

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten - Allgemeine Dermatologie
und Venerologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. A. Luger -

**Neues In-vitro Assay zur Untersuchung der Endothel –
Tumorinteraktion im Rahmen der Extravasation**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Kleinerüschkamp, Felix Martin Conrad
aus Mainz

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Dr. T. Görgе

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S.W. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. A. Luger -
Referent: Prof. Dr. med. S. W. Schneider
Koreferent: Dr. med. Dr. Tobias Görge

ZUSAMMENFASSUNG

Neues In-Vitro Assay zur Untersuchung der Endothel – Tumorinteraktion im Rahmen der Extravasation

Kleinerüschkamp, Felix Martin Conrad

Maligne Tumore metastasieren. Abgesiedelte Tumorzellen werden im Blut oder in Lymphe durch den Organismus transportiert und verlassen die Gefäße während der sog. Extravasation. Als Grenzschicht spielt das Endothel bei diesem Vorgang eine wichtige Rolle. Endothelzellen (EC) bilden, speichern und exozytieren Von-Willebrand-Faktor (VWF). Dieses große, hochspezialisierte Glykoprotein ist unmittelbar an den Gerinnungs- und Inflammationskaskaden des menschlichen Körpers beteiligt, und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen EC und Tumorzellen.

In dieser Arbeit wird ein mehrschichtiges, zellbasiertes In-vitro-Modell für die Extravasation getestet, welches die Interaktion zwischen Gefäßen und Tumorzellen untersucht. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) dient dabei als messbare Größe für die Integrität der Gefäßwand. Ein besonderer Augenmerk gilt dem VWF und seinem Einfluss auf die Geschwindigkeit der Schädigung des Gewebes durch die eingebrachten Tumorzellen. Ein statistisch verwertbarer Einfluss des VWF konnte in den durchgeführten Versuchen nicht gemessen werden.

VWF wird auf der Oberfläche von EC gebunden. Bisher ist nicht eindeutig geklärt, welches Protein diese Bindung vermittelt. Diese Arbeit zeigt, dass ein in EC vorkommendes Protein (Gp1b) dieser fehlende Bindungspartner sein kann. In der Immunfluoreszenz zeigt sich eine eindeutige Kolo-kalisation.

Termin der mündlichen Prüfung: 10.05.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| 1 Einleitung..... | 3 |
| 1.1 Metastasierung | 3 |
| 1.2 Das maligne Melanom und seine Zellen..... | 4 |
| 1.3 Endothel und Extravasation | 4 |
| 1.4 ADAMTS13 | 8 |
| 1.5 Der VWF und seine Rolle in der Metastasierung..... | 9 |
| 1.6 Ziel der Arbeit..... | 10 |
| 2 Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Zellen und Zellkultur..... | 11 |
| 2.1.1 Amelanotische Melanomzellen vom Typ A7..... | 11 |
| 2.1.2 HMEC-1..... | 13 |
| 2.1.3 HUVEC..... | 14 |
| 2.1.4 MDCK-C7 Zelllinie..... | 15 |
| 2.1.5 Zellkultur..... | 16 |
| 2.2 TEER/ELEXA | 18 |
| 2.2.1 Versuchsaufbau..... | 20 |
| 2.2.2 Die Filter-Welleinsätze mit Mikrofilter | 21 |
| 2.2.3 Aussähen der Zellen..... | 22 |
| 2.2.4 Das Messgerät | 24 |
| 2.2.5 Messen des elektrischen Widerstandes im Versuch..... | 25 |
| 2.3 Immunfluoreszenz Mikroskopie | 26 |
| 2.3.1 Aussäen der Zellen auf beschichtete Deckgläschen (Poly-L-Lysin)..... | 28 |
| 2.3.2 Fixieren und Färben der Zellen | 28 |
| 2.3.3 Betrachten der Präparate unter dem Immunfluoreszenzmikroskop | 29 |
| 2.4 FACS | 30 |
| 2.4.1 Durchführung der FACS Analyse | 32 |
| 2.5 intrazelluläre Calcium-Messung..... | 33 |
| 2.5.1 Aussäen der Zellen auf beschichtete Deckgläschen (Gelatine)..... | 35 |
| 2.5.2 Die Ca-Messung..... | 35 |
| 2.6 Tabellarische Auflistung der Verwendeten Materialien | 37 |
| 3 Ergebnisse - Teil I..... | 39 |

| | | |
|---------------|---|---|
| 3.1 | TEER/ELEXA | 39 |
| 3.1.1 | Die Kontrollen – Nur C7 | 40 |
| 3.1.2 | Die Kontrollen – Nur HMEC / leeres Filter-Well | 42 |
| 3.1.3 | C7 HMEC | 43 |
| 3.1.4 | TEER nach Zugabe der A7-Melanomzellen..... | 44 |
| 3.1.5 | Zugabe von Histamin | 45 |
| 4 | Ergebnisse - Teil II | 47 |
| 4.1 | Calcium-Messung | 47 |
| 4.2 | FACS | 48 |
| 4.3 | Immunfluoreszenz | 49 |
| 4.3.1 | Färbung des VWF in HUVEC Zellen | 49 |
| 4.3.2 | Kolokalisation VWF / Gplb in HUVEC | 51 |
| 4.3.3. | Ausschluss von Fehlfärbungen | 53 |
| 5 | Diskussion | 55 |
| 5.1 | Der VWF – adhäsiv und reaktiv | 55 |
| 5.1.2 | Gebunden aber an wen?..... | 55 |
| 5.1.3 | Entfaltung von VWF und Shear-stress | 58 |
| 5.1.4 | Regulation des VWF durch ADAMTS 13 | 58 |
| 5.2 | Extravasation Tumor-Endothel „cross-talk“ | 59 |
| 5.2.1 | Thrombin, MMP-1 und PAR I..... | 59 |
| 5.3 | TEER im neuen In-vitro-Modell | 61 |
| 6 | Anhang und Literaturverzeichnis | 63 |
| 6.1 | Inhaltsstoffe und Rezepturen verwendeter Materialien | 63 |
| 6.2 | Literaturverzeichnis..... | 66 |
| 6.3 | Danksagungen | 71 |
| 6.4 | Curriculum vitae | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

1 Einleitung

1.1 Metastasierung

(griech.: μετάσταση, von μετα~, meta~ - weg~ und στάση, stáse - die Stelle, Haltung, der Ort)

Maligne Tumoren sind in der Lage Metastasen, also Tochtergeschwülste, zu bilden, die keine direkte Verbindung zum Primärtumor besitzen. Der Begriff Metastasierung beschreibt diesen komplexen Vorgang, der aus nicht minder komplexen Teilvorgängen zusammengesetzt ist. Man unterscheidet 1. die Intravasation, 2. die Verschleppung entlang der verschiedenen Metastasierungswege und 3. die Extravasation.

Die Intravasation ist der erste Schritt und beinhaltet das Eindringen von Zellen des Primärtumors in die Metastasierungswege (Blutwege, Lymphwege, Körperhöhlen). Der Tumor wächst invasiv, überschreitet Organgrenzen und einzelne Zellen, oder Zellverbände lösen sich aus dem Primärtumor und werden im zweiten Schritt entlang der Metastasierungswege verschleppt. Der dritte und für diese Arbeit bedeutende Schritt ist die Extravasation, bei der die verschleppten Tumorzellen das Gefäßsystem, in dem sie sich befinden, wieder verlassen, um in dem angrenzenden Gewebe eine Metastase zu bilden [1].

Im Folgenden beschränken sich alle näheren Ausführungen auf die hämatogene Metastasierung und nehmen so direkten Bezug zu den durchgeführten Versuchen. Die in den Versuchen verwendeten Tumorzellen sind amelanotische Melanomzellen.

1.2 Das maligne Melanom und seine Zellen

Maligne Melanome gehören zu den bösartigen, metastasierenden Tumoren der Haut. Ausgehend von den zur Wanderung befähigten Melanozyten wachsen die entarteten Melanomzellen nicht in einem geschlossenen Zellverbund, sondern können migrieren. Diese Eigenschaft ist mitverantwortlich für die frühzeitige, prognostisch extrem bedeutsame, lymphogene und/oder hämatogene Metastasierung dieser Tumore.

Maligne Melanome kommen überwiegend bei Menschen mit heller Hautfarbe vor und die Inzidenz in Europa beträgt derzeit 5 – 14 Neuerkrankungen pro Jahr und 100 000 Einwohner. Chronische Lichteinflüsse, genetische Komponenten und insbesondere die traumatische Sonnenbelastung in der Kindheit begünstigen das Entstehen maligner Melanome [2, 3].

1.3 Endothel und Extravasation

Unser Gefäßsystem ist vollständig mit Endothel ausgekleidet. Es handelt sich dabei um eine dichte, hoch spezialisierte Zellschicht, welche auf der einen Seite Kontakt zum Blut oder zur Lymphe hat und auf der anderen Seite mit den weiteren Gefäßschichten und der subendothelialen Matrix verbunden ist. Das Endothel bildet also eine Grenzschicht zwischen Blut bzw. Lymphe und Gewebe. Der gesamte Zellverbund des Endothels im Körper eines erwachsenen Homo sapiens besteht aus $1-6 \times 10^{13}$ Zellen, wiegt ca. 720g und bedeckt eine Fläche von 3500-6000 Quadratmetern [4, 5]. Das Endothel übernimmt viele verschiedene physiologische Aufgaben und ist nach wie vor ein zentraler Gegenstand aktueller Forschung. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnten Heidenhahn (1891) und Starling (1894) nachweisen, dass das Endothel als eigenständiges, aktives Zellsystem eine selektive Barriere zwischen Blut und Gewebe ausbildet. Insbesondere die physiologischen Studien zur Endothel-Leukozyteninteraktion durch Gowan (1959) und elektronenmikroskopische Untersuchungen durch Weibel und Palade (1964) [6]

konnten wichtige Informationen zu den Aufgaben des Endothels liefern. So wird das Endothel in seiner Komplexität heute als dynamisches, heterogenes Organ verstanden, welches zentrale Funktionen in metabolischen, immunologischen und sekretorischen Prozessen übernimmt [7, 8]. Bei den vielfältigen physiologischen Aufgaben verwundert es nicht, dass auch viele pathophysiologische Prozesse in direktem Zusammenhang mit dem Endothel stehen. Arteriosklerose, Inflammation, Hypertonie, Koagulation, Neoangiogenese und auch die in dieser Arbeit behandelte Metastasierung bzw. Extravasation von malignen Tumorzellen finden direkt an und in Interaktion mit den Endothelzellen statt.

Der Gerinnung bzw. dem komplexen Gerinnungssystem, dem internen Verblutungsschutz des menschlichen Körpers, kommt dabei eine Schlüsselposition zu. Im Gerinnungssystem interagieren die verschiedenen, im Blut zirkulierenden Gerinnungsproteine, die Thrombozyten und die sekretorisch aktiven Endothelzellen in einem kaskadenförmig aufgebauten, selbstregulativen Zusammenspiel. Das Ziel dieses Zusammenspiels ist es, im Rahmen der primären Hämostase, Blutungen zum Stillstand zu bringen und in der sekundären Hämostase Endothel- und Gefäßwandläsionen wirksam mit einem Fibringerinnsel zu decken. Im Gegenzug muss eine überschießende Gerinnung mit möglichem Gefäßverschluss und der konsekutiven Minderperfusion im angrenzenden Gewebe unbedingt verhindert werden. Dazu wird parallel die Fibrinolyse aktiviert, welche diese „Nebenwirkungen“ der Gerinnung als eine Art Gegenspieler verhindert.

Das Gerinnungssystem wird immer dann aktiviert wenn es zur Schädigung der Gefäßwand und/oder des Endothels kommt. Verletzungen, auch kleinste Läsionen, lokale oder systemische Inflammation und eine unzureichende Versorgung der Gefäßwand mit Sauerstoff und Nährstoffen können dabei als mögliche Auslöser fungieren. Die luminale Oberfläche des Endothels ist normalerweise antithrombotisch und anti-adhäsiv, um einen möglichst reibungslosen Blutfluss zu gewährleisten. Im Rahmen der Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es jedoch auch zu einer Aktivierung der betroffenen

Endothelzellen und damit zu einer proinflammatorischen und prokoagulatorischen Zelloberfläche. Es werden verschiedene inflammatorische und gerinnungsfördernde Zytokine und Proteine freigesetzt. Eines dieser freigesetzten Proteine ist der Von-Willebrand-Faktor (VWF), ein hoch spezialisiertes Glykoprotein, welches die Fähigkeit besitzt, große Multimere zu bilden und unter anderem entscheidende Aufgaben in der Gerinnung übernimmt.

Namensgeber des VWF ist der finnische Arzt Erik von Willebrand, der 1926 als erster die autosomal-dominant vererbte Blutungsstörung beschrieb, die heute als von-Willebrand-Jürgens-Syndrom bekannt ist [9]. Mit einer Prävalenz von 1% handelt es sich um die häufigste angeborene Gerinnungsstörung. Typisch für diese Erkrankung sind die im klinischen Verlauf auftretenden diskreten kombinierten Blutungssymptome, bestehend aus hämophilietypischen, großflächigen Blutungen und petechialen Schleimhautblutungen. Pathophysiologisch wird diese Symptomkombination durch eine qualitative oder quantitative Veränderung des VWF erklärt. Der ausschließlich in Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisierte VWF stabilisiert den plasmatischen Gerinnungsfaktor VIII und ermöglicht die Thrombozytenadhäsion über den Glykoprotein-Ib-Komplex (GpIb). Ist der VWF in seiner Funktion eingeschränkt oder fehlt er gar vollständig, ist nicht nur die plasmatische Gerinnung beeinträchtigt, sondern es kommt auch zu einer Verlängerung der Blutungszeit, da die Thrombozytenadhäsionsfähigkeit gestört ist.

Der VWF wird von Endothelzellen synthetisiert und dann reguliert exozytiert [10]. Lange Zeit wurde angenommen, dass der VWF nur an der basalen Zellseite aus der Zelle gelangt und dort Teil der so genannten subendothelialen Matrix wird. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass ein Teil des VWF auch an der apikalen, dem Blut zugewandten Seite exozytiert werden kann [11]. Dabei wird der größte Teil des VWF nicht direkt ausgeschüttet, sondern in bestimmten endothelspezifischen Organellen, den Weibel-Palade-Körperchen (Weibel-Palade-Body = WPB) gespeichert. Die WPB sind stabförmig, ca. $2\mu\text{m} \times 0,2\mu\text{m}^2$ groß und enthalten neben dem VWF eine Vielzahl weiterer, vasoaktiver Moleküle, wie z.B. das proinflammatorische P-Selektin und

Interleukin 8. Ein großer Teil der WPB befinden sich an der apikalen Seite der Endothelzellen und liegen als so genannte „ready-formed-vesicles“ direkt unter der Zellmembran. Sie können bei Aktivierung der Endothelzelle exozytiert werden und ihren Inhalt in das Gefäßsystem entleeren. Erst in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, wie schnell dieser Exozytose-Vorgang eingeleitet werden kann. Unmittelbar nach Aktivierung der Endothelzelle kommt es in wenigen Sekunden zu einer Fusion der WPB mit der Zellmembran und zu einer konsekutiven Freisetzung der enthaltenden Proteine. Die Geschwindigkeit der Exozytose unterstreicht die essentielle Rolle des VWF [12, 13]

Kommt der VWF mit dem fließenden Blut in Kontakt, wirkt so genannter „Shear-stress“ auf das gerade exozytierte Protein. Shear-stress ist die Kraft, die von der bewegten Flüssigkeit Blut auf den wandnahen, unbewegten, VWF ausgeübt wird. Diese Kraft entfaltet den noch aufgerollten VWF und es entstehen ultra große, zur Vernetzung befähigte Multimere (ULVWF = ultra-large VWF fibers). Diese lassen sich als gestreckte, häufig stark vernetzte, fadenartige Strukturen auf der Zelloberfläche darstellen. Die Verbindung zwischen Vorhandensein und Stärke des Shear-stress und der Entfaltung des VWF konnte bereits gezeigt werden [14]. Damit Shear-stress effektiv auf den VWF wirken kann muss dieser auf der Zelloberfläche gebunden werden. Ansonsten würden die VWF Moleküle vom Blutstrom mitgerissen und könnten keine „Fäden“ bilden.

Insgesamt drei Bedingungen müssen erfüllt sein damit der VWF seine physiologischen und pathophysiologischen Aufgaben erfüllen kann. Er muss erstens mit Hilfe von bisher nicht eindeutig identifizierten Molekülen auf der Zelloberfläche fixiert sein, zweitens in entfalteter Form, als ULVWF, vorliegen, drittens muss der VWF einer gewissen Regulation unterworfen sein, damit die entstandenen, auf der Zelloberfläche haftenden, extrem adhäsiven Multimere nicht dauerhaft prothrombotisch und proinflammatorisch wirksam bleiben.

In diesem Zusammenhang wurde 2001 eine Metalloprotease mit dem Namen ADAMTS13 identifiziert, deren Fehlen beim Menschen in rezidivierenden Mikrothromben und extrem großen, im Plasma nachweisbaren VWF-Multimeren resultiert [15]. Die aus dieser Pathophysiologie entstehende Erkrankung ist

bekannt als Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP/ Moschcowitz-Syndrom).

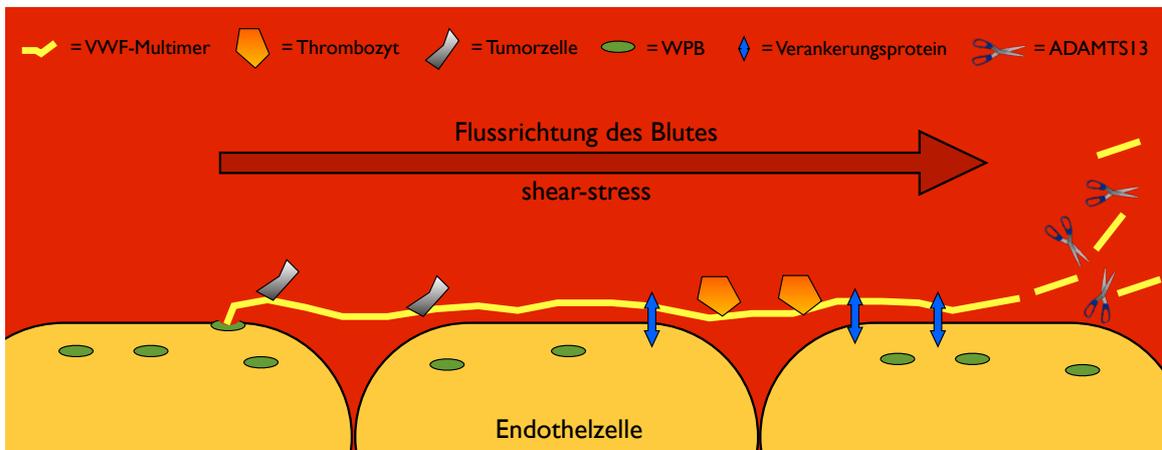


Abbildung 1: Schematische Darstellung der luminalen VWF Sekretion. Der exozytierte, wandnahe VWF wird durch den wirkenden Shear-stress entfaltet und durch bisher nicht eindeutig definierte Proteine an die Zelloberfläche gebunden. Thrombozyten, Leukozyten und/oder Tumorzellen können an bestimmten Bindungsdomänen gebunden werden. Die Protease ADAMTS13 zerschneidet die Multimere und reguliert so das prothrombotische Potential des VWF.

1.4 ADAMTS13

Die Metalloprotease ADAMTS13 (**A**-Disintegrin-like and **M**etalloproteinase with **T**hrombospondin-1 repeats) wurde 2001 entdeckt [15, 16]. ADAMTS13 ist als Protease in der Lage die ULVWF-Moleküle zu degradieren und ist somit das Schlüsselprotein der postsekretorischen VWF Regulation. Das Fehlen, eine fehlerhafte Synthese oder eine antikörpervermittelte Funktionsstörung der Protease führt zu einem fehlenden Abbau der ULVWF Moleküle im menschlichen Körper. So entstehen im Rahmen der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP/ Moschcowitz-Syndrom) unzählige Mikrothromben, welche zu irreversiblen Organschäden und zum Tode führen [17]. Auch in pathophysiologischen Prozessen anderer chronischer, inflammatorischer Erkrankungen, wie zum Beispiel der Leberszirrhose, Arteriosklerose und Sepsis scheint ADAMTS13 eine wichtige Rolle zu spielen [18, 19].

1.5 Der VWF und seine Rolle in der Metastasierung

Der VWF wird also hauptsächlich von Endothelzellen produziert und bei Aktivierung dieser Zellen freigesetzt. Auf der luminalen Zellseite ist der freigesetzte VWF dem fließenden Blut und somit einem Shear-stress ausgesetzt. Es bilden sich fadenähnliche ULVWF-Multimerere. Diese „Fäden“ bleiben auf den Endothelzellen haften und können mit ihren vielfältigen Bindungsregionen mit anderen Bestandteilen des Blutes interagieren. ADAMTS13 spaltet die ULVWF-Moleküle und reguliert so das prothrombotische und adhäsive Potential des VWF. Es konnten bereits direkte Interaktionen des VWF mit Thrombozyten und Leukozyten nachgewiesen werden [20]. Auch Tumorzellen befinden sich im Rahmen des hämatogenen Metastasierungsprozesses im Blut und können eine aktive und passive Interaktion mit Blutbestandteilen eingehen. Erst kürzlich wurden direkte Beziehungen zwischen dem luminal exozytierten VWF und Tumorzellen gezeigt [21] [22]. Die Einflüsse von VWF auf die Metastasierung werden dabei allerdings widersprüchlich beschrieben. Mehrere Studien zeigen, dass hohe VWF-Plasmaspiegel mit einer schnelleren Tumorausbreitung einhergehen und dass eine Blockierung von VWF mit Antikörpern die Metastasierung verzögern kann. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt allerdings, dass die Lungenbesiedlung durch Tumorzellen in VWF-Knockout-Mäusen beschleunigt ist [22-24].

Die Widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle des VWF im Rahmen der Metastasierung und der Tumorzell-Endothelzellinteraktion zeigen, dass extrem wichtige Zusammenhänge in einer Schlüsselstelle der Tumorausbreitung ungeklärt sind.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit ist es, erstens ein Verfahren zu testen und wenn möglich zu etablieren, welches die Extravasation von Tumorzellen besser beurteilbar bzw. messbar macht. Dazu soll ein mehrschichtiges, zellbasiertes In-vitro-Modell für die Extravasation erstellt und getestet werden, welches die Interaktion zwischen Gefäßwand und Endothel auf der einen Seite und den Tumorzellen auf der anderen Seite darstellt. Als Messgröße soll der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) verwendet werden, da dieser, wie bereits beschrieben, eine zeitbezogene Aussage über die Integrität einer Zellschicht liefert [25]. Die bisher durchgeführten TEER-Messungen werden durch eine zweite Zellschicht ergänzt um sich im Modell dem Aufbau der menschlichen Blutgefäße zu nähern.

Möglicherweise lassen sich über die Entwicklung eines geeigneten, möglichst naturgetreuen In-vitro-Modells auch unnötige Tierversuche verhindern, da bestimmte Sachverhalte bereits im Modell geklärt oder doch zumindest besser eingegrenzt werden können. So können zukünftige Fragen gezielter gestellt und Versuche gezielter geplant werden.

Zweitens soll der VWF als mögliches Schlüsselprotein der Metastasierung näher untersucht werden. Der besondere Augenmerk soll dabei auf die ULVWF-Multimere und deren Fixierung auf der Endothelzelloberfläche gerichtet werden.

Die Arbeit soll einen Beitrag zur immer aktuellen und vielfältigen Tumorforschung liefern und das Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge fördern. Am Ende der Arbeit soll neben einer Bewertung der gewonnenen Ergebnisse auch ein Ausblick auf mögliche weitere Fragestellungen und Versuchsansätze folgen, um die gewonnenen Erkenntnisse direkt sinnvoll zu nutzen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen und Zellkultur

Bei allen Versuchen dieser Arbeit wurden verschiedene Zellen eingesetzt. Diese werden im Folgenden grundlegend beschrieben. Die genaue Verwendung der einzelnen Zellen wird dann im Methodenteil des jeweiligen Versuchs erläutert. Die verwendeten Zellen müssen jeweils mit einem geeigneten Medium versorgt werden. Die genauen Zusammensetzungen dieser Medien finden sich im tabellarischen Anhang dieses Kapitels.

2.1.1 Amelanotische Melanomzellen vom Typ A7

Bei den verwendeten A7-Zellen handelt es sich um humane amelanotische Melanomzellen (AMM). Diese Art von Melanomzellen bildet kein Melanin und verhält sich biologisch aggressiver als Zellen pigmentierter, maligner Tumore. Die Diagnose der AMM ist schwieriger und erfolgt häufig erst histologisch nach Exzision von Hautproben unklarer Dignität. Die A7-Zelllinie besteht aus Klonen die mit einem Plasmid infiziert wurden, welches für ein geneticinresistenzvermittelndes Protein und ein „aktin-binding-protein“ (ABP) kodiert. Das ABP vermittelt unter anderem die Interaktion zwischen dem zelleigenen Aktinfilamentsystem und den Glykoproteinen der Plasmamembran anderer Zellen. Das ABP ermöglicht den A7-Zellen außerdem eine bestimmte Form der Fortbewegung, die Lokomotion. Maligne Zellen zeigen häufig eine Veränderung der Expressionssequenz von Genen, die das Aktinfilamentsystem verändern, oder die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Zellmembranen vermitteln (ABP). Für die A7-Zellen wird ein spezielles Kulturmedium verwendet, welches ein Aminoglykosid (Geneticin) enthält. Geneticin wirkt toxisch auf Pro- und Eukaryonten und übt einen Selektionsdruck auf die nicht

zur Lokomotion befähigten Zellen aus. So wird erreicht, dass nur A7-Zellen überleben, die auch mit dem Plasmid infiziert wurden [26-29].

Die in dieser Arbeit verwendeten A7-Melanomzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A. Schwab aus dem Physiologischen Institut der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

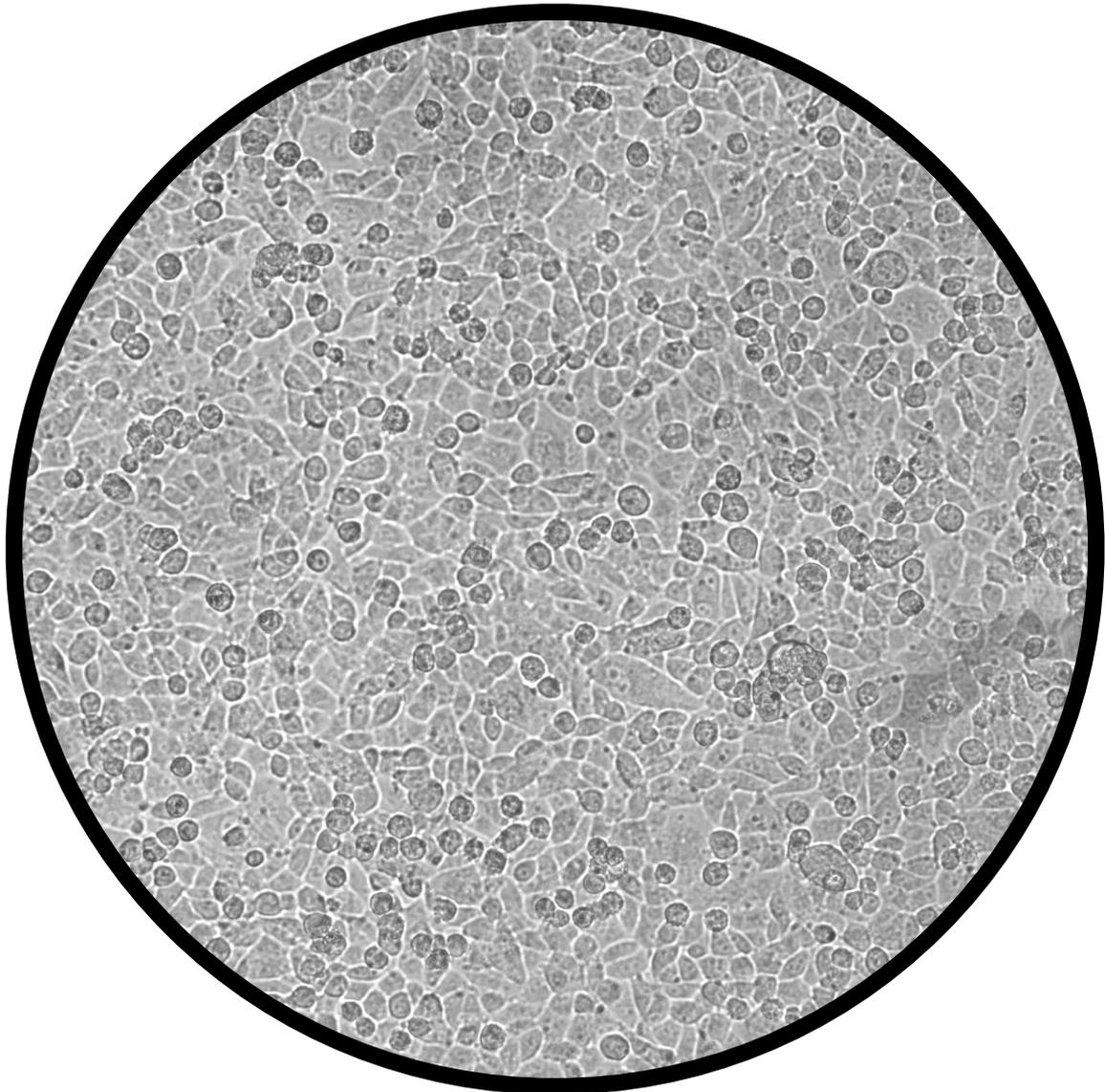


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Bild der A7 Melanomzellen

2.1.2 HMEC-1

Das Akronym HMEC steht für „**human microvascular endothelial cells**“. Die in den Versuchen verwendeten Zellen vom Typ HMEC-1 sind eine besondere, immortalisierte Zelllinie und stammen ursprünglich aus Atlanta, USA. Lange war die Forschung an Endothelzellen nur eingeschränkt möglich, da die Zellen schwierig zu isolieren und kultivieren sind und nur eine kurze Lebensspanne haben. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen wurden HDMEC, **human dermal microvascular endothelial cells**, mit einem Plasmid transfiziert, welches für ein bestimmtes Virusantigen (SV40T Ag) kodiert. Dieser Vorgang resultierte, wie 1992 zum ersten Mal veröffentlicht, in einer Immortalisierung der transfizierten Zellen [30]. Selbst nach 95 Passagen zeigten die als HMEC-1 bezeichneten Zellen keine Seneszenz (lateinisch: senescere = alt werden, altern), wohingegen regulär isolierte und kultivierte Endothelzellen diese Veränderungen bereits nach 8-10 Passagen zeigen. HMEC-1-Endothelzellen bilden in Kultur regelrechte Monolayer mit dem für Endothelzellen typischen pflastersteinartigen Relief, exprimieren und sezernieren den für diese Arbeit wichtigen VWF und zeigen viele weitere endothelspezifische Eigenschaften. So exprimieren HMEC-1 Zellen bestimmte Proteine (CD31, CD36, ICAM-1, CD44), die in der Zellmembran und auf der Zelloberfläche Kontakte zu Zellen des Blutes, z.B. Leukozyten herstellen und an deren Extravasation beteiligt sind. Die HMEC-1-Zelllinie gilt als erste immortalisierte Endothelzelllinie, mit normalen morphologischen, phänotypischen und funktionellen Charakteristika. Die Zellen eignen sich daher in besonderer Weise für Versuche, bei denen das Endothel in seiner physiologischen oder pathophysiologischen Funktion untersucht werden soll. Zusätzlich zu den erhaltenen Zelleigenschaften sind die HMEC-1 relativ einfach zu kultivieren, zu ernähren und zu passagieren. In den Versuchen wurden HMEC-1 Zellen der Passagen 1 bis 25 verwendet.

2.1.3 HUVEC

Das Akronym HUVEC steht für „human umbellical venous endothelial cells“. Diese werden im Labor des Physiologischen Institutes der WWU aus Nabelschnüren gewonnen. Die Arbeitsschritte werden im folgenden kurz erläutert. Die grundlegende Methode Endothelzellen aus Nabelschnüren zu isolieren und zu kultivieren wurde zuerst 1973 beschrieben [31]. Das ursprüngliche Protokoll wird heute in abgewandelter Form routinemäßig durchgeführt.

Menschliche Nabelschnüre werden direkt nach der Geburt von der Plazenta getrennt und an beiden Enden mit Klemmen verschlossen. Anschließend wird die Nabelvene sondiert und mit PBS (-/-) gespült. Nach Entfernen des überschüssigen PBS durch Einspritzen von Luft und dem Verschluss des nicht sondierten Endes wird erneut PBS (-/-) mit 20%-Kollagenase eingespült. Dieses wird für 10 Minuten bei 37°C in der Nabelschnur belassen. Danach wird die Nabelschnur massiert und die PBS-Kollagenase-Suspension mit den nun abgelösten HUVEC Zellen vorsichtig in ein 50ml Röhrchen gegeben. Dieses wird mit der gleichen Menge Medium-M199 aufgefüllt und abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in 5ml Medium resuspendiert und in gelatinebeschichtete T25 Kulturflaschen gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 Stunden, alle weiteren Wechsel erfolgen im Abstand von 48 Stunden.

HUVEC Zellen in niedrigen Passagen eignen sich besonders für Versuche bei denen ein möglichst physiologisches Zellverhalten wichtig ist. In höheren Passagen kommt es zu einer raschen Alterung der Zellen und zu einem Verlust oder zumindest einer Veränderung vieler der für Endothelzellen typischen Eigenschaften.

2.1.4 MDCK-C7 Zelllinie

Diese gut untersuchte Zelllinie wurde 1958 von Madin und Darby aus der Niere eines Cockerspaniels isoliert [32]. Die Zellen stammen ursprünglich aus dem renalen Sammelrohr. Man unterscheidet zwei verschiedene Zell-Subtypen, C7 und C11 [33]. In den Versuchen dieser Arbeit kamen die Zellen des Subtyps C7 zum Einsatz. Der C7-Subtyp gleicht den Hauptzellen des Sammelrohrs, die an der Elektrolytbalance des menschlichen Körpers beteiligt sind. C7 Zellen bilden in Kultur konfluierende Monolayer, über denen sich ein hoher transepithelialer Widerstand (bis zu $13000 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$) messen lässt. Diese Eigenschaft besitzen die Zellen des Subtyps C11 nicht. Der hohe TEER, die unkomplizierte Kultivierung und die häufige Verwendung in der Forschung machen die C7 Zellen ideal für die geplanten Versuche.

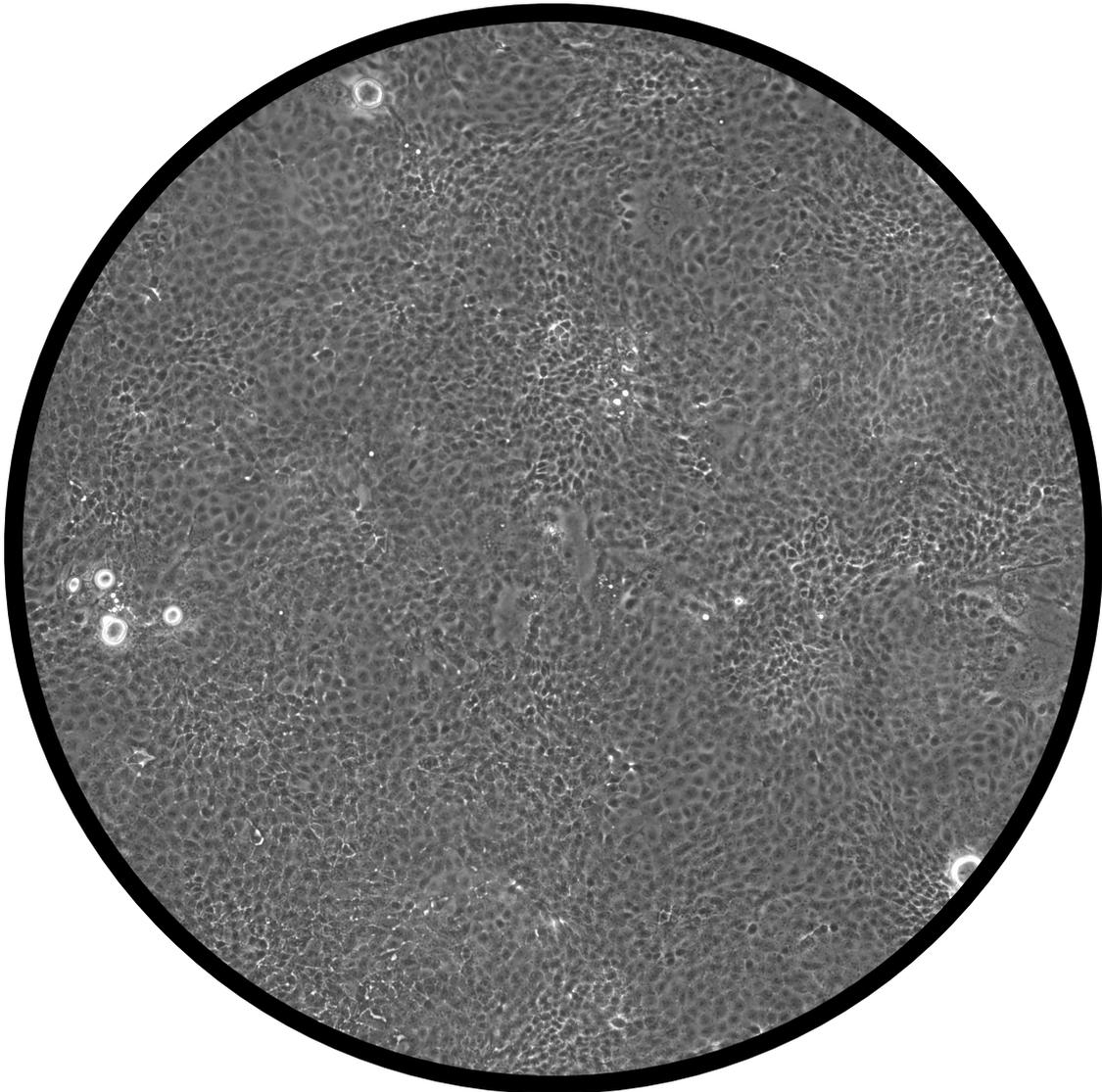


Abbildung 3: Lichtmikroskopisches Bild der C7 Zellen

2.1.5 Zellkultur

Die verwendeten Zellen und die verschiedenen Zelllinien wachsen je nach benötigter Zellmenge in T25 bzw. T50 Kulturflaschen und müssen regelmäßig passagiert werden. Die zu passagierende Kulturflasche wird aus dem Brutschrank entnommen und das enthaltene Medium wird abgesaugt. Danach werden die Zellen vorsichtig mit PBS (-/-) gewaschen, um die Reste des Mediums abzuspielen. Das PBS (-/-) wird abgesaugt und es wird eine passende Menge Trypsin (bei Endothelzellen wird Accutase verwendet) in die Flasche gegeben (T25 = 1ml). Das Trypsin löst die adhärennten Zellen, ohne

diese zu schädigen. Um den genauen Zeitpunkt des Ablösens nicht zu verpassen, werden die Zellen während der Behandlung mit Trypsin unter dem Mikroskop beobachtet. Nach 1-2 Minuten sind die Zellen ausreichend vom Boden der Flasche gelöst, so dass die Reaktion des Trypsin durch die erneute Zugabe von Zellmedium gestoppt wird. Die abgelösten Zellen werden in dem zugegebenen Medium suspendiert und in einem Falcon-Röhrchen abzentrifugiert. Der entstehende Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Das übrig gebliebene Zellpellet wird in einer definierten Menge Medium resuspendiert und auf die neuen Kulturflaschen verteilt oder in Versuchen verwendet. Dazu werden die Zellen, wie im jeweiligen Versuchsteil beschrieben in Filter-Wellen oder auf Deckgläschen gesät.

Alle Arbeiten an den Zellen finden in dem eigens dafür eingerichteten Zelllabor statt. Jedes Öffnen der Zellkulturflaschen wird unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Verunreinigungen, insbesondere durch Keime, zu verhindern. Die entsprechend ausgestatteten Arbeitsbänke arbeiten mit einem konstanten, laminaren Luftstrom. Das jeweilige Zellmedium und die verschiedenen Lösungen werden vor dem Verwenden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, um Temperaturschwankungen und deren Einfluss auf die Zellen bestmöglich zu vermeiden. Der für alle Zellen verwendete Brutschrank ist ein Hera-Cell 150 von Heraeus (Temperatur 37°C / Co₂-Sättigung 5% / pH 7,4 / maximale Luftfeuchtigkeit).

Zellen in Kultur werden regelmäßig mit geeignetem Medium versorgt. Der Mediumwechsel erfolgt in dreitägigem Rhythmus. T25 Kulturflaschen werden dabei mit 8-10ml Medium, größere Flaschen mit entsprechend mehr Medium befüllt.

2.2 TEER/ELEXA

Die beiden Akronyme TEER bzw. ELEXA stehen für „**T**rans-**e**pitheliale **e**lectric **R**esistance“ bzw. „**E**lectric **E**xtravasations **A**ssay“. Es geht also primär um die Messung des elektrischen Widerstandes über einer Zellschicht während einer bestimmte Zeitspanne. Beobachtet und dokumentiert werden Änderungen des gemessenen Widerstandes.

Der elektrische Widerstand ist ein Maß dafür, welche elektrische Spannung erforderlich ist, um einen bestimmten elektrischen Strom durch einen elektrischen Leiter fließen zu lassen. Als Formelzeichen für den elektrischen Widerstand wird in der Regel R verwendet. Der Widerstand hat die SI-Einheit Ohm, sein Einheitenzeichen ist das große Omega (Ω).

Der TEER einer einzelnen Zellschicht, einer so genannten „monolayer“ wird entsprechend des ersten Kirchhoff'schen Gesetzes aus den verschiedenen vorliegenden Einzelwiderständen berechnet. Siehe auch Abbildung 4.

- 1) Der zelluläre Widerstand (R_c), bestehend aus den in Serie geschalteten Widerständen der apikalen (R_a) und basolateralen (R_b) Zellmembranen;
- 2) Der parazelluläre Widerstand (R_p), bestehend aus den in Serie geschalteten Widerständen der tight-junctions (R_t) und dem Widerstand des interzellulären Raums (R_i);
- 3) Der Widerstand der Basalmembran.

$$R_c = R_a + R_b$$

$$R_p = R_t + R_i$$

$$\Rightarrow \frac{1}{R_{ges}} = \frac{1}{R_c} + \frac{1}{R_p}$$

Entsprechend des Ohm'schen Gesetzes ($R=U/I$) müssen zur Berechnung des elektrischen Widerstandes die Spannung (U) und der Strom (I) bekannt sein.

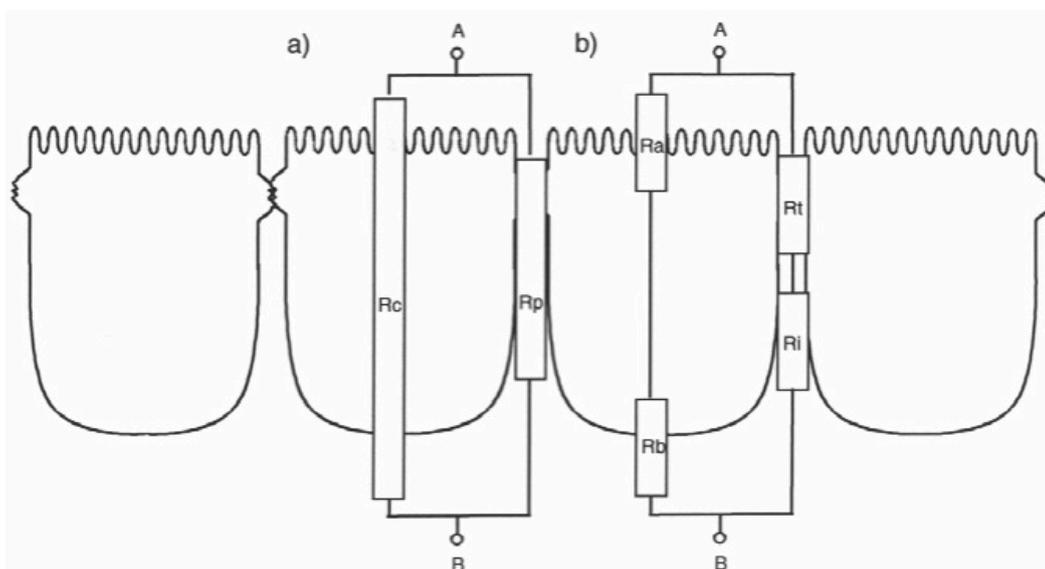


Abbildung 4: die verschiedenen Einzelwiderstände an einem Monolayer

Einen besonderen Einfluss auf den elektrischen Widerstand haben die für Epithelien typischen Tight-Junctions. Diese Zell-Zell-Kontakte dichten den Interzellulärraum ab, bilden somit eine Diffusionsbarriere, beeinflussen die Epithelpermeabilität und auf physikalischer Ebene die parazelluläre Leitfähigkeit [34]. Epithelien mit besonders ausgeprägten Tight-Junctions erzeugen daher entsprechend der oben genannten Formel hohe TEER-Werte und eignen sich als Indikator für die Integrität einer Monolayer. Da der zelluläre Widerstand unendlich hoch ist, bestimmt letztendlich die parazelluläre Permeabilität den Widerstand. Es gibt auch Hinweise für eine exponentielle Beziehung zwischen der Anzahl der Tight-Junctions und dem TEER [35]. Die Abbildung 5 zeigt die Anordnung der Elektroden und der Feldlinien im Versuch.

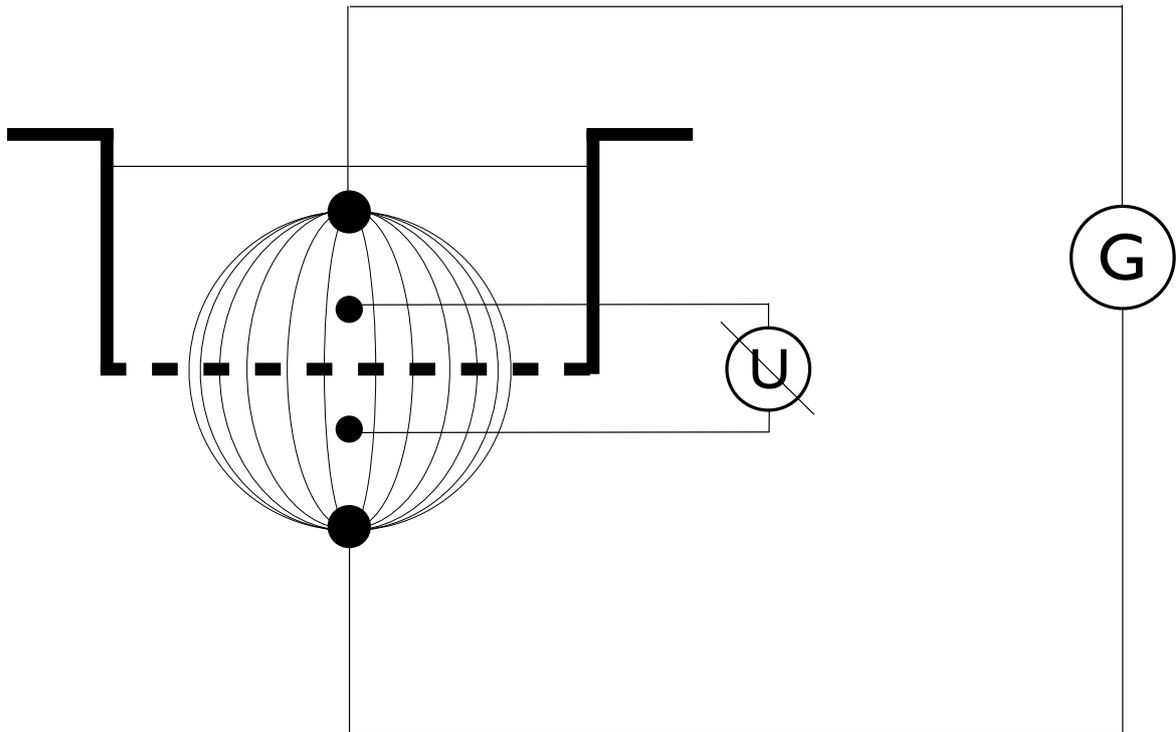


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TEER-Messung

2.2.1 Versuchsaufbau

Um den Widerstand über Zellschichten messen zu können, werden spezielle Zellkulturschalen verwendet, deren Boden eine Filtermembran ist. In einer Well-Platte ist Platz für sechs dieser speziellen Filter-Wells. Die benötigten Zellen werden von beiden Seiten auf diese Filtermembran gesät und mit dem jeweils geeigneten Zellmedium versorgt. Mit einem speziellen Messgerät kann dann der Widerstand über dieser mit Zellen bewachsenen Membran gemessen werden, ohne dass die Wells bewegt oder die Zellen berührt werden müssen. Eine der beiden Messdioden wird von oben in den zu messenden Filter-Welleinsatz getaucht, die andere ist etwas länger und taucht neben dem Einsatz in das mit Medium gefüllte Well. Den genauen Aufbau stellt die Abbildung 6 schematisch dar.

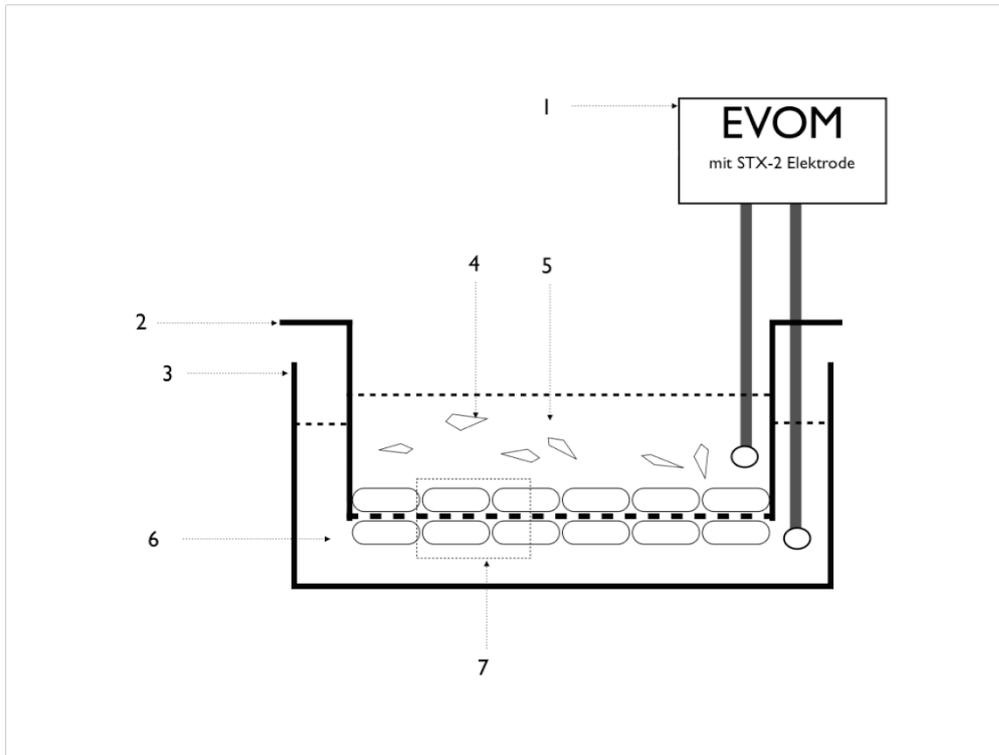


Abbildung 6: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus TEER / ELEXA1 - EVOM Messgerät mit STX-2 Elektroden; 2 - Filter-Welleinsatz; 3 - Well; 4 - A7 Zelle; 5 - Medium im Filter-Welleinsatz; 6 - Medium im Well; 7 - Zellen auf der Ober- und Unterseite des Filter-Welleinsatzes (Siehe auch Vergrößerung in der nächsten Abbildung).

2.2.2 Die Filter-Welleinsätze mit Mikrofilter

Die verwendeten Falcon "Cell-Culture-Inserts" sind mit einer transparenten Membran ausgestattet. Diese Membran ist 20µm dick, besteht aus zellkulturbehandeltem Polyethylen (PET) und hat Poren einer definierten Größe und Anzahl (Durchmesser: 0,4µm / Porendichte: $1,6 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$)

Die Filter sind, wie bereits gezeigt werden konnte, für die verwendeten Zellen nicht durchlässig. Zellen die in die Kavitäten gesät werden, können nicht durch die 0,4µm großen Poren migrieren und die auf der unteren Seite wachsenden Zellen schädigen oder verdrängen. So kann das Gefäßmodell mit zwei intakten Zellschichten beurteilt werden. Die Abbildung 7 zeigt schematisch den Aufbau einer Filter-Wellplatte mit den Filtercups.

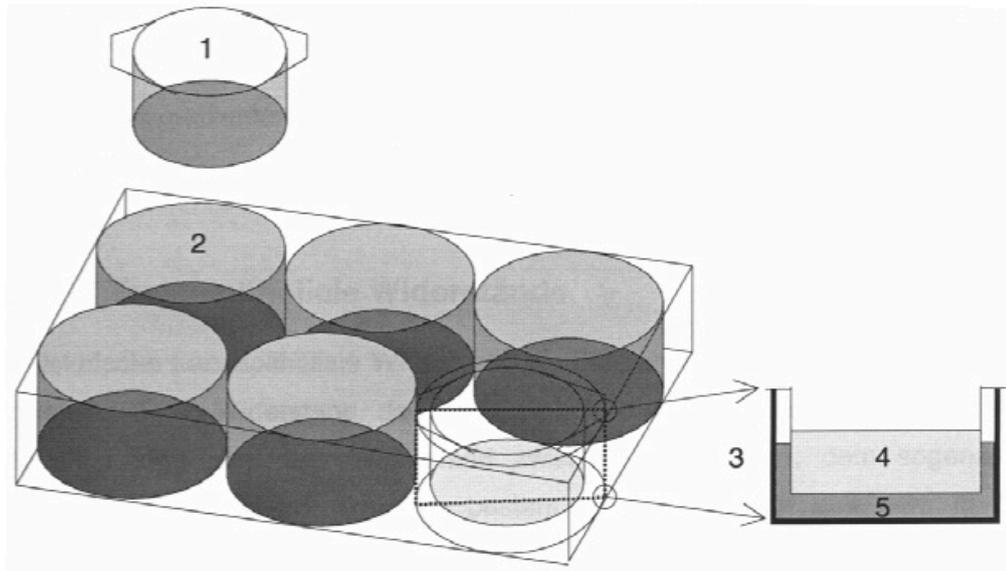


Abbildung 7: Wellplatte mit 6 Wells und entsprechenden Filter-Well-Einsätzen.

2.2.3 Aussähen der Zellen

Drei verschiedene Zellarten wurden in den TEER/ELEXA Versuchen verwendet (C7, HMEC, A7). Diese müssen je nach Versuchsanordnung in verschiedener Weise ausgesät werden. Das genaue Procedere für die unterschiedlichen Zellen wird im Folgenden in der Reihenfolge beschrieben, in der die Zellen verwendet werden. Nicht in jedem Versuch kamen alle verschiedenen Zellen zum Einsatz. Der jeweils genaue Aufbau kann dem Ergebnisteil entnommen werden.

Bei allen Versuchen kamen C7 Zellen zum Einsatz. Diese wurden jeweils auf die Unterseite der Filter-Wellen gesät. Dazu werden die Zellen, wie oben beschrieben, mit Trypsin aus der Kulturflasche gelöst, zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

1 Milliliter dieser Zellsuspension wird mit einer Pipette vorsichtig auf die Rückseite der einzelnen Filtermembranen gebracht, ohne diese zu berühren. Eine Beschädigung der dünnen Membran wird somit verhindert. Um ein Abgleiten der frisch ausgesäten Zellen zu verhindern, bleiben die Filter-Wellen

für 24 Stunden kopfüber im Brutschrank bei 37°C. Am nächsten Tag werden die Filter-Wells regelrecht in die mit C7-Medium angefüllte Wellplatte gestellt. Die Zellen wachsen jetzt problemlos an der Unterseite der Membran.

Im nächsten Schritt werden die HMEC-1 Zellen verwendet. Auch diese werden aus der jeweiligen Kulturflasche entnommen, zentrifugiert, in ausreichend Medium resuspendiert und dann in die Kavitäten der Filter-Wells gesät. Dieser Schritt verlangt die gleiche, vorsichtige Handhabung der Pipette, um die Membran nicht zu beschädigen, oder die C7 Zellen an der Unterseite des Wells zu beeinträchtigen.

Nach der beidseitigen Aussaat werden die Zellen alle zwei bis drei Tage mit neuem Medium versorgt. Ziel sind zwei konfluente Zellschichten an der Ober- und Unterseite der Wells und ein dementsprechend hoher TEER Wert. Werte zwischen 4000 und 12000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ werden dabei als ausreichend gewertet. Die meisten der gemessenen Werte liegen im oberen Drittel dieses Bereichs, bei ca. 10000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Als dritte Zellart werden A7-Melanomzellen verwendet. Diese werden analog zu den bereits beschriebenen Zellen in Medium suspendiert und in einer, über die Fläche rechnerisch ermittelten Menge von ca. 1 Millionen Zellen, in die Kavität der Filter-Wells gegeben. Von diesem, als Zeitpunkt $t(0)$ bezeichneten Moment an, werden regelmäßig TEER-Messungen durchgeführt, bis es zu einem kompletten Einbruch des Widerstandes gekommen ist. Die Abbildung 8 zeigt schematisch die Anordnung der Zellen im Well.

Ein Widerstandseinbruch über einer Zellschicht ist mit einem Verlust der Monolayerintegrität gleichzusetzen. Es muss zu einem Defekt der Tight-Junctions kommen und die parazelluläre Leitfähigkeit muss dementsprechend zugenommen haben.

Einige Wells werden ohne die Zugabe von A7 Zellen als Kontrollgruppe verwendet.

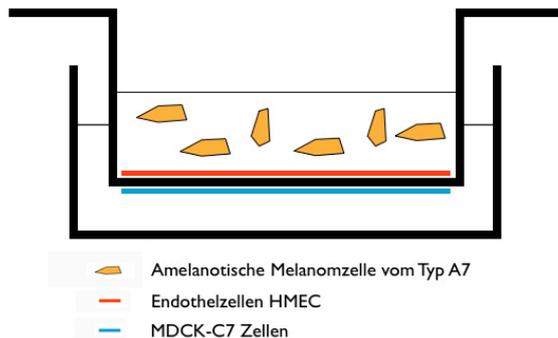


Abbildung 8: Schematischer TEER-Versuchsaufbau mit MDCK-C7, HMEC, A7 Zellen.

2.2.4 Das Messgerät

Das eingesetzte Messgerät ist ein epitheliales Voltohmmeter mit einer STX-2-Elektrode (EVOM, Sarasota, USA). Der batteriebetriebene EVOM wurde speziell für Messungen in der Zellforschung entwickelt. Das Gerät sendet einen Gleichstrom von $20\mu\text{A}$ welcher durch die zu messenden Zellschichten fließt. Es entsteht eine elektrische Spannungsdifferenz und der elektrische Widerstand lässt sich nach dem Ohm'schen Gesetz berechnen.

Ein eingebautes Display ermöglicht das direkte Ablesen der so gemessenen Werte. Der Eingangsscheinwiderstand des Gerätes beträgt $>1010\Omega$, der elektrische Widerstand hat ein Intervall von $0-1999\Omega$ und von $0-20.000\Omega$. Die Messergebnisse des EVOM werden weder von der Aufnahmefähigkeit der Membran noch vom vorliegenden Membranpotential (ca. $\pm 200\text{mV}$) beeinflusst. Diese Eigenschaften machen das Gerät ideal für die durchgeführten Versuche. Die STX-2 „Chopstick“ Elektroden bestehen aus einem Griff und zwei Elektrodenpaaren (Breite: 4mm / Dicke: 1mm). Die Elektrodenpaare enthalten Silber-/Silberchloridpellets für die Bestimmung der Spannung und eine Silberelektrode für die Anpassung der Stromstärke. Die STX-2 Elektrode ist so konstruiert, dass Messungen in Zellkulturplatten möglich sind.

2.2.5 Messen des elektrischen Widerstandes im Versuch

Im ersten Schritt werden die Elektroden für 20 Minuten in 70% Ethanol sterilisiert und anschließend in 2 Röhrchen (Falcon) mit auf 37°C erwärmter, physiologischer NaCl-Lösung von der Restspuren des Ethanol gereinigt. Der eigentliche Messvorgang beginnt mit der Bestimmung des Leerwertes. Dieser darf bei intakten Elektroden einen Wert von 20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ nicht überschreiten. Ist der Leerwert $< 20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wird die Messung an den Wells fortgesetzt. Die jeweilige Platte wird aus dem Brutschrank entnommen und auf die ebene Arbeitsfläche der sterilen Arbeitsbank gebracht. Dort findet die Messung des TEER in allen 6 Wells einer Platte statt.

Folgende Punkte sind bei der Durchführung der Messung zu beachten:

- 1) die Elektroden müssen ausreichend tief in das Medium getaucht werden um einen korrekten Messwert zu bekommen.
- 2) Die Elektroden dürfen unter keinem Umstand Kontakt zu den Zellen oder den Wänden der Filter-Wells haben, damit die Zellschicht nicht beschädigt, oder der jeweilige Messwert verfälscht wird.
- 3) Die Wells und die Elektroden müssen bei der Messung stabil gehalten werden, um Schwankungen der Messwerte zu verhindern.

Nach Abschluss der Messung wird die Platte zurück in den Brutschrank gestellt um unnötig lange Temperaturschwankungen zu verhindern. Die Elektrode wird erneut mit 70% Ethanol sterilisiert und zweimal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült. Dieser erneute Reinigungsschritt verhindert die Kontamination mit Keimen und das Verschleppen von Zellen zwischen den verschiedenen Wells. Die aufgeführten Arbeitsschritte werden in gleicher Weise wiederholt bis alle TEER-Werte bestimmt sind.

Dokumentiert wird jeweils der gemessene Leerwert, der gemessene Widerstand und der Zeitpunkt der Messung. Die erhobenen Daten werden im Ergebnisteil besprochen.

2.3 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie gehört im Wesentlichen zu den lichtmikroskopischen Verfahren und beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Bestimmte Stoffe, so genannte Fluorochrome können mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und strahlen reaktiv Licht einer anderen Wellenlänge ab. Filter im Mikroskop sorgen dafür, dass nur das abgestrahlte Licht beobachtet wird (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Um die zu untersuchenden Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, werden sie auf eine bestimmte Weise mit Fluorochromen markiert. Dazu färbt man das fixierte Präparat mit Hilfe zweier Antikörper. Der erste Antikörper bindet mit seiner FAB-Region spezifisch an ein Antigen der zu untersuchenden Struktur, der zweite bindet mit der FAB-Region spezifisch an den ersten Antikörper und ist an der FC-Region mit dem fluoreszierenden Farbstoff versehen. Speziell hergestellte Antikörper binden mit großer Sensitivität und Spezifität an bestimmte zelluläre Strukturen und machen diese sichtbar. Bemerkenswert ist weiterhin die Möglichkeit, verschiedene Strukturen mit verschiedenen Antikörpern und verschiedenen Farbstoffen zu markieren. So lassen sich z.B. räumliche Beziehungen und Kollokalisationen mehrerer Proteine bzw. Strukturen zeigen.

In dieser Arbeit kamen rot (TRITC) und grün (FITC) fluoreszierende Farbstoffe zum Einsatz, um VWF und Gplb gezielt zu markieren und eine Kollokalisation der beiden Proteine zu zeigen.

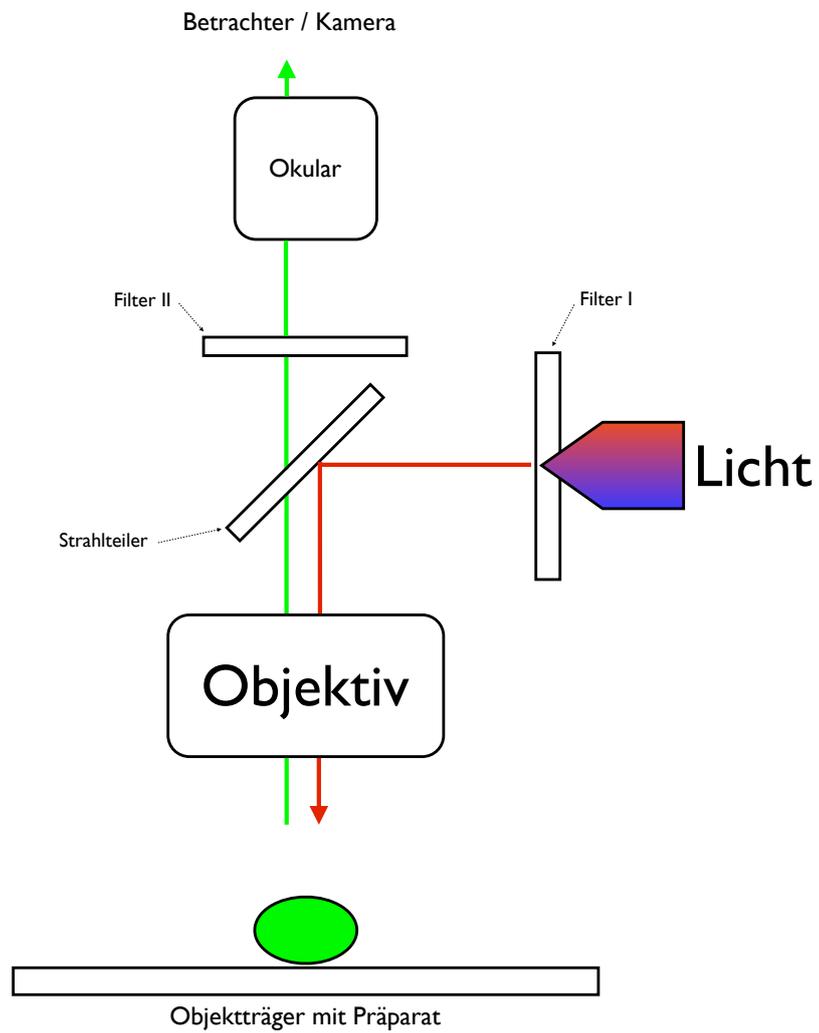


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops. Gefiltertes Licht einer bestimmten Wellenlänge (roter Strahl) regt das Präparat an. Dieses emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge (grüner Strahl) welches erneut gefiltert vom Betrachter wahrgenommen werden kann.

2.3.1 Aussäen der Zellen auf beschichtete Deckgläschen (Poly-L-Lysin)

Die verwendeten Glasplättchen sind handelsübliche Deckgläschen und müssen für die spätere Aussaat von HUVEC Zellen speziell präpariert werden, um ein Ablösen oder Abspülen der Zellen zu verhindern. Daher werden die Gläschen zuerst für 24 Stunden in einem Corregatabs©Bad gelagert und danach mit 70% Ethanol gereinigt, um alle, insbesondere fettige Rückstände, zu entfernen. Die Alkoholreste werden mit autoklavierten Tüchern (Kimwipes) entfernt, die Deckgläschen werden zweimalig in Aqua bidestillata abgespült und anschliessend getrocknet. Zum Schluss werden die vorbereiteten Gläschen entweder in mit Parafilm® verschlossenen Petrischalen gelagert, oder nach zwei weiteren Spülvorgängen mit Aqua bidestillata weiterverwendet.

Die gereinigten Gläschen werden direkt vor der Zellaussaat mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dieses wird in einer Konzentration von 0,1mg/ml in Wasser gelöst und mit einer Pipette als Meniskus auf die Gläschen gebracht. Nach 30 Minuten wird der Überstand vorsichtig abgesaugt. Es folgt ein weiterer Waschgang mit PBS und die Aussaat der Zellen. Die Gläschen mit den HUVEC Zellen werden in Wellplatten in den Brutschrank gestellt, bei Bedarf mit neuem Medium versorgt und gefärbt, wenn eine konfluente Zellschicht entstanden ist.

2.3.2 Fixieren und Färben der Zellen

Um die Zellen mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops betrachten zu können, müssen sie auf einem Objektträger fixiert und mit den oben beschriebenen Fluorochromen gefärbt werden. Dazu werden die Zellen folgendermaßen behandelt:

Im ersten Schritt werden die Zellen auf dem Deckgläschen sechsmal vorsichtig mit je einem Milliliter 0,1molarer NaPh-Lösung mit 4%iger Sucrose (NaPh-Lösung 1) gewaschen. Anschließend werden die Zellen auf Eis gelegt und mit 1 Milliliter der 0,1molaren NaPh-Lösung mit 4%iger Sucrose und 4% PFA-Zusatz für eine Stunde inkubiert. Danach werden die Zellen mit der NaPh-

Lösung 1 und 0,5% BSA für eine weitere Stunde behandelt und im Anschluss erneut sechs mal gewaschen.

Nach der Fixierung erfolgt der erste Färbeschritt. Dazu wird 1 µl des ersten Antikörpers mit der NaPh-Lösung 1 und 0,5% BSA vermischt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 4h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen erfolgt die Zugabe des zweiten Antikörpers. Dieser Schritt erfolgt entsprechend des ersten Färbeschritts. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Deckgläschen mit der mit Zellen versehenen Seite nach unten auf den Objektträger geklebt. Dazu verwendeten wir jeweils 10µl Dabco-Mowiol.

2.3.3 Betrachten der Präparate unter dem Immunfluoreszenzmikroskop

Zum Betrachten der fertig fixierten Präparate wurde das Zeiss Axiovert 100 verwendet. Das Mikroskop ist mit einer Kamera und der zugehörigen Software ausgestattet, so dass es möglich ist den untersuchten Bereich des Präparates zu photographieren. Die Bilder werden von der Kamera aufgenommen und im TIFF-Format gespeichert. Anschließend erfolgt die Umwandlung in das häufig verwendete JPEG-Format. Die verwendeten Fluorochrome mussten entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Diese Einstellung erfolgte jeweils am Mikroskop.

2.4 FACS

Das Akronym FACS steht für "fluorescence activated cell sorting". Dieser Begriff wird häufig synonym für den Begriff der Durchflusszytometrie verwendet. Interessanterweise wurde die zugrundeliegende Technologie Ende der 60er Jahre an der Westfälischen-Wilhelms-Universität zu Münster entwickelt [36]. Dr. W. Göhde und Dr. W. Dittrich reichten den Patentantrag für das "Automatische Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion" am 18.12.1968 beim Patentamt der Bundesrepublik Deutschland ein. Die Offenlegung des Patentbeschlusses erfolgte am 14.01.1971. Das Grundprinzip der Methode hat sich seit seiner Erfindung nicht wesentlich verändert und kann wie folgt dem originalen Patentantrag entnommen werden.

...„Im Gegensatz zur direkten, nichtautomatischen oder automatischen Zählung von Teilchen im mikroskopischen Präparat gestattet ein automatisches Meß- und Zählverfahren im Durchfluß rasche und genaue Bestimmungen der Anzahl und unter bestimmten Voraussetzungen auch der relativen Größe von Teilchen, die in einem vorgegebenen Volumen des flüssigen oder gasförmigen Dispersionsmittel enthalten sind. Die hier beschriebene Erfindung gestattet es nun, neben der Teilchengröße auch andere Eigenschaften der Teilchen zu ihrer Klassifizierung heranzuziehen. Insbesondere ist daran gedacht, mit Hilfe bestimmter Ausgestaltungen der Erfindung. 1. Submikroskopische Teilchen aufgrund des Tyndall-Effektes automatisch zu zählen und 2. an großen Kollektiven die Häufigkeitsverteilungen der Teilchen aufgrund ihres Gehaltes an verschiedenen Inhaltsstoffen z.B. Chlorophyll, Nukleinsäuren, Protein und an anderen Licht bestimmter Wellenlängen absorbierenden oder fluoreszierenden Farbstoffen, rasch und sicher zu ermitteln“...

...„Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass die zu zählenden und zu messenden Teilchen mit ihrem Dispersionsmedium annähernd in Richtung der optischen Achse eines Mikroskopes mit großer Geschwindigkeit durch eine im Mikroskop scharf eingestellte Düsenöffnung bewegt werden und

zwar vermöge einer zu beiden Seiten der Düse bestehenden mechanischen Druckdifferenz.“...

...„Werden dagegen die Teilchen annähernd parallel zur optischen Achse des Mikroskops durch eine kleine Düsenöffnung hindurchbewegt, dann ist jedes Teilchen zu irgendeinem Zeitpunkt, jedoch nur ein einziges Mal, optimal optisch abgebildet und kann bei gleichmäßiger Ausleuchtung der Düsenöffnung zu diesem Zeitpunkt ein für das individuelle Teilchen charakteristisches optisches Signal liefern.“

Zusammengefasst ermöglicht die Durchflusszytometrie die Analyse großer Zellmengen und der enthaltenen Inhaltsstoffe. Mit speziellen, antikörpergebundenen Fluorochromen lassen sich gezielt Zellinhalte sichtbar und damit auch zählbar machen. In dieser Arbeit soll durch eine FACS-Analyse der Nachweis erfolgen, dass HUVEC Zellen GpIb enthalten, da in den Immunfluoreszenzaufnahmen eine Kollokalisierung von VWF und GpIb darstellbar war (Siehe Ergebnisteil).

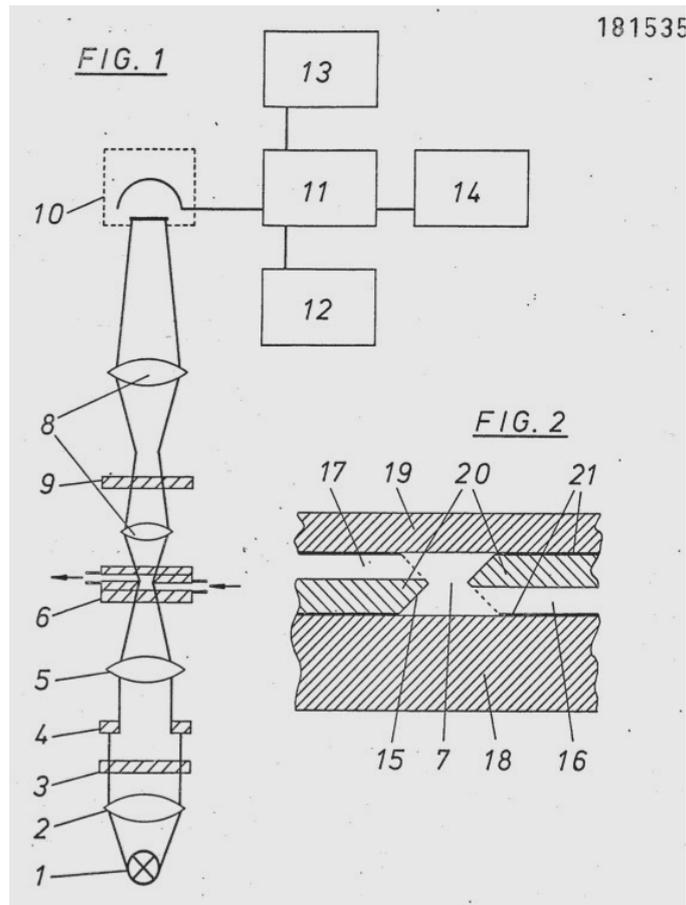


Abbildung 10: Ein Bild der originalen Zeichnung aus dem Patentantrag vom 18.12.1968. Die vielen Beschriftungen sind im Originaltext auf über 2 Seiten verteilt, so dass eine komplette Aufführung hier unterbleibt [37].

2.4.1 Durchführung der FACS Analyse

Für die FACS Untersuchung wurden HUVEC Zellen in der 2. Passage verwendet. Die Zellen werden jeweils in vier Wells mit 6cm Durchmesser kultiviert bis die komplette Fläche konfluent bewachsen ist. Die Zellen werden mit PBS gewaschen um sie vom Medium zu befreien und mit Accutase vom Wellboden abgelöst. Die entstehende Zellsuspension wird zentrifugiert und das resultierende Zellpellet resuspendiert.

Im nächsten Schritt werden 5µl des ersten Antikörpers (GpIb/CD42b – Immunotools) oder 2µl des Isotyp Antikörpers (Mouse IgG1 – Pharmingen) hinzugefügt. Danach werden die Zellen für eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen erneut abzentrifugiert und mit FACS Puffer + 0,1

% BSA gewaschen. Im nächsten Schritt wird der zweite Antikörper (anti-mouse IgG FITC – Sigma) hinzugegeben. Die Zellen werden erneut für eine Stunde auf Eis inkubiert. Vor der Messung erfolgt ein letzter Waschschrift und eine erneute Resuspension der Zellen. Die Zellsuspension wird in die FACS-Röhrchen überführt. In den Röhrchen befinden sich vor der Messung jeweils 400µl FACS-Puffer und 100µl der Zellsuspension.

Die FACS Röhrchen werden in das FACS-Gerät gegeben und der Reihe nach gemessen.

2.5 intrazelluläre Calcium-Messung

Eine Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Ströme setzt einen intakten zellulären Signaltransduktionsweg voraus. Daher nutzen wir diese Technik an vitalen Endothelzellen, um deren Aktivierbarkeit zu überprüfen. Der Ca^{2+} Spiegel und sein Verlauf bei Aktivierung (z.B. mit Histamin) steht in direktem Zusammenhang mit Exozytoseereignissen. Eine regulierte VWF-Ausschüttung kann ohne einen Ca^{2+} -Anstieg nicht stattfinden.

Analog zur Fluoreszenzmikroskopie werden in der Fluoreszenzspektrophotometrie auch Fluorochrome verwendet. Die Farbstoffe werden dabei mit elektromagnetischer Strahlung einer definierten Ausgangswellenlänge angeregt. Dieser Vorgang wird als Exzitation bezeichnet. Die Farbstoffmoleküle absorbieren die Strahlungsenergie, werden so in einen höheren Energiezustand versetzt und strahlen die gewonnene Energie in einer bestimmten Fluoreszenzwellenlänge wieder ab, um in ihren ursprünglichen Zustand zurückzukehren. Diese, als Emission bezeichnete Strahlung, wird gemessen.

Als Fluorochrom für die Ca^{2+} Messung eignet sich FURA-2 als ionenselektiver Fluoreszenzfarbstoff. Dieser kann die Zellmembran passieren und bietet mit seiner hohen Ionenselektivität, der guten Fluoreszenzintensität und der Möglichkeit der In-vitro-Kalibrierung (Zweilängenmethode), die optimalen Eigenschaften.

FURA-2 (FURA2/AM) ist ein unpolarer Acetoxymethylester. In der Zielzelle spalten intrazelluläre Esterasen die Estergruppen hydrolytisch ab, so dass freie Farbstoffmoleküle entstehen. Im Zytoplasma binden diese Fluorochrome mit einer Temperatur- und pH-Wert abhängigen Bindungskurve an freie Calciumionen. Den maximalen Emissionswert erzielt man bei FURA-2 abhängig von seinem Bindungsstatus mit unterschiedlichen Exzitationswellenlängen. Bei an Ca^{2+} gebundenem FURA-2 liegt dieses Exzitationsmaximum bei 340nm, bei freiem FURA-2 bei 380nm. Dividiert man die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten der angeregten FURA-2 Moleküle erhält man eine Ratio (Verhältniswert). Ein Verhältniswert lässt sich unabhängig von den Einzelwerten beurteilen. In unserem Fall können so Versuchsbedingte Schwankungen der FURA-2 Konzentration ausgeglichen werden [38, 39].

Um absolute Calciumkonzentrationen angeben zu können, werden die Ergebnisse nach folgender Formel berechnet. Die Formel beruht auf Ausführungen von G. Grynkiewicz et al. und stellt eine Abwandlung des Massenwirkungsgesetzes dar [40].

K_d beschreibt die Dissoziationskonstante für den Ca-FURA-2-Komplex; R ist das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten; R_{min} und R_{max} beschreiben die extremen Fluoreszenzintensitäten bei Abwesenheit oder Überangebot von Ca^{2+} ; $F_{min\ 380}/F_{max\ 380}$ ist die Division der der Intensitäten bei Vorhandensein oder Fehlen von Ca^{2+} bei einer Wellenlänge von 380 nm.

$$\left[Ca^{2+}\right]_i = K_d * \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} * \frac{F_{min\ 380}}{F_{max\ 380}}$$

2.5.1 Aussäen der Zellen auf beschichtete Deckgläschen (Gelatine)

Für die durchgeführten Calcium-Messungen müssen die HUVEC-Zellen erneut auf Glasplättchen kultiviert werden. Die ersten Reinigungsschritte sind identisch mit den notwendigen Schritten vor einer Beschichtung der Deckgläschen mit Poly-L-Lysin. (siehe Material und Methoden, Immunfluoreszenzmikroskopie)

Nach der beschriebenen Reinigung mit CorregaTabs© und 70% Ethanol, werden die Gläschen zusätzlich mit einer Gelatinebeschichtung versehen. Im ersten Schritt werden die Alkoholreste mit autoklavierten Tüchern (Kimwipes) entfernt. Dann werden die Deckgläschen zweimalig in Aqua bidestillata abgespült und anschließend getrocknet. Nach der Trocknung wird jedes Gläschen einzeln mit einem Meniskus 0,4% Gelatine betropft und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Gelatinemeniskus vorsichtig, ohne die Beschichtung zu verletzen, abgesaugt. Die übrige, hauchdünne Gelatineschicht muss im Anschluss in einem dH₂O gelösten 2% Glutaraldehyd-Bad vernetzt werden. Dieser Prozess dauert 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Im letzten Schritt werden die nun beschichteten Deckgläschen für mindestens eine Stunde in ein 70%Ethanolbad gelegt und zum Schluss entweder in mit Parafilm® verschlossenen Petrischalen gelagert, oder nach zwei weiteren Spülvorgängen mit Aqua bidestillata zum Aussäen genutzt.

2.5.2 Die Ca-Messung

Nach der Aussaat der Zellen wird die Ausbildung eines konfluenten Monolayers abgewartet. Ist dieser Zustand erreicht, werden die Zellen mit 1,3µM FURA-2/AM in HBRS inkubiert (10min / 37°C), drei mal mit HBRS gewaschen, in HBRS eingelegt und in eine Mikroskop-Zellkammer montiert. Das inverse Mikroskop (Nicon F200) ist mit einem FURA-2-Detektor (Deltascan Spectrofluorometer, PTI, Hamburg) und einem zugehörigen Softwarepaket (Felix/Oscar – PTI, Hamburg) ausgestattet.

Das Mikroskop und der Detektor werden so justiert, dass das Mess-Feld auf ca. 8 Zellen begrenzt bleibt. Die eigentliche Messung beinhaltet eine alternierende, im Sekundentakt stattfindende Anregung der Zellen mit den beiden Wellenlängen 340nm und 380nm. Die Emission der Zellen wird bei 510nm aufgezeichnet.

Die Aktivierung der Zellen im Versuch erfolgt mit einer definierten Menge Histamin (100µl/50µM), welches zu einem bestimmten Zeitpunkt vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette zu den in HBRS lagernden Zellen gegeben wird. Nach der Stimulation ist ein Anstieg der Ca^{2+} Konzentration zu erwarten, welcher einer Vesikelexozytose und damit der VWF Ausschüttung voran geht. Die bei den Versuchen aufgezeichneten Daten werden in entsprechende Graphen umgesetzt und im Ergebnisteil ausgewertet.

2.6 Tabellarische Auflistung der Verwendeten Materialien

| | |
|-------------------------------------|---|
| PBS (-/-) | PBS Dulbecco (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺) in Aqua destillata steril filtriert |
| 20% Kolagenase | Colagenase A, Boehringer Mannheim, Mannheim |
| Kulturflaschen T25 / T50 | Falcon |
| Röhrchen | Falcon |
| Kulturplatten | Falcon Tissue culture plate 6 Well (353046) Falcon Tissue culture plate 12 Well (353043) |
| Filter-Wells | Falcon Cellculture insert (353090) 0,4µm pore size |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| Brutschrank | Hera-Cell 150 Heraeus |
| Mikroskop | Zeiss Axiovert 25 |
| Eppendorf Pipetten | 100µl, 200µl, 1000µl |
| DABCO-Mowiol | Sigma 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octane (D2522) |
| Correga®-Tabs® Zahnreinigungsmittel | Correga® |
| Aqua destillata und bidestillata | Hausapotheke |
| Ethanol 70% | Hausapotheke |
| Parafilm® | AMCC (USA) |
| NaPh Lösung | 500 NaCl; 10 NaH ₂ PO ₄ ; 10 Na ₂ HPO ₄ |
| PFA 4% | Paraformaldehyd 4% |
| Antikörper | Dako Cytomation Polyclonal Rabbit Antihuman vWF P0226 |
| Antikörper | Dako Cytomation Polyclonal Rabbit Antihuman vWF A0082 |

| | |
|---------------------------|--|
| Deckgläschen | Marienfeld, Lauda-Königshofen |
| TEER-Meßgerät | EVOM, Sarasota, USA / STX 2 Elektrode |
| Immunfluoreszenzmikroskop | Zeiss Axiovert 100 |
| Autoklavierte Tücher | Kimwipes® |
| FACS-Gerät | BD FACS Calibur |

3 Ergebnisse - Teil I

3.1 TEER/ELEXA

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der TEER-Versuche dargelegt. Exemplarisch werden Graphen einzelner Versuche gezeigt. Die in den Versuchen gemessenen Ohm Werte wurden für die Berechnungen der Graphen jeweils mit der Grundfläche der Filtermembran in cm^2 multipliziert. Diese Fläche beträgt $4,2\text{cm}^2$. Die Werte werden also in $\Omega\cdot\text{cm}^2$ angegeben.

Die Graphen sind folgendermaßen aufgebaut:

Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen. Dabei wird der Zeitpunkt der A7 Aussaat als $t(0)$ definiert. Alle Messungen vor dieser Aussaat befinden sich also im negativen Stundenbereich. Auf der y-Achse werden die TEER Werte in $\Omega\cdot\text{cm}^2$ angegeben. Hohe Werte sprechen für eine intakte Zellschicht, zunehmend niedrigere Werte entstehen bei zunehmenden Defekten.

Jede einzelne Kurve zeigt die TEER-Messungen an einem Filter-Well. Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Daten des ersten durchgeführten TEER Versuchs. Die Aussaat der C7 Zellen findet bei $t=-170\text{h}$ statt. Der TEER steigt bei allen Wells kontinuierlich bis auf Werte von über $13000\ \Omega\cdot\text{cm}^2$. Es folgt die Aussaat der HMEC Zellen ($t=-100\ \text{h}$) und bei $t=0$ die Aussaat der A7 Melanomzellen. Deutlich zu erkennen ist, dass der TEER in allen Wells mit zugefügten A7 Zellen am Ende zusammenbricht. In den Wells ohne A7 Zellen ist bis zum Ende des Versuchs ein hoher TEER zu messen. Die Monolayer ist also noch intakt.

Interessanterweise kommt es auch nach der Zugabe der HMEC Zellen zu einem Absinken der gemessenen TEER Werte. Die Werte bleiben aber über $4000\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, was für eine weiterhin intakte Monolayer spricht. Trotzdem ist eine gegenseitige Beeinflussung der C7 und HMEC Zellen nicht zu widerlegen.

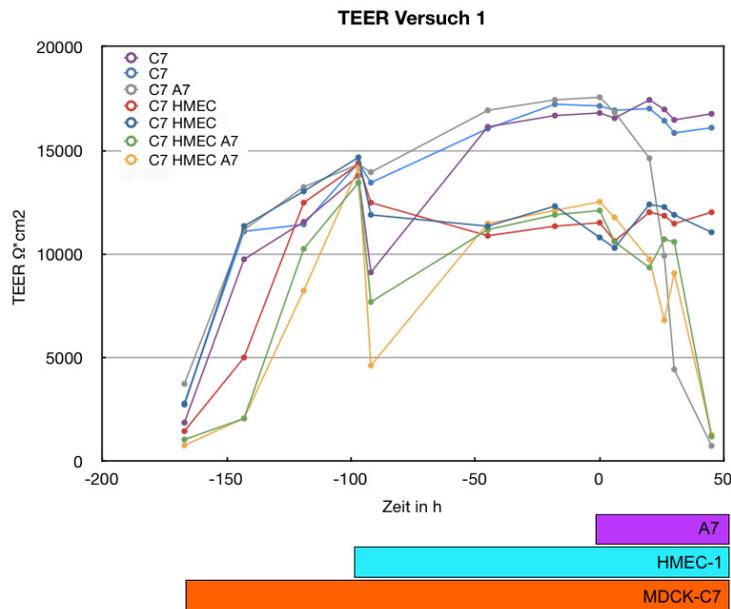


Abbildung 11: Die komplette graphische Darstellung des ersten TEER Versuchs. Jede einzelne Kurve beschreibt die TEER Entwicklung in einem Filter-Well. Die mehrfarbigen Balken unterhalb des Graphen zeigen an, in welchem Zeitraum die jeweiligen Zellen eingesetzt wurden.

3.1.1 Die Kontrollen – Nur C7

Bei diesem Versuch wird untersucht, in welchem Zeitraum der TEER bei einer frisch ausgesäten C7-Zellschicht ansteigt und wie sich der TEER im weiteren Verlauf verhält. Zunächst werden die MDCK-C7-Zellen ausgesät und von beiden Seiten mit Medium versorgt. TEER Messungen erfolgten in regelmäßigen Abständen und jeden zweiten Tag wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei werden apikal und basal jeweils 2ml Medium gewechselt. Eine zweite Aussaat erfolgt bei diesem Versuch nicht. Die folgenden Graphen (Abbildung 12 und Abbildung 13) zeigen die Ergebnisse zum einen in $\Omega \cdot \text{cm}^2$, zum anderen in Prozent vom Ausgangswert (ca. $t(0)$). Die höchsten TEER Werte werden 3-4 Tage nach Aussaat der C7 Zellen erreicht.

Werden die Zellen nicht manipuliert und regelmäßig mit Medium versorgt, bleibt die Zellschicht intakt und die gemessenen TEER-Werte bleiben hoch. Kurze reversible TEER Einbrüche können entstehen wenn zum Zeitpunkt der

Messung einzelne Zellen apoptotisch sind und der Zellverband ein Leck hat. Eine vitale, versorgte Zellschicht ist in der Lage diese Defekte rasch, meistens bis zur nächsten Messung zu schließen.

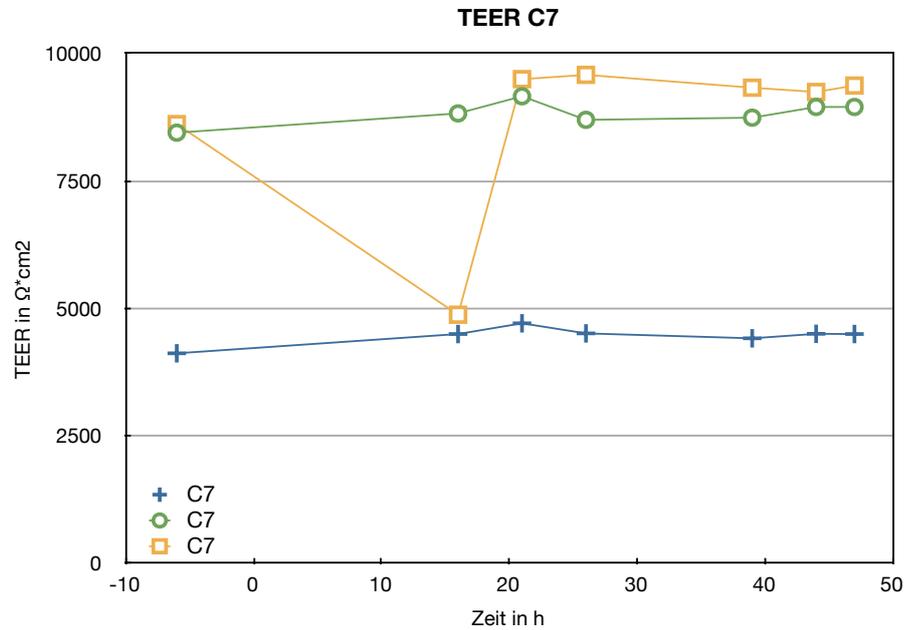


Abbildung 12: TEER von 3 Wells mit C7 Zellen. Die Widerstände bleiben in der Regel unbeeinträchtigt hoch. Kurze Einbrüche können durch apoptotische Einzelzellen erklärt werden. Die Integrität wird bis zur nächsten Messung wieder hergestellt.

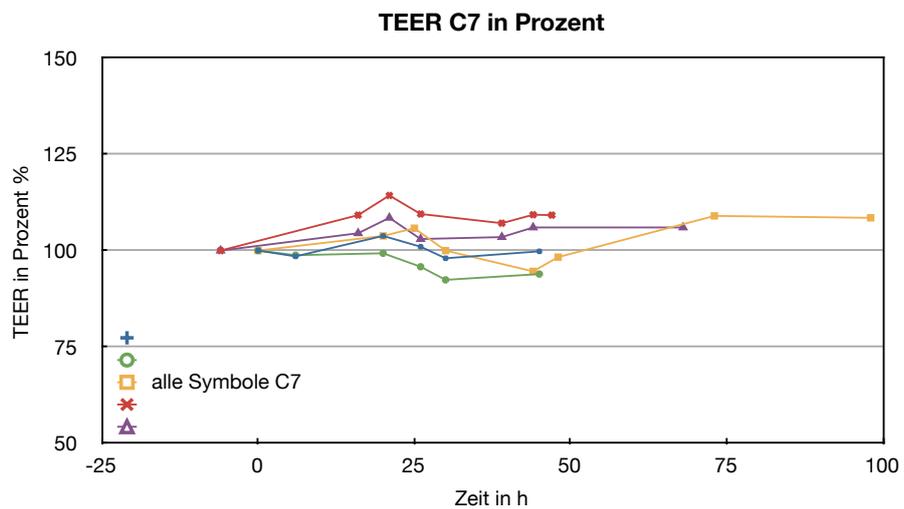


Abbildung 13: TEER von 6 Wells mit C7 Zellen in %. Es wird deutlich, über welchen Zeitraum MDCK C7 Zellen einen hohen TEER halten können, wenn die Versorgung der Zellen sichergestellt ist.

3.1.2 Die Kontrollen – Nur HMEC / leeres Filter-Well

Bei diesem Versuch wird untersucht, welchen TEER eine HMEC Zellschicht aufbauen kann. HMEC Zellen bilden ebenfalls eine Monolayer. Der wichtigste Unterschied zu den C7 Zellen ist, dass über einer nur aus Endothel bestehenden Zellschicht kein hoher TEER zu messen ist. Die gemessenen Werte decken sich mit denen eines leeren Filter-Well. Der Widerstandswert des leeren Wells wurde abgezogen, so dass der Wert Null beträgt. Über einen längeren Zeitraum von zwei Tagen verändern sich die TEER Werte nicht. Es wird also kein messbarer TEER aufgebaut. Der folgende Graph (Abbildung 14) verbildlicht das Ergebnis.

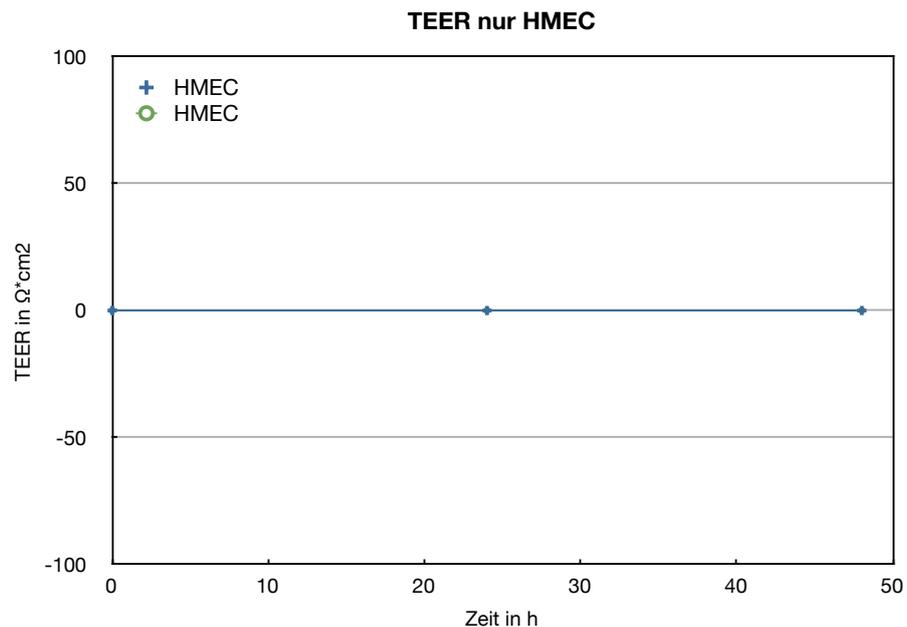


Abbildung 14: TEER von 2 Wells mit HMEC-1 Zellen. Es wird kein messbarer TEER aufgebaut.

3.1.3 C7 HMEC

Entscheidend für die Entwicklung eines neuen Extravasationsmodells ist die Kombination von Endothelzellen (HMEC) und Epithelzellen (C7) in einem gemeinsamen Versuchsaufbau. Dementsprechend wurde die oben beschriebene beidseitige Aussaat durchgeführt.

Die Abbildung 15 zeigt die Entwicklung des TEER wenn C7 und HMEC Zellen auf der Ober- und Unterseite eines Filter-Well kultiviert werden. Der TEER steigt, erreicht hohe Werte und bleibt bei diesen Werten, wenn keine Manipulation und eine ausreichende Versorgung der Zellen stattfindet. Es kommt aber, wie oben bereits erwähnt, zu einem leichten Absinken der TEER Werte nach Zugabe der HMEC. Da diese selber keinen Widerstand aufbauen, muss es zu einer leichten Beeinträchtigung der C7-Epitheldichte kommen.

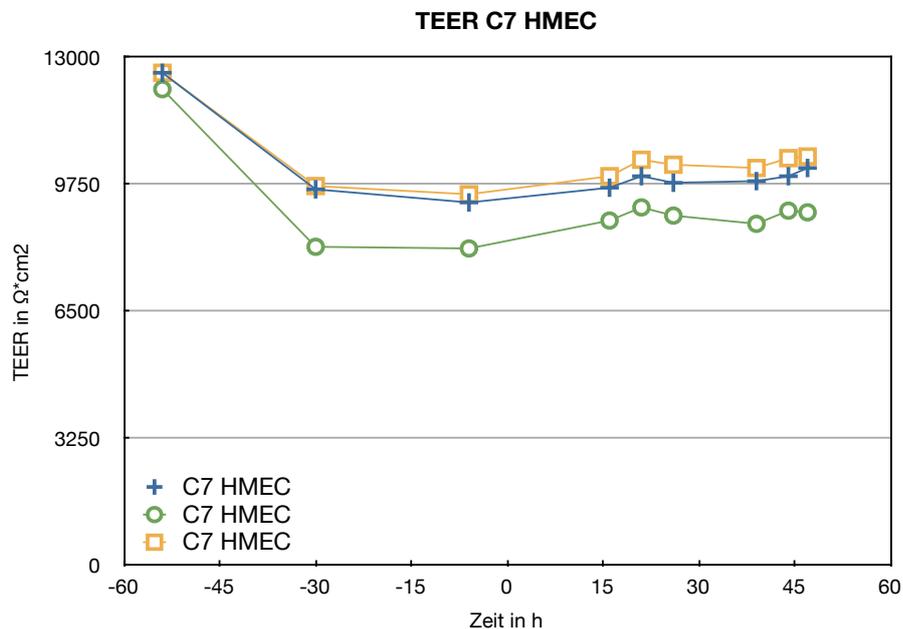


Abbildung 15: TEER von 3 Wells mit beidseitiger Aussaat von MDCK-C7 und HMEC-1 Zellen. Der TEER erreicht hohe Werte und bleibt stabil. Nach der Aussaat der HMEC-1 Zellen kommt es zu einem leichten Absinken der TEER Werte.

3.1.4 TEER nach Zugabe der A7-Melanomzellen

Die folgenden Graphen zeigen die Entwicklung des TEER nach Zugabe von 1 Millionen A7-Melanomzellen. Allen Versuchen gemein ist der Einbruch des TEER. Die Zugabe der A7 Zellen führt also zu einer Zerstörung der intakten MDCK-C7 Zellschicht. Da der TEER ausschließlich von den C7 Zellen gebildet wird, ist ein Einbruch mit einem Defekt an diesen Zellen gleichzusetzen. Unterschiedlich ist bei verschiedenen Versuchsansätzen der Zeitpunkt des TEER-Einbruchs.

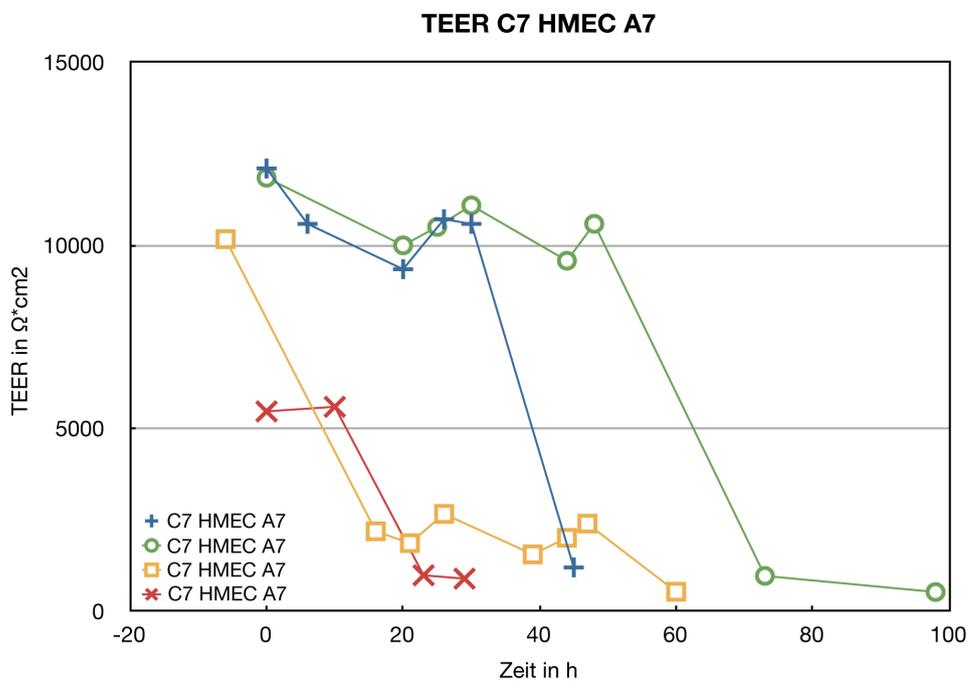


Abbildung 16: TEER von vier Wells mit MDCK-C7, HMEC-1 und A7 Zellen. Es kommt bei allen Wells zum Einbruch des TEER.

Betrachtet man dieselben TEER Werte noch ein weiteres Mal in Prozent vom Ausgangswert, wird der unterschiedliche Zeitpunkt des TEER Einbruchs graphisch deutlicher.

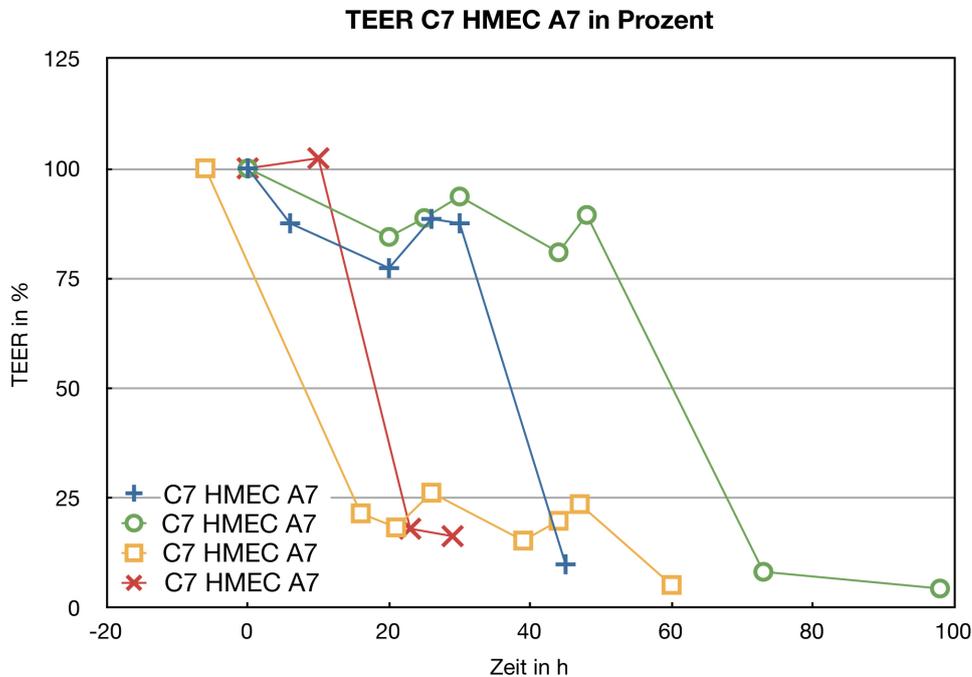


Abbildung 17: Es kommt wie in Abbildung 16 schon beschrieben zu einem Einbruch des TEER. Der Zeitpunkt des Einbruchs unterscheidet sich deutlich.

3.1.5 Zugabe von Histamin

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die HMEC Zellen im Well mit einer definierten Menge Histamin stimuliert (100µl/50µM), um eine Aktivierung der Endothelzellen zu erreichen. Die Kontrollen wurden mit der gleiche Menge Hepes stimuliert, welches keine Aktivierung zur Folge hat.

Es kommt bei allen vier Wells zu einem quasi gleichzeitig stattfindenden TEER Einbruch. Ein Unterschied zwischen den Wells mit stimuliertem Endothel und den unstimulierten Zellen kann den Daten nicht entnommen werden.

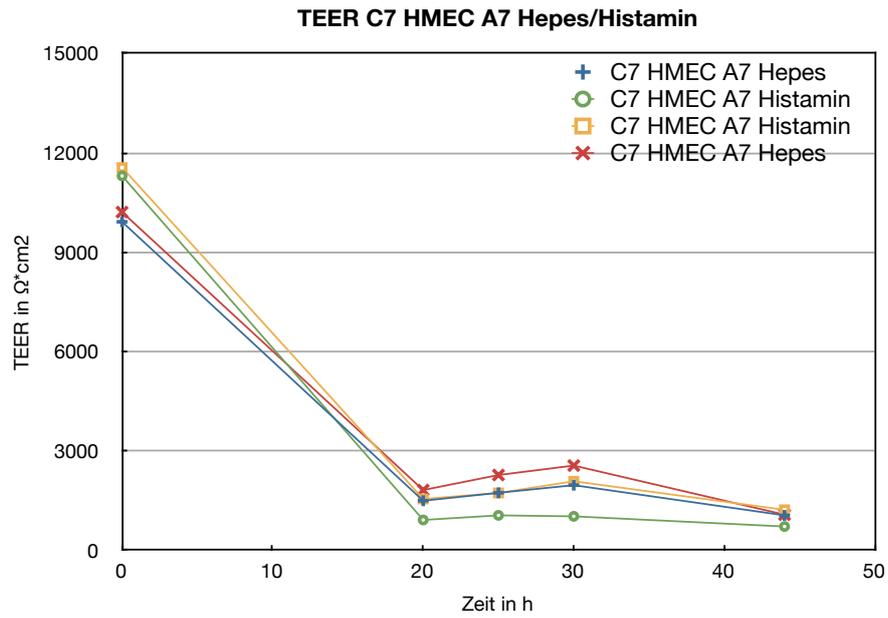


Abbildung 18: TEER Messung an C7 + HMEC + A7 Zellen unter Zugabe von Histamin bzw. Hepes. Histamin soll das Endothel stimulieren und eine mögliche Veränderung des TEER Einbruchs soll dokumentiert werden.

4 Ergebnisse - Teil II

4.1 Calcium-Messung

Die Abbildung 19 zeigt den Graphen der aus den Daten der durchgeführten Ca^{2+} Messung entstanden ist. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden, auf der y-Achse die Ca^{2+} Konzentration als Quotient angegeben. Je höher der Wert auf der y-Achse ist, desto höher ist die Ca^{2+} Konzentration in der Zelle. Die beiden deutlichen Peaks bei ca. 500 Sekunden und ca. 1600 Sekunden wurden unmittelbar nach der Zugabe der Histaminlösung aufgezeichnet und zeigen den intrazellulären Ca^{2+} Anstieg, welcher einer WPB Fusion und der konsekutiven VWF Freisetzung vorangeht. Die verwendeten HUVEC sind also vital und verfügen über eine intakte Signaltransduktion.

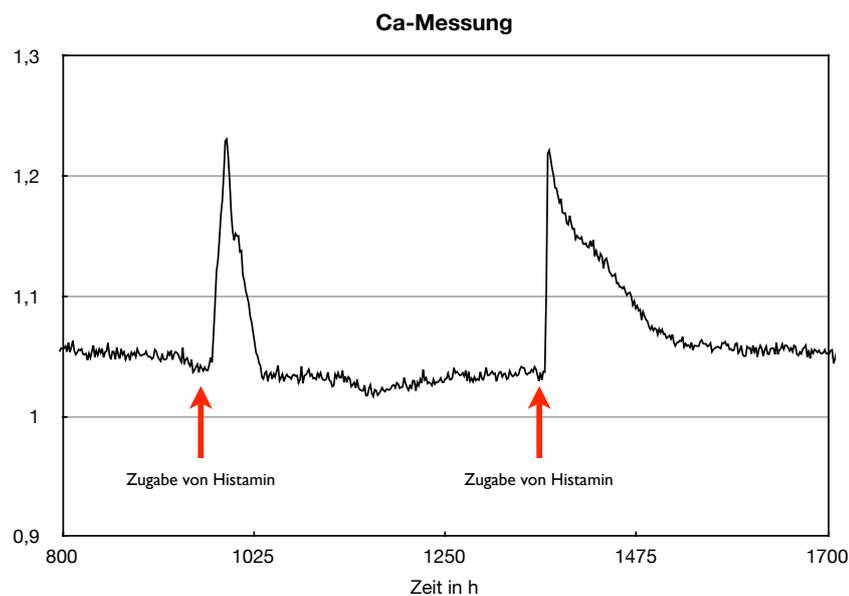


Abbildung 19: Graphische Darstellung einer Ca^{2+} -Messung über 900 Sekunden. Die Zugabe von Histamin ist durch die roten Pfeile markiert.

4.2 FACS

Die Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten FACS-Untersuchung. Diese wurde durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, dass die HUVEC Gplb enthalten.

Die rot gefüllte Kurve stellt die Fluoreszenz des Isotyps, die schwarze Kurve die Fluoreszenz des markierten Gplb dar. Um sicherzustellen, dass nur Endothelzellen zur Auswertung gelangen, wurde ein Gate verwendet welches nur Teilchen einer bestimmten Größe zulässt. Das Gate ist in der Abbildung als schwarzer Kreis dargestellt. Da die schwarze Kurve rechts von der roten Kurve des Isotyps liegt, kann davon ausgegangen werden, dass HUVEC Gplb enthalten.

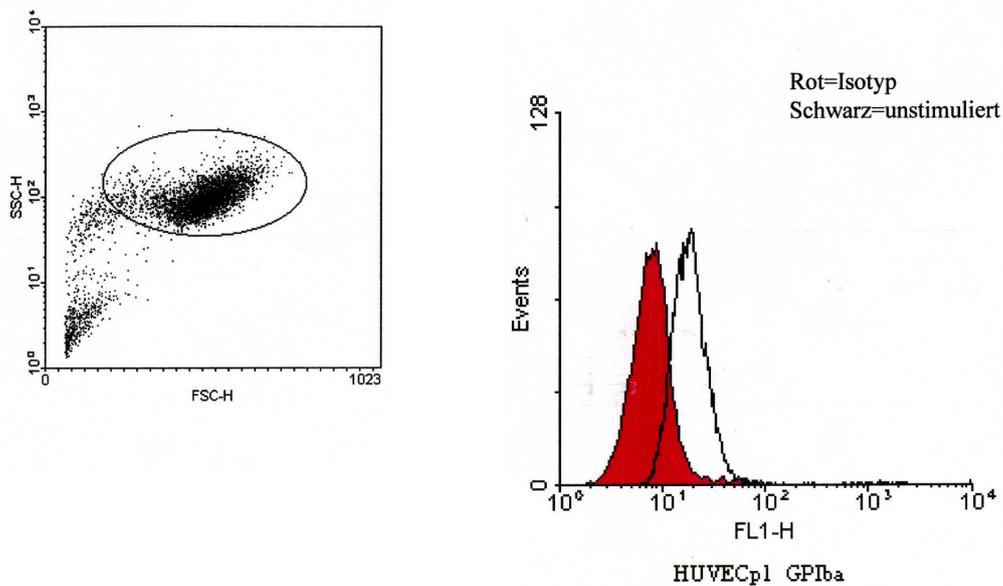


Abbildung 20: FACS Analyse von HUVEC auf das Vorhandensein von Gplba. Entscheidend ist die schwarze Kurve, deren Peak sich von der Kurve des Isotyps unterscheidet.

4.3 Immunfluoreszenz

4.3.1 Färbung des VWF in HUVEC Zellen

Alle in dieser Arbeit gezeigten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden von mir selbst angefertigt. In der ersten Versuchsreihe wurden HUVEC mit einem ersten Antikörper gegen VWF und einem grün fluoreszierendem Zweitantikörper gefärbt. Darstellbar werden folglich alle Bereiche des Präparates, welche VWF enthalten. Die vielen, kleinen, kommaförmigen Strukturen entsprechen den oben beschriebenen Weibel-Pallade-Körperchen (WPB). Diese enthalten neben anderen Proteinen hauptsächlich VWF. Die IF-Aufnahmen lassen vermuten, dass ein Teil der WPB gruppiert in der Nähe der Membranen liegen (Abbildung 24). Dieser Eindruck deckt sich mit dem aktuellen Forschungsstand. WPB liegen oft, als rasch zu exozytierende Vesikel, nahe der apikalen Zellmembran. Bei den ebenfalls grün fluoreszierenden, fadenähnlichen, vernetzten Strukturen handelt es sich um auf der Zelloberfläche fixierte, entfaltete VWF-Multimere, die nach Stimulation mit Histamin mittels WPB Exozytose freigesetzt wurden (Abbildung 22). Die Länge der gezeigten Protein-Fäden im Verhältnis zu der Größe der Endothelzellen unterstreicht die große Bedeutung des VWF. Mehrere Zellen werden von den feinen Fäden überspannt. Das vorbei fließende Blut mit seinen Bestandteilen hat ständigen Kontakt zu diesen interaktionsfreudigen Multimeren.

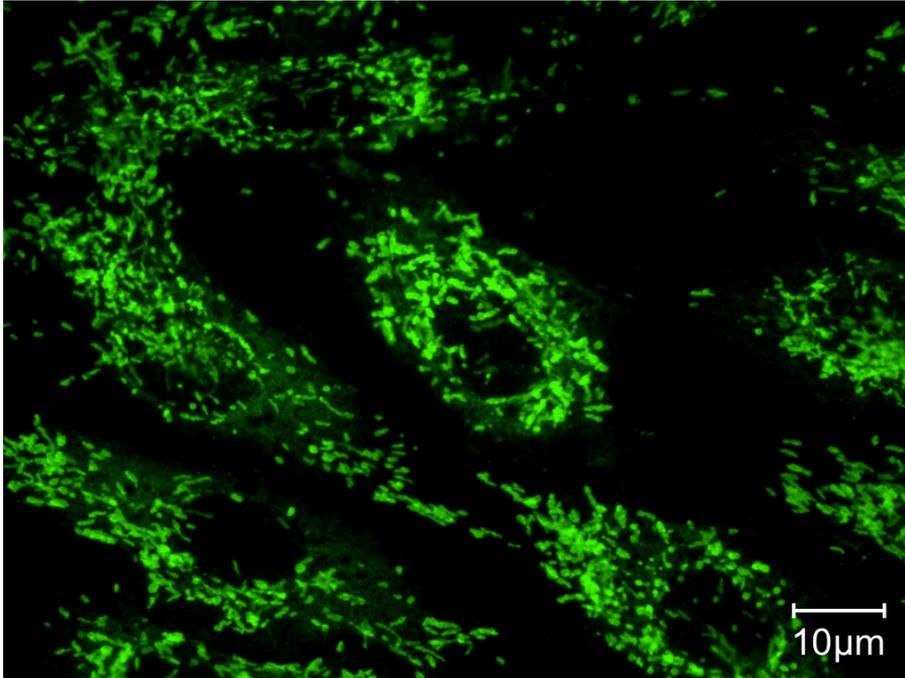


Abbildung 21: HUVEC mit zahlreichen WPB. Die kleinen, stabförmigen WPB befinden sich auch an der apikalen Seite der Endothelzellen.

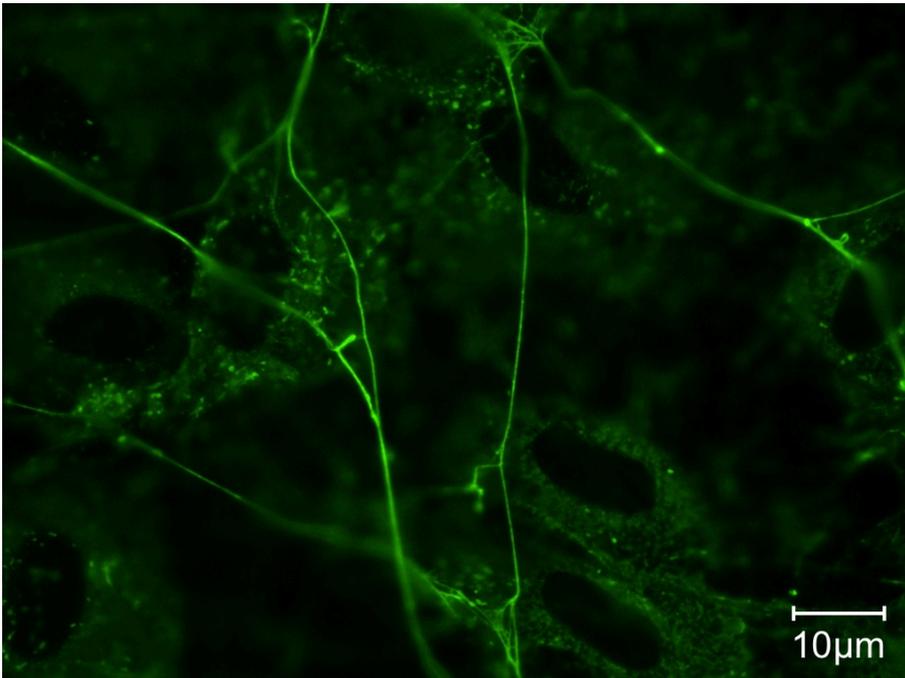


Abbildung 22: HUVEC und VWF-Multimere auf der Zelloberfläche. Die Fäden überspannen mehrere Zellen und sind zur Bildung von vernetzten Strukturen befähigt.

4.3.2 Kolokalisation VWF / Gplb in HUVEC

Endothelzellen enthalten VWF und, wie im FACS nachgewiesen, Gp1b (siehe 4.2). Da Gp1b ein wichtiger Bindungspartner von VWF ist, soll eine mögliche Kolokalisation der beiden Proteine in Endothelzellen aufgezeigt werden. Von Interesse ist, in welcher räumlichen Beziehung zueinander VWF und Gp1b in HUVEC vorkommen. Dazu wird eine Doppelfärbung mit zwei verschiedenfarbigen Antikörpern durchgeführt. Der VWF wird erneut grün, Gp1b hingegen rot dargestellt. Um die zweifarbigen Bilder zu erstellen, werden so genannte Overlays angefertigt. Dazu wird der ausgewählte Bereich des Präparates zweimal, nach Anregung durch verschiedene Wellenlängen, photographiert, ohne den Bildausschnitt zu verändern. Die beiden Bilder werden anschließend in der Bildbearbeitungssoftware zu einem zweifarbigen verbunden. Durch dieses Verfahren lassen sich verschiedene angefärbte Strukturen bezüglich ihrer Lokalisation beurteilen. Die folgenden Abbildungen 23-25 zeigen die entstandenen Overlays.

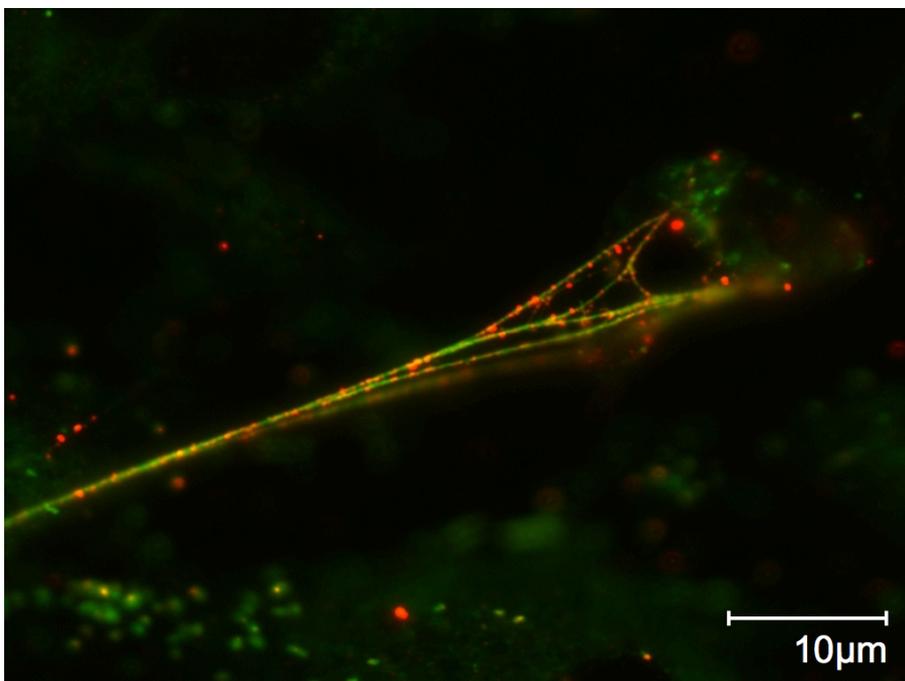


Abbildung 23: Gplb (rot) und VWF (grün) Kolokalisation. Die Gplb Signale erscheinen exakt entlang der VWF-Multimere und vereinzelt an den WPB.

Deutlich erkennt man die perlenähnlich angeordneten roten Signale (Gplb) entlang der grün gefärbten VWF-Multimere. Außerdem scheinen einige der

WPB, einem Streichholz nicht unähnlich, mit einem roten Kopf versehen (Abbildung 25). Da es sich hierbei nicht um alle, sondern nur um einige der WPB handelt, könnte es sich um solche handeln, die sich im Prozess der Fusion bzw. Exozytose befinden. Der in den WPB enthaltene VWF könnte also schon Kontakt zur eigentlichen Zellmembran und den dort befindlichen Proteinen haben.

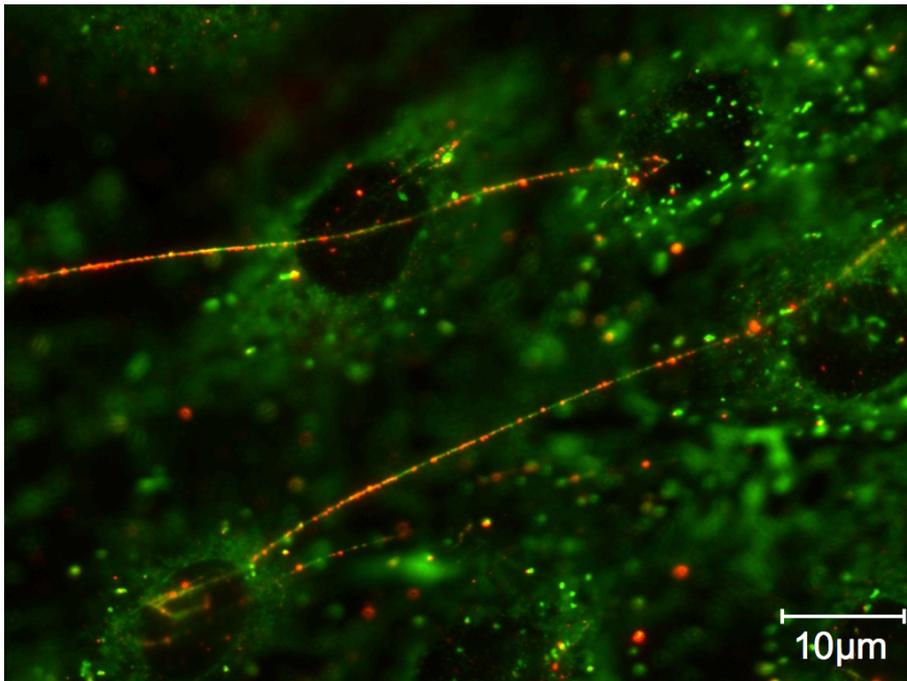


Abbildung 24: GpIb (rot) und VWF (grün) Kolokalisation. Die GpIb Signale erscheinen exakt entlang der VWF-Multimere und vereinzelt an den WPB.

Da VWF Bindungsdomänen für GpIb besitzt, welche eine wichtige Rolle in der Interaktion mit Thrombozyten spielen, und da auch HUVEC GpIb enthalten, ist ein Interaktion zwischen apikal sezerniertem VWF und dem zelleigenem GpIb durchaus denkbar.

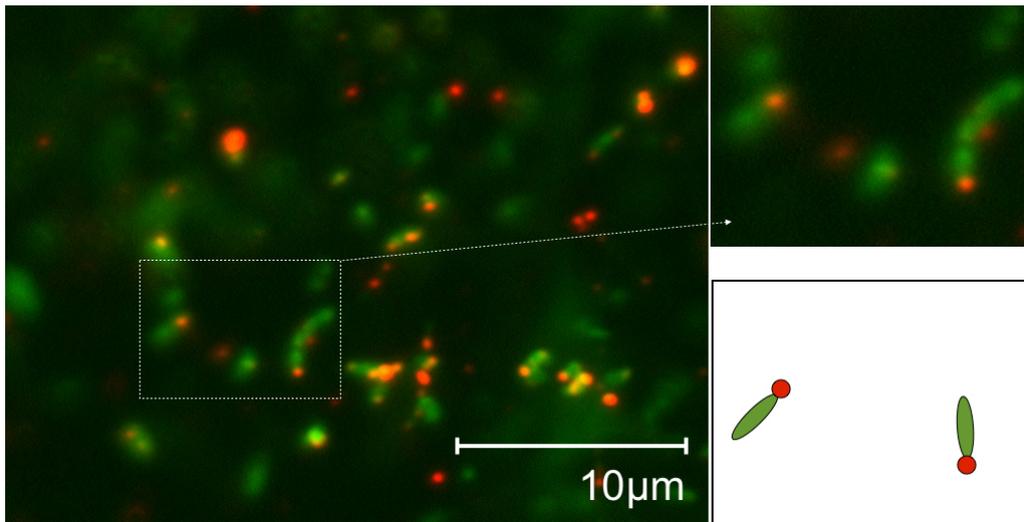


Abbildung 25: Gplb (rot) und VWF (grün) Kolokalisation. Rechts oben vergrößert. Rechts unten schematische Darstellung der streichholz-ähnlichen Konfiguration.

4.3.3. Ausschluss von Fehlfärbungen

Um Fehlfärbungen bzw. Interaktionen zwischen den Antikörpern ausschließen zu können, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt. Reiner, isolierter VWF wurde auf Objektträger gegeben und analog zu den Präparaten der bisherigen angefärbt. Die Abbildung 26 zeigt reinen VWF, der jeweils mit den Erst- und Zweitantikörpern für VWF und Gplb angefärbt wurde. Wie man deutlich erkennen kann ist auf dem gesamten Bild keine eindeutige Kolokalisation wahrzunehmen. Die roten Signale scheinen grob und unregelmäßig über das Präparat verteilt. Somit kann eine Kreuzreaktion der Gplb spezifischen Antikörper mit reinem VWF ausgeschlossen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die dargestellte Kolokalisation zwischen VWF und Gplb so zutrifft.

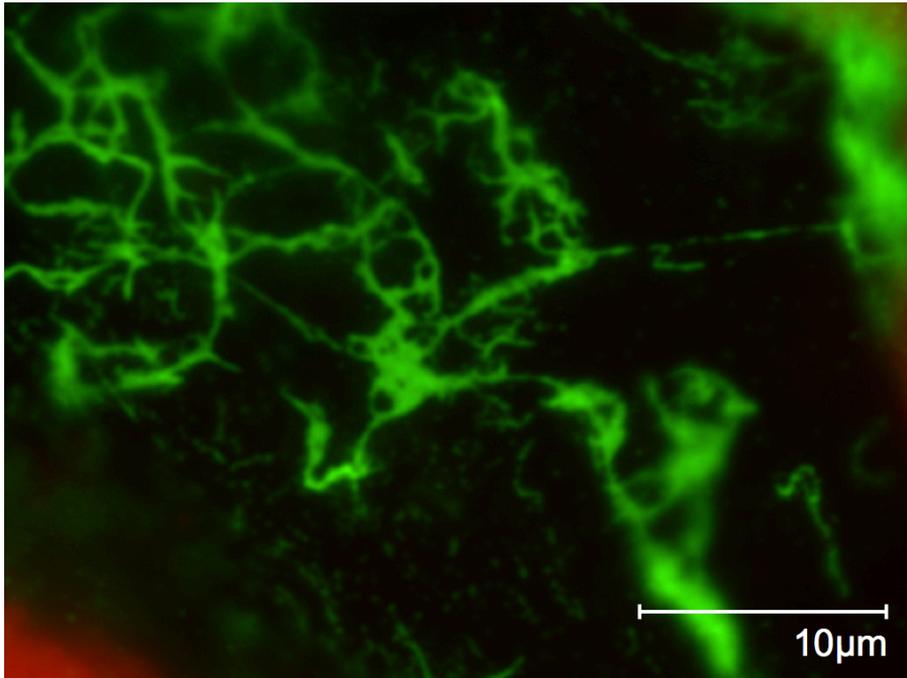


Abbildung 26: reiner VWF ohne Kolokalisation mit Gplb Antikörpern. Deutlich erkennt man die netzartigen VWF-Fäden.

5 Diskussion

5.1 Der VWF – adhäsiv und reaktiv

Der VWF ist ein hoch spezialisiertes, proinflammatorisches, extrem adhäsives, prokoagulatorisches Protein, welches bei jeder Endothelzellaktivierung freigesetzt wird. Wir wissen, dass drei Bedingungen erfüllt sein müssen, damit der VWF seine vielfältigen physiologischen Aufgaben ausführen kann.

Erstens muss der VWF einen Bindungspartner auf der Endozelle oder in der Matrix haben.

Zweitens muss der VWF in entfalteter Form vorliegen.

Drittens müssen VWF-Multimere einer Regulation unterliegen.

Diese drei Bedingungen sollen im Folgenden noch einmal ausführlich beschrieben und im Bezug auf die vorliegende Arbeit und den aktuellen Forschungsstand diskutiert werden.

5.1.2 Gebunden aber an wen?

Um die Frage beantworten zu können über welches Molekül der VWF an die Endothelzellen gebunden wird, muss man sich zuerst den Vorgang der VWF Exozytose vor Augen führen. Unmittelbar nach Endothelzellaktivierung kommt es zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg und zu einer Fusion der unter der Zelloberfläche positionierten WPB mit der Zellmembran. Noch nicht entfalteter VWF und eine Vielzahl anderer Moleküle werden freigesetzt. Würde der VWF als zusammengerolltes Knäuel, ohne an die Zelle gebunden zu sein, in den Blutstrom gelangen, würde er mitgerissen, ohne dass es zu einer entfaltenden Wirkung des vorhandenen Shear-stress käme. Erst durch eine Bindung des VWF, ggf. sogar direkt an der Fusionsstelle des jeweiligen WPB, kann Shear-stress effektiv wirken. Erst dann kann es zu einer adäquaten Entfaltung der Multimere kommen. Der Bindungspartner für VWF an der Zelloberfläche muss dementsprechend ein Molekül sein, welches an VWF und außerdem an die

Zelloberfläche binden kann. In der Literatur werden verschiedene Moleküle als mögliche VWF-Bindungspartner beschrieben.

Eine Arbeit zeigt, dass in Endothelzellen vorkommendes Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ in der Lage ist VWF unter Shear-stress zu binden [41]. Eine andere Arbeit aus dem Jahr 2004 erklärt, dass P-Selektin der Anker für VWF-Multimere auf der Endothelzelloberfläche ist [42]. Die diskutierten Ergebnisse sind also nicht schlüssig. Zudem haben wir gezeigt, dass in der P-Selektin -/- Knock-out Maus auch VWF Fäden gebildet werden können [43]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dass Gplb in HUVEC exprimiert wird (siehe Kapitel 4.2) und dass eine Kolokalisation von Gplb und ULVWF vorliegt. Gplb könnte also ebenfalls der gesuchte Bindungspartner von VWF auf der Endothelzelloberfläche sein. VWF besitzt Bindungsdomänen für Gplb, denn auch die Thrombozytenbindung an VWF wird über Gplb vermittelt. Interessanterweise zeigen die Immunfluoreszenzaufnahmen dieser Arbeit keine Gplb Signale an den meisten der intrazellulär liegenden WPB. Nur einige der WPB scheinen eine Kolokalisation mit Gplb vorzuweisen. Wir vermuten, dass es sich um genau solche WPB handelt, die sich im Prozess der Fusion mit der Endothelzellwand befinden, oder bereits fusioniert sind. Gplb könnte also genau zum Zeitpunkt der VWF Exozytose an der jeweiligen Fusionsstelle präsent sein, um sofort als Ankermolekül für den frisch exozytierten VWF zu dienen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass die Bindung zwischen Endothelzelle und VWF mittels verschiedener integraler Proteine vermittelt wird.

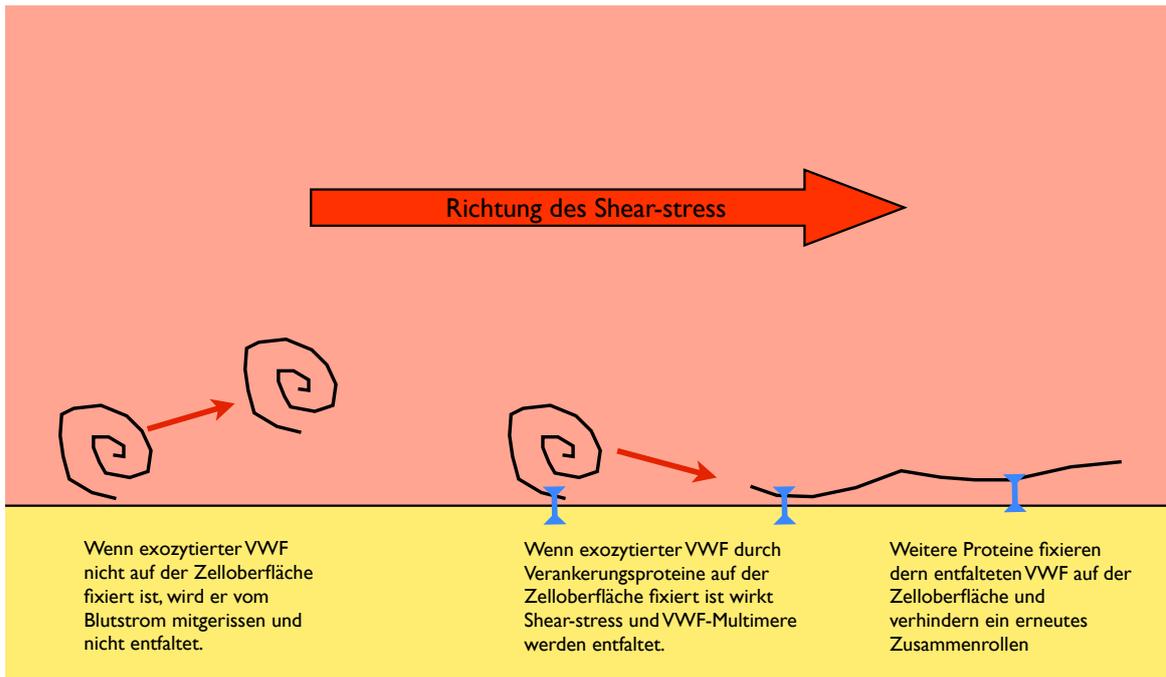


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Entfaltung auf der Zelloberfläche gebundener VWF-Multimere durch Shear-stress. Nur wenn VWF durch ein Ankerprotein fixiert wird, kann Shear-stress so wirken dass die Multimere entfaltet werden. Ist VWF nicht fixiert, werden die Multimere nicht entfaltet sondern mit dem Blutstrom mitgerissen.

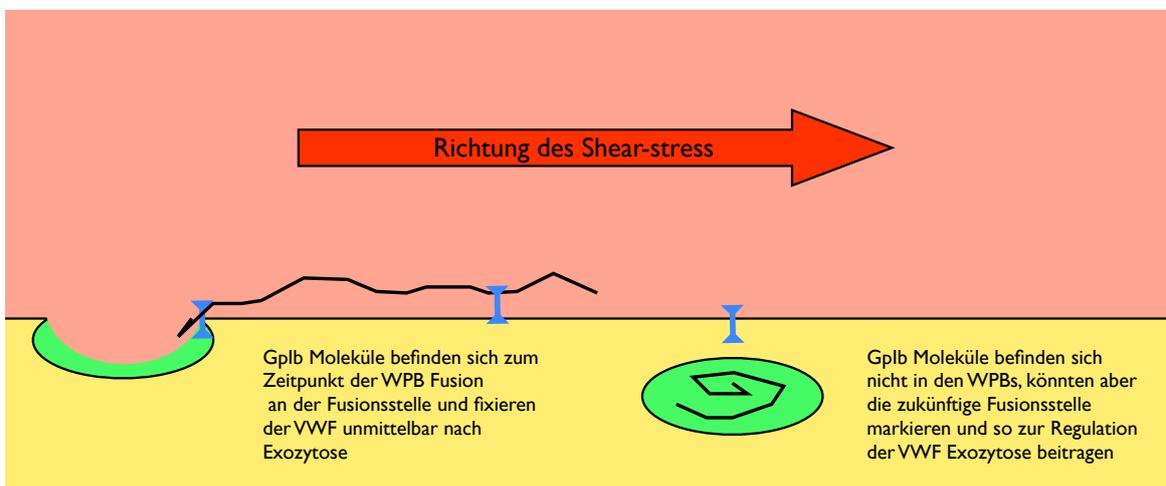


Abbildung 28: Schematische Darstellung der VWF Exozytose. Die blau dargestellten Gplb Moleküle befinden sich bei der WPB Fusion an der Fusionsstelle und fixieren den exozytierten VWF. Theoretisch könnten Gplb Moleküle die spätere Fusionsstelle für die WPB markieren.

5.1.3 Entfaltung von VWF und Shear-stress

Shear-stress ist bezogen auf diese Arbeit die Kraft die von der bewegten Flüssigkeit Blut auf wandnahe, fixierte Moleküle wirkt. Mathematisch ist Shear-stress das Produkt der Scher-Rate und der Viskosität des jeweiligen Mediums. Wirkt die Kraft auf nicht fixierte Moleküle oder Zellen des Blutes, werden diese einfach mit dem Blutstrom weiter transportiert. Viele Arbeiten belegen den unmittelbaren Zusammenhang der vorliegenden Flussraten und der Entfaltung von VWF-Multimeren [14, 44]. Erst wenn die Entfaltung stattgefunden hat, präsentiert der VWF seine Bindungsdomänen und kann mit anderen Molekülen interagieren.

VWF liegt im Blut meist in aufgerollter, bzw. gefalteter Form vor. Kommt es z.B. im Bereich von neu aufgetretenen Stenosen zu einer Flussbeschleunigung, kann sich auch im Blut gelöster VWF entfalten. Die Entfaltung bleibt nur bei hohen Scher-Raten bestehen und ist bei Verlangsamung des Blutflusses reversibel, wenn es nicht zu einer Bindung an das Endothel gekommen ist [14]. Auch isolierter VWF ist ab bestimmten Konzentrationen in der Lage große Netzwerke zu bilden, wenn ausreichender Shear-stress und eine VWF-bindende Oberfläche vorhanden ist [44].

5.1.4 Regulation des VWF durch ADAMTS 13

VWF-Multimere müssen einer Regulation, bzw. einem Abbau unterworfen sein, da sonst ständig eine überschießende Thrombosierung stattfindenden würde. ADAMTS13 spaltet die ULVWF-Moleküle und reguliert so das prothrombotische Potential des VWF. Es konnte gezeigt werden, dass weniger Thrombozyten an VWF binden, nachdem rekombinant hergestellte ADAMTS13 Moleküle die ULVWF-Multimere zerteilt haben.

Die genaue Rolle der Protease ADAMTS13 muss sicherlich ein zentraler Bestandteil der aktuellen Forschung in verschiedenen Bereichen der Tumor und Entzündungsforschung bleiben. Als Regulationsprotein hat ADAMTS13 einen unmittelbaren Effekt auf alle Prozesse, die mit Inflammation, Endothelzellaktivierung und der VWF-Ausschüttung verbunden sind. ADAMTS13 wirkt direkt anti-inflammatorisch, anti-adhäsiv und anti-

thrombotisch. Die pro-inflammatorische Wirkung des luminal exozytierten VWF wird über ADAMTS13 unmittelbar nach Exozytose reguliert, indem die langen Fäden an bestimmten Prädilektionsstellen zerteilt werden. Die bekannteste dieser Prädilektionsstellen liegt in der A2 Domäne des VWF Moleküls. ADAMTS13 löst hier die Verbindung zwischen zwei Aminosäuren (Tyrosin 1605 und Methionin 1606). Die A2 Domäne des VWF Moleküls liegt interessanterweise dann frei, wenn das Molekül entfaltet ist [45].

Viele Fragen bezüglich der genauen Funktion von ADAMTS13 sind allerdings noch zu beantworten.

- Welchen eigenen Regulationsprozessen ist ADAMTS13 unterworfen?
- Ist ADAMTS13 ein mögliches Ziel anti-inflammatorischer Therapie?
- Welchen Einfluss hat ADAMTS13 auf die Metastasierung?
- Kann man diesen Einfluss therapeutisch nutzen?

5.2 Extravasation Tumor-Endothel „cross-talk“

Wenn Tumorzellen im Prozess der hämatogenen Metastasierung extravasieren, müssen sie in Interaktion mit den Endothelzellen treten. Dieser Tumor-Endothel „cross-talk“ ist ein zentraler Punkt aktueller Forschung.

5.2.1 Thrombin, MMP-1 und PAR I

Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR) gehören zu den G- Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), besitzen sieben transmembranäre Domänen und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Verschiedene Serinproteasen (z.B. Thrombin, Trypsin und Trypsinase), aber auch so genannte aktivierende Peptide (AP) und Matrix-Metalloproteasen (MMP-1) können diese Aktivierung auslösen [25, 46, 47].

PAR Rezeptoren (PAR 1- PAR 4) sind an vielen akuten und chronischen inflammatorischen Prozessen beteiligt. Außerdem beeinflussen sie direkt das Gerinnungssystem, allergische Reaktionen und auch das Wachstum und die Ausbreitung maligner Tumore.

Die Aktivierung der PAR ist ein komplexer Vorgang. Proteinasen spalten den Rezeptor am extrazellulären N-Terminus. Es entsteht eine neue N-terminale Sequenz, die über verschiedene Bindungsvorgänge zu einer intramolekularen Aktivierung des Rezeptors führt [48].

Auf diese Selbst-Aktivierung folgt die Initialisierung verschiedener, G-Protein gekoppelter Signaltransduktionskaskaden, die zur Beeinflussung wichtiger Zellfunktionen (Proliferation, Differenzierung, Mitogenese, Zellmotilität, Regulation von Zellzyklusproteinen, Freisetzung von Wachstumsfaktoren) führen.

PAR1, auch als Thrombin-Rezeptor bezeichnet, wird von vielen verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Dazu gehören unter anderem Thrombozyten, Muskelzellen, Fibroblasten bestimmte Tumorzellen und auch Endothelzellen [49-51]

Thrombin ist als Serinprotease in der Lage PAR1 zu aktivieren und spielt, als zentrales Enzym der Gerinnungskaskade, eine wichtige Rolle bei Inflammation, allergischen Prozessen, Tumorstadium und Metastasierung, Gewebeumbau und Wundheilung [46, 52].

Auch MMP1 aus Tumorzellen ist in der Lage PAR1 zu aktivieren und führt somit zu einer Endothelzellaktivierung [51]. Konsekutiv kommt es zu der bereits beschriebenen Umgestaltung des Endothels. Es entsteht ein proinflammatorisches, prokoagulatorisches Milieu und Thrombozyten und Tumorzellen können an den exozytierten VWF-Multimeren anbinden [50, 53, 54].

Genauer kommt es durch die MMP1 und Thrombin vermittelte PAR1 Aktivierung zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels. Dieser Anstieg führt zur WPB Exozytose und damit zur Sekretion von VWF und P-Selektin.

Dieser so genannte Tumor-Endothel „cross-talk“ wird ein zentraler Punkt der aktuellen und zukünftigen Tumorforschung bleiben, da Tumorzellen aktiv an der proinflammatorischen und prokoagulatorischen Umgestaltung des Endothels

mitwirken und in diesem Verhalten möglicherweise beeinflussbar sind. Im Mausmodell konnte z.B. gezeigt werden, dass antikoagulatorisch wirksames Heparin eine Ausbreitung von Tumorzellen auf die Lunge inhibieren kann. Auch bei Tumorpatienten hat Heparin einen lebensverlängernden Effekt [55, 56].

Dieser Effekt kann durch die inhibitorische Wirkung von Heparin auf die Thrombinsynthese und die folglich fehlende prokoagulatorische Umgestaltung des Endothels erklärt werden. Auch bei Melanomzellen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen tumorzellinduzierter, thrombinvermittelter Endothelzellaktivierung und der möglichen Inhibition dieses Vorgangs durch LMWH (Low molecular weight heparin) gezeigt werden [57].

5.3 TEER im neuen In-vitro-Modell

Wird Endothel aktiviert, kommt es, wie oben bereits beschrieben, zu einer proinflammatorischen und prokoagulatorischen Umgestaltung der Oberfläche. Diese Umgestaltung wird auch bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Metastasierung untersucht.

Die oben beschriebenen TEER Versuche wurden durchgeführt, um ein neues Modell zu entwickeln, welches dem anatomischen Aufbau der menschlichen Blutgefäße näher kommt als das bereits etablierte TEER Assay.

Das neue Modell sollte speziell um eine Endothelzellschicht ergänzt werden, um den Prozess der Metastasierung und die Interaktion zwischen Endothel und Tumorzellen besser untersuchen zu können.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass durch die ergänzende Endothelzellschicht keine eindeutigen Vorteile bezüglich der Aussagekraft des bestehenden Modells zu erreichen sind. So kam es durch die Endothelzellschicht nicht zu einem eindeutig schnelleren oder eindeutig langsameren Widerstandseinbruch. Allerdings wurde das etablierte Modell um mögliche Fehlerquellen erweitert. Alleine das Hinzufügen der zweiten Zellschicht führte regelmäßig zu einem Absinken des vorher aufgebauten TEER. Eine mögliche Ursache sind die unterschiedlichen Zellmedien, die notwendig sind, um beide Zellarten ausreichend zu versorgen. Weitere

Versuche, z.B. mit aktiviertem Endothel, oder Inhibition von VWF scheinen bei dem hohen logistischen Aufwand und der bisherigen Ergebnislage nicht sinnvoll.

Bestätigen konnten die Versuche die hohe Dichtigkeit der konfluenten MDCK-C7 Monolayer.

Ich hoffe mit der Arbeit einen sinnvollen Beitrag zur Grundlagenforschung des Metastasierungsprozesses geleistet zu haben.

6 Anhang und Literaturverzeichnis

6.1 Inhaltsstoffe und Rezepturen verwendeter Materialien

Medium für MDCK-C7-Zellen

| | |
|-------|-------------------------|
| 500ml | DMEM |
| 50ml | FCS |
| 5ml | Penicillin/Streptomycin |

Medium für A7-Zellen

| | |
|-------|-------------------------|
| 500ml | DMEM |
| 50ml | FCS |
| 5ml | Penicillin/Streptomycin |
| 1ml | Geneticin 418 |

Serumfreies Medium für MDCK-C7

| | |
|-------|-------------------------|
| 500ml | DMEM |
| 50ml | Penicillin/Streptomycin |

Serumfreies Medium für A7-Zellen

| | |
|-------|-------------------------|
| 500ml | DMEM |
| 5ml | Penicillin/Streptomycin |
| 1ml | Geneticin 418 |

PBS-Puffer (pH = 7,0-7,5)

ohne Calcium und Magnesium

| | |
|-------|----------------------------------|
| 0,2g | KCl |
| 0,2g | KH ₂ PO ₄ |
| 8g | NaCl |
| 1,15g | Na ₂ HPO ₄ |

Ad 1 l sterilem Aqua dest

EDTA-Puffer (PBS + EDTA)

| | |
|-------|----------------------------------|
| 0,2g | EDTA |
| 8g | NaCl |
| 0,2g | KCl |
| 1,15g | Na ₂ HPO ₄ |
| 0,2g | KH ₂ PO ₄ |

ad 1 l sterilem Aqua dest

Trypsin-EDTA-Lösung

| | |
|-------|-----------------------------------|
| 0,2g | EDTA |
| 8g | NaCl |
| 1,15g | Na ₂ HPO ₄ |
| 0,2g | KH ₂ PO ₄ |
| 0,1g | Trypsin (13 000-20 000 BAEE U/mg) |

Kochsalzlösung (0,9%)

| | |
|--------|------------------------|
| 1000ml | H ₂ O dest. |
| 9g | NaCl |

DMEM (pH = 6,8-7,5)

ohne L-Glutamin

| | |
|----------|--------------------|
| 4,5g/l | Glukoseanteil |
| 10,92g/l | Anorganische Salze |
| 2,53g/l | Aminosäuren |
| 31,6mg/l | Vitamine |

RPMI 1640 (pH = 7,0-7,5)

ohne L-Glutamin

| | |
|-----------|--------------------|
| 5mg/l | Phenol Red |
| 9,35g/l | Anorganische Salze |
| 1,46g/l | Aminosäuren |
| 43,66mg/l | Vitamine |

FCS (pH = 7,0-7,5)

| | |
|--------------|------------|
| 1,8-2,45g/dl | Albumin |
| <100 µg/ml | IgG |
| <20 mg/dl | Hämoglobin |

Penicillin/Streptomycin (pH = 6,0-7,0)

| | |
|---------------|--------------|
| 10000U/ml | Penicillin |
| 10mg/ml | Streptomycin |
| Lösungsmittel | NaCl 0,9% |

L-Glutamin (pH = 6,5-7,5)

| | |
|---------------|------------|
| 200mM | L-Glutamin |
| Lösungsmittel | NaCl 0,9% |

Geneticin 418

Aminoglykosid-Antibiotikum

Formel $C_{20}H_{40}N_4O_{10} \times 2H_2SO_4$

6.2 Literaturverzeichnis

1. Böcker, *Pathologie*. 2004: Urban & Fischer Bei Elsevier.
2. Mackie, R.M., R. Marks, and A. Green, *The melanoma epidemic. Excess exposure to ultraviolet light is established as major risk factor*. *Bmj*, 1996. **312**(7042): p. 1362-3.
3. Rees, J.L., *Melanoma: what are the gaps in our knowledge*. *PLoS Med*, 2008. **5**(6): p. e122.
4. Wolinsky, H., *A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis*. *Circ Res*, 1980. **47**(3): p. 301-11.
5. Augustin, H.G., D.H. Kozian, and R.C. Johnson, *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes*. *Bioessays*, 1994. **16**(12): p. 901-6.
6. Weibel, E.R. and G.E. Palade, *New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia*. *J Cell Biol*, 1964. **23**: p. 101-12.
7. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. *Ann N Y Acad Sci*, 1982. **401**: p. 1-8.
8. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
9. EA, V.W., *Hereditär pseudohemofili*. *Finska Läkarsällskapetets Handl*, 1926: p. 87-112.
10. Denis, C.V., *Molecular and cellular biology of von Willebrand factor*. *Int J Hematol*, 2002. **75**(1): p. 3-8.
11. Goerge, T., et al., *Secretion pores in human endothelial cells during acute hypoxia*. *J Membr Biol*, 2002. **187**(3): p. 203-11.
12. Zhang, Z. and W. Li, *[Formation and function of Weibel-Palade bodies]*. *Yi Chuan*, 2009. **31**(9): p. 882-8.
13. Michaux, G. and D.F. Cutler, *How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies*. *Traffic*, 2004. **5**(2): p. 69-78.

14. Schneider, S.W., et al., *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7899-903.
15. Fujikawa, K., et al., *Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1662-6.
16. Furlan, M., R. Robles, and B. Lammle, *Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4223-34.
17. Zhou, Z., et al., *Von Willebrand factor, ADAMTS-13, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Semin Thromb Hemost. **36**(1): p. 71-81.
18. Bongers, T.N., et al., *Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients*. Atherosclerosis, 2009. **207**(1): p. 250-4.
19. Bongers, T.N., et al., *Reduced ADAMTS13 in children with severe meningococcal sepsis is associated with severity and outcome*. Thromb Haemost. **103**(6).
20. Goerge, T., et al., *Microfluidic reveals generation of platelet-strings on tumor-activated endothelium*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 283-6.
21. Floyd, C.M., et al., *von Willebrand factor interacts with malignant hematopoietic cell lines: evidence for the presence of specific binding sites and modification of von Willebrand factor structure and function*. J Lab Clin Med, 1992. **119**(5): p. 467-76.
22. Terraube, V., I. Marx, and C.V. Denis, *Role of von Willebrand factor in tumor metastasis*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 2**: p. S64-70.
23. Karpatkin, S., et al., *Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo*. J Clin Invest, 1988. **81**(4): p. 1012-9.
24. Terraube, V., et al., *Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 519-26.

25. Ludwig, T., et al., *The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(2): p. F319-27.
26. Cunningham, C.C., et al., *Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion*. Science, 1992. **255**(5042): p. 325-7.
27. Cunningham, C.C., *Actin structural proteins in cell motility*. Cancer Metastasis Rev, 1992. **11**(1): p. 69-77.
28. Langmann, *Medizinische Embryologie*. 1989, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
29. Braun-Falco, P.G., Wolff H, *Dermatologie und Venerologie*. 4. Auflage ed. 1997, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
30. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(6): p. 683-90.
31. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
32. Madin, S.H. and N.B. Darby, Jr., *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin*. Proc Soc Exp Biol Med, 1958. **98**(3): p. 574-6.
33. Gekle, M., et al., *Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties*. Pflugers Arch, 1994. **428**(2): p. 157-62.
34. Powell, D.W., *Barrier function of epithelia*. Am J Physiol, 1981. **241**(4): p. G275-88.
35. Claude, P., *Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens*. J Membr Biol, 1978. **39**(2-3): p. 219-32.
36. Dittrich, W. and W. Gohde, *[Impulse fluorometry of single cells in suspension]*. Z Naturforsch B, 1969. **24**(3): p. 360-1.
37. Göhde, D.W., *Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion*, Patentamt, Editor. 1971: Deutschland.

38. Uto, A., H. Arai, and Y. Ogawa, *Reassessment of Fura-2 and the ratio method for determination of intracellular Ca²⁺ concentrations*. Cell Calcium, 1991. **12**(1): p. 29-37.
39. Hayashi, H. and H. Miyata, *Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1994. **31**(1): p. 1-10.
40. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
41. Huang, J., et al., *Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1589-97.
42. Padilla, A., et al., *P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2150-6.
43. Chauhan, A.K., et al., *Formation of platelet strings and microthrombi in the presence of ADAMTS-13 inhibitor does not require P-selectin or beta3 integrin*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 583-9.
44. Barg, A., et al., *Soluble plasma-derived von Willebrand factor assembles to a haemostatically active filamentous network*. Thromb Haemost, 2007. **97**(4): p. 514-26.
45. Turner, N.A., et al., *Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage*. Blood, 2009. **114**(24): p. 5102-11.
46. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
47. Dery, O., et al., *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. Am J Physiol, 1998. **274**(6 Pt 1): p. C1429-52.
48. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
49. Howells, G.L., et al., *Peripheral blood lymphocytes express the platelet-type thrombin receptor*. Br J Haematol, 1993. **84**(1): p. 156-60.

50. Camerer, E., et al., *Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis*. Blood, 2004. **104**(2): p. 397-401.
51. Goerge, T., et al., *Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7766-74.
52. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(2): p. 245-82.
53. Ludwig, R.J., et al., *Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis*. Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2743-50.
54. Prandoni, P., A. Falanga, and A. Piccioli, *Cancer and venous thromboembolism*. Lancet Oncol, 2005. **6**(6): p. 401-10.
55. Borsig, L., et al., *Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3352-7.
56. Lazo-Langner, A., et al., *The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(4): p. 729-37.
57. Kerk, N., et al., *The mechanism of melanoma-associated thrombin activity and von Willebrand factor release from endothelial cells*. J Invest Dermatol. **130**(9): p. 2259-68.

6.3 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor und während des Schreibens unterstützt haben. Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Stefan Werner Schneider: für die gute Betreuung während der gesamten Zeit; für die regelmäßigen Diskussionen und Anregungen und für die Korrekturen. Nicht zuletzt auch für die grundsätzliche Begeisterung an der aktuellen Forschung.

Dr. Tobias Görge: für die gute Zeit im Labor, die Korrektur und das Beantworten so vieler Fragen.

Birgit Pöppelmann: für die Einweisung in die Zellkultur und für die stete Hilfsbereitschaft.

E.S. Schnäker: für die Einweisung in die Mikroskope und Hilfe mit der Software.

Katharina Porowski : für die Hilfe bei den Graphiken.

Marianne Wilhelmi: für die Bereitstellung der HUVEC.

Der Arbeitsgruppe / Dem Laborteam: für die gute Arbeitsatmosphäre.

Meiner Frau Jytte Albers und meiner Tochter Helene

Meinen Eltern Andrea und Heino Kleinerüschkamp.

Meinen Brüdern Moritz und Lukas Kleinerüschkamp.

