

Identifizierung neuer, durch mechanische Verletzung induzierter Gene in Endothelzellen

Petros Arnaoutis¹, Steffen-Sebastian Bolz², Michael Pfaffl⁵, Marcus Treitl¹, Markus Essler¹,
Martin Aepfelbacher³, P. C. Weber¹, Alois Sellmayer^{1,4}

*

¹Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, ²Physiologisches Institut, ³Max von Pettenkofer-Institut, ⁴Medizinische Klinik, Klinikum der Ludwig Maximilians-Universität, 80336 München und ⁵Institut für Physiologie, Life Science Zentrum Weihenstephan, Technische Universität München, 85350 München, Deutschland

Hintergrund der Doktorarbeit:

Die mechanische Verletzung der Gefäßwand, wie z.B. durch die Angioplastie führt zur Aktivierung von Endothelzellen und zum endothelialen Wundverschluss durch deren Migration und Proliferation. Die Expression von Early Response Genen, die mit dem Zellwachstum korreliert sind, und die Freisetzung von cytosolischem Calcium stellen frühe Antworten auf die mechanische Endothelzellverletzung dar. So induziert die mechanische Verletzung die Expression von c-fos und Egr-1, deren Expression schon nach einer Stunde ihr Maximum erreicht. Ziel unserer Untersuchungen war es *in vitro* weitere Early Gene zu identifizieren, deren Expression durch die mechanische Verletzung induziert wird und außerdem den Zusammenhang zwischen der Expression von c-fos und der intrazellulären Calciumfreisetzung nach mechanischer Verletzung zu untersuchen.

Methoden und Ergebnisse:

Subtraktive Hybridisierung: Konfluent gewachsene humane Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) wurden mit einem Mikrokamm multipel verletzt, nach einer Stunde lysiert und die RNA nach Standardmethoden isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurden Vollängen-cDNAs von verletzten und unverletzten Zellen hergestellt. Aus diesen cDNAs wurden durch das PCR Suppression Subtraktive Hybridisation-Verfahren (Clontech) und durch Klonierung in den Vektor pCRII (Invitrogen) eine c-DNA-Bank erstellt, die mit durch mechanische Verletzung differentiell expremierten cDNAs angereichert ist. Dabei zeigte sich in komplexen Kontroll- und Hybridisierungsexperimenten lediglich eine differentielle Expression einer cDNA-Sequenz, die für ein Protein der ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs)-Familie kodiert.

Atlas Array: Mittels des Atlas Pure Total Labeling System (Clontech) wurde aus Gesamt-RNA von verletzten und unverletzten Zellen (siehe oben) m-RNA isoliert und [³²P]-markierte c-DNA-Sonden hergestellt. Diese Sonden wurden getrennt voneinander auf Atlas Human 1.2 I Array Membranen (Clontech) hybridisiert. Auf diesen Nylon-Membranen sind 1176 c-DNA Fragmente immobilisiert, darunter auch Housekeeping Gene zur Normierung, wie GAPDH. Es konnte mit Hilfe dieser Methode neben schon bekannten durch Verletzung induzierte Early Response Gene, wie c-fos (Koordinaten: A09c) und Egr-1 (E10a), auch weitere Gene nachgewiesen werden, wie ICAM-1 (E14g), ATF-3 (D14k) und PAI-1 (F03n). Die Bestätigung dieser semiquantitativen Ergebnisse erfolgte mit quantitativer real-time RT-PCR-Analyse. Hierfür wurde mit einem LightCycler (Roche) gearbeitet, der schnelles Thermocycling mit der Online-Fluoreszenz-Detektion der PCR-Produkt kombiniert.

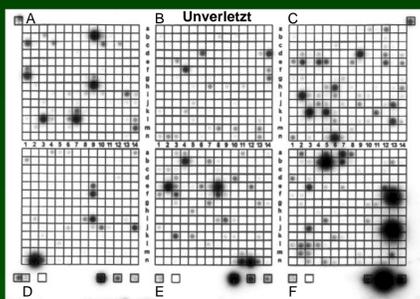


Bild 1: Array hybridisiert mit [³²P]-markierten Sonden aus unverletzten Zellen.

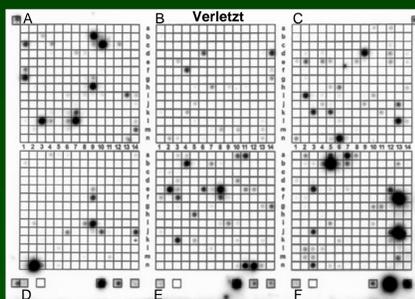


Bild 2: Array hybridisiert mit [³²P]-markierten Sonden aus verletzten Zellen.

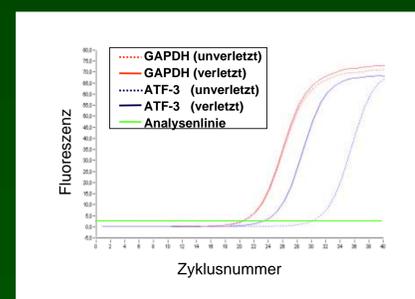


Bild 3: RT-PCR-Analyse der Expression von ATF-3 mittels LightCycler.

Northern Blot: RNA von verletzten bzw. unverletzten Zellen (siehe oben) wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine neutrale Nylonmembran geblotet und mit UV vernetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit [³²P]-markierten Anti-Sense-RNA-Sonden gegen c-fos, Egr-1, MCP-1 und GAPDH.

Fluoreszenzmikroskopie: Konfluent gewachsene HUVEC wurden mit den Calcium-sensitiven Farbstoffen Fura Red-AM und Calcium Green-AM beladen. Die sich in Abhängigkeit der cytosolischen Calcium-Konzentration ändernde Fluoreszenz der beiden Farbstoffe wurde mit einem konfokalen Mikroskop detektiert. Die Verletzung erfolgte durch eine 18-Gauge-Nadel, welche mit einem motorisierten Mikromanipulator durch den konfluenten Endothelzelllayer gezogen wurde.

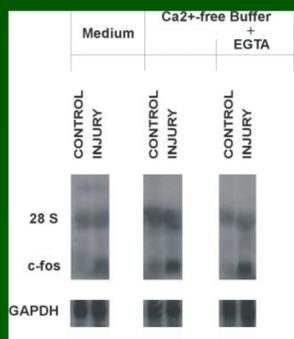


Bild 4: Die Expression von c-fos nach Verletzung ist nicht von der Verfügbarkeit extrazellulären Calciums abhängig.

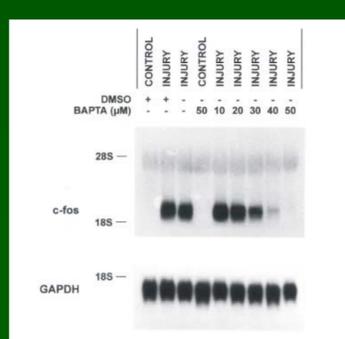


Bild 5: Der intrazelluläre Calcium-Chelator BAPTA-AM hemmt dosisabhängig die Expression von c-fos.

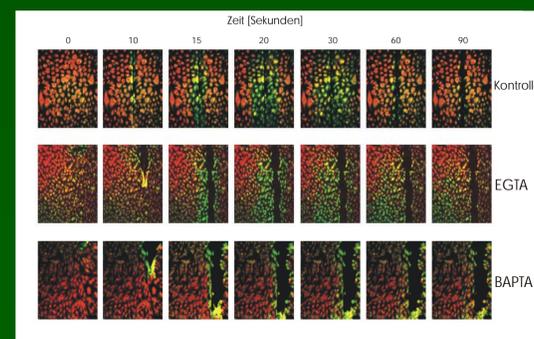


Bild 6: Die mechanische Endothelzellverletzung induziert eine vom Wundrand ausgehende Calciumwelle. Nach Behandlung mit dem intrazellulären Calcium-Chelator BAPTA-AM ist die Ausbreitung der Calciumwelle inhibiert, nicht aber in Anwesenheit von EGTA in Calcium-freiem Puffer.

Schlußfolgerungen:

Um neue durch die mechanische Verletzung induzierte Gene zu identifizieren wurde ein Zeitfenster von nur einer Stunde gewählt. Die zu vergleichenden mRNAs zeigten nur eine geringe differentielle Expression. Hierdurch wurde die effektive Anreicherung differentiell expremierter Gene vermindert und die Sensitivität der Subtraktiven Hybridisierung war stark reduziert. Es konnte nur eine Sequenz für ein Protein der ADAMTS-Familie detektiert werden. Sensitiver erwies sich der Nachweis mittels dem Atlas Array System. Hiermit konnte die differentielle Expression von c-fos und Egr-1 bestätigt, sowie z. B. für ICAM-1, ATF-3 und PAI-1 aufgezeigt werden. Bestätigende quantitative PCR-Untersuchungen werden derzeit durchgeführt. Die Daten weisen jedoch darauf hin, daß nicht nur Transkriptionsfaktoren, sondern auch z.B. Adhäsionsmoleküle und Plasminogen-Inhibitoren in der Frühphase der mechanischen Verletzung von Endothelzellen vermehrt expremiert werden.

Die Expression von c-fos nach mechanischer Endothelzellverletzung ist von der Verfügbarkeit intrazellulären Calciums, nicht aber vom Einstrom extrazellulären Calciums abhängig. Eine Beeinflussung der intrazellulären Calciumhomöostase kann die endotheliale Wundheilung beeinflussen.