al., 2012).

1.5.7 Connexin43

Connexin43 ist ein 43 kDa großes Transmembranprotein und gehört zu Familie der Connexine. Insgesamt umfasst die Connexin-Familie 21 verschiedene Connexinproteine. Connexin43 ist das am weitesten verbreitete Connexin. Zu finden in mindestens 35 Zelltypen, steht es im Fokus der Forschung.

Connexin43-Proteine können durch Zusammenschlüsse die sogenannten Gap Junctions formen, Verbindungen zwischen Zellen zum Austausch von Aminosäuren, Second Messengers und Ionen.

Connexin43 ist so gefaltet, dass es die Membran viermal durchläuft, wobei sich das N- und das C-terminale Ende auf der cytoplasmatischen Seite befinden (Yancey et al., 1989).

Zur Bildung von Gap Junctions oligomerisieren die Connexine zu Hexameren, sogenannte Connexons. Diese Zusammenfügung geschieht intrazellulär, nach Austritt des Connexin43 aus dem Endoplasmatischen Retikulum, vermutlich im Trans-Golgi-Netzwerk (Musil et al., 1993). Die Connexons zweier benachbarter Zellen können sich zu Gap Junctions verbinden. Durch die kanalartig aufgebauten Gap Junctions können kleinere Moleküle und Ionen diese durchqueren (Goodenough et al., 1996).

Connexin43-Proteine formen sich nicht nur zu homomeren Connexons, sondern können auch mit anderen Connexinen, beispielsweise Connexin45, heteromere Verbindungen eingehen (Desplantez et al., 2004).

Connexin43 hat eine kurze Halbwertszeit von nur wenigen Stunden, wodurch eine kontinuierliche Synthese und Abbau nötig sind. Der Grund hierfür könnte in der Regulierung der Gap Junctions und der durch diese gewährleisteten interzellulären Kommunikation liegen (Laird et al., 1991).

Der Phosphorylierungsstand der Connexine reguliert die Gap Junctions. So kann der Zustand der Phosphorylierung von Connexin43 über den Zusammenbau und den Erhalt der Gap Junctions und deren interzellulären Austausch von Molekülen und Ionen entscheiden. Die Phosphorylierung der Connexine geschieht über diverse Kinasen, unter anderem PKA, PKB und MAPK (Lampe et Lau, 2004).

Als ein möglicher Bindungspartner von Connexin43 gilt ZO-1. Die Bindung von ZO-1 an Connexin43 wirkt sich vermutlich positiv auf die Stabilität von Gap Junctions aus (Singh et al.,

1 Einleitung

2005) und reguliert ebenfalls deren Größe und Organisation (Hunter et al., 2005).

Connexin43 kann möglicherweise auch auf das Zellwachstum einwirken, indem es die Transkription vom Zellwachstumsregulator NOV erhöht, auf die Veränderung seiner Lokalisierung vom Zellkern in die Zellmembran einwirkt und sich dort mit diesem verankert (Gellhaus et al., 2004).

Die Gap Junctions sind über Connexin43 an Microtubuli verankert. Diese Verankerung ist für die Entstehung der Gap Junctions und deren Funktion in der interzellulären Kommunikation jedoch nicht obligat (Johnson et al., 2002).

Über Drebrin, einem Bindungspartner des Aktin-Zytoskeletts, sind Connexin43, beziehungsweise Gap Junctions, an das Zytoskelett verbunden. Diese Verbindung ist essentiell für die Erhaltung und Funktion von Gap Junctions. Eine Unterbrechung der Verbindung führt zum Abbau von Connexin43 (Butkevich et al., 2004).

Gap Junctions stehen in funktioneller Verbindung mit Adherens Junctions. Werden Adherens Junctions blockiert, verhindert das den Aufbau von Gap Junctions. Genauso verhindert die Blockierung von Gap Junctions den Aufbau von Adherens Junctions (Meyer et al., 1992).

2 Zielstellung

Die Zielstellung der Arbeit bestand darin herauszufinden, ob in vitro eine mechanische Stimulation humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen zur verstärkten Aktivierung von Signal- und Adhäsionsmolekülen führte. Dabei wurden zwei mechanische Stimulationsmethoden von Zellen in ihrer Effektivität verglichen. Zum einen wurde mit einer Anlage gearbeitet, die zyklische mechanische Kräfte direkt auf die Integrinrezeptoren der Zellen ausübte, zum anderen wurde ein STREX Cell Strain Instrument eingesetzt, das bei einer festgelegten Frequenz und Intensität die gesamte Zelle streckte.

Mit beiden Methoden wurde die Aktivierung der Signalmoleküle Erk, Akt und Src sowie der Adhäsionsmoleküle VE-Cadherin, Connexin43 und Caveolin-1 aufgrund mechanischer Kräfte analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Costar® 96-Well EIA/RIA Stripwell™ Plate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Criterion TGX Stain Free Gel 4-15% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Deckgläser (Menzel GmbH, Braunschweig)

Dynabeads® M-280 Schaf anti Maus (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Filterpapier (Whatman, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien)

Low Protein Binding Tubes (Sarstedt, Nümbrecht)

Objektträger (Engelbrecht GmbH, Edermünder)

PVDF Western Blotting Membranen (Roche, Basel, Schweiz)

ST-CH-04 silicone chambers (B-Bridge International, Cupertino, CA)

Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

3.2 Chemikalien

Endothelzellwachstumsmedium-Basal (Promocell, Heidelberg)

Ladepuffer (Laemmli)

Lyse-Puffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Milchpulver Blotting grade, fettarm, 5% (Roth, Karlsruhe)

Paraformaldehyd, 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA/ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Rat Tail Collagen Type I (Corning, Redford, ME)

Tris/Glycine Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Tris/Glycine/SDS Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

TritonX-100, 0,1% (Ferak, Berlin)

Trypsin/EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)

3.3 Geräte

Analog Vortex Mixer (VWR, Radnor, PA)

Anlage zur Erzeugung eines inhomogenen Magnetfeldes für die mechanische Stimulation

Atmospheric Pressure Plasma Jet (kINPen09, Greifswald)

AxioCam Cc1 (Carl Zeiss AG, Jena)

Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

CASY® Cell Counter (OLS, Bremen)

Laser Scanning Microscope, LSM 780 (Carl Zeiss AG, Jena)

Lichtmikroskop Axiovert 40C (Carl Zeiss AG, Jena)

MHR 13 Heizschüttler (Ditabis, Pforzheim)

MicroStar 12 (VWR, Radnor, PA)

Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe)

STREX Cell Strain Instrument (B-Bridge International, Cupertino, CA)

Vertikale Proteingelkammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Western-Blot Tanks (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Zentrifuge 5702R (Eppendorf, Hamburg)

3.4 Software

AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)

Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)

Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD)

Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA)

ZEN (Carl Zeiss AG, Oberkochen)

3.5 Antikörper

Alexa Fluor 488 anti-Maus (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Anti-Akt (pan) monoklonal anti-Kaninchen (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)

Anti-Caveolin-1 polyklonal anti-Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)

Anti-Connexin43 monoklonal anti-Kaninchen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Anti-Erk monoklonal anti-Kaninchen (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)

Anti-phospho-Caveolin-1 monoklonal anti-Maus (pY14) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)

Anti-phospho-Erk monoklonal anti-Kaninchen (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)

Anti-phospho-Src monoklonal anti-Kaninchen (Y416) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)

Anti-Src monoklonal anti-Maus (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)

Anti-VE-Cadherin monoklonal anti-Maus (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)

Anti-Vinculin monoklonal anti-Maus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Bio-Plex™ phospho-Akt (Serin 473) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

DAPI (Boehringer Mannheim, Mannheim)

Hoechst H 33342 (Applied Chemistries, Agawam, MA)

Phalloidin-Alexa 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA)

polyklonal Kaninchen anti-Maus Ig/HRP (Dako, Glostrup, Dänemark)

polyklonal Schwein anti-Kaninchen Ig/HRP (Dako, Glostrup, Dänemark)

3.6 Kits

Bio-Plex Pro™ Reagent Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL)

3.7 Methoden

3.7.1 Zellen

Die für die Experimente benutzten Humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) wurden aus Hautgewebstücken isoliert.

3.7.2 Zellgewinnung

Isolierung der HDMEC aus dermalem Gewebe

Zur Gewinnung von HDMEC aus der Haut wurde diese in eine Petrischale gegeben und anschließend mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) benetzt. Überschüssiges Gewebe wurde mit einer stumpfen, gebogenen Schere von der Haut entfernt und das Hautgewebe mit einem Skalpell in ungefähr 3x3 mm große Quadrate geschnitten. Die Hautabschnitte wurden über Nacht in 3-4 ml 0,4% Dispase liegend inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis von der Dermis mit Hilfe zweier Pinzetten getrennt. Hierfür wurde mit der einen Pinzette das Gewebestück gehalten und mit der zweiten Pinzette die noch feste Epidermis abgezogen und verworfen. Die Gewebestücke wurden danach in PBS gesammelt und das PBS daraufhin abgesaugt. Dann wurden die Gewebestücke in einem 50 ml-Röhrchen für 2 h bei 37 °C in 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung liegend und schüttelnd inkubiert. Nachdem die Gewebestücke anschließend auf den Röhrchenboden abgesunken waren und der Überstand abgesaugt wurde, wurden 2 ml FCS hinzugegeben. Die Gewebestücke wurden nun in eine große Glaspetrischale geschüttet und 5 ml PromoCell-Medium (für mikrovaskuläre Endothelzellen) hinzugegeben. Mit der Seite einer Skalpellklinge wurden die Gewebestücke ausgedrückt und die entstandene Zellsuspension über einen 100 µm-Filter gegeben. Der Filter wurde danach mit PBS nachgespült. Daraufhin folgte für 5 min die Zentrifugation bei 300x g. Das Zellpellet wurde in PromoCell-Medium aufgenommen. Die Aussaat erfolgte auf eine 75 cm²-Kulturflasche (15 ml) oder 2x25 cm²-Kulturflasche (5 ml).

Auftauen der tiefgefrorenen HDMEC

Um die in flüssigem Stickstoff bei -163 °C tiefgefrorenen Zellen für die Versuche verwendbar zu machen, wurden diese zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zentrifugation des Röhrchens wurde der Überstand mit dem zytotoxischen, für die Tiefkühlung der Zellen jedoch

3 Material und Methoden

wichtigen Spezialmedium verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin in frischem Basal-Medium resuspendiert und in Kulturflaschen verteilt.

Die Proliferation der Zellen fand in Kulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit statt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, um die nicht-adhären Zellen zu verwerfen und den übrigen Zellen frisches Medium zuzuführen. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und 5 ml frisches Medium mittels einer Pipette hinzugegeben.

3.7.3 Medium

Als Medium für die Proliferation und Lagerung der HDMEC wurde das Endothelzellwachstumsmedium Basal (Promocell) mit folgenden Zusätzen benutzt:

- 2% Fetales Kälberserum (FCS), das beim Reizen der Zellen auf 0,5% reduziert wurde
- 1% Antibiotika
- Endothelial cell growth supplement/Heparin (ECGS/H)
- Human endothelial growth factor (hEGF)
- Human basic fibroblast growth factor (hbFGF)
- Hydrocortison (HC)

3.7.4 Zellpassage und –aussaat

Die Zellpassage erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90%.

Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml Trypsin in die Kulturflasche gegeben, um die Zellen vom Kulturflaschenboden abzulösen. Die Flasche wurde danach für 5 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Um zu überprüfen, ob sich alle Zellen abgelöst haben, wurden sie im Lichtmikroskop untersucht. Konnten noch nicht alle Zellen vom Boden abgelöst werden, wurden sie noch weitere 2 min inkubiert. Sobald sich alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurden 5 ml Medium hinzugegeben. Das serumhaltige Basal-Medium stoppt die enzymatische Wirkung des Trypsins. Der Inhalt der Kulturflasche wurde nun in ein Röhrchen überführt. Daraus wurden 100 µl entnommen und die Zellanzahl im Casy Cell Counter bestimmt. Die Angabe erfolgte in Zellen pro ml. Die restlichen Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet so in Medium verdünnt, dass mindestens 50.000

3 Material und Methoden

Zellen in jeweils eine Silikonkammer (Kulturfläche 4 cm²) bzw. 10.000 Zellen in einem 96-Well überführt werden konnten.

3.7.5 Vorbereitung der Silikonkammern, Einsatz des Atmospheric Pressure Plasma Jet

Ein Teil der Vorbereitung der Silikonkammern für die STREX-Behandlung war die Plasmabehandlung der Kulturfläche der Silikonkammern mit einem Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) (Abbildung 1). Dieser Plasma Jet wird mit Argon Gas betrieben.

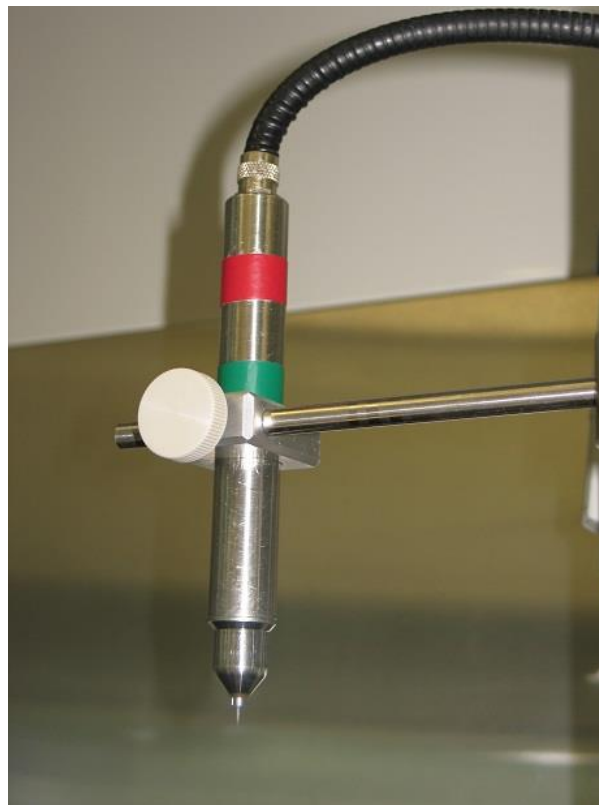


Abbildung 1: Atmospheric Pressure Plasma Jet, zur Plasmabehandlung der Kulturflächen der Silikonkammern eingesetzt

Bevor die Kulturfläche einer Silikonkammer mit dem Plasma Jet bestrahlt werden konnte, wurde dieser ca. 30 min lang unter der Sicherheitswerkbank eingebrannt. Dies diente der Reduktion von Feuchtigkeit, die möglicherweise aus der Luft in den Gasschlauch bei Nichtbenutzung permeabilisieren konnte. Die Verfälschung des Ergebnisses durch veränderte Bestrahlung wurde damit minimiert (Winter et al., 2013). Nach 30 min war ein homogen

3 Material und Methoden

trockener Strahl erzeugt.

Anschließend wurden die 2 x 2 x 1 cm großen sterilen Kulturflächen der Silikonkammern für 1 min gleichmäßig mit dem Plasma Jet behandelt. Dazu wurde die Kulturfläche direkt unter den Strahl gehalten und in einer linienförmigen Bewegung hin und her bewegt. Der Abstand zum Strahl wurde dabei so gewählt, dass das sichtbare Ende des Plasmastrahls gerade die Kulturfläche berührte. Anschließend wurde der Kammerboden mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung (200 µg/ml, gelöst in 0,1 prozentiger Essigsäure) beschichtet. Nach 1 h Inkubation wurde diese wieder entfernt, die Kammern mit PBS gespült und die vorbereiteten HDMEC in die Kammern ausgesät. Für eine optimale Haftung der Zellen an die Kollagenschicht wurden diese vor dem Streckversuch für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Plasmabehandlung der Kulturflächen bewirkte eine erhöhte Hydrophilie der Silikonoberflächen, die zu einer großflächigeren Verteilung der Kollagenlösung führte. Die Verringerung des Wasserkontaktwinkels und der Oberflächenspannung der hinzugefügten Lösung durch die Plasmabehandlung war signifikant (Finke, INP Greifswald) (Abbildung 2).

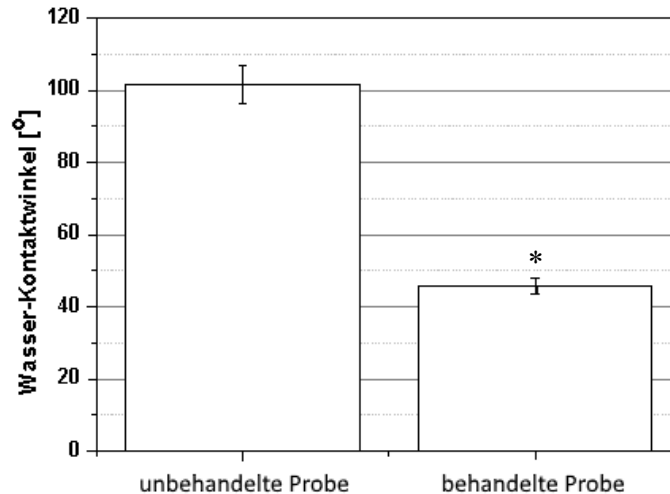


Abbildung 2: Signifikante Verringerung des Wasserkontaktwinkels nach Behandlung der Silikonkammern mit dem Atmospheric Pressure Plasma Jet (*).

*** $p < 0,05$; t-Test mit Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichungen. $n=3$.
(nach Finke: Bestimmung von Oberflächenenergie und Wasserkontaktwinkel, INP Greifswald).**

3 Material und Methoden

3.7.6 Mechanischer Reiz - Versuchsansatz mit paramagnetischen β 1-Integrin beschichteten Beads

Aussaat

Die Zellen wurden wie in 3.7.4 beschrieben in 96-Well-Platten ausgesät, wobei pro Well mindestens 10.000 Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden in den Wells für 24 h in Endothel Wachstumsmedium mit 2% FCS kultiviert.

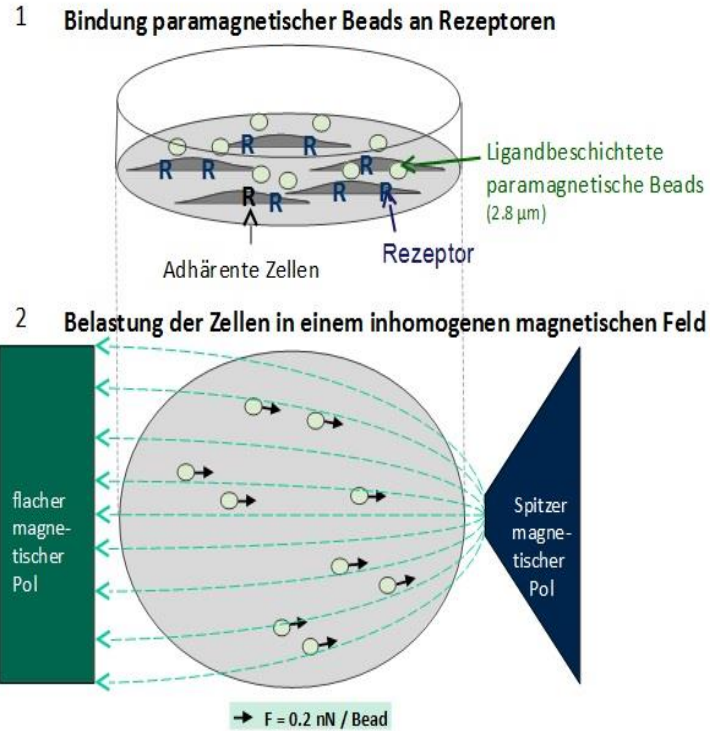
Beadbeschichtung

In Anlehnung an Pommerenke et al., 1996 wurden initial 100 μ l paramagnetische Beads bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde insgesamt dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads mit 500 μ l PBS und 1 μ g eines Maus anti- β 1-Integrin Antikörpers (5 μ l vom Antikörper mit einer Konzentration von 200 μ g/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Sediment viermal mit je 1 ml PBS gewaschen. Nicht gebundener Antikörper wurde somit entfernt. Das Beadsediment wurde in 1 ml DMEM ohne FCS resuspendiert.

Reiz an β 1-Integrin

Der Reiz an den β 1-Integrin-Untereinheiten erfolgte in einer Anlage, die zwischen einem spitzen und einem flachen Pol ein inhomogenes Magnetfeld erzeugt (Abbildung 3, Abbildung 4). Die mechanische Stimulation der Rezeptoren war zyklisch mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dauer von 15 min. Die magnetische Flussdichte betrug durchschnittlich 15 mT, die ausgeübte mechanische Kraft pro Bead betrug 0,2 nN.

3 Material und Methoden



nach Kasten, A. et al., J. Cell. Biochem. 111(2010) 1586-1597

Abbildung 3 (nach Kasten A et al., J. Cell. Biochem. 111 (2010): 1586-1597): Schema eines Wells mit darin kultivierten Zellen. Koppelung der Beads an die Integrinrezeptoren der Zielzellen (1). Reizbelastung im inhomogenen magnetischen Feld bei 1 Hz, durchschnittlich 15 mT und 0,2 nN pro Bead über 15 min (2).

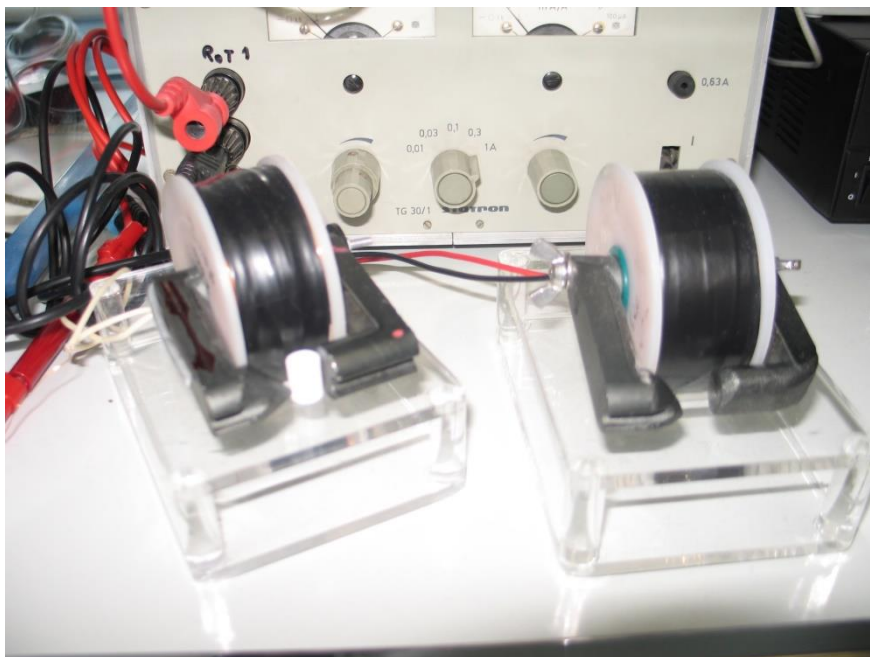


Abbildung 4: Anlage zur Erzeugung eines inhomogenen Magnetfeldes für die mechanische Stimulation der Oberflächenrezeptoren

3 Material und Methoden

Standzeiten und Kontrollzellen

Nach der mechanischen Stimulation der Integrinrezeptoren wurden die Zellen unterschiedlich langen Standzeiten ausgesetzt, bevor die Proteinexpression bzw. die Aktivierung der Signalmoleküle untersucht wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte sofort nach dem Reiz (0 min), nach 30 min, nach 1 h oder 6 h nach dem elektromagnetischen Reiz an den Integrinen.

Vergleichsansätze waren Kontrollzellen, die weder eine Beadbeschichtung bekamen, noch dem magnetischen Feld ausgesetzt waren. Getestet wurde auch der Einfluss des reinen Magnetfeldes auf die Zellen und die alleinige Beladung der Integrine mit den Beads, die durch das Clustern der Integrine auch schon einen potentiellen mechanischen Reiz darstellen.

3.7.7 Mechanischer Reiz - Versuchsansatz mit STREX-Zellstreckung

Aussaat

Vor der Aussaat erfolgte die Plasmabehandlung und Kollagenbeschichtung der Silikonkammern. Pro Silikonkammer wurden mindestens 50.000 Zellen für den Versuch ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden für 24 h bei 37 °C im Brutschrank gelagert, um sich optimal an das Kollagen anheften zu können.

Reiz im STREX Cell Strain Instrument

Das STREX Cell Strain Instrument (Abbildung 5) ist dazu in der Lage, Silikonkammern zyklisch zu strecken (Abbildung 6). Indem die ganze Silikonkammer gestreckt wurde, wurden auch die auf der Kulturfläche verteilten und fest am Kollagen verankerten Zellen direkt stimuliert. Die Angaben zur Streckung werden im Allgemeinen relativ zur Gesamtlänge der Silikonkammer gegeben. Für die Versuche betragen die Streckungsintensitäten 2%, 5%, 10% und 15% der Gesamtlänge der Kammern. Die zyklische Reizung erfolgte hierbei stetig bei einer Frequenz von 1 Hz, die Dauer der Reizung betrug 15 min. Zusätzlich zu den Versuchszellen wurde auch eine Kontrollreihe angesetzt, die ungereizt blieb. Nach der Streckung betrug die Standzeit der Kammern im Brutschrank einheitlich 30 min.



Abbildung 5: STREX Cell Strain Instrument zur mechanischen Stimulation von Zellen. Die Zellstimulation wird über zyklische Streckung von im Gerät eingespannten Silikonkammern ermöglicht.

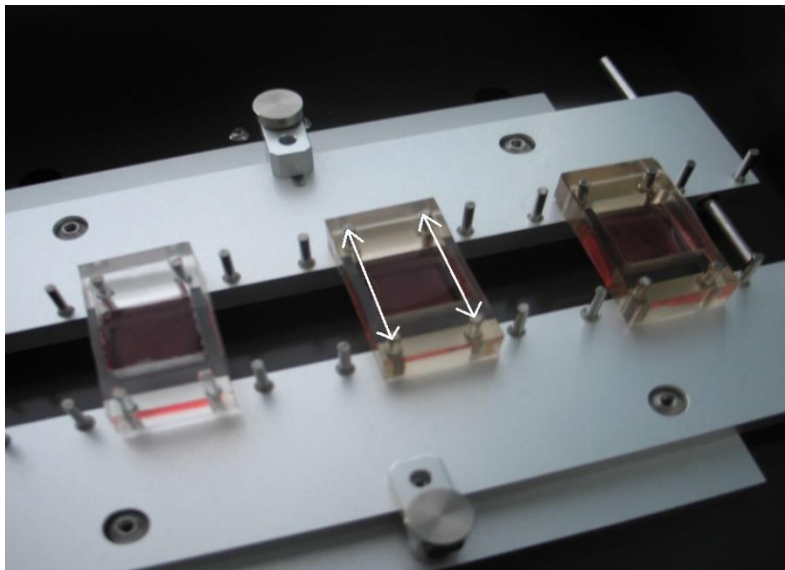


Abbildung 6: STREX Cell Strain Instrument mit eingespannten Silikonkammern, Streckrichtung (Pfeile) der Silikonkammern angedeutet. Die Streckungsintensitäten der Silikonkammern betragen 2%, 5%, 10% und 15% der Gesamtlänge der Kammern. Die Streckreizung erfolgte hierbei zyklisch bei einer Frequenz von 1 Hz, die Dauer eines Streckversuchs betrug 15 min.

3 Material und Methoden

3.7.8 Zelllyse

Nachdem die Versuche durchgeführt wurden und die entsprechende Standzeit vorüber war, wurden die Zellen lysiert, um deren durch den Versuch beeinflusste Proteinexpression und -phosphorylierung zu analysieren. Hierfür wurde nach einmaligem Waschen mit PBS 30 µl bzw. 300 µl Lysepuffer in die Wells bzw. in die Silikonkammern gegeben und diese für 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde das Lysat in Eppendorftubes überführt und mit 4500 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut überführt, um die auf dem Boden angesammelten Zelltrümmer aus den Proben zu entfernen.

3.7.9 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde zur regelmäßigen Begutachtung der Zellen genutzt. Während des Zellwachstums in der Kulturflasche konnte im Lichtmikroskop die voranschreitende Proliferation, die Zellmorphologie und die Zellgröße betrachtet werden. Auch in Silikonkammern konnten die Zellen im Lichtmikroskop, zum Beispiel nach einem Reiz, begutachtet und ihre Morphologie, Größe und Adhäsion zu anderen Zellen analysiert werden.

3.7.10 Immunfluoreszenzfärbung

Die Färbung von Proteinen mit immunfluoreszierenden Molekülen erlaubte eine genauere mikroskopische Bewertung von zellulären Substrukturen als es die Lichtmikroskopie hergab.

Um die Zielproteine darzustellen, wurden diese mit spezifischen primären Antikörpern verankert. An die primären Antikörper wiederum banden sekundäre Antikörper, an denen das fluoreszierende Molekül verankert wurde. Unter einem Fluoreszenzmikroskop traten die fluoreszierenden Moleküle farblich deutlich hervor. Dies ermöglichte eine genaue Begutachtung der Zielproteine, was zum Beispiel für eine vergleichende mikroskopische Analyse von Zellproteinveränderungen unter Ruhe und unter Zellstreckung nützlich war. Für die Streckversuche verwendete Immunfluoreszenzfärbungen richteten sich speziell an Proteine der Zell-Zell-Kontakte, sowie an das Aktinzytoskelett, und an Proteine des Zellkerns.

Um die Zielproteine der zuvor in den Silikonkammern gestreckten Zellen zu färben, wurden zunächst die Zellen direkt nach der Reizung zweimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 10 min fixiert.

3 Material und Methoden

Danach wurden die Zellen mit 0,1% TritonX-100-Lösung für 10 min permeabilisiert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, in diesem Fall anti-Connexin43- bzw. anti-VE-Cadherin-Antikörper, für die Darstellung der Zell-Zell-Kontakte. Die Verdünnung betrug 1:100 in PBS (angereichert mit 0,01% Tween 20 zur besseren Benetzung). Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit sekundärem, Fluorochrom-markiertem Antikörper für 30 min lichtgeschützt inkubiert.

Für die Darstellung des Aktinzytoskeletts wurde Phalloidin Alexa 546 in PBS (1:100) verdünnt und die Zellen damit für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit dem Hoechst Farbstoff 33342 in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS. Die Inkubationszeit betrug 15 min. Die Färbung von VE-Cadherin und von Connexin43 erfolgte jeweils mit Alexa Fluor 488 in einer Verdünnung von 1:100 in PBS.

Anschließend wurde mit PBS gewaschen und die mit PBS überschichteten Präparate lichtgeschützt bis zur Mikroskopie gelagert.

3.7.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein lichtmikroskopisches Verfahren, bei der ausgewählte, mit einem fluoreszierenden Molekül gefärbte Zellproteine sichtbar und deutlich von ihrer Umgebung abgrenzbar unter dem Mikroskop in Erscheinung treten. Auf diese Weise können Zellproteine spezifischer als unter einem normalen Lichtmikroskop untersucht werden. Dies kann zum Beispiel zur mikroskopischen Analyse von Proteinveränderungen unter mechanischer Zellstimulation genutzt werden. Im Fokus für die in dieser Arbeit angewendeten Streckreizversuche standen sowohl die mikroskopischen Veränderungen von Zell-Zell-Kontaktproteinen, als auch von Aktin und Proteinen des Zellkerns.

Das Fluoreszenzmikroskop ist so aufgebaut, dass aus einer Quelle ultraviolette Lichtwellen einer bestimmten Wellenlänge auf das fluoreszierende Molekül strahlen. Von diesem Molekül werden die Lichtwellen absorbiert, was Elektronen des Moleküls in ein höheres, aber instabiles Energieniveau befördert. Durch Zurückfallen der Elektronen in deren Grundniveau wird ein Teil der freiwerdenden Energie daraufhin in Form von Lichtwellen in einer längeren, sichtbaren Wellenlänge wieder emittiert. Dieses emittierte Licht kann dann durch das Okular des Mikroskops betrachtet werden. Die Vergrößerung entspricht hierbei der eines Lichtmikroskops (Sanderson et al., 2014).

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Laser Scanning Microscope (LSM) 780

3 Material und Methoden

durchgeführt. Bei diesem Mikroskop bewegt sich ein Laserstrahl über einen festgelegten Abschnitt des zuvor gefärbten Präparates und regt die fluoreszierenden Moleküle an. Die Fluoreszenzintensität ist direkt im Mikroskop sichtbar, kann aber auch bildlich festgehalten und auf dem Computer mit Hilfe des Programms ZEN dargestellt werden.

Je nach Zielprotein stehen jeweils spezifische, mit charakteristischem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markierte Antikörper zur Verfügung. Die Lichtquelle des LSM verfügt über verschiedene Wellenlängen, die die jeweiligen Fluorochrome anregen. Das zur Darstellung des Zellkerns an der Zell-DNA gekoppelte Hoechst 33342-Fluorochrom wird bei einer Wellenlänge von 355 nm maximal angeregt, das vom Fluorochrom emittierte Licht liegt bei einer Wellenlänge von 465 nm. Das am F-Aktin gekoppelte Phalloidin Alexa 546-Fluorochrom wird bei einer Wellenlänge von 556 nm maximal angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von 570 nm. Das an den primären anti-VE-Cadherin- und anti-Connexin43-Antikörpern konjugierte Alexa Fluor 488 wird bei einer Wellenlänge von 490 nm maximal angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von 519 nm.

Auch eine gleichzeitige Darstellung der unterschiedlich markierten Zielproteine in einem Abschnitt des Präparates ist als Bildaufnahme möglich. Nacheinander werden die unterschiedlichen Fluorochrome von dem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die dabei entstandenen Aufnahmen werden anschließend digital übereinandergelegt und zu einem Bild verarbeitet. So können alle gewünschten Strukturen (Kern, Aktin-Zytoskelett, Zielprotein z.B. VE-Cadherin) in einem Bild dargestellt werden.

3.7.12 Proteinbestimmung mit dem Qubit® Fluorometer

Mit dem Qubit® Fluorometer wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgt durch Moleküle, die, an das Zielprotein verankert, Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren. Die Intensität der durch die Moleküle emittierten Fluoreszenz wird im Fluorometer durch einen Detektor gemessen, während die Probe durch eine die Fluoreszenz anregende Lichtquelle bestrahlt wird.

Für genauere Ergebnisse wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt. Dazu wurden zwei Assay-Tubes pro Probe und drei Standardtubes vorbereitet. Als nächstes wurde die Quant-iT™ Arbeitslösung durch Mischung von Quant-iT™ Reagenz im Verhältnis von 1:200 in Quant-iT Puffer hergestellt. Dann wurde die entstandene Arbeitslösung nach folgendem Schema mit den Proben verdünnt: Für die Standards wurden 190 µl Arbeitslösung mit 10 µl im Kit enthaltende Standardlösung gemischt. Diese Standardlösungen bestehen aus

3 Material und Methoden

Bovine Serum Albumin (BSA) und dienen der Kalibrierung. Für die Proben wurden 199 μ l Arbeitslösung mit 1 μ l Probe gemischt. Nachdem alle Tubes für ca. 3 Sekunden gevortext wurden, inkubierten sie für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Dann konnte die Proteinkonzentration der verdünnten Proben nach der Kalibrierung mit den Standards im Fluorometer gemessen werden. Um die Originalkonzentration der Proben zu determinieren, mussten die Werte anschließend mit dem sogenannten diluting factor multipliziert werden.

3.7.13 Bio-Plex Assay

Das Bio-Plex Assay wird zur Detektion und Quantifizierung von Zellproteinen in Zellbeständen genutzt. Um die Proteine erfassen zu können, werden zuvor die Zellbestände lysiert. Die Proteine liegen so frei im Lysat vor. Die qualitative Detektion der Zielproteine erfolgt durch Beads, die über spezifische Antikörper an die Zielproteine verankert werden. Quantitativ werden die Proteine durch Streptavidin-Reporter, welche über sekundäre Antikörper an eine andere Bindungsstelle der Proteine haften, bestimmt. Dieses Verfahren wird Multiplex Assay genannt. Nach Verankerung der Zielproteine an die Beads beziehungsweise an die Reporter können diese mit Hilfe der, im Bio-Plex System integrierten, Durchflusszytometrie erkannt werden. Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Proteine nacheinander durch eine sehr dünne Küvette fließen. An dieser Küvette befinden sich zwei Laser und ein Detektor, der die Beads und die Reporter registriert. Die Beads besitzen je nach Protein, an welchem sie haften, eine charakteristische Fluoreszenz. Bei Bestrahlung durch den Laser emittieren die Beads Licht in ihrer charakteristischen Wellenlänge, die von dem Detektor erkannt wird und der es dem Detektor erlaubt, die Beads qualitativ dem Zielprotein zuzuordnen. Die von dem Bio-Plex System gemessene Anzahl der Reporter entspricht der Quantität der Zielproteine.

Zur Detektion und Quantifikation der Zielproteine wurden die Zelllysate mit gleicher Gesamtproteinkonzentration in 96-Well-Platten pipettiert und mit den spezifischen Beads über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen der Beads der sekundäre Antikörper hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Nach Waschung wurden die Streptavidin-Reporter hinzugegeben und für 10 min mit den Beads inkubiert.

Nach erneutem Waschen und Auffüllen der Wells mit Assaypuffer wurden die Zielproteine im Bio-Plex gemessen.

3.7.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In diesem Verfahren werden die in einer Probe enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Bedeutend ist dabei zum einen das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS), welches in einem proportionalen Verhältnis je nach Proteingröße an die Proteine bindet, zum anderen die Denaturierung und die damit einhergehende Entfaltung der Proteine, die im entfalteten Zustand besser verglichen werden können.

Die Gelelektrophorese läuft so ab, dass mit SDS beschichtete Proteinproben an ein Ende eines Polyacrylamid-Gels in einer Reihe aufgetragen werden. Wird an diesem Gel eine elektrische Spannung angelegt, werden die Proteine angeregt, in Richtung Pluspol zu wandern. Dieses befindet sich auf der anderen Seite des Gels. Das Gel hält dabei durch seinen netzartigen Aufbau die größeren Proteine stärker zurück als die kleineren.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden zunächst die Gesamtproteinmengen aller Proben angeglichen, indem die Proben je nach Proteinkonzentration verdünnt wurden. Für die Gelelektrophorese wurden anschließend 40 µl der Probenlösung mit 10 µl 5-fach konzentriertem Laemmli-Ladepuffer gemischt. Zur Denaturierung der Proteine wurde die gemischte Lösung für 5 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben auf das Polyacrylamid-Gel geladen. Anschließend wurden die Proteine durch ein elektrisches Feld, bei einer Spannung von 120 V und einer Stromstärke von 40 mA, nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

3.7.15 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots wurden die auf Polyacrylamid-Gelen befindlichen, zuvor in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Western-Blotting Membran mit Hilfe des Tank-Blot Verfahrens übertragen. In diesem Western-Blot Tank befindet sich ein senkrecht zur Oberfläche des zuvor übereinandergeschichteten Gel-Membran-Stapels gelegenes elektrisches Feld. Die Proteine transferierten in Richtung der Anode vom Gel auf die Membran. Nach Übertragung der Proteine auf die Membran erlaubte eine Verankerung von primären und sekundären Antikörpern an die Zielproteine eine indirekte Quantifizierung der Proteine. Für die Quantifizierung wurde die Membran in einer Luminollösung inkubiert. Ein Enzym, die Meerrettichperoxidase (HRP), die fest an einen sekundären Antikörper gebunden ist, katalysiert eine Oxidierung von Luminol. Die Intensität

3 Material und Methoden

des dabei entstehenden Chemilumineszenzsignals wurde in einem Imager aufgenommen. Für den Western-Blot wurde die noch unbeladene Membran zunächst in Methanol geschwenkt, zweimal 5 min in Wasser getaucht und dann in Transfer-Puffer gelagert. Das Gel wurde exakt passend auf die Membran geschichtet und so in den Western-Blot Tank eingespannt. Die Proteinübertragung erfolgte über Nacht bei einer Stromstärke von 140 mA. Auf der nun proteinbeladenen Membran wurden daraufhin freie unspezifische Antikörperbindungsstellen blockiert, indem die Membran für 1 h in 5 prozentiger Blockierungsmilch geschüttelt wurde. Nach 3 Waschschrritten wurde der 1:1000 in Blockierungsmilch verdünnte primäre Antikörper auf die Membran gegeben und inkubiert über Nacht. Am folgenden Tag wurde nach drei Waschschrritten, die zur Entfernung aller ungebundenen Antikörper führen, der 1:10.000 in Blockierungsmilch verdünnte, HRP gekoppelte sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben. Dort inkubiert er für 1 h. Nach wiederum drei Waschschrritten konnte die Detektion stattfinden. Dazu wurde mit dem SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit eine Arbeitslösung hergestellt, bestehend aus gleichen Anteilen von in dem Kit enthaltender Stable Peroxide Lösung und Luminol/Enhancer Lösung. Die Membran wurde in eine lichtdurchlässige Folie gelegt und mit dieser Lösung inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde darauf im Imager aufgenommen. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Image Lab.

3.8 Statistik

Alle Stimulationsversuche wurden mindestens drei, höchstens jedoch zehn Mal durchgeführt. Bei der ersten Methode der Zellstimulation, bei der HDMEC über ihre Integrinrezeptoren gereizt wurden, wurden für jeden Kontroll- und für jeden Reizansatz mindestens 10.000 Zellen verwendet. Bei der zweiten Methode, bei der mit dem STREX Cell Strain Instrument die ganze Zelle zyklisch gereizt wurde, wurden jeweils mindestens 50.000 Zellen verwendet. Die HDMEC stammten aus verschiedenen Zellgenerationen.

Die quantitativen Proteinanalysen fanden mittels Western-Blot und Bio-Plex-Assay statt. Die Konvertierung in numerische Werte erfolgte durch die Programme Image Lab und ImageJ. In Microsoft Excel 2010 wurden die Werte gesammelt, sortiert und relativiert, wobei die Kontrollreihen die Referenz darstellten.

Mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 5.0 wurden mit den relativierten Werten

3 Material und Methoden

Varianzanalysen mit anschließendem Bonferroni-Test als Post-Hoc-Verfahren durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug 0,05. Die Ergebnisse wurden in Form von Balkendiagrammen mit Einbeziehung des Standardfehlers des Mittelwertes dargestellt.

Für den p-Wert wurden folgende drei Werte ausgewählt, die gemäß ihrer Anwendung entsprechend markiert wurden:

*: $p \leq 0,05$

** : $p \leq 0,01$

***: $p \leq 0,001$

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der mechanischen Stimulation von $\beta 1$ -Integrin auf die Zellen

4.1.1 Einfluss des mechanischen Integrinreizes auf pErk

Der mechanische Reiz direkt an den Integrinrezeptoren führte zu keiner signifikanten Veränderung des pErk gegenüber den Kontrollzellen. Die Expression wurde direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und 6 h analysiert.

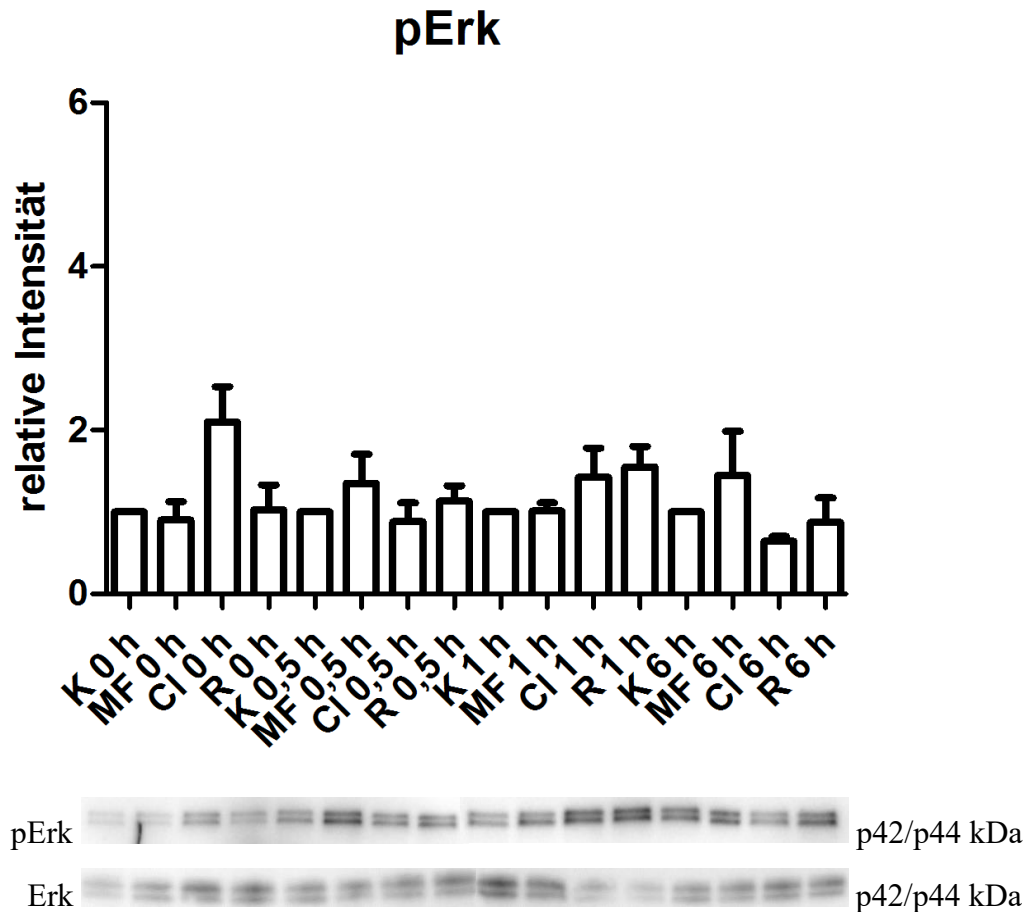


Abbildung 7: Auswirkung der mechanischen Stimulation von $\beta 1$ -Integrin auf pErk: keine signifikante Veränderung von pErk nach Reiz gegenüber der Kontrollreihe (K=Kontrollzellen; MF=Zellen im Magnetfeld, ohne Beads; Cl=Beadbeclusterte Zellen, nicht dem Magnetfeld ausgesetzt; R=im Magnetfeld gereizte, beadbeschichtete Zellen). n=3. HDMEC. Western Blot. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und nach 6 h.

4 Ergebnisse

4.1.2 Einfluss des mechanischen Integrinreizes auf pAkt

Auch für pAkt konnte keine signifikante Veränderung des Zielproteins nach erfolgter Integrinreizung und Inkubation der HDMEC nachgewiesen werden. Die Expression wurde direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und 6 h analysiert.

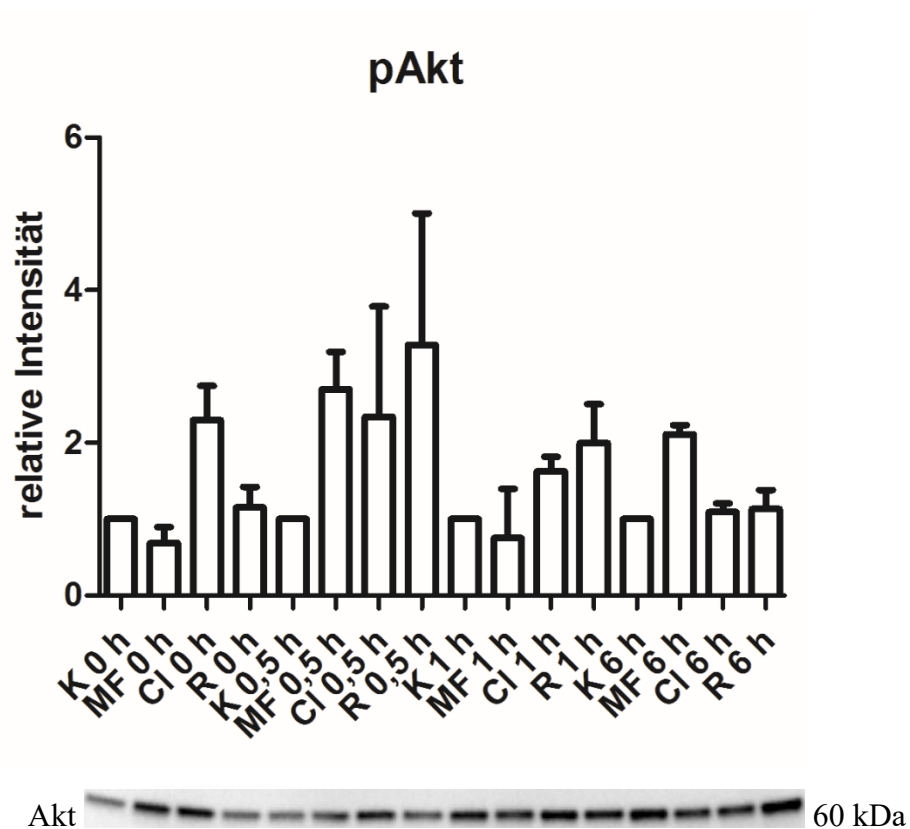


Abbildung 8: Auswirkung der mechanischen Stimulation von $\beta 1$ -Integrin auf pAkt: keine signifikante Veränderung von pAkt nach Reiz gegenüber der Kontrollreihe (K=Kontrollzellen; MF=Zellen im Magnetfeld, ohne Beads; Cl=Beadbeclusterte Zellen, nicht dem Magnetfeld ausgesetzt; R=im Magnetfeld gereizte, beadbeschichtete Zellen). n=3. HDMEC. Luminex Assay. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und nach 6 h.

4.2 Einfluss der Plasmabehandlung auf die Silikonkammern und die Endothelzellverankerung

Die Plasmabehandlung der sterilisierten Kulturflächen der Silikonkammern mit dem APPJ hatte auf die Kollagenverteilung und auf die Endothelzellverankerung einen nachweisbaren Einfluss. Die Endothelzellen wurden auf der Kulturfläche zur Vorbereitung auf die Versuche der mechanischen Reizung mit dem STREX Cell Strain Instrument verankert.

Der direkte Vergleich zwischen einer mit dem APPJ behandelten und einer unbehandelten Silikonkammer verdeutlicht den Unterschied in der jeweiligen Verteilung der Kollagenlösung. Nach Injektion von Kollagenlösung in die Silikonkammern konnte sich die Lösung auf der zuvor plasmabehandelten Oberfläche viel gleichmäßiger verteilen (Abbildung 9, Abbildung 10).

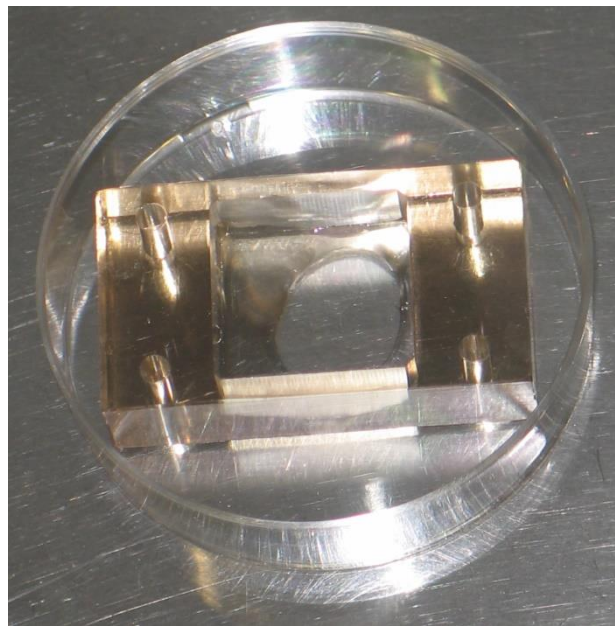


Abbildung 9: Unbehandelte Silikonkammer mit hinzugegebener Kollagen Typ I-Lösung: sichtbar ungleichmäßige Verteilung der Kollagenlösung

4 Ergebnisse

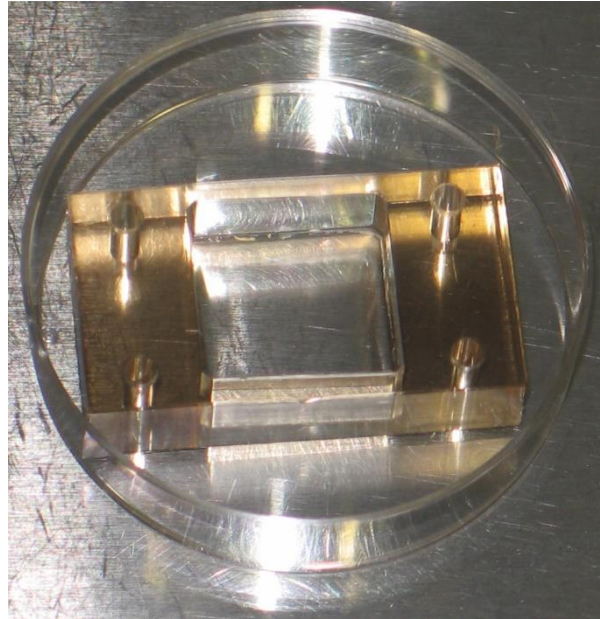


Abbildung 10: Mit dem APPJ über 1 min behandelte Silikonkammer und anschließend hinzugefügte Kollagen Typ I-Lösung: großflächigere Verteilung der Lösung

Je nachdem, ob die Kulturfläche der Silikonkammer vorher plasmabehandelt wurde oder unbehandelt blieb und ob die Fläche mit Kollagen beschichtet wurde oder nicht, zeigten die Zellen, die auf die Kulturfläche verteilt wurden, unter dem Mikroskop ein deutlich differentes Bild. Nach der Zellbesiedelung und einer Inkubationszeit von 4 h ließ sich mikroskopisch folgendes festhalten: Während die Zellbesiedelung ohne vorhergehende Plasmabehandlung der Kulturfläche und ohne Kollagenbeschichtung weitestgehend erfolglos blieb und die Zellen großflächig nicht adhärten (Abbildung 11), waren die Ergebnisse ohne Plasmabehandlung, aber mit Kollagenbeschichtung zwar besser, aber immer noch adhärten viele Zellen dort nicht (Abbildung 12). Nur eine Plasmabehandlung mit nachfolgender Kollagenbeschichtung der Kulturfläche sorgte für einen auf der Kollagenschicht gut verankerten Zellrasen (Abbildung 13).

4 Ergebnisse

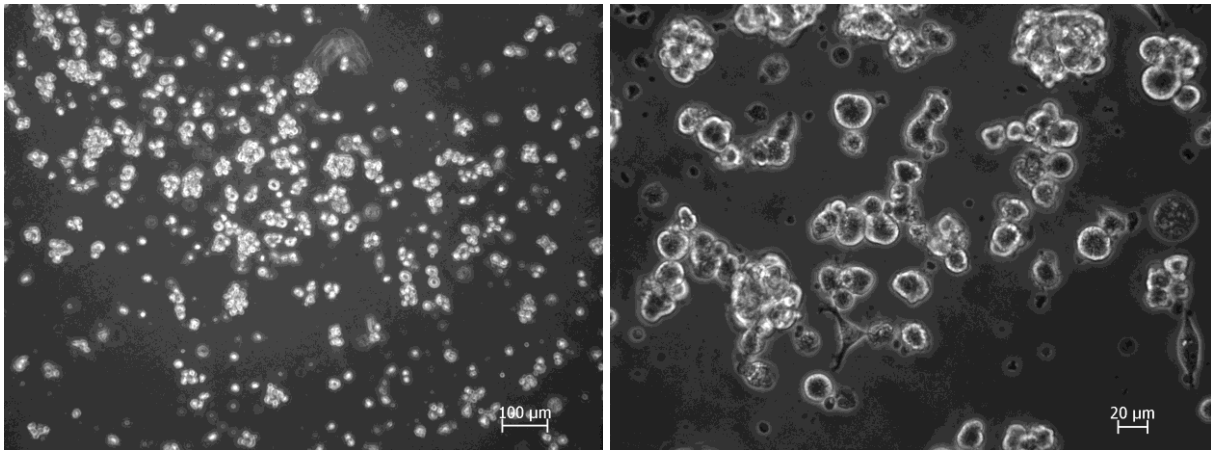


Abbildung 11: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor unbehandelten Silikonkammer.

Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

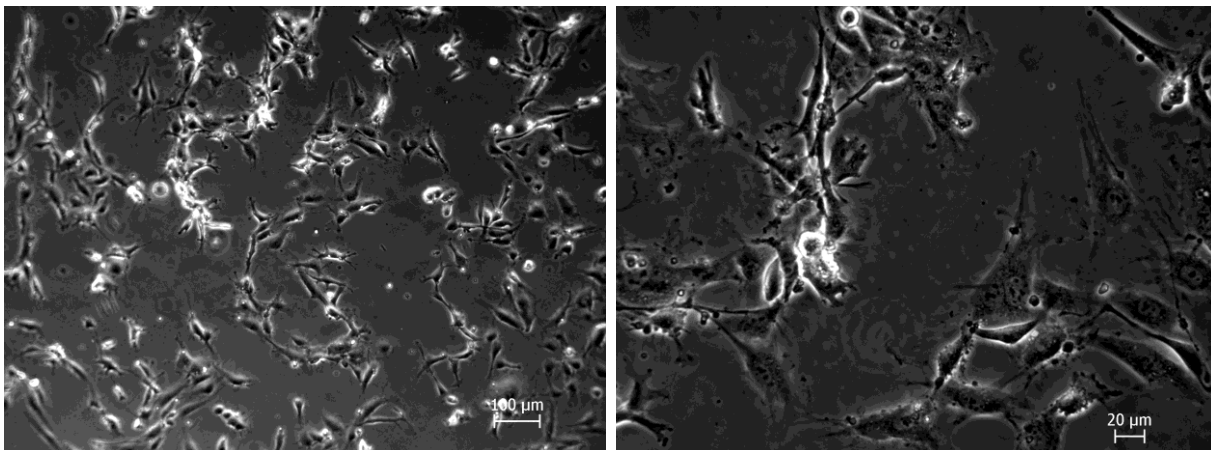


Abbildung 12: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.

Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

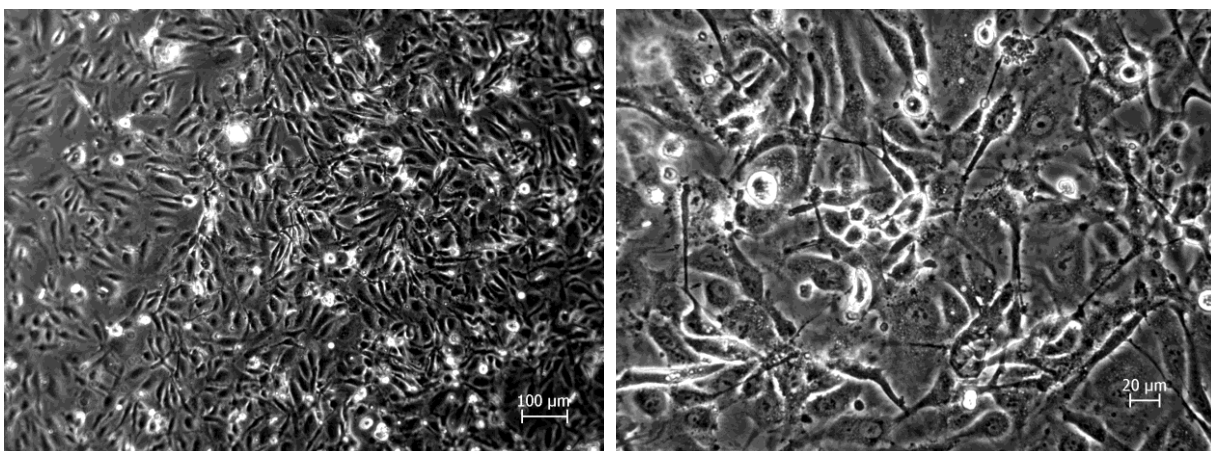


Abbildung 13: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor für 1 min mit dem APPJ behandelten und mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.

Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

4 Ergebnisse

Noch deutlicher sichtbar war der Unterschied nach einer Inkubation über 24 h mit im Anschluss erneuter Mikroskopie. Während sowohl in den nicht plasmabehandelten und nicht kollagenbeschichteten Kammern als auch in den nicht plasmabehandelten, aber kollagenbeschichteten Kammern die Zellen praktisch vollständig abgelöst waren (Abbildung 14, Abbildung 15), bildeten die Zellen in plasmabehandelten und kollagenbeschichteten Kammern einen dichten Zellrasen (Abbildung 16).

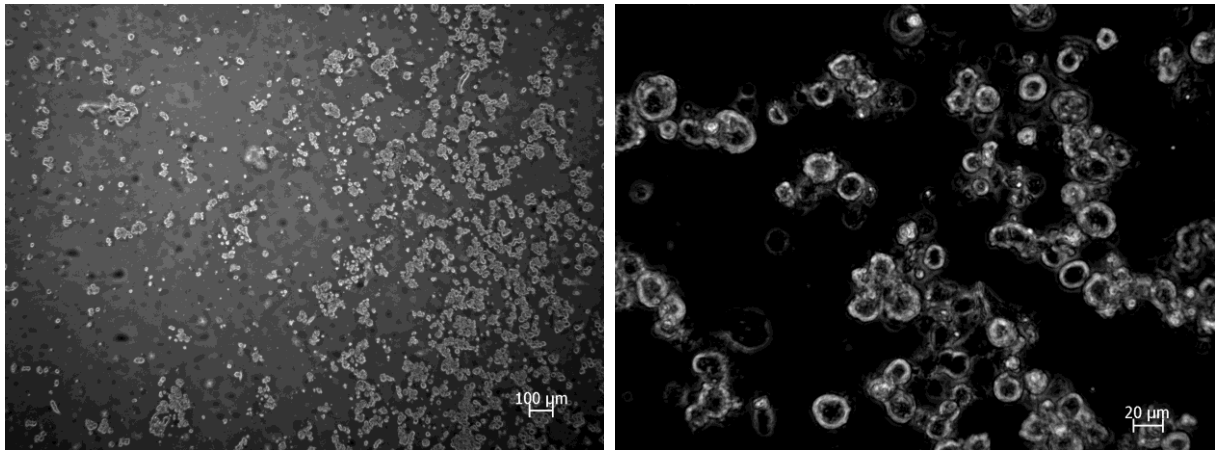


Abbildung 14: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor unbehandelten Silikonkammer.

Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

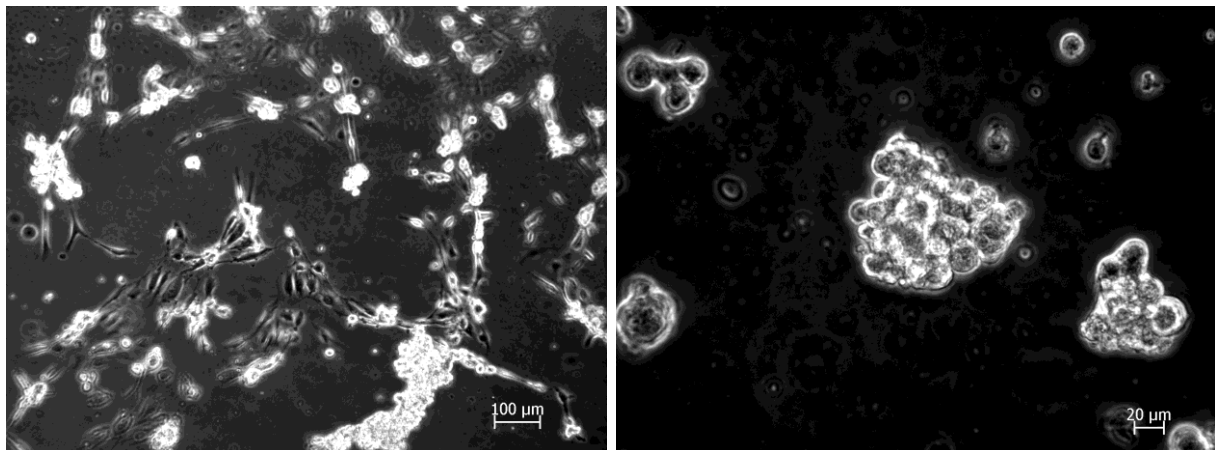


Abbildung 15: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.

Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

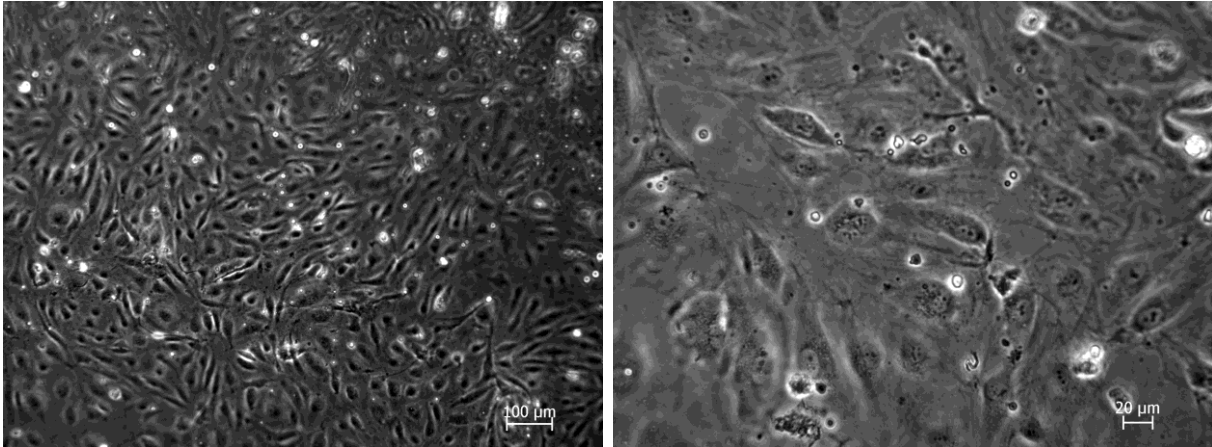


Abbildung 16: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor für 1 min mit dem APPJ behandelten und mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer. Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 20 µm.

4.3 Mechanische Stimulation der Zellen mit dem STREX Cell Strain Instrument

4.3.1 Lichtmikroskopische Veränderungen der Zellen nach mechanischer Stimulation

Unter dem Lichtmikroskop zeigte sich in den Silikonkammern eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie nach mechanischer Stimulation. In der Kontrollreihe war der Zellrasen gleichmäßig, die Zellen waren rund bis ovalförmig, die Zellkerne waren ebenfalls rund, und die Zellen hatten keine spezielle Ausrichtung (Abbildung 17). Mit steigender Reizintensität richteten sich die Zellen morphologisch immer deutlicher in Richtung der mechanischen Stimulation aus. Die Zellen wurden länglicher und bildeten spitze, in Reizrichtung ausgerichtete Enden aus. Auch wurden zum Teil Kontaktverbindungen zwischen benachbarten, durch die Streckung auseinandergezogenen Zellen sichtbar. Bereits bei einer Streckintensität von 5% war mikroskopisch eine Ausrichtung der Zellen zu erkennen (Abbildung 18). Noch ausgeprägter wurde diese bei 10% (Abbildung 19), beziehungsweise bei 15% (Abbildung 20).

4 Ergebnisse

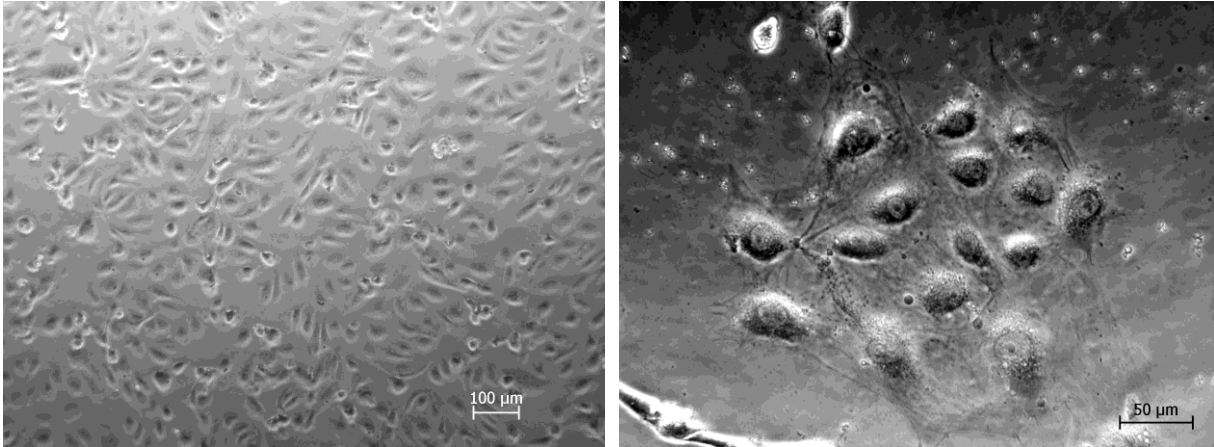


Abbildung 17: HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz. Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 50 µm.

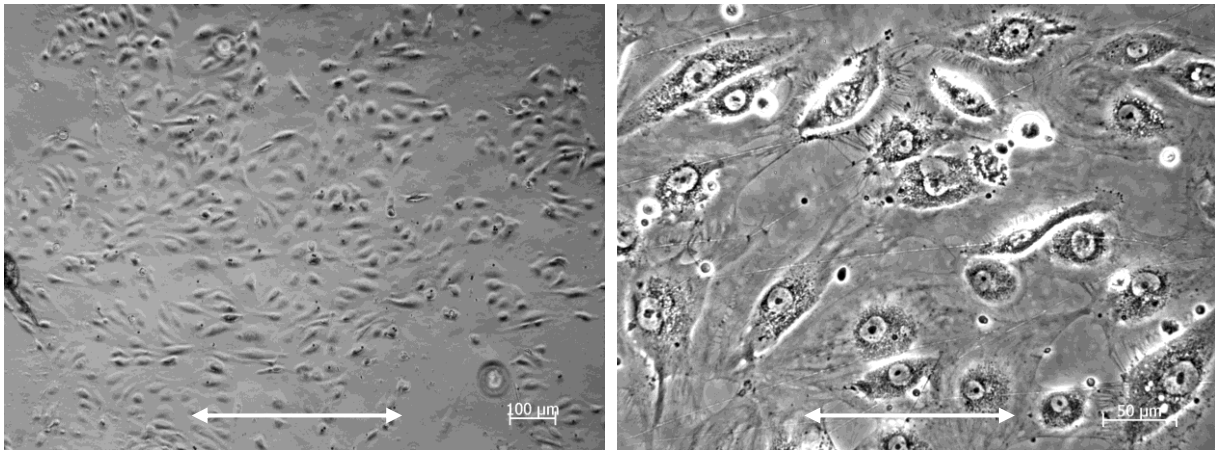


Abbildung 18: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an. Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 50 µm.

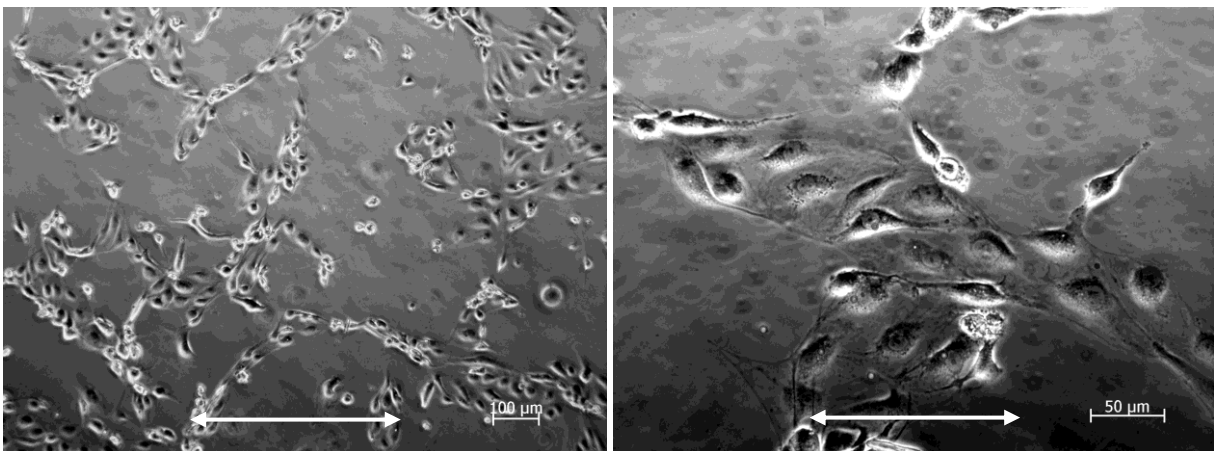


Abbildung 19: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an. Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 50 µm.

4 Ergebnisse

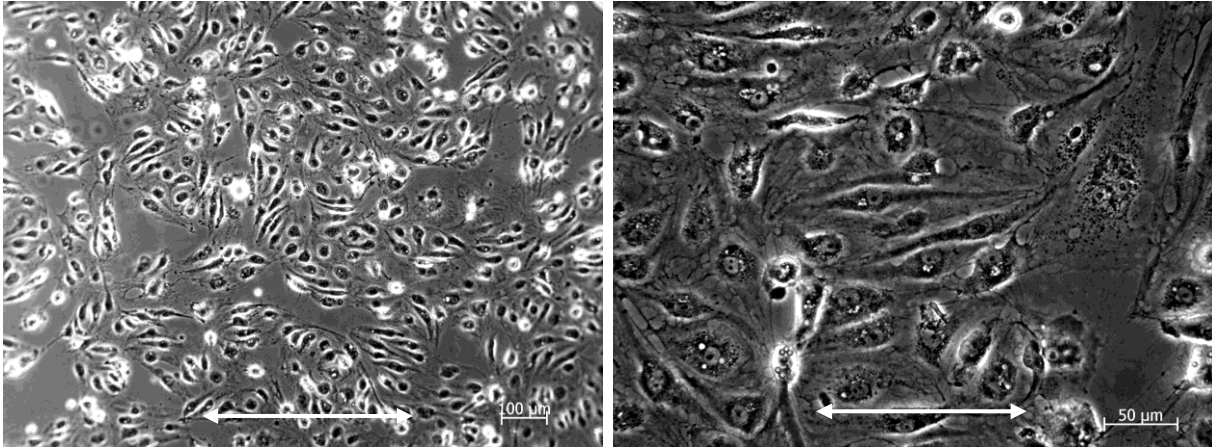


Abbildung 20: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an. Lichtmikroskop Axiovert 40 C. Bar links 100 µm, Bar rechts 50 µm.

4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie von VE-Cadherin nach mechanischer Stimulation

Um die Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte unter mechanischer Stimulation zu veranschaulichen, wurden die Zellen unter dem LSM betrachtet. VE-Cadherin wurde als repräsentatives Protein für die Zell-Zell-Kontakte ausgewählt und mit Alexa Fluor 488 verankert. Außerdem wurden das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin Alexa 546 und die Zellkerne mit Hoechst 33342 verkoppelt.

In der Kontrolle waren die Zellen gleichmäßig verteilt und besaßen keine Ausrichtung. Die Zell-Zell-Kontakte waren zwischen den eng anliegenden, benachbarten Zellen gleichmäßig ausgebildet (Abbildung 21).

Durch mechanischen Reiz im STREX richteten sich die Zellen in Streckrichtung aus, wurden länglicher und der Spalt zwischen den Zellmembranen benachbarter Zellen weitete sich. Bestanden bei geringer Reizintensität zwischen den aneinander anliegenden Zellen viele, gleichmäßig verteilte Zell-Zell-Kontaktverbindungen, konzentrierten diese sich unter intensiverer mechanischer Stimulation und sich weitender Zellabstände zu wenigen, weiter auseinandergezogenen Kontaktverbindungen, die jedoch weiterhin nachweisbar blieben (Abbildung 22 – 25).

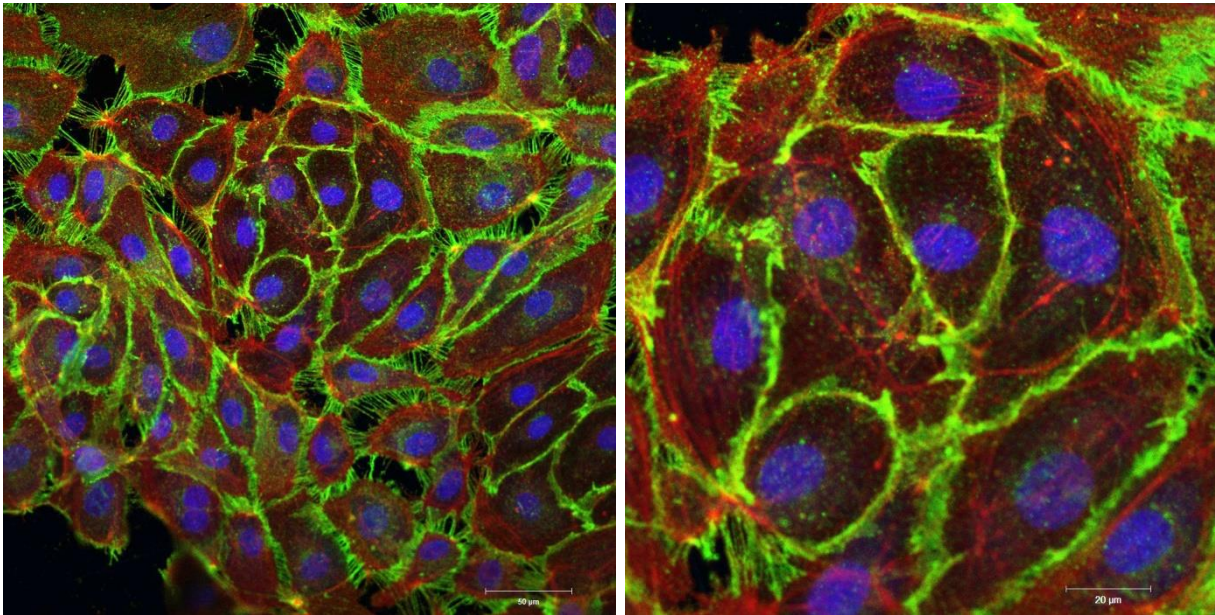


Abbildung 21: HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz: größtenteils eng anliegende Zellen, Zell-Zell-Kontakte gleichmäßig ausgebildet. Grün: VE-Cadherin; rot: Aktin; blau: Zellkerne. LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

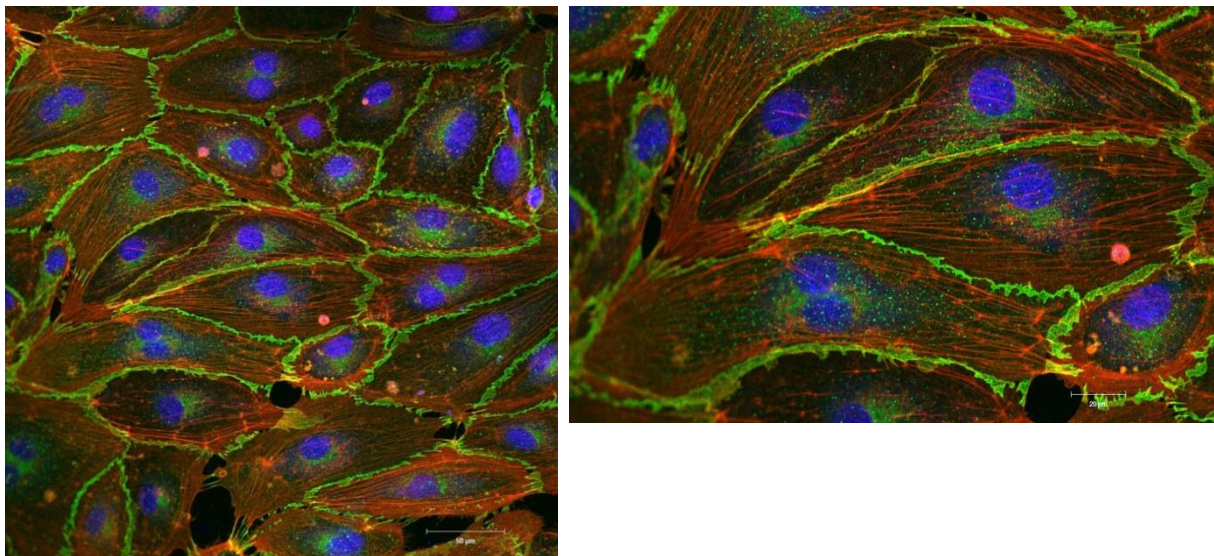


Abbildung 22: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 2% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Dehnung der Zellen und des Aktin-Zytoskeletts durch den Streckreiz, weiterhin bestehende gleichmäßige Zell-Zell-Kontakte. Grün: VE-Cadherin; rot: Aktin; blau: Zellkerne. LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

4 Ergebnisse

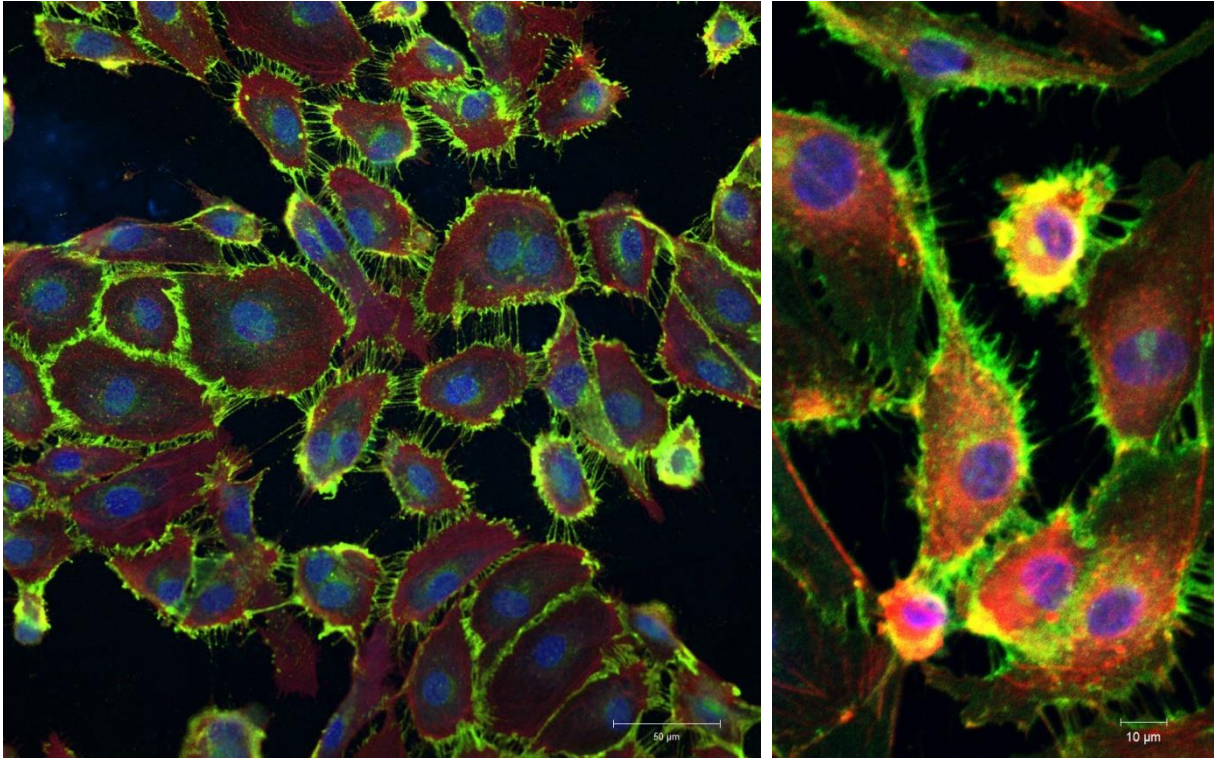


Abbildung 23: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellen durch Streckbelastung auseinandergezogen, Zellverbindungen bestehen weiterhin.

Grün: VE-Cadherin; rot: Aktin; blau: Zellkerne.
LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 10 µm.

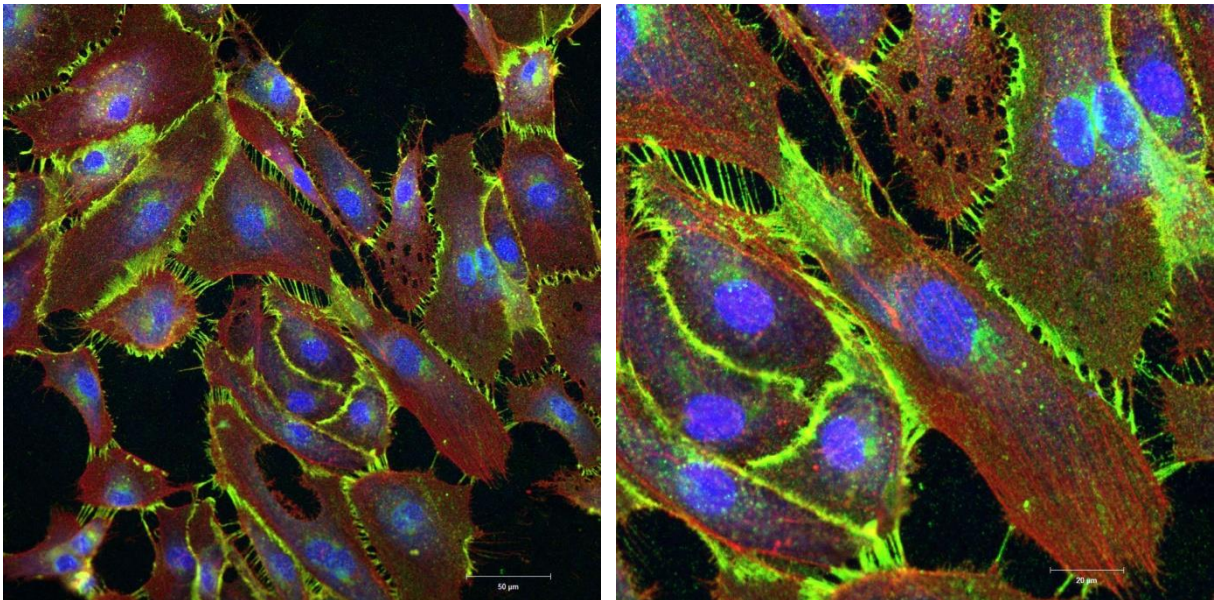
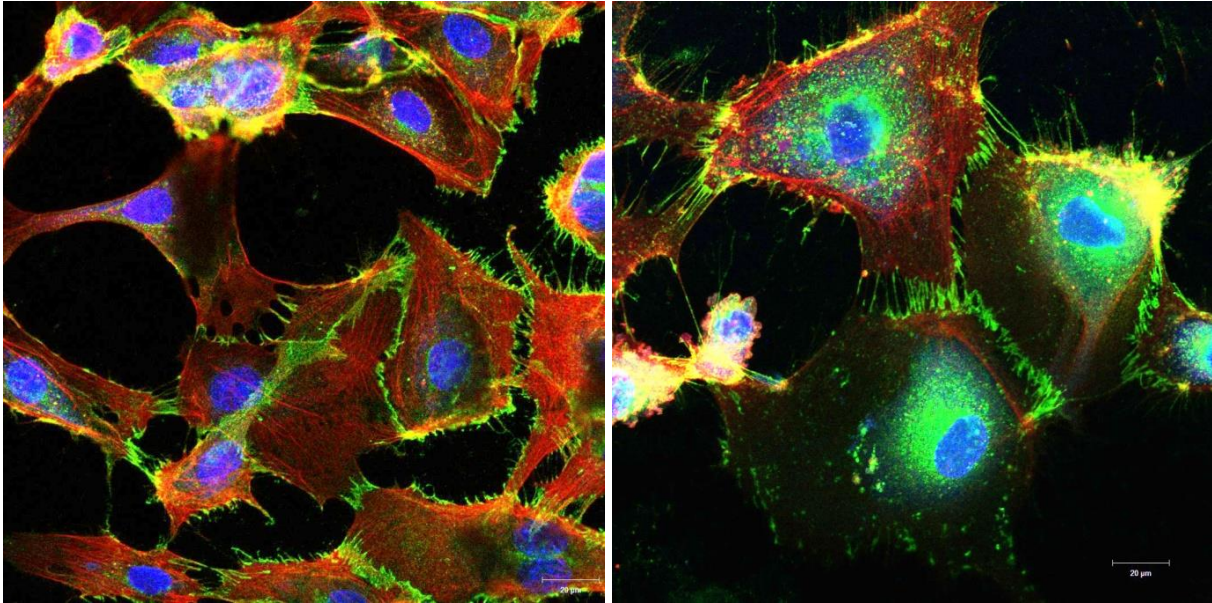


Abbildung 24: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: stark beanspruchte Zellverbindungen zwischen auseinandergezogenen Zellen.

Grün: VE-Cadherin; rot: Aktin; blau: Zellkerne.
LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.



**Abbildung 25: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: stärkere Dehnung der Zellen, Zellverbindungen zwischen auseinandergezogenen Zellen sichtbar.
Grün: VE-Cadherin; rot: Aktin; blau: Zellkerne.
LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.**

4.3.3 Fluoreszenzmikroskopie von Connexin43 nach mechanischer Stimulation

Auch die mikroskopisch sichtbaren Veränderungen von Connexin43, Protein der Gap Junctions, wurden unter dem Einfluss der mechanischen Stimulation im STREX untersucht und gegenüber der Kontrolle verglichen. Für die Untersuchung wurde Connexin43 mit Alexa Fluor 488 verkoppelt, das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin Alexa 546 und die Zellkerne mit Hoechst 33342.

Während eine gewisse Menge von Connexin43 perinukleär vorhanden war und sich weiteres Connexin43 in den Membranen der eng benachbarten Kontrollzellen gleichmäßig verteilte (Abbildung 26), konzentrierte sich die Verteilung des membranständigen Connexin43 bei den zuvor im STREX stimulierten Zellen stärker auf die noch bestehenden, gestreckten Zellverbindungen der auseinandergezogenen Zellen. Gleichzeitig schien sich Connexin43 perinukleär anzureichern.

Dieser Effekt war bei einem mechanischen Reiz von 2% noch gering (Abbildung 27). Bei 5% war er jedoch schon deutlicher (Abbildung 28) und bei den höheren Reizintensitäten schließlich noch ausgeprägter (Abbildungen 29, Abbildung 30).

4 Ergebnisse

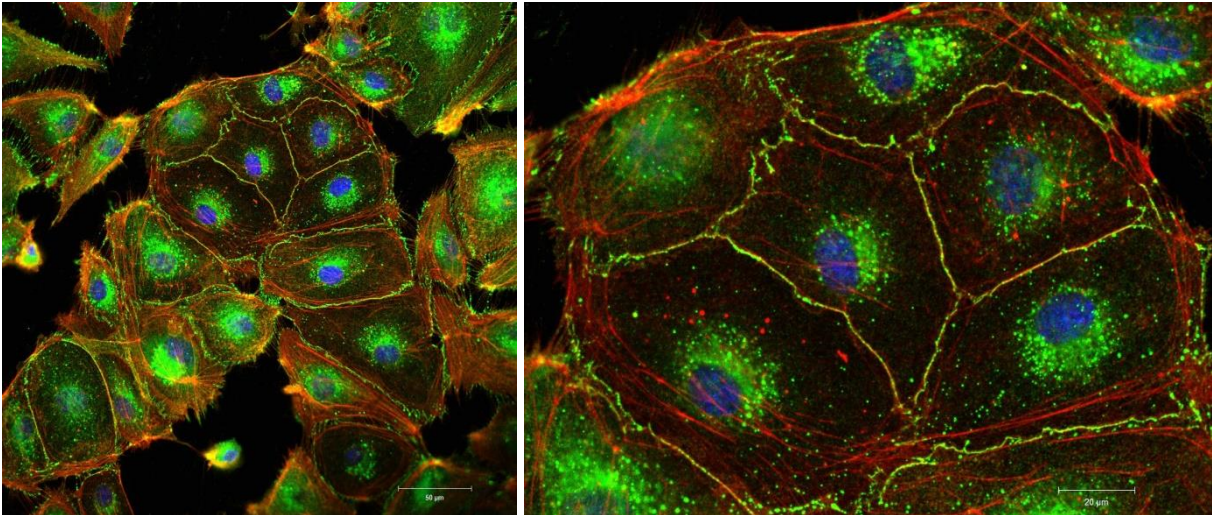


Abbildung 26: HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz: eng anliegende Zellen, Connexin43 perinukleär und membranständig gleichmäßig verteilt. Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne. LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

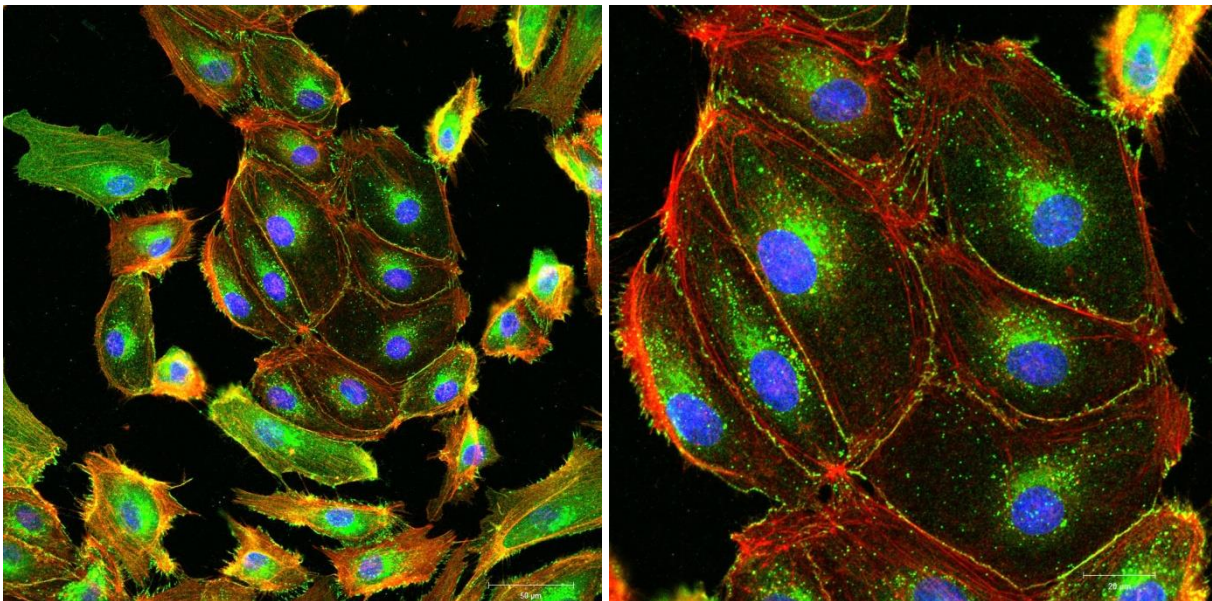


Abbildung 27: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 2% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellen größtenteils eng anliegend, Connexin43 perinukleär und membranständig meist gleichmäßig verteilt. Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne. LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

4 Ergebnisse

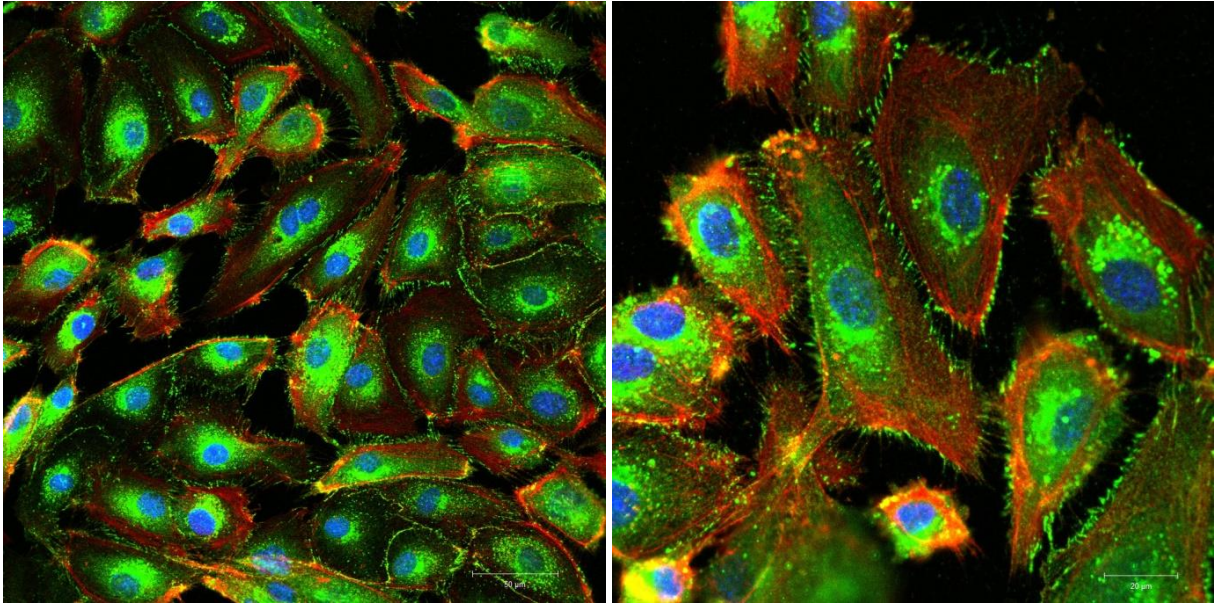


Abbildung 28: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellabstand vergrößert, Anreicherung von Connexin43 perinukleär und Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf noch existierende Zellverbindungen.

Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne.
LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

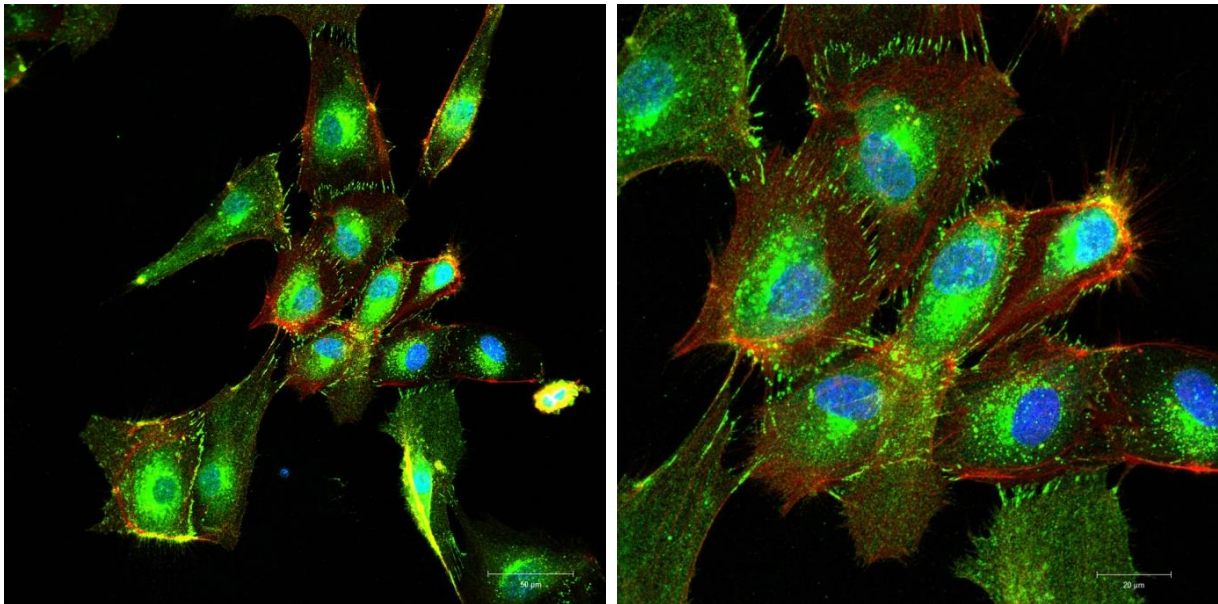


Abbildung 29: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: perinukleäre Anreicherung, starke Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf vorhandene Zellverbindungen.

Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne.
LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

4 Ergebnisse

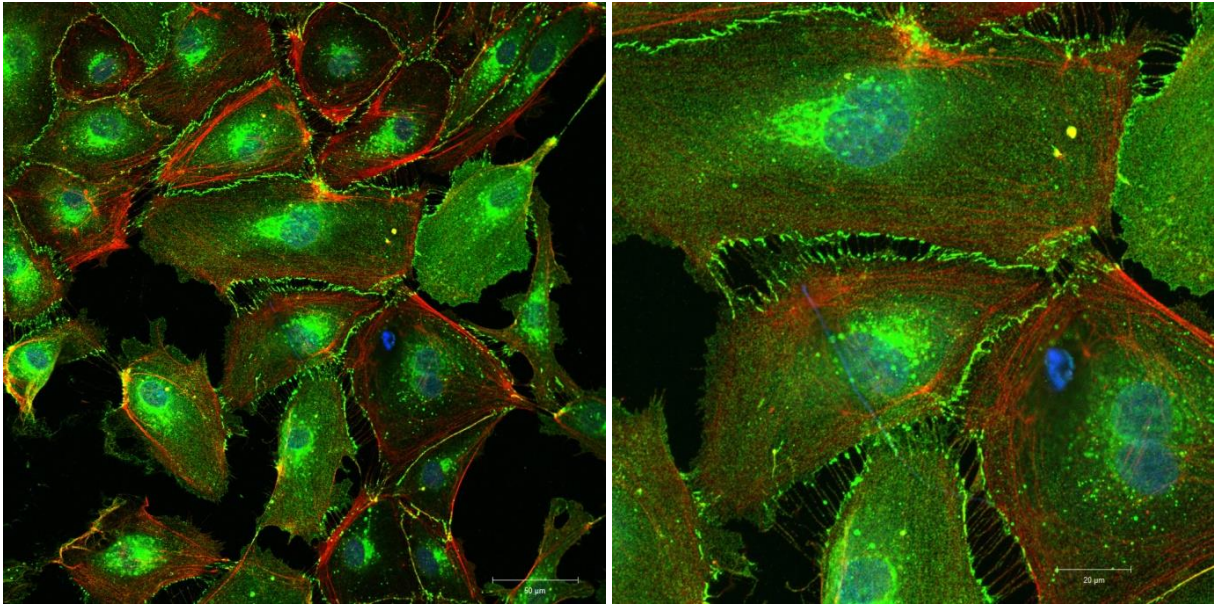


Abbildung 30: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: weitere perinukleäre Anreicherung, starke Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf noch vorhandene Zellverbindungen.

Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne.

LSM 780. Bar links 50 µm, Bar rechts 20 µm.

4 Ergebnisse

4.3.4 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Akt

Während die Expression von Gesamt-Akt durch die unterschiedliche mechanische Stimulation der Zellen im STREX unverändert blieb, kam es zu einer veränderten Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von Akt (Ser 473). Die gemessene Intensität des pAkt-Signals bei 10% Streckung sowie bei 15% Streckung war gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Auch war die gemessene Intensität von pAkt bei 15% Streckung der Zellen gegenüber Zellen, die 5% bzw. 10% gestreckt wurden, signifikant erhöht.

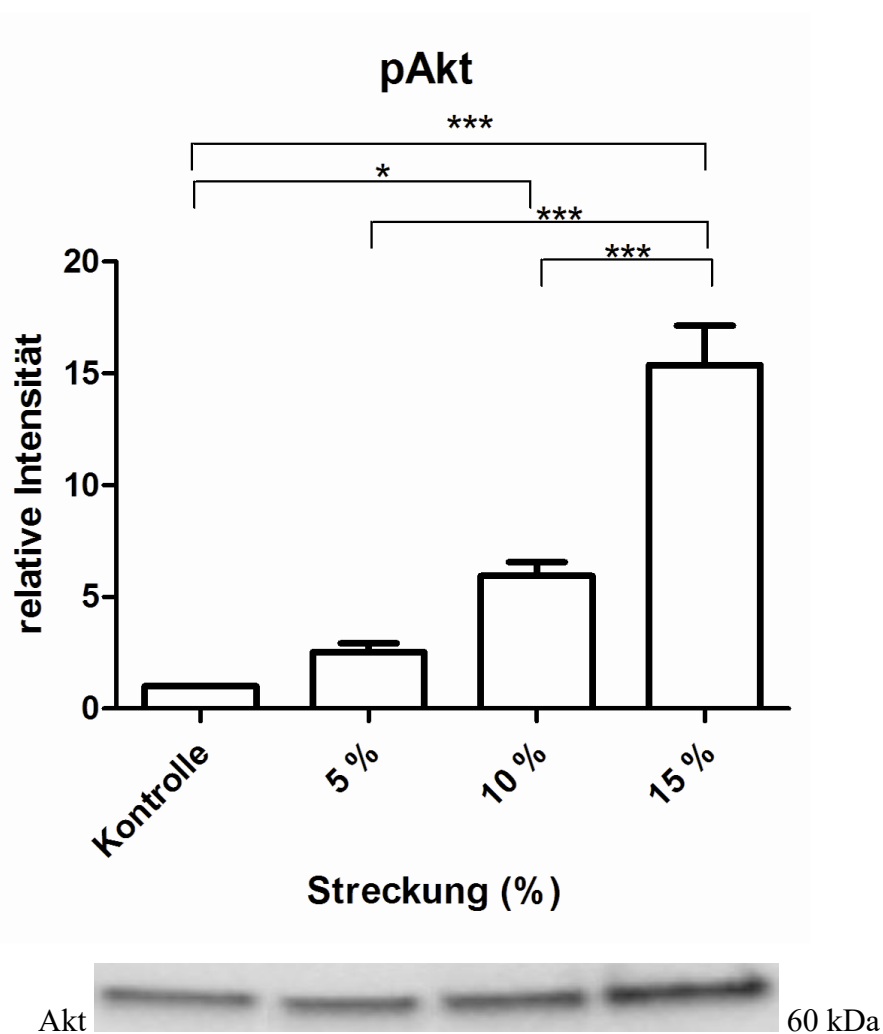


Abbildung 31: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pAkt: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 10% (*); Kontrolle und 15% (*) ; 5% und 15% (***) ; 10% und 15% (***) (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). $n=10$. HDMEC. Luminex Assay. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung.**

4 Ergebnisse

4.3.5 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Erk

Die Expression von Gesamt-Erk blieb in den im STREX gereizten Zellen gegenüber der Kontrollreihe konstant. Die aktivierte Form von Erk war jedoch zwischen den gereizten und den Kontrollzellen, aber auch innerhalb der unterschiedlich stark gereizten Zellen signifikant unterschiedlich ausgeprägt. So war die Intensität des pErk-Signals bei 15% Streckung verglichen mit der Kontrollreihe signifikant erhöht. Auch zwischen der 2% und der 15% Streckung, zwischen der 5% und 15% Streckung und zwischen der 10% und 15% Streckung gab es eine signifikante Zunahme in der Expression von pErk.

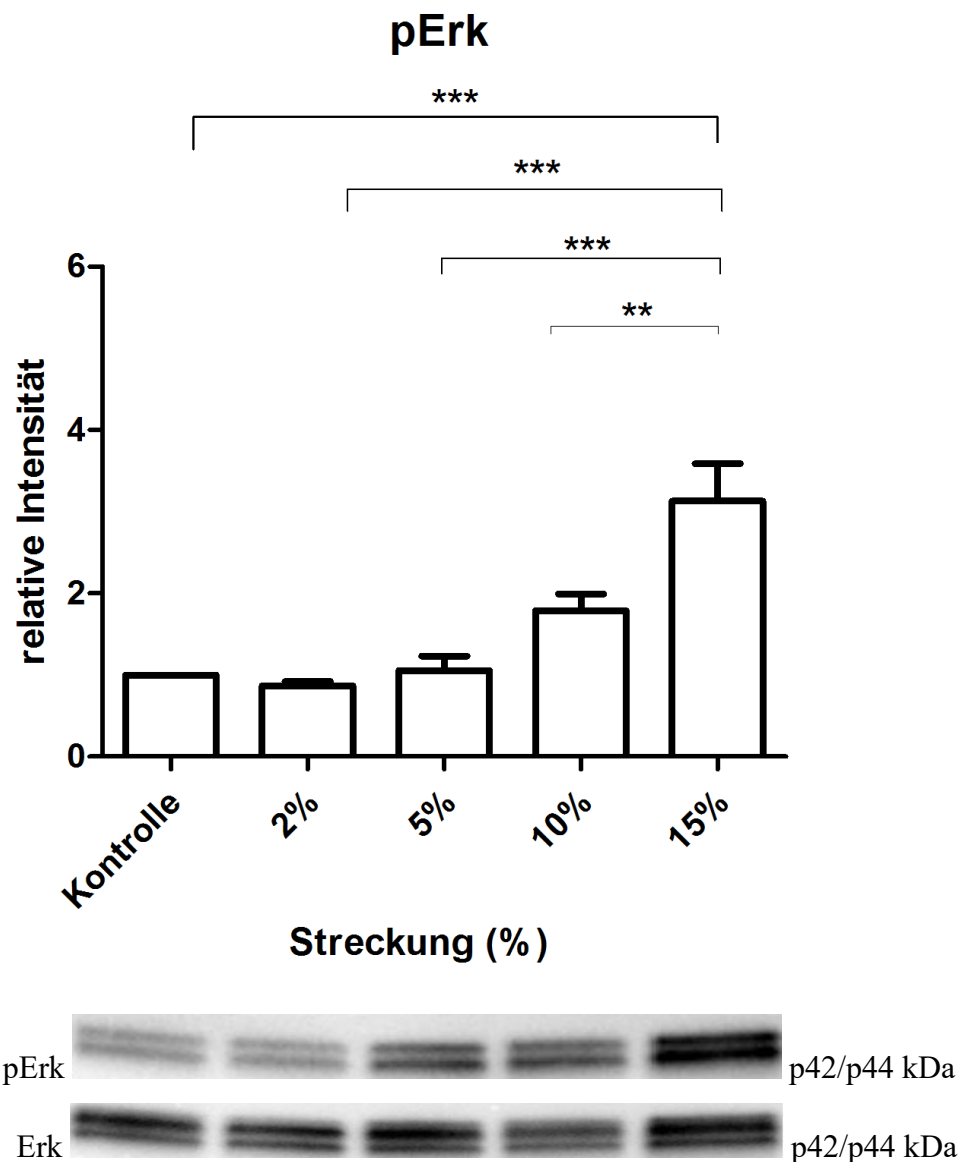
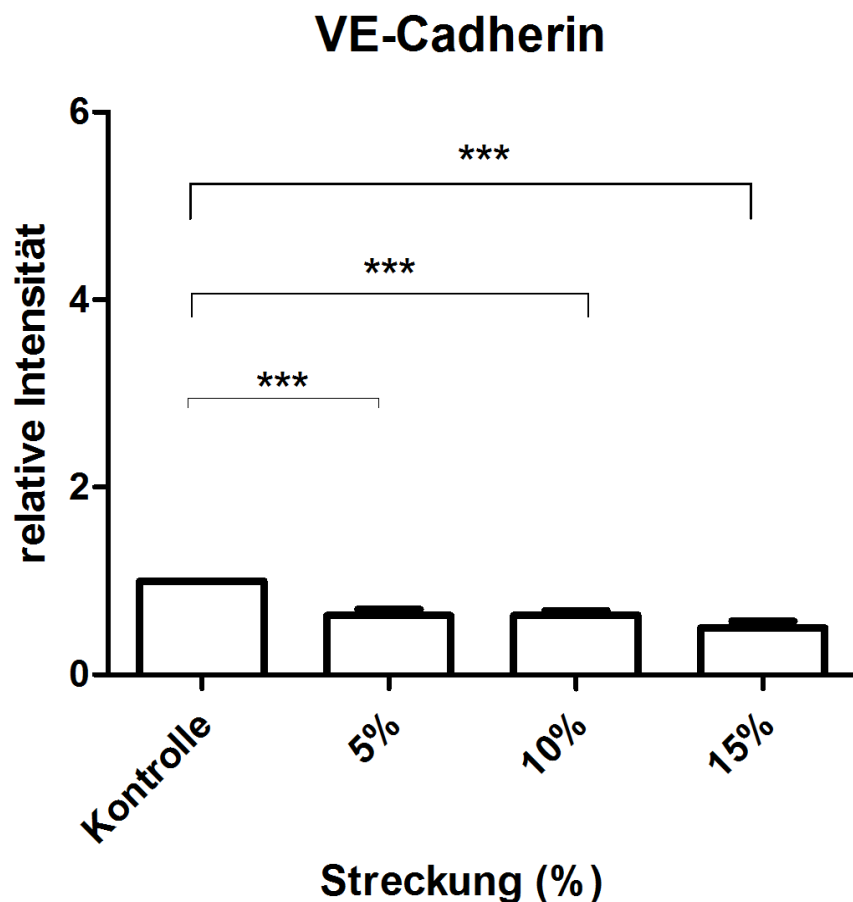


Abbildung 32: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pErk: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 15% (*) ; 2% und 15% (***) ; 5% und 15% (***) ; 10% und 15% (**) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). $n=10$. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung.**

4 Ergebnisse

4.3.6 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von VE-Cadherin

Gegenüber der Kontrolle waren signifikante Verringerungen der Expression von VE-Cadherin nach mechanischer Stimulation der Zellen im STREX erkennbar. Die signifikanten Verringerungen betrafen den Vergleich der Kontrollreihe mit den Streckstärken von 5%, 10% und von 15%. Darüber hinaus zeigte die Höhe der ermittelten Intensität unter steigender Stimulation eine abnehmende Tendenz.



VE-Cadherin  110 kDa

Abbildung 33: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von VE-Cadherin: signifikante Verringerung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 5% (*) ; Kontrolle und 10% (***) ; Kontrolle und 15% (***) ($***p \leq 0,001$). $n=8$. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung.**

4 Ergebnisse

4.3.7 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Connexin43

Die Höhe der gemessenen Expression von Connexin43 war unter steigender Reizstärke im STREX signifikant verringert. Die signifikante Verringerung der ermittelten Expression befand sich zwischen der Kontrolle und 5% Streckung, zwischen der Kontrolle und 10% Streckung und zwischen der Kontrolle und 15% Streckung. Bei zunehmender Reizstärke war eine Tendenz hin zu geringer werdender Intensität des gemessenen Connexin43 zu beobachten.

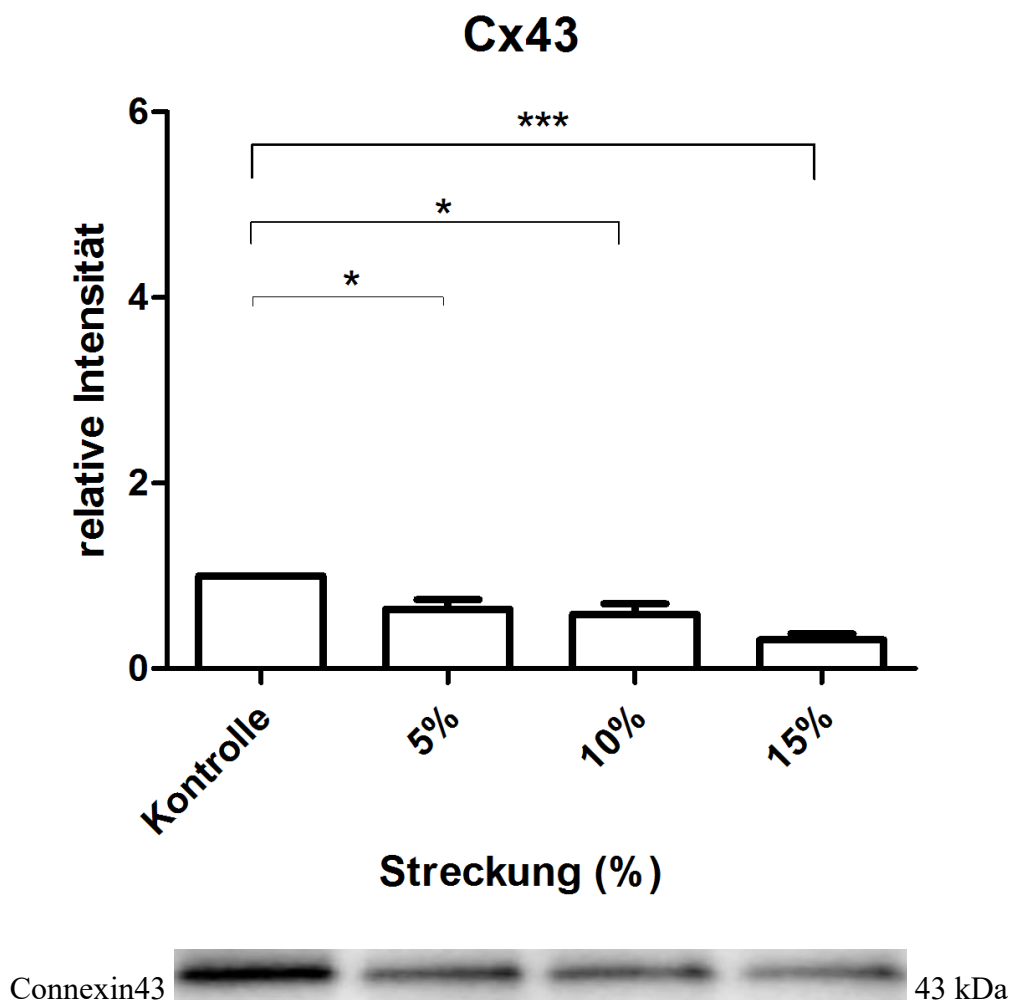


Abbildung 34: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von Connexin43: signifikante Verringerung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 5% (*); Kontrolle und 10% (*); Kontrolle und 15% (***) ($*p \leq 0,05$; $***p \leq 0,001$). $n=5$. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung.

4 Ergebnisse

4.3.8 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Caveolin-1

Der mechanische Reiz der Zellen im STREX beeinflusste die Expression von Caveolin-1 nicht signifikant. Der Anteil des phosphorylierten Caveolin-1 erfuhr jedoch durch die mechanische Stimulation signifikante Veränderungen. Diese gingen mit einer Aufwärtstendenz des nachgewiesenen pCaveolin-1 bei zunehmender Reizstärke einher. Eine signifikante Erhöhung der gemessenen Signalintensität zeigte sich zwischen der Kontrolle und 15% Streckung sowie zwischen 5% und 15% Streckung.

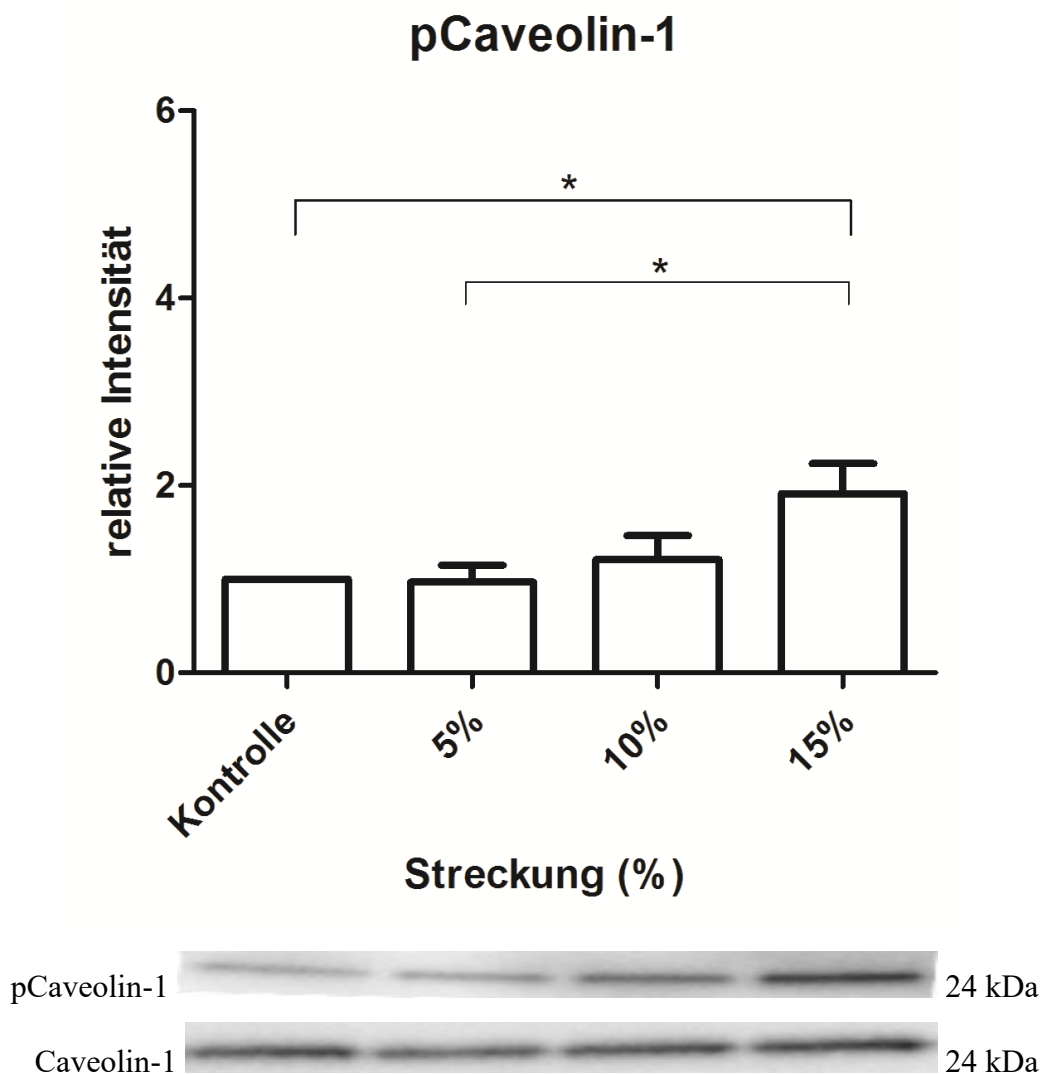


Abbildung 35: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pCaveolin-1: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 15% (*); 5% und 15% (*) ($*p \leq 0,05$). $n=8$. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zelllyse 30 min nach Streckung.

4 Ergebnisse

4.3.9 Auswirkung der mechanischen Stimulation im STREX auf die Expression von Src

Die Streckung der Zellen im STREX hat sich nicht signifikant ausgewirkt sowohl auf die Höhe der Src-Expression als auch auf die Phosphorylierung von Src.

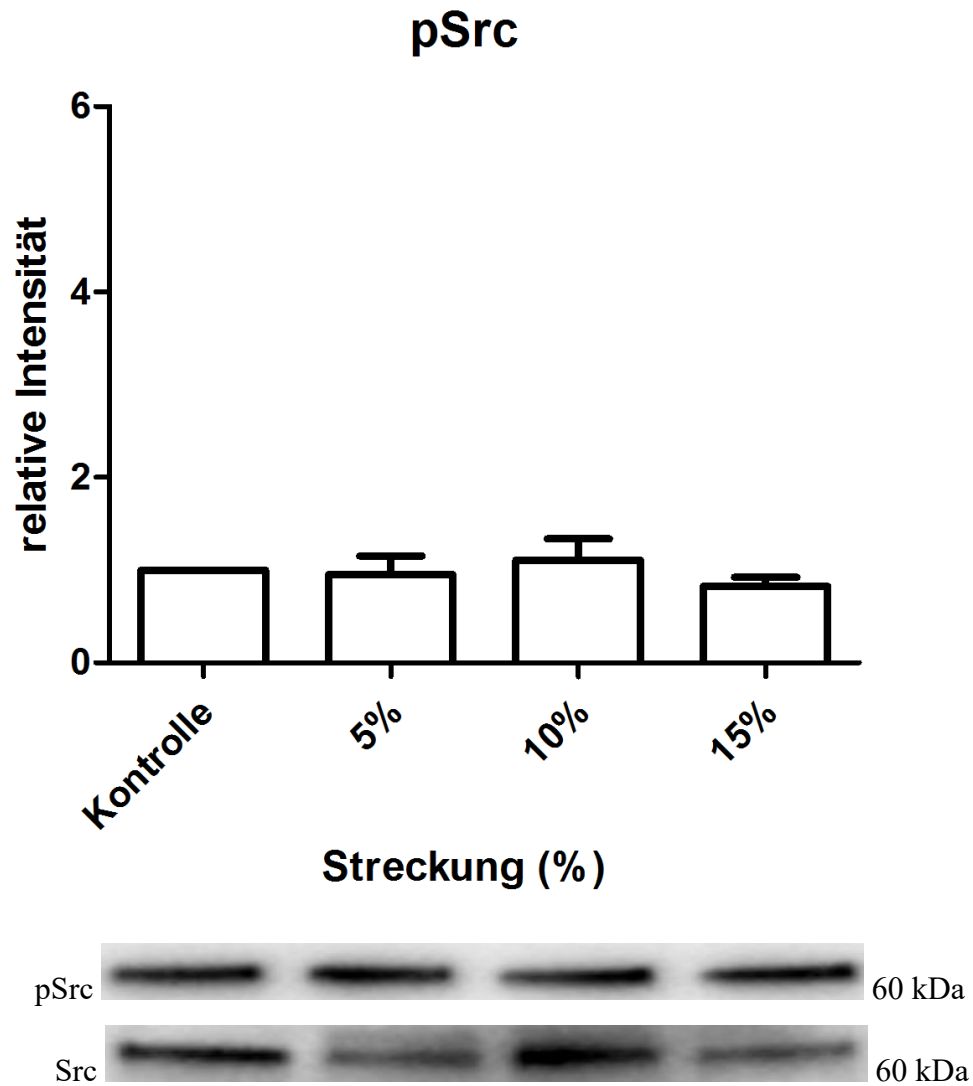


Abbildung 36: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pSrc: keine signifikante Veränderung der gemessenen Intensität unter Streckung. n=8. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung.

5 Diskussion

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss induzierter mechanischer Stimulation in der Expression und Aktivierung von Signal- und Adhäsionsmolekülen der humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) zu untersuchen. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurden zwei Versuchsansätze ausgewählt und deren Signalaktivierungspotential miteinander verglichen. Im ersten Ansatz wurden die HDMEC über membranständige β 1-Integrine mechanisch stimuliert und anschließend die Aktivierung ausgewählter Signalproteine betrachtet.

Im zweiten Versuchsansatz wurden Silikonkammern mit Plasma bestrahlt und mit Kollagen beschichtet. Daraufhin wurden HDMEC auf diese ausgesät. Die HDMEC verankerten sich über Transmembranproteine an das in den Kammern befindliche Kollagen. Die Silikonkammern wurden dann mit den am Kollagen verankerten Zellen im STREX Cell Strain Instrument zyklisch für 15 Minuten bei 1 Hz gestreckt. Die Expression und Aktivierung ausgewählter Signal- und Adhäsionsproteine wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ausgewertet.

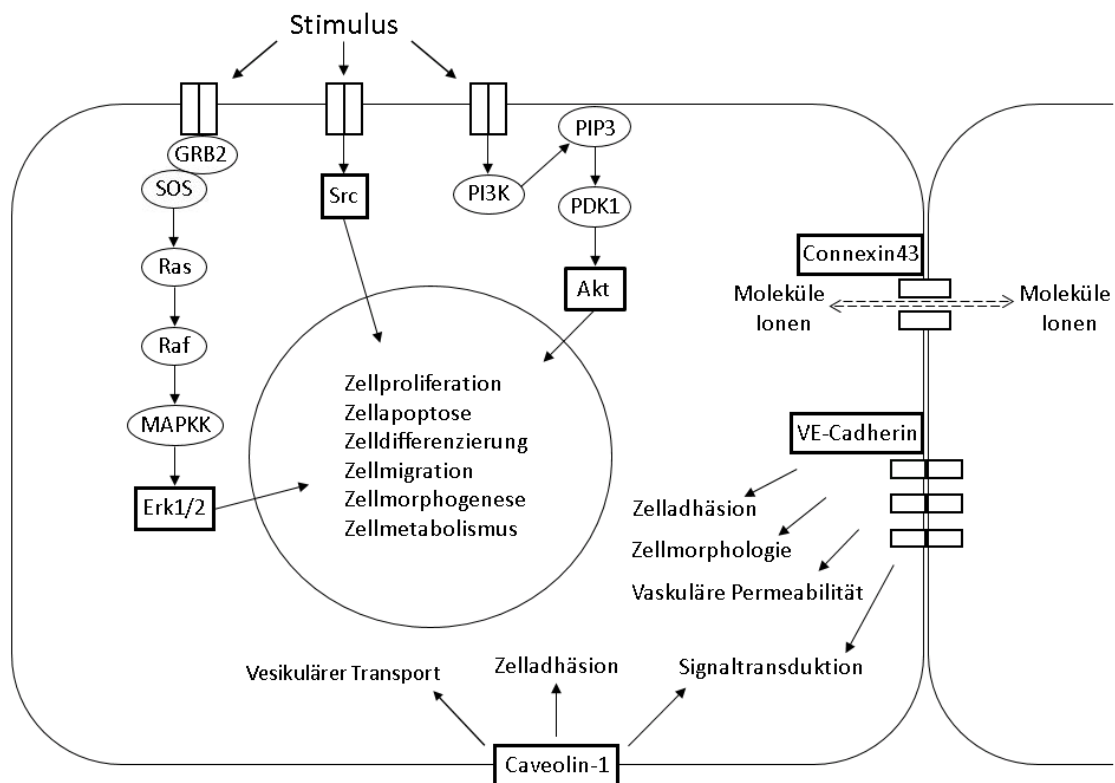


Abbildung 37: Stark vereinfachte Übersicht über die für diese Untersuchung ausgewählten Proteine und deren funktionelle Bedeutung für die Zelle. Ausgewertet wurden die Signalproteine Erk, Akt und Src, sowie die Adhäsionsproteine Connexin43, VE-Cadherin und Caveolin-1.

5 Diskussion

Das Signalprotein Erk, eine MAP-Kinase, spielt als zentrales Protein des MAP-Kinase-Weges eine wichtige Rolle in der zellulären Proliferation, Differenzierung und Morphogenese. Die Aktivierung von Erk geschieht durch eine MAPKK-vermittelte Phosphorylierung. Frühere Untersuchungen konnten eine vermehrte Erk-Aktivierung in Epithelzellen unter anderem durch Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren nachweisen (Ishibe et al., 2004). Bei Tumorzellen wurde durch eine induzierte Verstärkung der β 1-Integrin-Expression eine vermehrte Erk-Aktivierung festgestellt (Pan et al., 2016). Hinsichtlich einer mechanischen Aktivierung wurde eine vermehrte Erk-Phosphorylierung unter β 1-Integrin-vermittelter mechanischer Streckung von Stammzellen nachgewiesen (Müller et al., 2013). Die Ausschaltung des β 1-Integrin-Rezeptors bei Osteoblasten führte bei anschließender mechanischer Stimulation der Zellen zu einer Hemmung der Erk-Aktivierung (Yan et al., 2012). Der erste Ansatz meiner Arbeit, die β 1-Integrin-vermittelte zyklische Stimulation von HDMEC, untersuchte mögliche Veränderungen in der Phosphorylierung von Erk unter mechanischem Reiz und bei unterschiedlichen Inkubationszeiten von bis zu 6 Stunden. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt nach mechanischer Stimulation eine signifikante Veränderung der Aktivierung von Erk. Nur leichte Erhöhungen waren beobachtbar, die jedoch auch bei den nur mit Beads inkubierten Zellen vorkamen, was zeigt, dass die mechanische Stimulation der Integrine durch Clustern ein Signal erzeugt, was durch mechanische Zugkräfte am Rezeptor nicht erhöht wird. Da also unter mechanischem Reiz der β 1-Integrin Subunits von HDMEC keine über dem Basalniveau der Kontrollzellen hinausgehende signifikante Aktivierung von Erk möglich ist, geschieht die zelluläre Anpassungsreaktion möglicherweise über die Aktivierung eines anderen Signalwegs. Im Hinblick auf oben zitierte Arbeiten an Erk überraschten die Ergebnisse.

Gänzlich anders sind jedoch die Ergebnisse des zweiten Ansatzes. Im STREX Cell Strain Instrument stieg mit steigender Intensität der mechanischen Stimulation der Versuchszellen die Erk-Phosphorylierung. Gesamt-Erk blieb dabei wie zu erwarten unverändert. Diese Ergebnisse reihen sich besser in die vorher durchgeführten Arbeiten ein. Erk scheint also doch in der reaktiven Anpassung der Zelle auf einen äußeren mechanischen Reiz von Bedeutung zu sein. In der Literatur ist für Epithelzellen ein Weg beschrieben, bei dem Erk-abhängig die Morphologie der Zelle beeinflusst werden kann. Bei dem beschriebenen Weg kann eine durch einen Wachstumsfaktor getriggerte Aktivierung von Erk ausgelöst und ein Erk-Paxillin-Komplex gebildet werden. Dieser Komplex kann zum Ort der Zell-Matrix-Interaktion translozieren und FAK aktivieren, welches die Zellmorphologie direkt beeinflussen kann (Liu

et al., 2002; Ishibe et al., 2003; Ishibe et al., 2004). Ob dieser oder doch ein anderer Weg bei mechanisch gereizten HDMEC bedeutsam ist, muss durch entsprechende Experimente weiter untersucht werden.

Die Serin/Threonin Kinase Akt ist eine zentrale zelluläre Proteinkinase, die in nahezu allen menschlichen Zellen vorkommt und an einer hohen Bandbreite zellulärer Funktionen beteiligt ist. Dazu zählen die Zellproliferation, die Apoptose, die Zellmotilität und der zelluläre Metabolismus.

Der Akt-Signalweg kann durch externe Stimuli aktiviert werden. Als Auslöser sind häufig Wachstumsfaktoren beschrieben. Die initiale Aktivierung des Akt-Signalweges führt über Zwischenschritte schließlich zur Aktivierung der Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1), durch die Akt phosphoryliert und aktiviert wird.

In vorherigen Arbeiten wurden bei mechanischen Streckungen von Stammzellen vermehrte Akt-Phosphorylierungen nachgewiesen (Case et al., 2011; Müller et al., 2013). Auch bei aus Pulmonalarterien gewonnenen glatten Muskelzellen ließ sich unter mechanischer Streckung eine Akt-Phosphorylierung nachweisen (Kim et al., 2016).

Im ersten Ansatz dieser Arbeit, unter β 1-Integrin-vermittelter mechanischer Stimulation der Zellen, kam es, ähnlich wie schon bei Erk im ersten Ansatz, zu keiner signifikanten Veränderung des phosphorylierten, aktivierten Akt in den Zellen nach mechanischer Stimulation der Integrin-Rezeptoren.

Dies ist ebenso wie die Ergebnisse zu Erk überraschend, besonders auch im Hinblick auf die oben genannten Arbeiten. Wie auch bei Erk zeigten sich zum Teil leicht verstärkte Phosphorylierungen unter Beadbeladung, also durch Clustern der Rezeptoren.

Beim zweiten Versuchsansatz jedoch konnte eine signifikante Erhöhung der Akt-Phosphorylierung korrelierend zur ansteigenden Intensität der mechanischen Stimulation nachgewiesen werden. Dies stimmt auch mit mechanischen Streckversuchen anderer Arbeiten überein.

In einer Arbeit mit vaskulären Endothelzellen, die entweder einer laminaren oder einer oszillierenden Strömung ausgesetzt waren, wurden unter der oszillierenden Strömung eine vermehrte Akt-Phosphorylierung nachgewiesen, dessen Wirkung auf mTOR und über diesen Weg eine Progression des Zellzyklus (Guo et al., 2007). Akt könnte also ebenfalls bei HDMEC bei mechanischer Stimulation über diesen Weg wirken. Dies muss weiter untersucht werden.

Eine Arbeit von Melchior mit humanen Endothelzellen zeigte die intrazelluläre Lokalisation

von pAkt unter laminärer und unter unregelmäßiger mechanischer Reizung. Dabei zeigte sich, dass pAkt bei unregelmäßiger Reizung eher perinukleär, bei laminärer Reizung jedoch vermehrt an Zell-Zell-Junctions in den Bereichen großer Scherkräfte lokalisiert war. Bei Strömungsumkehr konzentrierte sich pAkt am flussaufwärts gerichteten Rand der Zelle. Vermutlich übt pAkt so noch nicht beschriebene, lokale Wirkungen auf Zellfunktionen aus (Melchior et al., 2014). Dies ist ein weiterer interessanter Gesichtspunkt, der möglicherweise analog auch bei HDMEC eine Rolle spielen könnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse des ersten Versuchsansatzes, dass unter mechanischer Streckung der β 1-Integrine von HDMEC keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung/Aktivierung von Erk und Akt stattfindet. Dies steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen vorheriger Arbeiten, welche sich mit der Wirkung der mechanischen Stimulation auf die Signalproteine Erk und Akt in Zellen befassten, und auch nicht mit den Ergebnissen des zweiten Versuchsansatzes. Aus diesem Grund wurde von weiteren Versuchen mit mechanischer Stimulation der Zellen im Magnetfeld abgesehen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die in HDMEC fehlende signifikante Veränderung der Phosphorylierung der genannten Signalproteine bei mechanischer Stimulation der β 1-Integrin-Rezeptoren ist, dass das Phosphorylierungspotential der β 1-Integrine auf die intrazellulären Signalproteine schon unter Ruhebedingungen ausgereizt sein könnte. Wird die Zelle zusätzlich über β 1-Integrine mechanisch stimuliert, kann so möglicherweise keine weitere nennenswerte Phosphorylierung stattfinden.

Die weiteren Versuche, die zum Ziel hatten, die Auswirkung der mechanischen Stimulation auf zusätzliche Signalproteine zu untersuchen, wurden nur noch mit dem zweiten Versuchsansatz im STREX Cell Strain Instrument ausgeführt. Dessen Ergebnisse Erk und Akt betreffend stimmen sehr viel mehr mit früheren Arbeiten zu diesem Thema überein.

VE-Cadherin (vascular-endothelial cadherin) ist ein weiteres in meiner Arbeit untersuchtes Signalprotein. Das Transmembranprotein ist Bestandteil der Adherens Junctions und desmosomalen Kontaktverbindungen. Es ist somit vornehmlich an der interzellulären Adhäsion beteiligt. Durch intrazelluläre Verbindungen an das Aktin-Zytoskelett und an Transkriptionsfaktoren kann VE-Cadherin ebenfalls in intrazelluläre Prozesse eingreifen. So beeinflusst VE-Cadherin neben der Stabilität der Zell-Zellkontakte unter anderem auch die Morphogenese der Zelle und die Signaltransduktion.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Veränderung der Expression von VE-Cadherin in den zuvor gestreckten Zellen nachgewiesen. Die Erhöhung der Stärke des Zellreizes korrelierte mit einer Abnahme an VE-Cadherin im Zellsubstrat.

Dies stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Ohashi überein, die mit BAEC (bovine aortic endothelial cells) durchgeführt wurde. In jener Arbeit wurden Versuchszellen unterschiedlich erhöhten hydrostatischen Druckverhältnissen von bis zu 150 mmHg ausgesetzt. Eine anschließende Analyse des Zellsubstrats wies ebenfalls eine Verminderung von VE-Cadherin nach Reiz nach (Ohashi et al., 2007).

Die in diesem Zusammenhang erstellten LSM-Aufnahmen der unterschiedlich gestreckten Versuchszellen mit Fluoreszenzmarkierung von VE-Cadherin zeigten den Einfluss des mechanischen Reizes der Zellen auf VE-Cadherin und die über dieses Protein vermittelten Zell-Zell-Verbindungen. Die Anzahl der Kontaktverbindungen verringerte sich zwischen den sich weitenden Zellabständen unter Zunahme der Intensität der mechanischen Stimulation. Die Verbindungen dehnten sich unter erhöhter Reizintensität immer weiter aus bis hin zu deren Auflösung. Gleichzeitig war eine starke Längsorientierung des Aktin-Zytoskeletts und der gesamten Zellen in Streckrichtung sichtbar.

Ähnlich wurde es in der Arbeit von Miao mit vaskulären Endothelzellen beschrieben, die in Flusskammern zyklischen pulsatilen sowie pendelnden mechanischen Reizungen ausgesetzt waren und nach sechsstündigem Reiz mikroskopisch sichtbare Unterbrechungen vom gefärbtem VE-Cadherin in den Zellmembranen aufwiesen (Miao et al., 2005).

Hervorzuheben in der Arbeit von Miao ist der gestellte hypothetische Zusammenhang zwischen den Lückenbildungen von VE-Cadherin in den Zellmembranen bei zyklischen mechanischen Reizungen, was in der Konsequenz zu erhöhter interzellulärer Permeabilität beitragen könnte, und deren Auswirkungen auf die Bildung von lokalen arteriosklerotischen Veränderungen.

Die Ergebnisse meiner Arbeit sprechen ebenfalls für eine möglicherweise erhöhte interzelluläre Permeabilität bei HDMEC unter zyklischer Streckung aufgrund der Verminderung der Signalintensität von VE-Cadherin und der mikroskopisch geweiteten und rarefizierten VE-Cadherin-abhängigen Zellkontakte. Ob dies potentiell Auswirkung auf lokale arteriosklerotische Veränderungen hat, bleibt zu untersuchen.

Connexin43 ist ein Protein, das als Baustein für die Connexons dient. Diese transmembranös gelegenen Connexons können sich mit entsprechenden Connexons benachbarter Zellen zu Gap Junctions verbinden. Über diese Gap Junctions sind eine Zell-Zell-Kommunikation und der Austausch kleinerer Moleküle und Ionen zwischen Zellen möglich (Goodenough et al., 1996).

5 Diskussion

In der Auswertung der Streckversuche zeigte sich eine signifikante Verringerung des Connexin43-Gehaltes in den Zellsubstraten unter zunehmender mechanischer Stimulation der Zellen.

In den LSM-Aufnahmen, in denen die Connexin43-Proteine mit einem Fluoreszenzmarker versehen wurden, zeigte sich mit zunehmender Streckung eine Dehnung der Connexin43-vermittelten Zell-Zell-Verbindungen und deren sporadische Abnahme in den Zellmembranen, ähnlich wie bereits bei VE-Cadherin beobachtet wurde.

In den Ergebnissen zeigen also VE-Cadherin und Connexin43 einige ähnliche Tendenzen.

Bereits 1992 konnte von Meyer gezeigt werden, dass Antikörper gegen N-Cadherin, einem Verwandten von VE-Cadherin, der auch aus der Familie der Cadherine stammt, die Ausbildung von Gap Junctions behindern, ebenso wie Antikörper gegen Connexin43 die Ausbildung von Adherens Junctions vermindern (Meyer et al., 1992).

Möglich wäre also auch hier eine gegenseitige Beeinflussung der Expression zwischen VE-Cadherin und Connexin43.

Die Bedeutung einer verminderten Connexin43-Expression unter mechanischer Stimulation wurde bei Osteozyten untersucht. Scherkräften ausgesetzte Osteozyten wiesen in einer Arbeit von Li ebenfalls eine verminderte Connexin43-Expression nach, was unter anderem zu einer Erhöhung proapoptischer Signalmoleküle in den Zellen führte (Li et al., 2013). Durch den verminderten interzellulären Austausch von Molekülen durch die verringerte Zellkommunikation ist dieser Effekt auch durchaus bei HDMEC denkbar. Die Auswirkung des veränderten interzellulären Austausches auf die Konzentration von Signalmolekülen und Ionen bei HDMEC ist sicherlich ein interessanter Ansatz zukünftiger Versuche.

Die Caveoline kommen in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers vor. Auf zellulärer Ebene sind sie hauptsächlich in der Plasmamembran in den Caveolae zu finden, aber auch in diversen Zellkompartimenten wie dem Golgi-Apparat und in Vesikeln. Caveolin-1 ist Hauptbestandteil der Caveolae in Endothelzellen. Durch Oligomerisierungen formt es die Basis der Caveolae in ebenen Zellen und kann dort als Markermolekül genutzt werden.

Caveolae können als vesikuläre Transporter sowohl Membrankomponente und extrazelluläre Liganden, als auch manche Viren und Toxine endozytieren (Pelkmans et al., 2002).

Caveolin-1 kann auch Transmembranproteine und Signalmoleküle binden (Lisanti et al., 1994). Auch moduliert es Signalmoleküle und Signalkaskaden, zum Beispiel reguliert es die GTPase-Aktivität von α -Untereinheiten von G-Proteinen herab (Li et al., 1996).

Während in den Streckreizversuchen der Anteil des gesamten Caveolins bei jeder

5 Diskussion

Streckintensität unverändert blieb, wurde mit steigender Reizintensität ein Anstieg der Caveolin-1-Phosphorylierung beobachtet. Eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung der Caveolin-1-Phosphorylierung lag bei einer Streckintensität von 15% vor.

Welche Bedeutung eine Erhöhung der Caveolin-1-Phosphorylierung in den Versuchszellen besitzen könnte, zeigt eine Arbeit von Joshi, die den Einfluss der Caveolin-1-Phosphorylierung in der Dynamik von Fokalen Adhäsionen und in der Zellmigration bei Tumorzellen nachweisen konnte (Joshi et al., 2008). Nachgewiesen als verbindende Elemente sind die Proteine Rho und die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK), welche auf das Zytoskelett wirken. Durch die entwicklungsgeschichtlich enge Verzahnung zwischen den menschlichen Zellen und der Caveolae wäre in HDMEC ein zumindest ähnlicher Mechanismus denkbar.

Interessant wäre zu untersuchen, ob Rho und ROCK bei mechanischer Stimulation der HDMEC ebenfalls ansteigen, ob sie über diesen Weg auf das Zytoskelett einwirken und welche Folgen dieses haben könnte, und zum Beispiel auch, ob die Zellausrichtung davon abhängt.

Src stammt aus der Familie der Src-Kinasen und hat bei vielen Signalkaskaden eine regulierende Funktion. Src hat Einfluss auf die Zellproliferation, die Zellmigration und die Angiogenese. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist seine nachgewiesene Bedeutung bei der Zelladhäsion (Irby et al., 2002), bei Modifikationen am Zytoskelett, beim Membrantransport und bei seiner Beteiligung an der Mitose (Bjorge et al., 2000).

Durch seine vielfältige Funktion gilt Src gemeinhin als Protoonkogen.

In der Auswertung der Ergebnisse der unterschiedlichen mechanischen Streckungen ist keine signifikante Veränderung der Expression von Src im Vergleich zur Kontrollreihe beobachtet worden. Ebenfalls untersucht wurde das phosphorylierte Src, kurz pSrc. Der phosphorylierte Zustand geht mit einer Konformationsänderung des Src-Proteins einher, welches Src inaktiviert. Auch für pSrc wurde bei allen Streckreizintensitäten eine nahezu konstante Aktivität beobachtet.

Die Bedeutung von Src in der zellulären Stressreaktion ist somit unklar. Möglich wäre, dass Src unter der zellulären Stressreaktion eine nur untergeordnete Bedeutung hat.

Bestätigte sich dies in weiteren Versuchen, wäre es eine weiterführende Entdeckung, besonders im Hinblick auf seinen nachgewiesenen Einfluss auf die oben genannten zellulären Funktionsbereiche.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich, unter vorheriger Plasmabestrahlung von Silikonkammern durch den APPJ, Kollagenlösung sichtbar gleichmäßiger verteilte.

5 Diskussion

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der an die Plasmabestrahlung und Kollagenbeschichtung gefolgten Zellaussaat in die Silikonkammern zeigte sich außerdem ein weitaus dichterere Endothelzellrasen als in den nicht-plasmabestrahlten bzw. nicht mit Kollagen beschichteten Kontrollkammern. Auf diese Erkenntnisse aufbauend, hat sich die Behandlung der Silikonkammern mit dem APPJ in dieser Arbeit als fester Bestandteil der Versuchsvorbereitungen etabliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mechanische Streckung von HDMEC eine Reihe von Signal- und Adhäsionsmolekülen beeinflusst.

Die beschriebenen Veränderungen erfolgten dabei unter fester Verankerung der HDMEC auf sich dynamisch veränderbare Silikonflächen, die zuvor mit Plasma bestrahlt und mit Kollagen beschichtet wurden und sich in den Streckversuchen zyklisch bei einer Frequenz von 1 Hz um 2%, 5%, 10% und 15% ihrer Länge dehnten.

So konnte eine quantitative Veränderung der Expressionen von pAkt, pErk, Connexin43, pCaveolin-1 und VE-Cadherin nachgewiesen werden. Die veränderten Expressionen dieser Signalmoleküle unter mechanischer Reizung zeugen von einem Einfluss der externen Stimulationen auf zellulärer Ebene und von einer reaktiven Anpassung der Zellen. Dieser Effekt wurde durch die nach Streckung angefertigten licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen untermauert, in denen das Aktin-Zytoskelett, die Zellkerne, VE-Cadherin und Connexin43 markiert worden waren.

Weiterhin wurde herausgefunden, dass die über paramagnetische Beads und β 1-Integrin vermittelte mechanische Stimulation der HDMEC im zyklisch aktivierten, inhomogenen elektromagnetischen Feld zu keiner signifikanten Aktivierung der zentralen Signalmoleküle Erk und Akt geführt hat.

Die in dieser Arbeit neu erfassten Erkenntnisse weisen darauf hin, dass, werden ganze Zellverbände mechanisch belastet, HDMEC ähnliche zelluläre Reaktionen zeigen wie andere humane Zelltypen, an denen bereits mit mechanischer Stimulation experimentiert wurde, zum Beispiel Stammzellen oder auch Osteoblasten. Dies gilt für die morphologische Anpassung als auch für die Expression von Signalproteinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können zum Verständnis von Veränderungen in mikrovaskulären Endothelzellen nach mechanischer Stimulation beitragen, wie sie unter anderem bei Gefäßpathologien wie Bluthochdruck und Arteriosklerose vorkommen oder auch bei der Angiogenese nach Gefäßverletzungen. Wie die molekularen Mechanismen im Detail ablaufen und welche weiteren Auswirkungen

5 Diskussion

mechanische Stimulation auf HDMEC hat, beispielsweise auf die Genexpression oder auch auf die Expression anderer intrazellulärer Signalmoleküle, muss noch weiterführend erforscht werden.

Weitere Versuchen könnten durchgeführt werden, in denen zum Beispiel die Gesamtdauer der mechanischen Stimulation alteriert wird. Die Ergebnisse könnten auch mit dem Verhalten anderer Arten von Endothelzellen bei vergleichsweiser mechanischer Stimulation verglichen werden.

Analog zu den aktuellen Entwicklungen in der Forschung, wo das Verhalten von Stammzellen *in vitro* intensiv untersucht wird, um das Wissen für therapeutische Zwecke zu nutzen, könnte auch im Allgemeinen das *in vitro* Verhalten von Endothelzellen wie HDMEC zukünftig noch eine Rolle spielen.

6 Zusammenfassung

1. Zielstellung der Arbeit war die Prüfung einer verstärkten Expression ausgewählter Signal- und Adhäsionsmoleküle in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) nach mechanischer Belastung. Zwei Methoden wurden dabei ausgewählt und deren Ergebnisse verglichen.
2. Zyklische mechanische Stimulation der β 1-Integrine von HDMEC im Magnetfeld führte zu keiner signifikant veränderten Expression von pErk bzw. von pAkt.
3. Zyklische mechanische Dehnung der gesamten Zellen in Silikonkammern im STREX Cell Strain Instrument, auf deren Oberfläche HDMEC über Kollagen verankert wurden, führte zur Stimulation dieser Zellen mit damit einhergehenden zellulären Veränderungen, die in den folgenden Punkten zusammengefasst werden:
4. Im konventionellen Lichtmikroskop war nach mechanischer Stimulation im STREX Cell Strain Instrument eine deutliche Längsausrichtung der Zellen in Streckrichtung zu beobachten.
5. Unter Fluoreszenzmarkierung von VE-Cadherin und Aktin waren im LSM bei zuvor mechanisch stimulierten Zellen gezerzte und zum Teil aufgelöste Zell-Zell-Kontakte sichtbar. Darüber hinaus war eine Längsausrichtung des Aktin-Zytoskeletts parallel zur Streckrichtung beobachtbar.
6. Die fluoreszenzmarkierten Connexin43-Moleküle konzentrierten sich bei den mechanisch gereizten Zellen vornehmlich in den Zellmembranen entlang der noch bestehenden Zell-Zell-Verbindungen.
7. Die mechanische Stimulation der HDMEC führte bei einer Streckung von 10% und 15% der Gesamtlänge der Silikonkammern zu signifikant vermehrter Expression von pAkt.
8. Ein signifikanter Anstieg von pErk wurde bei einer Streckung von 15% nachgewiesen.
9. Die Expression von VE-Cadherin und Connexin43 sank signifikant ab einer Streckung von 5%.
10. Bei einer Streckung von 15% zeigte pCaveolin-1 eine signifikant erhöhte Expression.
11. Die Expression von Src und pSrc blieb unter mechanischer Zellstimulation konstant.
12. Summa summarum hat die mechanische Stimulation von in Silikonkammern verankerten HDMEC eine nachweisbare Wirkung auf die Zellmorphologie und auf die Expression der Signalproteine pAkt und pErk sowie der Adhäsionsproteine VE-Cadherin, Connexin43 und pCaveolin-1.

6 Zusammenfassung

13. Das Reizverhalten von HDMEC bei verschiedenen Intensitäten der mechanischen Stimulation könnte unter anderem zum Verständnis von Pathologien wie Bluthochdruck und dessen Auswirkungen auf Endothelzellen beitragen. Auch zeigen die aktuellen Entwicklungen in der Stammzellforschung, dass das Wissen über das Verhalten von Zellen in vitro für zukünftige Therapiemöglichkeiten von Bedeutung sein kann, wovon auch andere Zellarten wie HDMEC profitieren könnten.

7 Abkürzungsverzeichnis

APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAEC	Bovine aortic endothelial cells
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CD	Cluster of differentiation
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
Cl	Cluster
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECGS/H	Endothelial cell growth supplement/Heparin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
Erk	Extracellular-signal regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FKHRL1	Forkhead human transcription factor like 1
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GDP	Guanosindiphosphat
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosintriphosphat
hbFGF	Human basic fibroblast growth factor
HC	Hydrocortison
HDMEC	Human dermal microvascular endothelial cells

7 Abkürzungsverzeichnis

hEGF	Human endothelial growth factor
hnRNP-K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL1 α	Interleukin-1 α
LSM	Laser Scanning Microscope
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MF	Magnetfeld
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOV	Nephroblastoma overexpressed
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PRAS40	Proline-rich AKT1 substrate 40 kDa
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH-Domäne	Src homology Domäne
Shh	Sonic hedgehog

7 Abkürzungsverzeichnis

SHPS-1	Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1
SHP-2	Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2
SOS	Son of Sevenless
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
VE-Cadherin	Vascular-endothelial Cadherin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VE-PTP	Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase
ZO-1	Zonula occludens-1

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Atmospheric Pressure Plasma Jet, zur Plasmabehandlung der Kulturflächen der Silikonkammern eingesetzt	23
Abbildung 2: Signifikante Verringerung des Wasserkontaktwinkels nach Behandlung der Silikonkammern mit dem Atmospheric Pressure Plasma Jet (*).	24
Abbildung 3 (nach Kasten A et al., J. Cell. Biochem. 111 (2010): 1586-1597): Schema eines Wells mit darin kultivierten Zellen. Koppelung der Beads an die Integrinrezeptoren der Zielzellen (1). Reizbelastung im inhomogenen magnetischen Feld bei 1 Hz, durchschnittlich 15 mT und 0,2 nN pro Bead über 15 min (2).	26
Abbildung 4: Anlage zur Erzeugung eines inhomogenen Magnetfeldes für die mechanische Stimulation der Oberflächenrezeptoren.....	26
Abbildung 5: STREX Cell Strain Instrument zur mechanischen Stimulation von Zellen. Die Zellstimulation wird über zyklische Streckung von im Gerät eingespannten Silikonkammern ermöglicht.....	28
Abbildung 6: STREX Cell Strain Instrument mit eingespannten Silikonkammern, Streckrichtung (Pfeile) der Silikonkammern angedeutet. Die Streckungsintensitäten der Silikonkammern betragen 2%, 5%, 10% und 15% der Gesamtlänge der Kammern. Die Streckreizung erfolgte hierbei zyklisch bei einer Frequenz von 1 Hz, die Dauer eines Streckversuchs betrug 15 min.	28
Abbildung 7: Auswirkung der mechanischen Stimulation von $\beta 1$ -Integrin auf pErk: keine signifikante Veränderung von pErk nach Reiz gegenüber der Kontrollreihe (K=Kontrollzellen; MF=Zellen im Magnetfeld, ohne Beads; Cl=Beadbeclusterte Zellen, nicht dem Magnetfeld ausgesetzt; R=im Magnetfeld gereizte, beadbeschichtete Zellen). n=3. HDMEC. Western Blot. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und nach 6 h.	36
Abbildung 8: Auswirkung der mechanischen Stimulation von $\beta 1$ -Integrin auf pAkt: keine signifikante Veränderung von pAkt nach Reiz gegenüber der Kontrollreihe (K=Kontrollzellen; MF=Zellen im Magnetfeld, ohne Beads; Cl=Beadbeclusterte Zellen, nicht dem Magnetfeld ausgesetzt; R=im Magnetfeld gereizte, beadbeschichtete Zellen). n=3. HDMEC. Luminex Assay. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt nach dem Reiz (0 h), nach 0,5 h, 1 h und nach 6 h.	37
Abbildung 9: Unbehandelte Silikonkammer mit hinzugegebener Kollagen Typ I-Lösung: sichtbar ungleichmäßige Verteilung der Kollagenlösung.....	38
Abbildung 10: Mit dem APPJ über 1 min behandelte Silikonkammer und anschließend hinzugefügte Kollagen Typ I-Lösung: großflächigere Verteilung der Lösung	39
Abbildung 11: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor unbehandelten Silikonkammer.	40

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 12: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.	40
Abbildung 13: HDMEC nach Aussaat und 4 h Inkubation in einer zuvor für 1 min mit dem APPJ behandelten und mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.	40
Abbildung 14: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor unbehandelten Silikonkammer.	41
Abbildung 15: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.	41
Abbildung 16: HDMEC nach Aussaat und 24 h Inkubation in einer zuvor für 1 min mit dem APPJ behandelten und mit 1 ml Kollagen Typ I-Lösung beschichteten Silikonkammer.	42
Abbildung 17: HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz.	43
Abbildung 18: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an.	43
Abbildung 19: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an.	43
Abbildung 20: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C. Doppelpfeil zeigt Streckrichtung an.	44
Abbildung 21: HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz: größtenteils eng anliegende Zellen, Zell-Zell-Kontakte gleichmäßig ausgebildet.	45
Abbildung 22: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 2% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Dehnung der Zellen und des Aktin-Zytoskeletts durch den Streckreiz, weiterhin bestehende gleichmäßige Zell-Zell-Kontakte.	45
Abbildung 23: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellen durch Streckbelastung auseinandergezogen, Zellverbindungen bestehen weiterhin.	46
Abbildung 24: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: stark beanspruchte Zellverbindungen zwischen auseinandergezogenen Zellen.	46
Abbildung 25: HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: stärkere Dehnung der Zellen, Zellverbindungen zwischen auseinandergezogenen Zellen sichtbar.	47

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 26:** HDMEC aus der Kontrollreihe ohne ausgeübten mechanischen Reiz: eng anliegende Zellen, Connexin43 perinukleär und membranständig gleichmäßig verteilt. Grün: Connexin43; rot: Aktin; blau: Zellkerne. 48
- Abbildung 27:** HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 2% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellen größtenteils eng anliegend, Connexin43 perinukleär und membranständig meist gleichmäßig verteilt. 48
- Abbildung 28:** HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 5% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: Zellabstand vergrößert, Anreicherung von Connexin43 perinukleär und Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf noch existierende Zellverbindungen. 49
- Abbildung 29:** HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 10% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: perinukleäre Anreicherung, starke Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf vorhandene Zellverbindungen. 49
- Abbildung 30:** HDMEC nach einem zyklischen Reiz über 15 min mit einer Frequenz von 1 Hz, einer Reizintensität von 15% und anschließender Standzeit von 30 min im Brutschrank bei 37 °C: weitere perinukleäre Anreicherung, starke Konzentrierung des membranständigen Connexin43 auf noch vorhandene Zellverbindungen. 50
- Abbildung 31:** Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pAkt: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 10% (*); Kontrolle und 15% (***) ; 5% und 15% (***) ; 10% und 15% (***) (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). n=10. HDMEC. Luminex Assay. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung. 51
- Abbildung 32:** Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pErk: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 15% (***) ; 2% und 15% (***) ; 5% und 15% (***) ; 10% und 15% (**) (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). n=10. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung. 52
- Abbildung 33:** Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von VE-Cadherin: signifikante Verringerung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 5% (***) ; Kontrolle und 10% (***) ; Kontrolle und 15% (***) (***) $p \leq 0,001$). n=8. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zellyse 30 min nach Streckung. 53
- Abbildung 34:** Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von Connexin43: signifikante Verringerung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 5% (*); Kontrolle und 10% (*); Kontrolle und 15% (***) (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$). n=5. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min.

8 Abbildungsverzeichnis

Frequenz 1 Hz. Zelllyse 30 min nach Streckung.	54
Abbildung 35: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pCaveolin-1: signifikante Erhöhung der gemessenen Intensität zwischen: Kontrolle und 15% (*); 5% und 15% (*) (* $p \leq 0,05$).	55
Abbildung 36: Auswirkung der mechanischen Stimulation von HDMEC im STREX Cell Strain Instrument auf die Expression von pSrc: keine signifikante Veränderung der gemessenen Intensität unter Streckung. n=8. HDMEC. Western Blot. Dauer der Streckung 15 min. Frequenz 1 Hz. Zelllyse 30 min nach Streckung.	56
Abbildung 37: Stark vereinfachte Übersicht über die für diese Untersuchung ausgewählten Proteine und deren funktionelle Bedeutung für die Zelle. Ausgewertet wurden die Signalproteine Erk, Akt und Src, sowie die Adhäsionsproteine Connexin43, VE-Cadherin und Caveolin-1.	57

9 Literaturverzeichnis

Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1301-1312

Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R 3rd, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM, Rosner MR (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* 277: 16733-16743

Aebersold DM, Shaul YD, Yung Y, Yarom N, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2004) Extracellular Signal-Regulated Kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Mol. Cell. Biol.* 24: 10000-10015

Ahluwalia A, Jones MK, Szabo S, Tarnawski AS (2014) Aging impairs transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor in human microvascular endothelial cells: implications for angiogenesis and cell survival. *J. Physiol. Pharmacol.* 65: 209-215

Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P (1996) Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399: 333-338

Angst BD, Marcozzi C, Magee AI (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114: 629-641

Arlan LG, Elder BL, Morgan MS (2009) House dust mite extracts activate cultured human dermal endothelial cells to express adhesion molecules and secrete cytokines. *J. Med. Entomol.* 46: 595-604

Bando H, Tamura N, Kobayashi S, Ohyanagi Hara M, Ichimura Y, Tajima M, Haruta K, Hashimoto H (2003) Endothelial cell-binding antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod. Rheumatol.* 13: 44-49

9 Literaturverzeichnis

Benbrahim A, L'Italien GJ, Kwolek CJ, Petersen MJ, Milinazzo B, Gertler JP, Abbott WM, Orkin RW (1996) Characteristics of vascular wall cells subjected to dynamic cyclic strain and fluid shear conditions in vitro. *J. Surg. Res.* 65: 119-127

Ben-Ze'ev A, Geiger B (1998) Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 629-639

Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C (2001) Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann. NY Acad. Sci.* 947: 93-109

Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, Tavare JM (2002) The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277: 33895-33900

Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ (2000) Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19: 5620-5635

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675

Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249: 64-67

Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM (2004) Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium* 11: 45-57

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868

9 Literaturverzeichnis

- Bull HA, Hothersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM (1996) Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 106: 655-660
- Bustos-Arriaga J, Mita-Mendoza NK, Lopez-Gonzalez M, García-Cordero J, Juárez-Delgado FJ, Gromowski GD, Méndez-Cruz RA, Fairhurst RM, Whitehead SS, Cedillo-Barrón L (2016) Soluble mediators produced by the crosstalk between microvascular endothelial cells and dengue-infected primary dermal fibroblasts inhibit dengue virus replication and increase leukocyte transmigration. *Immunol. Res.* 64: 392-403
- Butkevich E, Hülsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R, Majoul I (2004) Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14: 650-658
- Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF (1998) Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 273: 7201-7204
- Case N, Thomas J, Sen B, Styner M, Xie Z, Galior K, Rubin J (2011) Mechanical regulation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) in mesenchymal stem cells is dependent on Akt protein serine 473 phosphorylation via mTORC2 protein. *J. Biol. Chem.* 286: 39450-39456
- Castiglioni S, Cazzaniga A, Maier JA (2014) Potential interplay between NF κ B and PPAR γ in human dermal microvascular endothelial cells cultured in low magnesium. *Magnes. Res.* 27: 86-93
- Chen J, Fabry B, Schiffrin EL, Wang N (2001) Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1475-1484
- Chen T, Guo ZP, Li MM, Li JY, Jiao XY, Zhang YH, Liu HJ (2011) Tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), an important mediator of endothelial inflammation, is associated with the pathogenesis of Henoch-Schonlein purpura. *Clin. Exp. Immunol.* 166: 64-71

9 Literaturverzeichnis

Chen T, Guo ZP, Wang WJ, Qin S, Cao N, Li MM (2014) Increased serum HMGB1 levels in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Exp. Dermatol.* 23: 419-423

Ciołkiewicz M, Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA (2010) Analysis of correlations between selected endothelial cell activation markers, disease activity, and nailfold capillaroscopy microvascular changes in systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Rheumatol.* 29: 175-180.

Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodríguez Fernández JL, Baribault H, Oshima RG, Adamson ED (1995) Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9161-9165.

Coutu MD, Craig SW (1988) cDNA-derived sequence of chicken embryo vinculin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8535-8539

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241

Desplantez T, Halliday D, Dupont E, Weingart R (2004) Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflugers Arch.* 448: 363-375

Detmar M, Tenorio S, Hettmannsperger U, Ruszczak Z, Orfanos CE (1992) Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 98: 147-153

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12: 3499-3511

9 Literaturverzeichnis

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605

Dragovich MA, Chester D, Fu BM, Wu C, Xu Y, Goligorsky MS, Zhang XF (2016) Mechanotransduction of the endothelial glycocalyx mediates nitric oxide production through activation of TRP channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 311: C846-C853

Edinger AL, Thompson CB (2002) Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol. Biol. Cell* 13: 2276-2288

Eimer W, Niermann M, Eppe MA, Jockusch BM (1993) Molecular shape of vinculin in aqueous solution. *J. Mol. Biol.* 229: 146-152

Elsberger B, Stewart B, Tatarov O, Edwards J (2010) Is Src a viable target for treating solid tumours? *Curr. Cancer Drug Targets* 10: 683-694

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB (2004) Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64: 3892-3899

Eskin S, Ives C, McIntire L, Navarro L (1984) Response of cultured endothelial cells to steady flow. *Microvasc. Res.* 28: 87-94

Galie PA, Nguyen DH, Choi CK, Cohen DM, Janmey PA, Chen CS (2014) Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 7968-7973

Gallant ND, Michael KE, García AJ (2005) Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol. Biol. Cell* 16: 4329-4340

García JI, Zalba G, Detera-Wadleigh SD, de Miguel C (1996) Isolation of a cDNA encoding the rat MAP-kinase homolog of human p63mapk. *Mamm. Genome* 7: 810-814

Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke

9 Literaturverzeichnis

K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E (2004) Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279: 36931-36942

Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE (1995) ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J.* 14: 951-962

Gonzalez FA, Raden DL, Rigby MR, Davis RJ (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett.* 304: 170-178

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65:475-502

Guo D, Chien S, Shyy JY (2007) Regulation of endothelial cell cycle by laminar versus oscillatory flow: distinct modes of interactions of AMP-activated protein kinase and Akt pathways. *Circ. Res.* 100: 564-571

Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid Res.* 39: 369-379

Heo KS, Fujiwara K, Abe J (2014) Shear stress and atherosclerosis. *Mol. Cells* 37: 435-440

Hoffmann G, Schobersberger W, Rieder J, Smolny M, Seibel M, Fürhapter C, Fritsch P, Sepp N (1999) Human dermal microvascular endothelial cells express inducible nitric oxide synthase in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 112: 387-390

Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* 179: 1043-1057

Hunter AW, Barker RJ, Zhu C, Gourdie RG (2005) Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol. Biol. Cell.* 16: 5686-5698

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4: 648-657

Irby RB, Yeatman TJ (2002) Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer Res.* 62: 2669-2674

Ishibe S, Joly D, Liu ZX, Cantley LG (2004) Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Mol. Cell.* 16: 257-267

Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG (2003) Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol. Cell.* 12: 1275-1285

Izard T, Evans G, Borgon RA, Rush CL, Bricogne G, Bois PR (2004) Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature* 427: 171-175

Johnson RG, Meyer RA, Li XR, Preus DM, Tan L, Grunenwald H, Paulson AF, Laird DW, Sheridan JD (2002) Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Exp. Cell Res.* 275: 67-80

Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA (1991) Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4171-4175

Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, Kojic LD, Cox ME, Griffith OL, Chan SK, Jones SJ, Leung SP, Masoudi H, Leung S, Wiseman SM, Nabi IR (2008) Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res.* 68: 8210-8220

Kanda K, Matsuda T (1993) Behavior of arterial wall cells cultured on periodically stretched substrates. *Cell Transplant* 2: 475-484

Kasten A, Müller P, Bulnheim U, Groll J, Bruellhoff K, Beck U, Steinhoff G, Möller M, Rychly J (2010) Mechanical integrin stress and magnetic forces induce biological responses in mesenchymal stem cells which depend on environmental factors. *J. Cell. Biochem.* 111: 1586-1597

Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylänne J, Calderwood DA (2006) The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol. Cell* 21: 337-347

Kilarski WW, Jura N, Gerwins P (2003) Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 291: 70-82

Kim HJ, Yoo HY, Jang JH, Lin HY, Seo EY, Zhang YH, Kim SJ (2016) Wall stretch and thromboxane A₂ activate NO synthase (eNOS) in pulmonary arterial smooth muscle cells via H₂O₂ and Akt-dependent phosphorylation. *Pflugers Arch.* 468: 705-716

Kolahi KS, Mofrad MR (2010) Mechanotransduction: a major regulator of homeostasis and development. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2: 625-639

Kowalczyk AP, Navarro P, Dejana E, Bornslaeger EA, Green KJ, Kopp DS, Borgwardt JE (1998) VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J. Cell Sci.* 111: 3045-3057

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem. J.* 273: 67-72

Lampe PD, Lau AF (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 1171-1186

Le Duc Q, Shi Q, Blonk I, Sonnenberg A, Wang N, Leckband D, de Rooij J (2010) Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* 189: 1107-1115

Lee J, Packard RR, Hsiai TK (2015) Blood flow modulation of vascular dynamics. *Curr. Opin. Lipidol.* 26: 376-383

Lee KH, Bang D, Choi ES, Chun WH, Lee ES, Lee S (1999) Presence of circulating antibodies to a disease-specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells in patients with Behçet's disease. *Arch. Dermatol. Res.* 291: 374-381

Lee KH, Cho HJ, Kim HS, Lee WJ, Lee S, Bang D (2002) Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular endothelial cells stimulated by anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with Behçet's disease. *J. Dermatol. Sci.* 30: 63-72

Lee KH, Chung HS, Bang D, Lee S (1999) Behçet's disease sera containing antiendothelial cell antibodies promote adhesion of T lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med. J.* 40: 152-158

Lee KH, Chung HS, Kim HS, Oh SH, Ha MK, Baik JH, Lee S, Bang D (2003) Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behçet's disease. *Arthritis Rheum.* 48: 2025-2035

Lehoux S, Tedgui A (2003) Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J. Biomech.* 36: 631-43

Levesque MJ, Nerem RM (1985) The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J. Biomech. Eng.* 107: 341-347

Li S, Couet J, Lisanti MP (1996) Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 271: 29182-29190

Li X, Liu C, Li P, Li S, Zhao Z, Chen Y, Huo B, Zhang D (2013) Connexin 43 is a potential regulator in fluid shear stress-induced signal transduction in osteocytes. *J. Orthop. Res.* 31: 1959-1965

Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ (2007) Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature* 447: 1012-1016

Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B, Feldberg E, Geiger B (1997) Expression of the adherens junction protein vinculin in human basal and squamous cell tumors: relationship to invasiveness and metastatic potential. *Hum. Pathol.* 28: 1230-1236

Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z, Sargiacomo M (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* 4: 231-235

Liu X, Pawson T (1994) Biochemistry of the Src protein-tyrosine kinase: regulation by SH2 and SH3 domains. *Recent Prog. Horm. Res.* 49: 149-160

Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG (2002) Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J. Biol. Chem.* 277: 10452-10458

Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S, Bies RD (1997) Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation* 95: 17-20

Melchior B, Frangos JA (2014) Distinctive subcellular Akt-1 responses to shear stress in endothelial cells. *J. Cell Biochem.* 115: 121-129

Meyer RA, Laird DW, Revel JP, Johnson RG (1992) Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J. Cell Biol.* 119: 179-189

Meyer T, Brinck U (1997) Immunohistochemical detection of vinculin in human rhabdomyosarcomas. *Gen. Diagn. Pathol.* 142: 191-198

Miao H, Hu YL, Shiu YT, Yuan S, Zhao Y, Kaunas R, Wang Y, Jin G, Usami S, Chien S (2005) Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations. *J. Vasc. Res.* 42: 77-89

9 Literaturverzeichnis

- Mitra SK, Schlaepfer DD (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 516-523
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV (1995) VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 6: 911-927
- Müller P, Langenbach A, Kaminski A, Rychly J (2013) Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 8: e71283
- Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10339-10343
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell. Biol.* 4: 556-564
- Musil LS, Goodenough DA (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077
- Naruse K, Sai X, Yokoyama N, Sokabe M (1998) Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation. *FEBS Letters* 441: 111-115
- Naruse K, Yamada T, Sai XR, Hamaguchi M, Sokabe M (1998) Pp125FAK is required for stretch dependent morphological response of endothelial cells. *Oncogene* 17: 455-463
- Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U, Vestweber D (2002) VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J.* 21: 4885-4895
- Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ (1997) Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J. Cell Sci.* 110: 1013-1022

Oh ES, Gu H, Saxton TM, Timms JF, Hausdorff S, Frevert EU, Kahn BB, Pawson T, Neel BG, Thomas SM (1999) Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Mol. Cell Biol.* 19: 3205-3215

Ohashi T, Sugaya Y, Sakamoto N, Sato M (2007) Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells. *J. Biomech.* 40: 2399-2405

Ojeda L, Gao J, Hooten KG, Wang E, Thonhoff JR, Dunn TJ, Gao T, Wu P (2011) Critical role of PI3K/Akt/GSK3 β in motoneuron specification from human neural stem cells in response to FGF2 and EGF. *PLoS One* 6: e23414

Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM (2002) Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 105: 431-437

Osaki M, Oshimura M, Ito H (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9: 667-676

Pan J, Yang Q, Shao J, Zhang L, Ma J, Wang Y, Jiang BH, Leng J, Bai X (2016) Cyclooxygenase-2 induced β 1-integrin expression in NSCLC and promoted cell invasion via the EP1/MAPK/E2F-1/FoxC2 signal pathway. *Sci. Rep.* 6: 33823

Panneerselvam M, Patel HH, Roth DM (2012) Caveolins and heart diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 729: 145-156

Parsons JT, Parsons SJ (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 187-192

Pearson GW, Earnest S, Cobb MH (2006) Cyclic AMP selectively uncouples mitogen-activated protein kinase cascades from activating signals. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3039-3047

Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*. 3: 311-320

- Peltier J, O'Neill A, Schaffer DV (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev. Neurobiol.* 67: 1348-1361
- Peng X, Cuff LE, Lawton CD, DeMali KA (2010) Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin. *J. Cell Sci.* 123: 567-577
- Pommerenke H, Schreiber E, Dürr F, Nebe B, Hahnel C, Möller W, Rychly J (1996) Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur. J. Cell Biol.* 70: 157-164
- Ranganathan A, Yazicioglu MN, Cobb MH (2006) The nuclear localization of ERK2 occurs by mechanisms both independent of and dependent on energy. *J. Biol. Chem.* 281: 15645-15652
- Redlitz A, Daum G, Sage E (1999) Angiostatin Diminishes Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinases ERK-1 and ERK-2 in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *J. Vasc. Res.* 36: 28-34
- Remuzzi A, Dewey CF Jr, Davies PF, Gimbrone MA Jr (1984) Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro. *Biorheology* 21: 617-630
- Roche S, Fumagalli S, Courtneidge SA (1995) Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* 269: 1567-1569
- Ruszczak Z, Detmar M, Imcke E, Orfanos C (1990) Effects of rIFN Alpha, Beta, and Gamma on the Morphology, Proliferation, and Cell Surface Antigen Expression of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells In Vitro. *J. Invest. Dermatol.* 95: 693-699
- Sadano H, Inoue M, Taniguchi S (1992) Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 625-630
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD (2014) Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb. Protoc.* 10: doi: 10.1101/pdb.top071795

9 Literaturverzeichnis

Saunders RM, Holt MR, Jennings L, Sutton DH, Barsukov IL, Bobkov A, Liddington RC, Adamson EA, Dunn GA, Critchley DR (2006) Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur. J. Cell Biol.* 85: 487-500

Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270: 16395-16401

Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N (2002) VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9462-9467

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat. Med.* 8: 1145-1152

Shirinsky VP1, Antonov AS, Birukov KG, Sobolevsky AV, Romanov YA, Kabaeva NV, Antonova GN, Smirnov VN (1989) Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. *J. Cell Biol.* 109: 331-339

Shpacovitch VM, Brzoska T, Buddenkotte J, Stroh C, Sommerhoff CP, Ansel JC, Schulze-Osthoff K, Bunnett NW, Luger TA, Steinhoff M (2002) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappaB in human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 118: 380-385

Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R, Lampe PD (2005) Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *J. Biol. Chem.* 280: 30416-30421

Song JW, Munn LL (2011) Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 15342-15347

Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM (2004) Vinculin

modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J. Cell Biol.* 165: 371-381

Swerlick RA, Garcia-Gonzalez E, Kubota Y, Xu YL, Lawley TJ (1991) Studies of the modulation of MHC antigen and cell adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 97: 190-196

Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ (1992) Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 148: 78-83

Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302: 103-106

Tsuda M, Matozaki T, Fukunaga K, Fujioka Y, Imamoto A, Noguchi T, Takada T, Yamao T, Takeda H, Ochi F, Yamamoto T, Kasuga M (1998) Integrin-mediated tyrosine phosphorylation of SHPS-1 and its association with SHP-2. Roles of Fak and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 13223-13229

Twamley-Stein GM, Pepperkok R, Ansorge W, Courtneidge SA (1993) The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7696-7700

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007) Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9: 316-323

Vasile VC, Edwards WD, Ommen SR, Ackerman MJ (2006) Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with reduced expression of vinculin in the intercalated disc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349: 709-715

Viggers RF, Wechezak AR, Sauvage LR (1986) An apparatus to study the response of cultured endothelium to shear stress. *J. Biomech. Eng.* 108: 332-337

9 Literaturverzeichnis

Wang Z, Wang N, Liu P, Peng F, Tang H, Chen Q, Xu R, Dai Y, Lin Y, Xie X, Peng C, Situ H (2015) Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget* 6: 37135-37150

Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID (2007) Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128: 171-182

Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, Roberts JM (2003) Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol. Cell* 12: 381-392

Werdich XQ, Penn JS (2005) Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis* 8: 315-326

Winter J, Wende K, Masur K, Iseni S, Dünnbier M, Hammer MU, Tresp H, Weltmann K-D, Reuter S (2013) Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 46: 295401

Yamaguchi T, Nagao S, Wallace DP, Belibi FA, Cowley BD, Pelling JC, Grantham JJ (2003) Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney Int.* 63: 1983-1994

Yan YX, Gong YW, Guo Y, Lv Q, Guo C, Zhuang Y, Zhang Y, Li R, Zhang XZ (2012) Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One.* 7: e35709

Yancey SB, John SA, Lal R, Austin BJ, Revel JP (1989) The 43-kD polypeptide of heart gap junctions: immunolocalization, topology, and functional domains. *J. Cell Biol.* 108: 2241-2254

Yang L, Fujimoto M, Murota H, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Yamada K, Suzuki K, Nishikawa A, Hosono Y, Yoneda Y, Takehara K, Imura Y, Mimori T, Takeuchi T, Katayama I, Naka T (2015) Proteomic identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a novel cold-associated autoantigen in patients with secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology (Oxford)* 54: 349-358

Yeh M, Gharavi NM, Choi J, Hsieh X, Reed E, Mouillesseaux KP, Cole AL, Reddy ST, Berliner JA (2004) Oxidized phospholipids increase interleukin 8 (IL-8) synthesis by activation of the c-src/signal transducers and activators of transcription (STAT)3 pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 30175-30181

Yokoi K, Hawke D, Oborn CJ, Jang JY, Nishioka Y, Fan D, Kim SW, Kim SJ, Fidler IJ (2011) Identification and validation of SRC and phospho-SRC family proteins in circulating mononuclear cells as novel biomarkers for pancreatic cancer. *Transl. Oncol.* 4: 83-91

Yoshizumi M, Abe J, Tsuchiya K, Berk BC, Tamaki T (2003) Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. *J. Pharmacol. Sci.* 91: 172-176

Yung Y, Yao Z, Hanoch T, Seger R (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J. Biol. Chem.* 275: 15799-15808

Zebda N, Dubrovskiy O, Birukov K (2012) Focal Adhesion Kinase Regulation of Mechanotransduction and its Impact on Endothelial Cell Functions. *Microvasc. Res.* 83: 71-81

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3: 245-252

Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 270: 12665-12669

Ziche M, Morbidelli L (2000) Nitric oxide and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 50: 139-148

Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR (2006) The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16: 453-460

Danksagung

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. Nebe für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation danken.

Herrn Prof. Rychly danke ich für seine hilfreichen Korrekturvorschläge, die er durch seine große Kenntnis auf dem Gebiet geben konnte.

Auch meiner Betreuerin Frau Dr. Müller danke ich für ihren Zuspruch und ihre Geduld ganz herzlich. Sie war jederzeit und in allen Phasen dieser Arbeit an meiner Seite, hat immer wieder mein Interesse und meine Neugier geweckt und mich stets bei der Bearbeitung und Umsetzung des Themas unterstützt.

Ebenfalls möchte ich dem ganzen Forschungsteam des Arbeitsbereiches Zellbiologie danken. Dies betrifft insbesondere auch Frau Seidel, die mir oft genug im Labor weiterhalf, wenn ich Hilfe brauchte. Die nette und inspirative Atmosphäre im Labor habe ich immer sehr geschätzt und genossen.

Auch danke ich meiner gesamten Familie und meinen Freunden, die immer für mich da sind und mich während des Studiums unterstützt und ermuntert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nis-Christian Nissen
Anschrift: Lohmühlenweg 12
18057 Rostock
Geburtsdatum: 17.09.1991
Geburtsort: Heide
Eltern: Wiebke S. Nissen, Lehrerin
Prof. Dr. Nis R. Nissen, Historiker und Autor

Berufserfahrung:

12/2018: 3. Staatsexamen
2017 bis 2018: Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums
10/2017: 2. Staatsexamen
2015 bis 2016: Erasmus-Auslandsaufenthalt in Grenoble, Frankreich
Seit 2014: Doktorand im Arbeitsbereich Zellbiologie der
Universitätsmedizin Rostock
10/2014: 1. Staatsexamen
10/2012: Beginn des Medizinstudiums
09/2011 bis 05/2012: Freiwilliges Ökologisches Jahr
beim Kompetenzzentrum Wasser, Berlin

Schulischer Werdegang:

2002 bis 2011: Werner-Heisenberg-Gymnasium Heide
2008 bis 2009: Austauschjahr auf Hawaii: Kapaa High School
1998 bis 2002: Grundschule Lohe-Rickelshof

Sprachkenntnisse:

Englisch: fließend
Französisch: Unicert B2-Zertifikat
Latein: Latinum

Weitere Qualifikationen:

2012 bis 2016: Mitglied beim Freien Studenten Orchester Rostock
Persönliche Interessen: Klavierspielen, Fußball- und Tennisspielen, Klettern,
Fahrradfahren, Fotografieren, Reisen

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Expression von Signal- und Adhäsionsmolekülen in humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen nach mechanischer Stimulation der Zellen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Rostock, den