

**Proteomanalyse wachsender Kollateralarterien sowie  
migrierender und nicht-migrierender Endothelzellen aus  
der Ratte (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)  
im Vergleich**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie  
der Universität Hamburg

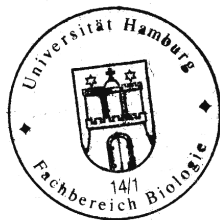
vorgelegt von

**Natalie Obermeyer**

Hamburg, Januar 2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. L. RENWRANTZ  
Tag der Disputation: 04. März 2005

Hamburg, den 21. Februar 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

# I. Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG .....	- 1 -
2.	EINLEITUNG .....	- 3 -
2.0.1	Die Arteriosklerose .....	- 3 -
2.1	MECHANISMEN DES GEFÄßWACHSTUMS.....	- 6 -
2.1.1	Die Vaskulogenese .....	- 6 -
2.1.2	Die Angiogenese .....	- 6 -
2.1.3	Die Arteriogenese .....	- 8 -
2.1.4	Das Zytoskelett.....	- 11 -
2.1.5	Die Zelladhäsion und –migration .....	- 13 -
2.1.6	Das Intermediärfilament Vimentin .....	- 17 -
2.2	ZIEL DER ARBEIT .....	- 19 -
3	MATERIAL UND METHODEN.....	- 20 -
3.1	MATERIAL.....	- 20 -
3.1.1	Gewebeproben .....	- 20 -
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	- 21 -
3.1.3	Puffer und Lösungen .....	- 23 -
3.1.4	Enzyme und Reaktionskits.....	- 25 -
3.1.5	Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper .....	- 25 -
3.1.6	Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör .....	- 26 -
3.2	METHODEN .....	- 27 -
3.2.1	Ligatur der Rattenhinterläufe .....	- 27 -
3.2.2	Entnahme der Kollateralarterien und Kontrollgefäße.....	- 27 -
3.2.3	Herstellung von Proteinextrakten aus Gefäßen .....	- 28 -
3.2.4	2D-Elektrophorese .....	- 29 -
3.2.5	Massenspektrometrie.....	- 30 -
3.2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	- 30 -
3.2.7	SDS-PAGE .....	- 30 -
3.2.8	Western Blot-Analysen .....	- 31 -
3.2.9	Kulturmedien .....	- 31 -
3.2.10	Kultur und Subklonierung der Endothelzellen .....	- 31 -
3.2.11	Kultur von RHE-A und RHE-neg Zellen .....	- 32 -
3.2.12	Charakterisierung der RHE-A und RHE-neg Zellen: FACS-Analysen .....	- 32 -
3.2.13	Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE-A und RHE-neg Zellen ..	- 33 -
3.2.14	Bestimmung der Proliferationsrate der Zelllinien.....	- 34 -
3.2.15	Time-Lapse Videomikroskopie.....	- 35 -
3.2.16	Daten-Analyse.....	- 35 -
3.2.17	siRNA-Transfektion.....	- 35 -
3.2.18	Migrationsanalyse mit der AC96 Boyden Kammer (NeuroProbe).....	- 37 -

---

4	ERGEBNISSE .....	- 38 -
4.1	DAS IN VIVO-MODELL: AUSBILDUNG VON KOLLATERALARTERIEN IM RATTENHINTERLAUF .....	- 38 -
4.1.1	<i>Induktion der Arteriogenese im Rattenhinterlauf durch Ligatur der Femoralarterie.</i> .....	- 38 -
4.1.2	<i>Vergleich des Proteinexpressionsmusters von Kollateral- bzw. Kontrollgefäß- Extrakten.....</i>	- 39 -
4.2	DAS IN VITRO MODELL: CHARAKTERISIERUNG DER ENDOTHELZELLINIEN .....	- 42 -
4.2.1	<i>RHE-A und RHE-neg Zellen: zwei Phänotypen.....</i>	- 42 -
4.2.2	<i>Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE-A und RHE-neg Zellen .....</i>	- 43 -
4.2.3	<i>Vergleich des Migrationsvermögens beider Zelllinien .....</i>	- 46 -
4.2.4	<i>Vergleich der proliferativen Aktivität beider Zelllinien .....</i>	- 48 -
4.2.5	<i>Vergleich des Protein-Expressionsmusters von RHE-A und RHE-neg Zellen: Die 2D-Elektrophorese .....</i>	- 50 -
4.2.6	<i>Unterschiede in der Vimentin-Expression von RHE-A und RHE-neg Zellen.....</i>	- 53 -
4.2.7	<i>Etablierung der Transfektion von RHE-A Zellen mit siRNA .....</i>	- 54 -
4.2.8	<i>Effekt der Vimentin-Suppression auf das Migrationsverhalten von RHE-A Zellen.....</i>	- 56 -
4.2.9	<i>Effekt der Vimentinsuppression auf die Zellproliferation .....</i>	- 59 -
5	DISKUSSION .....	- 62 -
5.1	VERGLEICH DER PROTEINEXPRESSION IN KOLLATERALEN UND KONTROLLGEFÄßEN.....	- 62 -
5.1.1	<i>Die Femoralarterien-Ligatur im Rattenmodell .....</i>	- 62 -
5.1.2	<i>Proteinexpressionsstudien mit der 2D-Elektrophorese .....</i>	- 63 -
5.1.3	<i>Differenzielle Expression von Vimentin in Kollateralen und Kontrollen .....</i>	- 66 -
5.2	DIE ANALYSE DER PROTEINEXPRESSION IM IN VITRO MODELL.....	- 69 -
5.2.1	<i>Warum sind Endothelzellen als in vitro Modell sinnvoll?.....</i>	- 69 -
5.2.2	<i>Das in vitro Modell: Endothelzelllinien aus dem Rattenherzen .....</i>	- 70 -
5.2.3	<i>Vimentinsuppression in RHE A Zellen durch siRNA Transfektion .....</i>	- 72 -
5.2.4	<i>Die Funktion von Vimentin bei der Endothelzellmigration .....</i>	- 74 -
5.2.5	<i>Der Einfluss von Vimentin auf die Proliferation von Endothelzellen .....</i>	- 75 -
5.3	AUSBLICK.....	- 77 -
6	LITERATUR .....	- 79 -

## II. Abkürzungsverzeichnis

Ang	Angiotensin
bFGF	basic fibroblast growth factor
Cdc	Zyclin-abhängige Kinase
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserum-Albumin
CRP	C-reaktives Protein
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAK	Fokale Adhäsions -Kinase
FCS	fötale Kälberserum
GAP	GTPase activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GDP	Guanin Diphosphat
GTP	Guanin Triphosphat
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol Trisphosphat
kDa	Kilodalton
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate buffered saline
PIP	Phosphoinositolphosphat
PKC	Proteinkinase C
RHE	Rattenherzendothel
siRNA	small interfering ribonuclease
TEMED	Tetramethylethyldiamin
VCAM	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

# 1. Zusammenfassung

Arteriosklerotische Gefäßveränderungen führen zu Beeinträchtigungen der Hämodynamik. Wird ein Blutgefäß infolge einer Plaqueruptur verschlossen, wirkt eine verstärkte Schubspannung auf umliegende Anastomosen. Aus einigen dieser Anastomosen entwickeln sich daraufhin natürliche Umgehungskreisläufe – die Kollateralarterien. Die Ausbildung dieser kompensatorischen Gefäße verläuft sehr schnell und in zwei Phasen. Ein bis drei Tage post Okklusion findet eine proliferative Phase statt, in der Gefäßzellen starke mitotische Aktivität zeigen. Dann schließt sich von Tag 3-21 eine Remodeling-Phase an, in der das neue Gefäß einen intensiven Umbau erfährt, der zur Ausbildung der typischen Korkenzieher ähnlichen Struktur führt.

Damit derartige Reaktionen hervorgerufen werden können, ist die Übersetzung der auf die Gefäßzellen einwirkenden physikalischen Kraft auf eine biochemische Ebene in den Zellen notwendig. Auf veränderte biochemische Informationen antworten Zellen wiederum mit mechanischen Vorgängen wie z.B Migration oder Proliferation.

In der vorliegenden Arbeit werden Proteinexpressionsstudien von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen unter Verwendung der zweidimensionalen Gelelektrophorese dargestellt. Mit dieser Methode konnte ein in Kollateralen stark hochreguliertes Protein ausfindig gemacht werden, welches sich bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse als das Intermediärfilament Vimentin identifizieren ließ.

Weiterhin wird in dieser Arbeit die Generierung eines in vitro Modellsystems vorgestellt, das die verschiedenen Phasen des Kollateralwachstums reflektieren kann. Dieses setzt sich aus zwei subklonierten Endothelzelllinien aus dem Rattenherzen zusammen. Eine dieser Zelllinie lässt sich durch eine sehr starke proliferative Aktivität charakterisieren, während die andere einen vorwiegend migrierenden Phänotyp aufzeigt. Proteinexpressionsstudien der Zellen ergaben, dass auch in diesem Fall die Vimentinkonzentration unterschiedlich war. Im migrierenden Zelltyp erwies sich die Vimentinexpression als wesentlich höher als im proliferierenden Zelltyp. Die Erkenntnis, dass sowohl in Kollateralarterien als auch in migrierenden Endothelzellen die Vimentinexpression im Vergleich zu

Kontrollen bzw. proliferierenden Endothelzellen maßgeblich erhöht ist, gab den Anlass zu einer vertieften Analyse der Funktion des Strukturproteins. Es sollte herausgefunden werden, ob Vimentin einen Einfluss auf die Signaltransduktion hat, die dazu führt, dass biochemische Signale in einer Zelle mechanische Reaktionen, wie z.B. die Zellmigration, auslösen.

Mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode konnte die Vimentinexpression in migrierenden Endothelzellen erfolgreich supprimiert werden. Die Unterdrückung der Vimentinexpression führte unter anderem zu einer drastischen Reduktion des Migrationsvermögens (-50%) der Endothelzellen. Dies konnte sowohl durch videomikroskopische Aufnahmen als auch anhand von Boyden Kammer Experimenten gezeigt werden.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal bewiesen werden, dass das Intermediärfilament Vimentin maßgeblich an der Migration von Endothelzellen beteiligt ist. Folglich beeinflusst Vimentin die Übersetzung biochemischer Stimuli in eine mechanische Reaktion von Endothelzellen.

In weiterführenden Studien soll anhand von RNA-Interferenz-Experimenten in vivo herausgefunden werden, ob Vimentin auch beim Kollateralwachstum funktionell bedeutsam ist. Insbesondere soll untersucht werden, ob Vimentin ebenfalls die entgegengesetzte Informationsweiterleitung, d.h. die Transduktion physikalischer Kräfte, die beispielsweise bei erhöhtem Scherstress auf Zellen einwirken, in biochemische Vorgänge vermitteln kann.

## 2. Einleitung

### 2.0.1 Die Arteriosklerose

Die Folgekrankheiten der Arteriosklerose wie z.B. die koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt oder Schlaganfall, sind trotz zahlreicher Forschungsarbeiten heutzutage noch immer die häufigste Todesursache in den westlichen Staaten.

Die Risikofaktoren für die Ausbildung einer Arteriosklerose sind gut bekannt: Als gesicherte Risikofaktoren gelten Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas, eine positive Familienanamnese und ungenügende körperliche Betätigung. Weitere potentielle Risikofaktoren wie Hypertriglyzeridämie, eine überhöhte Konzentration an Lipoprotein, Homocystein, c-reaktivem Protein (CRP) oder Fibrinogen im Blut, sowie chronische Chlamydien- oder *Helicobacter pylori* Infektionen werden zur Zeit näher analysiert ([www.medicine-worldwide.de](http://www.medicine-worldwide.de)).

Humane Koronararterien weisen eine typische trilaminare Struktur auf. Die innerste, an das Gefäßlumen angrenzende Schicht, besteht aus einer Monolayer von Endothelzellen, die direkt mit dem Blut in Kontakt treten. An die Endothelschicht grenzt die Lamina elastica interna, die aus einer mit glatten Muskelzellen durchsetzten Bindegewebsschicht besteht. Endothelschicht und Lamina elastica interna bilden zusammen die sogenannte Intima. Darunter befindet sich eine dicht gepackte Schicht aus glatten Muskelzellen, an die sich wiederum die Lamina elastica externa anschließt. Diese beiden Schichten bezeichnet man als Media. Die Media ist in eine Elastin und Kollagen reiche Matrix, die Adventitia, eingebettet.

Die Entstehung von Atheromen wurde vielfach untersucht und ist in (Libby, 2002) zusammengefasst:

Die Bildung arteriosklerotischer Plaques wird vor allem von einer Rekrutierung von Entzündungszellen und der Ausbildung eines Lipidkerns charakterisiert. Es wird davon ausgegangen, dass das Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mit großer Wahrscheinlichkeit an der Leukozyten-Rekrutierung beteiligt ist. VCAM-1 bindet vorzugsweise Monozyten und T-Lymphozyten und damit beide Arten von Leukozyten, die in entstehenden Atheromen vorkommen.

Monozyten, die über Adhäsionsmoleküle (VCAM-1) an Endothelzellen gebunden sind, wandern dann entlang eines Chemokin-Gradienten (meist das monocyte chemoattractant protein-1 oder MCP-1) durch die Endothelzellschicht hindurch in



die Intima hinein. Dort angekommen differenzieren die Monozyten zu Makrophagen. Makrophagen haben die Besonderheit bestimmte Lipoproteinrezeptoren zu exprimieren, die sogenannten Scavenger-Rezeptoren, die modifizierte (oxidierte oder glykosylierte) Lipoproteine binden. Die modifizierten Lipoproteine werden internalisiert und das auf diese Weise in die Zelle transportierte Cholesterin akkumuliert in zytoplasmatischen Lipidtröpfchen. Dies führt zur Ausbildung einer, für atherosklerotische Läsionen typischen, Schaumzelle. Schaumzellen sezernieren wiederum Sauerstoffradikale und inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  und Tumor-Nekrosis-Faktor- $\alpha$ , die die Expression von VCAM-1 in Endothelzellen induzieren und die Entzündungsreaktion in der Läsion fortschreiten lassen. Weiterhin werden Metalloproteasen freigesetzt, die die extrazelluläre Matrix degradieren und damit die fibröse Kappe des arteriosklerotischen Plaques zerstören können. Ebenfalls von Makrophagen exprimierte Gewebefaktoren geraten somit in Kontakt mit dem Blut, was zur Ausbildung von Thromben führt, die schließlich einen akuten Arterienverschluss auslösen. Ein akutes Ereignis wird verhindert, wenn es infolge einer Reduktion des Lipoproteingehaltes und einer Verdickung der fibrösen Kappe zur Stabilisierung des Plaques kommt.

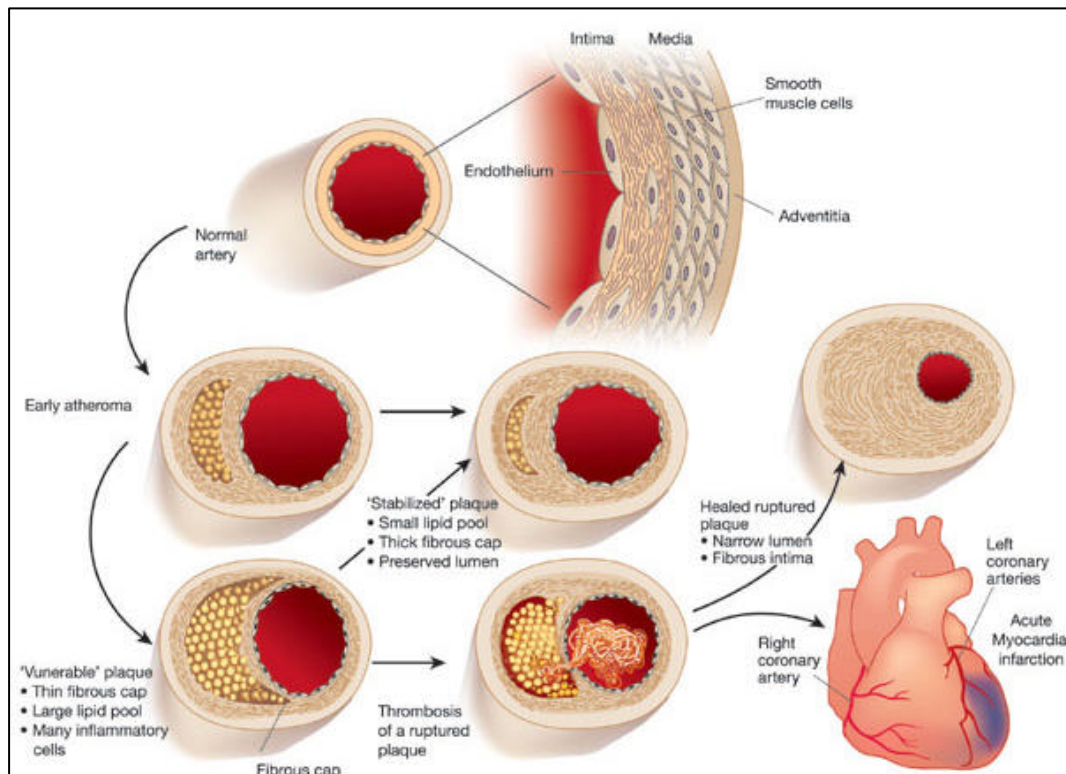


Abbildung 2.1:

Schematische Darstellung der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques. In der frühen Arteriosklerose kommt es durch Rekrutierung von Entzündungszellen und Internalisierung von Lipoproteinen zur Ausbildung eines Lipidkerns in der Arterienwand. Durch fortschreitende Entzündungsreaktionen und Expression von Proteasen kann der Lipidkern wachsen und die schützende fibröse Kappe, die die Läsion stabilisiert, zerstört werden. Erfolgt eine Ruptur des Plaques, geraten von Makrophagen sezernierte Gewebefaktoren in das Blut und lösen die Bildung eines Thrombus aus, was wiederum zu einem akuten Myokardinfarkt führen kann. Kann der Plaque stabilisiert werden, kommt es durch Akkumulation von glatten Muskelzellen zu einer Gefäßstenose und durch den eingeschränkten Blutfluss zu Symptomen wie Angina pectoris. Ein akutes Ereignis kann jedoch verhindert werden. (Quelle: Libby, Nature 2002)

Die therapeutische Intervention ist zurzeit die einzige Möglichkeit Gefäßstenosen erfolgreich zu behandeln. Jeder Organismus verfügt jedoch über die Fähigkeit neue Blutgefäße eigenständig auszubilden. Neben der Entstehung primärer Gefäße während der Embryonalentwicklung (Vaskulogenese) findet im adulten Organismus eine Gefäßentwicklung statt, durch die in der Umgebung eines stenosierten Gefäßes kompensatorische Umgehungskreisläufe gebildet werden können. Hierin liegt der Ansatz zu einer möglichen endogenen Therapie begründet. Im Folgenden werden die verschiedenen Mechanismen des Gefäßwachstums vorgestellt.

## **2.1 Mechanismen des Gefäßwachstums**

### **2.1.1 Die Vaskulogenese**

Die Vaskulogenese ist die embryonale und damit die früheste Form des Gefäßwachstums. Sie beschreibt die Ausbildung eines primitiven kapillaren Netzwerks aus Hämangioblasten. Diese Zellen verwachsen zu Clustern, die als Blutinseln bezeichnet werden. Die inneren Zellen dieser Blutinseln differenzieren zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, während sich die äußere Zellschicht zu primitiven Endothel-Vorläuferzellen umwandelt (Flamme et al., 1997). Die Entscheidung in welche Richtung die Differenzierung geht, wird von verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren wie VEGF (Vascular endothelial growth factor), VEGF-Rezeptor 2 und bFGF (basic fibroblast growth factor) beeinflusst (Ferrara, 1999; Shalaby et al., 1997) (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Der VEGF-R2 wird dabei in hämatopoetischen Vorläuferzellen, nicht aber in Endothel-Vorläuferzellen herunterreguliert. Das Zusammenwachsen der primitiven Endothelzellen führt schließlich zur Ausbildung eines primären Plexus. Dieser primäre Plexus entwickelt sich durch neu sprießende Kapillaren (Angiogenese) und den Einzug bereits bestehender Gefäße (Intususseption) weiter zu einem Netzwerk von Kapillaren, das das gesamte Myokard durchspannt (Risau, 1997).

Das arterielle und das venöse System trennen sich offenbar schon sehr früh, wobei das ursprünglich bei der Neuritenaussprossung gefundene Ephrin B2 Protein ausschließlich auf arteriellen Gefäßen zu finden ist, während sein Rezeptor Eph B4 nur auf venösen Gefäßen vorkommt (Adams et al., 1999). Den Anschluss an die Aorta findet das kapillare Netzwerk erst kurz vor der Geburt. Durch die Verbindung entsteht eine starke Veränderung der hämodynamischen Situation in den Gefäßen, die mit einem dramatischen Druckanstieg im arteriellen Teil des Plexus einhergeht. Dieser Druck scheint zu einer Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen zu führen, die die Arterialisierung der Gefäße vollendet.

### **2.1.2 Die Angiogenese**

Der Ausbildung des primären Plexus während der Vaskulogenese folgt dessen Expansion durch die Entwicklung neuer Kapillaren aus präexistierenden Gefäßen. Dieser als Angiogenese bezeichnete Vorgang kommt in zwei unterschiedlichen

Formen vor. Zum einen können Kapillaren aus vorbestehenden Gefäßen sprießen („sprouting angiogenesis“). Hierbei wird die extrazelluläre Matrix zunächst proteolytisch abgebaut, um Platz zu schaffen für die neu wachsenden Gefäße. Nachfolgend migrieren und proliferieren chemotaktisch angelockte Endothelzellen, formen ein Lumen und bilden ein funktionelles Endothel aus (Risau, 1997) (Folkman, 1982). Zum anderen kann die Teilung bereits bestehender Gefäße durch den Einzug von Säulen aus glatten Muskelzellen oder transendothelialer Brücken zur Ausweitung des kapillaren Netzwerks führen („non-sprouting“ Angiogenese oder Intussuseption“) (Risau, 1997) (Carmeliet, 2000).

Die Angiogenese ist nicht nur bei der Embryonalentwicklung von Bedeutung, sondern auch im erwachsenen Organismus z.B. im Falle der Wundheilung oder in der Schwangerschaft. Diese physiologische Angiogenese läuft streng reguliert ab. Wird die Kontrolle außer Kraft gesetzt, kann es zur pathologischen Angiogenese kommen, die wesentliche Auswirkungen u.a. auf Tumorwachstum, Metastasierung, rheumatische Arthritis und Retinopathien hat (Buschmann and Schaper, 1999).

Als primärer Stimulus für angiogenetisches Gefäßwachstum wurde Hypoxie identifiziert. Die Sauerstoffversorgung der Zellen wird durch einfache Diffusion von Sauerstoff aus dem Blut in die Zellen gewährleistet. Wird diese durch pathologische Vorgänge wie Gefäßstenosen unterbrochen, gerät das von dem entsprechenden Gefäß versorgte Gewebe in eine Sauerstoffschuld (Ischämie). Infolge dessen kommt es zur verstärkten Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF -1 (hypoxia inducible factor 1), der wiederum in kürzester Zeit den „Vascular endothelial growth factor“ VEGF sowie NO-Synthasen induziert. VEGF ist dafür bekannt sowohl physiologische als auch pathologische Angiogenese zu stimulieren (Carmeliet, 2003) (van Royen et al., 2001).

Eingeleitet wird die Angiogenese durch eine Vasodilatation, die durch Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) (bei pathologischer Angiogenese) ausgelöst werden kann. Die Einwirkung von VEGF erhöht die Durchlässigkeit eines Gefäßes, die eine Voraussetzung für die Aussprossung einer neuen Kapillare ist. Angiopoetin 1 (Ang 1) ist ein Inhibitor vaskulärer Permeabilität und hat damit antagonistische Eigenschaften zum VEGF.

Die Möglichkeit der Endothelzellen zu proliferieren und sich von ihrem residenten Ort fortzubewegen bedingt deren Herauslösung aus dem Zellverband und dem

extrazellulären Gewebe. Diese Destabilisierung des Gefäßes wird zum einen durch Angiopoetin 2, das den Abbau der schützenden Schicht aus glatten Muskelzellen vermittelt, und zum anderen durch Proteinase wie Matrix-Metalloproteinasen, Plasminogen-aktivierte Proteasen, Chymasen oder Heparinasen, die Matrix-Moleküle abbauen und Wachstumsfaktoren wie bFGF oder VEGF aktivieren, bewerkstelligt (Carmeliet, 2000). Im Anschluss an die proteolytischen Prozesse haben die Endothelzellen ausreichend Platz zu proliferieren, in Richtung des chemotaktischen Signals zu migrieren und sich schließlich zu neuen Kapillaren zu formieren.

### **2.1.3 Die Arteriogenese**

Die Fähigkeit des menschlichen Organismus (drohende) Gefäßverschlüsse mit der Ausbildung natürlicher Umgehungskreisläufe zu kompensieren, wurde bereits im 18. Jahrhundert von dem schottischen Chirurgen John Hunter genutzt. Er behandelte Aneurysmata in Extremitäten, indem er das Gefäß oberhalb des Aneurysmas ligierte, so dass sich mit der Zeit Kollateralarterien bildeten und die Gefäßaussackung schließlich aus dem Kreislauf ausgeschlossen werden konnte. Damit war die erste therapeutische Angiogenese bzw. Arteriogenese vollbracht. (Kobler, 1960)

Zur Behandlung von Gefäßverschlüssen kommen heute hauptsächlich invasive Therapien wie Ballondilatationen, Stent-Implantationen und Bypass-Operationen zum Einsatz. Obwohl Dank dieser Methoden die Mortalität der koronaren Herzkrankheit wesentlich gesenkt werden konnte, bleiben nicht unerhebliche Restrisiken bestehen. Es sind nur die Gefäße dilatierbar, die auch mit einem Führungsdraht erreicht werden können. Infolge der großen Gefäßtraumata, die während einer Dilatation entstehen, kommt es nicht selten zu Restenosen (6-30%) (Lau et al., 1999) (Rubartelli et al., 1998). Eine erfolgreiche Bypass-Operation wird limitiert durch die beschränkte Anzahl und Haltbarkeit der Grafts.

Die Möglichkeit durch verstärkte Proliferation von Kollateralarterien eine natürliche Revaskularisation wieder herzustellen, stellt daher eine interessante Alternative zu den invasiven Therapien dar.

Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass die Ausbildung von Kollateralen ein angiogenetischer Prozess ist. Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass sich die Entwicklung der Umgehungskreisläufe in mehreren Punkten

von der Angiogenese unterscheidet. Zunächst sind Kollateralarterien keine neu sprießenden Kapillaren, sondern sie entstehen durch massive Proliferation konkreter präexistierender Anastomosen (Schaper and Ito, 1996). Im Gegensatz zur Angiogenese, bei der Hypoxie als primärer Stimulus identifiziert werden konnte und die durch Hypoxie-abhängige Faktoren wie HIF-1 und VEGF induziert wird (Risau, 1997; Shweiki et al., 1992), läuft die Entwicklung der Kollateralarterien im nicht-ischämischen Gebiet ab und ist auch nicht durch hypoxische Faktoren induzierbar. Als primärer Stimulus wird hier eine verstärkte Schubspannung diskutiert, die mit der infolge der Ligation des Versorgungsgefäßes erhöhten Blutflussgeschwindigkeit einhergeht. Die verstärkte Schubspannung wirkt auf die präexistierenden Anastomosen, die nun eine Verbindung zwischen einem Bereich hohen Blutdrucks und einem Gebiet mit niedrigem Blutdruck herstellen (Schaper and Pasyk, 1976). Dabei reagieren nur bestimmte Anastomosen auf den Stimulus, während andere passiv bleiben (Herzog et al., 2002).

Experimente am Hinterlauf von Kaninchen, denen die Arteria femoralis ligiert wurde zeigten, dass die Ausbildung der Kollateralen ausschließlich im Oberschenkel, also im normoxischen Bereich erfolgt. Die Sprossung neuer Kapillaren beschränkt sich dagegen auf das ischämische Gebiet im Unterschenkel. Das Kollateralwachstum verläuft mit einer maximalen Proliferation 3 Tage post Okklusion wesentlich schneller als das Sprossen der Kapillaren. Die Kapillarsprossung lässt erst nach 7 Tagen das Proliferationsmaximum erkennen (Ito et al., 1997).

Ein weiterer Unterschied besteht im histologischen Aufbau der Gefäße. Angiogenetische Kapillaren entstehen durch proliferierende und migrierende Endothelzellen, die sich zu einem neuen Tubus formieren. Eine stabilisierende Schicht aus glatten Muskelzellen fehlt in diesen Kapillaren. Daher sind sie wenig widerstandsfähig, empfindlich gegenüber Hypoxie und Schubspannung und können keinem stärkeren Blutfluss standhalten (Buschmann and Schaper, 1999). Kollateralarterien sind dagegen sowohl mit einer Endothelschicht, einer lamina elastica interna als auch mit ein bis zwei stabilisierenden Schichten aus glatten Muskelzellen ausgestattet (Longland, 1953). Sie können zwar aufgrund ihrer geringen Größe nicht unmittelbar die basale Perfusion wieder herstellen, ihre Beschaffenheit erlaubt jedoch eine starke Proliferation der Gefäße und eine dramatische Vergrößerung des Lumens. Infolge dessen kann die Perfusion in das

ischämische Gebiet zumindest teilweise wieder ermöglicht werden (Buschmann and Schaper, 1999)).

An den beschriebenen Beispielen wird deutlich, dass es sich bei der Entstehung von Kollateralarterien nicht um Angiogenese handelt, und dass dieses Phänomen seine eigene Bezeichnung verdient. Daher wurde von (Ito et al., 1997) der Begriff der „Arteriogenese“ geprägt, um das Kollateralwachstum von der Angiogenese und der embryonalen Vaskulogenese zu unterscheiden. Weiterhin wird deutlich, dass nur die Kollateralarterien als potentielle „natürliche Bypässe“ dienen können, um bei einem (drohenden) Verschluss eines Versorgungsgefäßes das betroffene ischämische Gebiet in einem adäquaten Zeitraum zu reperfundieren.

Die Arteriogenese ist ein Prozess, der in mehreren Phasen verläuft. In (Scholz et al., 2000) wird das Kollateralwachstum in Initiation, Proliferation, Synthese/Migration und Reifung unterteilt. Die Initiation beginnt Minuten nach der Okklusion des Versorgungsgefäßes mit der Aktivierung von Endothelzellen durch verstärkte Schubspannung in den Anastomosen. Die Aktivierung führt zu einer Sezernierung von MCP-1, einer verstärkten Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM und infolge dessen zur Rekrutierung von Monozyten. Diese Entzündungsreaktion führt zur weiteren Freisetzung von MCP-1, das wiederum weitere Monozyten anlockt. Die Phase der Proliferation erfolgt 1-3 Tage post Okklusion. In dieser Zeit wandeln sich glatte Muskelzellen vom kontraktile in den synthetischen Phänotyp um und es wird die maximale mitotische Aktivität von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten erreicht. Es schließt sich die Synthese/Migrations- Phase an, die 3-14 Tage post Okklusion stattfindet. Hier ist die proliferative Aktivität der Zellen wieder rückläufig und wird durch synthetische und proteolytische Aktivität von glatten Muskelzellen abgelöst. Die Lamina elastica interna wird teilweise abgebaut, um den Umbau des Gefäßes zu ermöglichen. Die Rekrutierung von Monozyten wird eingestellt. Schließlich, Tag 14-21 post Okklusion, wird die Reifung beschrieben, in der es nur noch geringe proliferative, migratorische und proteolytische Aktivität gibt und sich glatte Muskelzellen wieder vom synthetischen in den kontraktile Phänotyp umwandeln.

In neueren Studien wird das Kollateralwachstum als ein biphasischer Prozess beschrieben, der infolge einer Okklusion mit einer massiven Proliferation der

Zellen beginnt. Die proliferative Phase wird nach einer Woche von einem intensiven Remodeling abgelöst, welches zur Ausbildung einer Neointima und einer drastischen Verdickung der Gefäßwand führt (Herzog et al., 2002). (Khmelewski et al., 2004) konnten zeigen, dass die Makrophagenakkumulation während der proliferativen Phase des Kollateralwachstums unabhängig von der Rekrutierung zirkulierender Monozyten erfolgt. Vielmehr führen die Teilung residenter Makrophagen sowie die Differenzierung gewebständiger Vorläuferzellen zur lokalen Erhöhung der Makrophagenanzahl.

In diesem Kapitel wurde u.a. beschrieben, dass infolge einer Gefäßokklusion eine erhöhte Schubspannung auf die umliegenden Gefäße einwirkt und dass diese Schubspannung die Ausbildung von Kollateralarterien stimuliert. Hierbei stellt sich die Frage, wie äußere mechanische Kräfte (wie die Schubspannung) in biochemische Prozesse umgewandelt werden können, die ihrerseits wiederum Proliferation und Migration von Gefäßzellen auslösen. Eine mögliche Antwort darauf geben die Arbeiten von Donald Ingber, nach denen das Zytoskelett sowohl die Übersetzung von physikalischen Einflüssen in intrazelluläre Signale als auch von chemischen Signalen in mechanische Reaktionen der Zelle übernimmt (Ingber, 2003a; Ingber, 2003b). Um die zytoskeletäre Verbindung zwischen intrazellulären und extrazellulären Bereichen besser zu verstehen, wird im Folgenden der Aufbau des Zellgerüsts näher beschrieben.

#### **2.1.4 Das Zytoskelett**

Eukaryotische Zellen besitzen ein Gerüst aus verschiedenen Proteinfilamenten, das bestimmte Eigenschaften der Zellen wie Formgebung, innere Stabilität, intrazellulären Transport, Kontraktilität und Zellteilung gewährleistet. Die Proteinfilamente bestehen aus drei Komponenten: Mikrotubuli, Mikrofilamente und Intermediärfilamente. Die Mikrotubuli sind 25 nm dicke, unverzweigte, hohle Strukturen aus Heterodimeren von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Sie dienen der Gestaltgebung der Zelle und als Gleitschienen für intrazelluläre Bewegungsabläufe wie z.B. dem Vesikeltransport.

Die 6 nm dicken Mikrofilamente stellen eine weitere Filamentform dar. Der Hauptbestandteil der Mikrofilamente ist Aktin. Aktin ist in der monomeren Form ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa, welches mit hoher



Affinität zu langen, fädigen Strukturen polymerisiert, die eine helikale Struktur annehmen. Die Ausbildung dieser Polymere ist reversibel und gerichtet. Das bedeutet, die Polymere wachsen in eine bestimmte Richtung, welches Plus-Ende genannt wird. Das Minus-Ende liegt meist in der Plasmamembran verankert vor. Der dynamische Auf- und Abbau der Aktin-Filamente unterliegt einer strengen Regulation, die medikamentös beeinflusst werden kann (Zellgifte).

Aktin-Filamente können mit Hilfe von Aktin-Bindeproteinen wie Formin quervernetzt werden und sich somit zu stabileren Bündeln formieren.

Mikrofilamente haben vielfältige Funktionen. Im Zusammenspiel mit Myosin wird die Zellkontraktion ermöglicht, die bei Vorgängen wie der Muskelkontraktion, Zellteilung oder Schließung des Neuralrohrs in der Embryogenese von Bedeutung ist.

Weiterhin entstehen lokale Ausformungen der Zelle über Mikrofilamente. Bei der Ausbildung von interzellulären Verbindungen wie den Gürteldesmosomen beobachtet man diese, sowie in Form von Mikrovilli. Bei der Zellmigration bilden sie sich als flächige Fortsätze (Lamellipodien) und/oder als schmale, fingerartige Ausbuchtungen (Filopodien) aus dem Leitsaum aus.

Die variabelste Variante der Proteinfilamente sind die Intermediärfilamente. Sie werden gewebs- und zellspezifisch exprimiert, dienen aber einheitlich der mechanischen Festigung. Dies wird am Beispiel der Keratin-Filamente in Epithelzellen besonders deutlich, wenn man bedenkt, dass diese Zellen in verhornter Form Bestandteil von Haaren und Fingernägeln sind.

Weiterhin stabilisieren Intermediärfilamente interzelluläre Kontakte wie Punktdesmosomen und Zell-Matrix-Verbindungen wie Hemidesmosomen.

Die Bausteine der Intermediärfilamente bilden alle Dimere mit einem stabähnlichen,  $\alpha$ -helikalen Mittelstück aus. Die Dimere lagern sich in antiparalleler Ausrichtung zu Tetrameren zusammen, die sich wiederum zu sogenannten Protofilamenten staffeln. Acht Protofilamente verbinden sich jeweils zu einem Intermediärfilament.

Neben dem Keratin findet man weitere Intermediärfilamente am Rande des Zellkerns, der innenseitig durch eine aus Laminen aufgebaute Kernlamina verstärkt wird. In Neuronen befinden sich Neurofilamente, die aus unterschiedlichen Bausteinen gebildet werden können (Koolman, 1998)

(Plattner, 2002). Auf das für Zellen mesenchymalen Ursprungs typische Intermediärfilament Vimentin und dessen Bedeutung wird in der vorliegenden Arbeit noch näher eingegangen.

### **2.1.5 Die Zelladhäsion und –migration**

Neben den bereits erwähnten Desmosomen gibt es weitere Verbindungspunkte zwischen Zelle und Extrazellulärer Matrix bzw. Zelluntergrund. Adhärenz Zellen bilden in Kultur fokale Adhäsionskontakte aus. Diese Kombination aus verschiedenen Strukturproteinen bildet eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und den Proteinen der Zellumgebung. Die prominenteste, transmembrane Komponente in fokalen Adhäsionskontakten besteht aus Integrinen. Integrine sind Heterodimere aus unterschiedlich kombinierten  $\alpha$ - &  $\beta$ -Untereinheiten (Hynes, 1992). Beide Untereinheiten durchspannen die Zellmembran und besitzen eine lange, extrazelluläre und eine kurze, intrazelluläre Domäne. Die  $\beta$ -Untereinheiten können sich mit verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten paaren, wodurch jeweils Rezeptoren für unterschiedliche Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) entstehen. Die Bindung eines Liganden an den Integrin-Rezeptor sowie der Zusammenschluss mehrerer Integrin-Dimere zu einem Cluster sind eine notwendige Voraussetzung für die Formation eines Fokalkontaktes. Dabei entscheidet die Art des von der EZM angebotenen Proteins über die Zusammensetzung der Integrine (Dejana et al., 1988). Während die Integrin-Dimere auf der extrazellulären Seite direkt über eine Rezeptor-Liganden-Bindung mit der EZM verknüpft sind, spielen auf der intrazellulären Seite ungleich mehr Proteine bei der Verbindung der Integrincluster zu den Mikrofilamenten des Zytoskeletts eine Rolle. Unter anderem sind Talin, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin sowie Tensin, Profilin und Zyxin beteiligt. Als Signaltransduktoren fungieren weiterhin verschiedene Kinasen (FAK (focal adhesion kinase) bzw. src-Kinase) und Paxillin. Die Regulation der Ausbildung von Fokalkontakten wird, wie auch die Aktinpolymerisation und damit die Bildung von Lamellipodien und Filopodien, maßgeblich über Mitglieder der GTPase-Familie Rho gesteuert. GTPasen sind konformationsreguliert und je nachdem, ob sie GTP- oder GDP-gebunden vorliegen, sind sie aktiv und interagieren mit nachgeschalteten Signaltransduktionsprozessen oder inaktiv. Rho-GTPasen werden durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert und durch GTPase-aktivierende

Proteine (GAPs) inaktiviert. Für die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien sind die Rho-GTPasen Rac, Cdc42 und RhoG verantwortlich (Hall, 1994) (Huttenlocher et al., 1995) (Ridley et al., 2003).

Rho beeinflusst die Abläufe über zwei synergistische Wege. Zum einen kann eine Zellkontraktion zur Ausbildung von Stressfasern aus Aktin führen, die wiederum die Formation von Fokalkontakten verursachen. Zum anderen stimuliert Rho die IP3-Kaskade, die ebenfalls über eine Aktivierung der Aktinpolymerisation die Ausbildung von Stressfasern vermittelt, oder direkt über Phosphoinositol-2-phosphat (PIP<sub>2</sub>), das an Vinculin bindet und dadurch Bindungsstellen für Talin und Aktin frei legt, wirkt.

Die Entstehung und Reifung fokaler Adhäsionen kann in drei Phasen unterteilt werden. Als erstes führt ein extrazelluläres Signal über die bereits beschriebenen Signalwege zur Cluster-Bildung der Integrine. Durch weitere Anlagerung der ebenfalls schon erwähnten Proteine an die zytoplasmatische Seite des Integrinclusters entstehen sogenannte fokale Komplexe, die hauptsächlich an den Rändern von Lamellipodien zu finden sind. Aus den fokalen Komplexen bilden sich schließlich durch weiteren Umbau fokale Kontakte, die die reife Form der Zell-Matrix-Verbindungen darstellen. Aus gebündeltem Aktin bestehende Stressfasern, die sich durch die gesamte Zelle erstrecken können, münden in die fokalen Kontakte und erzeugen somit eine Spannung innerhalb der Zelle. (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996)

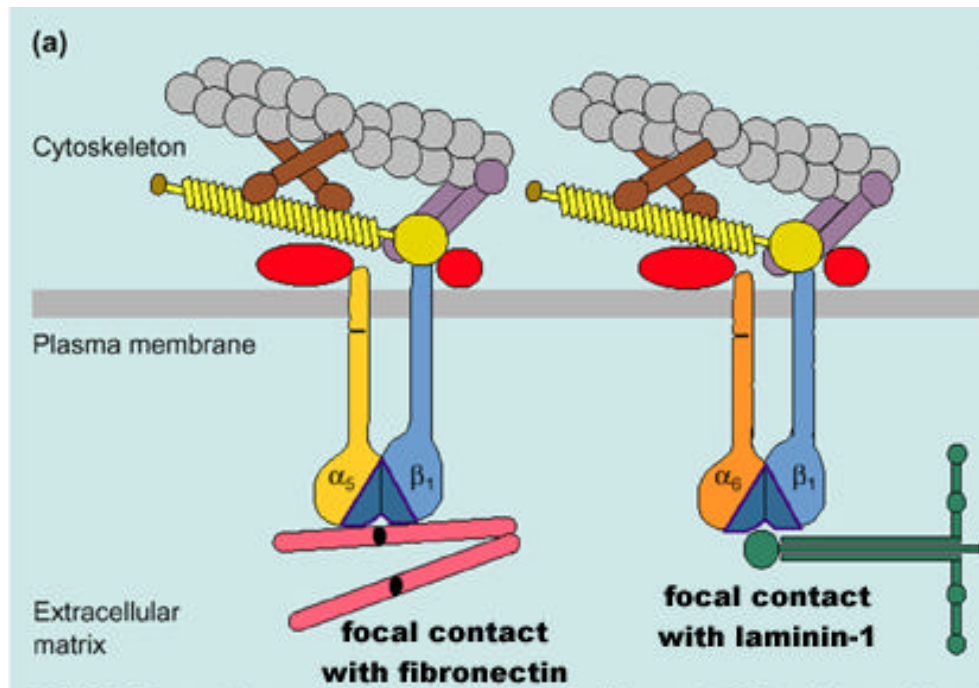


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Fokalkontaktes. Die Verbindung zwischen den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und den Proteinen der Extrazellulären Matrix wird über Cluster verschiedener kombinierter Integrin-Dimere vermittelt. Dabei entscheidet der Ligand auf der EZM über die Zusammensetzung der Integrin-Rezeptoren. Zahlreiche Proteine interagieren auf der intrazellulären Seite der Integrincluster und vermitteln den Kontakt zum Zytoskelett (Quelle: <http://darwin.bio.uci.edu>).

Die Zellmigration basiert auf einer dynamischen Interaktion zwischen der Zelle, deren Untergrund und dem an das Zytoskelett gebundenen Bewegungsapparat. Eingeleitet wird die Zellbewegung durch ein gerichtetes fächerförmiges (Lamellipodium) oder fingerartiges (Filopodium) Ausstülpfen des Leitsaums, das durch lokale Aktinpolymerisation ermöglicht wird. Lamellipodien und Filopodien werden über Fokalkontakte auf dem Zelluntergrund fixiert. Dabei muss die Adhäsion so stark sein, dass die Zugkraft, die sich innerhalb der Zelle aufbaut, ausreicht, um diese nach vorne zu ziehen. Die Fokalkontakte müssen dagegen an der Zellrückseite schwach genug sein, um sich vom Untergrund ablösen und die Vorwärtsbewegung der Zelle gewährleisten zu können (DiMilla et al., 1991). In der Tat wurden bei Untersuchungen der Integrin-Zytoskelett-Interaktionen Unterschiede zwischen der Zellfront und der Rückseite der Zelle beobachtet. Integrine der Zellrückseite haben demnach eine weniger starke Verbindung zum Zytoskelett und liegen nicht so fest in der Membran verankert vor wie die Integrine des Leitsaums (Schmidt et al., 1993). Die Hinterseite der Zelle unterscheidet sich

somit funktionell und strukturell von der Zellvorderseite. Dadurch entsteht eine asymmetrische Adhäsionssituation, die für die Zellbewegung essentiell ist (Huttenlocher et al., 1995). Der Hauptregulator dieser Zellpolarisierung ist wiederum die GTPase Cdc42 (Ridley et al., 2003). Eine Aktivierung von Cdc42 ist in Richtung der Zellfront zu beobachten (Itoh et al., 2002). Sowohl eine Inhibierung als auch eine verbreitete Aktivierung von Cdc42 unterbricht die gerichtete Migration (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Fokalkontakte dienen aber nicht nur der Kontaktaufnahme zwischen Zytoskelett und Zelluntergrund. Sie leiten weiterhin Informationen und Signale von der EZM in das Zellinnere. Letzteres wird durch die Assoziation von Signaltransduktionsmolekülen wie z.B. verschiedene Kinasen (FAK (focal adhesion kinase), PKC (protein kinase C) oder PI (phosphoinositide 3-kinase) und weiteren Faktoren an die Fokalkontakte ermöglicht (Clark and Brugge, 1995).

Die Zellmigration wird über vielfältige Wege kontrolliert und reguliert. Es gibt eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Komponenten der EZM, die die Migration fördern bzw. hemmen. Eine stimulierende Wirkung auf die Migration haben Faktoren wie Interleukin-8 oder der Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF/scatter factor (Matsumoto et al., 1994) (Dunlevy and Couchman, 1995). Kritische Determinanten der Zellmigration sind weiterhin die vorhandenen Konzentrationen an Substrat, Rezeptor und an der Adhäsion beteiligten zytoskeletären Komponenten. Dabei ist eine mittlere Konzentration an z.B. Substrat optimal für den Migrationsvorgang. Bei einer zu geringen Menge an Substrat wird keine ausreichende Adhäsion der Zelle erreicht. Zu hohe Substratkonzentrationen dagegen führen zu einer so starken Adhäsion der Zelle, dass das für die Migration notwendige Loslösen der Fokalkontakte nicht mehr gewährleistet wird (DiMilla et al., 1993).

Nicht nur der Kontakt zwischen Integrinen und der EZM beeinflussen die Zellmigration, sondern ebenfalls die Interaktionen zwischen Integrinen und Zytoskelett. Die Migrationsrate variiert mit der Menge an Zytoskelett-assoziierten Proteinen. So konnte gezeigt werden, dass die Suppression von Vinculin oder  $\alpha$ -Aktinin durch Antisense-Methoden die Migration von 3T3-Zellen verstärkt (Fernandez, 1993). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression dieser Proteine zur Inhibition der Zellbewegung (Fernandez, 1992) (Gluck and Ben-Ze'ev, 1994).

### 2.1.6 Das Intermediärfilament Vimentin

In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem gezeigt, dass neben den bereits erwähnten zytoskeletären Proteinen Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin auch das Intermediärfilament Vimentin die Zellmigration beeinflusst.

Vimentin ist ein Typ-III-Intermediärfilament mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa. Obwohl die Größe und die Primärsequenz von Intermediärfilamenten variieren können, teilen alle diese Proteine einen gemeinsamen strukturellen Aufbau. Dieser besteht aus einer zentralen stabförmigen Domäne, die an den Enden von einer Kopf- bzw. einer Schwanzdomäne flankiert wird. Die zentrale Domäne lässt sich unterteilen in zwei große spiralförmige Subdomänen, die höchstwahrscheinlich eine  $\alpha$ -helikale Struktur aufweisen, und kleinere nicht-helikale Verbindungsdomänen (Hess et al., 2004).

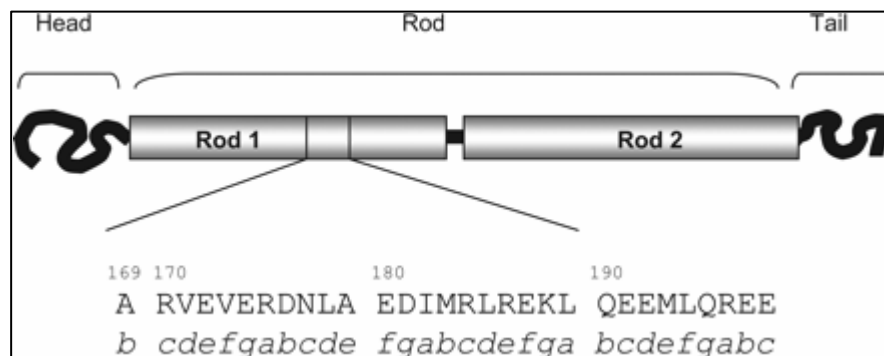


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines Vimentin-Proteins nach J.F.Hess et al 2004. Das Intermediärfilament besteht aus einer zentralen, stabförmigen Domäne, die flankiert wird von einer Kopf- bzw. einer Schwanzdomäne.

Vimentin kann posttranslational phosphoryliert werden, wobei die Phosphorylierungsstellen auf der Kopfdomäne liegen. Zu den Kinasen, die Vimentin phosphorylieren können, gehören die Rho-Kinasen, die bereits bei der Aktinpolymerisation und der Ausbildung von Fokalkontakten große Bedeutung haben (Goto et al., 1998).

Obwohl bei der Vimentin knockout-Maus im Vergleich zum Wildtyp kein veränderter Phänotyp festgestellt werden konnte (Colucci-Guyon et al., 1994), wurden für das Intermediärfilament eine Reihe von bedeutungsvollen Funktionen beschrieben. Aus der Vimentin knockout-Maus isolierte Fibroblasten zum Beispiel zeigten im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten eine eingeschränkte Stabilität und

ein vermindertes Migrations- und Kontraktionsvermögen (Eckes et al., 1998). Vimentin soll ebenfalls an der Migration von humanen Epithelzellen beteiligt sein (Gilles et al., 1999). Auch in Endothelzellen spielt das Vimentin-Zytoskelett eine entscheidende Rolle. Die Arbeitsgruppe um C.R. Jones entdeckte, dass die Adhäsion von primären, humanen Endothelzellen Vimentin-assoziiert abläuft und weiterhin, dass bei immortalisierten, Fluss-stimulierten Endothelzellen die Suppression von Vimentin zu einer Verkleinerung der Fokalkontakte und zu einer Schwächung der Adhäsion führt (Gonzales et al., 2001) (Tsuruta and Jones, 2003). Bereits ein Jahr zuvor konnte gezeigt werden, dass es in Endothelzellen, die einer hämodynamischen Schubspannung ausgesetzt wurden, zu einer drastischen Deformation des Vimentin-Netzwerkes kam. Dabei fand weder eine akute Polymerisation noch eine Depolymerisation der Vimentin-Filamente statt (Helmke et al., 2000).

Die Vimentin-gesteuerte Reaktion von Zellen auf eine angelegte Schubspannung spiegelt sich ebenfalls in *in vivo* Situationen wider. Zunächst wurde bei Mesenterialarterien aus Vimentin-defizienten Mäusen im Organbad eine im Vergleich zu Kontrollarterien verminderte Fluss-induzierte Dilatation festgestellt (Henrion et al., 1997). Drei Jahre später erwies sich Vimentin als wichtiger Modulator des Remodelings von Arterien infolge veränderter Blutflüsse (Schiffers et al., 2000).

## **2.2 Ziel der Arbeit**

Die Arteriogenese hat sich in den letzten Jahren als eigenständiger Mechanismus des Gefäßwachstums neben der Vaskulogenese und der Angiogenese erwiesen. Im Vergleich zu den anderen Zweigen des Gefäßwachstums sind die Vorgänge während des Kollateralwachstums jedoch weitgehend ungeklärt. Obwohl eine Erhöhung der Blutflussgeschwindigkeit infolge einer Gefäßokklusion und die damit verstärkte Schubspannung in den umliegenden Gefäßen als primärer Stimulus für die Arteriogenese identifiziert werden konnte, sind die nachfolgenden Abläufe die zum Wachstum eines kompensatorischen Gefäßes führen noch unverstanden. Bekannt ist, dass das Kollateralwachstum in verschiedenen Phasen abläuft, wobei es zunächst zu einer massiven Zellproliferation kommt, die dann von einem hauptsächlich durch Zellmigration gekennzeichneten Gefäßremodeling abgelöst wird. Es bleibt jedoch zu klären, auf welche Art und Weise der Stimulus eine biochemische Reaktion in den Gefäßzellen hervorrufen kann, die wiederum zu mechanischen Prozessen wie Migration und Proliferation führt.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand von vergleichenden Proteinexpressionsstudien von Kollateralarterien und Kontrollgefäßen differenziell exprimierte Proteine identifiziert werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob die gefundenen Proteine an der Informationsvermittlung zwischen mechanischen und biochemischen Prozessen in Zellen beteiligt sein könnten. Die in Kollateralarterien hochregulierten Proteine sollen außerdem im Zellkulturmodell auf ihre funktionelle Bedeutung bei der Zellproliferation und –migration hin untersucht werden.



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Gewebeproben**

##### Rattengewebe:

Kollateralarterien aus dem ligierten Bein von Sprague-Dawley Ratten, 3 Tage nach Okklusion der Femoralarterie (Herzog *et al.* 2002).

Gefäße aus dem Kontrollbein von Sprague-Dawley Ratten, 3 Tage nach Ligation der Femoralarterie (Herzog *et al.* 2002).

Kryoschnitte von Haut neonataler Sprague-Dawley Ratten.

##### Zelllinien

RHE A: Rattenherz-Endothelzellen; die Zelllinie A wurde in unserem Labor durch mehrmaliges Subklonieren von der ursprünglichen RHE - Zelllinie (Derhaag *et al.*, 1996) ausdifferenziert und getrennt kultiviert. Die RHE A Zellen weisen starke Migrationsfähigkeit auf (Obermeyer *et al.*, 2003).

RHE neg: Durch das Subklonieren der Parentalzelllinie (s.o.) wurden ebenfalls die Zelllinie neg ausselektioniert. Die RHE neg zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus (Obermeyer *et al.*, 2003).

##### Größenstandards:

Prestained Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad

Unstained Precision Protein Standard, Bio-Rad

Dual Colour Protein Standard, Bio-Rad

### 3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck	Lipofectamin	Invitrogen
Acrylamid	Bio-Rad	Magnesiumchlorid	Merck
Agarose	Sigma	Magnesiumsulfat	Merck
3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (AEC)	Sigma	Mayers Hämalaunlösung	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma	2-Mercaptoethanol	Sigma
Bio Safe Coomasie Reagenz	Bio-Rad	Methanol	Merck
Bio-Lytes 3-10	Bio-Rad	Mineralöl	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma	Moviol	Calbiochem
BSA	Sigma	Natriumacetat	Merck
Casy Clean	Schärfe	Natriumazid	Sigma
	Systems	Natriumcarbonat	Merck
(CHAPS)	Sigma	Natriumchlorid, reinst	Merck
Carpofen (Rimadyl)	Pfizer	Natriumdesoxycholat	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Sigma	di-Natriumdihydrogen- phosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Natriumhydrogenphosphat	Merck
DL-Dithiothreitol	Sigma	Natriumhydroxid	Merck
Dulbecco´s Medium mit Glutamat	Gibco BRL	Natriumthiosulfat	Sigma
Einbettungsmedium für Kryoschnitte	DAKO	OptiMEM	Gibco BRL
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma	PBS Dulbecco´s	Gibco BRL
Essigsäure, 100%	Merck	Penicillin/Streptomycin	Roche
Ethanol	Merck	Ponceau S-Reagenz	Serva
Enrofloxacin (Baytril)	Bayer	Proteaseinhibitor Cocktail- Complete, Mini, EDTA- free	Roche
FCS	Gibco BRL	RNase Away	Molecular Bioproducts
Formaldehyd 37%	Merck	Salzsäure, rauchend, 37%	Merck
Gelatine	Sigma	Silbernitrat	Roth
Glycerol, 87%, reinst	Merck	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Glycin	Roth	Sorbitol	Merck
Harnstoff (reinst)	Bio-Rad	Sypro Ruby	Bio-Rad
HEPES	Sigma	TEMED	Sigma
Hoechst B 2883	Sigma		

Immersionsöl	Merck	Tissue-Tek	Sakura
Iodoacetamid	Sigma		Finetek
Isobutanol	Merck	Tris	Sigma
Isopropanol	Merck	Trockenmilch	Bio-Rad
Isoton II	Beckmann- Coulter	Trypsin – EDTA	Gibco BRL
Kaliumchlorid	Merck	Trypanblau	Serva
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Tween 20	Sigma
Ketamin	Atarost	Wasserstoffperoxid	Merck
		Xylazin	Bayer
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklavierband	Eppendorf	Parafilm	Merck
Centricon - Röhrchen	Millipore	Pasteurpipetten	Eppendorf
Chamber slides	Nunc	Pinzetten	Merck
Criterion Precast-Gele 10%	Bio-Rad	Pipetten: 0,5-1;1-10;10- 100; 100-200 und 200- 1000 µl	Gilson
DAKO – Pen	DAKO		
Deckgläser	Marienfeld	Pipettenspitzen	Gilson, Eppendorf
Digital – Timer	Merck		
Dialyseschläuche	Serva	Pipettierhilfe – Pipettus	Hirschmann Laborgerät
Drehtisch	Schütt Labor- technik		Falcon
Einwegsäulen	Bio-Rad	Plastik Pipetten: 2; 5; 10 und 25 ml	
FACS – Röhrchen	Sarstedt	Plastik Messküvetten	Rudolf Franke
Färbekasten	Rudolf Franke	Reaktionsgefäße: 0,5;1,5 und 2,0 µl	Eppendorf
Filterpapier	Whatman		
Filterpapier-Wicks	Bio-Rad	Reaktionsgefäße:15;50 ml	Falcon
Glaszubehör	Schott	Reaktionsgefäße: 50 ml	Nalgene
Handschuhe	Kimberly- Clark	Röntgenfilme 13 x18 cm	Kodak
IPG-Streifen NL pH3-10	Bio-Rad	Skalpel und -klingen	Bayha
Neubauer Zählkammer	Merck	Spatel	Merck
Nitrocellulose Transfer- membran	Schleicher & Schuell	Sterilfilter: 0,2 und 0,45 µm	Millipore
		Waschküvetten	Merck

Objekträger Super Frost Plus Objekträgerhalter Objekträger - Kasten	Menzel-Gläser Merck Neo Lab	Wägebepapier Wägeschälchen Zellkulturflaschen Zellkulturschalen 6well, 12well, 24well, 96well	Machery-Nagel Machery-Nagel Falcon Nunc
---	-----------------------------------	--	--

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

AEC-Stocklösung	1 Tablette AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazole) in 5 ml Dimethylformamid (DMF)
Blocking Puffer (Western Blot)	5% Trockenmilch (w/v); in Waschpuffer A
1x Blotting-Puffer	10mM Tris, 0,75M Glycin, 20% Methanol
Färbelösung für Immunhistochemie	10 ml Natriumacetat (0,1M, pH 4,8), 500 µl AEC-Stocklösung, 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fixierungslösung für Sypro Ruby Färbung	10 % Methanol, 7 % Essigsäure
Gelatinelösung für Immunhistochemie	1 % Gelatine in 1x PBS
Lämmli-Probenpuffer 8 x	3,8 ml dest. Wasser; 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 800 µl Glycerol; 1,6 ml SDS 10 %; 400 µl Beta-Mercaptoethanol; 400 µl Bromphenolblau
Laufpuffer für Elektrophorese	Für 1L: 3 g Tris; 14,4 g Glycin; 1 g SDS

Polyacrylamid-Trenngele 10% (2 Stück)	4,8 ml dest. Wasser; 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8); 2,5 ml Acrylamid (40 %); 100 µl SDS (10%); 50 µl APS (10%); 5 µl TEMED
Polyacrylamid-Sammelgele 4% (2 Stück)	1,6 ml dest. Wasser; 630 µl Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,6); 250 µl Acrylamid (40 %); 25 µl SDS (10 %); 12,5 µl APS (10 %); 2,5 µl TEMED
10 x PBS	8% NaCl; 0,2% KCl; 0,2% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,76% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; (w/v); pH 7,4
Probenpuffer für FACS-Analysen	1% Formaldehyd (37%); (v/v); in 1 x PBS
Waschpuffer A für Western Blot	10 mM Tris pH 7,4; 0,5 % NaCl; 0,1 % Tween 20
Waschpuffer B für Western Blot	0,25 % Natriumdeoxycholat; 0,1 % SDS in Waschpuffer A
Waschpuffer für Immuncytochemie	PBS (Dulbecco´s); 3 % FCS (Gibco)
Waschpuffer für Immunhistochemie	10% 10 x PBS; 2 % Gelatinelösung; 0,05 % Tween 20
Waschpuffer für Zellen vor der 2D-Elektrophorese	250 mM Sorbitol; 10 mM Tris pH 7,0

Alle oben erwähnten Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min./121°C/1 bar). Thermolabile Komponenten wurden durch einen 0,2 bzw. 0,45 µm Filter sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf 50°C zugegeben. Zur Einstellung des pH – Wertes wurde, wenn nicht anders vermerkt, 1M HCl oder 1M NaOH verwendet.

### 3.1.4 Enzyme und Reaktionskits

#### Enzyme:

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade; 1 U/  $\mu$ l (Gibco BRL, Eggenstein)

RNase A (Sigma-Aldrich, Seelze )

#### Reaktionskits:

Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München)

Bio-Rad Ready Prep<sup>TM</sup> Sequential Extraction Kit (Bio-Rad, München)

BrdU-Flow-Kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA)

ECL Western blotting detection reagents and analysis system

(Amersham Biosciences, Freiburg)

### 3.1.5 Antikörper und enzymkonjugierte Nachweisantikörper

#### Tabellarische Zusammenstellung der verwendeten primären Antikörper:

Primäre Antikörper	Spezifität	Spezies des Spendertiers	Firma	Verdünnung	Nachweis Methode
Flk-1 (C20)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, CA, USA	1:25	FACS
Flt-1 (C17)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, CA, USA	1:25	FACS
VE-Cadherin (C19)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz, CA, USA	1:25	FACS
CD-31 (TLD-3A12)	monoklonal	Maus	Serotec, Oxford, UK	1:20	FACS
CD-54 (TLD-4C9)	monoklonal	Maus	Serotec, Oxford, UK	1:20	FACS
Vimentin (V9)	monoklonal	Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500	Western Blot
PI3-Kinase	polyklonal	Kaninchen	Upstate, NY, USA	1:1000	Western Blot
Pan-Zytokeratin (Lu-5)	monoklonal	Maus	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:50	Immuncytochemie

Tabellarische Zusammenstellung der verwendeten sekundären bzw. tertiären Antikörper:

Sekundäre Antikörper + Konjugat	Klasse	Firma	Eingesetzte Verdünnung	Nachweis-Methode
Ziege anti Maus, Cy2	IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:200	FACS
Ziege anti Kaninchen, Cy2	IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:200	FACS
Esel anti Ziege, Biotin-Streptavidin (Fluorescein-gekoppeltes Streptavidin)	IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:200	FACS
Ziege anti Maus, Peroxidase-gekoppelt	IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:10000 1:300	Western Blot Immuncyto- chemie
Esel anti Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:10000	Western Blot

### 3.1.6 Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör

#### FACS-Gerät

FACS-Calibur, (Becton-Dickinson, San Jose, CA )

#### Fokussierungs-Apparatur und Zubehör für Isoelektrische Fokussierung

Protean IEF Cell (Bio-Rad, München)

#### Geldokumentations-Apparatur

Fluor-S-Max (Bio-Rad, München)

#### Gelelektrophorese-Kammer für 2D-Elektrophorese

Criterion™ Cell, Criterion Dodeca™ Cell (Bio-Rad, München)

#### Kryostat:

2800 Frigocut N (Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch)

#### Mikroskope:

Olympus BH2 (OM System, Japan)

Binokular – Olympus CK 2 (OM System, Japan)

#### Sonifiziergerät

Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Berlin)

#### Zellzähl-Apparatur

Casy 1 TT Cell Counter + Analyse System (Schärfe Systems, Reutlingen)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Ligatur der Rattenhinterläufe**

15 etwa 250 Gramm schwere, männliche Sprague Dawley Ratten wurden mit einem Gemisch aus Kohlendioxid und O<sub>2</sub> (80:20) immobilisiert und anschließend durch intraperitoneale Gabe von 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin narkotisiert. Die Tiere wurden vor der Operation in stabiler Rückenlage an allen vier Pfoten fixiert, in den Kniefalten geschoren und das Operationsfeld desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte mittels Skalpell auf der medialen Seite des rechten Oberschenkels parallel zu der Arterie und der Vene femoralis. Durch stumpfes Präparieren im inguinalen Fettgewebe wurde die Arteria circumflexa femoris lateralis dargestellt, doppelt ligiert und durchtrennt. Die Arteria femoralis wurde vorsichtig von Vene und Nerv isoliert und doppelt ligiert. Der Wundverschluss erfolgte in der Unterhaut mit Einzelknopfnähten und in der Oberhaut mit einem Hautklammergerät und Wundklammern nach Michel. Postoperativ bekamen die Tiere zur Infektionsprophylaxe 10 mg/kg Enrofloxacin und zur Schmerzbehandlung 5 mg/kg Carprofen subcutan.

### **3.2.2 Entnahme der Kollateralarterien und Kontrollgefäße**

Drei Tage nach der Femoralarterienligatur erfolgte die Entnahme der gebildeten Kollateralarterien bzw. der Kontrollgefäße aus den Ratten-Hinterläufen. Dem narkotisierten Tier (s.o.) verabreichte man zusätzlich 0,2 ml Heparin in die Schwanzvene, fixierte es in stabiler Rückenlage und eröffnete das Abdomen mit einem Skalpell in der Linea alba. Durch stumpfes Lösen der serösen Häute und des Darmkonvoluts wurden die großen abdominalen Gefäße freipräpariert und die Aorta abdominalis, sowie die Vena cava caudalis bis zur Aortenbifurkation dargestellt. Nach der Ligatur der Aorta kaudal der Leber und Anschlingen des Gefäßes kranial der Arteria renalis wurde das Gefäß durch den Faden angehoben, in der Gefäßmitte angeschnitten und ein Katheter (20 G Kanüle + 10 cm langem Polyethylenschlauch) eingeführt. Nochmals erfolgte eine Applikation von 0,2 ml Heparin direkt durch den Katheter, bevor die Vena cava caudalis zur Entblutung des Tieres eröffnet wurde.

Durch den in die Aorta eingeführten, mit Ligaturen doppelt fixierten Katheter wurde das Gefäßsystem mit ca. 120 ml warmer Krebs-Ringer-Lösung bis zum Austritt klarer Flüssigkeit gespült. Anschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes durch



Perfusion mit einer 3,5 %igen Formaldehydlösung. Nach Erhärtung der Muskulatur erfolgte die Identifizierung und Entnahme der Kollateralarterien bzw. der Kontrollgefäße. Hierzu wurde die Haut der Hinterläufe vom Muskelgewebe abpräpariert, die Adduktoren auf Kniegelenkebene durchtrennt, das distale Segment der Kollateralarterien im Kniefettgewebe fixiert und die gesamte Oberschenkelmuskulatur einschließlich der Kollateralarterie vom Femur- und Beckenknochen abgetrennt und entnommen.

Die weitere Präparation der Gefäße erfolgte in ständig eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe eines Binokulars. Muskel- und Fettgewebe wurden vollständig entfernt, die Kollateralarterien/Kontrollgefäße vorsichtig von den umgebenden Gefäßen isoliert, leicht getrocknet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 Grad gelagert.

### **3.2.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Gefäßen**

Die tiefgefrorenen Gefäße wurden nach ihrer Größe sortiert, ca. 1,5 cm lange Gefäßstücke unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zermörsert und das Gewebepulver in vorgekühlte Eppendorf-Cups gegeben. Die pulverisierten Proben wurden in 100-150 µl Puffer 3 (Sequential Extraction Kit, Bio-Rad, München) + 1-1,5 µl Tributylphosphin (Bio-Rad, München) aufgenommen, gevortext und für eine Stunde unter Kühlung inkubiert, wobei die Proben ca. alle 10 Minuten kurz gevortext wurden.

Nach der Inkubation erfolgte eine 15-minütige Abzentrifugation ungelöster Bestandteile bei 10000g.

Die Überstände wurden abgenommen, 1:1 mit Tributylphosphin-haltigem Puffer 3 (Sequential Extraction Kit, Bio-Rad, München) verdünnt und für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt.

Insgesamt wurden 30 Gefäße präpariert (15 Kollateralarterien und 15 Kontrollgefäße) und 5 Gefäße pro Proteinextrakt gepoolt, so dass jeweils drei Kollateral-Extrakte und drei Kontroll-Extrakte 2D-gelelektrophoretisch aufgearbeitet werden konnten.

### 3.2.4 2D-Elektrophorese

RHE-A und RHE-neg Zellen wurden geerntet, zweimal mit 250 mM Sorbitol in 10 mM Tris, pH 7,0 gewaschen und die Proteine unter Verwendung des ReadyPrep Sequential Extraction Kits (Bio-Rad, München) einzeln aufgearbeitet. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford bestimmt und die Extrakte für die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension (Isoelektrische Fokussierung) in einer Konzentration von 1 µg/µl eingesetzt. 200 µl der Proben wurden durch eine aktive Rehydrierung bei 50 V über Nacht von 11 cm langen Gelstreifen mit einem immobilisierten, nicht-linearen pH-Gradienten von pH 3-10 aufgenommen. Die Fokussierung erfolgte in der IEF-Zelle nach Anleitung der Firma Bio-Rad (S1 = 15 Minuten 250 Volt, S2 = 4 Stunden 250-8000 Volt, S3 = 35000 Voltstunden). Nach der Isoelektrischen Fokussierung erfolgte die Äquilibrierung der IPG-Streifen zunächst für 15 Minuten im Äquilibrierungspuffer I bestehend aus (6 M Harnstoff, 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,375 M Tris/HCL (pH 8,8), 20 % Glycerol und 2 % Dithiothreitol (DTT)) und dann weitere 15 Minuten im Äquilibrierungspuffer II bestehend aus denselben Bestandteilen wie Puffer I mit der Ausnahme, dass die 2 % DTT durch 2,5 % Iodoacetamid ersetzt werden. Nach der Äquilibrierung wurden die Streifen kurz mit Elektrophorese-Laufpuffer abgespült und auf 10 %igen Criterion Gelen (Bio-Rad) platziert. Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension (SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)) lief für ca. 20 Minuten bei 50 Volt und dann bis zum Ende bei 150-200 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 Minuten in einem Puffer aus 10 % Methanol und 7 % Essigsäure fixiert und anschließend über Nacht mit der Fluoreszenz-Färbelösung Sypro Ruby Protein Gel Stain gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele für 1 Stunde im Fixierungspuffer gewaschen und schließlich mit Hilfe eines Fluor-S-Systems eingescannt. Die Bildanalyse erfolgte unter Verwendung der PDQuest-Software von Bio-Rad. Regulierte Proteinspots wurden auf einem UV-Tisch aus den Gelen ausgestochen, die Proben mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch analysiert.

### **3.2.5 Massenspektrometrie**

Proteinspots aus den zytosolischen Extrakten von RHE-A und RHE-neg Zellen, die signifikante Intensitätsunterschiede aufwiesen, wurden aus den Gelen ausgestochen, mit DTT reduziert, die Cysteinreste mit Iodoacetamid modifiziert und nach Shevchenko et al. 1996 im Gel mit Trypsin verdaut. Nach dem Verdau wurden die Peptide aus dem Gel extrahiert und über eine C18 mZipTip (Millipore) entsalzt. Die Analyse erfolgte über die Nanoelektrospray Massenspektrometrie in einem QTOF II Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK). Die durch Kollisions-induzierte Fragmentierung der Peptide erhaltenen MS/MS Spektren wurden mit Hilfe der Mascot-Datenbank identifiziert.

### **3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde der Protein-Assay von Bio-Rad verwendet.

Die Herstellung des Standards erfolgte durch schrittweise Verdünnung einer 1,44 mg/ml konzentrierten BSA-Lösung mit 0,9 % NaCl. Referenzwerte waren: 0,0 mg/ml, 0,09 mg/ml, 0,18 mg/ml und 0,36 mg/ml BSA. Die Proteinproben wurden 1:50 oder 1:25 mit 0,9 % NaCl verdünnt und für die Messung pro Probe und Messwert 100 µl eingesetzt. Zu jedem Ansatz pipettierte man 1 ml Farbreagenz (1:5 in Wasser verdünnt) und inkubierte ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen, bevor die Messung im Photometer bei 595 nm erfolgte.

### **3.2.7 SDS-PAGE**

Für die Auftrennung von Proteinextrakten wurden 10 %ige Acrylamid-Gele benutzt. Von jeder Probe wurden 20 µg Protein eingesetzt, mit 8x Probenpuffer nach Lämmli versetzt und für 3 Minuten aufgekocht. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) eingesetzt, mit 1x Laufpuffer aufgefüllt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit 50 V gestartet. Die Spannung wurde, nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen haben, bis zum Ende des Laufes auf 160 V erhöht. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese 3 x 5 Minuten in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in 50 ml Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, München) für ca. 2 Stunden gefärbt oder für einen Westernblot eingesetzt.

### **3.2.8 Western Blot-Analysen**

Die durch ein- oder zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Tank-Blot Systems auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (je nach Gelgrösse bei 100-115 V für 45-60 Minuten). Die Membran wurde für 1 Stunde in 5 % Magermilchpulver, gelöst in 10 mM Tris/0,5 % NaCl/0,2 % Tween/ pH 7,4, geblockt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach vier Waschschritten (Puffer A, B, B, A jeweils 10 Minuten) wurde die Membran für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur mit den jeweiligen sekundären Antikörpern behandelt. Ungebundene Antikörper-Moleküle wurden durch erneutes Waschen entfernt und die immunreaktiven Proteine chemiluminometrisch bestimmt.

### **3.2.9 Kulturmedien**

Die Endothelzelllinien wurden in folgendem Medium kultiviert: 90 % Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (D-MEM) mit Glutamax I, 4500 mg/L D-Glucose, Natriumpyruvat, 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Trypsin-EDTA-Lösung besteht aus 0,5 g/L Trypsin und 0,2 g/L EDTA (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Dulbecco's PBS (phosphate buffered saline) ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und Natriumkarbonat wurde für alle Experimente verwendet.

### **3.2.10 Kultur und Subklonierung der Endothelzellen**

Als Ursprungszelllinie wurde eine spontan immortalisierte Endothelzelllinie aus dem Rattenherzen verwendet (Derhaag et al.1996). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) und im Abstand von zwei Tagen im Verhältnis 1:5 passagiert. Die Zelllinie erwies sich als heterogene Population bestehend aus Zellen mit zwei verschiedenen Phänotypen. Zur Trennung und Subklonierung der beiden Zelltypen wurden die Zellen, durch Verdünnung vereinzelt, in 96-well Platten ausgesetzt und jeweils ein Klon eines jeden Phänotyps einzeln kultiviert. Die beiden neu kultivierten Zelllinien wurden als RHE-A bzw. RHE-neg Zellen benannt.

### **3.2.11 Kultur von RHE A und RHE neg Zellen**

Beide Zelllinien wurden unter Standardbedingungen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in D-MEM mit 10 % FCS und Antibiotika kultiviert. Konfluente Zell-Monolayer wurden im Abstand von zwei Tagen im Verhältnis 1:3 (RHE A) bzw. 1:5 (RHE neg) passagiert. Für die Ernte wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für 2 Minuten bei 37 °C mit 1x Trypsin-EDTA behandelt, die Zellen durch leichtes Klopfen an der Kulturflasche abgelöst und in D-MEM aufgenommen. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1000 g und dem Absaugen des alten Mediums, folgte die Aufnahme des Zellpellets in 5 ml frischem D-MEM und die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bzw. dem Casy 1 –Zellzählgerät (Schärfe System, Deutschland). Aliquots der Zellsuspension wurden erneut abzentrifugiert und den folgenden Experimenten entsprechend aufgearbeitet.

### **3.2.12 Charakterisierung der RHE A und RHE neg Zellen: FACS-Analysen**

Die Zellen (ca.  $1 \times 10^6$  pro Ansatz) wurden wie oben beschrieben geerntet, mit PBS + 3 % FCS gewaschen und auf FACS-Röhrchen verteilt (1 ml Zellsuspension pro Röhrchen). Zellen, die für den Nachweis intrazellulär lokalisierter Proteine dienen, wurden unter Verwendung der Komponenten des BrdU-Flow-Kits (Pharmingen GmbH, Deutschland) zunächst fixiert, indem 100 µl Cytofix/Cytoperm in jedes Röhrchen pipettiert und die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Nach dem Waschen der Zellen mit 1 ml Waschpuffer wurden sie durch Behandlung mit 100 µl CytopermPlus für 10 Minuten auf Eis permeabilisiert. Es folgte wiederum ein Waschschritt, bevor die Zellen mit 100 µl Cytofix/Cytoperm für 5 Minuten auf Eis refixiert und wieder gewaschen wurden.

Anschließend inkubierten die Zellen für eine Stunde bei 4 °C in 50 µl der in PBS/3 % FCS verdünnten primären Antikörperlösung. Nach dreimaligem Waschen in PBS/3 % FCS folgte die Inkubation in 50 µl einer Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörperlösung für 45 Minuten bei 4°C. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/3 % FCS entfernt und die permeabilisierten Zellen in 500 µl PBS/3 % FCS resuspendiert, während die nicht-permeabilisierten Zellen in 500 µl PBS/0,1 % PFA (Paraformaldehyd) aufgenommen wurden. Die Auswertung wurde am Durchflusszytometer (BD-Bioscience) durchgeführt.

### **3.2.13 Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE A und RHE neg Zellen**

Aufgrund der starken Proliferationsaktivität der RHE neg Zellen sollte die Möglichkeit eines epithelialen Ursprungs der Zellen ausgeschlossen werden. Beide Zelllinien wurden immunhistochemisch mit einem Pan-Zytokeratin-Antikörpern (Lu-5, Dianova, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Hierfür setzte man die Zellen auf Chamber Slides (Labtech International, Burkhardtdorf, Deutschland) aus und ließ sie über Nacht im Brutschrank adhären. Als Positivkontrolle dienten 10 µm dicke Kryoschnitte von Haut neonataler Ratten. Hierfür wurde die Haut auf Korkplättchen in eine Kryomatrix eingebettet, durch Einfrieren fixiert und mit einem Kryostaten 10 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgenommen und getrocknet wurden. Die Fixierung der Zellen und Kryoschnitte erfolgte durch folgende Behandlung: 1 min in PBS, 1 min in PBS/Aceton 50:50, 2 min in purem Aceton bei Raumtemperatur und schließlich 2 min in purem eiskalten Aceton. Danach wurden die Zellen und die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten getrocknet und weiterhin für 20 Minuten in PBS + 1 % Gelatine und 0,1 % Tween rehydriert. Der primäre Antikörper wurde 1:50 in PBS + 1 % Gelatine und 0,1 % Tween verdünnt eingesetzt und die Proben damit für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Negativkontrollen wurde auf den primären Antikörper verzichtet. Ungebundene Moleküle des primären Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Proben in PBS + 1 % Gelatine + 0,1 % Tween entfernt. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Ziege anti Maus Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland), der 1:300 verdünnt in PBS + 1 % Gelatine und 0,1 % Tween und für eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt wurde. Die ungebundenen Antikörpermoleküle wurden wiederum durch dreimaliges Waschen in PBS + 1 % Gelatine + 0,1 % Tween eliminiert. Die Färbung erfolgte unter Verwendung von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) gelöst in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,8 für ca. fünf Minuten. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt, die Objektträger eingedeckelt und die Farbreaktion unter dem Mikroskop ausgewertet und fotografiert.

### 3.2.14 Bestimmung der Proliferationsrate der Zelllinien

Die Endothelzellen wurden in 6-well Platten kultiviert. Die Ausbildung einer konfluenten Zellschicht wurde vermieden, um die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten. Es erfolgte die Inkubation mit 0,3 mg/ml Bromodeoxyuridin (BrdU) für 2 Stunden (bzw. 5,5 Stunden bei mit siRNA transfizierten Zellen). Anschließend wurden die Zellen nach dem Protokoll des BrdU-Flow-Kits (PharMingen GmbH, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden die Zellen 2x mit PBS/3 % FCS und einmal mit reinen PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. In jedes Röhrchen wurden 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer pipettiert und die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer folgte die Zentrifugation der Zellen für 3 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert. Zur Permeabilisierung der Zellen gab man 100 µl CytopermPlus-Puffer in jedes Röhrchen und inkubierte für 10 Minuten auf Eis. Wiederum folgten die Zugabe von 1 ml Waschpuffer und die Zentrifugation der Zellen. Anschließend wurden zur Refixierung der Zellen 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer in jedes Röhrchen pipettiert, für 5 Minuten auf Eis inkubiert, 1 ml Waschpuffer hinzugegeben und zentrifugiert. Um die in die DNA eingebauten BrdU-Moleküle für den Antikörper zugänglich zu machen, folgte die Inkubation in 100 µl in PBS verdünnter DNase (Endkonzentration 300 mg/ml) für 1 Stunde bei 37 °C. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen zur Detektion der BrdU-Moleküle mit 50 µl einer mit FITC markierten anti-BrdU-Antikörperlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunklen behandelt. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, abzentrifugiert und in 500 µl PBS/3 % FCS pro Probe resuspendiert. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen wurde mit einem Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA) bestimmt und gegen die Gesamtzahl der Zellen normalisiert. Von beiden Zelllinien wurden jeweils 12 Aliquots analysiert (mit siRNA-transfizierten RHE A Zellen wurden 4 unabhängige Versuche durchgeführt). Bei jeder FACS-Analyse wurden pro Probe 30000 Zellen gemessen.

### **3.2.15 Time-Lapse Videomikroskopie**

Beide Zelllinien wurden in 50 ml Kulturflaschen bis zur 70 %igen Konfluenz herangezogen. Die Flaschen wurden vollständig mit Kulturmedium aufgefüllt, für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende CO<sub>2</sub>-Aufnahme des Mediums zu gewährleisten und schließlich luftdicht verschlossen auf dem auf 37 °C vorgewärmten Mikroskoptisch eines Lichtmikroskops (Olympus, Deutschland) platziert. Mit einer CCD-Kamera erfolgte die Aufnahme der Zellen in einminütigen Intervallen über 7 Stunden. Der Migrations-Weg und die Migrations-Geschwindigkeit der Zellen wurden mit Hilfe der Imagoquant Multi-Track-Software Version 2.01 der Firma Mediquant ermittelt (Mediquant, Halle, Deutschland).

### **3.2.16 Daten-Analyse**

Die statistischen Analysen wurden nach dem Student's T-Test ermittelt. Daten wurden als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$  und als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

### **3.2.17 siRNA-Transfektion**

RHE-A Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen (bzw. 6-well Platten) bis zur ca. 50%igen Konfluenz herangezogen. Zellen, die zur Migrations-Analyse genutzt werden sollten, wurden in 50 ml Zellkulturflaschen mit Verschluss ohne Filter kultiviert.

Vor Beginn der Arbeiten mit siRNA wurden sämtliche Arbeitsflächen, Instrumente und Geräte mit RNase Away gründlich gereinigt.

12,5 µg (6wells je 5 µg) siRNA wurde mit OptiMEM (Gibco) auf ein Endvolumen von 250 µl (100 µl) verdünnt. 12,5 µl (5 µl) Lipofectamin (Invitrogen) wurde ebenfalls mit OptiMEM auf 250 µl (100 µl) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 250 µl (100 µl) der jeweiligen, verdünnten siRNA mit 250 µl (100 µl) verdünntem Lipofectamin vereint und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Komplexbildung zu gewährleisten. In der Zwischenzeit wurde das Zellmedium aus den Flaschen/wells abgesaugt und durch 2,5 ml (1,5 ml) Transfektionsmedium (DMEM + 10 % FCS, ohne Antibiotika) ersetzt. Je 500 µl (200 µl) des siRNA-Lipofectamin-Gemisches wurde den Flaschen (wells) zugegeben, diese leicht geschwenkt und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 4 Stunden wurde jeder Flasche (jedem well) noch



einmal 2,5 ml (1,5 ml) Transfektionsmedium zugegeben und dann für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen, die zur Bestimmung der Transfektionsrate mit Fluorescein gekoppelter Kontroll-siRNA behandelt wurden, wurden nur über Nacht inkubiert und die Aufnahme am nächsten Tag anhand von FACS-Messungen (FACS-Calibur, Becton Dickinson, USA) bestimmt.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen, aus denen Proteinextrakte für die Western Blots hergestellt werden sollten, geerntet, mit PBS gewaschen und die Pellets in ca. 100 µl 40 mM Trispuffer pH 7,4 resuspendiert. Die Suspension wurde 2 x für 5 Sekunden mit 75 % sonifiziert und die nicht gelösten Bestandteile bei 15000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C in einer Heraeus Zentrifuge abzentrifugiert. Vom Überstand wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt und 20 µg Protein sowohl für ein 10 % SDS-Gel als auch für einen Western Blot eingesetzt.

Die Kulturflaschen mit den Zellen für die Migrations-Analyse wurden mit Medium aufgefüllt und aufrecht für mindestens 20 Minuten in den Brutschrank gestellt, um eine optimal CO<sub>2</sub>-Sättigung des Mediums zu gewährleisten. Die Migrations-Analyse erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera auf einem Lichtmikroskop (siehe Kapitel 3.2.15).

Die Zellen für die Proliferationsanalysen wurden wie oben beschrieben mit BrdU behandelt und gefärbt.

<b>siRNA Target</b>	<b>siRNA Sequenz</b>	<b>Firma</b>
Unspezifische Kontrolle, Fluorescein-gekoppelt	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Qiagen Kat.Nr. 1022079
Vimentin (Ratte)	AGGAATGGTACAAGTCCAAGT	Qiagen eigenes Design
Vimentin-Kontrolle (Ratte)	AGCAGATGATAGCCATGAAGT	Qiagen eigenes Design

### **3.2.18 Migrationsanalyse mit der AC96 Boyden Kammer (NeuroProbe)**

Zunächst erfolgte die Beschichtung des Polycarbonat-Filters (NeuroProbe 301-417-0014) mit 100 µg/ml Collagen gelöst in 0,5 M Essigsäure, danach mit 10 µg/ml Fibronectin gelöst in Wasser und schließlich ein Waschschrift mit serumfreiem DMEM für jeweils eine Minute. Zwischen den Behandlungen wurde der Filter vollständig bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Medien mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen (10%, 5%, 0%) wurden vorbereitet, bevor die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und im Casy 1 gezählt wurden. Es folgte die Herstellung einer Zellsuspension von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml DMEM + 1% Serum.

Die unteren Kammern wurden mit jeweils 25 µl serumhaltigem Medium gefüllt. Der beschichtete Filter wurde in den oberen Teil der Boyden-Kammer eingespannt, luftblasenfrei auf den unteren Teil der Boyden-Kammer aufgesetzt, zügig mit den Schrauben fixiert und die oberen Kammern mit 50 µl der entsprechenden Zellsuspension gefüllt.

Es folgte eine Inkubation im Brutschrank über Nacht, bevor der Filter wieder aus der Boyden-Kammer entnommen, in absolutem Methanol bei 4°C für 2 Stunden fixiert und die Zellen anschließend mit der Diff-Quick-Färbung (Dade-Behring) sichtbar gemacht wurden. Nach der Färbung wurden die überschüssigen Zellen auf der Oberseite des Filters mit einem feuchten Tuchs entfernt, der Filter getrocknet, zerteilt und die Stücke jeweils mit der Unterseite nach oben auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus) bei vierzigfacher Vergrößerung. Für die Auswertung wurden aus drei unabhängigen Versuchen jeweils drei Kammern pro Ansatz ausgezählt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das in vivo-Modell: Ausbildung von Kollateralarterien im Rattenhinterlauf

#### 4.1.1 Induktion der Arteriogenese im Rattenhinterlauf durch Ligatur der Femoralarterie

Für die in vivo-Studien diente das in der Arbeitsgruppe bereits gut etablierte Modell der Femoralarterien-Ligatur im Rattenhinterlauf. Hierfür wurde die Arteria femoralis durch doppelte Ligatur künstlich okkludiert und infolge dessen die Ausbildung von Umgehungskreisläufen, den Kollateralarterien, induziert (Herzog et al., 2002). In der Abbildung 4.1 ist das Kollateralwachstum im Rattenhinterlauf angiographisch dargestellt. Die Arteria femoralis, mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, ist im Kontrollbein unversehrt. Im ligierten Bein ist die Durchtrennung deutlich zu erkennen. Die weißen Pfeile markieren die präexistierende Anastomose in der Kontrolle bzw. die gewachsene Kollateralarterie mit ihrer typischen Korkenzieherform im ligierten Bein. Sie zweigt von der Arteria iliaca interna ab (linke Bildhälfte) und mündet in die Arteria poplitea, die schließlich zur Arteria femoralis aufschließt. Zur Verdeutlichung ist in der Abbildung der Entwicklungsstand 7 Tage post Okklusion gezeigt, in der die Ausbildung der Kollaterale gut zu sehen ist.

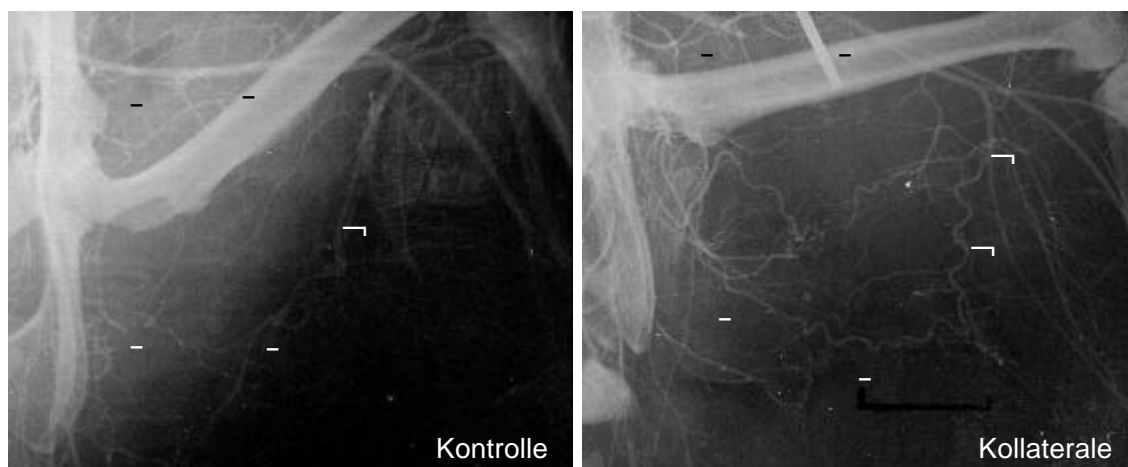


Abbildung 4.1: Angiographische Darstellung von präexistierender Anastomose bzw. Kollateralarterie (weiße Pfeile) im Hinterbein der Ratte vor bzw. 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie (schwarze Pfeile).

#### 4.1.2 Vergleich des Proteinexpressionsmusters von Kollateral- bzw. Kontrollgefäß-Extrakten

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Proteine bei der Arteriogenese bedeutend sein könnten, wurden Extrakte von Kollateralarterien und von Kontrollgefäßen in vergleichende Proteinexpressionsanalysen einbezogen. Die Studien wurden mit Hilfe der 2-dimensionalen Gelelektrophorese durchgeführt, da diese Methode ein weites Spektrum der exprimierten Proteine erfasst. In der Abbildung 4.2 sind mit Sypro Ruby gefärbte 2D-Gele zu sehen. Gel 4.2A zeigt das Proteinexpressionsmuster von Kollateralarterien, Gel 4.2B die Proteinspotverteilung von Kontrollgefäßen. Differenziell regulierte Proteine, in den Gelen mit Nummern markiert, wurden mit der Auswertungssoftware PDQuest von der Firma Bio-Rad analysiert und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Einige der analysierten Proteine wie z.B. Albumin (Protein 2) und humanes Keratin (Protein 4) stellten sich als Kontaminationen heraus. Alle weiteren Proteine erwiesen sich als signifikante Ergebnisse. Dabei konnte Kollagen (Protein 1) ausschließlich in dem Extrakt der Kontrollgefäße und Vimentin (Protein 5) nur im Kollateralextrakt detektiert werden. Annexin (Protein 3) zeigte eine fünffach erhöhte Konzentration im Kollateralextrakt. Da der Unterschied in der Vimentinexpression sehr auffällig war, und dieses Protein als zytoskeletäre Komponente für die in dieser Arbeit vorliegende Fragestellung besonders interessant erschien, wurde sich bei weiteren Studien auf das Intermediärfilament konzentriert.

NUMMER	PROTEIN	EXPRESSION	MW (KDA)	PI
1	Kollagen	Nur in Kontr.	150	9,2
2	Albumin	5fach - in Kol	68,7	6,09
3	Annexin	5fach - in Kol	35,7	4,9
4	Keratin	Nur in Kontr.	67	3,7
5	Vimentin	Nur in Kol	53,7	5,06

Tabelle 4.1:

Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse der im 2D-Gel als unterschiedlich exprimiert identifizierten Proteine. Die entsprechende Verteilung der Proteinspots ist in Abbildung 4.2 dargestellt. MW=Molekulargewicht, PI= isoelektrischer Punkt, Kol=Kollaterale, Kontr.=Kontrolle.

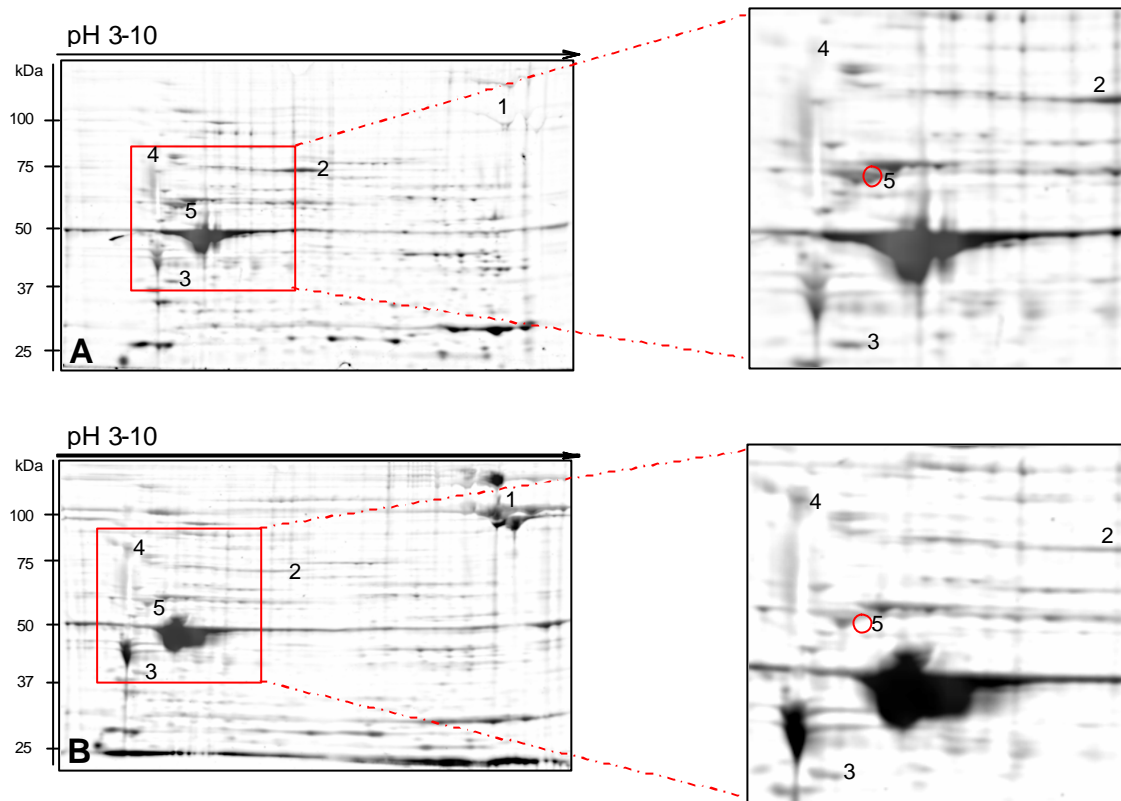


Abbildung 4.2:

2D-Gele von Kollateralarterien- (A) bzw. Kontrollgefäß-Extrakten (B). Unterschiedlich exprimierte Proteine sind mit Nummern gekennzeichnet. Der in Kollateralen am deutlichsten hochregulierte Proteinspot ist in den Vergrößerungen zusätzlich mit einem Kreis markiert. Massenspektrometrische Analysen ergaben folgende Identifizierungen: Protein 1=Kollagen, 2=Albumin, 3=Annexin, 4=Keratin, 5=Vimentin. Die Eigenschaften der einzelnen Proteine werden in Tabelle 4.1 und im Text näher erläutert.

Obwohl die Resultate der 2D-Gelelektrophorese sehr deutlich waren, sollte der Unterschied in der Vimentin-Expression mit einer weiteren Methode verifiziert werden. Hierfür wurden die Gefäßextrakte zusätzlich im Western Blot auf ihren Vimentingehalt hin überprüft. Die Immunfärbung gegen Vimentin ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen die PI3-Kinase eingesetzt (p85). Die unteren Banden zeigen, dass das Vimentin-Signal bei Kollateralarterien deutlich stärker ausgeprägt ist als bei Kontrollgefäßen. Damit konnte das Ergebnis der 2D-Elektrophorese auch im Western Blot bestätigt werden.

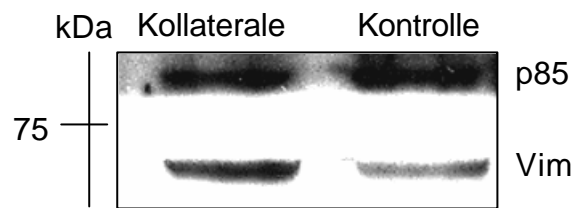


Abbildung 4.3:

Western Blot von Extrakten aus Kollateralarterien und Kontrollgefäßen. P85 wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Vim= Vimentin, Die Konzentration an Vimentin ist in Kollateralextrakten deutlich höher als in Kontrollextrakten.

Die 2D-elektrophoretischen und Western Blot Analysen ergaben, dass das Intermediärfilament Vimentin in Kollateralarterien wesentlich stärker exprimiert wird als in Kontrollgefäßen. Folglich stellte sich die Frage, ob das zytoskeletäre Protein bei dem Kollateralwachstum eine funktionelle Bedeutung hat. Um dieser Frage nachzugehen, sollte die Vimentinexpression und –funktion zunächst auf zellulärer Ebene geklärt werden. Um hierbei möglichst stabile Versuchsbedingungen voraussetzen zu können, wurden *in vitro* Studien an Zelllinien und nicht an primären Zellen durchgeführt. Für das *in vitro* Modell wurden Endothelzelllinien gewählt, da die Endothelschicht von Gefäßen in direktem Kontakt zum Blut steht und daher sämtliche Veränderungen in der Blutflussgeschwindigkeit und der Schubspannung unmittelbar auf das Endothel einwirken. Die Verwendung von zwei Endothelzelllinien, von denen die eine einen vorwiegend proliferierenden Phänotyp hat und die andere einen überwiegend migrierenden Phänotyp, erlaubte die Reflexion der verschiedenen Phasen (Proliferation und Remodeling) des Kollateralwachstums *in vitro*. Nachfolgend wird zunächst die Charakterisierung der Endothelzelllinien beschrieben, bevor auf die Analysen der funktionellen Bedeutung von Vimentin eingegangen wird.

## **4.2 Das in vitro Modell: Charakterisierung der Endothelzelllinien**

### **4.2.1 RHE A und RHE neg Zellen: zwei Phänotypen**

Der Ursprung der beiden verwendeten Zelllinien liegt in einer von D.J. Derhaag isolierten Endothelzelllinie aus dem Rattenherzen. Unter herkömmlichen Kulturbedingungen erwies sich diese Rattenherz-Endothelzelllinie als heterogene Population, die sich aus zwei phänotypisch verschiedenen Zellen zusammensetzte. Durch starke Verdünnung der Zellen wurden diese vereinzelt und eine Zelle eines jeden Phänotyps subkloniert. Daraus entstanden zwei neue Endothelzelllinien, die als RHE A bzw. RHE neg Zellen benannt wurden.

In Abbildung 4.4 sind beide Phänotypen in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt: Die in Abbildung 4.4A (10 x) und 4.4C (20 x) illustrierten RHE A Zellen zeigten in Kultur ein verstreutes Wachstum. Sie waren durch einen sehr ausgeprägten zytosolischen Bereich gekennzeichnet, durch den sie Durchmesser von bis zu 30 µm erreichten. Weiterhin bildeten die Zellen deutliche Lamellipodien und Filopodien aus.

Die in Abbildung 4.4B (10 x) und 4.4D (20 x) dargestellten RHE neg Zellen wuchsen dagegen in Kultur in dichten, kleinen inselförmigen Strukturen. Dabei bildeten sie das für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterartige Muster aus. Sie hatten im Vergleich zu den RHE A Zellen ein relativ kleines zytoplasmatisches Areal und erreichten daher im Durchmesser nur eine Größe von 10-15 µm. Die Ausbildung von Lamellipodien oder Filopodien konnte bei den RHE neg Zellen nicht beobachtet werden.

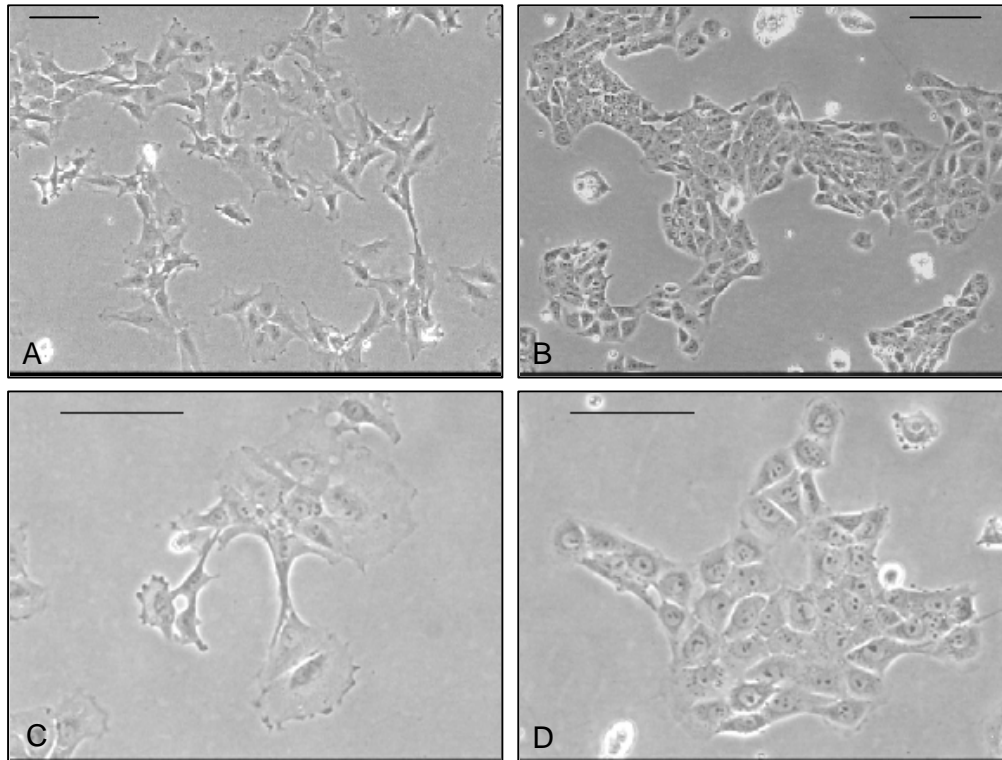


Abbildung 4.4:

Phasenkontrastbilder von RHE A und RHE neg Zellen. A & C: RHE A Zellen wachsen in Kultur verstreut auf dem Flaschenboden, haben einen ausgeprägten zytosolischen Bereich und bilden deutliche Lamellipodien aus. B & D: RHE neg Zellen wachsen in Kultur in kleinen dichten Inseln, haben einen kleinen zytosolischen Bereich und bilden keine Lamellipodien aus. A & B: 10x vergrößert, C & D: 20x vergrößert. Balken = 40 µm.

#### 4.2.2 Bestätigung des endothelialen Charakters von RHE A und RHE neg Zellen

Es besteht die Möglichkeit, dass Zellen unter extremen Bedingungen, wie z.B. der starken Verdünnung vor der Subklonierung, die Genexpression verändern und dadurch verschiedene Eigenschaften verlieren oder hinzugewinnen. Mit der Färbung der beiden neu klonierten Zelllinien mit Antikörpern gegen verschiedene endothelspezifische Proteine (Flk-1, Flt-1 und CD54) sollte deren endothelialer Ursprung bestätigt werden. Die Abbildung 4.5 veranschaulicht, dass sowohl RHE A- als auch RHE neg-Zellen in FACS-Messungen eine signifikante Expression der getesteten, endothelialen Markerproteine zeigten. Im Vergleich mit den Negativkontrollen (nicht gefüllte Kurven) ist jeweils eine deutliche Verschiebung der Signale der spezifisch gefärbten Zellen (gefüllte Kurven) in den intensiveren Fluoreszenzbereich erkennbar.



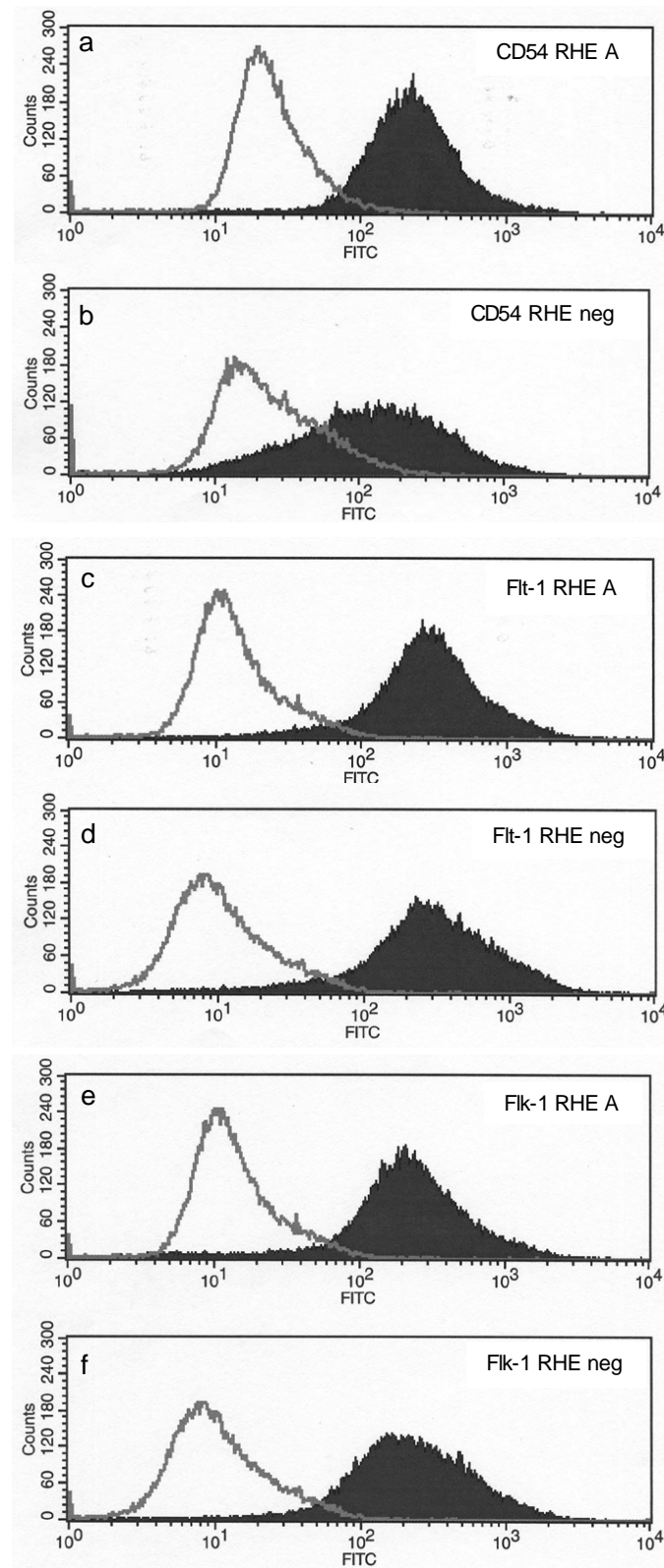


Abbildung 4.5

Immunzytologische Färbung von RHE A und RHE neg Zellen gegen verschiedene endothelspezifische Markerproteine wie CD54 (a: RHE A, b: RHE neg), Flt-1 (c: RHE A, d: RHE neg) und Flk-1 (e: RHE A, f: RHE neg). Die nicht gefüllten Kurven stellen die Negativkontrollen und die gefüllten Kurven die Signale der gefärbten Zellen dar. Von jeder Probe wurden in FACS-Messungen 30000 Zellen analysiert.

Die ausgeprägte Expression der verschiedenen endothelialen Proteine ließ bereits auf die Manifestierung des endothelialen Charakters der neu klonierten Zelllinien schließen. Dennoch sollten weiterhin potentielle, epitheliale Eigenschaften der Zellen ausgeschlossen werden. Dies ermöglichte eine immunzytologische Färbung der Zellen gegen das epitheliale Markerprotein Zytokeratin. Wie in Abbildung 4.6 illustriert, zeigten weder RHE A- noch RHE neg-Zellen eine Expression von Zytokeratin. Die Aktivität des eingesetzten Antikörpers wurde durch die deutlich sichtbare Färbung der Positivkontrolle, die aus Kryoschnitten von Rattenhaut bestand, bestätigt.

Die Kombination der positiven endothelspezifischen und der negativen epithelspezifischen Färbungen bestätigte sowohl die RHE A- als auch die RHE neg-Zellen als Zelllinien endothelialen Ursprungs.

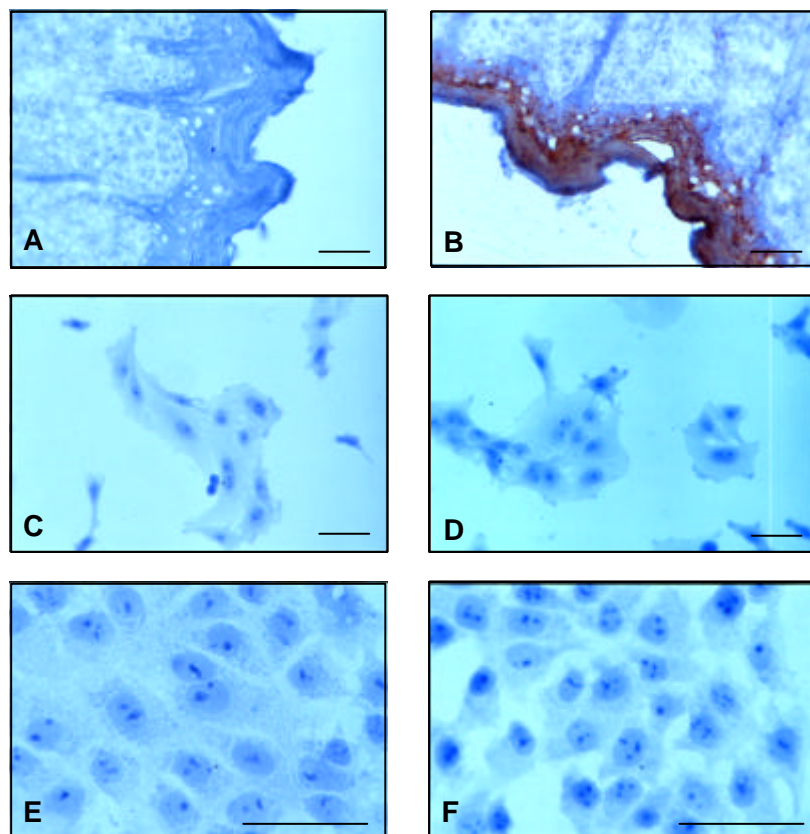


Abbildung 4.6:

Immunhistochemische Färbung gegen Zytokeratin. A & B: Kryoschnitte (10 µm) von Haut neonataler Ratten als positive Kontrolle, 40x vergrößert. C & D: RHE A Zellen, 40x vergrößert. E & F: RHE neg Zellen, 100x vergrößert. A, C & E: Negativkontrollen ohne primären Antikörper, B, D & F: spezifisch gefärbte Proben. Weder RHE A noch RHE neg Zellen exprimieren Zytokeratin. Balken = 10 µm.

### **4.2.3 Vergleich des Migrationsvermögens beider Zelllinien**

Die ausgeprägten phänotypischen Unterschiede zwischen RHE A und RHE neg Zellen wurden bereits in Kapitel 4.2.1 angesprochen. Während RHE A Zellen verstreut auf dem Boden der Kulturgefäße wuchsen und deutliche Lamellipodien ausbildeten, formierten sich RHE neg Zellen in Kultur zu dichten Gruppen ohne Ausbildung von Ausläufern. Die Fähigkeit der RHE A Zellen sich derart auszubreiten, ließ bereits deren Mobilität vermuten. In der Tat konnte die individuelle Migration von RHE A Zellen, wie in Abbildung 4.7 gezeigt, durch videomikroskopische Aufnahmen beobachtet werden. In der Bilderserie ist von oben nach unten die Bewegung der RHE A Zellen innerhalb eines 10-minütigen Zeitfensters dargestellt. Die mit dem weißen Pfeil markierte Zelle entfernte sich deutlich von den benachbarten Zellen. Die reversible Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte wurde anhand der verschiedenen lokalisierten schwarzen Punkte am Zellrand sichtbar.

In der Bilderserie der RHE neg Zellen, die das Verhalten der Zellen innerhalb eines 15-minütigen Zeitfensters zeigt, konnte man dagegen keinerlei Bewegung feststellen. Die mit dem weißen Pfeil markierte Zelle blieb den gesamten Zeitraum über an einer Stelle fixiert. Weiterhin konnte man keine sichtbare Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte beobachten.

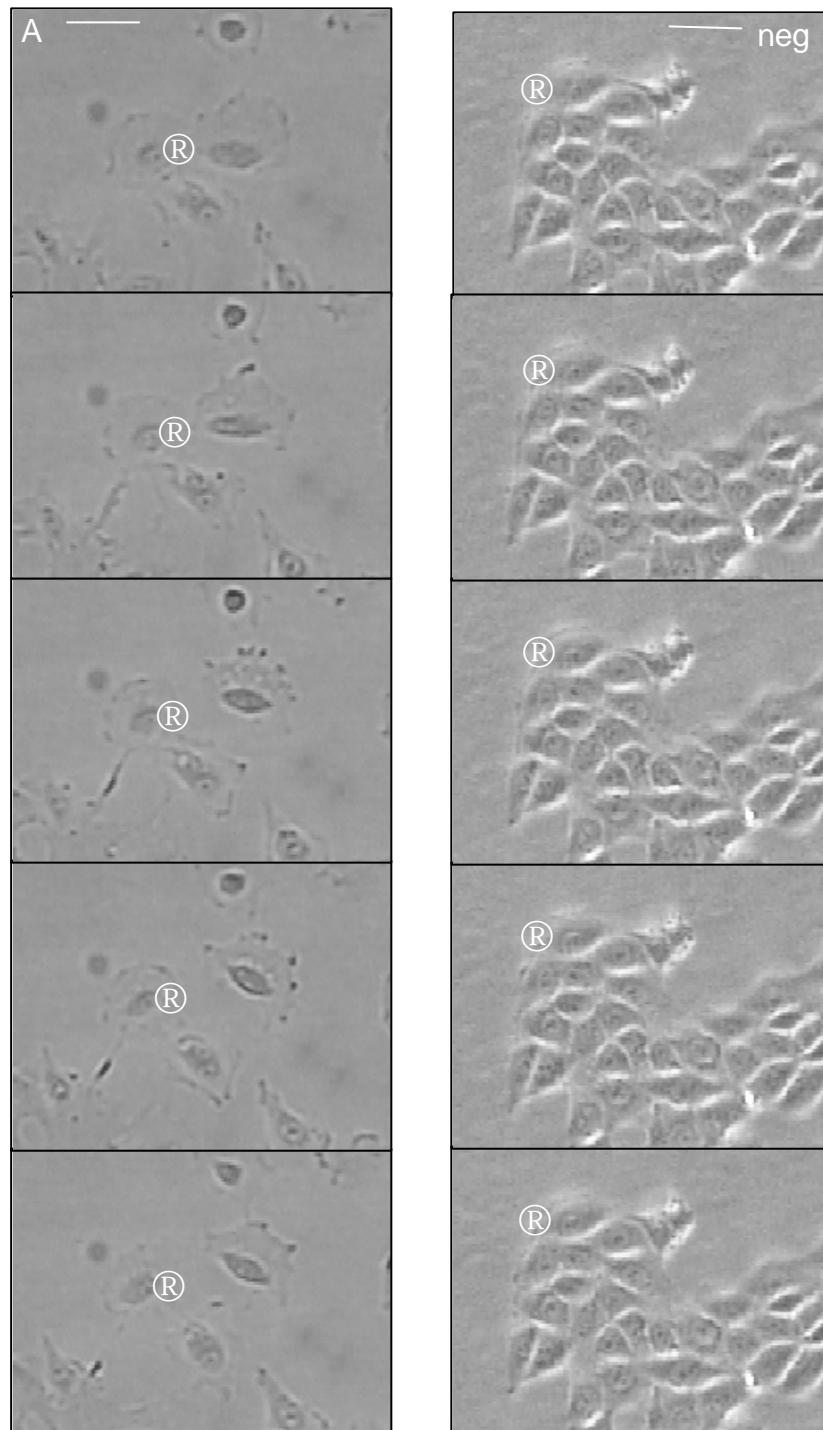


Abbildung 4.7:

Unterschiedliches Migrationsverhalten bei RHE A und RHE neg Zellen: Gezeigt sind Auszüge aus videomikroskopischen Aufnahmen (10x vergrößert), die die Wanderung innerhalb eines 10-minütigen (RHE A) bzw. eines 15-minütigen (RHE neg) Zeitfensters veranschaulichen. Während die Bewegung der A-Zellen deutlich zu erkennen ist, bleiben die neg-Zellen immobil (Beispiele sind mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet). Balken = 20  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 4.7 ist das kurzfristige Migrationsverhalten der Zelllinien anhand einer beispielhaften Zelle veranschaulicht worden. Wie deutlich der Unterschied in der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit zwischen A- und neg-Zellen nach längerfristigen Beobachtungen war, wird durch die Analyse der videomikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe der ImagoQuant-Software geklärt. Beide Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 7 Stunden gefilmt, wobei die einzelnen Bilder in Intervallen von einer Minute aufgenommen wurden. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen, ergab die Auswertung der Filme, dass RHE A Zellen sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$  fortbewegten, während RHE neg Zellen mit  $0,04 \mu\text{m}/\text{min}$  weniger als halb so schnell waren.

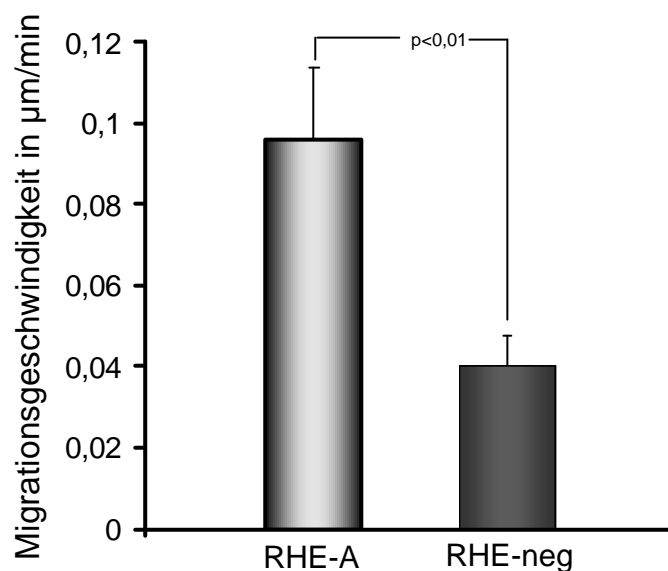


Abbildung 4.8:  
Videomikroskopische Analyse der Migrationsgeschwindigkeit von RHE-A und RHE-neg Zellen.  
Innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 7 Stunden (ein Bild pro Minute) migrieren RHE-A Zellen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ , während RHE-neg Zellen mit durchschnittlich  $0,04 \mu\text{m}/\text{min}$  nicht halb so schnell sind. A:n=20, neg:n=18.

#### 4.2.4 Vergleich der proliferativen Aktivität beider Zelllinien

Als weitere Eigenschaft der Zelllinien wurde nach der Fähigkeit zur Migration auch deren proliferative Aktivität untersucht. Bereits während der Kultivierung der Zellen war auffällig, dass sich die RHE neg Zellen wesentlich teilungsaktiver verhielten als RHE A Zellen. Für das Passagieren mussten RHE neg Zellen 1:5 verdünnt werden, für RHE A Zellen reichte eine Verdünnung von 1:3 aus. Dieser subjektive Eindruck sollte durch Proliferations-Experimente, bei denen das Thymidin-Analogon Bromodesoxy-Uridin (BrdU) in die DNA der sich teilenden Zellen eingebaut wurde, verifiziert werden. Die mit BrdU markierten Zellen wurden mit

einem anti-BrdU-Antikörper behandelt und mit Hilfe von FACS-Messungen analysiert. Abbildung 4.9 stellt diese anhand eines Beispiels (4.9A: RHE A Zellen, 4.9B: RHE neg Zellen) und Abbildung 4.10 in der Gesamtanalyse von acht unabhängigen Experimenten dar. Nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit BrdU hatten durchschnittlich 15 % der RHE A und 55 % der RHE neg Zellen das Thymidin-Analogon in die DNA eingebaut.

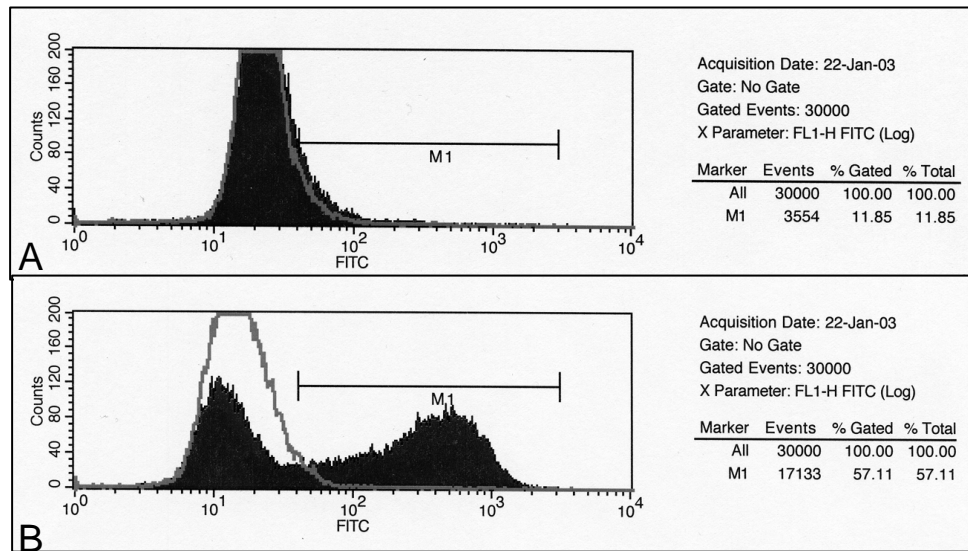


Abbildung 4.9:

Proliferationsassay von RHE A und RHE neg Zellen. Gezeigt sind FACS-Analysen einer immunzytochemischen Färbung gegen BrdU, nachdem die Zellen für 2 Stunden mit BrdU inkubiert worden sind. 12 % der RHE A Zellen (A) und 57 % der RHE neg Zellen (B) haben BrdU inkorporiert.

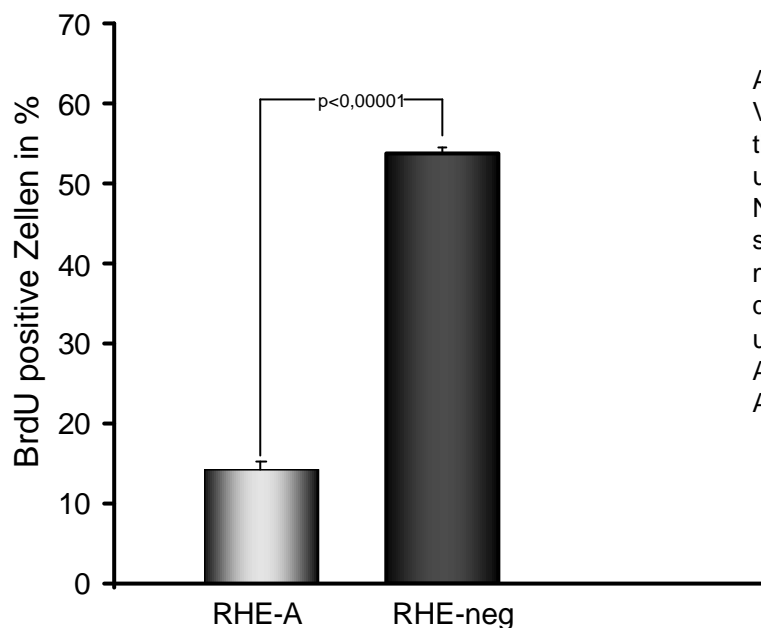


Abbildung 4.10:  
Vergleich der Proliferationsraten von RHE-A und RHE-neg Zellen. Nach einer zwei-stündigen Inkubation mit BrdU haben 55 % der RHE-neg Zellen und nur 15 % der RHE-A Zellen das Thymidin Analogon eingebaut.

Diese Ergebnisse bestätigten eindeutig die Erfahrungen aus der Zellkultur und bescheinigten den RHE neg Zellen einen stark proliferierenden Phänotyp, während die RHE A Zellen, wie in Abb. 4.7 und 4.8 gezeigt, einen vorwiegend migrierenden Phänotyp aufzeigten. Mit diesen Eigenschaften eignen sich die beiden Zelllinien optimal, um die Proliferations- und die Remodeling-Phase des Kollateralwachstums in vitro nachvollziehen zu können.

#### 4.2.5 Vergleich des Protein-Expressionsmusters von RHE A und RHE neg Zellen: Die 2D-Elektrophorese

Beide in dieser Arbeit untersuchten Endothelzelllinien entstammten einer Ursprungszelllinie. Sie wiesen eine vergleichbare Expression verschiedener endothelialer Markerproteine auf, zeigten aber auch ausgeprägte Unterschiede im Phänotyp, im Migrations- und im Proliferationsvermögen. Diese wurden im bisherigen Ergebnisteil deskriptiv behandelt. Der folgende Abschnitt fokussiert sich auf die Frage, welche Ursachen dem unterschiedlichen Verhalten der Geschwister-Zelllinien zugrunde liegen. Da sämtliche Verhaltensweisen von Zellen aus dem Zusammenspiel verschiedener Proteine resultieren, sollten die Zelllinien auf Unterschiede in ihren Proteinexpressionsmustern hin untersucht werden. Weiterhin war von Interesse, ob das in den Kollateralarterien als verstärkt

exprimiert gefundene Vimentin auch in den verschiedenen Zelllinien einer Regulation unterliegt. Für diese Studien kam, wie schon zuvor bei den Gefäßextrakten, die 2-dimensionale Gelelektrophorese zum Einsatz.

Die zytosolischen Proteinextrakte von RHE A und RHE neg Zellen wiesen, wie von Geschwister-Zelllinien erwartet werden konnte, ein ähnliches Expressionsmuster auf. Gleichzeitig ließen sich aber auch auffällige Unterschiede in der Proteinspot-Verteilung erkennen. In Abbildung 4.11 sind in einem kombinierten 2D-Gel zytosolische Proteine von RHE A und RHE neg Zellen, die sich in einem Bereich von pH 3-10 und 20-100 kDa auftrennen ließen, illustriert. Nach Analyse mit der Auswertungs-Software PDQuest als differenziell exprimiert erkannte Proteine sind aus dem Gel ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert worden.

Wie in Tabelle 4.2 dargestellt, waren hauptsächlich vier Proteingruppen in den beiden untersuchten Zelllinien in unterschiedlicher Konzentration vorhanden. Dazu gehörten zum einen zytoskeletäre Proteine wie Aktin und das bereits in den Kollateralextrakten gefundene Vimentin. Diese Proteine lagen in den Extrakten der RHE A Zellen deutlich höher konzentriert vor. Die Konzentration des Aktins war in RHE neg Extrakten dreifach geringer als in RHE A Lysaten. Die Konzentration des Vimentins lag bei RHE neg Zellen sogar unterhalb der Detektionsgrenze. Zum anderen waren Signalproteine reguliert, die zur Familie der Hitzeschockproteine gehören bzw., wie im Fall der alpha-Enolase, bei Stoffwechselwegen wie dem glykolytischen Abbau zum Tragen kommen. Letztere Proteine waren in RHE A Extrakten dreifach geringer konzentriert als in den RHE neg Lysaten.



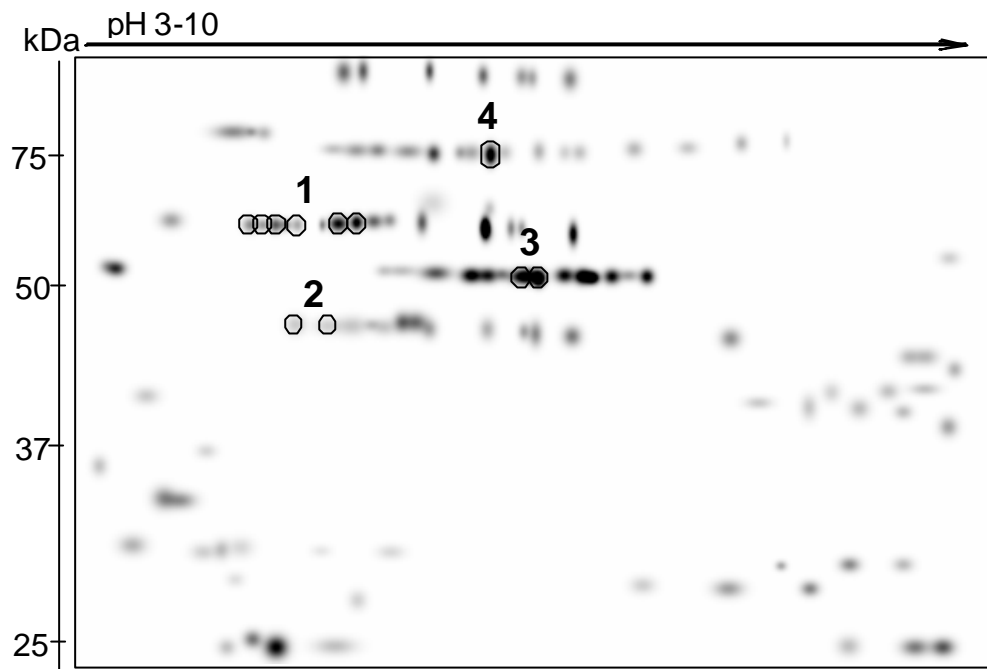


Abbildung 4.11:

Mit PDQuest kombiniertes 2D-Gel aus zytosolischen Extrakten von RHE A und RHE neg Zellen. Die markierten Proteine sind in den Zelllinien unterschiedlich exprimiert und wurden massenspektrometrisch identifiziert (Tabelle 4.2). Direkt nebeneinander liegende Spots stellen verschieden modifizierte Isoformen eines Proteins dar.

NUMMER	PROTEIN	EXPRESSION	MW (KDA)	PI
1	Vimentin	nur in RHE-A Zellen	53,7	5,06
2	Aktin	3fach - in RHE-A Zellen	41,7	5,31
3	$\alpha$ -Enolase	3fach - in RHE-A Zellen	47,2	5,84
4	HSP-70-8, Mortalin	3fach - in RHE-A Zellen	70,8	5,37

Tabelle 4.2:

Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der im 2D-Gel als differenziell exprimiert identifizierten Proteine.

#### **4.2.6 Unterschiede in der Vimentin-Expression von RHE A und RHE neg Zellen**

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien lagen bei der Migration und der Proliferation und damit in Bereichen, die auch für die Phasen des Kollateralwachstums entscheidend sind. Beide Vorgänge sind unmittelbar mit dem Zytoskelett verknüpft bzw. werden über Veränderungen im zytoskeletären Bereich vermittelt. Dass das Intermediärfilament Vimentin sowohl in Kollateralen als auch in Endothelzellen mit migrierendem Phänotyp hochreguliert war, veranlasste zu einer vertieften Analyse der möglichen funktionellen Folgen.

In Abbildung 4.12 ist noch einmal das Ergebnis der 2-dimensionalen Auftrennung zytosolischer Proteine für beide Zelllinien getrennt dargestellt. Der Auftrennungsbereich lag wie beim vorherigen 2D-Gel zwischen pH 3-10 und 20-100 kDa. Das Gel 4.12A, in dem das Expressionsmuster von RHE neg Zellen gezeigt ist, lässt kein positives Vimentinsignal erkennen (eingekreiste Bereiche). Im Gel 4.12B, der Proteinverteilung von RHE A Zellen, sind dagegen die sichtbaren Vimentinspots markiert.

Wie bei den Gefäßextrakten wurde auch hier das Ergebnis durch zweidimensionale Western Blots, die mit einem spezifischen Antikörper gegen Vimentin gefärbt wurden, bestätigt. In den Immunfärbungen erscheint nur auf dem Blot der RHE A Extrakte ein positives Signal (4.12D). Die Vimentinkonzentration im RHE neg Extrakt liegt auch im Western Blot unterhalb der Detektionsgrenze (4.12.C).

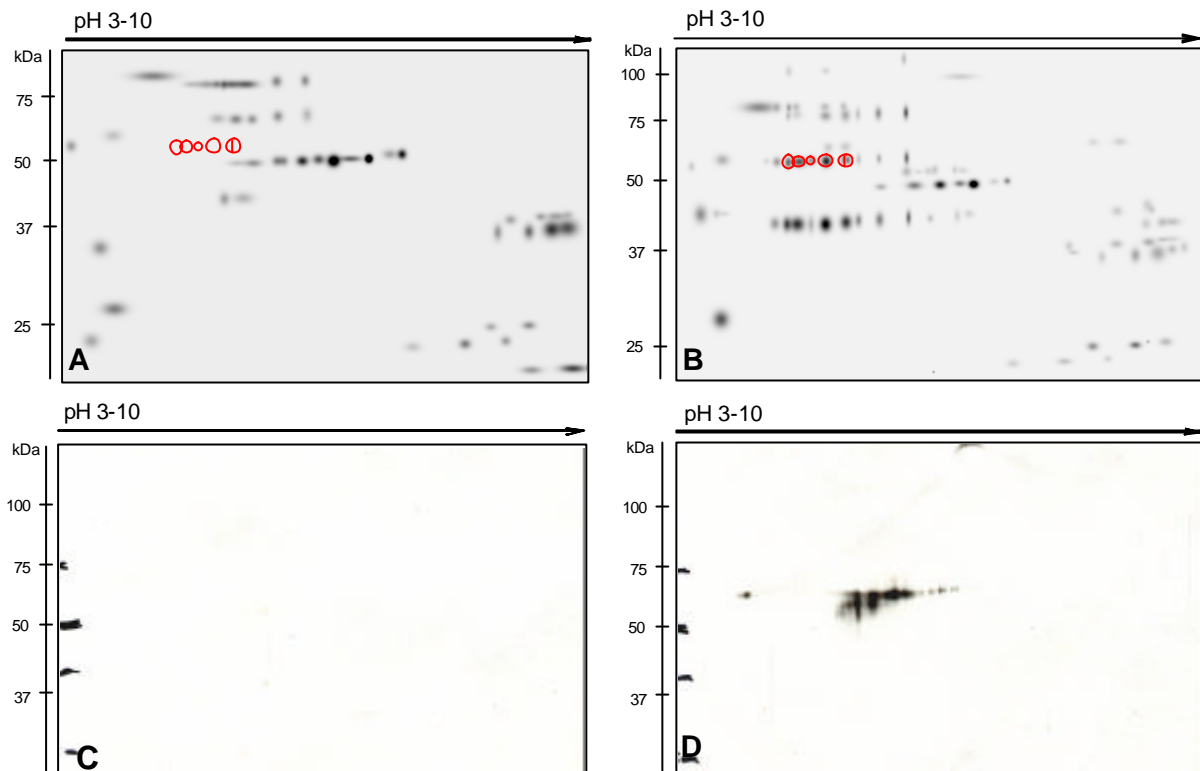


Abbildung 4.12:

2D-Gele zytosolischer Extrakte von RHE neg (A) und RHE A-Zellen (B). Vimentin (markierte Spots) ist in den mit Sypro Ruby gefärbten Gelen nur im RHE A-Extrakt detektierbar. Abb. C & D = Western Blots der entsprechenden 2D-Gele. Mit einem spezifischen Vimentin-Antikörper wird nur in dem Blot des RHE A-Extraktes (D) ein Signal sichtbar, nicht jedoch in dem Blot des RHE neg-Extraktes (C).

#### 4.2.7 Etablierung der Transfektion von RHE A Zellen mit siRNA

Wenn man die bisherigen Ergebnisse des Vergleichs der beiden Zelllinien zusammenfasst fällt auf, dass das Migrationsvermögen der RHE A Zellen mit einer signifikant erhöhten Vimentinexpression der Zellen einherging. Das Intermediärfilament Vimentin ist bei der Migration von Fibroblasten und Epithelzellen bedeutsam (Gilles et al., 1999) (Eckes et al., 1998). Ein Zusammenhang zwischen der Endothelzell-Migration und der Expression von Vimentin ist dagegen bisher noch nicht bekannt. Da die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse aber einen möglichen Zusammenhang dieser beiden Phänomene vermuten ließen, sollte die funktionelle Bedeutung des Vimentins in RHE A Zellen direkt analysiert werden. Zur funktionellen Untersuchung eines Proteins kann entweder die Reaktion der Zellen auf dessen Überexpression oder auf dessen Suppression beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Protein-Suppression mittels der RNA-Interferenz-Methode gewählt. Hierfür wurden die Zellen mit spezifischen

kleinen RNA-Oligonukleotiden (small interference RNA, siRNA) transfiziert, die sich mit der endogenen messenger RNA des Zielproteins verbinden, um dann als doppelsträngige RNA von der Zelle als falsch erkannt und gezielt abgebaut zu werden. Folglich fehlte diese mRNA für die Translation und das Zielprotein konnte nicht gebildet werden. Da jede Zellpopulation unterschiedlich sensitiv gegen die Behandlung mit Transfektionsreagenzien ist, bestand die Notwendigkeit zur Optimierung der Transfektionseffizienz. Es musste ein Kompromiss zwischen ausreichender siRNA-Aufnahme und höchstmöglicher Überlebensrate der Zellen gefunden werden. Für die Etablierung der RNA-Interferenz-Methode wurde eine Fluoreszenz-gekoppelte, unspezifische siRNA eingesetzt, die zwar keinen Suppressionseffekt hatte, aber deren Aufnahme mit Hilfe eines Durchflusszytometers gut dargestellt werden konnte.

Wie in Abbildung 4.13 zu sehen, ließen sich die RHE A Zellen unter Verwendung von 5 µg/6well siRNA und 5 µl/6well des Transfektionsreagenzes Lipofectamin von der Firma Invitrogen zu über 99 % mit siRNA transfizieren. Die Überlebensrate der Zellen betrug hierbei über 97 %. Für alle weiteren Transfektions-Experimente wurde das entsprechende Protokoll eingesetzt.

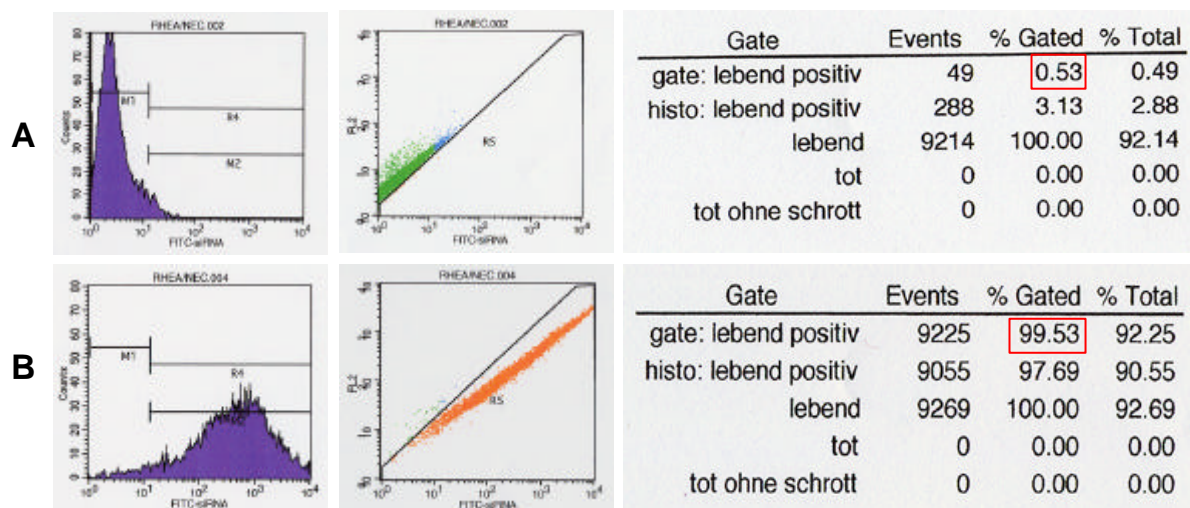


Abbildung 4.13: Optimierung der Transfektion von RHE A Zellen mit siRNA. Mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter, unspezifischer siRNA kann im FACS die nötige Menge an Transfektionsreagenz für die optimale Transfektionseffizienz ermittelt werden. A: mit 5 µg siRNA behandelte Zellen ohne Zugabe vom Transfektionsreagenz Lipofectamin. B: mit 5 µg siRNA behandelte Zellen nach Zugabe von 5 µl Lipofectamin/6well. Die Zugabe von 5 µl Lipofectamin führt zu einer 99%igen siRNA-Aufnahme bei RHE-A Zellen, bei einer Überlebensrate von über 97 %.

#### **4.2.8 Effekt der Vimentin-Suppression auf das Migrationsverhalten von RHE A Zellen**

Im vorherigen Kapitel wurde die erfolgreiche siRNA-Aufnahme von RHE A Zellen dokumentiert. Die alleinige Aufnahme der siRNA garantiert allerdings noch keine spezifische Suppression des gewünschten Zielproteins. Selbst wenn diese gelingt, bleibt noch ein funktioneller Effekt auf die veränderte Proteinexpression abzuwarten.

In den folgenden Abbildungen kann nicht nur die erfolgreiche Unterdrückung der Vimentin-Expression in transfizierten RHE A Zellen, sondern auch die resultierenden ausgeprägten Veränderungen auf das Migrations- und das Proliferationsvermögen der Zellen präsentiert werden.

Abbildung 4.14 veranschaulicht zunächst die Suppression von Vimentin in spezifisch transfizierten RHE A Zellen anhand eines Western Blots. Als Kontrolle dienten Extrakte unbehandelter Zellen. Neben den mit spezifischer siRNA gegen Vimentin behandelten Zellen sind als weitere Kontrolle Zellen zum Einsatz gekommen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden. Die Sequenz der unspezifischen siRNA unterschied sich von der der Vimentin siRNA nur durch eine Veränderung der Nukleotid-Reihenfolge.

Ein anti-PI-3-Kinase-Antikörper diente als Ladekontrolle, um aufgetragene Proteinmengen im Western Blot abgleichen zu können. Obwohl die geladenen Proteinmengen nicht bei allen drei Proben exakt übereinstimmen, ist die Reduktion der Vimentinkonzentration in spezifisch transfizierten Zellen leicht zu erkennen (mittlere Bande unten). Dass die Kontroll siRNA keinen supprimierenden Effekt hat wird besonders deutlich, da das Vimentin-Signal dem der unbehandelten Zellen vergleichbar ist, obwohl hier die geringste Menge an Gesamtprotein aufgetragen wurde (rechte Banden).



Abbildung 4.14:

Migrationsanalyse siRNA-transfizierter RHE A Zellen.

Western Blot als Nachweis der Suppression der Vimentin-Translation nach Transfektion von RHE A Zellen mit siRNA. P85: Ladekontrolle, Vim: Vimentin-Signal. Kontrolle: unbehandelte Zellen, siVimentin: mit spezifischer Vimentin-siRNA transfizierte Zellen, siKontr.: mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.

Im Folgenden ist der Effekt der Vimentinsuppression auf das Migrationsvermögen der Zellen dargestellt. Wie bereits in Kapitel 4.2.3 gezeigt, migrierten RHE A Zellen nach videomikroskopischen Analysen im Durchschnitt mit einer Geschwindigkeit von  $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ . Die videomikroskopischen Aufnahmen wurden mit transfizierten Zellen wiederholt. Die Auswertung ergab, wie in Abbildung 4.15 zu sehen, dass die mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen sich mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit fortbewegten wie die unbehandelten Zellen. Die spezifisch transfizierten Zellen wiesen dagegen eine deutlich reduzierte Migrationsgeschwindigkeit auf, die im Durchschnitt bei  $0,05 \mu\text{m}/\text{min}$  lag. Damit führte eine nahezu vollständige Unterdrückung der Vimentinexpression in RHE A Zellen zu einer Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit um 50 %.

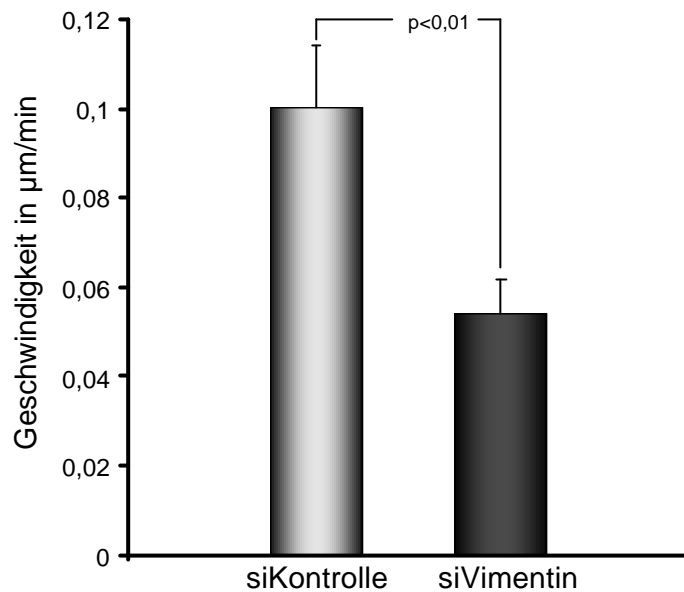


Abbildung 4.15:  
Videomikroskopische Analyse der Migrationsgeschwindigkeit von RHE A Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. Vimentin-siRNA. Nach Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA bleibt das durchschnittliche Tempo vergleichbar mit dem unbehandelter Zellen (0,1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Die Suppression des Vimentins führt zu einer Reduktion der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit um 50 % (0,054  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). n=17

Die Videomikroskopie ist eine elegante Methode um Zellbewegungen darzustellen und auszuwerten. Dennoch ist diese Methode weniger evaluiert als z.B. die Migrationsanalyse in einer Boyden Kammer, bei der sich Zellen aktiv durch eine mit Poren durchsetzte Membran hindurch bewegen müssen. Um zu prüfen, ob die Suppression von Vimentin auch diese Art der Zellbewegung beeinträchtigt, wurden transfizierte Zellen über Nacht in einer Boyden Kammer inkubiert.

Abbildung 4.16 zeigt zunächst die erfolgreiche Suppression von Vimentin in den spezifisch transfizierten RHE A Zellen.

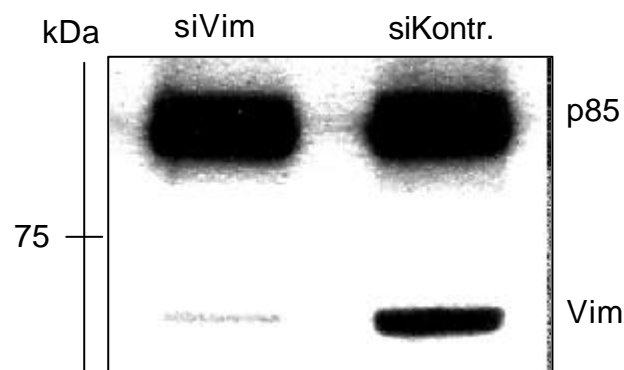


Abbildung 4.16:  
Western Blot als Nachweis für die Vimentinsuppression nach siRNA-Transfektion von RHE A Zellen. P85 = Ladekontrolle, Vim = Vimentinsignal.

In Abbildung 4.17 ist die Abschwächung des Migrationsvermögens in mit Vimentin-siRNA transfizierten Zellen deutlich im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Es migrierten während einer Inkubation über Nacht durchschnittlich 226 ( $\pm$  33) Kontroll-Zellen durch die Membran, während dieses nur 130,4 ( $\pm$  20) der supprimierten Zellen schafften. Das bedeutet, die Anzahl der migrierten Zellen reduzierte sich durch die Suppression von Vimentin um 42,5 %. Dieses Ergebnis korrelierte mit den Daten, die aus den videomikroskopischen Analysen gewonnen wurden, bei der die Vimentinsuppression in Zellen zur Halbierung der Migrationsgeschwindigkeit führte.

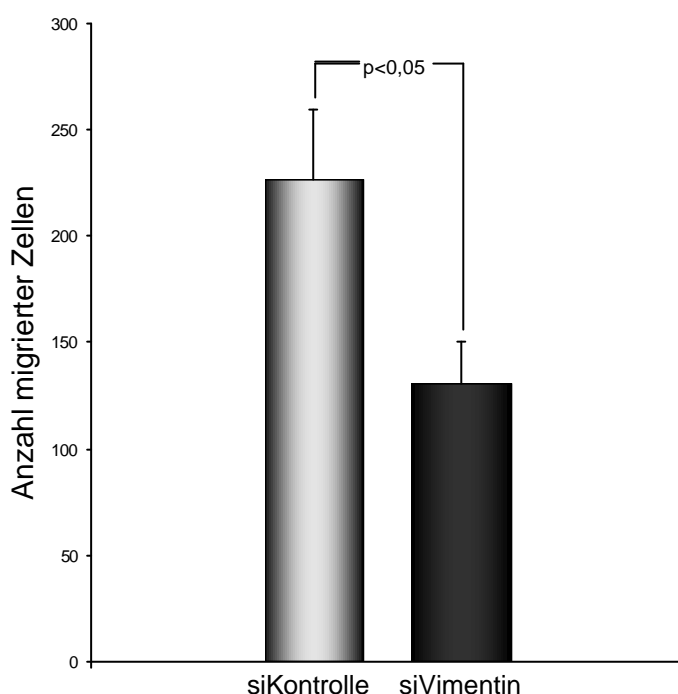


Abbildung 4.17: Migrationsanalyse von siRNA-transfizierten RHE-A Zellen in der Boyden Kammer. Die Suppression von Vimentin führt zu einer Reduktion des Migrationsvermögens um 42,5 %. Die Zellen wurden über Nacht in der Boyden Kammer inkubiert. Als chemotaktischer Lockstoff wurden in den unteren Kammern DMEM + 5% FCS eingesetzt. n = 9

#### 4.2.9 Effekt der Vimentinsuppression auf die Zellproliferation

Eine funktionelle Bedeutung des Vimentins bei der Migration von RHE A Zellen konnte somit nachgewiesen werden. Das Zytoskelett spielt allerdings nicht nur bei der Zellbewegung, sondern auch bei zahlreichen weiteren zellulären Vorgängen eine entscheidende Rolle. Hierzu zählt nicht zuletzt die Zellteilung, bei der das Zytoskelett eine komplette Umstrukturierung erfährt. Aus diesem Grund sollte weiterhin der Effekt der Vimentinsuppression auf die Proliferation der Zellen untersucht werden. In Abbildung 4.18 ist zunächst wieder ein Western Blot als Nachweis der erfolgreichen Eliminierung von Vimentin in RHE A Zellen mittels



siRNA-Transfektion dargestellt. An dem Signal der Ladekontrolle p85 lässt sich erkennen, dass von allen drei untersuchten Proben gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, was den Abgleich der Vimentinkonzentration vereinfacht. Im abgebildeten Fall konnte in der Tat eine komplette Blockierung der Vimentinexpression in den Zellen erreicht werden.

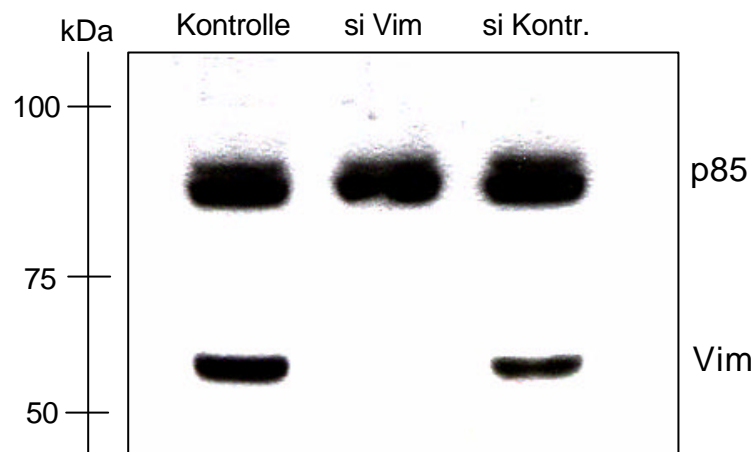


Abbildung 4.18: Proliferationsanalyse siRNA-transfizierter RHE A Zellen. Western Blot als Nachweis der Suppression der Vimentin-Translation nach Transfektion von RHE A Zellen mit spezifischer siRNA. P85: Ladekontrolle, Vim: Vimentin-Signal. Kontrolle: unbehandelte Zellen, siVim: mit spezifischer Vimentin-siRNA transfizierte Zellen, siKontr.: mit unspezifischer Kontroll-siRNA transfizierte Zellen.

Für die Analyse der Proliferationsaktivität der Zellen kam wieder die BrdU-Methode zum Einsatz, die bereits in Kapitel 4.2.4 angesprochen wurde. Die Methode ist allerdings dahingehend verändert worden, dass die Inkubationszeit der Zellen mit dem Thymidin-Analogon von 2 Stunden auf 5,5 Stunden erhöht wurde. Innerhalb dieser 5,5 Stunden wurde das BrdU, wie in Abbildung 4.19 illustriert, von 37 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen in die DNA eingebaut. Im Gegensatz dazu zeigten sich in demselben Zeitraum nur 21 % der mit Vimentin-siRNA transfizierten Zellen BrdU-positiv. Das Fehlen des Vimentins führte folglich zu einer Reduktion der Proliferation von RHE A Zellen um 43 %. Das bedeutet, dass der Status der Vimentin-Expression sich nicht nur maßgeblich auf die Migration von RHE A Zellen, sondern ebenfalls auf deren Fähigkeit zur Proliferation auswirkte.

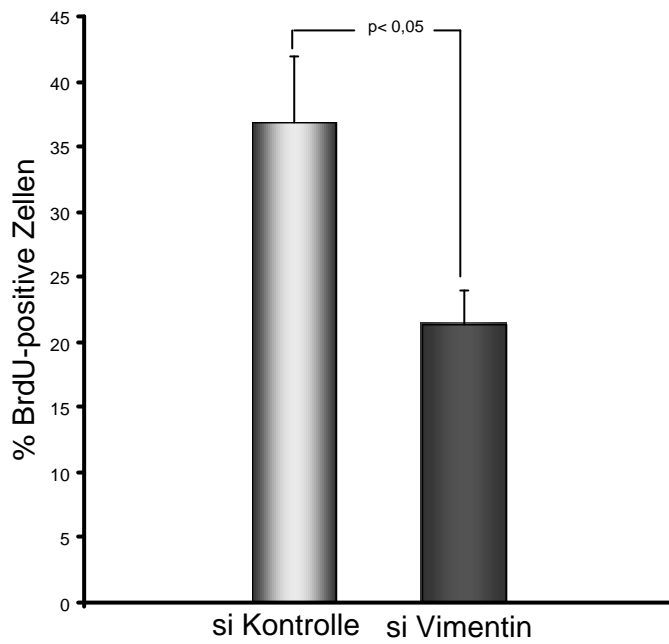


Abbildung 4.19:

Vergleich der Proliferationsrate von transfizierten RHE A Zellen. 37 % der RHE A Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, haben nach 5,5 h BrdU eingebaut. Dagegen ist dies nur bei 21% der mit spezifischer Vimentin-siRNA transfizierten Zellen der Fall. In vier unabhängigen Versuchen wurde der BrdU-Einbau anhand von FACS-Messungen festgestellt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Vergleich der Proteinexpression in Kollateralen und Kontrollgefäßen**

#### **5.1.1 Die Femoralarterien-Ligatur im Rattenmodell**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Expression des Intermediärfilaments Vimentin in Kollateralarterien hochreguliert wird. Hierfür wurde ein Femoralarterien-Ligaturmodell der Ratte verwendet. Dieses Modell wurde in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert (Herzog et al., 2002; Scholz et al., 2000). Es eignete sich besonders gut für vergleichende Studien an Kollateralen und Kontrollgefäßen, da hier eine präexistierende Anastomose, aus der sich die Hauptkollaterale entwickelt, zu jedem Zeitpunkt genau identifiziert werden konnte. Somit war sichergestellt, dass exakt die sich entsprechenden Anastomosen im ligierten Hinterlauf und im nicht ligierten Kontrollhinterlauf verglichen wurden.

Für die Gefäßentnahme wurde der dritte Tag post Okklusion gewählt, da das Endothel zu diesem Zeitpunkt die höchste Aktivität aufzeigt. Endothel- und glatte Muskelzellen enthalten eine erhöhte Anzahl freier Ribosomen und gleichzeitig eine reduzierte Menge an rauhem Endoplasmatischem Retikulum. Dies sind Anzeichen dafür, dass sich die Zellen aus einem kontraktilen in einen proliferativen Phänotyp umgewandelt haben. Tatsächlich ist, wie an Ki-67- und BrdU-Färbungen gezeigt werden konnte, der Anstieg der proliferativen Aktivität der wachsenden Kollaterale drei Tage nach Okklusion des Versorgungsgefäßes maximal. Weiterhin beginnt in diesem Zeitraum die Auflösung der Lamina elastica interna im mittleren Teil der Kollaterale. Die Rekrutierung von Makrophagen in die Kollateralwand erreicht am dritten Tag post Okklusion ebenfalls ihren Höhepunkt (Herzog et al., 2002; Scholz et al., 2000).

Das Ziel dieser Arbeit war Proteine zu analysieren, die spezifisch in wachsenden Kollateralarterien exprimiert werden. Kontaminationen durch umgebendes Gewebe sollten möglichst vermieden werden. Daher wurden die für die Analysen verwendeten Gefäße sorgfältig durchspült und vom umliegenden Gewebe freipräpariert. Die Präparation erfolgte unter ständiger Kühlung und gewährleistete, dass das Endothel der Gefäße vollständig intakt und funktionell blieb. Dies konnte von (Munzel et al., 1995) gezeigt werden, die mit auf gleiche

Weise präparierten Gefäßen erfolgreich Endothelfunktionsmessungen im Organbad durchführten. Die Studien ergaben unter anderem, dass Gefäße mit Endothel nach chronischer Nitroglyzerin (NTG)-Behandlung eine größere Toleranz gegenüber dem Vasodilator entwickeln, als Gefäße, bei denen das Endothel entfernt wurde. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die präparierten Gefäße dazu in der Lage waren, sowohl auf Vasokonstriktoren wie Phenylephrin, als auch auf verschiedene Vasodilatoren wie NTG oder Acetylcholin zu reagieren.

### **5.1.2 Proteinexpressionsstudien mit der 2D-Elektrophorese**

Diese Arbeit hatte das Ziel, die während einer bedeutenden Phase des Kollateralwachstums (3 Tage post Okklusion) regulierten Proteine zu identifizieren. Dabei richtete sich die Konzentration bewusst auf Veränderungen auf Proteinebene, da Proteine die funktionellen Einheiten sämtlicher zellulärer Vorgänge bilden. Um die Vorgänge, die unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in Gefäßzellen ablaufen verstehen zu können, benötigt man Informationen über deren Genexpression. Neuere Methoden wie z.B. die Genchip-Technologie erlauben gleichzeitige Expressionsanalysen von einer Vielzahl von Genen. Allerdings lässt sich anhand der Menge an Nukleinsäuren wie z.B. mRNA nie die tatsächlich in der Zelle vorhandene Proteinkonzentration ableiten. Ein Großteil der mRNA-Moleküle wird abgebaut, bevor die Translation in das Protein erfolgen kann. Die Anzahl der Proteine verändert sich ebenfalls fortlaufend, da in der Zelle ein ständiger Auf-, Ab- und Umbau der Moleküle stattfindet. Die direkte Messung der Proteinexpression stellt daher die beste Alternative dar, um metabolische Prozesse innerhalb einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt zu beurteilen.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit mit höchstmöglicher Auflösung Proteinextrakte aus Geweben und Zellen aufzutrennen (Tuttle et al., 2002) (Byrjalsen et al., 1999) (Gharbi et al., 2002) (Hewett, 2001). Hierbei können Proteine noch in einer Konzentration im unteren Nanogramm-Bereich detektiert werden (Jungblut et al., 1996). Dabei muss bedacht werden, dass schwach exprimierte Proteine von den Signalen stärker exprimierter Kandidaten im Gel überstrahlt werden können. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Proteine je nach ihrer Beschaffenheit unterschiedlich gut löslich sind. Zytosolische Proteine bedürfen keiner so aufwendigen Behandlung um in

Lösung gebracht zu werden wie beispielsweise membranständige Proteine (Rabilloud et al., 1997) (Santoni et al., 2000). Die Probenaufbereitung stellt aber den essentiellen Schritt für das Gelingen der zweidimensionalen Gelelektrophorese dar, da das Proteinmuster im Gel entscheidend von den Eigenschaften des für den Extrakt verwendeten Lösungsmittels abhängt. Um membranständige Proteine in Lösung zu bringen, können eine Vielzahl verschiedener Detergenzien verwendet werden. Neben ionischen Detergenzien wie z.B. Natriumdodecylsulfat gibt es nichtionische (Triton) und zwitterionische (CHAPS) Substanzen. Diese verschiedenen Lösungsmittel unterscheiden sich in ihren hydrophilen Kopf- und hydrophoben Schwanzdomänen und können daher verschieden strukturierte Proteine angreifen. Die Solubilisierungseigenschaften von Detergenzien hängen weiterhin von physikalischen Größen wie der Temperatur, dem Druck, der Ionenstärke und dem pH-Wert ab. Nicht zuletzt hat die verwendete Konzentration der gewählten Detergenzien einen starken Einfluss auf die Lösung der Proteine (Neugebauer, 1990) (Hjelmeland, 1990). Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine Methode, die eine höchstmögliche Auftrennung eines Proteinextraktes erlaubt. Dennoch ist es wichtig sich bewusst zu machen, dass nie sämtliche exprimierte Proteine in einem einzigen Extrakt gelöst werden können. Bei jedem Experiment werden aber immer nur die Proteine aufgetrennt, die zuvor auch in Lösung gebracht wurden. Aus diesem Grund wird auch auf einem 2D-Gel stets nur ein bestimmter Teil der exprimierten Proteine detektiert und analysiert. Für eine optimale Probenaufbereitung kann z.B. das sequenzielle Extraktionskit der Firma BioRad verwendet werden. Dieses enthält drei unterschiedlich aggressive Puffer, die die schrittweise Abtrennung verschieden löslicher Proteine ermöglichen. Ein limitierender Faktor ist hierbei die Menge des Probenmaterials, da jeder Schritt der Extraktion einen Materialverlust mit sich bringt.

Für die isoelektrische Fokussierung können Gelstreifen von 7-21 cm Länge verwendet werden. Von der Länge der Streifen hängt auch die Größe des Acrylamidgels in der zweiten Dimension ab. Die Qualität der Auftrennung verbessert sich mit zunehmender Größe der verwendeten Materialien. Gleichzeitig wächst allerdings auch die aufzutragende Proteinmenge, daher müssen bei der Wahl der Versuchskonditionen die limitierenden Faktoren des jeweiligen Ausgangsmaterials berücksichtigt werden.

Bei der Analyse der Gefäßextrakte war die Proteinmenge ein limitierender Faktor, da die Kollateralarterien zum Zeitpunkt der Entnahme mit 1-1,5 cm Länge und etwa 0,5 mm Durchmesser sehr klein waren. Die bestmögliche Auftrennung einer möglichst großen Bandbreite von im Extrakt enthaltenen Proteinen gewährleistete die Verwendung von 10 cm lange Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradient von 3-10 in der ersten Dimension und 10 %ige Criterion-Gele in der zweiten Dimension. Für die Isoelektrische Fokussierung mit 10 cm langen Gelen wurden 200 µg Protein benötigt. Um den Materialverlust so gering wie möglich zu halten, wurde mit dem Bewusstsein möglicherweise schwach exprimierte Proteine durch Überlagerung nicht zu erfassen, auf eine sequenzielle Extraktion der Proteine verzichtet. Die durchgeführten Studien konzentrierten sich zunächst auf zytosolische Proteine. Daher konnte für die Elektrophorese ein Gesamtextrakt verwendet werden.

Nach der Elektrophorese wurden die Acrylamidgele mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby gefärbt. Diese Färbelösung ist annähernd so sensitiv wie eine Silberfärbung und hat die Vorteile sehr leicht handhabbar, für Proteine spezifisch und mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Proteine kompatibel zu sein (Nishihara and Champion, 2002). Die Auswertung differenziell exprimierter Proteine erfolgte mit Hilfe der Software PDQuest der Firma BioRad. Als reguliert befundene Proteinspots wurden aus dem Gel ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert. Für die Sequenzierung von Proteinen gibt es verschiedene Methoden wie z.B. den Edman-Abbau, die Erstellung von Peptid-Karten oder die Tandem-Massenspektrometrie (Appella et al., 2000). Für diese Arbeit wurden die Proteine mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie analysiert, da diese Methode die höchstmögliche Genauigkeit bei der Identifikation gewährleistet. In zweidimensionalen Gelen erfolgt die Auftrennung von Proteinen zwar mit höchster Auflösung. Es ist aber dennoch möglich, dass ein Proteinspot von mehreren Proteinen gebildet wird. In einem derartigen Fall hat die Tandem-Massenspektrometrie den Vorteil jedes der in dem analysierten Spot vertretenden Proteine identifizieren zu können. Bei einer Auswertung mit einem MALDI-TOF wäre eine solche Unterscheidung beispielsweise nicht möglich.

Das Protein, das in den Kollateral- und Kontrolleextrakten die deutlichsten Konzentrationsunterschiede aufwies, wurde als das Intermediärfilament Vimentin

identifiziert. Wie bereits einleitend beschrieben, ist Vimentin ein Strukturprotein und Bestandteil des Zytoskeletts von z.B. Endothelzellen (Gonzales et al., 2001).

### **5.1.3 Differenzielle Expression von Vimentin in Kollateralen und Kontrollen**

Aufgrund der Expressionsunterschiede wurde die Hypothese entwickelt, dass Vimentin einen funktionellen Einfluss auf das Kollateralwachstum hat. Hierbei könnte das Intermediärfilament einerseits als Sensor der Schubspannung fungieren. Andererseits wäre ein entscheidender Einfluss auf die darauf folgende, zelluläre Antwort möglich. Komplexe zelluläre Antworten könnten dabei durch Migrations- oder Proliferationsaktivität ausgedrückt werden (siehe Abb. 5.1).

Verschiedene Arbeiten anderer Forschungsgruppen geben bereits Hinweise darauf, dass Vimentin eine wichtige Rolle bei der Übersetzung mechanischer Stimuli in biochemische Signale spielt. (Schiffers et al., 2000) zeigten einen direkten Einfluss von Vimentin auf das Fluss-induzierte Remodeling von Arterien bei chronisch veränderten Blutflüssen. Das „inward remodeling“, d.h. die Verkleinerung des Gefäßlumens infolge eines blockierten Blutflusses, war dabei in Vimentin-defizienten Tieren abgeschwächt. Das „outward remodeling“, bzw. die Vergrößerung des Gefäßlumens infolge verstärkter Blutflüsse, fiel in diesen Tieren dagegen ausgeprägter aus. Gleichzeitig potenzierte sich in der Abwesenheit von Vimentin die arterielle hypertrophische Antwort der Gefäße auf veränderte Blutflüsse, d.h. die Gefäßwand verdickte sich. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Suppression von Vimentin in Abhängigkeit von der hämodynamischen Situation direkt oder indirekt zu einer Vergrößerung des Gefäßlumens führen kann. Drei Jahre zuvor diskutierten (Henrion et al., 1997) den Einfluss von Vimentin auf die Mechanotransduktion in Gefäßen, die einer akut erhöhten Schubspannung ausgesetzt waren. Während die Durchmesser passiver Arterien aus Wildtypen und Vimentin knockout-Tieren keine Unterschiede aufwiesen, zeigte sich, dass die Fluss-induzierte Dilatation der Gefäße in Vimentin supprimierten Tieren verringert war. Ähnliche Reaktionen wurden auch auf zellulärer Ebene beobachtet. (Helmke et al., 2000) konnten zeigen, dass es in Endothelzellen, die hämodynamischem Stress ausgesetzt wurden, zu einer schnellen Deformierung von Vimentinfilamenten kommt. In ebenfalls Scherstress ausgesetzten Endothelzellen fanden (Tsuruta and Jones, 2003), dass Vimentin die

Größe von Fokalkontakten und deren Adhäsionsstärke reguliert. Diese Daten legen nahe, dass Vimentin auf erhöhte Schubspannungen reagieren kann und infolge dessen auch funktionell in die Entwicklung von Kollateralen eingreifen könnte.

Weiterhin gibt es ebenfalls Anhaltspunkte dafür, dass Veränderungen auf biochemischer Ebene der Zelle über Vimentin in komplexe mechanische Reaktionen wie beispielsweise Zellmigration übersetzt werden können bzw. dass der Verlust von Vimentin derartige Übertragungen behindert.

(Eckes et al., 1998) zeigten dies am Beispiel von Fibroblasten. Vimentin-defiziente primäre Fibroblasten wiesen eine stark beeinträchtigte mechanische Stabilität auf, die sich auf die mobilen Fähigkeiten der Zellen auswirkte. Sowohl die durch verschiedene chemoattraktive Stoffe induzierte Migration in einer Boyden Chamber als auch die Neigung zur Wundheilung in vitro waren in Fibroblasten ohne Vimentin signifikant reduziert. Zudem waren derartige Zellen nicht mehr dazu in der Lage, Matrices aus Kollagen zu kontrahieren.

Ähnliche Ergebnisse wurden von (Gilles et al., 1999) für humane Epithelzellen beschrieben. Anhand von Wundheilungs-Experimenten konnten sie zeigen, dass in Epithelzellen, die sich direkt am Wundrand befanden, die Expression von Vimentin durch eine Aktivierung des Promotors induziert wurde. Nachfolgend wurde die Stimulierung einer aktiven Migration in diesen Zellen beobachtet. Die Geschwindigkeit der Vimentin exprimierenden Zellen war dabei signifikant höher als die von Zellen ohne Vimentin. In Zellen, die weiter vom Wundrand entfernt lokalisiert waren, konnte keine Expression von Vimentin detektiert werden. Nach dem Verschluss der Wunde wurde in den Zellen, die sich zuvor am Wundrand befunden hatten eine Deaktivierung der Vimentinexpression festgestellt.

Diesen Ergebnissen zufolge werden durch Reize wie z.B chemoattraktive Lockstoffe oder Verwundung biochemische Prozesse in Zellen ausgelöst, die zur (erhöhten) Expression von Vimentin führen. Die erhöhte Konzentration von Vimentin ermöglicht den Zellen wiederum, mit mechanischen Prozessen wie Migration auf die Stimulation zu reagieren. Obwohl man berücksichtigen muss, dass derartig komplexe Vorgänge wie die Zellmigration niemals nur von einem einzigen Protein abhängen, hat das Vimentin als Bestandteil des Zytoskeletts jedoch einen bemerkenswerten regulativen Einfluss auf diesen Prozess.



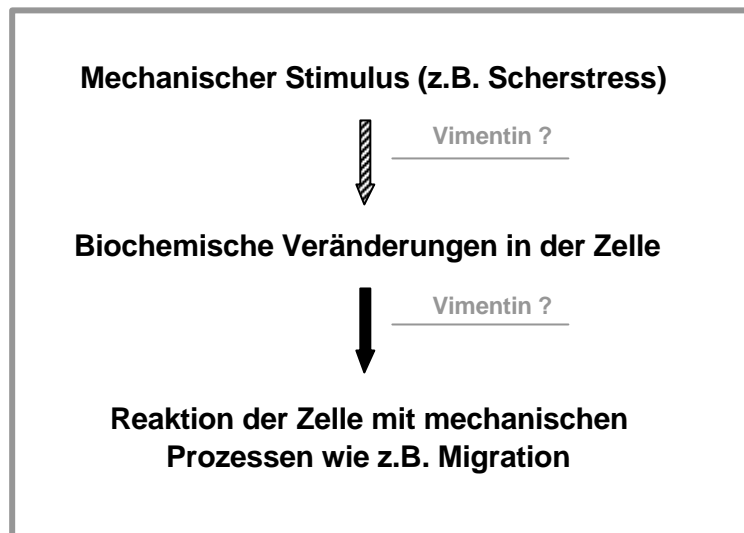


Abbildung 5.1: Schema der möglichen Angriffspunkte von Vimentin bei der Signaltransduktion eines mechanischen Stimulus in biochemische Reaktionen bzw. in die wiederum darauf folgende mechanische Antwort einer Zelle. Der gefüllte Pfeil markiert die im zweiten Teil der Arbeit untersuchte Fragestellung.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich auf die Funktion von Vimentin in Endothelzellen. Es sollte festgestellt werden, ob das Intermediärfilament auch in diesem Zelltyp die Translation biochemischer Signale in mechanische Reaktionen ermöglicht. Für diese Untersuchung wurde ein stabiles in vitro System generiert, welches die Analyse des funktionellen Einflusses von Vimentin in diesen Zellen erlaubt.

## **5.2 Die Analyse der Proteinexpression im in vitro Modell**

### **5.2.1 Warum sind Endothelzellen als in vitro Modell sinnvoll?**

Mit einem in vitro Modell sollte ein reproduzierbares System geschaffen werden, in dem möglichst realistisch eine in vivo Situation reflektiert werden kann. In dieser Arbeit wurde sich aus folgenden Gründen für Endothelzelllinien als Modellsystem entschieden: Eine Zelllinie hat den Vorteil unter Kulturbedingungen weniger anfällig für spontane Mutationen oder Veränderungen in der Genexpression zu sein als Primärzellkulturen und stellt daher ein stabileres System dar. Die in der Arbeit behandelte Fragestellung beschäftigt sich mit der Proteinexpression in Kollateralarterien, deren Wachstum durch eine erhöhte Schubspannung stimuliert wird. Das Endothel kleidet Gefäße von Innen aus und wird somit als Erstes mit einer Veränderung der hämodynamischen Situation konfrontiert. Endothelzellen fungieren als Sensoren für Variationen in der Schubspannung (Barakat and Lieu, 2003) (Resnick et al., 2003). Hierbei werden sowohl Integrin- als auch G-Protein vermittelte Signaltransduktionswege diskutiert, die nachfolgend die Aktivierung von Tyrosin- und Serinkinasen, das Rearrangement des Zytoskeletts und die Produktion von NO und reaktiven Sauerstoffradikalen verursachen (Resnick et al., 2000). In den Endothelzellen findet folglich die direkte Translation des mechanischen Stimulus auf eine intrazelluläre biochemische Ebene statt. Auf die ausgelösten biochemischen Veränderungen können die Zellen wiederum mit mechanischen Prozessen wie Migration oder Proliferation reagieren. Wie in Abbildung 5.2 dargestellt, erfolgen diese entgegengesetzten Abläufe nach dem Tensegrity-Modell von D. Ingber über die gleichen Proteinkomplexe (Ingber, 2003b).

Für die Modellzelllinie ist es unter der gegebenen Fragestellung eine notwendige Bedingung Vimentin zu exprimieren. Auch diese Voraussetzung ist in Endothelzellen gegeben (Gonzales et al., 2001; Tsuruta and Jones, 2003) und erklärt diesen Zelltyp zu einem sinnvollen Versuchsobjekt.

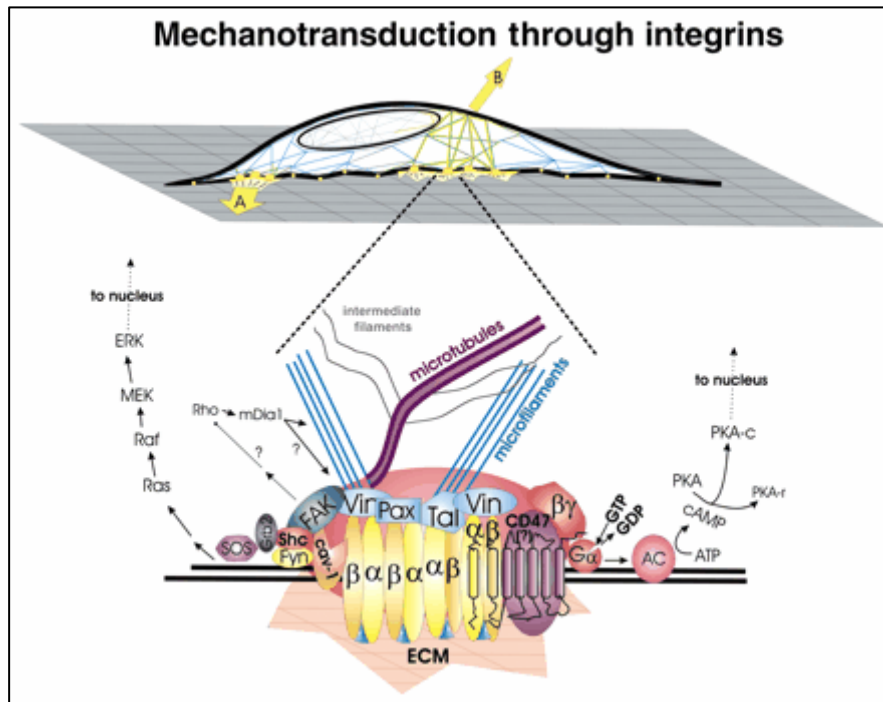


Abbildung 5.2: schematische Darstellung der Mechanotransduktion in Zellen. Wirken auf eine Zelle äußere physikalische Kräfte wie Zug oder Druck, so werden diese über zytoskeletäre Komponenten bis zu membranständigen Rezeptoren (Integrine) weitergeleitet. Hier findet die Übersetzung des mechanischen Stimulus auf eine biochemische Ebene statt. Über verschiedene Signaltransduktionswege (G-Proteine, Tyrosinkinasen) verteilt sich die Information über die gesamte Zelle bis zum Zellkern. Auch der entgegengesetzte Informationsweg erfolgt über die gezeigten Bausteine. Biochemische Veränderungen in der Zelle gelangen bis zu den zytoskeletären Komponenten, die folglich eine komplexe mechanische Reaktion hervorrufen. Quelle: (Ingber, 2003b).

### 5.2.2 Das in vitro Modell: Endothelzelllinien aus dem Rattenherzen

Die als Modellsystem ausgewählte Zelllinie wurde erstmals von (Derhaag et al., 1996) beschrieben. Unter Kulturbedingungen stellte sich diese Zelllinie allerdings als heterogene Population heraus, die Zellen mit zwei verschiedenen Phänotypen enthielt. Folglich wurden die verschiedenartigen Zellen vereinzelt, subkloniert und als Rattenherzendothel (RHE) A bzw. RHE neg Zellen bezeichnet (Obermeyer et al., 2003). Da diese Behandlung mit großem Stress für die Zellen verbunden war, kann sie möglicherweise Veränderungen der Zelleigenschaften hervorgerufen haben. Die Expression von verschiedenen endothelialen Markerproteinen wie CD54 und die VEGF-Rezeptoren Flk-1 und Flt-1 wurde jedoch für beide neu klonierten Zelllinien im FACS bestätigt. Eventuelle epitheliale Eigenschaften der Zelllinien konnten durch eine negative Färbung gegen Zytokeratin ausgeschlossen werden.

Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Zelllinien lag in deren Morphologie. RHE A Zellen fielen durch ihren großen zytoplasmatischen Bereich auf, aus dem sich zahlreiche Lamellipodien und Filopodien erstreckten. Sie zeigten eine spontane amöboide Bewegung, bei der die reversible Ausbildung fokaler Adhäsionskontakte mikroskopisch verfolgt werden konnte. RHE neg Zellen waren dagegen wesentlich kleiner, bildeten keine Ausläufer in Form von Lamellipodien oder Filopodien aus und zeigten auch keine Amöbenartige Fortbewegung. Die einzige erkennbare Fortbewegung fand bei RHE neg Zellen im Verbund statt. Es konnte weder eine separate Migration einzelner Zellen, noch die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten mit dem Mikroskop beobachtet werden. Die Analysen der videomikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass RHE A Zellen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  migrierten, während RHE neg Zellen mit durchschnittlich 0,04  $\mu\text{m}/\text{min}$  nicht einmal halb so schnell waren. Damit wiesen die Geschwisterzelllinien extrem ausgeprägte Unterschiede im Migrationsvermögen auf und waren daher prädestiniert für Studien über Bewegungsabläufe von Endothelzellen.

Ähnliches galt für das Proliferationsverhalten der beiden Zelllinien. Die Auswertung des Proliferationsassays, bei dem die Zellen über zwei Stunden mit dem Thymidin-Analogon Bromodesoxyuridin (BrdU) inkubiert wurden, ergab, dass in dieser Zeit 3,7x mehr RHE neg Zellen BrdU einbauten als RHE A Zellen. Folglich eigneten sich die beiden Zelllinien nicht nur als Modellsystem für Zellmigrationsstudien, sondern ebenso für die Untersuchungen, die die Zellteilung betreffen. Die Zelllinien wiesen somit konkrete Unterschiede in den Verhaltensmustern auf, die auch bei dem Kollateralwachstum bedeutend sind. Wie schon die Kollateral- und Kontrolleextrakte wurden ebenfalls Extrakte von RHE A und RHE neg Zellen mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, um unterschiedlich exprimierte Proteine aufzuspüren. Da bei den Kulturzellen die Materialmenge kein limitierender Faktor war, wurden die Zellen sequenziell aufgearbeitet. Zytoplasmatische Extrakte wurden unter Verwendung von Gradientengelen mit einem pH von 3-10 in der ersten Dimension und 10 % Acrylamidgelen in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Auswertung der Gele mit der PDQuest Software ergab, dass verschiedene zytoplasmatische Proteine in den Zelllinien unterschiedlich exprimiert wurden. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse konnten diese Proteine als die

Hitzeschockproteine Mortalin und HSP-70-8, das glykolytische Enzym  $\alpha$ -Enolase und die Strukturproteine Aktin und das bereits in den Kollateralen als hochreguliert gefundene Vimentin identifiziert werden. Dabei waren die Hitzeschockproteine und die  $\alpha$ -Enolase in RHE A Zellen dreifach schwächer exprimiert als in RHE neg Zellen. Die Aktinmenge erwies sich dagegen dreifach stärker in RHE A Zellen und das Intermediärfilament Vimentin war ausschließlich in RHE A Zellen zu finden. Dieses Ergebnis wurde wiederum durch Immunfärbungen im Western Blot verifiziert. Durch die auffällige Korrelation der ausgeprägten Vimentinexpression in Kollateralarterien und vornehmlich migrierenden Endothelzellen fokussierte sich das Interesse auf das Intermediärfilament und die Fragestellung, ob es in diesem Zusammenhang eine bedeutende Funktion ausübt.

Es sind vielfältige Funktionen für das Strukturprotein beschrieben worden, darunter potenzielle Einflüsse bei der Immunantwort. (Mor-Vaknin et al., 2003) konnten zeigen, dass Vimentin von stimulierten Makrophagen sezerniert wird. Weiterhin beeinflusst es die mechanische Stabilität, die Migration, die Kontraktilität von Fibroblasten (Eckes et al., 1998) und die Migration von Epithelzellen (Gilles et al., 1999). (Gonzales et al., 2001) haben einen endothelialen Zell-Matrix Adhäsionskomplex beschrieben, in den Vimentin integriert ist, und der offenbar regulierend auf die Zellmigration einwirkt. Wie bereits erwähnt, ist Vimentin bei der Fluss-induzierten Vasodilatation von Bedeutung (Schiffers et al., 2000). Weiterhin kommt es zur Deformation des Intermediärfilaments in Fluss-stimulierten Endothelzellen (Helmke et al., 2000).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und die Ansätze aus der Literatur ließen vermuten, dass Vimentin an der Entwicklung von Kollateralen eventuell über eine regulierende Wirkung auf die Zellmigration beteiligt ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die funktionelle Rolle von Vimentin mit Hilfe von RNA-Interferenzstudien an RHE A Zellen untersucht.

### **5.2.3 Vimentinsuppression in RHE A Zellen durch siRNA Transfektion**

Die RNA-Interferenz (RNAi) wurde in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Fire et al., 1998). Mittlerweile ist die Anwendung dieser Methode jedoch in fast allen Organismen u.a Pflanzen, Insekten und Säugerzellen möglich (Waterhouse et al., 1998) (Misquitta and Paterson, 1999) (Harborth et al., 2001) (Elbashir et al., 2001a). Dabei muss beachtet werden, dass die Methode in

Säugerzellen in einer leicht abgewandelten Form angewendet werden muss. Bei der RNA-Interferenz wird durch die Transfektion von doppelsträngiger RNA in Zellen eine Hemmung der Translation eines Zielproteins verursacht. Transfiziert man jedoch Säugerzellen mit doppelsträngiger RNA, die größer ist als 30 bp, so kommt es zu einer umfassenden Inhibierung der Proteinexpression und infolge dessen zum apoptotischen Tod der Zellen (Gil and Esteban, 2000). Dieses Problem konnte umgangen werden als entdeckt wurde, dass eine Ribonuklease namens Dicer die transfizierte, doppelsträngige DNA in kleinere Nukleotide von 21-25 Basenpaaren Länge zerteilt (Bernstein et al., 2001) (Elbashir et al., 2001b). Mit der direkten Transfektion kleiner interferierender dsRNA Moleküle (small interfering RNA, siRNA) gelang schließlich die spezifische Suppression von Zielproteinen in kultivierten Säugerzellen (Elbashir et al., 2001a). Der Wirkungsmechanismus von siRNA Molekülen ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

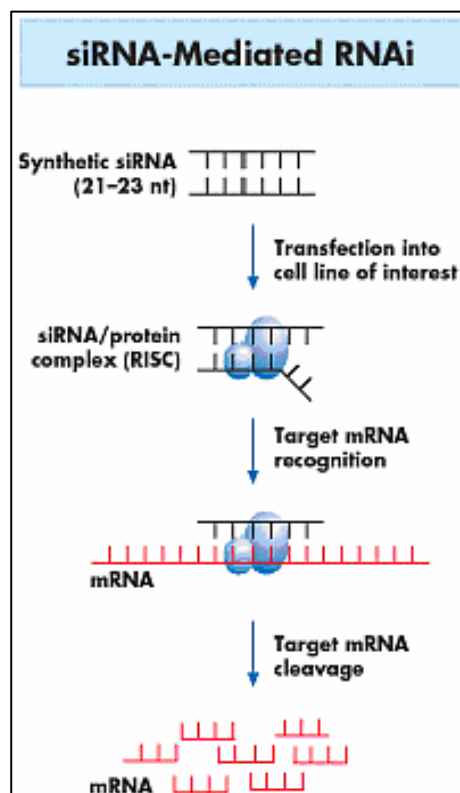


Abbildung 5.3: Mechanismus der spezifischen Proteinsuppression durch siRNA. Nach der Transfektion verbinden sich siRNAs mit verschiedenen Proteinen zum RNA-induced silencing complex (RISC). Der Komplex sucht auf der endogenen mRNA nach einem zur siRNA homologen Bereich. Ist dieser gefunden, entwindet sich die siRNA und deren Antisense-Strang bindet an die mRNA, die infolge dessen endonukleolytisch abgebaut wird. Die Translation des Zielproteins wird somit verhindert. Quelle: [www.qiagen.de](http://www.qiagen.de).

Jeder Zelltyp reagiert allerdings unterschiedlich empfindlich auf Behandlungen mit Transfektionsreagenzien. Daher ist es notwendig, optimale Konditionen für die Experimente zu etablieren. Dazu gehören ein möglichst effizientes Transfektionsreagenz mit einer möglichst niedrigen Toxizität, die Verwendung optimaler Mengen von Reagenz und siRNA und die Ermittlung der notwendigen Inkubationsdauer, um eine effektive Proteinsuppression zu erreichen. Die Optimierung der Versuchskonditionen erfolgte mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter unspezifischer siRNA. Die Überlebensrate der Zellen und die siRNA-Aufnahme wurden anhand von FACS-Messungen bestimmt. Für die Transfektion von RHE A Zellen erwies sich das Transfektionsreagenz Lipofectamin (Invitrogen) als besonders geeignet. Die Verwendung von 5 µl Lipofectamin und 5 µg siRNA für  $1 \times 10^5$  Zellen stellte sich als optimale Kombination für die RHE A Zellen heraus, bei der eine Aufnahmerate von über 99 % bei einer Überlebensrate von knapp 98 % erreicht werden konnte. Nach der Transfektion spezifischer siRNA-Moleküle bedurfte es einer zweitägigen Inkubation, um die Vimentinexpression in den Zellen zu unterdrücken. Dabei wurde reproduzierbar eine nahezu vollständige Suppression der Vimentinexpression in RHE A Zellen erreicht.

Es muss jedoch bedacht werden, dass es sich hierbei um eine transiente Transfektion handelt. Die Vimentinsuppression ist folglich ein vorübergehendes Phänomen, das sich nur zwei bis drei Tage nach der siRNA Transfektion beobachten lässt. Für stabile Transfektionen, die zu einer dauerhaften Suppression des Zielproteins führen, wurde von (Paddison et al., 2002) die Verwendung von „Haarnadel“ förmigen dsRNAs beschrieben.

Die transiente Suppression der Zielproteine ist aber ausreichend, um anhand der Reaktionen der Zelle auf deren Funktionen zu schließen. Durch die Suppression konnten mehrere Funktionen für Vimentin in RHE A Zellen abgeleitet werden.

#### **5.2.4 Die Funktion von Vimentin bei der Endothelzellmigration**

Ein funktioneller Einfluss von Vimentin auf die Migration von RHE A Zellen konnte sowohl durch die Analyse videomikroskopischer Aufnahmen als auch durch Experimente mit der Boyden Kammer festgestellt werden. Die Auswertung der videomikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Software Imagoquant (Mediquant). Diese Software ermöglichte die gleichzeitige Beobachtung von Geschwindigkeit und Wegstrecke zahlreicher Zellen. Durch die Computer

gestützte Auswertung wurde dabei die Gefahr der subjektiven Analyse ausgeschlossen. Der Vergleich von spezifisch transfizierten RHE A Zellen und Kontrollen mit dieser Methode ergab, dass die Vimentin supprimierten Zellen bis zu 50 % der Migrationsgeschwindigkeit einbüßten.

Die Ergebnisse der Imagoquant-Analysen waren eindeutig und reproduzierbar. Dennoch sollte diese relativ neue Methode durch Vergleichsexperimente mit Hilfe eines etablierteren Migrationsassays validiert werden. Hierfür kam die Methode der Boyden Kammer zum Einsatz (Murohara et al., 1999). Es wurden transfizierte RHE A Zellen durch eine fünffach erhöhte Serumkonzentration in der unteren Kammer der Boyden Apparatur chemotaktisch angelockt. Die Auszählung der durch die Membran migrierten Zellen zeigte, dass im Vergleich zu Kontrollen über 42 % weniger Vimentin supprimierte Zellen die Unterseite der Membran erreichen konnten. Damit wurden mit beiden verwendeten Methoden vergleichbare Resultate erzielt, die die Bedeutung von Vimentin bei der Endothelzellmigration bestätigten.

Während die Rolle der Endothelzellmigration bei der Angiogenese mehrfach beschrieben ist (Risau, 1997) (Patan, 2000) (Carmeliet, 2000), ist sie im Zusammenhang mit der Arteriogenese noch sehr wenig erforscht. Obwohl es noch keine direkten Beweise für die Beteiligung migrierender Endothelzellen beim Kollateralwachstum gibt, sprechen alle architektonischen Veränderungen in den Gefäßen während der Remodeling-Phase dafür. Dass zum Beispiel die Zellproliferation in den Kollateralen eine Woche post Okklusion bereits rückläufig ist, während gleichzeitig eine fortlaufende Verlängerung des Gefäßes stattfindet (Herzog et al., 2002), lässt sich nur durch die Teilnahme migrierender Endothel- und Muskelzellen an diesem Prozess erklären.

### **5.2.5 Der Einfluss von Vimentin auf die Proliferation von Endothelzellen**

Neben der Migration ist vor allem auch die Zellteilung von der Beschaffenheit des Zytoskeletts abhängig. Vimentin wurde dafür beschrieben, bei der Proliferation von synchronisierten Fibroblasten notwendig zu sein (Wang and Stamenovic, 2000). (Klein et al., 1993) fanden einen über Vimentin vermittelten, regulierenden Einfluss von Interleukin-4 auf die Morphologie und die Proliferation von Endothelzellen. In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der Proliferationsrate der Einbau des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) in die Zellen bestimmt. Ein



Kritikpunkt dieser Methode besteht in der Möglichkeit, dass fälschlicher Weise BrdU bei DNA-Reparaturprozessen in die Zellen eingebaut wird. Die Spezifität dieser Methode für tatsächliche Zellteilungsprozesse wird aber anhand der Proliferationsexperimente an Kollateralen deutlich (Herzog et al., 2002). Die kinetischen Untersuchungen an Kollateralarterien zeigten eindeutig, dass in den Kontrollen keine BrdU-positiven Zellen detektiert werden konnte.

Die dargestellten Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss von Vimentin auf die Endothelzellproliferation verhielten sich kontrovers. RHE neg Zellen zeigten einen stark proliferierenden Phänotyp, wiesen aber gleichzeitig eine derart niedrige Konzentration von Vimentin auf, dass das Protein weder in zweidimensionalen Gelen noch in Western Blots von zytosolischen Extrakten dieser Zellen detektiert werden konnte. Auf der anderen Seite haben Proliferationsanalysen mit transfizierten RHE A Zellen gezeigt, dass die Suppression von Vimentin deren Zellteilung signifikant beeinträchtigte. Diese unterschiedlichen Resultate können dahingehend interpretiert werden, dass dem Vimentin keine generelle Funktion bei der Proliferation von Endothelzellen zukommt. Das Zytoskelett erfährt jedoch während der Zellteilung einen vollständigen Umbau, der sämtliche zytoskeletäre Proteine erfasst. In Zellen, deren Zytoskelett zu einem grossen Teil aus Vimentinfilamenten besteht, beeinflusst demzufolge hauptsächlich Vimentin die Zytokinese. Wird die Vimentinexpression in diesen Zellen unterdrückt, so kann die Aufgabe nicht durch andere Strukturproteine wie z.B. Aktin kompensiert werden. Bei Zellen deren Zytoskelett dagegen nur zu einem sehr geringen Teil aus Vimentinfilamenten besteht, wird die Zytokinese von stärker exprimierten Strukturproteinen übernommen und eine geringe Vimentinkonzentration bleibt ohne Auswirkung auf die Proliferation.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Intermediärfilament Vimentin sowohl in Kollateralarterien als auch in Endothelzellen mit migrierendem Phänotyp höher exprimiert ist, als in Kontrollgefäßen bzw. nicht-migrierenden Endothelzellen. Die Frage, ob Vimentin das Verhalten von Endothelzellen beeinflusst, konnte ebenfalls in dieser Arbeit geklärt werden. Das Intermediärfilament beeinflusst signifikant die Migration von Endothelzellen und damit eine wichtige Verhaltensweise für das Remodeling von Kollateralarterien.

Für die Beantwortung der Frage, ob Vimentin als ein direkter Sensor für veränderte Schubspannungen in Gefäßen dient, der als Mechanotransduktor die Ausbildung von Kollateralarterien vermittelt, sollen in weiterführenden Experimenten in vivo Studien an Vimentin knockout-Mäusen durchgeführt werden. Hierbei soll besonders beobachtet werden, ob Vimentin bei den verschiedenen Phasen des Kollateralwachstums differenzielle Bedeutungen hat. Die Entwicklung von Kollateralarterien soll kurz nach einer Gefäßokklusion (1-3 Tage) und zu späteren Zeitpunkten (3-21 Tage) beobachtet werden.

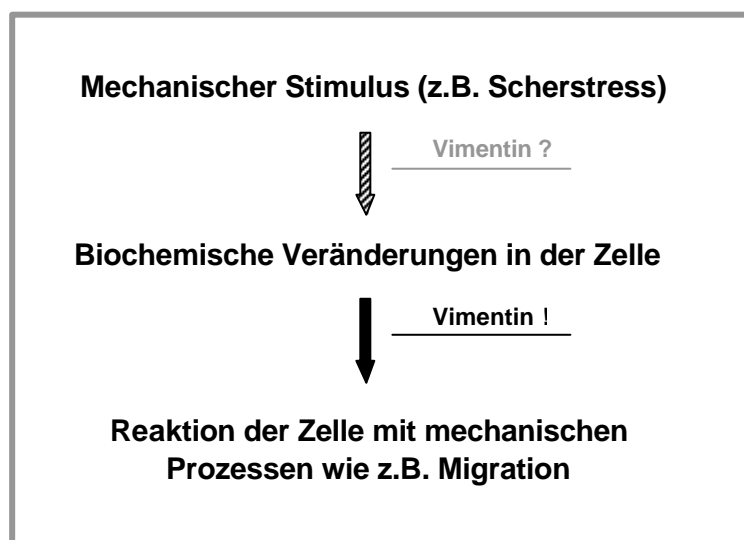


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der möglichen und bestätigten Angriffspunkte von Vimentin bei der Signaltransduktion. Das Intermediärfilament beeinflusst die Übersetzung biochemischer Informationen in mechanische Reaktionen in Form von Migration in Endothelzellen.

Die Feststellung, dass Vimentin für die Endothelzellmigration bedeutend ist, lässt darauf schließen, dass auch angiogenetische Prozesse maßgeblich von dem Intermediärfilament abhängen können. Vimentin ist bereits als Marker für mobile Tumorzellen bekannt (Lang et al., 2002). Mit den neuen Erkenntnissen ist weiterhin ein Einfluss von Vimentin auf das Gefäßwachstum von Tumoren denkbar. Um dieses nachzuweisen, könnten Vimentin-supprimierte Zellen in Fibringel-Experimenten eingesetzt werden. In diesen kann die Ausbildung von Gefäßstrukturen verfolgt werden. (Nehls and Drenckhahn, 1995).

## 6 Literatur

- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W. and Klein, R. (1999) Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev*, **13**, 295-306.
- Appella, E., Arnott, D., Sakaguchi, K. and Wirth, P.J. (2000) Proteome mapping by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in combination with mass spectrometric protein sequence analysis. *Exs*, **88**, 1-27.
- Barakat, A. and Lieu, D. (2003) Differential responsiveness of vascular endothelial cells to different types of fluid mechanical shear stress. *Cell Biochem Biophys*, **38**, 323-343.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.
- Burridge, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 463-518.
- Buschmann, I. and Schaper, W. (1999) Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci*, **14**, 121-125.
- Byrjalsen, I., Mose Larsen, P., Fey, S.J., Nilas, L., Larsen, M.R. and Christiansen, C. (1999) Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: characterization of proteins with increased expression in hyperplasia and adenocarcinoma. *Mol Hum Reprod*, **5**, 748-756.
- Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, **6**, 389-395.
- Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, **9**, 653-660.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-439.
- Clark, E.A. and Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, **268**, 233-239.
- Colucci-Guyon, E., Portier, M.M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S. and Babinet, C. (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*, **79**, 679-694.

- Dejana, E., Colella, S., Conforti, G., Abbadini, M., Gaboli, M. and Marchisio, P.C. (1988) Fibronectin and vitronectin regulate the organization of their respective Arg-Gly-Asp adhesion receptors in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol*, **107**, 1215-1223.
- Derhaag, J.G., Duijvestijn, A.M., Emeis, J.J., Engels, W. and van Breda Vriesman, P.J. (1996) Production and characterization of spontaneous rat heart endothelial cell lines. *Lab Invest*, **74**, 437-451.
- DiMilla, P.A., Barbee, K. and Lauffenburger, D.A. (1991) Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J*, **60**, 15-37.
- DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M. and Lauffenburger, D.A. (1993) Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol*, **122**, 729-737.
- Dunlevy, J.R. and Couchman, J.R. (1995) Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J Cell Sci*, **108 ( Pt 1)**, 311-321.
- Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A., Koteliansky, V., Babinet, C. and Krieg, T. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci*, **111 ( Pt 13)**, 1897-1907.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629-635.
- Fernandez, J. (1992) Overexpression of vinculin suppresses cell motility in Balb/C 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **22**, 127-134.
- Fernandez, J. (1993) Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility and anchorage dependent growth of 3T3 cells. *Journal of cell biology*, **122**, 1285-1294.
- Ferrara, N. (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*, **56**, 794-814.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. and Moore, M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439-442.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Flamme, I., Frolich, T. and Risau, W. (1997) Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*, **173**, 206-210.
- Folkman, J. (1982) Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci*, **401**, 212-227.
- Gharbi, S., Gaffney, P., Yang, A., Zvelebil, M.J., Cramer, R., Waterfield, M.D. and Timms, J.F. (2002) Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics*, **1**, 91-98.
- Gil, J. and Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, **5**, 107-114.
- Gilles, C., Polette, M., Zahm, J.M., Tournier, J.M., Volders, L., Foidart, J.M. and Birembaut, P. (1999) Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci*, **112 ( Pt 24)**, 4615-4625.
- Gluck, U. and Ben-Ze'ev, A. (1994) Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J Cell Sci*, **107 ( Pt 7)**, 1773-1782.
- Gonzales, M., Weksler, B., Tsuruta, D., Goldman, R.D., Yoon, K.J., Hopkinson, S.B., Flitney, F.W. and Jones, J.C. (2001) Structure and function of a vimentin-associated matrix adhesion in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, **12**, 85-100.
- Goto, H., Kosako, H., Tanabe, K., Yanagida, M., Sakurai, M., Amano, M., Kaibuchi, K. and Inagaki, M. (1998) Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J Biol Chem*, **273**, 11728-11736.
- Hall, A. (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 31-54.
- Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T. and Weber, K. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, **114**, 4557-4565.
- Helmke, B.P., Goldman, R.D. and Davies, P.F. (2000) Rapid displacement of vimentin intermediate filaments in living endothelial cells exposed to flow. *Circ Res*, **86**, 745-752.
- Henrion, D., Terzi, F., Matrougui, K., Duriez, M., Boulanger, C.M., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Briand, P., Friedlander, G., Poitevin, P. and Levy, B.I. (1997) Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest*, **100**, 2909-2914.

- Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A. and Ito, W.D. (2002) Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, H2012-2020.
- Hess, J.F., Budamagunta, M.S., Voss, J.C. and Fitzgerald, P.G. (2004) Structural Characterization of Human Vimentin Rod 1 and the Sequencing of Assembly Steps in Intermediate Filament Formation in Vitro Using Site-directed Spin Labeling and Electron Paramagnetic Resonance. *J Biol Chem*, **279**, 44841-44846.
- Hewett, P.W. (2001) Identification of tumour-induced changes in endothelial cell surface protein expression: an in vitro model. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 325-335.
- Hjelmeland, L.M. (1990) Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzymol*, **182**, 253-264.
- Huttenlocher, A., Sandborg, R.R. and Horwitz, A.F. (1995) Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 697-706.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.
- Ingber, D.E. (2003a) Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*, **116**, 1157-1173.
- Ingber, D.E. (2003b) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*, **116**, 1397-1408.
- Ito, W.D., Arras, M., Scholz, D., Winkler, B., Htun, P. and Schaper, W. (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*, **273**, H1255-1265.
- Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N. and Matsuda, M. (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 6582-6591.
- Jungblut, P., Thiede, B., Zimny-Arndt, U., Muller, E.C., Scheler, C., Wittmann-Liebold, B. and Otto, A. (1996) Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis*, **17**, 839-847.
- Khmelewski, E., Becker, A., Meinertz, T. and Ito, W.D. (2004) Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circ Res*, **95**, E56-64.
- Klein, N.J., Rigley, K.P. and Callard, R.E. (1993) IL -4 regulates the morphology, cytoskeleton, and proliferation of human umbilical vein endothelial cells: relationship between vimentin and CD23. *Int Immunol*, **5**, 293-301.

- Koolman, J., Röhm, K.H. (1998) *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme, Stuttgart.
- Lang, S.H., Hyde, C., Reid, I.N., Hitchcock, I.S., Hart, C.A., Bryden, A.A., Villette, J.M., Stower, M.J. and Maitland, N.J. (2002) Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate*, **52**, 253-263.
- Lau, K.W., Ding, Z.P., Johan, A., Kwok, V. and Lim, Y.L. (1999) Angiographic restenosis rate in patients with chronic total occlusions and subtotal stenoses after initially successful intracoronary stent placement. *Am J Cardiol*, **83**, 963-965, A969-910.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, **420**, 868-874.
- Longland, C.J. (1953) The collateral circulation of the limb; Arris and Gale lecture delivered at the Royal College of Surgeons of England on 4th February, 1953. *Ann R Coll Surg Engl*, **13**, 161-176.
- Matsumoto, K., Nakamura, T. and Kramer, R.H. (1994) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, **269**, 31807-31813.
- Misquitta, L. and Paterson, B.M. (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1451-1456.
- Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K. and Markovitz, D.M. (2003) Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat Cell Biol*, **5**, 59-63.
- Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B.A., Tarpey, M.M. and Harrison, D.G. (1995) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*, **95**, 187-194.
- Murohara, T., Witzenbichler, B., Spyridopoulos, I., Asahara, T., Ding, B., Sullivan, A., Losordo, D.W. and Isner, J.M. (1999) Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1156-1161.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1995) A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res*, **50**, 311-322.
- Neugebauer, J.M. (1990) Detergents: an overview. *Methods Enzymol*, **182**, 239-253.
- Nishihara, J.C. and Champion, K.M. (2002) Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis*, **23**, 2203-2215.



- Obermeyer, N., Janson, N., Bergmann, J., Buck, F. and Ito, W.D. (2003) Proteome analysis of migrating versus nonmigrating rat heart endothelial cells reveals distinct expression patterns. *Endothelium*, **10**, 167-178.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1443-1448.
- Patan, S. (2000) Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*, **50**, 1-15.
- Plattner, H., Hentschel, J. (2002) *Zellbiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. and Lunardi, J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 307-316.
- Resnick, N., Yahav, H., Schubert, S., Wolfovitz, E. and Shay, A. (2000) Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **11**, 167-177.
- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., Shushy, M., Schubert, S., Zilberman, L.C. and Wolfovitz, E. (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol*, **81**, 177-199.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. and Horwitz, A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, **302**, 1704-1709.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
- Rubartelli, P., Niccoli, L., Verna, E., Giachero, C., Zimarino, M., Fontanelli, A., Vassanelli, C., Campolo, L., Martuscelli, E. and Tommasini, G. (1998) Stent implantation versus balloon angioplasty in chronic coronary occlusions: results from the GISSOC trial. Gruppo Italiano di Studio sullo Stent nelle Occlusioni Coronariche. *J Am Coll Cardiol*, **32**, 90-96.
- Santoni, V., Molloy, M. and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, **21**, 1054-1070.
- Schaper, W. and Ito, W.D. (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*, **79**, 911-919.
- Schaper, W. and Pasyk, S. (1976) Influence of collateral flow on the ischemic tolerance of the heart following acute and subacute coronary occlusion. *Circulation*, **53**, 157-62.
- Schiffers, P.M., Henrion, D., Boulanger, C.M., Colucci-Guyon, E., Langa-Vuves, F., van Essen, H., Fazzi, G.E., Levy, B.I. and De Mey, J.G. (2000) Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 611-616.

- Schmidt, C.E., Horwitz, A.F., Lauffenburger, D.A. and Sheetz, M.P. (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol*, **123**, 977-991.
- Scholz, D., Ito, W., Fleming, I., Deindl, E., Sauer, A., Wiesnet, M., Busse, R., Schaper, J. and Schaper, W. (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*, **436**, 257-270.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W.L., Fischer, K.D., Schuh, A.C., Schwartz, L., Bernstein, A. and Rossant, J. (1997) A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, **89**, 981-990.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**, 843-845.
- Tsuruta, D. and Jones, J.C. (2003) The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci*, **116**, 4977-4984.
- Tuttle, J.L., Hahn, T.L., Sanders, B.M., Witzmann, F.A., Miller, S.J., Dalsing, M.C. and Unthank, J.L. (2002) Impaired collateral development in mature rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, H146-155.
- van Royen, N., Piek, J.J., Buschmann, I., Hofer, I., Voskuil, M. and Schaper, W. (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, **49**, 543-553.
- Wang, N. and Stamenovic, D. (2000) Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C188-194.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W. and Wang, M.B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13959-13964.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Professor Beisiegel für die Übernahme des Anleitungsrechtes, für die Korrektur und die Begutachtung meiner Dissertation.

Herrn Dr. Wulf Ito möchte ich herzlich danken für die Überlassung des interessanten Themas und die trotz häufigem Zeitmangel gute Betreuung und Unterstützung. Vielen Dank auch für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und dem DAAD/Vigoni Austauschprogramm mit der Universität Siena.

Ich danke Herrn Professor Renwantz für die Begutachtung meiner Dissertation.

Bei Dr. Fritz Buck bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Analysen.

Meinen Kollegen danke ich sehr herzlich für die entspannte Zusammenarbeit, das Interesse an meinem Projekt, die Hilfe und nicht zuletzt natürlich für die gemütlichen Kaffeepausen.

Danke vor allem an Petra (auch für das Korrekturlesen!), Anna und Dorit. Aber auch an „die Ehemaligen“ Andrea, Juliane und Nina.

Ich möchte „Inspektor“ Hartwig von Herzen danken, der jederzeit die Gabe hatte, mich immer wieder zu motivieren. Auf der Suche nach Problemlösungen macht er seinem Namen alle Ehre!

Ebenso möchte ich „der Schläusten“ Claudia danken für jede Menge Spass, allzeit passende Kommentare, den gleichen Dialekt und ihr Kichern.

Ohne Mary hätte ich vor allem in der Endphase manchmal gerne noch aufgegeben. Danke für Deine Hilfe und für die Fußstapfen, in die ich in Richtung Promotion treten konnte.

An Tanja ein riesiges Dankeschön für das pädagogisch wertvolle Korrekturlesen meiner Arbeit, obwohl sie so viele „Fremdworte“ enthält!

Mein ganz lieber Dank geht an Gunnar für das Verständnis und die Motivationen, wenn die Anspannung einmal keinen Feierabend kannte.

Meinen lieben Eltern möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben. Vielen Dank für Euer Interesse und Eure Fürsorge.