

Abkürzungsverzeichnis**III**

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion des Gefäßsystems	1
1.2	Endothelzellen und deren Funktion	2
1.3	Endotheliale Dysfunktion	3
1.4	Hypoxie	4
1.5	TGF β -Aktivierung	5
1.6	TGF β ₁ -Signalweg über SMADs	6
1.7	Bedeutung des TGF β ₁ -Signalwegs in Endothelzellen	7
1.8	Endotheliale-mesenchymale Transition (EndoMT)	9
1.9	Ziel der Arbeit	10
2	Material	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Antikörper	14
2.3	Geräte und Laborbedarf	16
3	Methoden	19
3.1	Zellkulturmethoden	19
3.1.1	Versuchstiere	19
3.1.2	Isolierung von kardialen mikrovaskulären Endothelzellen aus der Ratte	19
3.1.3	Kultivierung	21
3.1.4	Subkultivierung	22
3.1.5	Normoxie und Hypoxie der Endothelzellen	23
3.2	Proteinbiochemische Methoden	24
3.2.1	Herstellung von Proteinlysaten mit RIPA	24
3.2.2	Quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Lowry	25
3.2.3	Proteindenaturierung mit Laemmli-Puffer	26
3.2.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE	27
3.2.5	Western Blot	29
3.3	Immunzytochemische Methoden	33
3.3.1	Fixierung der Endothelzellen	33
3.3.2	Indirekte Immunfluoreszenz	33
3.4	HOE-Assay zum Apoptose-Nachweis	36
3.5	Proliferationsmessungen	36

3.5.1	Bestimmung der Zelldichte durch Trypsinierung	36
3.5.2	Bestimmung der abgestorbenen Zellen im Überstand	37
3.6	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Entwicklung der Zellkultur	38
4.1.1	Zellmorphologie von mikrovaskulären Endothelzellen	38
4.1.2	Anpassung der Enzymdigestion	39
4.1.3	Anpassung der Adhäsionszeit	41
4.1.4	Etablierung der Immunzytochemie	42
4.2	Induktion des TGF β ₁ /SMAD-Signalwegs unter Hypoxie	48
4.2.1	Effizienz der Hypoxie	48
4.2.2	Aktivierung des ALK1-Signalweges unter Hypoxie/Reoxygenierung	49
4.2.3	Aktivierung des ALK5-Signalweges unter Hypoxie/Reoxygenierung	51
4.2.4	TGF β ₁ -unabhängiger SMAD-Signalweg unter Hypoxie/ Reoxygenierung	53
4.3	Zelltod oder Proliferation unter Hypoxie/Reoxygenierung	54
4.3.1	Zelltod und Proliferation nach einer Stunde Hypoxie/Reoxygenierung	55
4.3.2	Zelltod und Proliferation nach drei Tagen Hypoxie	59
4.4	Endotheliale-mesenchymale Transition der MVECs	61
4.4.1	Anpassung der Hypoxiezeiten	61
4.4.2	Immunzytochemie nach dreitägiger Hypoxie	63
4.4.3	Immunzytochemie nach TGF β ₁ -Gabe	66
4.4.4	Proteinanalyse nach dreitägiger Hypoxie	69
5	Diskussion	71
6	Zusammenfassung	77
7	Summary	79
8	Literaturverzeichnis	81
9	Danksagung	90