

| | |
|---|------------|
| 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 | <i>Statistik</i> | 37 |
| 4 | Ergebnisse | 38 |
| 4.1 | <i>Entwicklung der Zellkultur</i> | 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 | <i>Induktion des TGFβ1/SMAD-Signalwegs unter Hypoxie</i> | 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 | <i>Zelltod oder Proliferation unter Hypoxie/Reoxygenierung</i> | 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 | <i>Endotheliale-mesenchymale Transition der MVECs</i> | 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 |