

**Arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen:  
Einfluss von Wachstumsfaktoren, Hypoxie  
und Biomechanik**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biotechnologin Corina Gryczka  
geboren am 31. Juli 1978 in Bernburg

Dresden, Mai 2008

Gutachter: Prof. Dr. G. Vollmer  
Prof. Dr. H. Morawietz  
Dr. A. H. Wagner

Eingereicht am: 23.06.2008

Tag der Verteidigung: 20.10.2008

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems	3
1.1.2 Die Aufrechterhaltung des Blutgefäßsystems	5
1.1.2.1 Das Angiopoietin/Tie-System	7
<b>1.2 Die Funktionen des Endothels</b>	<b>9</b>
1.2.1 Erkrankungen des Endothels	10
1.2.2 Arteriovenöse Differenzierung von Endothelzellen	11
1.2.2.1 Das Ephrin/EphB System	12
1.2.2.2 Der Notch-Signalweg	13
1.2.2.3 Die Hey-Gene	17
<b>1.3 Ziel der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>20</b>
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays	21
2.1.4 Allgemeine Lösungen	22
2.1.5 Zellkultur	25
2.1.5.1 Zellkultur-Produkte	25
2.1.5.2 Wachstumsfaktoren	26
2.1.5.3 Inhibitoren	26
2.1.5.4 Zellkultur-Lösungen	27
2.1.5.5 Kultur- und Stimulationsmedien	28
2.1.6 Bakterienkultur	29
2.1.6.1 Verwendete Bakterienstämme	29
2.1.6.2 Bakterienkultur-Produkte	29
2.1.6.3 Bakterienkultur-Lösungen	29

---

<b>2.2 Methoden</b>	<b>30</b>
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	30
2.2.1.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	30
2.2.1.3 Reverse Transkription	31
2.2.1.4 Standard-PCR	32
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.1.6 Extraktion von Proteinen aus Zellen	34
2.2.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.2.1.8 Western Blot	35
2.2.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	36
2.2.1.10 DNA-Plasmid Mini/Midi-Präparation	37
2.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	38
2.2.2 Zellkultur-Methoden	38
2.2.2.1 Präparation und Kultivierung	38
2.2.2.1.1 Präparation und Kultivierung primärer Endothelzellen aus Venen und Arterien der Nabelschnur	39
2.2.2.1.2 Kultivierung von <i>human embryonic kidney cells</i> (HEK293)	40
2.2.2.1.3 Kultivierung von <i>human dermal microvascular endothelial cells</i> (HMEC-1)	40
2.2.2.1.4 Kultivierung von THP-1 Zellen	40
2.2.2.2 Passagieren von adhärenenten Zellkulturen	40
2.2.2.3 Zellzahlbestimmung	41
2.2.2.4 Quervernetzte Gelatine	41
2.2.2.5 Fixierung von Zellen	41
2.2.2.6 Markierung von Zellen mit Vitalfarbstoffen	42
2.2.2.7 Transfektion von humanen Endothelzellen	42
2.2.2.8 Dual-Luciferase Reporter Assay	43
2.2.2.9 Netzwerkbildung	44
2.2.2.10 Monocyten-Adhäsionsversuche	44
2.2.2.11 Bestimmung der Proliferationsrate von Endothelzellen	45
2.2.2.12 Applikation laminarer Schubspannung	46
2.2.2.13 Hypoxie	48
2.2.2.14 Stimulation humaner Endothelzellen mit Wachstumsfaktoren	48
2.2.2.15 Behandlung von humanen Endothelzellen mit Inhibitoren	49
2.2.2.16 Bestimmung von Angiopoietin-2 im Zellkulturüberstand	49
2.2.2.17 Immunfluoreszenz	50
2.2.3 Statistik	50

---

<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Nachweis arteriovenös differenzieller Genexpression kultivierter humaner Endothelzellen</b>	<b>51</b>
3.1.1 Analyse der Genexpression von HUVEC und HUAEC mit cDNA Mikroarrays	51
3.1.2 Nachweis differenziell exprimierter Gene in HUVEC, HUAEC und HMEC-1 durch RT-PCR	54
3.1.3 Nachweis differenziell exprimierter Gene in HUVEC und HUAEC durch Western Blot-Analyse	55
<b>3.2 Vergleich physiologischer Eigenschaften arterieller und venöser Endothelzellen</b>	<b>56</b>
3.2.1 Vergleich der Proliferationseigenschaften zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen	56
3.2.2 Adhäsion monozytärer THP-1 Zellen an arteriellen und venösen Endothelzellen	59
3.2.3 Interaktionen humaner Endothelzellen bei der Gefäßbildung	61
3.2.3.1 HUAEC–HUVEC im 2D-Co-Kultur-Modell	61
3.2.3.2 HUAEC–HUVEC im 3D-Co-Kultur-Modell	63
<b>3.3 Regulation der Angiopoietin-2-Expression in humanen Endothelzellen</b>	<b>68</b>
3.3.1 Klonierung des Angiopoietin-2-Promotors	70
3.3.1.1 Analyse der zelltypspezifischen Angiopoietin-2-Promotor-Aktivität	73
3.3.2 Regulation der Angiopoietin-2 Expression	75
3.3.2.1 Regulation der Angiopoietin-2-Expression durch Wachstumsfaktoren	75
3.3.2.2 Regulation des Angiopoietin-2-Promotors durch VEGF-A	80
3.3.2.3 Regulation der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch Schubspannung	82
3.3.2.4 Regulation des Angiopoietin-2-Promotors über Schubspannung	85
<b>3.4 Untersuchungen zum Notch-Signalweg in humanen Endothelzellen</b>	<b>86</b>
3.4.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Regulation des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen	86
3.4.1.1 Einfluss des Kulturmediums auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen	86
3.4.1.2 Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Regulation des Notch-Signalwegs	90
3.4.2 Einfluss biomechanischer Kräfte auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen	96
3.4.3 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die arteriovenöse Differenzierung	100
3.4.3.1 Regulation des Notch-Signalwegs	100
3.4.3.2 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die 3D-Co-Kultur	103
3.4.4 Inhibition des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen	105
3.4.4.1 Einfluss der Inhibierung des Notch-Signalwegs auf die 3D-Co-Kultur	110
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>133</b>
<b>6. LITERATUR</b>	<b>136</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
Ang	Angiopoietin
Angpt2Prom	Angiopoietin-2-Promotor
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bFGF-2	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 ( <i>basic fibroblast growth factor-2</i> )
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CADASIL	<i>cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical and leukoencephalopathy</i>
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure ( <i>copy desoxy ribonucleic acid</i> )
CMV	<i>cauliflower mosaic virus</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COUP-TF II	<i>chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
D	Dimension
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole-dihydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DII	<i>Delta-like</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	embryonisch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immune substrate assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen ( <i>endothelial progenitor cells</i> )
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
G0-Phase	<i>gap 0-Phase</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSI-X	Gamma-Sekretase-Inhibitor X
hEGF	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>human epidermal growth factor</i> )
HEK	human embryonic kidney
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
Hey	<i>hairy/enhancer of split-related with YRPW motif</i>
Hif	Hypoxie induzierter Faktor
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen ( <i>human microvascular endothelial cells</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxydase</i> )
HUAEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnurarterie ( <i>human umbilical artery endothelial cells</i> )
HUVEC	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )

---

IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
K	Kontrolle
LOX-1	<i>Lectin-like oxLDL receptor-1</i>
M	Molar
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Versuche
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Natriumhydrogencarbonat
n.n.	nicht nachweisbar
NO	Stickstoffmonoxid
N(otch)-ICD	<i>Notch intracellular domain</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	Partialdruck
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF-BB	Plättchenwachstumsfaktor BB ( <i>platelet-derived growth-BB</i> )
PDT	Generationszeit ( <i>population doubling time</i> )
PDL	<i>population doubling level</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
RBP-Jk	<i>recombination signal-binding protein 1 for J-kappa</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RU	relative Einheit ( <i>relative unit</i> )
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SEM	Standardfehler
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
S-Phase	Synthese-Phase
Su(H)	<i>suppressor of hairless</i>
SU5416	VEGF-Rezeptor 2-Kinase-Inhibitor III
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS (-T)	Tris-Buffered Saline (-Tween)
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
ÜN	über Nacht
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WF	Wachstumsfaktor
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )

# 1. Einleitung

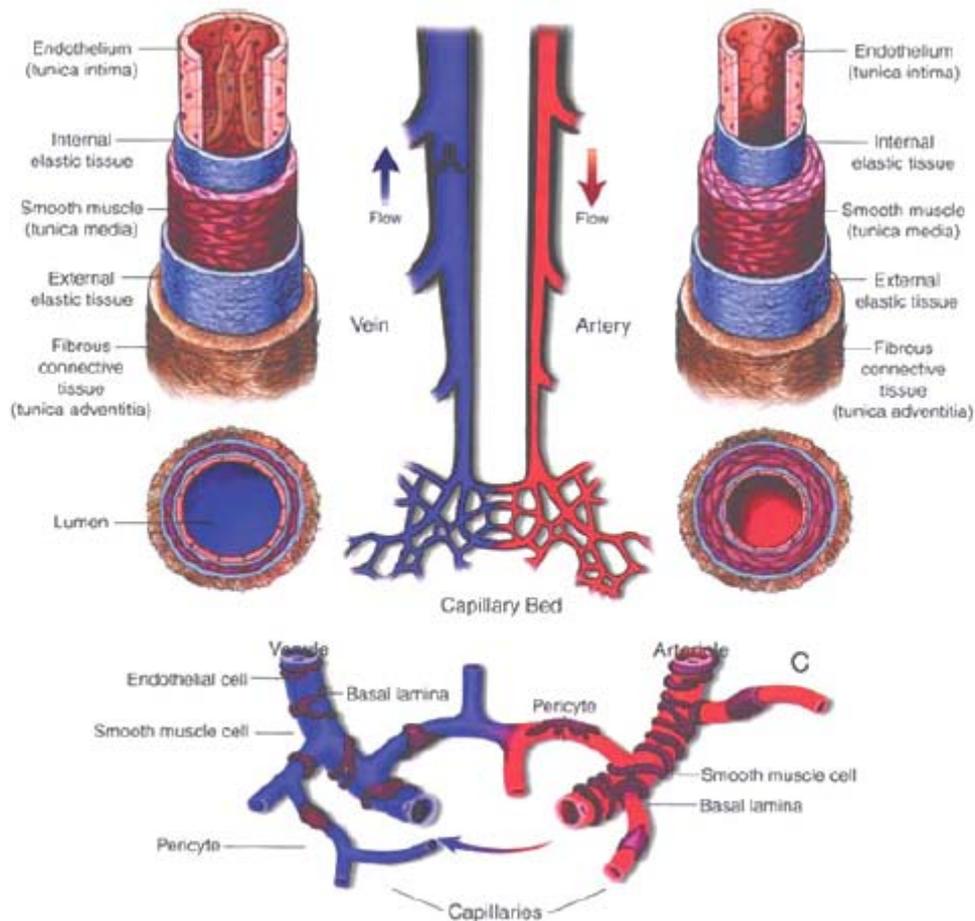
## 1.1 Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems

*Coronary heart disease is now the leading cause of death worldwide. It is on the rise and has become a true pandemic that respects no borders (World Health Organization, 2006).*

*[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/cvd\\_atlas\\_14\\_deathHD.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_14_deathHD.pdf)*

Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ihre Folgen sind die häufigste Todesursache weltweit. Ein weitergehendes Verständnis von Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems kann dazu beitragen, die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen besser zu verstehen und damit die Möglichkeit zu deren Prävention bzw. neuen Behandlungsstrategien eröffnen.

Herz-Kreislauf-Erkrankungen beruhen meist auf einer Dysfunktion des Endothels (Ross, R and Glomset, JA, 1976b, Ross, R and Glomset, JA, 1976a), welches mit 1.000-7.000 m<sup>2</sup> Fläche eines der größten Organe im menschlichen Körper darstellt. Sämtliche Blutgefäße sind mit einer einschichtigen Zelllage von Endothelzellen ausgekleidet, die eine physikalische Barriere zwischen dem Gefäßlumen und dem dahinter liegenden Gewebe bilden. Das Blutgefäßsystem übernimmt die Versorgung der Organe mit Nährstoffen und Sauerstoff, und den Abtransport von Abfallprodukten und Kohlendioxid. Der komplexe Aufbau des Blutgefäßsystems basiert dabei auf einer hierarchischen Grundstruktur, angefangen mit den großen Blutgefäßen, den Arterien und Venen, die sich in den Organen zu kleineren Ateriolen und Venolen verzweigen, bis hin zu den feinen, aus nur einer Lage von Endothelzellen bestehenden Kapillaren, die für die Mikrozirkulation wichtig sind (Abb. 1.1). Die Wand größerer Blutgefäße besteht neben der Intima als innerster Schicht von Endothelzellen, aus zwei weiteren Schichten. Die Media wird je nach Gefäßtyp von einer mehr oder weniger ausgeprägten Schicht glatter Muskelzellen gebildet, während die äußerste aus Bindegewebe bestehende Schicht, die Adventitia, das Gefäß direkt umgibt und in der Umgebung verankert. Neben der strukturellen Trennung von Gefäßlumen und Gewebe sind Endothelzellen an der Erfüllung weiterer wichtiger Funktionen wie die Regulation des Gefäßtonus, der Blutgerinnung und der Gefäßpermeabilität beteiligt (Michiels, C, 2003).



**Abb. 1.1: Aufbau und Struktur verschiedener Blutgefäße im adulten Organismus**

Das Endothel bildet in allen Gefäßen eine einlagige innere Zellschicht (Intima). Die von den glatten Muskelzellen gebildete Media ist dagegen nur in den großen Arterien vielschichtig ausgebildet und von starken elastischen Fasern umgeben. Ihre Stärke nimmt mit der Verringerung des arteriellen Durchmessers ab. Im Kapillarbett werden die Endothelzellen nur noch von einzelnen Perizyten bzw. glatten Muskelzellen begleitet (Torres-Vazquez, J *et al.*, 2003).

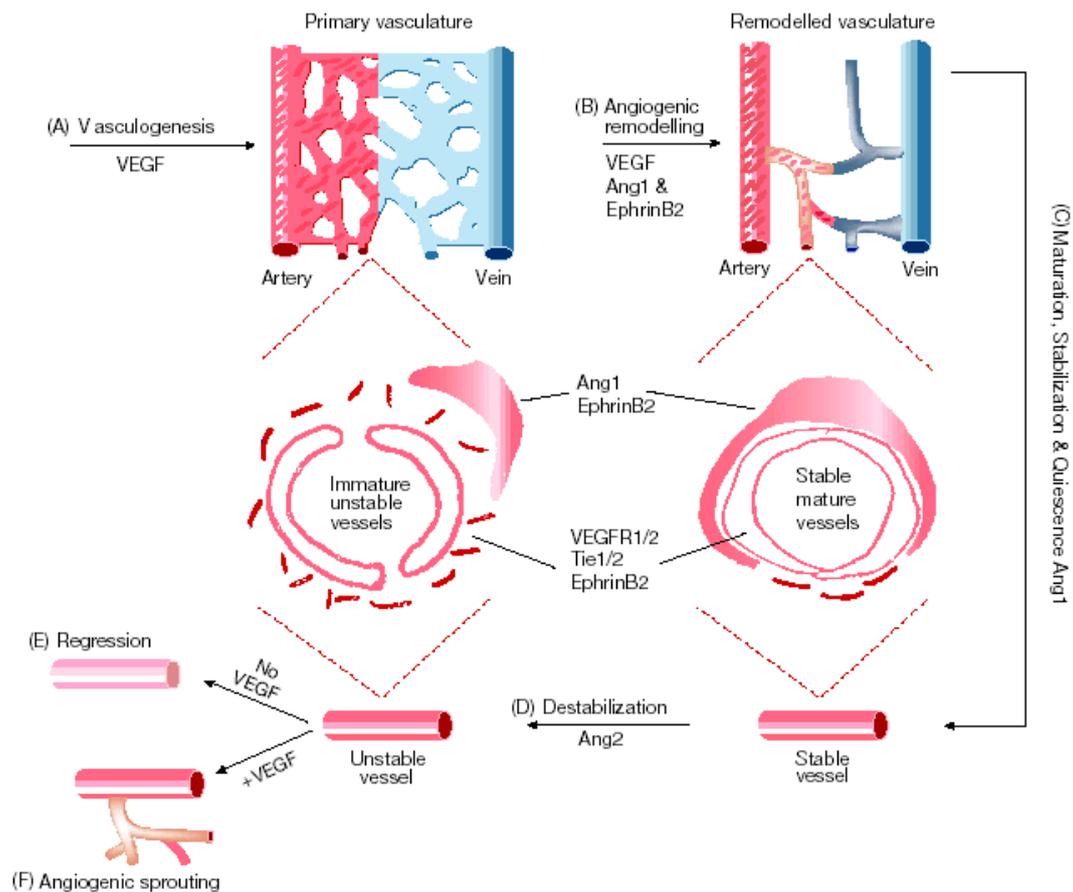
Ihren Aufgaben im Organismus angepasst, weisen arterielle und venöse Gefäße strukturelle Unterschiede auf (Hirashima, M and Suda, T, 2006). Obgleich alle Blutgefäße mit Endothelzellen ausgekleidet sind, liegt der hauptsächliche strukturelle Unterschied in der Media, die den vorherrschenden Drücken der Blutzirkulation angepasst ist. Die vom Herzen wegführenden arteriellen Gefäße haben aufgrund der hohen Blutdruckwerte mehrere Lagen von glatten Muskelzellen und Kollagenfasern. Die Gefäße sind dadurch besonders elastisch und muskulös. In den Venen ist der Blutdruck dagegen gering. Für die Integrität dieser Gefäße ist eine einschichtige Zelllage glatter Muskelzellen ausreichend. Darüber hinaus wird bei der Rückführung des mit Stoffwechselprodukten angereicherten venösen Blutes ein Rückfluss durch Venenklappen verhindert.

### 1.1.1 Die Entwicklung des Blutgefäßsystems

Das Blutgefäßsystem ist das erste sich entwickelnde Organ während der Embryogenese. Die Endothelzellen sind dabei die ersten Zellen, die sich im kardiovaskulären System differenzieren (Coffin, JD and Poole, TJ, 1991, Noden, DM, 1991, Risau, W, 1991). Die Embryogenese selbst unterteilt sich in zwei streng nacheinander ablaufende Prozesse, die Vaskulogenese und die Angiogenese (Abb. 1.2). Es wird eine Vielzahl von interzellulären Signalwegen diskutiert, die die Prozesse der Vaskulogenese und Angiogenese regulieren. Dazu gehören klassische Wachstumsfaktor-vermittelte Signalwege über VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF oder PDGF. Weitere bisher bekannte Signalsysteme, die in der Gefäßentwicklung von entscheidender Bedeutung sind, umfassen das Angiopoietin/Tie-Rezeptorsystem, sowie das Ephrin/Eph-Rezeptorsystem.

Die Vaskulogenese bezeichnet die Entwicklung eines primitiven Gefäßnetzwerkes im avaskulären Embryo. Der initiale Schritt ist die Bildung von Hämangioblasten aus dem Mesoderm. Die aus pluripotenten Stammzellen bestehenden Hämangioblasten formen Blutinseln, bei denen sich die innere Zellschicht zu hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickelt und die äußere Schicht (Angioblast) sich zu Endothelzellen differenziert. Der VEGF-Rezeptor 2 ist die erste endotheliale Rezeptor-Tyrosinkinase, die im Angioblasten exprimiert wird, und sowohl für die Differenzierung von Endothelzellen, als auch für die Entwicklung hämatopoetischen Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle spielt (Yamaguchi, Y *et al.*, 1993). Der Angioblast differenziert unter dem Einfluss von VEGF und bFGF zu Endothelzellen. Die Endothelzellen koordinieren sich zu einem primären Gefäßplexus (Risau, W, 1995, Risau, W and Flamme, I, 1995), einem unausgereiftem, nicht funktionsfähigen Netzwerk aus röhrenförmigen Strukturen.

Die sich anschließende Organisation (Remodeling) hin zu der komplexen hierarchischen Struktur des Gefäßsystems wird als Angiogenese bezeichnet (Folkman, J, 1984). Der Prozess der Angiogenese wird im sich entwickelnden Embryo größtenteils durch Hypoxie gesteuert, die die Freisetzung angiogener Faktoren stimuliert (Forsythe, JA *et al.*, 1996). Unter dem Einfluss von VEGF beginnt der primäre Plexus zu sprossen und sich zu teilen. Das Wachstum und die Migration der Endothelzellen werden angeregt. Durch die Sezernierung von Faktoren wie PDGF-B und TGF- $\beta$ 1 rekrutieren die Endothelzellen glatte Muskelzellen und andere für den Aufbau der Gefäßwand benötigte murale Zellen (Hirschi, KK *et al.*, 1998, Chambers, RC *et al.*, 2003). Die neu entstehenden Gefäßsprossen werden durch den Einfluss von Angiopoietin-1 stabilisiert, so dass nach Abschluss der embryonalen Angiogenese ein reifes und ruhendes Gefäßsystem vorliegt.



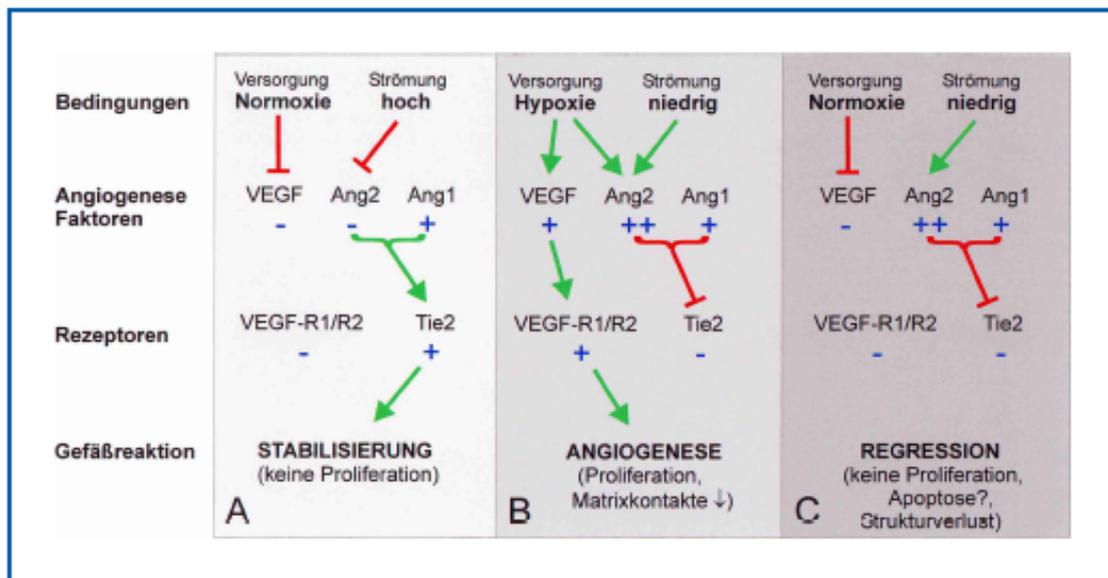
**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Prozesse bei der Blutgefäßbildung.**

Der Prozess der Gefäßentwicklung und -differenzierung beinhaltet die Vaskulogenese (A), das angiogene Remodeling (B), die Reifung und Stabilisierung (C), die Destabilisierung (D), die Regression (E) und das angiogene Sprossen (F) (Yancopoulos, GD *et al.*, 2000).

Durch den Einfluss von Angiotensin-2 kann es weiterhin in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zu einer Destabilisierung und Regression von nicht benötigten Gefäßsprossen kommen. In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (VEGF) kommt es dagegen bei Bedarf zu einem weiteren angiogenen Sprossen.

### **1.1.2 Die Aufrechterhaltung des Blutgefäßsystems**

Das Gefäßsystem im adulten Organismus ist jedoch nicht statisch. Bei einem veränderten Bedarf in Geweben, tritt die Angiogenese als Adaptionsmechanismus bei physiologischen und pathophysiologischen Situation auf. Dazu gehören z.B. die Wundheilung und die Bildung der Plazenta, sowie die Neovaskularisierung nach Ischämie infolge eines Infarkts. Auch das pathophysiologische Wachstum von Tumoren ist durch eine extensive Angiogenese charakterisiert. Die Angiogenese ist im adulten Organismus die vorrangige Möglichkeit der Gefäßneubildung aus bereits existierenden Gefäßen. Dabei spielen das VEGF- und das Angiopoietin/Tie-2-System eine wichtige Rolle. Beide werden durch den Sauerstoffpartialdruck und der Wandschubspannung reguliert (Abb. 1.3; (Hanahan, D, 1997)). In einem gut perfundierten Gefäß sind weder VEGF, noch Angiopoietin-2 exprimiert. Die Bindung von Angiopoietin-1 an den Tie-2-Rezeptor bewirkt eine Stabilisierung des Gefäßes. Eine durch Hypoxie induzierte Angiogenese beginnt mit einer durch Stickstoffmonoxid vermittelten Vasodilatation existierender Gefäße. Unter den Einfluss von VEGF erhöht sich die Durchlässigkeit der Gefäße. Die Destabilisierung wird durch Angiopoietin-2 verstärkt, das die Lockerung der Verbindungen zwischen Endothelzellen und dem unterliegenden Gewebe beschleunigt. Unter der weiteren Einwirkung von VEGF und bFGF kann ein angiogenes Sprossen erfolgen. Ohne Einwirkung von VEGF kann es wie in der Embryonalentwicklung dagegen zur vollständigen Regression von Gefäßen kommen.



**Abb. 1.3: Regulation des VEGF- und Angiopoietin/Tie-2 Systems bei der Angioadaptation durch Sauerstoffpartialdruck und Wandschubspannung.**

(A) Unter normoxischen Bedingungen wird das Gefäß durch den Einfluss von Angiopoietin-1 stabilisiert. (B) Unter hypoxischen Bedingungen bei gleichzeitiger Verringerung der Blutströmung kommt es durch Aktivierung des VEGF-Signalwegs bei gleichzeitiger Inaktivierung des Tie-2-Rezeptors zu angiogenem Sprossen. (C) Bei Normoxie mit verringerter Strömung kann es zur Gefäßregression durch Inhibition des Tie-2-Rezeptors kommen (Zakrzewicz, A *et al.*, 2002).

Neben der oben beschriebenen pränatalen Vaskulogenese (Kap. 1.1.1), bei der die Endothelzellen aus dem Mesoderm differenzieren, wird auch eine postnatale Vaskulogenese, bei der sich Endothelzellen im adulten Organismus aus pluripotenten Knochenmarkszellen (Aghi, M and Chiocca, EA, 2005) oder endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) bilden, diskutiert (Eguchi, M *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit des Gefäßumbaus ist die Arteriogenese. Hierbei induziert erhöhte Schubspannung nach Gefäßverschluss das Wachstum präformierter Kollateralen zu funktionellen Kollateralen (Schaper, W and Buschmann, I, 1999). Diese Kollateralgefäße sind Arterien, die durch Proliferation und Gefäßumbau aus Arteriolen entstehen.

### 1.1.2.1 Das Angiopoietin/Tie-System

Die Angiogenese ist einer der wenigen biologischen Prozesse, welcher die Bildung und Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen aller Organe betrifft. Dabei beschreibt der Begriff die Anpassung bereits bestehender Gefäße an eine veränderte Bedarfslage, die sowohl die Neubildung, als auch die Regression von Gefäßen umfasst. Beginnend mit der embryonalen Gefäßentwicklung, ist die Angiogenese auch für die spätere Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität im adulten Organismus von Bedeutung. Die Regulation der Angiogenese unterliegt einem diffizilen, durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren kontrollierten Gleichgewicht, welches sich schnell zu gunsten einer pathophysiologische Angiogenese verändern kann, die das Wachstum aggressiver Tumore charakterisiert. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren, die spezifisch auf Endothelzellen Einfluss nehmen, gehören die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) und die Familie der Angiopoietine. Die als erste endothelspezifischen Wachstumsfaktoren identifizierten VEGFs, gelten als Haupt-Angiogenesefaktoren (Ferrara, N and Henzel, WJ, 1989). Sie regulieren sowohl die Ausbildung des unreifen Gefäßplexus während der Vaskulogenese, als auch das sich anschließende angiogene Sprossen (Yla-Herttuala, S *et al.*, 2007). Obwohl die VEGFs fundamentale Prozesse wie die Vaskulogenese und die Angiogenese initiieren können, würde die durch sie geförderte Gefäßbildung zu durchlässigen, unreifen und instabilen Gefäßen führen (Detmar, M *et al.*, 1998). Es besteht daher die Notwendigkeit eines Zusammenspiels mit weiteren Wachstumsfaktoren wie den Angiopoietinen.

Die Angiopoietine sind kleine sekretorische Glycoproteine, die als Liganden der Tie-Rezeptoren entdeckt wurden. Diese Rezeptoren gehören zu der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und werden gleich den VEGF-Rezeptoren exklusiv von den Gefäßendothelzellen exprimiert. Studien mit *knock-out*-Mäusen, denen entweder der Rezeptor Tie-1 oder der Rezeptor Tie-2 fehlten, deuteten darauf hin, dass der über den Tie-Rezeptor vermittelte Signalweg in die spätere embryonale Gefäßentwicklung eingreift (Suri, C *et al.*, 1998). Die Embryos der Tie-*knock-out*-Mäuse starben an Tag 13.5 bis 14.5 zu einem Zeitpunkt, an dem sich der primitive Gefäßplexus unter Einwirkung von den VEGFs schon gebildet hatte. In den Tie-*knock-out*-Mäusen fehlte das weitere Remodeling in die hierarchische Gefäßstruktur. Dahingegen starben VEGF-Rezeptor-*knock-out*-Mäuse schon an Tag 8.5 bis 9.5 zum Zeitpunkt, an dem die Blutzirkulation einsetzt (Shalaby, F *et al.*, 1995).

Zurzeit sind drei humane Angiopoietine identifiziert, Angiopoietin-1, 2 und 4 (Angiopoietin-3 ist das Maus-Homolog zum humanen Angiopoietin-4), die alle mit hoher Affinität an den Tie-

2-Rezeptor binden. Die Angiotensin-II-Rezeptoren-1 und 2 stellen zusammen mit dem Tie-2-Rezeptor ein interessantes Ligand/Rezeptor-System dar, bei dem zwei Liganden derselben Familie gegensätzliche Funktionen über denselben Rezeptor ausüben. Sie spielen dadurch gleichermaßen für die Erhaltung und die Stabilität des Gefäßsystems, als auch für die Neubildung von Blutgefäßen eine große Rolle. Obwohl sie untereinander eine Homologie von 60% aufweisen, aktiviert Angiotensin-II als Agonist den Tie-2-Rezeptor (Suri, C *et al.*, 1996), während Angiotensin-1 als sein natürlicher Antagonist den Rezeptor blockiert (Maisonpierre, PC *et al.*, 1997).

Angiotensin-II wird von einer Vielzahl von Geweben exprimiert und bewirkt über einen parakrinen Mechanismus die Autophosphorylierung des endothelialen Tie-2-Rezeptors. Die Aktivierung des Rezeptors durch Angiotensin-II ermöglicht die Rekrutierung stromaler Zellen an die Gefäßspitze, zur Gewährleistung der Gefäßintegrität (Vikkula, M *et al.*, 1996). Die Angiotensin-II *knock-out*-Tiere zeigen die gleichen Defekte wie der Tie-Rezeptor-*knock-out*, die sich besonders im Herzen manifestierten (Dumont, DJ *et al.*, 1994, Sato, TN *et al.*, 1995, Suri, C *et al.*, 1996). Nachdem der primäre Gefäßplexus sich gebildet hatte, unterbleibt das weiterführende Remodeling der vaskulären Struktur in große und kleine Gefäße. Des Weiteren konnten Probleme in der Integration des Endokards in das Myokard nachgewiesen werden. Eine detaillierte Analyse auf zellulärer Ebene verdeutlichte, dass dabei die Endothelzellen nicht in der Lage waren, mit den umgebenden Zellen in Kontakt zu treten. Die transgene Überexpression von Angiotensin-II in der Haut hatte dagegen eine massive Hypervaskularisierung zur Folge, welche zusätzlich durch sehr große und undurchlässige Gefäße charakterisiert war (Suri, C *et al.*, 1998, Thurston, G *et al.*, 1999).

Angiotensin-1 wird im Gegensatz zu Angiotensin-II ausschließlich von Gefäßendothelzellen solcher Gewebe exprimiert und freigesetzt, die einer massiven Angiogenese unterliegen. Dazu zählen auch Tumorgewebe (Zhang, L *et al.*, 2003). Angiotensin-1 blockiert als natürlicher Antagonist die Angiotensin-II vermittelte Aktivierung des Tie-2-Rezeptors (Maisonpierre, PC *et al.*, 1997). Die gezielte transgene endotheliale Überexpression von Angiotensin-1 in der Maus führt zur embryonalen Letalität (Maisonpierre, PC *et al.*, 1997). Die Defekte bei transgenen Überexpressionen sind durch eine fehlende Blutgefäßbildung gekennzeichnet und gleichen damit denen der Tie- und der Angiotensin-II *knock-out*-Tiere. Der *knock-out* von Angiotensin-1 ist dagegen postnatal letal (Gale, NW *et al.*, 2002). Die Mäuse sterben erst zwei Wochen nach der Geburt.

In einem Modell des vaskulären Remodelings, dem Augenmodell neonataler Mäuse, konnten Gale und Mitarbeiter (Gale, NW *et al.*, 2002) zeigen, dass in den homozygoten Angiopoietin-2 *knock-out*-Tieren sowohl jegliches angiogene Sprossen als auch die notwendige Gefäßregression unterblieb. In diesen Modellen wurde deutlich, dass Angiopoietin-2 in der embryonalen Gefäßbildung selbst keine herausragende Rolle spielt, den postnatalen Gefäßumbau und die Aufrechterhaltung des Gefäßsystems jedoch entscheidend reguliert.

Aus den Daten wurde ein Modell entwickelt, in dem Angiopoietin-2 als notwendiger Gefäß-Destabilisator wirkt, der das angiogene Sprossen eines ruhenden Gefäßes erst ermöglicht. Dabei wird durch die autokrine Induktion von Angiopoietin-2 im Endothel der stabilisierende Einfluss von Angiopoietin-1 blockiert und die Zellen können sich an eine veränderte Bedarfslage anpassen. Die Anpassung kann sowohl das weitere angiogene Sprossen umfassen, welches durch gleichzeitig vorhandene angiogene Stimuli gesteuert wird, als auch die Regression des Gefäßes bedeuten.

## 1.2 Die Funktionen des Endothels

Endothelzellen sind aus dem Mesoderm entstandene bipolare Zellen (Risau, W and Flamme, I, 1995), die in direkten Kontakt mit dem Blut und mit dem dahinter liegenden Gewebe stehen. Die durch das Endothel gebildete Barriere ist selektiv permeabel. Dadurch kontrolliert das Endothel in organspezifischer Weise den Stoffaustausch zwischen dem Blutstrom und dem umgebenden Gewebe und damit die Gewebshomöostase. Das gesunde Endothel ist antithrombotisch und für die Aufrechterhaltung des Blutflusses verantwortlich. Außerdem ist es an der Bildung und Sezernierung von Faktoren der Blutgerinnung beteiligt (Becker, BF *et al.*, 2000). Als multifunktionelle Grenzschicht kommen dem Endothel Aufgaben als Empfänger und Übersetzer von im Blut zirkulierenden Signalen zu (Rösen, P, 2002). Alle Veränderungen im strömenden Blut werden vom Endothel wahrgenommen und als Reaktion an die Gefäßwand weitergeleitet. Solche Veränderungen beinhalten mechanische Reize (Dehnung und Wandschubspannung), sowie die Konzentration vasoaktiver Substanzen und metabolischer Faktoren. Die Expression von Rezeptoren ermöglicht die Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Hormone, wie VEGF oder bFGF, auf Zytokine wie Interleukine, oder auf Infektionen durch die Reaktion auf bakterielle Toxine.

Das Endothel selbst produziert biologisch aktive Substanzen. Dazu gehören den Blutdruck beeinflussende vasodilatatorische Faktoren wie Stickstoffmonoxid (Palmer, RM *et al.*, 1987) und vasokonstriktorische Faktoren wie Angiotensin II, inflammatorische Modulatoren wie ICAM, oder Wachstumsfaktoren und Zytokine. Eine weitere wichtige Funktion übernimmt das Endothel bei der Gefäßanpassung oder Gefäßneubildung (Angiogenese) im adulten Organismus, um die Versorgung der Organe aufrecht zu erhalten.

Die Einteilung der Vaskulatur in Arterien und Venen beinhaltet zwei distinkte und separate Netzwerke, die sich durch den gesamten Organismus ziehen. Das Endothel selbst weist eine der lokalen Spezifikation angepasste, phänotypische Heterogenität auf, beginnend mit seiner Klassifizierung in kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches Endothel (Cleaver, O and Melton, DA, 2003). Aber auch die molekulare Heterogenität von Endothelzellen verschiedener Gewebe ist enorm (Chi, JT *et al.*, 2003). Als Beispiel seien die Endothelzellen der Hautgefäße genannt, die bFGF und Enzyme der Cholesterin-Biosynthese produzieren (Chi, JT *et al.*, 2003), während Endothelzellen des Myometriums spezifisch den Calcitonin-Rezeptor exprimieren, der bei der Implantation des Embryos in die Gebärmutter eine Rolle spielt (Zhu, LJ *et al.*, 1998).

### 1.2.1 Erkrankungen des Endothels

Die Entwicklung von Gefäßkrankheiten beruht auf der chronischen Schädigung der Endothelzellen, die dadurch in ihrer Funktion eingeschränkt sind. Die Folge ist eine veränderte Vasoreaktivität, eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Plasmaproteine und eine selektive Hyperadhäsivität für Leukozyten und thrombotische Komplikationen (Rösen, P, 2002). Gefäßerkrankungen gehören in den Industrieländern hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Ernsthaftigkeit zu den wichtigsten Erkrankungen. Dabei können Gefäßerkrankungen sämtliche Abschnitte des Blutkreislaufs betreffen, sowohl die Gefäße des großen Kreislaufs (Körperkreislauf) wie des kleinen Kreislaufs (Lungenkreislauf). Der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ umschreibt die pathophysiologischen Veränderungen der Eigenschaften des Endothels durch die Einwirkung von Risikofaktoren (Gimbrone, MA, Jr. *et al.*, 2000), wie Hypercholesterinämie, Rauchen, Bluthochdruck oder Diabetes. Die funktionelle Heterogenität arterieller und venöser Endothelzellen ist in der Pathogenese gefäßspezifischer Erkrankungen von klinischer Relevanz. Im Hinblick auf Ernsthaftigkeit und Gefahrenpotential sowie Häufigkeit stehen arterielle Gefäßerkrankungen an erster Stelle.

In Folge einer fortschreitenden Verengung („Verkalkung“) arterieller Gefäße im Prozess der Atherosklerose kommt es zunächst zu einer Minderversorgung und später zum Absterben

betroffener Gewebebereiche. Mögliche Komplikationen der Atherosklerose sind Durchblutungsstörungen („Schaufensterkrankheit“), Nierenversagen oder Angina pectoris, sowie als fatale Endpunkte Herzinfarkt oder Schlaganfall.

Das Hauptsymptom bei venösen Erkrankungen ist die Stauung bzw. Schwellung des der Vene zugehörigen Gewebebezirkes durch die behinderte Rückflussmöglichkeit des Blutes zum Herzen. Eine Volkskrankheit sind die durch eine Schwächung der Venenwand/Venenklappen charakterisierten Varizen (Krampfadern). Aber auch Thrombosen sind häufige Verschlusskrankheiten, die sich in den tieferen Bein- oder Beckenvenen bilden.

Ein bisher nicht vollständig gelöstes Problem stellen die hohen Restenoseraten venöser Bypässe im Vergleich zu arteriellen Bypässen bei der Behandlung von Gefäßverengungen durch Bypass-Chirurgie dar (Suma, H, 1999). Von klinischer Bedeutung ist ebenfalls das Remodeling nach arteriovenösen (AV)-shunt-Operationen, da sich bei jedem dritten eingesetzten AV-shunt das betroffene Gefäß verschließt (Weiswasser, JM *et al.*, 2004).

### **1.2.2 Arteriovenöse Differenzierung von Endothelzellen**

Arterien und Venen sind aufgrund ihrer Funktion im Körper morphologisch, funktionell und genetisch verschieden (Zhong, TP *et al.*, 2001). Die mit dem Blut im direkten Kontakt stehenden Endothelzellen, sind je nach Gefäßtyp natürlichen, aber unterschiedlichen biomechanischen Parametern und Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt. Die morphologische Anpassung beruht auf den in den Gefäßen vorherrschenden Blutdrücken. Die funktionelle und genetische Heterogenität arterieller und venöser Endothelzellen umfasst zum einen Moleküle, die entsprechend der jeweiligen physiologischen Funktion benötigt werden, aber auch die Expression von Molekülen, die die Identität der Endothelzellen selbst bestimmen. Die Endothelzellen sind dabei besonders in den Blickpunkt der Forschung gerückt, da sie als erster Zelltyp die Gefäßbildung initiieren. Zunächst wurde angenommen, dass die strukturellen Unterschiede auf physiologischen Faktoren, wie der Richtung und der Stärke des Blutflusses beruhen und sich daher erst zu einem späteren Zeitpunkt der Gefäßentwicklung manifestieren. Doch der Nachweis der spezifischen arteriellen und venösen Marker Ephrin-B2 und EphB4 auf sich entwickelnden Gefäßstrukturen noch vor dem Einsetzen der Blutzirkulation deutete an, dass die molekulare Determinierung in den arteriellen oder venösen Genotyp einer genetischen Kontrolle unterliegt (Wang, HU *et al.*, 1998, Adams, RH *et al.*, 1999, Gerety, SS and Anderson, DJ, 2002).

Weitere putative Signalwege, die die arteriovenöse Differenzierung kontrollieren und in verschiedenen Tiermodellen nachweisbar sind, sind zum einen der Notch-Signalweg, sowie Signalwege über das VEGF-Rezeptor/Neuropilin System (Tab. 1).

**Tab.1: Bekannte molekulare Marker des arteriellen und venösen Gefäßsystems**

(Adams, RH, 2003, modifiziert)

	Arterielle Endothelzellen	Venöse Endothelzellen
<b>Maus</b>	Ephrin-B2 <sup>1,2,3</sup> , Neuropilin-1 <sup>4</sup> , Connexin-40 <sup>4</sup> , Bmx <sup>5,6</sup> , Notch-1 <sup>7</sup> , -3 <sup>7</sup> und -4 <sup>7</sup> , Delta-like 4 <sup>7,8</sup> , Jagged-1 <sup>7</sup> , Jagged-2 <sup>7</sup>	EphB4 <sup>1,2,3</sup>
<b>Huhn</b>	Ephrin-B2 <sup>9,10</sup> , Neuropilin-1 <sup>9,11</sup>	Neuropilin-2 <sup>11</sup> , Tie-2 <sup>9,12</sup>
<b>Zebrafisch</b>	Notch-5 <sup>13,14</sup> , gridlock <sup>14,15</sup> , Ephrin-B2a <sup>13,14,15</sup>	Flt4 <sup>13,14,15</sup> , EphB4 <sup>15</sup>

1 (Wang, HU *et al.*, 1998); 2 (Adams, RH *et al.*, 1999); 3 (Gerety, SS *et al.*, 1999); 4 (Mukouyama, YS *et al.*, 2002); 5 (Ekman, N *et al.*, 1997); 6 (Rajantie, I *et al.*, 2001); 7 (Villa, N *et al.*, 2001); 8 (Shutter, JR *et al.*, 2000); 9 (Moyon, D *et al.*, 2001a); 10 (Othman-Hassan, K *et al.*, 2001); 11 (Herzog, Y *et al.*, 2001); 12 (Moyon, D *et al.*, 2001b); 13 (Lawson, ND *et al.*, 2001); 14 (Lawson, ND *et al.*, 2002); 15 (Zhong, TP *et al.*, 2001)

### 1.2.2.1 Das Ephrin/EphB System

Der angiogene Umbau im Embryo hin zu einem komplexen Gefäßnetzwerk umfasst die Ausbildung arterieller und venöser Gefäße mit einer gewebe- und organtypischen Spezialisierung der Wand- und Netzwerkstruktur (Risau, W and Flamme, I, 1995). Die Arbeitsgruppe um Wang und Mitarbeiter (Wang, HU *et al.*, 1998) konnte erstmals zeigen, dass die arteriovenös spezifische Expression von Ephrin-B2 und EphB4 der Bildung von Arterien und Venen während der Vaskulogenese vorausgeht. Neuere Studien belegen jedoch,

dass diese beiden Moleküle in der frühesten arteriovenösen Entscheidung nicht aktiv involviert sind. Sie werden erst bei der Ausbildung der homo- und heterotypischen Zellkontakte diskutiert werden, bei denen der Ligand Ephrin-B2 eine spezifische arterielle und der Rezeptor EphB4 eine venöse Expression aufweist. Die Liganden und Rezeptoren vermitteln attraktive und repulsive Reize, über die die Fusion arterieller und venöser Gefäße kontrolliert wird und somit arteriovenöse Grenzen definiert werden (Adams, RH *et al.*, 1999, Wilkinson, DG, 2001).

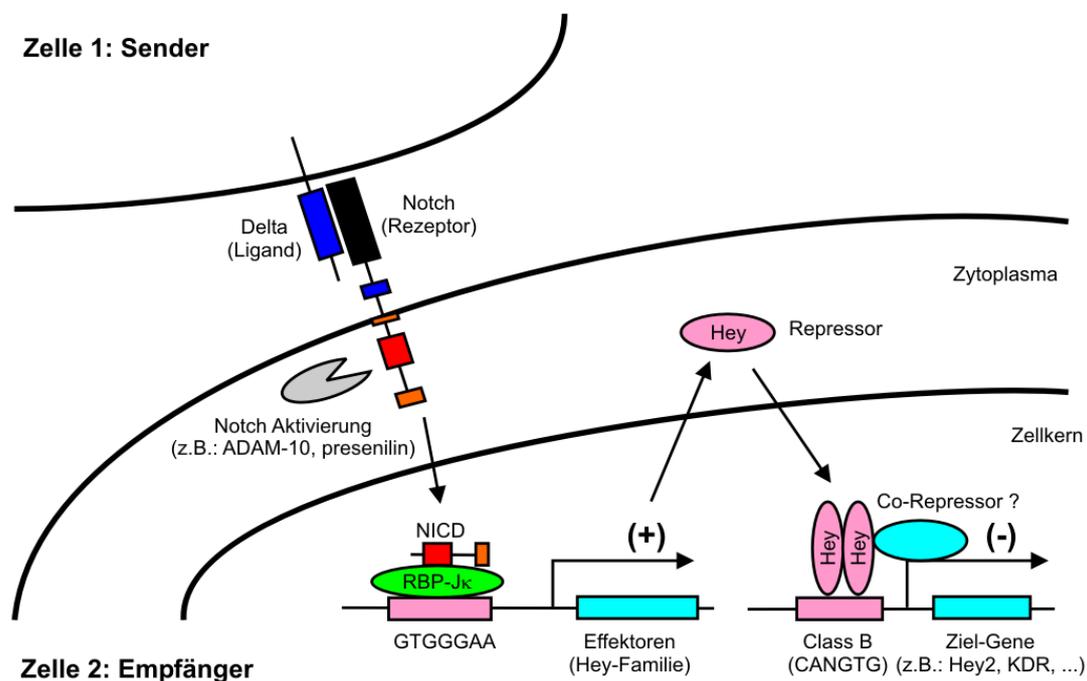
Die membranständigen Eph-Rezeptoren gehören zu der Klasse der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und werden aufgrund von Sequenzhomologien und Bindungspräferenzen mit den Ephrinen in zwei Klassen eingeteilt. Die Klasse der EphA-Rezeptoren umfasst acht Mitglieder (EphA1-A8), die mit den sechs Ephrin-A-Proteinen interagieren (Ephrin-A1-A6). Die Ephrin-A-Proteine werden über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker auf der Zelloberfläche präsentiert. In der zweiten Klasse werden sechs EphB-Rezeptoren (EphB1-B6) zusammengefasst, die an drei transmembrane Ephrin-B-Proteine (Ephrin-B1-B3) binden. Aufgrund der potentiellen Bindungsmöglichkeiten in der jeweiligen Klasse untereinander existiert eine Vielzahl von Eph/Ephrin Interaktionen. Neuere Studien sprechen für eine bidirektionale Signaltransduktion, bei der die Ephrin-Liganden ebenfalls als Rezeptoren aktivierende Signale vermitteln können (Kullander, K and Klein, R, 2002).

### 1.2.2.2 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter Signalweg mit essentieller Bedeutung für eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, die alle drei Keimblätter des Embryos betreffen (Fortini, ME and Artavanis-Tsakonas, S, 1994, Weinmaster, G, 1997, Greenwald, I, 1998). In Vertebraten wird der Notch-Signalweg in der embryonalen Musterbildung und Entwicklung diskutiert, einschließlich der Neurogenese und der Somitenbildung (Weinmaster, G, 1998, Artavanis-Tsakonas, S *et al.*, 1999). Auf zellulärer Ebene wird über den Notch-Signalweg die asymmetrische Entscheidung des Zellschicksals diktiert (laterale Inhibition) (Muskavitch, MA, 1994) und damit die Bildung von Gewebsgrenzen festgelegt (Irvine, KD, 1999). Über den Notch-Signalweg werden der Zelle Reize zur Proliferation oder Apoptose vermittelt, die das Überleben der Zelle gewährleisten (Lewis, J, 1998, Artavanis-Tsakonas, S *et al.*, 1999). Das humane Notch-System beinhaltet vier transmembrane Rezeptoren, die Notch-Rezeptoren 1 bis 4, und fünf ebenfalls membrangebundene, als DSL (Delta, Serrate, Lag2) zusammengefasste Liganden, Delta-like 1, 3, 4 und Jagged 1, 2 (Nye, JS and Kopan, R, 1995). Die Struktur der Notch-Rezeptoren

setzt sich aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne und einer intrazellulären Signaldomäne zusammen. Beide Domänen sind bei allen Notch-Rezeptoren ähnlich aufgebaut. Die extrazelluläre Domäne besteht aus mehreren EGF-ähnlichen Wiederholungen, während die intrazelluläre Domäne eine RAM-Domäne, Ankyrin-Wiederholungen und eine C-terminale PEST-Domäne umfasst (MacKenzie, F *et al.*, 2004). Für die Aktivierung des Notch-Signalwegs ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt über eine Ligand-Rezeptor Interaktion notwendig (Abb. 1.4).

Durch die Aktivierung wird die Notch-Intrazelluläre Signaldomäne (Notch-ICD) proteolytisch durch die Sekretase Presenilin (Weinmaster, G, 1998, De Strooper, B *et al.*, 1999) abgespalten und wandert von der inneren Zellmembran in den Zellkern. Dort bindet die Notch-ICD an einen Repressor, das *Recombination signal-binding protein 1 for J-kappa* (RBP-J $\kappa$ ), der direkt über die spezifische Sequenz GTGGGA an die DNA bindet und die Transkription der Gene mit diesem Motiv in ihrer Promotorregion blockiert. Die Notch-ICD wirkt als Transaktivator, der durch die Bindung an RBP-J $\kappa$  die Transkription der Zielgene induziert (Weinmaster, 1998; Jarriault, 1995; Lai, 2002; Martinez-Arias *et al.*, 2002).

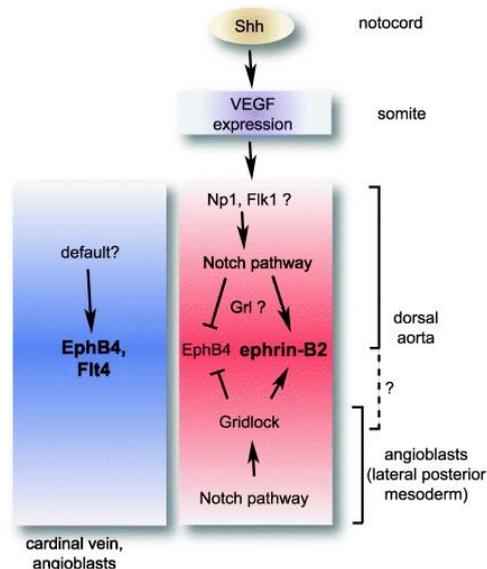


**Abb. 1.4:** Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs

Durch den Zell-Zellkontakt einer „Sender-Zelle“ mit der „Empfänger-Zelle“ kommt es zur Bindung der Notch-Liganden (Delta) an ihre Rezeptoren. Dadurch kommt es zur Aktivierung von intrazellulären Proteasen (z.B.: Presenilin), die die Intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) abspalten. Diese transloziert in den Zellkern und bindet dort an das *Recombination signal-binding protein 1 for J-kappa* (RBP-J $\kappa$ ). Dadurch entsteht ein Transkriptionsfaktorkomplex, der seine Effektorgene aktiviert. (nach Iso, T *et al.*, 2003, modifiziert)

Vieles spricht dafür, dass der Notch-Signalweg sowohl während des angiogenen Umbaus, als auch bei der arteriovenösen Determinierung von Endothelzellen eine Rolle spielt. Die Defekte im vaskulären Umbau, die in transgenen Modellen immer wieder auftreten, können zum einen an einer gestörten Notch-Interaktion von Endothelzellen mit mesenchymalen Zellen oder an einem gestörten Notch-Signaling der Endothelzellen untereinander liegen. Die Embryos mit Mutationen in den Molekülen des Notch-Signaling sterben an Tag 9.5 bis 10.5 (Hrabe de Angelis, M *et al.*, 1997, Xue, Y *et al.*, 1999, Krebs, LT *et al.*, 2000), dem Zeitpunkt in der Entwicklung, an dem die Blutzirkulation einsetzen sollte. Studien im Zebrafisch stellen den Notch-Signalweg als Induktor der frühen genetischen arteriovenösen Differenzierung in den Mittelpunkt (Zhong, TP *et al.*, 2000, Lawson, ND *et al.*, 2001).

In diesen Studien hatte sich gezeigt, dass die Inhibierung von Notch zu arteriovenösen Shunts zwischen der Dorsalaorta und der hinteren Kardinalvene führte, die den Verlust der arteriovenösen Identität der Endothelzellen vermuten ließ. Nach weiteren detaillierten Analysen wird der Notch-Signalweg in der Determinierung des arteriellen Genotyps diskutiert, der daraufhin die Differenzierung dieser Endothelzellen in den venösen Phänotyp unterdrückt. Dem Notch-Signalweg übergeordnet, ist das vom Notochord freigesetzte *Sonic Hedgehog* (Shh), welches über die Induktion des Wachstumsfaktors VEGF-A in den Somiten die arterielle Identität bestimmt (Lawson, ND *et al.*, 2002). Die Mechanismen zur Ausbildung der venösen Identität waren bisher weitestgehend unverstanden.



**Abb. 1.5: Signalwege der arteriovenösen Differenzierung im Zebrafisch**

Dargestellt sind die Signalwege im lateralen Mesoderm und in den großen Blutgefäßen. Vom Notocord freigesetztes Sonic Hedgehog (Shh) induziert in den Somiten die Expression von VEGF. VEGF kann dann über den arteriell exprimierten Co-Rezeptor Neuropilin-1 (Np1) in der Aorta die arterielle Identität regulieren. Die venöse Differenzierung kann von bisher unbekanntem Signalen gesteuert werden oder als vorgegebener Phänotyp durch die Abwesenheit von arteriellen Signalen entstehen (Adams, RH, 2003).

Erste Hinweise, dass der Notch-Signalweg in der Gefäßentwicklung eine Rolle spielt, kamen von Expressionsanalysen zu Notch-1 (del Amo, FF *et al.*, 1993) und Notch-4 (Uyttendaele, H *et al.*, 1996). Der Verlust von Notch-1 oder Notch-1/Notch-4 hatte eine gestörte Reorganisation des vaskulären Gefäßplexus bis hin zu großen Gefäßen und kleinen verzweigten Kapillaren zur Folge und führte unweigerlich zum Tod der Embryos. Der Phänotyp von *knock-out*-Tiere weiterer Notch-Moleküle, Jagged-1 oder die Gamma-Sekretasen PS1 und PS2, waren ebenfalls durch diese Defekte gekennzeichnet (Herreman, A *et al.*, 1999, Xue, Y *et al.*, 1999, Krebs, LT *et al.*, 2000).

Ebenso führen humane Krankheiten, wie CADASIL und das Alagille-Syndrom, zu Defekten in der Vaskulatur, da ihre Ursachen in genetischen Mutationen von Genen des Notch-Signalwegs liegen. Eine Mutation im Notch-3 Gen ist die Ursache für die neurovaskuläre Krankheit CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical and leukoencephalopathy*), in deren Verlauf es zum Verlusts von glatten Muskelzellen im cerebralen arteriellen Gefäßsystem und zu Läsionen kommen kann (Joutel, A *et al.*, 1996). Das Alagille-Syndrom ist eine Krankheit, die die Vaskulatur verschiedener Organe, wie der Leber, dem Herz und den Nieren betrifft. Die Ursache hierfür ist eine Mutation in dem Notch-Ligand Jagged-1.

Notch-Familienmitglieder werden in der frühen Entwicklung des Embryos in der gesamten Vaskulatur exprimiert, während sie später nur noch in arteriellen Gefäßen nachweisbar sind. Besonders deutliche Effekte sind in der Entwicklung des Herzens und in den Gonaden der Maus zu finden. Am Tag 9.5 der embryonalen Entwicklung ist die Expression von Notch-4 in der Kardinalvene nachweisbar (Uyttendaele, H *et al.*, 1996). Die Hohlvene, die sich später aus der Kardinalvene entwickelt, exprimiert dagegen kein Notch-4 mehr, welches ab Tag 13.5 nur noch in den Endothelzellen der Aorta nachweisbar ist (Uyttendaele, H *et al.*, 1996, Villa, N *et al.*, 2001). In den sich entwickelnden männlichen Mausgonaden ist am Tag 11.5 eine arteriovenöse Expression von Notch-1, Notch-4 und Dll-4 zu beobachten, welche sich schon am folgenden Tag nur noch auf die Arterien beschränkt (Brennan, J *et al.*, 2002).

### 1.2.2.3 Die Hey-Gene

Direkte Zielgene im Notch/RBP-J $\kappa$ -Signalweg sind neben den HES-Genen (**H**airy/**E**nhancer of **S**plit), die Familie der Hey-Gene (**H**airy/**E**nhancer of split-related with **Y**RPW motif) (Nakagawa, O *et al.*, 2000, Davis, RL and Turner, DL, 2001), welche die drei Mitglieder Hey-1, Hey-2 und Hey-L umfasst. Synonyme Bezeichnungen der Hey-Familie sind HRT (**H**airy-**R**elated **T**ranscription-Factor), HESR (**H**airy/**E**nhancer of **S**plit-**R**elated), CHF (**C**ardiovascular **B**asic-**L**oop-**H**elix **F**actor), HERP (**H**airy/**E**nhancer of split-related **R**epressor **P**rotein). Nakagawa und Mitarbeiter (Nakagawa, O *et al.*, 2000) konnten erstmals durch *in vitro* Studien mit C3H10T1/2 Zellen zeigen, dass ein murines Hey-2 Promotorkonstrukt durch die Notch1-ICD induziert werden konnte. Die Mitglieder der Hey-Familie sind Transkriptionsfaktoren der basic Helix-Loop-Helix-Klasse. In ihrer Proteinstruktur weisen sie drei funktionale Domänen auf, eine N-terminale bHLH-Domäne, eine Orange-Domäne und eine für Protein-Protein-Interaktionen notwendige YRPW-Domäne am C-Terminus.

Der Unterschied zu den nahe verwandten HES-Genen liegt zum einen in der Substitution eines Prolins zu Glycin in der basischen Domäne, sowie in der C-terminalen Domäne mit dem Wechsel des WRPW-Motivs in ein YRPW-Motiv. Es wird angenommen, dass die Hey-Gene mögliche *downstream* Modulatoren des Notch-Signals im kardiovaskulären System sind und als transkriptionale Repressoren fungieren. Im Yeast Two-Hybrid-System konnte gezeigt werden, dass Hey-1 und Hey-2 mit dem Transkriptionsfaktor ARNT interagieren und dadurch die ARNT-vermittelte Aktivierung des VEGF-Promotors reprimieren (Chin, MT *et al.*, 2000). Die direkte Bindung von Hey an ARNT bewirkt die Dissoziation des ARNT-Komplexes von der DNA. Die bHLH-Region war dabei für die Reprimierung verantwortlich (Chin, MT *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte in der Maus eine negative Autoregulation der durch Notch induzierten Hey-2-Genexpression nachgewiesen werden, die ebenfalls über einen bisher unbekanntem Mechanismus durch die bHLH-Domäne vermittelt wurde (Nakagawa, O *et al.*, 2000). Aber auch das diese Familie kennzeichnende YRPW-Motiv wird als mögliche funktionelle Repressor-Domäne diskutiert. Dieses Motiv ähnelt der WRPW-Region der neuronalen HES-Proteine, die die Interaktion mit Co-Repressoren, wie der *groucho*-Familie, vermittelt (Beatus, P *et al.*, 1999).

Während der Embryogenese werden die Hey-Gene verstärkt im embryonalen Gefäßsystem exprimiert. Ausserdem findet man sie im sich entwickelnden Herzen, in den Schlundbögen und in den Somiten (Nakagawa, O *et al.*, 1999). Ähnlich den Notch-Signalmolekülen weisen

die Hey-Gene ein periodisches, deutlich von anderen Geweben abgegrenztes Expressionsmuster auf.

Das im Zebrafisch entdeckte *gridlock* (Weinstein, BM *et al.*, 1995), wurde von Zhong und Mitarbeitern (Zhong, TP *et al.*, 2000, Zhong, TP *et al.*, 2001) in den Kontext der arteriovenösen Differenzierung gestellt. In der Zebrafiscentwicklung wird dieser putative Notch-Effektor selektiv in der Dorsalaorta exprimiert. Durch eine genetische Mutation in *gridlock* wird die Ausbildung der Aorta massiv gestört (Zhong, TP *et al.*, 2000). Die Expression von *gridlock* ist noch vor der Entwicklung der Blutgefäße in der Region der Angioblastenvorläufer, dem hinteren lateralen Mesoderm nachweisbar. Das murine und humane Homolog zu *gridlock* ist Hey-2. Der *knock-out* des murinen Hey-1 oder Hey-2 allein führte im Unterschied zum Zebrafisch zu keinerlei arteriellen oder sonstigen phänotypischen Defekten (Donovan, J *et al.*, 2002, Gessler, M *et al.*, 2002, Sakata, Y *et al.*, 2002). Erst der Doppel-*knock-out* von Hey-2 und Hey-1 ist durch den vollständigen Verlust großer arterieller Hauptgefäße und damit verbundene massive Blutungen embryonal letal (Chien, KR and Olson, EN, 2002).

Ähnliche Entwicklungsdefekte sind im Jagged-1- und Notch-1-*knock-out* zu beobachten (Adams, RH *et al.*, 1999, Gerety, SS and Anderson, DJ, 2002). Die weitere molekulare Analyse der Notch-Mutanten zeigte, dass die Expression von Hey-1 und Hey-2 im Dottersack stark reduziert war und die restlichen falsch ausgebildeten Gefäße keine arteriellen Marker wie Ephrin-B2 exprimierten (Fischer, A *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu experimentellen Modellen ist die differenzielle Expression in humanen arteriellen und venösen Endothelzellen weniger gut verstanden.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Arterien und Venen sind durch eine distinkte molekulare und funktionelle Identität charakterisiert. Durch den Vergleich des Expressionsmuster arterieller und venöser Endothelzellen aus der humanen Nabelschnur in DNA-Array-Analysen konnten putative Kandidatengene identifiziert werden, welche mit den komplexen molekularen Mechanismen der arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen im Zusammenhang stehen könnten. Durch die gezielte Manipulation der Kandidatengene sollte untersucht werden, ob eine Redifferenzierung arterieller und venöser Endothelzellen möglich ist. Im Rahmen der Promotion sollte die differenzielle Expression von Molekülen des Notch-Signalwegs untersucht, sowie die arteriovenöse Expression von Angiopoietin-2 näher analysiert werden. Dabei sollte untersucht werden, ob Wachstumsfaktoren, biomechanische Parameter, wie die Schubspannung oder der Sauerstoffpartialdruck, die genetischen und funktionellen Eigenschaften humaner arteriellen und venösen Endothelzellen beeinflussen und regulieren können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien in Reinheitsgrad „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Carl Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe), Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München). Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Cell-Tracker Green CMFDA	Molecular Probes, Invitrogen Karlsruhe
Cell-Tracker Orange CMTMR	Molecular Probes, Invitrogen Karlsruhe
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Dextran	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe
Gasgemisch: 95% N <sub>2</sub> / 5% CO <sub>2</sub>	AirLiquid
Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg
Western Lightning Western Blot Chemiluminescence Reagent (Enhanced Luminol)	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

### 2.1.2 Geräte

**Gerät**

Hypoxie-Kammer  
mit Sauerstoffsensor ProOx 110

Fluostar Optima

**Hersteller**

Biospherix, Redfield NY

BMG Labtech, Offenburg

### 2.1.3 Kommerzielle Kits und Assays

**Produkt**

Human Angiopoietin-2 Quantikine ELISA Kit

BCA Protein Assay Reagent Kit

CellTiter-Blue Viability Assay

Dual Luciferase Reporter Assay

JETQUICK Gel Extraction Spin Kit

JETQUICK-Plasmid Purification Kit

peqGOLD TriFast

Taq CORE kit

TOPO XL PCR Cloning Kit

**Hersteller**

R&D Systems, Wiesbaden

Pierce, Rockford, USA

Promega, Mannheim

Promega, Mannheim

Genomed, Löhne

Genomed, Löhne

PeqLab, Erlangen

Qbiogen, Morgan Irvine, CA

Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.4 Allgemeine Lösungen

#### Tris-Acetat-EDTA (50x TAE)

Tris                                2M  
EDTA (pH 8.0)                0,05M  
in dH<sub>2</sub>O

→ *Gebrauchslösung für die Agarose-Gelelektrophorese*

DNA: 1x TAE in dH<sub>2</sub>O

RNA: 1x TAE in DEPC-Wasser

#### 10x Ladepuffer (für Agarosegele)

Glycerin                        5ml  
TE-Puffer \*                    5ml  
Bromphenolblau                Spatelspitze  
Xylencyanol                    Spatelspitze

(\*) für RNA: TE-Puffer mit DEPC-Wasser ansetzen

#### Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer )

Tris-HCl (pH 8.0)                10mM  
Natrium-EDTA                    1mM  
in dH<sub>2</sub>O

#### DEPC-Wasser

1ml DEPC auf 1000ml ddH<sub>2</sub>O

→ autoklaviert

**10x Laufpuffer (SDS-Page)**

Tris	125mM
Glycine	950mM
SDS	0,5%
in dH <sub>2</sub> O	

→ *Gebrauchslösung*

1x Laufpuffer in dH<sub>2</sub>O

**5x Blotpuffer (Western Blot)**

Tris	125mM
Glycine	950mM
SDS	0,05%
in dH <sub>2</sub> O	

→ *Gebrauchslösung* (1l)

200ml 5x Blotpuffer

200ml Methanol

600ml dH<sub>2</sub>O

**10x TBS-T**

Tris-HCl (pH 7,5)	200mM
NaCl	1,5M
Tween 20	1%
in dH <sub>2</sub> O	
pH 7,4	

→ *Gebrauchslösung*

1x TBS-T in dH<sub>2</sub>O

**APS-Lösung (SDS-Gelelektrophorese)**

10% APS in dH<sub>2</sub>O

**SDS-Lösung**

10% SDS in dH<sub>2</sub>O

**PBS-Lösung**

1x Tablette in 500ml dH<sub>2</sub>O

→ autoklaviert

**BSA-Lösung**

0,5% w/v bzw. 1% w/v BSA in PBS

**Protein-Puffer**

Tris-HCl (pH 7,4)	20mM
SDS	1%
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (P8340 Sigma Aldrich)	1:100

**4x Lämmli-Puffer (SDS-Gelelektrophorese)**

SDS	4%
Glycerol	60%
Tris-HCl (pH 6,8)	250mM
Bromphenolblau	0,02%
in dH <sub>2</sub> O	

→ *Gebrauchslösung:*

Zusatz von 400mM DTT

**DTT-Lösung**

1M in dH<sub>2</sub>O

**Blockierungslösung (Immundetektion)**

5% Milchpulver in 1x TBS-T

## 2.1.5 Zellkultur

### 2.1.5.1 Zellkultur-Produkte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
boviner Wachstumsfaktor → aus der Retina von Kälberaugen	eigene Präparation
Collagenase Type II	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
DMEM high Glucose (4,5g/l) mit L-Glutamin mit Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories, Pasching
Dulbeccos phosphate buffered saline (PBS)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Endothelial Cell Basal Medium	Promocell, Heidelberg
Endothelial Cell Basal Medium MV-2	Promocell, Heidelberg
Endothelmedium ohne L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
fötale Kälberserum (FCS) → Hitze-inaktiviert	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Fungizone (Amphotericin B, 250µg/ml)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine (porcine skin)	Fluka, Sigma-Aldrich, München
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	PAA Laboratories, Pasching
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
M199 (Pulver) mit Earle's Salze and L-Glutamin ohne $\text{NaHCO}_3^-$	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 (1x) mit HEPES mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Transfectin Lipid Reagent	Biorad, München
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.5.2 Wachstumsfaktoren

Alle Wachstumsfaktoren wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen.

<b>Wachstumsfaktor</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
rh VEGF-A <sub>165</sub>	50ng/ml
IGF-1	20ng/ml
PDGF-BB	10ng/ml
human EGF-1	0,1ng/ml
bFGF-2	1ng/ml

### 2.1.5.3 Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden von der Firma Calbiochem (Merck, Darmstadt) bezogen.

<b>Inhibitor</b>	<b>Stammlösung in DMSO</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
Gamma-Sekretase Inhibitor X	1mM	50-2000nM
VEGF-Receptor 2 Kinase Inhibitor III (SU5416)	10mM	5µM

#### **2.1.5.4 Zellkultur-Lösungen**

##### **Collagenase-Lösung**

1% w/v Collagenase Type II in PBS-Lösung

→ steril filtriert

##### **Gelatine-Lösung**

2% w/v Gelatine in dH<sub>2</sub>O

→ autoklaviert

→Zusatz von: 100U/ml Penicillin/Streptomycin

2,5µg/ml Fungizone

##### **L-Glutamin**

100mM L-Glutamin in PBS-Lösung

##### **M199-Medium**

9,3g M199-Pulver

2,2g NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

in dH<sub>2</sub>O

→ steril filtriert

### 2.1.5.5 Kultur- und Stimulationsmedien

<b>Basalmedium</b>	<b>Zusätze</b>	<b>Anwendung</b>
(1) M199-Medium	200U/ml Penicillin/Streptomycin 5µg/ml Fungizone	Nabelschnurpuffer
(2) M199-Medium + FCS	10% FCS 100U/ml Penicillin/Streptomycin 2,5µg/ml Fungizone	frisch präparierte Endothelzellen
(3) M199-Medium + FCS + WF	10% FCS 1% boviner Wachstumsfaktor 100U/ml Penicillin/Streptomycin 2,5µg/ml Fungizone	HUAEC, HUVEC
(4) M199-Medium ohne NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	10% FCS 1% boviner Wachstumsfaktor 100U/ml Penicillin/Streptomycin 2,5µg/ml Fungizone 25mM HEPES	Zeitrafferaufnahmen HUAEC, HUVEC
Endothelmedium	1mM L-Glutamin	Stimulationsmedium
Endothelial Cell Basal Medium (EBM)	<u>Supplementpack C-39210:</u> ECGS/H 0.4% Fetal Calf Serum 2% Epidermal Growth Factor 0,1ng/ml Hydrocortison 1µg/ml basic Fibroblast Factor 1ng/ml	Stimulationsmedium
Endothelial Cell Basal Medium MV-2	<u>Supplementpack C-39221:</u> FCS 5% Epidermal Growth Factor 5,0ng/ml Hydrocortison 0,2µg/ml Vascular Endothelial Growth Factor 5,0ng/ml basic Fibroblast Factor 10ng/ml R3 IGF-1 20ng/ml Ascorbic Acid 1µg/ml	HMEC-1
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	10% FCS 100U/ml Penicillin/Streptomycin 2,5µg/ml Fungizone	HEK293
RPMI 1640 (1x)	10% FCS 100U/ml Penicillin/Streptomycin 2,5µg/ml Fungizone	THP-1 Stimulationsmedium

## 2.1.6 Bakterienkultur

### 2.1.6.1 Verwendete Bakterienstämme

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Hersteller</b>
Subcloning Efficiency DH5 Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe
Library Efficiency DH5 $\alpha$ . Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.6.2 Bakterienkultur-Produkte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agar	Lab M, Bury, UK
LB-Broth	Lab M, Bury, UK

### 2.1.6.3 Bakterienkultur-Lösungen

#### **Ampicillin-Stammlösung**

100mg/ml Ampicillin in dH<sub>2</sub>O

→ steril filtrieren; Lagerung der Aliquots bei -20°C

> *Endkonzentration: 100 $\mu$ g/ml*

#### **Kanamycin-Stammlösung**

50mg/ml Kanamycin in dH<sub>2</sub>O

→ steril filtrieren; Lagerung der Aliquots bei -20°C

> *Endkonzentration: 50 $\mu$ g/ml*

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellkulturen**

Für die Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellkulturen wurde das Reagenz peqGOLD TriFast nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und direkt auf der Zellkulturschale mit 1ml/60mm Kulturschale peqGOLD TriFast lysiert. Die isolierte RNA wurde in 50µl DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration und Qualität photometrisch über Absorptionsmessung bestimmt.

#### **2.2.1.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Die Konzentration von RNA und DNA erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260nm und 280nm im Photometer. Das Verhältnis 260/280 ist der Reinheitskoeffizient und gibt über die Verunreinigung mit Proteinen Aufschluss. Er sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (Ausubel, FM, 1987, Sambrook, J and Russell, DW, 2001).

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mit Hilfe folgender Koeffizienten bestimmt:

1x A260-Einheit = 50µg/ml doppelsträngige DNA

1x A260-Einheit = 40µg/ml RNA

### 2.2.1.3 Reverse Transkription

Für die weiteren Analysen wurde die RNA durch reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion umfasste zwei Teilschritte, bei denen zunächst die RNA mit Random Primern (Invitrogen) inkubiert wurde, und im zweiten Schritt die eigentliche reverse Transkription (Superscript II RNase H-reverse transcriptase, Invitrogen) der RNA in cDNA erfolgte. Es wurden je Reaktionsansatz 500ng Gesamt-RNA eingesetzt.

<b>1. Reaktionsansatz</b>	<b>15µl</b>
RNA (100ng/µl)	5µl
Random-Primer (30ng/µl)	4µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	6µl

Der Ansatz wurde bei 72°C für 3min inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 10µl des 2. Reaktionsansatzes.

<b>2. Reaktionsansatz</b>	<b>10µl</b>
5x RT-Puffer	5µl
dNTPs (10mM)	1,25µl
DTT (1mM)	12,5µl
RNase Out Inhibitor	0,5µl
Super Script II	0,25µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,5µl

Der Ansatz wurde bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte zur Inaktivierung der reversen Transkriptase eine Inkubation bei 95°C für 1min, bevor der Ansatz abschließend auf 4°C abgekühlt wurde.

### 2.2.1.4 Standard-PCR

Für den Nachweis von Zielgenen wurde jeweils 20ng cDNA in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die verwendeten humanspezifischen Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Die benötigten Enzyme und Reagenzien wurden von der Firma Qbiogen (Heidelberg) bezogen.

<b>PCR-Ansatz</b>	<b>25µl</b>
10x Taq Puffer	2,5µl
dNTP (100µM)	5,0µl
sense Primer (10pmol)	0,5µl
antisense Primer (10pmol)	0,5µl
Taq DNA-Polymerase (5U/µl)	0,3µl
ddH <sub>2</sub> O	14,2µl
cDNA (10ng/µl)	2,0µl

<b>PCR-Standardprogramm</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklenzahl</b>
initiale Denaturierung	95°C	1min	1x
Denaturierung	95°C	30sec	} nx <sup>(b)</sup>
Annealing	X°C <sup>(a)</sup>	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
finale Elongation	72°C	1min	1x

(a) Die spezifische Annealing-Temperatur ist abhängig von den Primern.

(b) Die Zyklenzahl ist abhängig vom Zelltyp.

Zur Analyse der PCR wurden 20µl der PCR-Probe mit 2µl 10x Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente konnte über einen gleichzeitig aufgetragenen Größenmarker bestimmt werden. Die Intensität der amplifizierten genspezifischen Fragmente wurde mit der Software AIDA ermittelt und verglichen.

Tab. 1: Genspezifische Primersequenzen

<b>Gen</b>	<b>Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')</b>	
Angiopoietin-2	sense	tggcagcgttgatttcagag
	antisense	cgttgtctccatcctttgtgc
VEGF-A	sense	cttgccttgctgcttacctc
	antisense	ggcacacaggatggcttga
VEGF-R2	sense	catgtggtctctctggttgg
	antisense	ctggtcacgtggaaggagat
CD44s	sense	catctaccccagcaacceta
	antisense	tgctccaccttcttgactcc
eNOS	sense	ggaacctgtgtgaccctc
	antisense	ccacgtcatactcatccat
COUP-TFII	sense	cctcaaggccatagtctgt
	antisense	atatcccggatgagggttc
Delta-like 4 (Dll-4)	sense	actcttaccgggtcatctgc
	antisense	agtacattgccaggagtg
Notch 4	sense	acacctacacctgcctctgc
	antisense	tggcagcaatacagtcaccc
Hey-2	sense	aagatgcttcaggcaacagg
	antisense	acaaggggtgactctgagg
Hey-1	sense	atthtggccagaaaagacg
	antisense	cgcgtcaaagtaaccttcc
18S rRNA	sense	gttgggtggagcgatttgtctgg
	antisense	agggcagggacttaataacc
GAPDH	sense	catcaccatcttcaggagcg
	antisense	tgaccttggcccacagccttg

### 2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren (DNA und RNA) können entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Der dem Gel zugesetzt Farbstoff Ethidiumbromid ermöglichte die Auswertung der aufgetrennten Nukleinsäuren unter UV-Licht.

Für ein 1%iges Agarosegel wurde Agarose in 100ml 1x TAE Puffer aufgeköcht. Hatte sich die Lösung auf 60°C abgekühlt, wurde 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml) dazugegeben und der Ansatz wurde in eine Gelkammer gegossen. Die zu untersuchende Probe wurde mit 10x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der DNA bzw. RNA in einer Standard-Elektrophorese-Apparatur erfolgte bei 8-10 V/cm und wurde anschließend mit einem CCD-Kamera-gestützten Geldokumentationssystem dokumentiert.

### 2.2.1.6 Extraktion von Proteinen aus Zellen

Für die Extraktion von Proteinen aus eukaryotischen Zellkulturen wurde das Reagenz peqGOLD TriFast nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und direkt auf der Zellkulturschale mit 1ml/60mm Kulturschale peqGOLD TriFast lysiert. Die isolierten Proteine wurden in 100µl 1% SDS / Proteinpuffer 1:100 gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit dem kommerziell erhältlichen *BCA Protein Assay Reagent Kit* (Pierce) bestimmt.

### 2.2.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Dazu wurden die Proteinproben jeweils mit 4x Lämmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 6min denaturiert und auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli werden die Proteine zunächst im Sammelgel (4,5%, pH 6,8) konzentriert, bevor sie im Trenngel (7,5%-10%, pH 8,8) bei 110V separiert werden. Die Gelelektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 4°C durchgeführt.

### 2.2.1.8 Western Blot

Die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Größe separierten Proteine wurden für weitere Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die so immobilisierten Proteine konnten anschließend über Immundetektion nachgewiesen werden.

Es wurde das „Wet Blot“-Verfahren benutzt, bei dem die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf die Membran (Protran BA83, Whatman) transferiert werden. Der Proteintransfer erfolgte bei 100mA pro Gel für 1,5 Stunden bei 4°C.

Die so auf einer Membran immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dabei wurde ein für das zu untersuchende Protein spezifischer, primärer Antikörper mit einem sekundären Antikörper detektiert. Der sekundäre Antikörper wurde über die konjugierte Meerrettich Peroxidase nachgewiesen.

Die Membran wurde für eine Stunde in Blockierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 2). Die Membran wurde drei Mal für je 10min bei Raumtemperatur mit 1x TBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 1x TBS-T für je 10min bei Raumtemperatur wurde die Aktivität der Peroxidase mit dem Western-Lightning-Chemilumineszenz-Reagenz detektiert.

Tab. 2: *Verwendete Antikörper für die Immundetektion*

<b>primärer Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung (in Blockierungslösung)</b>
rabbit anti-human Hey-2 (polyklonal)	Bereich Gefäßendothel Mikrozirkulation	1 : 2.500
mouse anti-human COUP-TF II (monoklonal)	R&D Systems	1 : 1.000
mouse anti- $\beta$ -Actin (monoklonal)	Sigma	1 : 30.000
<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung (in Blockierungslösung)</b>
goat anti-rabbit HRP	Zymed	1 : 5.000
rabbit anti-mouse HRP	Zymed	1 : 5.000

### 2.2.1.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmid-Vektoren wurde das TOPO XL PCR Cloning Kit verwendet. Die Vektor-Konstrukte wurden anschließend in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert und positive Kolonien durch Antibiotikaselektion identifiziert.

Die weitere Klonierung der DNA-Fragmente in Expressionsvektoren wurde nach Standardmethoden (Sambrook, J and Russell, DW, 2001) mit Enzymen und Lösungen der Firma *Promega* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Klonierungsschritte umfassten unter anderem die Manipulation von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen, Ligation, Phosphatase-Behandlung der Vektorenden und die Generierung von glatten Enden mit dem Klenow-Fragment.

Fragmente des Angiopoietin-2-Promotors wurden teilweise mit Hilfe von PCR kloniert. Die humanspezifischen Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: *Angiopoietin-2 Promotor: Klonierungsprimer*

<b>Klonierungsprimer</b>	<b>Oligonukleotid-Sequenz (5'-3')</b>
angpt2 Klon 2	ctcttcccgggatgagatccttcaga
angpt2 Klon 5	tagcctggtcgacagagcg
angpt2 Klon 10	ctgcacgctgccatggctggg
angpt2 Klon 11	gatcctcgagtgtcagtatccg

### 2.2.1.10 DNA-Plasmid Mini/Midi-Präparation

Für die Plasmid-Präparation aus Bakterien wurden das Säulensystem „JETQUICK“ (*GENOMED*) verwendet.

Die auf Selektionsplatten nach der Transformation gewachsenen Kolonien wurden isoliert und in 3ml Selektionsmedium überführt. Die Bakterien wurden bei 37°C im Schüttler (225rpm) über Nacht (ÜN-Kultur) inkubiert.

Für eine Plasmid-Minipräparation wurden 1,5ml der ÜN-Kultur genutzt und nach dem Protokoll des Herstellers weiter bearbeitet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde abschließend mit 75µl dH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und über einen qualitativen Restriktionsverdau analysiert.

Die verbliebenen 1,5ml der ÜN-Kultur wurden in 50ml Selektionsmedium überführt und für eine Plasmid-Midipräparation bei 37°C im Schüttler (225rpm) über Nacht angezogen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5000 x g, 5min) pelletiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der Plasmid-DNA erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde abschließend mit 5ml E6 von der Säule eluiert, mit 3,5ml Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde leicht angetrocknet und in 50µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.2).

### 2.2.1.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Die in einem Agarose-Gel aufgetrennten DNA-Fragmente konnten für die weiteren Klonierungen ausgeschnitten und gereinigt werden. Dafür wurde der „Gel Extraktion Kit“ (*GENOMED*) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

## 2.2.2 Zellkultur-Methoden

### 2.2.2.1 Präparation und Kultivierung

Tab. 4: Verwendete Zellkulturen

Zellart	Beschreibung	Kulturmedium
HUAEC	humane arterielle Endothelzellen aus der Nabelschnur → eigene Präparation	(3) M199
HUVEC	humane venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur → eigene Präparation	(3) M199
HMEC-1	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen → immortalisiert Zelllinie	Endothelial Cell Basal Medium MV-2
THP-1	monocytäre Zelllinie	RPMI 1640 (1x)
HEK293	humane embryonale Nierenzellen → mit Adenovirus 5 transformierte Zelllinie	DMEM high Glucose (4,5g/l)

### **2.2.2.1.1 Präparation und Kultivierung primärer Endothelzellen aus Venen und Arterien der Nabelschnur**

Venöse und arterielle humane Endothelzellen wurden aus der Nabelschnur präpariert (Jaffe, EA *et al.*, 1973). Die Nabelschnur wurde direkt nach der Entbindung in (1) M199 überführt und bei 4°C gelagert. Die Präparation unter sterilen Bedingungen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die dabei benötigten Lösungen und Medien wurden auf 37°C temperiert.

Der Zugang für die Nabelschnurgefäße wurde durch Knopfkanülen ermöglicht, welche an beiden Enden eingeführt wurden. Zunächst wurden Blutrückstände in den Nabelschnurgefäßen durch mehrmaliges Spülen der Nabelschnur mit PBS entfernt. Das Gefäßlumen wurde anschließend vollständig mit 0,5% Collagenase Typ II-Lösung gefüllt, die beide Enden der Nabelschnur mit Klemmen verschlossen und in einem mit Wasser befüllten Becherglas bei 37°C für 12min inkubiert. Von einem Nabelschnurende wurde die Klemme entfernt und die abgelösten Zellen durch leichtes Massieren der Nabelschnur in ein 50ml Röhrchen überführt. Die Ausbeute an Zellen konnte durch nochmaliges Spülen mit (1) M199 erhöht werden. Wenn möglich, wurden die Zellen aus mehreren Nabelschnüren vereinigt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1000xg, 6min) pelletiert, in (2) M199 aufgenommen und in mit 2% Gelatine beschichteten 60mm Zellkulturschalen ausgesät. Es besteht die Möglichkeit, die Zellen aus mehreren Nabelschnüren zu vereinigen.

Die Endothelzellen wurden im Brutschrank bei 37°C mit einer wasserdampfgesättigten CO<sub>2</sub> Atmosphäre (5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Nach 12 Stunden wurde das Medium entfernt und durch (3) M199 ersetzt. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden erneuert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen passagiert (siehe 2.2.2.2).

#### **2.2.2.1.2 Kultivierung von *human embryonic kidney cells* (HEK293)**

Die Zelllinie HEK293 wurde als adhärenente Monolayer-Kultur mit DMEM high Glucose (4,5g/l)-Medium im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Mit Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Für das Passagieren von HEK293-Zellen war Trypsin nicht notwendig, da sich die Zellen schon durch leichtes Klopfen an die Kulturschale ablösten. Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden erneuert.

#### **2.2.2.1.3 Kultivierung von *human dermal microvascular endothelial cells* (HMEC-1)**

Die Zelllinie HMEC-1 (Ades, EW *et al.*, 1992) wurde als adhärenente Monolayer-Kultur mit Endothelial Basal Medium MV-2 Medium im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Mit Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert (siehe 2.2.2.2). Das Kulturmedium wurde alle 48 Stunden erneuert.

#### **2.2.2.1.4 Kultivierung von THP-1 Zellen**

Die monozytäre Zelllinie THP-1 ist eine Suspensionskultur, welche in RPMI 1640 (1x)-Medium im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert wurde. Die Suspensionskultur wurde in Zellkulturflaschen gezüchtet.

#### **2.2.2.2 Passagieren von adhärenenten Zellkulturen**

Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen mit HBSS gewaschen. Anschließend wurden 750µl/60mm Kulturschale oder Zellkulturflasche Trypsin/EDTA (1x) auf die Zellen pipettiert und bei 37°C inkubiert. Begannen die Zellen sich abzulösen, wurde (1) M199 zugegeben, die Zellkulturschale wurde mehrmals mit der Zellsuspension gespült und in Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (1000xg, 6min, RT) wurde das Zellpellet in das entsprechende Kulturmedium aufgenommen und auf Zellkulturschalen verteilt.

### 2.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10µl einer entsprechend verdünnten Zellsuspension auf die Kammer pipettiert, und unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Mit Hilfe der folgenden Formel kann die Gesamtzellzahl ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{GZ}{4} \times \text{VF} \times 10.000$$

GZ: Anzahl der Zellen in vier Großquadraten

VF: Verdünnungsfaktor

### 2.2.2.4 Quervernetzte Gelatine

Für die Analyse durch Immunfluoreszenz wurden Zellen auf quervernetzter Gelatine kultiviert. Dazu wurden die Platten mit 0,5% Gelatine (in PBS) beschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Gelatine abgenommen und die Platten mit 2% Glutaraldehyd (in dH<sub>2</sub>O) 15min bei 37°C inkubiert. Das Glutaraldehyd wurde entfernt und die Platten anschließend mit 70% Ethanol für 30min bei RT inkubiert. Danach werden die Platten gründlich mindestens fünfmal mit PBS gewaschen. Die Platten können bis zur Verwendung mit PBS überschichtet bei 4°C gelagert werden.

### 2.2.2.5 Fixierung von Zellen

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde vorsichtig eiskaltes Methanol pipettiert und anschließend für 30min bei -20°C inkubiert. Es ist möglich, die Zellen in Methanol bei -20°C bis zur weiteren Verwendung zu lagern. Die Rehydrierung der Zellen erfolgte mit 37°C warmen PBS für 10min bei 37°C.

### 2.2.2.6 Markierung von Zellen mit Vitalfarbstoffen

Adhärente Zellen wurden direkt auf der Zellkulturschale, Flüssigkulturen direkt in der Suspension gefärbt. Bei der Markierung von Suspensionskulturen schloss sich an jeden Wasch- oder Färbeschritt eine Zentrifugation an (1000xg, 5min).

Die Zellen wurden gewaschen und für 25min in Färbelösung (Kulturmedium mit 5 $\mu$ M Cell-Tracker) im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Färbelösung wurde abgenommen und die Zellen wurden für weitere 25min in dem Kulturmedium im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Danach konnten die Zellen mikroskopisch untersucht oder für weitere Versuche umgesetzt werden.

### 2.2.2.7 Transfektion von humanen Endothelzellen

Fremd-DNA wurde über Lipofektion in Endothelzellen eingeschleust. Es handelte sich hierbei um eine transiente Transfektion.

Die Endothelzellen waren am Versuchstag 70%-80% konfluent. Sie wurden vor der Transfektion gewaschen und mit frischem Medium supplementiert.

Für den Transfektionsansatz (siehe Tab. 5), wurden die zu transfizierenden DNA und das Lipid zunächst separat in OptiMEM angesetzt, gemischt und 20min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf die Zellen pipettiert. Das Verhältnis DNA ( $\mu$ g) zu Lipid ( $\mu$ l) betrug 4:1.

Tab. 5: Transfektionsansatz

<b>Kulturschale</b>	<b>DNA [<math>\mu</math>g]</b>	<b>Lipid [<math>\mu</math>l]</b>	<b>OptiMEM [<math>\mu</math>l]</b>
24-well (2cm <sup>2</sup> )	2	0,5	100
60mm (28cm <sup>2</sup> )	10	2,5	1000

### 2.2.2.8 Dual-Luciferase Reporter Assay

Der Dual-Luciferase Reporter Assay ist eine Methode zur Promotor-Reporter-Gen-Analyse. Hierbei besteht die Möglichkeit, zwei verschiedene Reporter gleichzeitig zu exprimieren und zu vermessen. Bei den Reportern handelte es sich um zwei verschiedene Luziferasen, die Firefly- und die Renilla-Luziferase. Da beide Enzyme ein unterschiedliches Substratspektrum haben, können sie in getrennten Reaktionen untersucht werden. Das System selbst eignet sich besonders für Promotorstudien. Der zu untersuchende Promotor wird dabei vor die Firefly-Luziferase kloniert, während die Renilla-Luziferase durch einen konstitutiv aktiven CMV-Promotor kontrolliert wird und somit als interner Abgleich für die Transfektionseffizienz dient.

Die transfizierten Zellen wurden direkt auf der Kulturschale in 1x Passive Lyse Puffer (PLB, im Kit enthalten) lysiert (100µl/24-well, 1ml/60mm). Für eine effiziente Zellyse wurde der Ansatz für 15min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Messung wurden 20µl des Zellysats eingesetzt.

Die Vermessung der Aktivität beider Luziferasen erfolgte in zwei nacheinander ablaufenden Reaktionen. Zuerst wurde die Aktivität der Firefly-Luziferase durch Zugabe des „*Luciferase Assay Reagent II*“ (LARII) bestimmt. Anschließend wurde durch die Zugabe des „*Stop and Glow*“-Reagenz die erste Reaktion abgestoppt und die Aktivität der Renilla-Luziferase gemessen. Von den Reagenzien wurden jeweils 70µl automatisch durch die Mikroinjektoren des Fluostar Optima zu dem Zellysat pipettiert. Jede Reaktion wurde über 12sec lang verfolgt.

### 2.2.2.9 Netzwerkbildung

Die Matrigel-Versuche wurden auf 24-*well*-Kulturplatten durchgeführt. Pro *well* einer 24-*well*-Platte wurde 400µl Matrigel eingesetzt. Das Matrigel wurde über Nacht bei 4°C verflüssigt, auf die Platte pipettiert und für 30min bei 37°C geliert.

Am Versuchstag wurden die Zellen mit Vitalfarbstoffen markiert (siehe 2.2.2.6), bevor sie auf Matrigel-beschichtete Zellkulturplatten umgesetzt wurden. Dazu wurden die markierten Zellen von der Platte mit Trypsin/EDTA (siehe 2.2.2.2) abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet im Versuchsmedium aufgenommen, die erforderliche Zellzahl auf die Matrigel-beschichteten Platten ausgesät und im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter dem Durchlicht- bzw. Fluoreszenzmikroskop.

Für Zeitrafferaufnahmen wurden die Zellen in (4) M199 ausgesät, da die Kammer des Mikroskops über keine CO<sub>2</sub>-Begasung verfügt.

### 2.2.2.10 Monocyten-Adhäsionsversuche

Primäre Endothelzellen wurden in 24-*well*-Kulturplatten umgesetzt und bis zur Konfluenz in (3) M199 kultiviert. Am Versuchstag wurden die Endothelzellen gewaschen und mit RPMI-Medium versetzt. Die monozytären THP-1 Zellen wurden mit dem Vitalfarbstoff Cell-Tracker green CMFDA gefärbt, ausgezählt und in einer definierten Zellzahl von 100.000 Zellen auf die Endothelzellen gegeben. Anschließend wurde die Fluoreszenz (485nm/520nm) der THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 0 gemessen. Nach einer Inkubation von 15min im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), wurden nicht-adhärenente THP-1 Zellen durch dreimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die Fluoreszenz (485nm/520nm) der adhärenenten THP-1 Zellen gemessen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Endothelzellen ohne THP-1 Zugabe. Das Verhältnis der Fluoreszenz vor und nach dem Waschen gibt Aufschluss über den Grad der adhärenenten THP-1 Zellen und dient als Vergleichswert zwischen den einzelnen Versuchsreihen.

$$(F_0/F_{15\text{min}}) * 100 = \text{Grad der Adhäsion [\%]}$$

F<sub>0</sub> - Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0

F<sub>15min</sub> - Fluoreszenz nach 15min Inkubation und Waschschrift

### 2.2.2.11 Bestimmung der Proliferationsrate von Endothelzellen

Die Proliferation von Endothelzellen wurde über die Zunahme einer eingangs bestimmten Zellzahl in einem festgelegten Zeitraum ermittelt. Somit konnte der *population doubling level* (PDL, *Generationszahl*) und die *population doubling time* (PDT, *Verdopplungszeit*) errechnet werden. Mit beiden Rechengrößen ist ein Vergleich der Proliferation zwischen verschiedenen Zelltypen möglich.

Basierend auf einer fluorometrischen Methode (CellTiter-Blue Viability Assay) wurde die metabolische Kapazität der Zellen bestimmt und mit der Zellzahl korreliert. Dabei wird ein zu den Zellen pipettierter Farbstoff (Resazurin) von den lebenden Zellen zu Resurofin reduziert. Der Komplex kann fluorometrisch detektiert werden. Die Zellzahl wird über eine vorher ermittelte Standardreihe berechnet, die sich durch Korrelation einer definierten Zellzahl mit dem durch sie erzeugte Fluoreszenzsignals ergibt.

Um der Proliferation der Endothelzellen zu kalkulieren, wurden folgende Annahmen getroffen (Mall, JW, 2003). Die Endothelzellen vermehren sich durch exponentielles Wachstum. Ausgehend von einer einfachen Teilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen, ergeben sich aus einer Ausgangszellzahl von  $N_0$  Zellen nach  $n$  Teilungen  $N$  Zellen. Mathematisch ergibt sich daraus:

$$N = N_0 * 2^n.$$

Hieraus folgt nach Umformung:

$$\lg N = \lg N_0 + n * \lg 2.$$

Die Generationszeit (PDL) berechnet sich demnach als

$$n = \text{PDL} = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2.$$

Die für einen Teilungszyklus benötigte Verdopplungszeit (PDT) berechnet sich als:

$$\text{PDT [h]} = t [\text{h}] / \text{PDL}.$$

Hierbei ist  $t$  die Zeitdauer zwischen den Messungen der Ausgangszellzahl  $N_0$  und der Endzellzahl  $N$ .

Die Zellen wurden am Versuchstag in einer definierten Zellzahl auf 24-*well*-Kulturplatten in EBM-Medium umgesetzt. In einer Zeitreihe wurde jeweils nach 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden 100µl Cell Titer-Blue Reagenz zu den Zellen pipettiert und der Ansatz für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz (560/590nm) gemessen. Der nach 6 Stunden gemessene Wert stellt die Ausgangszellzahl  $N_0$  mit der Annahme dar, dass sich die Zellen in diesem kurzen Zeitraum noch nicht geteilt haben.

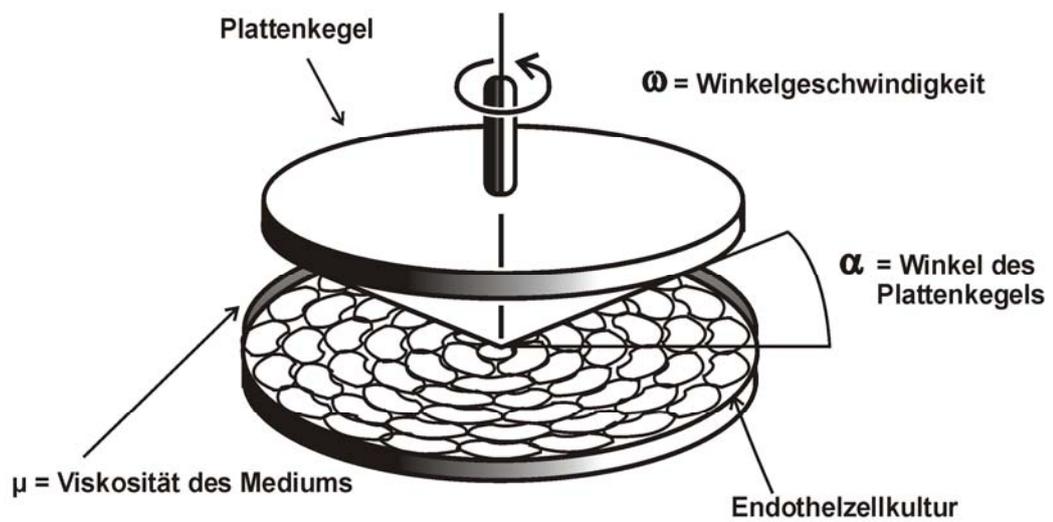
### 2.2.2.12 Applikation laminarer Schubspannung

Die durch den Blutstrom erzeugte Schubspannung wurde in einem Plattenkegelviskosimeter (Abb. 2.1) simuliert. Komponenten des Plattenkegelviskosimeter sind die gummierte Petrischalenhalterung, der absenkbarer Kegel mit Justierung, eine Motor-Getriebe-Kombination sowie eine Steuereinrichtung zur stufenlosen Einstellung der Umdrehungsgeschwindigkeit. Der Kegel aus Polycarbonat hat einen Durchmesser von 50mm und einen Öffnungswinkel von  $0,5^\circ$ . Der Kegel wird mit definierter Winkelgeschwindigkeit über der Zellkulturschale gedreht, wodurch das Medium in Bewegung versetzt wird und dadurch Schubspannung auf die Zellen ausgeübt. Diese Kraft hängt in diesem Modell von der Viskosität des Mediums, dem Winkel  $\alpha$  des Plattenkegels sowie der Winkelgeschwindigkeit ab. Durch eine Veränderung der Winkelgeschwindigkeit kann die applizierte Schubspannung variiert werden. Die Viskosität des verwendeten Mediums wurde experimentell ermittelt. Die Zugabe des biologisch inerten Dextran führt zur Erhöhung der Viskosität und erlaubt damit die Erzeugung höherer Schubspannungswerte. Endothelzellen wurden auf 2% Gelatine-beschichtete 60mm Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium versehen, dem je nach applizierter Schubspannung 5% Dextran zugesetzt wurde. Die Zugabe von Dextran war bei hohen Schubspannungswerten ( $30\text{dyn/cm}^2$ ) notwendig, um den starken Fliehkräften entgegen zu wirken. Für niedrige Schubspannungswerte ( $1\text{dyn/cm}^2$ ) war die Zugabe von Dextran nicht nötig. Die stationären Kontrollen wurden jeweils mit demselben Medium behandelt. Die Kulturschale wurde in das Plattenkegelviskosimeter eingesetzt, der Kegel abgesenkt und an der Apparatur die für die Schubspannung entsprechende Winkelgeschwindigkeit eingestellt. Am Ende der Versuchsdauer wurden die Zellen für die Analyse von RNA- und Proteinexpression zweimal mit PBS gewaschen (Dextran-Entfernung), und in 1 ml peqGold Trifast Reagenz lysiert.

(A)



(B)

Schubspannung ("shear stress")  $\tau$ :

$$\tau = \frac{\mu\omega}{\alpha}$$

**Abb. 2.1.: Plattenkegelviskosimeter**

(A) Plattenkegelviskosimeter

(B) Schematische Darstellung des Plattenkegelviskosimeters mit Angabe der veränderbaren physikalischen Parameter, welche die Schubspannung  $\tau$  beeinflussen.

### **2.2.2.13 Hypoxie**

Hypoxische Bedingungen im Gefäßsystem wurden in einer Hypoxie-Kammer simuliert. Die Kammer bestand aus einem Plexiglasgehäuse, welches einen Abschluss gegenüber der Außenatmosphäre gewährleistete. Der in die Kammer integrierte Sauerstoffsensor (ProOx 110) war an eine Gasregelungseinheit angeschlossen. Wurde der eingestellte Sauerstoffgehalt innerhalb der Kammer überschritten, so wurde über eine Begasung mit einem Gemisch aus 95% N<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> der Sollwert wieder hergestellt. Die Kammer selber wurde in einen Brutschrank bei 37°C gestellt.

Am Versuchstag wurden konfluente Endothelzellen mit HBSS gewaschen, mit frischen (3) M199-Medium versehen und in die Hypoxie-Kammer gestellt. Die normoxische Kontrolle wurde im Brutschrank inkubiert. Am Ende des Versuches wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in peqGold Trifast Reagenz lysiert.

### **2.2.2.14 Stimulation humaner Endothelzellen mit Wachstumsfaktoren**

Die für die Stimulationsversuche verwendeten Wachstumsfaktoren sind unter 2.1.5.2 aufgeführt. Vor dem Stimulationsversuch wurden konfluente Endothelzellen 16 Stunden in Endothelmedium kultiviert. Das Endothelmedium ist Serum-frei und enthält keine weiteren Wachstumsfaktoren. Am Versuchstag wurde das Medium erneut gewechselt, bevor 30min später der Wachstumsfaktor dazu gegeben wurde. Für die Zugabe des Wachstumsfaktors wurden 200µl Kulturmedium abgenommen, mit dem Wachstumsfaktor versetzt und auf die Zellen zurück pipettiert. Nach 24 Stunden wurde für die Analyse von in das Medium sezernierten Substanzen 1ml Kulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in peqGOLD TriFast Reagenz lysiert, um Analysen auf mRNA- und Proteinebene durchzuführen.

### **2.2.2.15 Behandlung von humanen Endothelzellen mit Inhibitoren**

Für die Inhibitorstudien wurden die unter 2.1.5.3 aufgeführten Inhibitoren eingesetzt.

Für die Inhibition des Notch-Signalwegs wurde der Gamma-Sekretase-Inhibitor X verwendet. Am Versuchstag wurden konfluente Endothelzellen mit HBSS gewaschen und mit frischen (3) M199 versehen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30min nach dem Mediumwechsel. Es wurden dafür 200µl Kulturmedium abgenommen, der Inhibitor wurde dazu gegeben und der Ansatz auf die Zellen zurück pipettiert. Die Kontrollen wurden mit dem gleichen Volumen DMSO behandelt, um einen Einfluss des Lösungsdurch auszuschließen. Am jeweiligen Versuchszeitpunkt wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in peqGOLD TriFast Reagenz lysiert, um für weitere Analysen Gesamt-RNA und Protein zu isolieren.

Die Inhibition des VEGF-Signalweges erfolgte mit dem VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor III (SU5416). Konfluente Endothelzellen wurden mit HBSS gewaschen und in Endothelmedium für 16 Stunden kultiviert. Das Endothelmedium ist Serum-frei und enthält keine weiteren Wachstumsfaktoren. Am Versuchstag wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30min nach dem Mediumwechsel, eine Stunde danach die Zugabe von VEGF-A. Sowohl die Kontrolle, als auch der Ansatz mit VEGF-A erhielten das gleiche Volumen an DMSO, um den Einfluss des Inhibitorlösungsdurch auszuschließen. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte jeweils in 200µl Kulturmedium. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in peqGOLD TriFast Reagenz lysiert, um für weitere Analysen Gesamt-RNA und Protein zu isolieren.

### **2.2.2.16 Bestimmung von Angiopoietin-2 im Zellkulturüberstand**

Die quantitative Bestimmung von Angiopoietin-2 im Zellkulturüberstand wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-System (Human Angiopoietin-2 Quantikine ELISA Kit) durchgeführt. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden 1:3 verdünnt eingesetzt.

### 2.2.2.17 Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde über Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen auf quervernetzter Gelatine kultiviert, und nach den entsprechenden Behandlungen mit eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation mit 1% BSA-Lösung für eine Stunde bei 37°C blockiert. Die Zellen wurden danach dreimal für je 5min bei 37°C unter Schütteln mit PBS gewaschen. Die sich anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen. Es schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper an, die für 30min bei 37°C durchgeführt wurde. Ab diesem Schritt erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen nochmals in drei Waschsritten für 5min bei 37°C mit PBS gewaschen. Dabei wurde im zweiten Waschsritt für die Markierung der Zellkerne DAPI (1:2500) zu dem PBS gegeben. Die so markierten Zellen konnten bei 4°C in PBS gelagert.

*Tab. 6: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz*

<b>primärer Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b> (in 0,5% BSA-Lösung)
rabbit anti-human Angiopoietin-2	Zymed	1 : 100
<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b> (in 0,5% BSA-Lösung)
goat anti-rabbit IgG-Alexa 546	Molecular Probes	1 : 1.000

### 2.2.3 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der arteriovenösen Differenzierung humaner Endothelzellen untersucht. Dabei wurden über das globale Expressionsmuster der arteriellen und venösen Endothelzellen Markergene identifiziert und verifiziert. Weitergehend wurde untersucht, ob die arteriovenöse Differenzierung in Hinblick auf die ausgewählten Markergene auf genetischer Ebene fixiert ist, oder durch äußere Einflüsse manipuliert werden kann. Dazu wurden der Einfluss biomechanischer Parameter, des Sauerstoffpartialdrucks, sowie der Einfluss von Wachstumsfaktoren detailliert analysiert. Neben den Analysen der Genexpression wurden auch physiologische Eigenschaften der Endothelzellen charakterisiert und verglichen.

#### **3.1 Nachweis arteriovenös differenzieller Genexpression kultivierter humaner Endothelzellen**

##### **3.1.1 Analyse der Genexpression von HUVEC und HUAEC mit cDNA Mikroarrays**

Humane arterielle und venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur wurden bis zur Konfluenz in EBM-Medium kultiviert. Es wurde die Gesamt-RNA aus je drei unabhängigen Endothelzellpräparationen isoliert und durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Über eine DNA-Microarray-Analyse (Affymetrix, GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array; Kooperation zwischen Winfried Göttlich, Bereich Gefäßendothel und Mikrozirkulation an der Medizinischen Fakultät Dresden und Peter Ellinghaus, Bayer AG Wuppertal) wurde die Genexpression von 47.000 Transkripten einschließlich der 38.500 bisher bekannten und charakterisierten Gene des Menschen in humanen arteriellen und venösen Endothelzellen verglichen.

Der Vergleich der mRNA-Expression arterieller und venöser Endothelzellen über den DNA-Microarray konnte ein global differenziell exprimiertes Genmuster nachweisen. Es konnten 18.863 Transkripte in mindestens einem der Zelltypen sicher nachgewiesen werden. Von diesen Transkripten waren 593 präferentiell arteriell (Quotient der Mittelwerte HUAEC/HUVEC  $\geq 2$ ) und 633 präferentiell venös (Quotient der Mittelwerte HUAEC/HUVEC  $\leq 0,5$ ) exprimiert.

Von den 593 arteriell exprimierten Transkripten konnten 89 exklusiv in der arteriellen Endothelzell-Gesamt-RNA nachgewiesen werden. In der venösen Endothelzell-Gesamt-RNA konnten 105 Transkripte exklusiv nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Moleküle des Notch-Signalwegs, Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 (Tab. 3.1.) fokussiert, die präferenziell bis exklusiv arteriell exprimiert werden. Weitere Gene mit einem arteriellen Expressionsmuster, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, sind Angiopoietin-2 und CD44s. Der Genexpression von Hey-1, Hey-2 und CD44s konnte in HUVEC durch die Mikroarray-Analyse nicht nachgewiesen werden. Die Zahlenwerte geben dort einen Mittelwert der *Absent calls* wieder (Tab. 3.1.).

Als ein weiteres Markergen in der arteriovenösen Charakterisierung humaner Endothelzellen wurde der Transkriptionsfaktor COUP-TF II ausgewählt, der eine signifikant höhere Expression in venösen Endothelzellen aufweist.

#### **Hairy/enhancer of split related with YRPW motif 2 (Hey-2)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	2948	47 (A)	63,7
SEM	±280	±32	
t-Test	≤ 0,001		

#### **Hairy/enhancer of split related with YRPW motif 1 (Hey-1)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	6769	638 (A)	10,6
SEM	±752	±123	
t-TEST	= 0,001		

#### **CD44s antigen (homing function and indian blood group system)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	907	193 (A)	4,7
SEM	±54	±45	
t-TEST	≤ 0,001		

**Notch homolog 4 (Notch-4)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	2126	464	4,6
SEM	±357	±87	
t-TEST	= 0,011		

**delta-like 4 (Dll-4)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	2289	537	4,3
SEM	±254	±73	
t-TEST	= 0,03		

**Angiopoietin-2**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	9364	4883	1,9
SEM	±480	±417	
t-TEST	= 0,002		

**Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 (COUP-TF II)**

	HUAEC	HUVEC	HUAEC/ HUVEC
Mittelwert	2826	16262	0,17
SEM	±1433	±1268	
t-TEST	0,002		

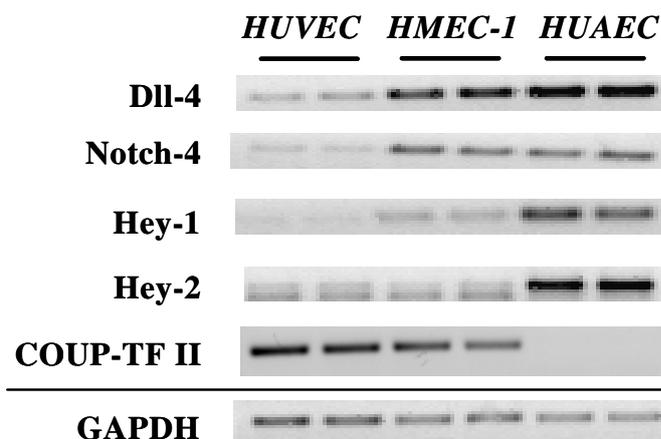
**Tab. 3.1.: Signalintensitäten der Affymetrix cDNA-Mikroarray-Analysen**

Arterielle und venöse humane Endothelzellen aus der Nabelschnur wurden bis zur Konfluenz in EBM-Medium angezogen. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und über RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Durch einer DNA-Microarray-Analyse (Affymetrix, HG-U133A) wurde die Genexpression der 22.000 bisher bekannten Gene des Menschen in humanen arteriellen und venösen Endothelzellen verglichen. Mittelwert ± SEM in relativen Einheiten; n = 3; (A) = absent call.

### 3.1.2 Nachweis differenziell exprimierter Gene in HUVEC, HUAEC und HMEC-1 durch RT-PCR

Die differenzielle Expression der in Tabelle 3.1 aufgeführten Gene wurde in unabhängigen humanen Endothelzellpräparationen durch RT-PCR mit Gen-spezifischen Primern verifiziert (Abb. 3.1). Dazu wurde Gesamt-RNA aus konfluenten primären arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur isoliert, sowie aus der Zelllinie mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1; Ades et. al., 1992) Die Auswertung der RT-PCR konnte bestätigen, dass die Moleküle des Notch-Signalwegs, Dll-4, Notch-4, Hey1 und Hey-2, in arteriellen Endothelzellen deutlich höher exprimiert werden, als in venösen Endothelzellen (Abb. 3.1). Der Transkriptionsfaktor Hey-2 konnte ausschließlich in arteriellen Endothelzellen nachgewiesen werden. Trotz der *Absent calls* des DNA-Mikroarrays (Tab. 3.1.), konnte auch in HUVEC eine schwache Expression des Transkriptionsfaktors Hey-1 detektiert werden. In den mikrovaskulären Endothelzellen konnte die Expression von Dll-4, Notch-4 und Hey-1 nachgewiesen werden. Der Vergleich der Signalintensitäten zeigte eine höhere Expressionsstärke von Hey-1 in den HMEC-1, als in den HUVEC, die aber niedriger im Vergleich zu der arteriellen Expression war (Abb. 3.1). Dagegen konnte die mRNA-Expression von Hey-2 in den HMEC-1 über RT-PCR nicht nachgewiesen werden.

Die Expressionsanalysen für den Transkriptionsfaktor COUP-TF II ergab deutliche Signale in den venösen und in den mikrovaskulären Endothelzellen, wohingegen in den arteriellen Endothelzellen keine Expression nachweisbar war.



**Abb. 3.1: Nachweis der mRNA-Expression arteriovenös differenziell exprimierter Gene in Endothelzellen**

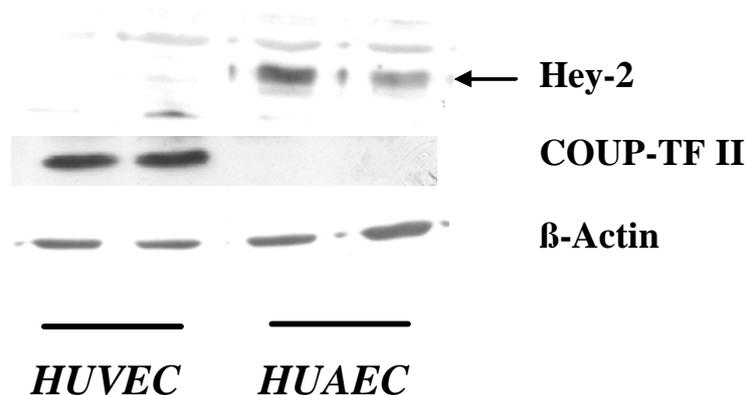
Aus primären humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC und HUAEC), sowie aus der HMEC-1-Zelllinie (humane mikrovaskulärer Endothelzellen) wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Genexpression mit genspezifischen Primern durch PCR analysiert. Als interne Kontrolle wurde auf die GAPDH-mRNA-Expression normalisiert.

### 3.1.3 Nachweis differenziell exprimierter Gene in HUVEC und HUAEC durch Western Blot-Analyse

Die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren Hey-2 und COUP-TF II wurde in humanen arteriellen und venösen Endothelzellen auf Proteinebene verifiziert. Dazu wurde Gesamtprotein aus konfluenten primären arteriellen und venösen Nabelschnur-Endothelzellen isoliert. Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel separiert, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, und anschließend mit spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 3.2).

Die Analyse des Gesamtproteins aus arteriellen Endothelzellen konnte die Hey-2-Proteinexpression eindeutig bestätigt werden. In venösen Endothelzellen war die Hey-2-Proteinexpression dagegen nicht nachweisbar.

Die Proteinexpression des Transkriptionsfaktors COUP-TF II konnte dagegen nur in venösen Endothelzellen, nicht aber in arteriellen Endothelzellen detektiert werden.



**Abb. 3.2: Nachweis der Hey-2- und COUP-TF II-Proteinexpression in venösen und arteriellen Endothelzellen**

20 µg Gesamt-Protein aus primären HUVEC und HUAEC wurde in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (15%) separiert und die Proteinexpression von Hey2 und COUP-TFII durch Western Blot analysiert. Der Nachweis von β-Actin diente als interne Ladekontrolle.

Das sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene bestätigte differenzielle Expressionsmuster kultivierter arterieller und venöser Endothelzellen, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Gene des Notch-Signalwegs weitergehend untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob sich die arteriovenöse Differenzierung auf die Regulation weiterer ausgesuchter arteriovenös differenziell exprimierte Gene außerhalb des Notch-Signalwegs, wie den Angiogenesefaktor Angiotensin-2 und den Oberflächenrezeptor CD44s, auswirkt.

## **3.2 Vergleich physiologischer Eigenschaften arterieller und venöser Endothelzellen**

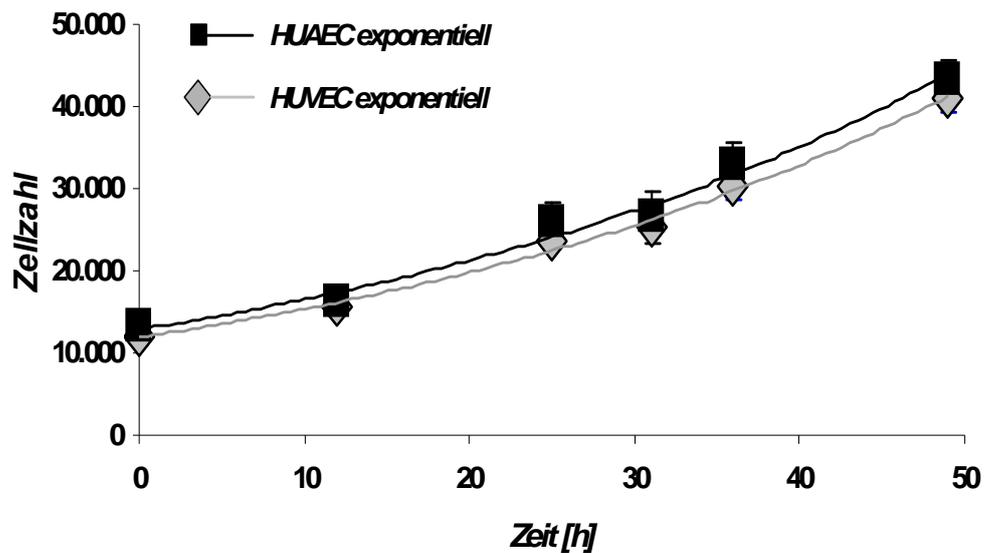
### **3.2.1 Vergleich der Proliferationseigenschaften zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen**

Venöse und arterielle Endothelzellen der Nabelschnur wurden auf ihre Proliferationseigenschaften hin untersucht. Die Proliferation wurde in diesem Versuch über die Verdopplungszeit definiert. Die in die Berechnung der Verdopplungszeit einfließende Zellzahl wurde mit der experimentell erfassbaren Größe der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert. Die Bestimmung der metabolischen Aktivität erfolgte mit dem CellTiter-Blue Cell Viability Assay.

Für den Versuch wurde eine definierte Zellzahl humaner Endothelzellen in der ersten Passage eingesetzt, sowie das kommerziell erhältliche EBM-Kulturmedium verwendet, um Artefakte, bedingt durch unterschiedliche Zelldichten bei der Primärpräparation oder den Kulturbedingungen auszuschließen.

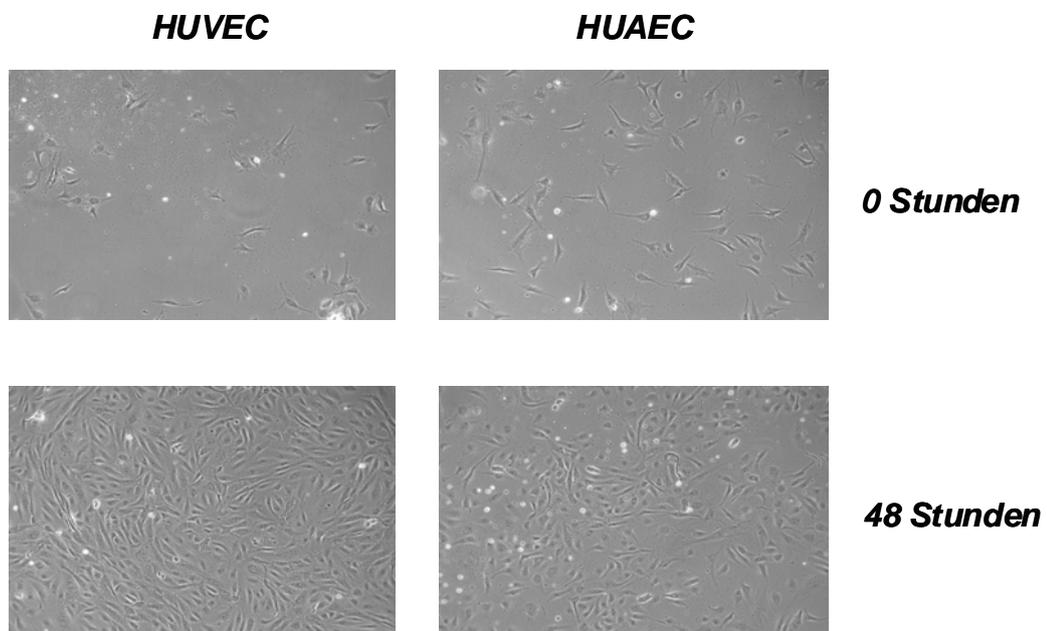
Ausgehend von 12.000 Zellen, wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden die Zunahme der Zellzahl verfolgt. Der Zeitraum von 48 Stunden wurde dabei in mehrere enge Zeitintervalle eingeteilt, um eventuelle zeitlich Unterschiede in der Proliferation zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen erkennen zu können.

In dem Versuchszeitraum von 48 Stunden war eine exponentielle Zunahme der Zellzahl zu beobachten (Abb. 3.3). Die ausgesäte Zellzahl von 12.000 Zellen erhöhte sich um mehr als das Dreifache, sowohl bei arteriellen, als auch bei venösen Endothelzellen. Am Versuchsendpunkt konnte bei beiden Zelltypen eine Zellzahl von circa 40.000 Zellen (HUAEC: 43251 Zellen  $\pm$  2547; HUVEC: 40947  $\pm$  1448) gezählt werden. An keinem der untersuchten Zeitpunkte waren abweichende Werte zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen zu beobachten. Diese theoretischen Berechnungen wurden durch die mikroskopischen Aufnahmen unterstützt, die zeigten, dass in diesem Zeitraum von 48 Stunden beide Zelltypen einen gleichmäßigen Zellrasen erreichten (Abb. 3.4).



**Abb. 3.3:** Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit von HUAEC und HUVEC

HUAEC und HUVEC wurden mit jeweils 12.000 Zellen auf 24-well-Kulturplatten in EBM-Medium ausgesät. Zu den Zeitpunkten 0, 12, 25, 31, 35 und 48 Stunden wurde die metabolische Aktivität der Zellen mit dem Cell Titer Blue-Cell Viability Assay bestimmt und über eine zuvor ermittelte Eichkurve mit der Zellzahl korreliert ( $n > 4$ ).

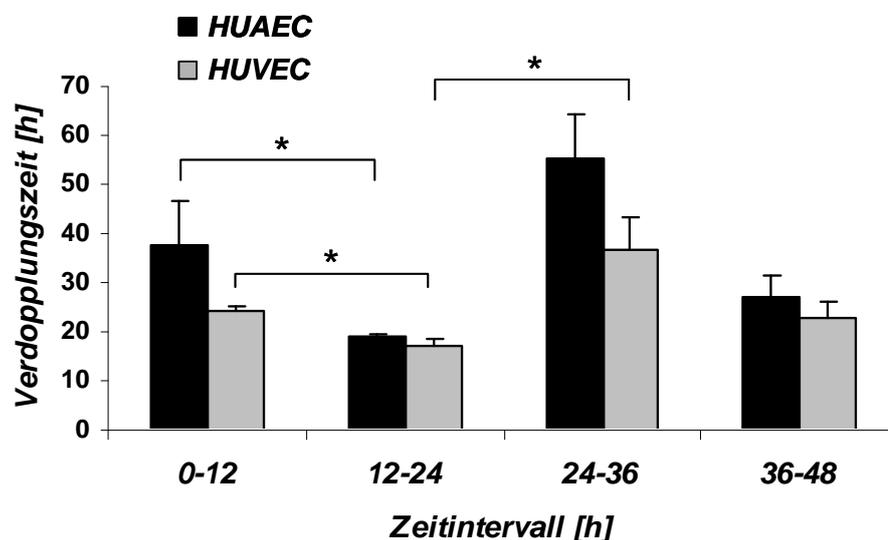


**Abb. 3.4:** Repräsentative Hellfeldaufnahmen von HUVEC und HUAEC

HUAEC und HUVEC wurden mit jeweils 12.000 Zellen auf 24-well-Kulturplatten in EBM-Medium ausgesät. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden und 48 Stunden wurde Hellfeldaufnahmen der Zellen angefertigt.

Die Zellzahl unterschied sich am Versuchsendpunkt bei venösen und arteriellen Endothelzellen nicht, und dennoch konnten zeitlich begrenzte Unterschiede in der Proliferation während des Versuchszeitraum auftreten. Der experimentelle Beobachtungszeitraum wurde daher in engere Zeitintervalle eingeteilt. Dazu wurde nach der Aussaat mit 12.000 Zellen, an den Zeitpunkten 12h, 24h, 36h und 48h die Zellzahl bestimmt und für die Zeitintervalle 0-12h, 12-24h, 24-36h und 36-48h die Verdopplungszeit (PDT) errechnet. Die berechneten Verdopplungszeiten sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

Zu Beginn der Messung, 0-12h, benötigten HUAEC für einen Verdopplungszyklus  $38\text{h} \pm 9$ . HUVEC benötigten in diesem Zeitraum für die Verdopplung der Zellzahl  $24\text{h} \pm 0.9$ . Während des folgenden Zeitintervalls, 12-24h, verkürzte sich die Verdopplungszeit der arteriellen Endothelzellen im Vergleich zur anfänglichen Proliferation auf  $19\text{h} \pm 0.9$ . Die venöse Verdopplungszeit verkürzte sich auf  $17\text{h} \pm 1,61$ . Im weiteren zeitlichen Verlauf, Intervall 24-36h, verlängerte sich die Dauer für einen Verdopplungszyklus bei beiden untersuchten Zelltypen (HUAEC  $55\text{h} \pm 9,23$ ; HUVEC  $37\text{h} \pm 6,7$ ). Zum Ende der Messung hin, beschleunigte sich die Proliferation nochmals bei beiden Zelltypen (HUAEC  $27\text{h} \pm 4,3$ , HUVEC  $23\text{h} \pm 3,48$ ). In keinem der definierten Zeitintervalle waren signifikante Unterschiede in der Proliferation zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen zu erkennen.



**Abb. 3.5: Verdopplungszeit (PDT)**

HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden in einer Eingangszellzahl von 12.000 Zellen in EBM-Medium ausgesät und die Zellzahl zu den Zeitpunkten 0, 12, 25, 36 und 48h durch des Cell Titer Blue-Cell Viability Assay und einer zuvor bestimmten Standardkurve ermittelt. Über die ermittelte Zellzahl wurde die Verdopplungszeit für die angegebenen Zeitintervalle berechnet ( $n > 4$ , \*  $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Adhäsion monozytärer THP-1 Zellen an arteriellen und venösen Endothelzellen

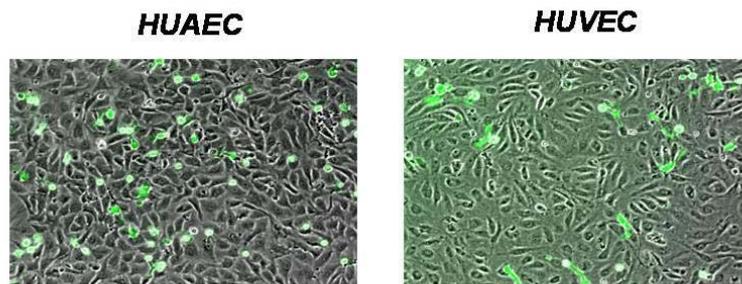
Dem mit dem Blut in direkten Kontakt stehenden Endothel kommt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen zu. Ein Schritt dabei ist die die Anheftung von im Blut zirkulierenden monozytärer Zellen an das Endothel, welche von den Adhäsionsmolekülen abhängig ist, die das aktivierte Endothel auf seiner Oberfläche präsentiert. In diesen Zusammenhang ist das arteriell exprimierte Gen CD44s interessant (Tab. 3.1). Dies ist ein Oberflächenmolekül, das bei chronischen Entzündungen die Anheftung von Lymphozyten ermöglicht (Krettek, A *et al.*, 2004).

In einem der Entzündung angelehnten Prozess sollte der Versuch eine mögliche Abhängigkeit zwischen der arteriovenös differenziellen Expressionsstärke von CD44s und der Adhäsion von Monozyten analysieren.

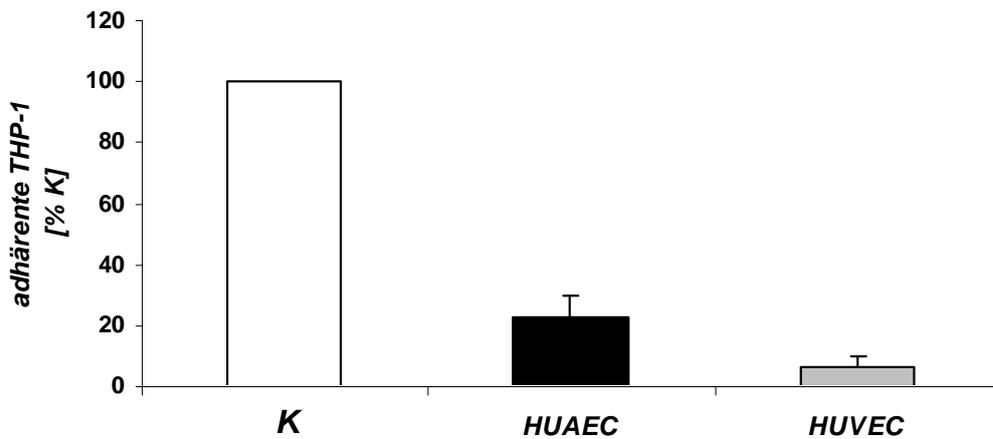
Dazu wurde ein konfluenter Endothelzellrasen unter statischen Bedingungen mit monozytären THP-1 Zellen inkubiert. Die THP-1 Zellen waren zuvor mit dem Vitalfluoreszenzfarbstoff Cell-Tracker Green CMFDA markiert und ausgezählt wurden. Die Fluoreszenz der ausgesäten THP-1 Zellen zum Zeitpunkt 0 wurde gemessen. Es erfolgte eine Inkubation für 15min bei 37°C, in deren Anschluss durch Waschschrte nicht-adhärente THP-1 Zellen entfernt wurden. Die Fluoreszenz der verbliebenen anhaftenden Zellen wurde erneut gemessen, und der Grad der Adhärenz an das darunterliegende Endothel errechnet. Verglichen wurde der monozytäre Adhäsionsgrad zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur.

Die Auswertung ergab (Abb. 3.6), dass auf dem arteriellen Endothel  $21\% \pm 6$  der ausgesäten monozytären THP-1 Zellen adhärrierten, während auf dem venösen Endothel nur  $10\% \pm 4$  der THP-1 Zellen haften blieben.

## (A) Hellfeldaufnahme



## (B)

**Abb. 3.6: Adhäsion monozytärer THP-1 Zellen auf humanen arteriellen und venösen Endothelzellen**

In 24-well-Kulturplatten herangezogene, konfluente HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden am Versuchstag in RPMI-Medium umgesetzt. 100.000 THP-1 Zellen wurden mit Cell-Tracker Green CMFDA markiert und auf den Endothelzellrasen ausgesät. Es wurde die Fluoreszenz zum Zeitpunkt 0 vor dem Waschen gemessen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C wurden nicht-adhärenente THP-1 Zellen durch drei aufeinander folgende Waschschrirte entfernt. Anschließend wurde die Fluoreszenz erneut nach dem Waschen gemessen. (A) Repräsentative Hellfeldaufnahmen von HUAEC und HUVEC die mit der Fluoreszenzaufnahme THP-1 Zellen überlagert wurden. (B) Für die Auswertung wurde das Verhältnis der Fluoreszenz herangezogen, das jeweils vor dem Waschen und nach dem Waschen ermittelt wurde. Angabe als Prozent zur Kontrolle zum Zeitpunkt 0 vor dem Waschen ( $n > 4$ ).

### **3.2.3 Interaktionen humaner Endothelzellen bei der Gefäßbildung**

In der Entwicklung des embryonalen Blutgefäßsystems zu einem komplexen Netzwerk, können zellspezifische Moleküle die Erkennung und Interaktion zwischen den Zellen vermitteln. Aufgrund dieser „Orientierungsmoleküle“ werden repulsive oder attraktive Reize vermittelt und die Anordnung der Zellen koordiniert. Für die arteriovenöse Spezifikation wird z.B. das membranständige EphrinB/EphB-System mit der arteriellen Expression der Ephrin-B2 Liganden und der venösen Expression des EphB4-Rezeptors diskutiert.

Es sollte daher untersucht werden, wie sich adulte arterielle und venöse Endothelzellen in einer Co-Kultur verhalten.

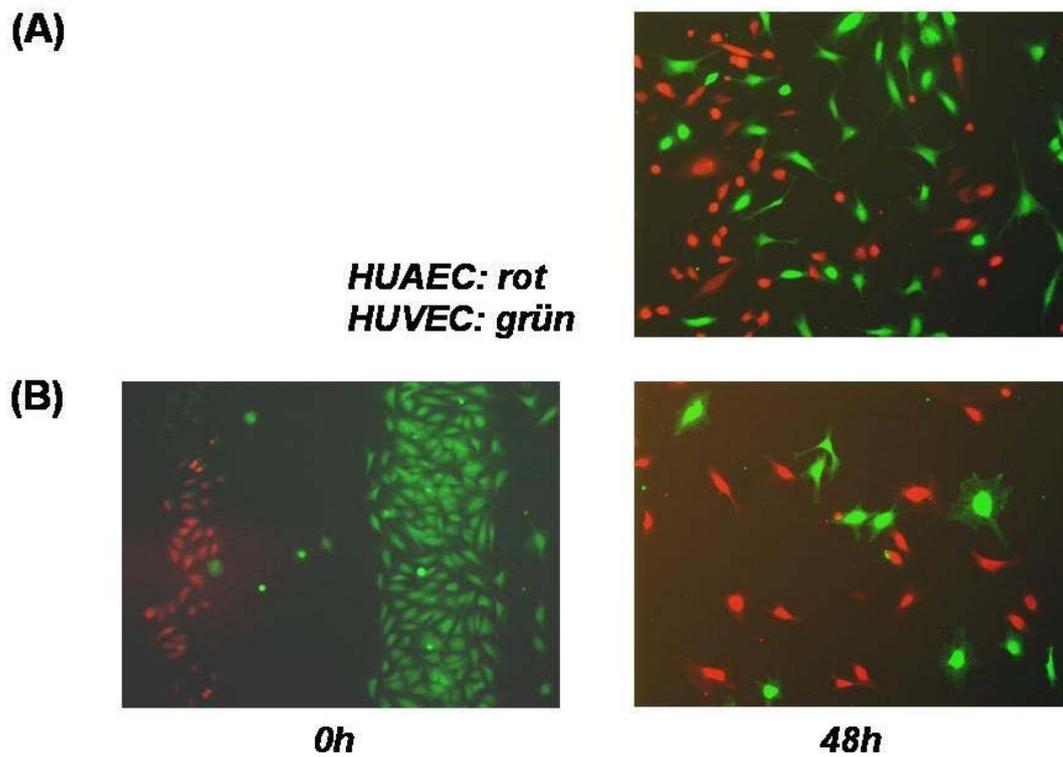
#### **3.2.3.1 HUAEC–HUVEC im 2D-Co-Kultur-Modell**

Zunächst wurden in einem 2D-Co-Kultur-Modell mit Vitalfluoreszenzfarbstoffen markierte HUAEC und HUVEC gemischt und dann ausgesät. Die Inkubation erfolgte in M199-Medium ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren, so dass Mischungseffekte allein auf die Migration der Zellen und nicht auf Proliferationseigenschaften zurückzuführen sind (Abb. 3.7 A).

Nach 48 Stunden war keine auffällige Musterbildung zu erkennen. Arterielle und venöse Endothelzellen bildeten eine ungeordnete Mischung ohne auffällige Sortierungsphänomene.

Da in diesem ersten Versuch bereits initial eine Mischung beider Zelltypen vorlag, sollten in einem weiteren Schritt HUAEC und HUVEC getrennt durch eine Barriere ausgesät werden (Abb. 3.7 B). Die Barriere wurde entfernt und die Migration beobachtet. Nach 48 Stunden war der anfängliche Spalt von den Zellen überwunden worden, und es lag eine homogene Verteilung von arteriellen und venösen Endothelzellen vor.

In beiden Varianten des 2D-Co-Kultur-Modells waren am Endpunkt des Versuches die beiden Zelltypen ohne typspezifische Clusterbildung vermischt.

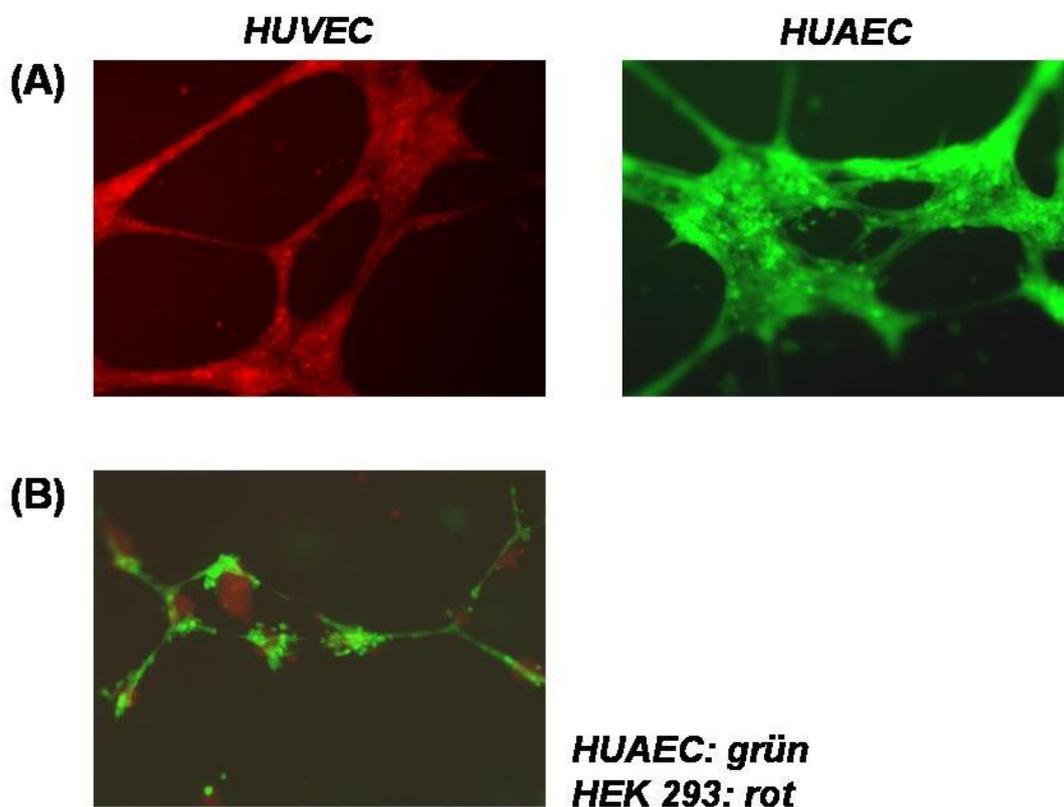


**Abb. 3.7: 2D-Co-Kultur von arteriellen und venösen Endothelzellen**

(A) HUAEC und HUVEC wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert, in (2) M199 (ohne Wachstumsfaktoren) gemischt und auf 60mm Kulturschalen ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Co-Kultur unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. (B) HUAEC und HUVEC wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert und durch eine Barriere getrennt in (2) M199 (ohne Wachstumsfaktoren) ausgesät. Die Barriere wurde nach einer Stunde entfernt. Nach 48 Stunden wurde die Co-Kultur unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 3.2.3.2 HUAEC–HUVEC im 3D-Co-Kultur-Modell

Im Matrigel bilden Endothelzellen netzwerkartige Strukturen, die an das anfängliche Stadium des vaskulären Plexus während der Entwicklung des Blutgefäßsystems erinnern. Das in Abbildung 8A gezeigte Netzwerk wurde jeweils aus 800.000 arteriellen bzw. venösen Endothelzellen gebildet. Versuche mit nicht-endothelialen HEK293 Zellen konnten belegen, dass die Formation von Strukturen im Matrigel ein für Endothelzellen charakteristisches Verhalten ist. HEK293-Zellen bildeten weder allein, noch zusammen mit Endothelzellen ein Netzwerk (Abb. 3.8 B).



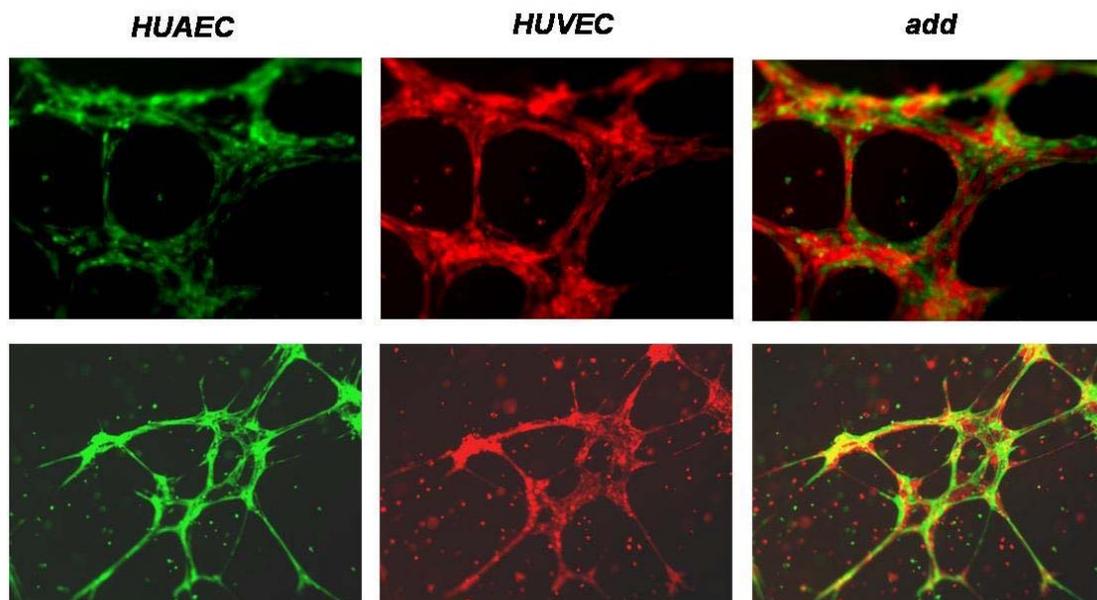
**Abb. 3.8: 3D-Co-Kultur humaner adulter Endothelzellen im Matrigel**

(A) 800.000 HUVEC (rot) oder 800.000 HUAEC (grün) wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert und in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät. Die Fluoreszenz wurde nach 24 Stunden ausgewertet.

(B) 200.000 HUAEC (grün) und 200.000 HEK293 (rot) wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert, gemischt und in 400µl Matrigel in DMEM-Medium high Glucose ausgesät. Die Fluoreszenz wurde nach 24 Stunden ausgewertet.

Es wurde dann untersucht, wie adulte arterielle und venöse Endothelzellen die gemeinsame Netzwerkbildung im Matrigel koordinieren. Dazu wurden HUAEC und HUVEC mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert und in variierenden Zellzahlen in 24-well-Kulturschalen in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät.

Zunächst wurden HUAEC und HUVEC mit 400.000 Zellen in jeweils gleicher Zellzahl gemischt und ausgesät. Das in Abbildung 9 nach 24 Stunden entstandene Netzwerk bestand aus einer mosaikartigen Mischung aus HUVEC und HUAEC. Trennte man das Netzwerk jedoch nach Zellart, waren zwei separate Strukturen zu erkennen. Dennoch war es schwierig eine Aussage über das Gesamtnetzwerk zu treffen, ob das Netzwerk gemeinsam durch gemischte arteriell-venöse Interaktionen oder sowohl die arteriellen, als auch die venösen Endothelzellen ein in sich geschlossenes eng benachbartes Netzwerk ausbildeten. In keinem Ansatz wurde je eine einzelne unabhängige Struktur beobachtet.

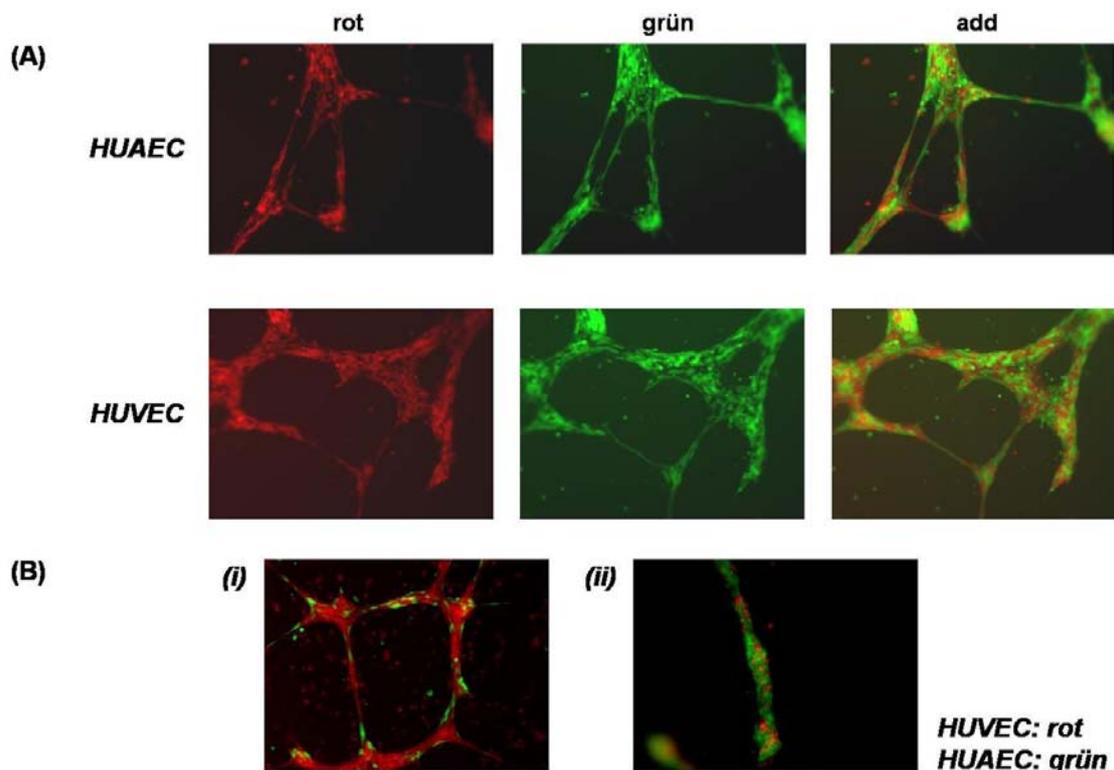


**Abb. 3.9: Heterogene Netzwerkbildung von arteriellen und venösen Endothelzellen im Matrigel**

Jeweils 400.000 HUAEC (grün) und 400.000 HUVEC (rot) wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert, gemischt und in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Fluoreszenz ausgewertet.

Um die Frage nach der Art des Gesamtnetzwerks zu beantworten, sollten die Netzwerke von HUVEC und HUAEC im Einzelnen näher untersucht werden. Dazu wurden zwei Ansätze einer Zellart, arteriell oder venös, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in gleicher Zellzahl im Matrigel ausgesät (Abb. 3.10 A). In der Auswertung zeigte sich, dass die gebildeten homogenen Netzwerke beider Zelltypen dem heterogenen Ansatz aus arteriellen und venösen Endothelzellen ähnelten, der in Abbildung 3.9 gezeigt ist. Auch hier zeigte sich eine Trennung in zwei „Farben“ mit zwei scheinbar unabhängig existierenden Strukturen. In einem anderen Ansatz wurden HUAEC und HUVEC in verschiedenen Zellzahlverhältnissen ausgesät (Abb. 3.10 B). Hier zeigte das Bild, dass sich die in geringerer Anzahl ausgesäter Zellen in das Netzwerk der anderen Zellart integrierte.

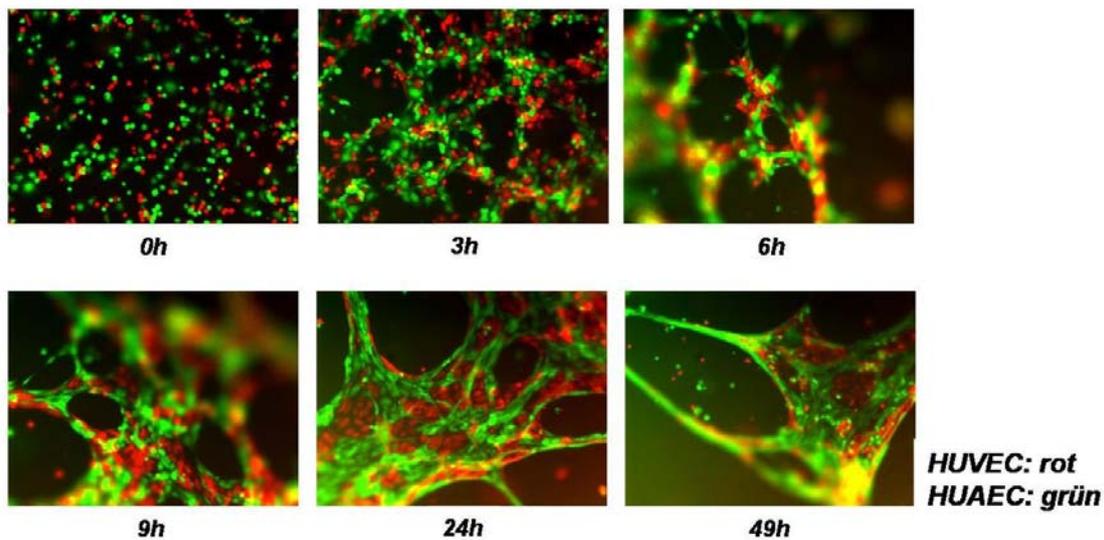
Vorversuche hatten gezeigt, dass eine Mindestanzahl an Zellen ausgesät werden muss, um die Strukturbildung zu induzieren. Bei einer zu geringen Zahl an Zellen konnte kein Netzwerk gebildet werden. Wurde die Zellzahl jedoch erhöht, auch wenn es sich dabei um Zellen des anderen Zelltyps handelte, so fand die Netzwerkbildung statt.



**Abb. 3.10: Abhängigkeit der Netzwerkbildung von der Zellart und der Zellzahl**

(A) Zwei Ansätze mit jeweils 200.000 Zellen von HUAEC oder HUVEC wurden mit unterschiedlichen Cell-Tracker Vitalstoffen markiert und in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät. Die Fluoreszenz wurde nach 24 Stunden ausgewertet. (B) HUAEC (grün) und HUVEC (rot) wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert und in verschiedenen Zellzahlverhältnissen in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät. Die Fluoreszenz wurde nach 24 Stunden ausgewertet. (i) HUAEC (50.000 Zellen) und HUVEC (350.000 Zellen) (ii) HUAEC (350.000 Zellen) und HUVEC (50.000 Zellen)

Da die Analyse eines fixen Endpunkts nach 24 Stunden keine Aussage über die Dynamik der Netzbildung zuließ, sollte die Netzbildung in diesem Zeitraum an mehreren Zeitpunkten analysiert werden (Abb. 3.11). 200.000 HUAEC und 200.000 HUVEC wurden markiert, gemischt und im Matrigel ausgesät. Zum Zeitpunkt der Aussaat lag eine gleichmäßige Mischung von HUAEC und HUVEC vor. Schon nach 3 Stunden war eine anfängliche Koordinierung der Zellen zu beobachten, die nach 6 Stunden erste netzwerkartige Strukturen erkennen ließ. In dem Zeitraum zwischen 9 Stunden und 24 Stunden verfestigten sich die Strukturen, so dass nicht mehr einzelne runde Zellen zu beobachten waren, sondern lang gestreckte Zellen, die ihren festen Platz hatten und untereinander Kontakte ausbildeten. Zu allen untersuchten Zeitpunkten waren arterielle und venöse Endothelzellen gemischt. An einzelnen Stellen war zu erkennen, dass Strukturen gemeinsam von HUVEC und HUAEC gebildet wurden, andere Bereiche deuteten auf nebeneinander verlaufenden Verbindungen hin, bestehend aus jeweils nur einer Zellart.



**Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der Netzbildung in einer Co-Kultur von arteriellen und venösen Endothelzellen im Matrigel**

Jeweils 200.000 HUAEC (grün) und HUVEC (rot) wurden mit Cell-Tracker Vitalfarbstoffen markiert, gemischt und in 400µl Matrigel in EBM-Medium ausgesät (Zeitpunkt 0h). Weitere Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgten nach 3, 9, 24 und 49 Stunden.

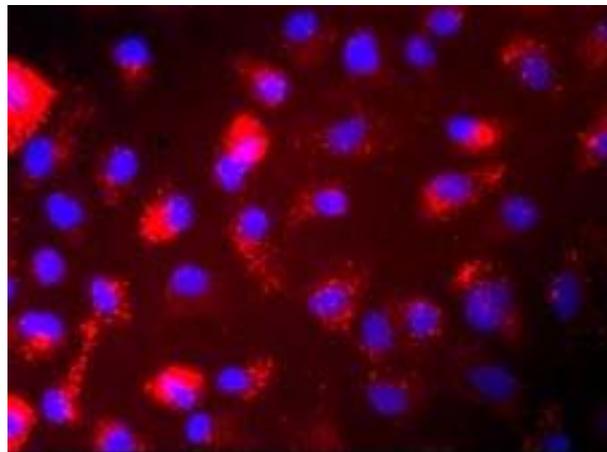
---

Durch Zeitraffer-Aufnahmen sollte der Beginn der Netzwerkbildung detaillierter dargestellt werden. Dazu wurden 125.000 HUAEC und 125.000 HUVEC markiert, gemischt und in 400µl Matrigel in M199 (10% FCS, 28mM HEPES) ausgesät. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde dann mit einem 10er Objektiv alle 10min ein Bild aufgenommen.

Die Auswertung zeigte, dass die Zellen anfangs höchst beweglich waren. Einige Zellen bewegten sich teilweise durch das gesamte Gesichtsfeld, traten dabei mit anderen Zellen in Kontakt oder lösten Kontakte, um zu anderen Zellaggregaten zu wandern. Andere Zellen bildeten Filopodien-ähnliche Ausläufer, um nach Kontaktmöglichkeiten mit anderen Zellen zu suchen. Es war jedoch nicht zu erkennen, ob die jeweilige Zelle zwischen arteriell oder venös unterscheiden kann. Sich bildende Zellaggregate waren immer eine Mischung aus HUAEC und HUVEC und. Mit der Zeit nahm die Beweglichkeit der einzelnen Zellen ab. Nur noch wenige Zellen legten größere Strecken zurück. Auffällig war, dass nur wenige Zellen vereinzelt vorlagen, der größte Teil der Zellen sich dagegen in heterogenen Zellaggregaten organisiert hatten. In einzelnen Bereichen wurden dabei Netzwerkstrukturen ausgebildet.

### 3.3 Regulation der Angiopoietin-2-Expression in humanen Endothelzellen

Die Angiogenese ist einer der wenigen biologischen Prozesse im adulten Organismus, der die Anpassung des Gefäßbetts an eine veränderte Bedarfslage ermöglicht. Die Neubildung und die Regression notwendiger Gefäße werden durch Angiogenesefaktoren gesteuert, zu denen das Angiopoietin-2 gehört. Dieses für die Angiogenese wichtige Molekül wird nur von Endothelzellen gebildet und sezerniert. Lokalisationsstudien weisen das Angiopoietin-2 in granulären Strukturen nach, welche über die gesamte Zelle verteilt sind (Abb. 3.12).

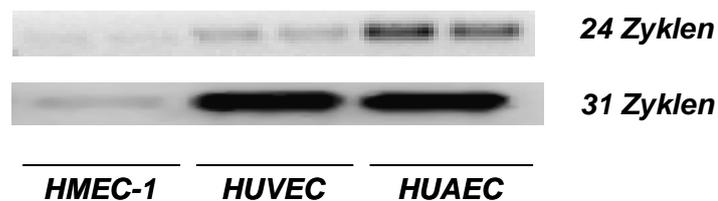


**Abb. 3.12: Lokalisation von Angiopoietin-2 in HUVEC**

HUVEC wurden für 24 Stunden in (3) M199 kultiviert. In der sich anschließenden Immunfärbung, wurden die Zellen zunächst mit Methanol fixiert, bevor der Nachweis von Angiopoietin-2 mit anti-huAng2 (1:100) und Alexa Fluor 546 gekoppeltem anti-rabbit-IgG (1:1000) erfolgte. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Zunächst wurde die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 in verschiedene Endothelzellen untersucht. Für die Expressionsstudie wurden arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur (HUAEC und HUVEC), sowie mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) analysiert.

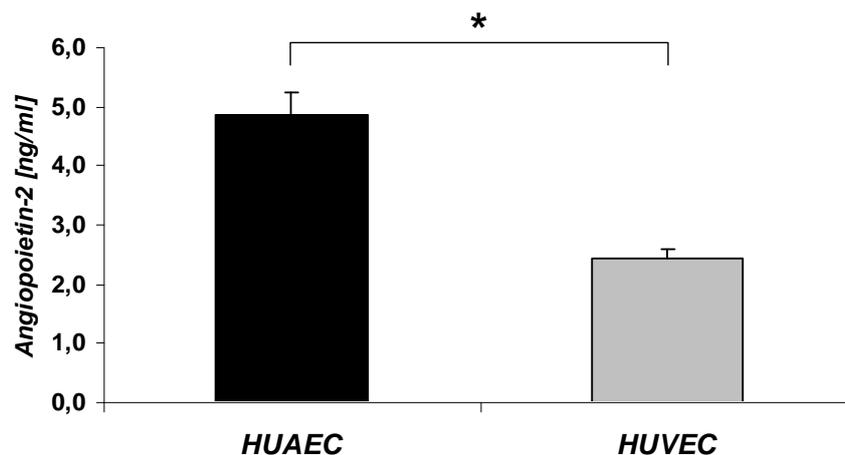
Die Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR bestätigte das arteriovenös differenzielle Expressionsmuster der cDNA-Mikroarrayanalyse in Kapitel 3.1.1 (Tab. 3.1). Wie in Abbildung 3.13 erkennbar, liegt Angiopoietin-2 in den HUAEC um den Faktor 2 höher exprimiert vor, als in den HUVEC. Im Vergleich zu den primären Nabelschnur-Endothelzellen, war die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 in der mikrovaskulären Endothelzellenlinie nur schwach nachweisbar. Erst durch die Amplifikation mit einer höheren Anzahl von 31 Zyklen war der Nachweis sicher möglich.



**Abb. 3.13: Angiopoietin-2-mRNA-Expression in Endothelzellen**

HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden in EBM-Medium kultiviert, HMEC-1 in MV-2-Medium. Mit Erreichen der Konfluenz wurde die Gesamt-RNA isoliert und durch RT-PCR die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 mit unterschiedlichen Zyklenzahlen analysiert und in diesem repräsentativen Gelbild dargestellt.

In den Endothelzellen der Nabelschnur wurde außerdem die Peptidfreisetzung von Angiopoietin-2 untersucht. Dazu wurden HUAEC und HUVEC für 24 Stunden in Endothelmedium kultiviert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und die Konzentration von Angiopoietin-2 durch ELISA bestimmt (Abb. 3.14). Die quantitative Auswertung des ELISA ergab, dass das Kulturmedium von HUAEC 5ng/ml Angiopoietin-2 enthielt, während im Überstand der HUVEC 2,4ng/ml Angiopoietin-2 nachweisbar waren.



**Abb. 3.14: Nachweis von Angiopoietin-2 im Kulturmedium von primären humanen Endothelzellen**

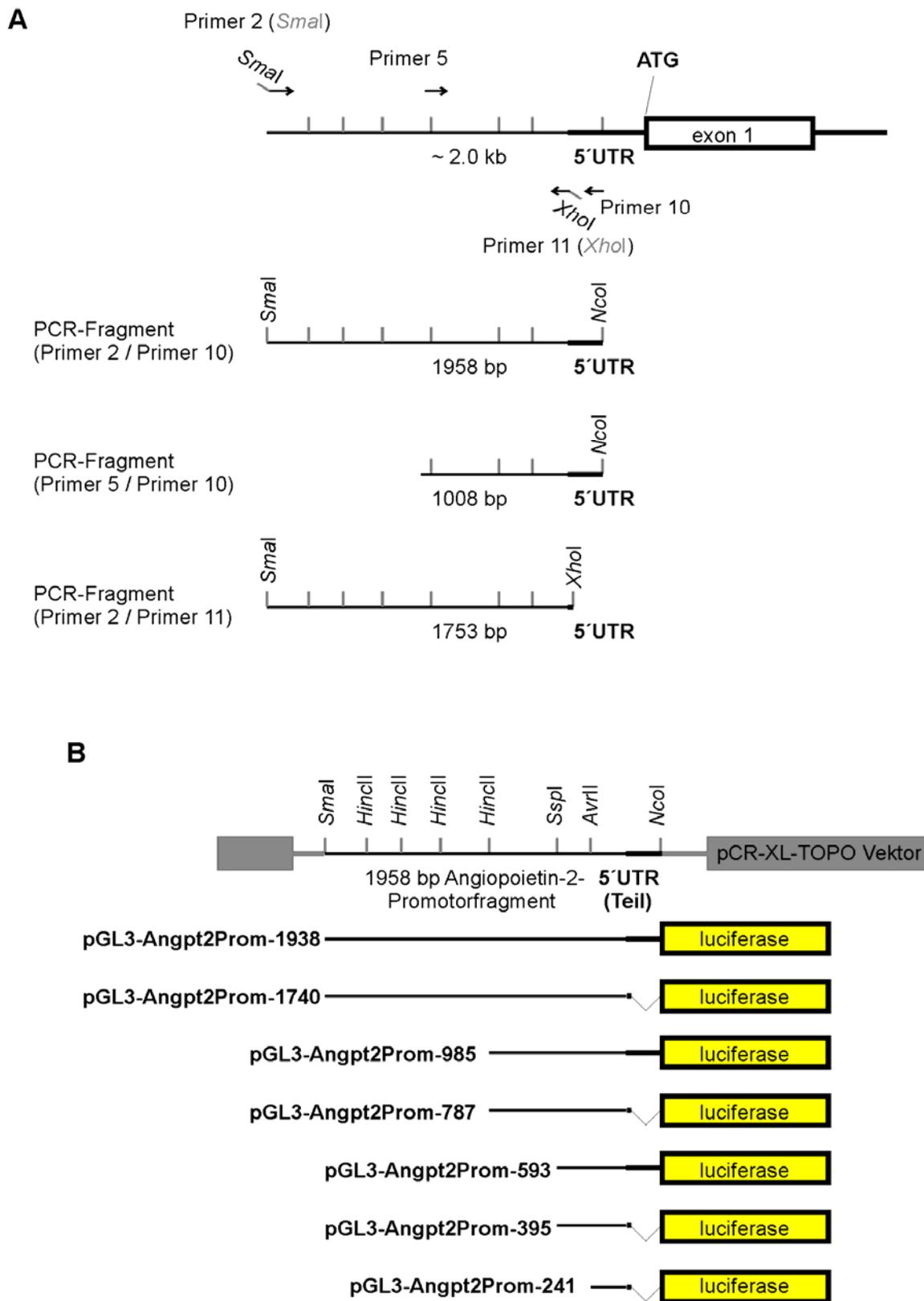
Konfluente Endothelzellen der Nabelschnur (HUAEC und HUVEC) in der ersten Passage wurden für 24 Stunden in Endothelmedium kultiviert. Danach wurde der Kulturüberstand abgenommen und mit dem Angiopoietin-2 ELISA die Konzentration des freigesetzten Angiopoietin-2 ermittelt. Angabe der Freisetzung von Angiopoietin-2 in mg/ml  $\pm$  SEM (n = 3, \* p < 0,05).

### 3.3.1 Klonierung des Angiopoietin-2-Promotors

Die transkriptionelle Regulation der differentiellen Expression von Angiopoietin-2 in den verschiedenen Endothelzellen sollte auf Promotorebene detaillierter untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Fragment des Angiopoietin-2-Promotors für Reporteranalysen in den Vektor pGL3-Basic kloniert. Durch weitere sukzessive Verkürzungen bis hin zu einem „Minimalpromotor“ sollten putative regulatorische Sequenzen des Promotors identifiziert werden. In der Zellkultur wurden die Promotorkonstrukte weiterhin auf ihre Regulation durch biomechanische Kräfte und Wachstumsfaktoren untersucht.

Ausgehend von den Klonierungsprimern 2 und 10 wurde aus humaner genomischer DNA ein ca. 2000bp langes Fragment stromaufwärts des Transkriptionsstarts von Angiopoietin-2 amplifiziert. Dieses PCR-Fragment wurde direkt durch TA-Klonierung in den Vektor pCR-XL-TOPO kloniert, in *E. coli* vermehrt und durch Sequenzierung die Identität bestätigt. In zwei weiteren PCR-Reaktionen mit diesem Plasmid als Vorlage wurden Promotor-PCR Fragmente von 1008 bp (Primer 2 / Primer 5) und 1753 bp (Primer 2 / Primer 11) erhalten und ebenfalls durch TA-Klonierung in den Vektor pCR-XL-TOPO integriert (Abb. 3.15 A). Diese Vektoren enthielten durch die Primerwahl an ihren Enden geeignete Kombinationen von singulären Restriktionsschnittstellen (*SmaI*, *HincII*, *SspI*, *AvrII*, *XhoI*, *NcoI*) für eine Restriktionsklonierung in den Reportergenvektor pGL3-Basic.

Nach Restriktion des Vektors *pCR-XL-Angpt2Prom-1958* (Abb. 3.15B) mit *SmaI* und *NcoI* wurde das erhaltene Fragment in das ebenfalls mit *SmaI* und *NcoI* geschnittenen pGL3-Basic-Plasmid kloniert und der Vektor *pGL3-Angpt2Prom-1938* erhalten. Der zusätzliche Vektor *pCR-XL-Angpt2Prom-1008* wurde mit *HincII* und *NcoI* sowie mit *SspI* und *NcoI* geschnitten, und die erhaltenen Fragmente jeweils in das pGL3-Basic-Plasmid kloniert. Dadurch wurden die Vektoren *pGL3-Angpt2Prom-985* und *pGL3-Angpt2Prom-593* kloniert (Abb. 3.15B). Ausgehend von dem weiteren Vektor pCR-XL-Angpt2Prom-1753 wurde durch Restriktion mit *SmaI* und *XhoI* der Vektor *pGL3-Angpt2Prom-1740* kloniert. Über eine Restriktion mit *HincII* und *XhoI* wurde zunächst eine Verkürzung auf 787bp vorgenommen (*pGL3-Angpt2Prom-787*), und mit *SspI* und *XhoI* eine weiter Verkürzung auf 395bp (*pGL3-Angpt2Prom-395*) vorgenommen. Für das mit 241bp kürzeste Fragment, wurde das Fragment Angpt2Prom-1783 mit *AvrII* und *XhoI* geschnitten und anschließend die *AvrII* geschnittenen Seite mit dem Klenow-Fragment zu einem glatten Ende aufgefüllt (*pGL3-Angpt2Prom-241*) (Abb. 3.15 B).

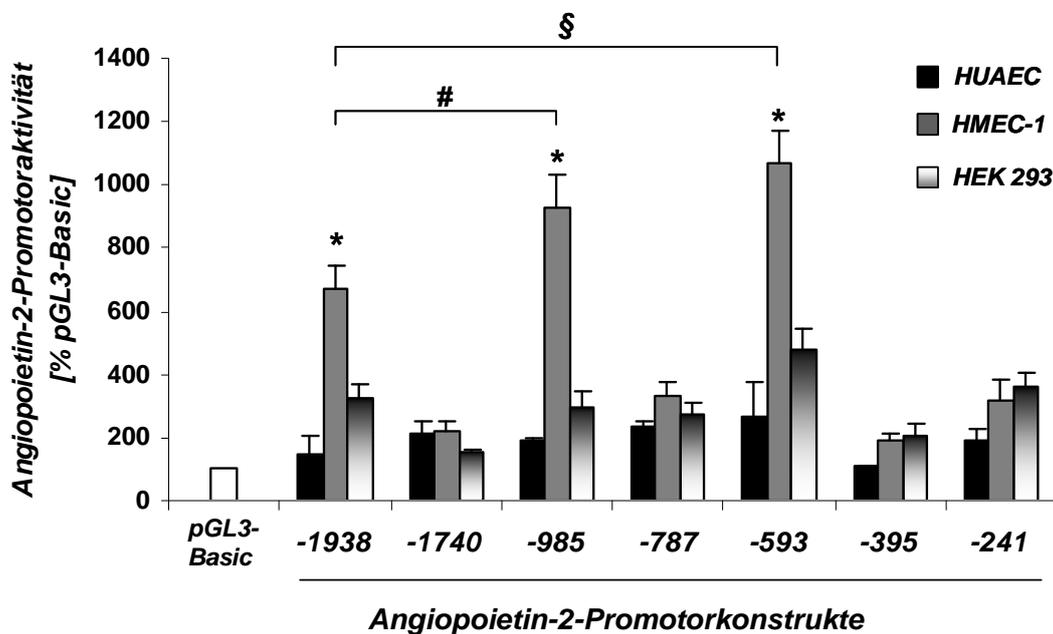


**Abb. 3.15: Klonierung von Angiopoietin-2-Promotorkonstrukten**

(A) Aus humaner genomischer DNA wurde ein Fragment amplifiziert, das 2000 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart von Angiopoietin-2 umfasst. In dieses Promotorfragment wurden durch PCR gezielt Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die erhaltenen Fragmente wurden durch TA-Klonierung in den pCR-XL-TOPO Vektor überführt. (B) Durch Restriktionsklonierung wurden aus den drei erhaltenen Vektoren (hier nur pCR-XL-Angpt2Prom-1958 dargestellt) sieben Angiopoietin-2-Promotor-Konstrukte in pGL3-Basic kloniert.

### 3.3.1.1 Analyse der zelltypspezifischen Angiopoietin-2-Promotor-Aktivität

Um die Regulation des Angiopoietin-2 Promotors zu analysieren, wurde die Aktivität der Promotorkonstrukte zunächst in verschiedenen Zellkulturen untersucht (Abb. 3.16). Es wurden dabei primäre arterielle Endothelzellen der Nabelschnur (HUAEC), mikrovaskulärer Endothelzellen der Zelllinie HMEC-1, und HEK293 als nicht-endotheliale humane Zelllinie untersucht. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Lipofektion mit dem Transfectin Lipidreagenz und wurde in 24-well-Kulturschalen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2µg des Angiopoietin-2 Reporterplasmids pGL3-Angpt2Prom (Firefly-Luciferase) und 0,02µg des Kontrollplasmids pRL-CMV (Renilla-Luziferase) eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde nach 24 Stunden über den Dual-Luciferase-Assay ausgewertet. Für die quantitative Bestimmung der Promotoraktivität wurde zunächst für jeden Ansatz der gemessene Wert der Firefly-Luziferase auf den Wert der Renilla-Luziferase als Maß für die Transfektionseffizienz abgeglichen. In der weiteren Berechnung wurde diese um die Transfektionseffizienz korrigierte Promotoraktivität als Prozent der Aktivität des promotorlosen pGL3-Basic Vektors angegeben.



**Abb. 3.16: Basalaktivität der Angiopoietin-2-Promotorkonstrukte in unterschiedlichen humanen Zellen**

Angiopoietin-2-Promotorkonstrukte wurden über Lipofektion in HUAEC, HMEC-1 und HEK293-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde die Aktivität mit dem Dual-Luciferase-Assay bestimmt und auf die Transfektionseffizienz von pRL-CMV korrigiert. Angabe der Promotoraktivität in Prozent zum promotorlosen Vektor pGL3-Basic  $\pm$  SEM (HUAEC / HEK293, n = 2, HMEC-1, n = 4; \* p < 0,05 zur Kontrolle pGL3-Basic, # p < 0,05, § p < 0,05).

Die Auswertung der Luziferase-Aktivität in den verschiedenen Zellkulturen ergab, dass die Konstrukte Angpt2Prom-1938, Angpt2Prom-985 und Angpt2Prom-593 in den HMEC-1 eine deutliche Basalaktivität zeigten (Abb. 3.16). Innerhalb dieser Gruppe von Konstrukten war die Aktivität des kurzen 593bp-Fragments mit 1007% pGL3-Basic ( $\pm 106$  %) signifikant höher, als die des 1938bp langen Fragments mit 630% pGL3-Basic ( $\pm 73$  %). Auch die Verkürzung auf 985bp zeigte schon eine signifikante Aktivitätssteigerung auf 930% pGL3-Basic ( $\pm 106$  %), die durch die weitere Verkürzung auf 593bp nicht signifikant erhöht werden konnte.

Die Konstrukte Angpt2Prom-1748, Angpt2Prom-787, Angpt2Prom-395 und Angpt2Prom-241 waren in den HMEC-1 nicht oder nur schwach aktiviert. In der nicht-endothelialen Zelllinie HEK293 war unabhängig für alle Promotorkonstrukte eine schwache Aktivität nachweisbar, während in den primären arteriellen Endothelzellen HUAEC keines der getesteten Promotorkonstrukte aktiv war.

Aufgrund der Schwierigkeiten, primäre humane Endothelzellen durch Lipofektion zu transfizieren, wurden alle weiteren Analysen der Promotorkonstrukte in der Zelllinie HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) durchgeführt.

---

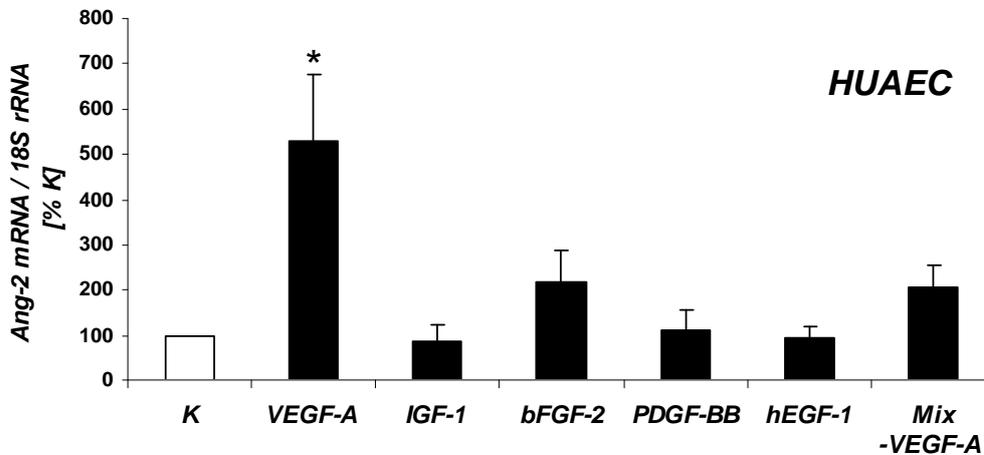
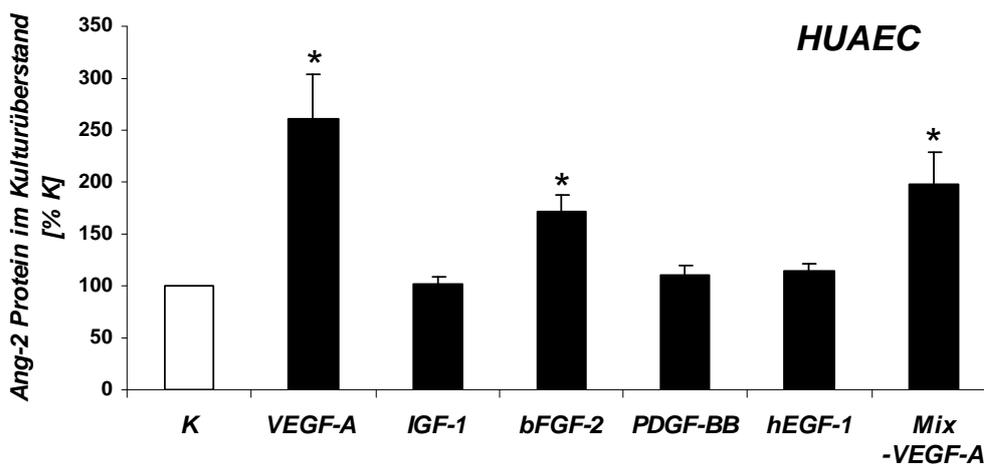
### **3.3.2 Regulation der Angiopoietin-2 Expression**

#### **3.3.2.1 Regulation der Angiopoietin-2-Expression durch Wachstumsfaktoren**

Der Prozess der Angiogenese wird durch das Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren kontrolliert. In einem ersten Experiment wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die arteriovenöse Expression von Angiopoietin-2 untersucht.

Als wichtige angiogene Faktoren wurden VEGF-A und bFGF-2 analysiert. Zusätzliche Stimulie waren hEGF-1, IGF-1 und PDGF-BB als Faktoren, die in die Pathogenese der Arteriosklerose eingreifen (Abb. 3.17). Außerdem sollte die Stimulation mit einer Mischung aus bFGF-2, hEGF-1, IGF-1 und PDGF-BB (Mix -VEGF-A) mögliche Interaktionen der Wachstumsfaktoren untereinander aufzeigen.

Die Stimulationsversuche wurden mit arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur durchgeführt. Nach einer Vorinkubation in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren von 16 Stunden wurde am Versuchstag der entsprechende Wachstumsfaktor in das Kulturmedium gegeben. Die Analyse der mRNA-Expression und der Proteinexpression von Angiopoietin-2 erfolgte 24 Stunden nach Zugabe des Wachstumsfaktors und wurde auf eine unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die mRNA-Expression wurde durch RT-PCR untersucht und auf die Expression der 18S rRNA normalisiert. Die Proteinexpression wurde anhand der Freisetzung von Angiopoietin-2 in das Kulturmedium mit einem spezifischen ELISA analysiert.

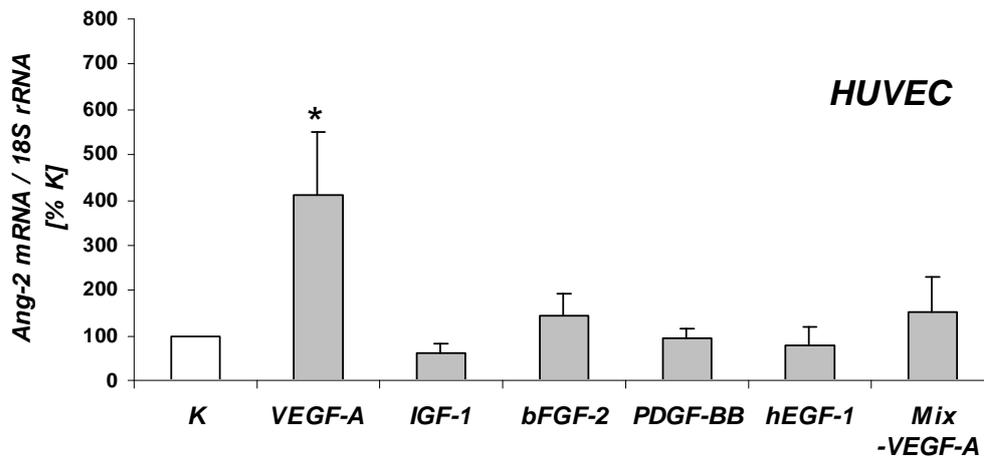
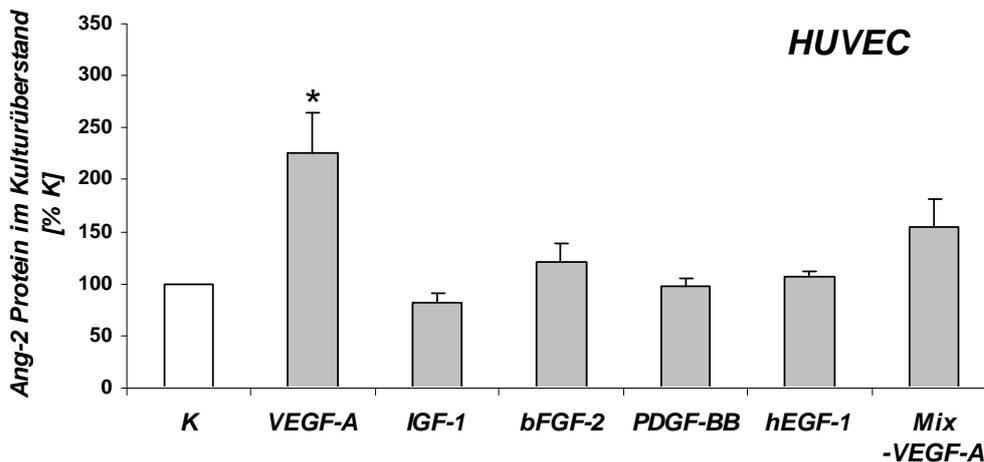
**(A) Angiopoietin-2-mRNA-Expression in HUAEC****(B) Angiopoietin-2-Proteinexpression in HUAEC**

**Abb. 3.17: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Regulation der Angiopoietin-2-mRNA- und Proteinexpression in HUAEC**

Vor der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden konfluente HUAEC für 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorbehandelt. Nach Wachstumsfaktor-Zugabe wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert (VEGF-A 50ng/ml, IGF-1 20ng/ml, bFGF-2 1ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, hEGF-1 0,1ng/ml; Mix-VEGF-A (IGF-1 20ng/ml, bFGF-2 1ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, hEGF-1 0,1ng/ml)). (A) Für die Analyse der Angiopoietin-2-mRNA-Expression wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. (B) Für die Analyse der Proteinfreisetzung wurde der Kulturüberstand abgenommen und mit dem Angiopoietin-2-ELISA untersucht. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n = 3$ , \*  $p < 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle).

Der Test der verschiedenen Wachstumsfaktoren zeigte, dass VEGF-A in einer Konzentration von 50ng/ml bei den HUAEC sowohl die mRNA-Expression von Angiopoietin-2, als auch die Freisetzung des Proteins in das Kulturmedium induzierte (Abb. 3.17 A und B). Dabei waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine 5fache Induktion der mRNA-Expression ( $530\% \pm 147$ ) zu beobachten, sowie eine 2,5fache Erhöhung der Proteinfreisetzung ( $260\% \pm 43$ ). Die Wachstumsfaktoren IGF-1, bFGF-2, PDGF-BB und hEGF-1 alleine, oder in Kombination hatten in den HUAEC keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription von Angiopoietin-2 (Abb. 3.17 A). Die Auswertung der Proteinfreisetzung ergab (Abb. 3.17 B), dass die Freisetzung von Angiopoietin-2 durch Stimulation von HUAEC mit 1ng/ml bFGF-2 ebenfalls erhöht wurde ( $171\% \pm 16$ ). Auch die Stimulation mit einer Mischung der vier Wachstumsfaktoren IGF-1, bFGF-2, PDGF-BB und hEGF-1 hatte einen Effekt auf die Proteinfreisetzung, welche im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle um das Doppelte erhöht werden konnte ( $199\% \pm 31$ ).

Die Auswertung der Stimulation von HUVEC mit den Wachstumsfaktoren ergab, dass in einer Konzentration von 50ng/ml eingesetzte VEGF-A sowohl die mRNA-Expression von Angiopoietin-2, als auch die Freisetzung des Proteins in das Kulturmedium stimulierte (Abb. 3.18 A und B). Über den Wachstumsfaktor wurde die Transkription von Angiopoietin-2 im Vergleich zur Kontrolle um das 4fache induziert ( $411\% \pm 137$ ). Die nachweisbare Menge an freigesetztem Protein erhöhte sich um das 2,25fache ( $225\% \pm 25$ ). Die Wachstumsfaktoren IGF-1, bFGF-2, PDGF-BB und hEGF-1 allein oder in Kombination, hatten in den HUVEC keinen signifikanten Einfluss auf die Transkription von Angiopoietin-2 oder seine Freisetzung in das umgebende Medium.

**(A) Angiopoietin-2-mRNA-Expression in HUVEC****(B) Angiopoietin-2-Proteinexpression in HUVEC**

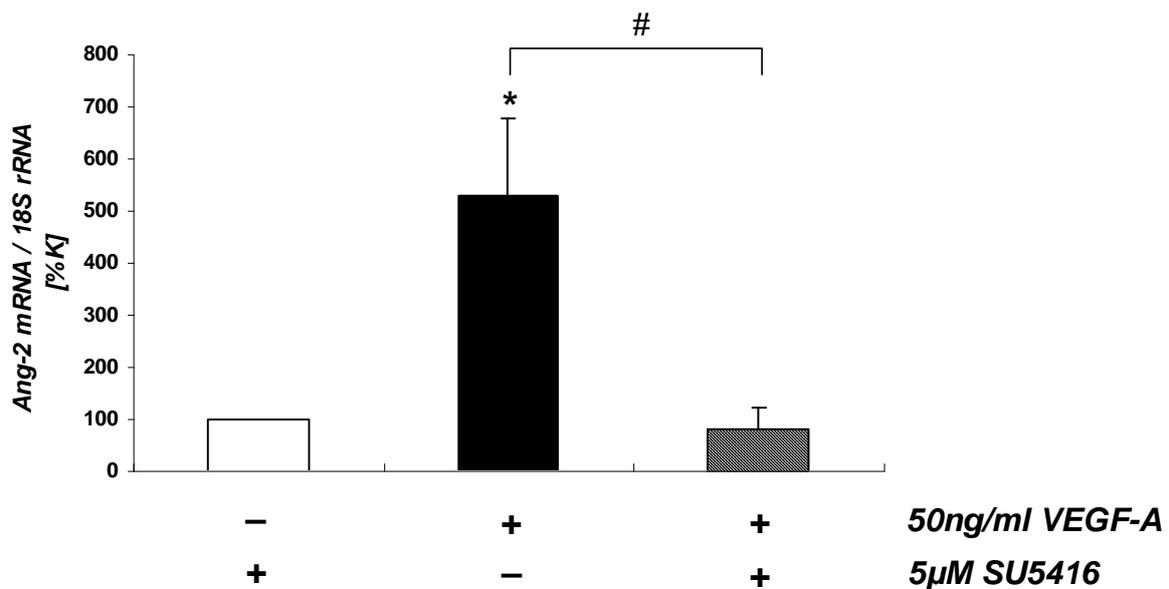
**Abb. 3.18: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Regulation der Angiopoietin-2-mRNA- und Proteinexpression in HUVEC**

Vor der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden konfluente HUVEC für 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorbehandelt. Nach Wachstumsfaktor-Zugabe wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert (VEGF-A 50ng/ml, IGF-1 20ng/ml, bFGF-2 1ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, hEGF-1 0,1ng/ml; Mix-VEGF-A (IGF-1 20ng/ml, bFGF-2 1ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, hEGF-1 0,1ng/ml)). (A) Für die Analyse der Angiopoietin-2-mRNA-Expression wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression von 18S rRNA abgeglichen. (B) Für die Analyse der Proteinfreisetzung wurde der Kulturüberstand abgenommen und im Angiopoietin-2-ELISA untersucht. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM (n = 3, \* p < 0,05 zur unbehandelten Kontrolle).

Die Expressionskontrolle von Angiopoietin-2 durch den Angiogenesefaktor VEGF-A wurde in einer Inhibitorstudie näher untersucht. Durch die Inhibierung der VEGF-Rezeptor 2 Kinase sollte erkennbar werden, ob VEGF-A über einen direkten oder indirekten Signalweg die Transkription von Angiopoietin-2 reguliert.

Primäre arterielle Endothelzellen der Nabelschnur wurden nach einer Vorbehandlung in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren für 16 Stunden, gleichzeitig mit 50ng/ml VEGF-A und 5 $\mu$ M VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitor III (SU5416) für 24 Stunden stimuliert. In der Auswertung wurde auf einen Kontrollansatz abgeglichen, der nur mit dem Inhibitor SU5416 allein behandelt worden war.

Die Auswertung der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR zeigte, dass die Blockade des VEGF-Rezeptor 2 die VEGF-A vermittelte Induktion vollständig verhinderte (Abb. 3.19).

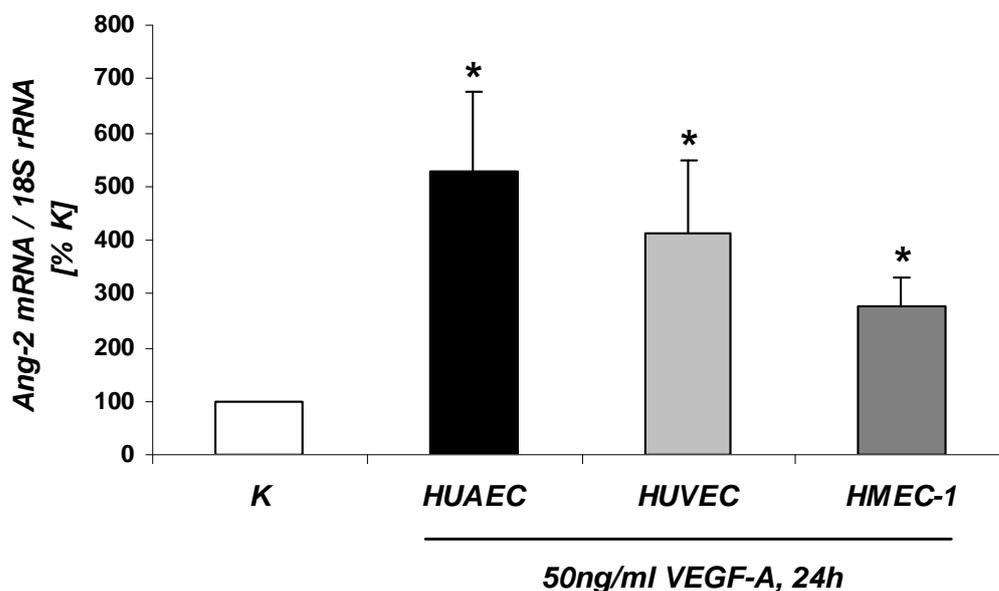


**Abb. 3.19: Einfluss eines VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitors auf die Angiopoietin-2-mRNA-Expression**

Primäre arterielle Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUAEC) wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktor vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit VEGF-A (50ng/ml) und / oder dem VEGF-Rezeptor 2 Inhibitor SU5416 (5 $\mu$ M) für 24 Stunden. Für die Analyse der Angiopoietin-2-mRNA-Expression wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR untersucht und auf die Expression von 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der Inhibitorkontrolle  $\pm$  SEM (n = 3, \* p < 0,05 zur Inhibitorkontrolle, # p < 0,05).

### 3.3.2.2 Regulation des Angiopoietin-2-Promotors durch VEGF-A

Die nachgewiesene Angiopoietin-2-mRNA-Induktion durch den Wachstumsfaktor VEGF-A sollte im Promotor näher analysiert werden. Als Testsystem für die Promotorstudien wurde die Zelllinie HMEC-1 verwendet. Entsprechend den Wachstumsfaktor-Stimulationsversuche in primären Endothelzellen der Nabelschnur wurde auch in der Zelllinie HMEC-1 die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch den Wachstumsfaktor VEGF-A stark induziert (Abb. 3.20  $278\% \pm 51$ ).



**Abb. 3.20: Einfluss von VEGF-A auf die Regulation der Angiopoietin-2-mRNA-Expression in Endothelzellen**

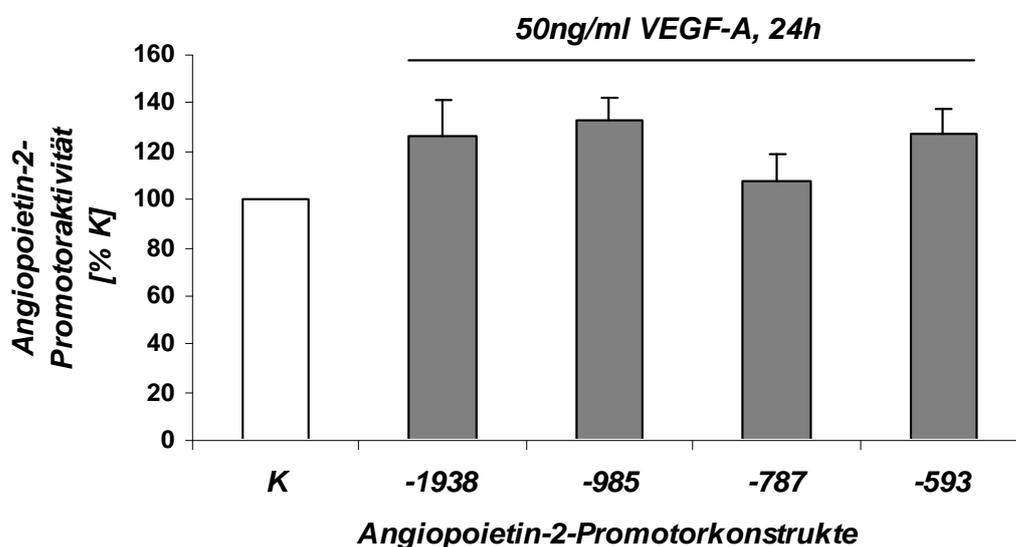
Primäre arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur (HUAEC und HUVEC), sowie mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit 50ng/ml VEGF-A stimuliert. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Der Abgleich erfolgte jeweils auf eine unbehandelte Kontrolle des gleichen Zelltyps. Angabe der Expression als Prozent zur unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle).

Aufgrund der gut detektierbaren Basalaktivität der Plasmide mit den Promotorfragmenten Angpt2Prom-1938, Angpt2Prom-985 und Angpt2Prom-593 (Abb. 3.16), wurde die Regulation von VEGF-A an diesen Konstrukten untersucht. Zusätzlich wurde das Promotorfragment Angpt2Prom-787 mit in die Untersuchung eingeschlossen.

HMEC-1 wurden auf 24-well-Kulturplatten in MV-2 Medium mit  $2\mu\text{g}$  des zu untersuchenden Reportergenplasmids und mit  $0,02\mu\text{g}$  des Kontrollplasmids pRL-CMV durch Lipofektion transfiziert. Das Medium wurde 4 Stunden nach der Transfektion gewechselt und die Zellen in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren umgesetzt.

Zusammen mit dem Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von 50ng/ml VEGF-A. Der Ansatz wurde für 24 Stunden inkubiert und anschließend über den Dual-Luciferase-Assay ausgewertet. Für die Auswertung wurden alle Ergebnisse auf die Transfektionseffizienz mit Hilfe der Aktivität der Renilla-Luciferase des pRL-CMV Plasmids abgeglichen und dann auf die Aktivität des promotorlosen pGL3-Basic Plasmids normalisiert. Im nächsten Schritt erfolgte der Abgleich auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. Die so erhaltenen Werte sind als Prozent der Kontrolle in Abbildung 3.21 dargestellt.

Die Normalisierung der Basalaktivitäten auf den promotorlosen pGL3-Basic-Vektor zeigte zunächst, dass die Promotorfragmente Angpt2Prom-1938, Angpt2Prom-985 und Angpt2Prom-593 in allen Ansätzen eine nachweisbare Aktivität hatten, während das Promotorfragment Angpt2Prom-787 inaktiv war. Die VEGF-A Stimulation (Abb. 3.21) hatte im Vergleich zu der Basalaktivität der unbehandelten Kontrolle keinen Effekt auf die Aktivität der Promotorfragmente Angpt2Prom-1938 und Angpt2Prom-985. Ebenso konnte die VEGF-A Stimulation das Fragment Angpt2Prom-787 nicht aktivieren. Dahingegen deutete sich für das kurze 593bp Fragment, Angpt2Prom-593, ein Trend zu einer leichten Aktivitätssteigerung durch VEGF-A an ( $127\% \pm 10$ ,  $p < 0,1$ ).



**Abb. 3.21: Einfluss von VEGF-A auf die Regulation des Angiopoietin-2-Promotors**

HMEC-1 wurden mit den Angiopoietin-2-Promotorkonstrukten (2µg) Angpt2Prom-1938, Angpt2Prom-985, Angpt2Prom-787 und Angpt2Prom-593 und dem Kontrollplasmid pRL-CMV (0,02µg) in MV-2 Medium transfiziert. Nach 4 Stunden wurde zu Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren gewechselt und gleichzeitig 50ng/ml VEGF-A zugegeben. Die Analyse der Promotoraktivitäten erfolgte 24 Stunden nach der VEGF-A Applikation mit dem Dual-Luciferase-Assay. Angabe der Promotoraktivität als Prozent der jeweils unbehandelten Kontrolle ( $n = 4$ ,  $\# p < 0,1$  zur unbehandelten Kontrolle).

### 3.3.2.3 Regulation der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch Schubspannung

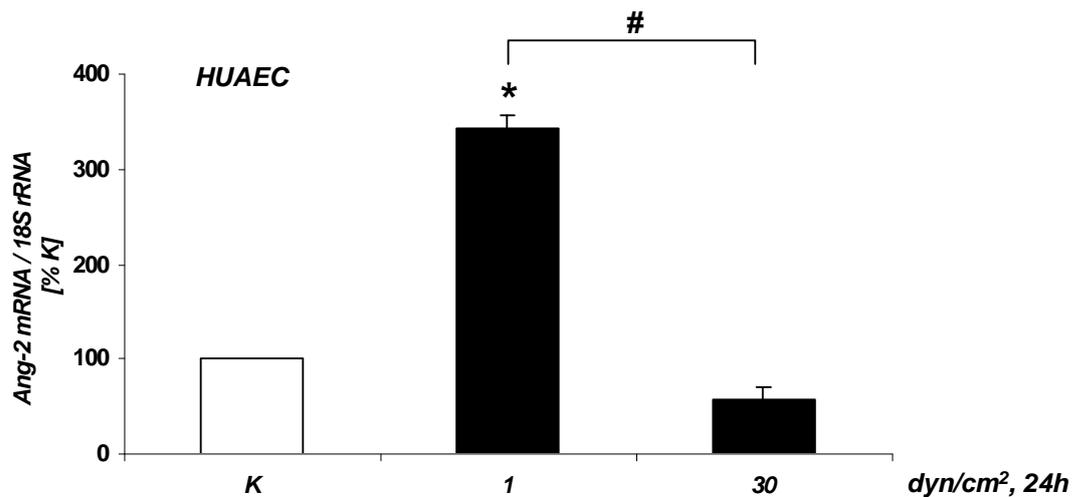
Der Einfluss biomechanischer Kräfte wie Schubspannung ist in arteriellen und venösen Gefäßen physiologischerweise unterschiedlich. Aber auch pathophysiologische Ereignisse, wie z.B. Thrombosen, ziehen eine veränderte Schubspannung in betroffenen Gefäßen nach sich, die bei chronischen Zuständen zu einer veränderten, der Situation sich anpassenden Genexpression in den Zellen führt. Die folgenden Versuche sollten zeigen, inwieweit die transkriptionelle Kontrolle von Angiopoietin-2, einem wichtigem Molekül des angiogenen Umbaus, durch biomechanische Kräfte reguliert wird.

Dazu wurden arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur in einem Plattenkegelviskosimeter unterschiedlichen laminaren Schubspannungen ausgesetzt. Untersucht wurden der Einfluss einer geringen venösen Schubspannung ( $1\text{dyn/cm}^2$ ) und einer hohen arteriellen Schubspannung ( $30\text{dyn/cm}^2$ ) über einen Zeitraum von 24 Stunden. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert und auf die Expression der 18S rRNA normalisiert. Der Abgleich erfolgte auf eine stationäre Kontrolle. Die Schubspannungsversuche wurden auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen in (3) M199-Medium durchgeführt. Dem Medium für hohe Schubspannung wurde zusätzlich zur Erhöhung der Viskosität 5% Dextran zugesetzt.

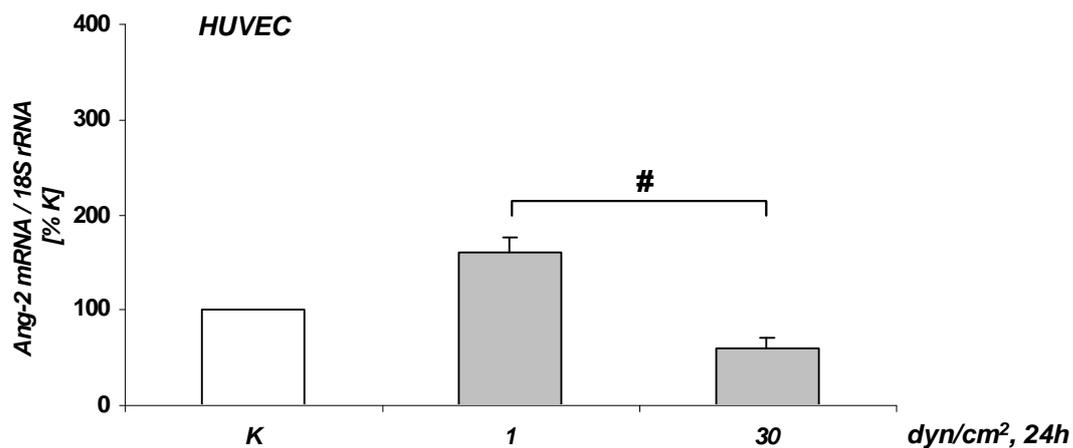
Die Applikation einer geringen laminaren Schubspannung von  $1\text{dyn/cm}^2$  hatte in den HUAEC eine starke Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression zur Folge (Abb. 3.22 A). Im Vergleich zu der stationären Kontrolle erhöhte sich die mRNA-Expression signifikant um den Faktor 3 ( $342\% \pm 14$ ). Dahingegen konnte durch eine hohe arterielle Schubspannung von  $30\text{dyn/cm}^2$  die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 auf  $57\% \pm 14$ ) herabreguliert werden.

In den venösen Endothelzellen kam es durch die geringe Schubspannung ebenfalls zu einer Erhöhung der Angiopoietin-2-mRNA-Expression auf 160% (Abb. 3.22 B). Die Applikation einer hohen arteriellen Schubspannung konnte die basale Expression der stationären Kontrolle auf 60% herabregulieren.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC

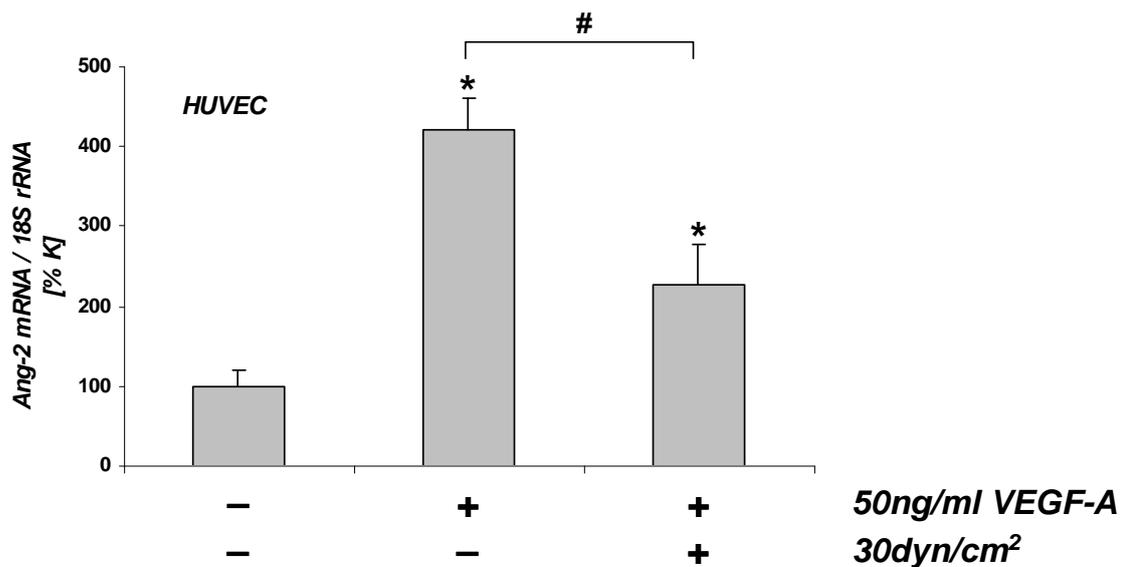


**Abb. 3.22: Einfluss von laminarer Schubspannung auf die Regulation der Angiotensin-2-mRNA-Expression**

HUAEC (A) und HUVEC (B) der ersten Passage wurden für 24 Stunden unterschiedlichen Schubspannungen von 1 dyn/cm<sup>2</sup> und 30 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt. Am Versuchsende wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression über RT-PCR analysiert. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle (n > 3; \* p < 0,05 zur stationären Kontrolle, # p < 0,05).

Des Weiteren sollte untersucht werden, wie der induzierende Einfluss von VEGF-A auf die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch Schubspannung reguliert werden kann. Dazu wurden venöse Endothelzellen der Nabelschnur 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Anschließend wurde gleichzeitig mit der Zugabe von 50ng/ml VEGF-A eine Schubspannung von 30dyn/cm<sup>2</sup> appliziert. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse wurden auf einen Kontrollansatz ohne jegliche Stimulation bezogen.

Die Auswertung zeigte (Abb. 3.23), dass die durch VEGF-A-vermittelte Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch eine hohe arterielle Schubspannung teilweise verhindert werden konnte. In dem Versuchszeitraum von 24 Stunden erreichte die stationäre Stimulation mit VEGF-A eine 4fache Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression (421% ± 41), während die gleichzeitige Applikation von laminarer Schubspannung (30dyn/cm<sup>2</sup>, 24 Stunden) diese Induktion auf die Hälfte verringerte (227% ± 50).



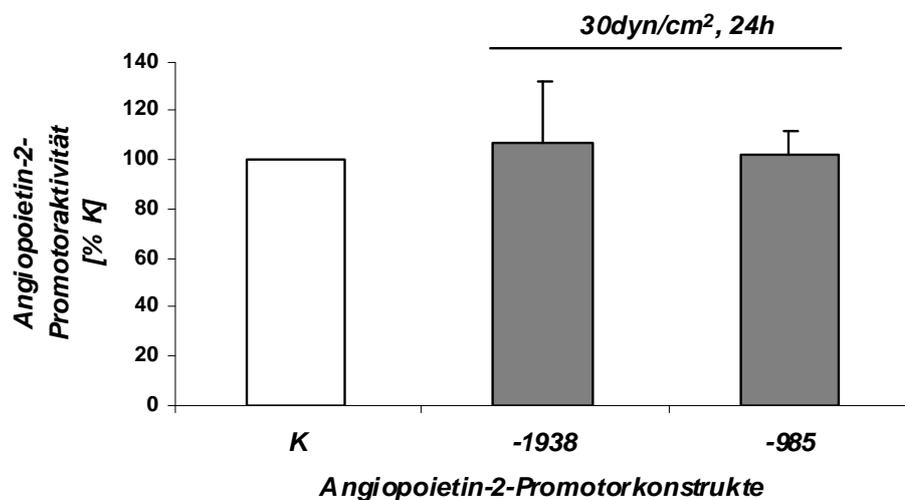
**Abb. 3.23: Einfluss von Schubspannung auf die VEGF-A-abhängige mRNA-Expression von Angiopoietin-2**

HUVEC der ersten Passage wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Anschließend erfolgte die gleichzeitige Zugabe von 50ng/ml VEGF-A und die Applikation laminarer Schubspannung von 30dyn/cm<sup>2</sup> in einem Plattenkegelviskosimeter. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Angabe der Expression als Prozent der stationären, unbehandelten Kontrolle (n = 3, \* p < 0,05 zur Kontrolle, # p < 0,05).

### 3.3.2.4 Regulation des Angiotensin-2-Promotors über Schubspannung

Die schubspannungsabhängige Regulation der Angiotensin-2-Expression sollte auf der Promotorebene analysiert werden. Dazu wurde neben dem „maximalen“ Promotorfragment Angpt2Prom-1938bp, auch das rund 1000 Basenpaaren kürzere Fragment Angpt2Prom-985bp untersucht, um eventuelle Schubspannungs-abhängige Regulatorelemente eingrenzen zu können. HMEC-1 wurden mit Angpt2Prom-1938bp und Angpt2Prom-985bp transfiziert und eine laminare Schubspannung von  $30\text{dyn/cm}^2$  über einen Zeitraum von 24 Stunden appliziert (Abb. 3.24). Danach wurde die Promotoraktivität durch den Dual-Luciferase-Assay gemessen und auf eine stationäre Kontrolle, die mit dem promotorlosen pGL3-Basic Vektor transfiziert wurde, abgeglichen.

Die Auswertung zeigte, dass die Schubspannung die Aktivität der Angiotensin-2 Promotorfragmente nicht beeinflusste. Für beide Fragmente war eine Basalaktivität nachweisbar, die sich aber auch durch die Applikation hoher laminarer Schubspannung nicht änderte.



**Abb. 3.24: Einfluss der Schubspannung auf die Aktivität der Angiotensin-2-Promotorfragmente**

Die Promotorkonstrukte pGL3-Angpt2Prom-1938 und pGL3-Angpt2Prom-985 wurde in HMEC-1 transfiziert. 4 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Applikation laminarer Schubspannung ( $30\text{dyn/cm}^2$ ) über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde die Promotoraktivität mit dem Dual-Luciferase-Assay bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die des promotorlosen Vektors pGL3-Basic normalisiert und auf eine statische Kontrolle abgeglichen. ( $n > 4$ )

### **3.4 Untersuchungen zum Notch-Signalweg in humanen Endothelzellen**

#### **3.4.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Regulation des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen**

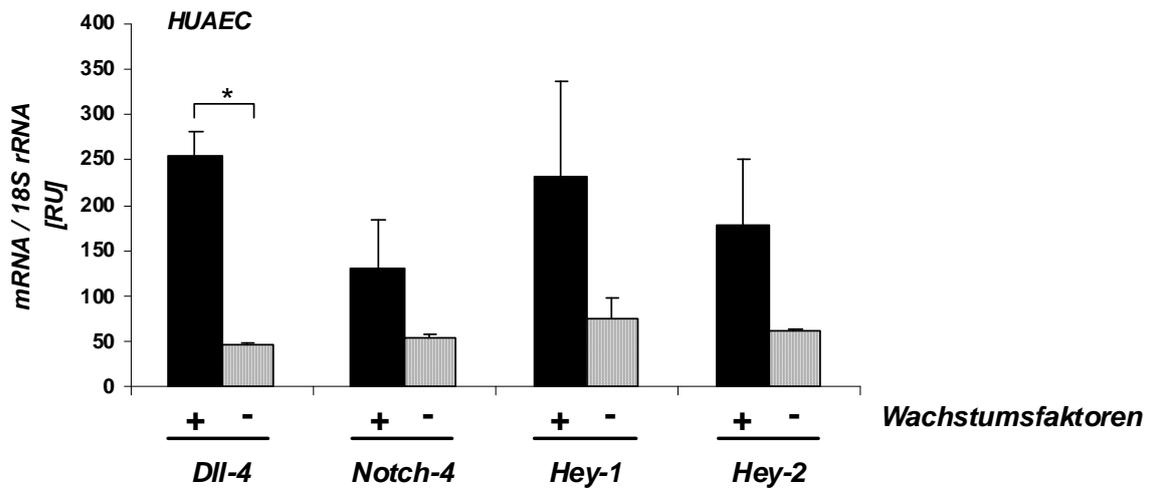
##### **3.4.1.1 Einfluss des Kulturmediums auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen**

Verschiedene Wachstumsfaktoren werden in der Zelldifferenzierung diskutiert. Es sollte daher nach Wachstumsfaktoren gesucht werden, welche die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen regulieren können.

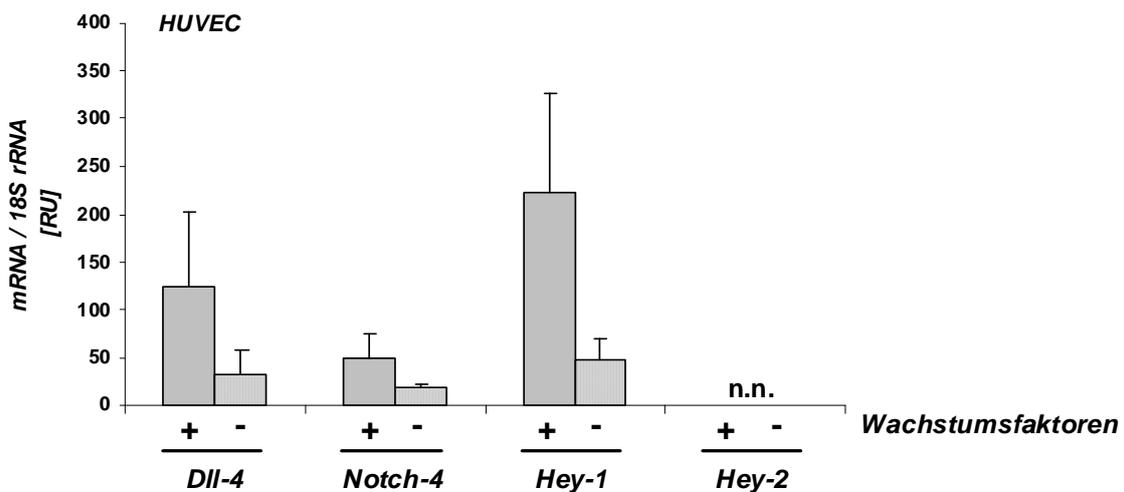
Zunächst wurde untersucht, ob die im Ergebnisteil unter 3.1 beschriebene arteriovenöse Genexpression des Notch-Signalwegs auf den Gehalt an Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Kulturmedien zurückzuführen ist. Die für die Kultivierung von Endothelzellen verwendeten Kulturmedien enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Wachstumsfaktoren. Die Anzucht erfolgt in (3) M199-Medium, welches durch den Zusatz von fötalem Kälberserum (FCS) und bovinen Wachstumsfaktor reich an Wachstumsfaktoren ist. Dahingegen enthält das für die Stimulationsversuche verwendete Endothelmedium keinerlei Wachstumsfaktoren. Das Vollmedium fördert die Proliferation der Zellen, während der Entzug der Wachstumsfaktoren mit dem Minimalmedium die Zellen in einen Ruhezustand versetzt.

Konfluente, in (2) M199-Medium angezogene arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur wurden am Versuchstag gewaschen und entsprechend dem Versuchsansatz entweder mit Endothelmedium als Minimalmedium oder mit (3) M199 als Vollmedium versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Genexpression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR quantifiziert. Der interne Abgleich erfolgte auf die Expression der 18S rRNA.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC



**Abb. 3.25: Einfluss des Kulturmediums auf die arteriovenöse Differenzierung des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen**

HUAEC (A) und HUVEC (B) der ersten Passage wurden in (3) M199-Medium bis zur Konfluenz angezogen. Am Versuchstag wurden die Zellen gewaschen und in (3) M199 als Wachstumsfaktor-reiches Vollmedium weiter inkubiert oder mit Endothelmedium als Minimalmedium ohne jegliche Wachstumsfaktoren versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von Dll4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR untersucht. Angabe der Expression in relativen Einheiten [RU]  $\pm$  SEM ( $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ , n.n. nicht nachweisbar).

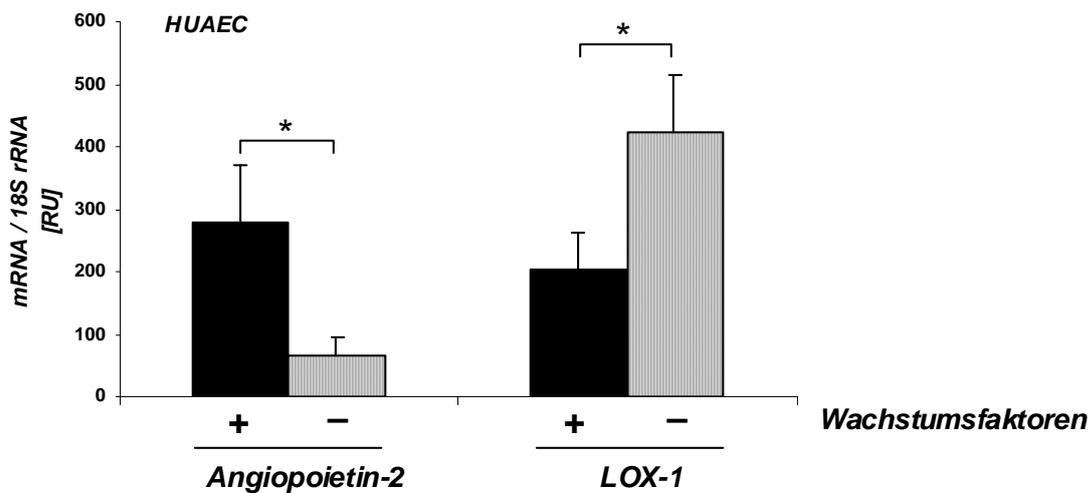
Die in Abbildung 3.25 A dargestellte Auswertung der mRNA-Expression der Gene des Notch-Signalwegs in HUAEC ergab, dass die Expression aller untersuchten Gene durch den Wechsel von Vollmedium auf Minimalmedium herabreguliert wurde. Dennoch war immer noch eine basale Expression in dem Minimalmedium durch RT-PCR nachweisbar. Die mRNA-Expression des Gens Dll-4 wurde durch den Entzug der Wachstumsfaktoren von  $256 \text{ RU} \pm 26$  im Vollmedium signifikant auf  $46 \text{ RU} \pm 3$  herabreguliert. Die Gene von Notch-4, Hey-1 und Hey-2 waren im Minimalmedium im Gegensatz zu dem Wachstumsfaktor-reichen Vollmedium um den Faktor 2 bis 3 schwächer exprimiert.

Die Auswertung der Expression des Notch-Signalwegs in venösen Endothelzellen (Abb. 3.25 B) unterlag hohen Schwankungen. Dennoch deutete sich für den Wechsel von dem Vollmedium auf das Minimalmedium eine Herabregulation der mRNA-Expression an. Die Expression von Hey-2 in HUVEC war in keinem der beiden Kulturmedien nachweisbar.

Die für die Kultivierung und die Stimulationsversuche verwendeten Medien hatten keinen Einfluss auf die arteriovenöse Expression der Gene des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen der Nabelschnur. Trotz der Herabregulation von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 im Minimalmedium war die arterielle Expression dieser Gene stärker, als in venösen Endothelzellen.

Zusätzlich wurde mit Angiopoietin-2 und dem LOX-1 Rezeptor die Expression von Genen untersucht, die nicht in der Signalkaskade von Notch liegen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die Regulationsphänomene im Notch-Signalweg nur ein Resultat des Mediumwechsels sind, das unspezifisch alle Gene betrifft.

Konfluente, in (2) M199-Medium angezogene, arterielle Endothelzellen der Nabelschnur wurden am Versuchstag gewaschen und entsprechend dem Versuchsansatz entweder mit Endothelmedium als Minimalmedium, oder mit (3) M199 als Vollmedium versetzt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Genexpression von Angiopoietin-2 und dem LOX-1 Rezeptor durch RT-PCR quantifiziert. Der interne Abgleich erfolgte auf die Expression der 18S rRNA.



**Abb. 3.26: Einfluss des Kulturmediums auf die arteriovenöse Differenzierung in humanen arteriellen Endothelzellen**

HUAEC der ersten Passage wurden in (3) M199-Medium bis zur Konfluenz angezogen. Am Versuchstag wurden die Zellen gewaschen und in (3) M199 als Wachstumsfaktor-reiches Vollmedium weiter inkubiert oder mit Endothelmedium als Minimalmedium ohne jegliche Wachstumsfaktoren versetzt. Nach 24 Stunden wurde für die Analyse der Angiopoietin-2- und LOX1-mRNA-Expression die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression in relativen Einheiten [RU]  $\pm$  SEM ( $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ ).

Die Auswertung von Genen, die nicht im Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg stehen ergab (Abb. 3.26), dass der Entzug von Wachstumsfaktoren die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 herabregulierte, während die mRNA-Expression des LOX-1-Rezeptors induziert wurde. Das Gen von Angiopoietin-2 lag in dem Minimalmedium ( $66 \text{ RU} \pm 30$ ) um den Faktor 4 schwächer exprimiert vor, als im Wachstumsfaktor-reichen Vollmedium ( $282 \text{ RU} \pm 90$ ). Während für den LOX-1-Rezeptor im Vollmedium eine Expression von  $202 \text{ RU} \pm 60$  nachweisbar war, wurde diese durch den Entzug der Wachstumsfaktoren um den Faktor 2 auf  $425 \text{ RU} \pm 85$  verstärkt.

---

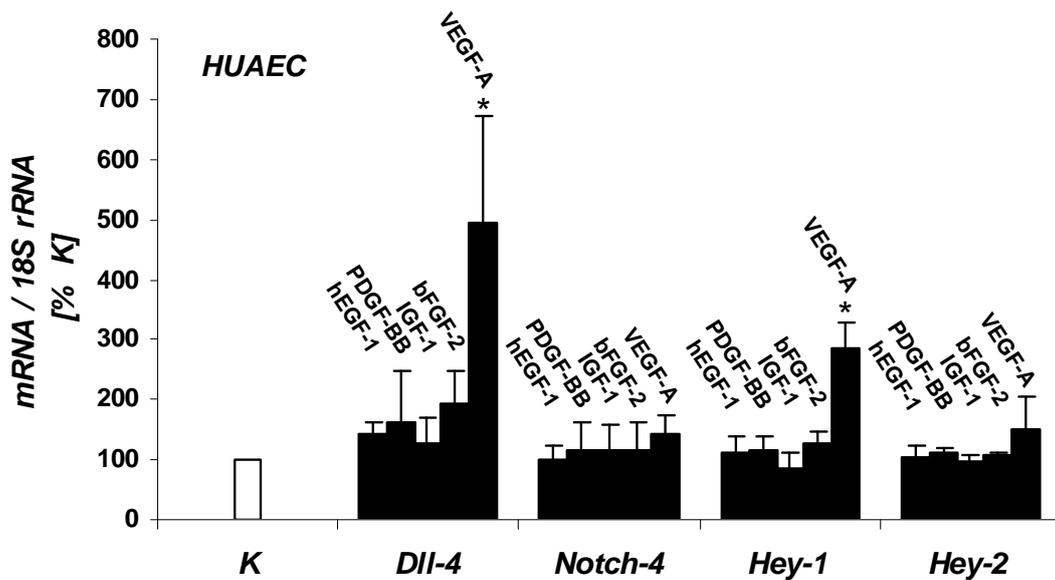
### **3.4.1.2 Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren auf die Regulation des Notch-Signalwegs**

Das dem Vollmedium zugesetzte fötale Kälberserum und der bovine Wachstumsfaktor aus der Retina von Kälberaugen enthalten einen nicht definierten Gehalt an Wachstumsfaktoren. Es sollte daher untersucht werden, welcher Wachstumsfaktor speziell einen Einfluss auf die Expression differenziell exprimierter Gene in arteriellen und venösen Endothelzellen hat.

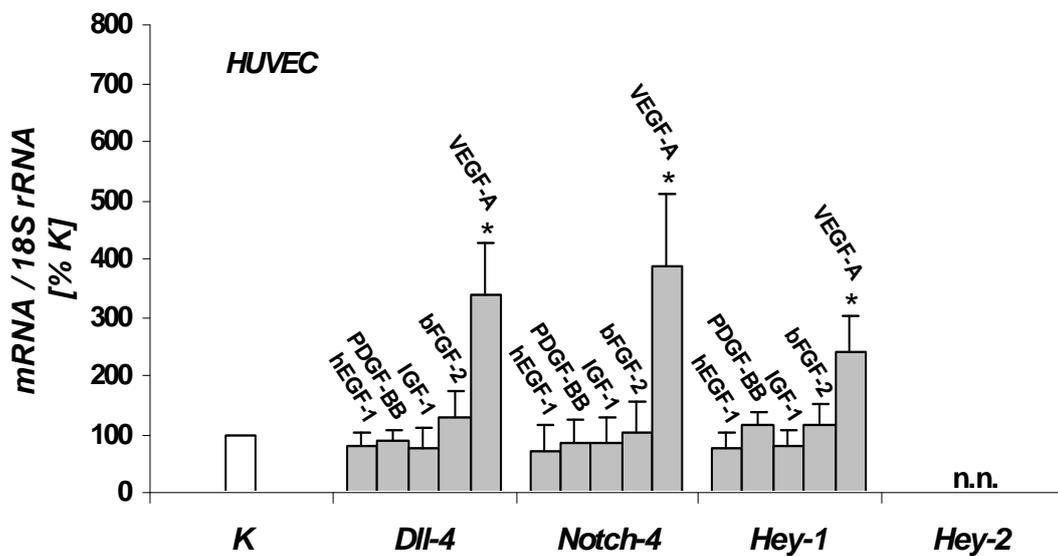
Es wurden die Wachstumsfaktoren hEGF-1, IGF-1 und PDGF-BB getestet, sowie mögliche Wachstumsfaktoren im Rahmen der Zelldifferenzierung, wie bFGF-2 und VEGF-A.

Die Stimulationsversuche wurden mit arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur durchgeführt. Nach einer Vorinkubation in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren wurde am Versuchstag der entsprechende Wachstumsfaktor in das Kulturmedium gegeben (hEGF-1 0,1ng/ml, IGF-1 20ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, bFGF-2 1ng/ml, VEGF-A 50ng/ml). Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von Dll4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR untersucht. Als interner Abgleich wurde auf die mRNA-Expression der 18S rRNA normalisiert und die Ergebnisse als Prozent der unbehandelten Kontrolle angegeben (Abb. 3.27).

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC



**Abb. 3.27: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die mRNA-Expression von Molekülen des Notch-Signalwegs**

Konfluente HUAEC (A) und HUVEC (B) der ersten Passage wurden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren für 16 Stunden vorinkubiert. Dann wurden die Zellen für 24 Stunden mit den Wachstumsfaktoren (hEGF-1 0,1ng/ml, IGF-1 20ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, bFGF-2 1ng/ml oder VEGF-A 50ng/ml) inkubiert. Für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2, wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ; \* $p < 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle, n.n. nicht nachweisbar).

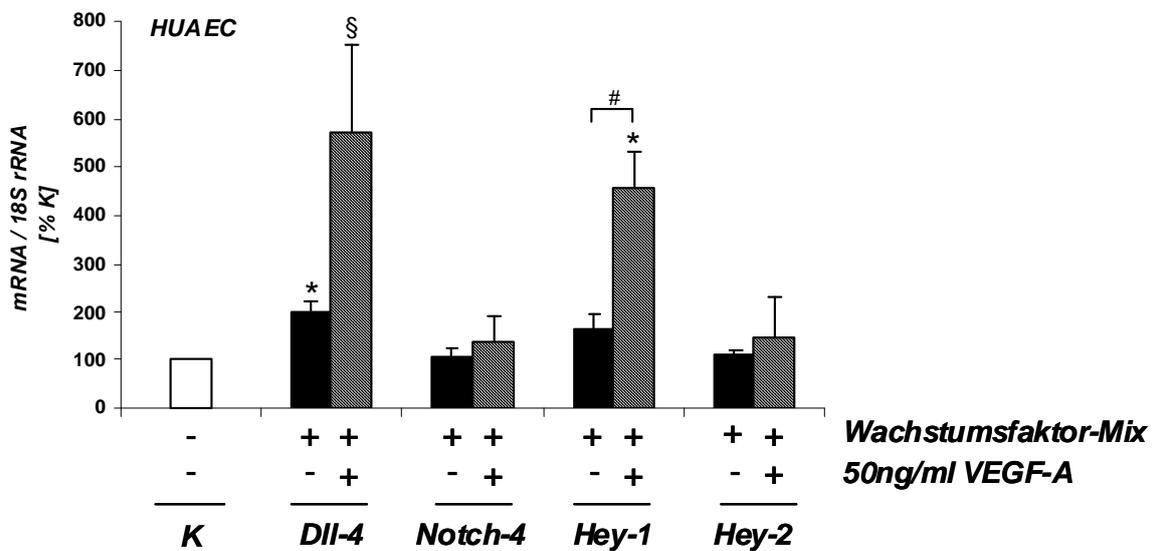
Die detaillierte Auswertung der einzelnen Moleküle des Notch-Signalwegs ergab, dass die arterielle mRNA-Expression (Abb. 3.27 A) von Dll-4 durch den Wachstumsfaktor VEGF-A im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um das 5fache induziert wurde ( $493\% \pm 180$ ). Regulatorische Effekte auf die Dll-4 Expression durch hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB oder bFGF-2 waren nicht nachweisbar. Die Expression des Notch-4-Rezeptors wurde durch keinen der getesteten Wachstumsfaktoren beeinflusst. Die Expression von Hey-1 wurde durch die Stimulation mit VEGF-A auf  $284\% \pm 44$  verstärkt, hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB oder bFGF-2 hatten keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Hey-1. Die mRNA-Expression von Hey-2 wurde in den HUAEC durch keinen der getesteten Wachstumsfaktoren signifikant beeinflusst.

Durch die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor VEGF-A wurde eine signifikante Induktion der mRNA-Expression in venösen Endothelzellen (Abb. 3.27 B) von Dll-4 ( $337\% \pm 89$ ), Notch-4 ( $386\% \pm 125$ ) und Hey-1 ( $239\% \pm 63$ ) erreicht. Die Auswertung der ebenfalls untersuchten Wachstumsfaktoren hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB oder bFGF-2 zeigte in den HUVEC keine regulatorischen Effekte auf die Expression dieser drei Moleküle. Die mRNA-Expression von Hey-2 wurde durch keinen der getesteten Wachstumsfaktoren induziert und war durch RT-PCR nicht nachweisbar.

Mögliche Effekte in der Regulation des Notch-Signalwegs wurden sowohl in den HUAEC, als auch in den HUVEC durch die Stimulation mit VEGF-A erzielt. Die Wachstumsfaktoren hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB und bFGF-2 waren unter den gewählten Bedingungen allein nicht in der Lage, den Notch-Signalweg der HUAEC und HUVEC zu regulieren.

Verschiedene Signalkaskaden, ausgelöst von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, haben oft gemeinsame Schaltstellen, um dieses Signal zu verstärken oder abzuschwächen bzw. abzuschalten. Daher sollte ein zusätzlicher Versuch zeigen, ob die Wachstumsfaktoren gemeinsame synergistische oder antagonistische Effekte auf die Regulation des Notch-Signalwegs haben. Konfluente arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur wurden zunächst 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorinkubiert. Am Versuchstag wurde eine Mischung aus Wachstumsfaktoren dazugegeben, bestehend aus hEGF-1 (0,1ng/ml), IGF-1 (20ng/ml), PDGF-BB (10ng/ml) und bFGF-2 (1ng/ml), der entsprechend des Versuchsansatzes VEGF-A (50ng/ml) zugesetzt wurde. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von Dll4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR untersucht. Als interner Abgleich wurde auf die mRNA-Expression der 18S rRNA normalisiert und in Prozent der unbehandelte Kontrolle angegeben.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC

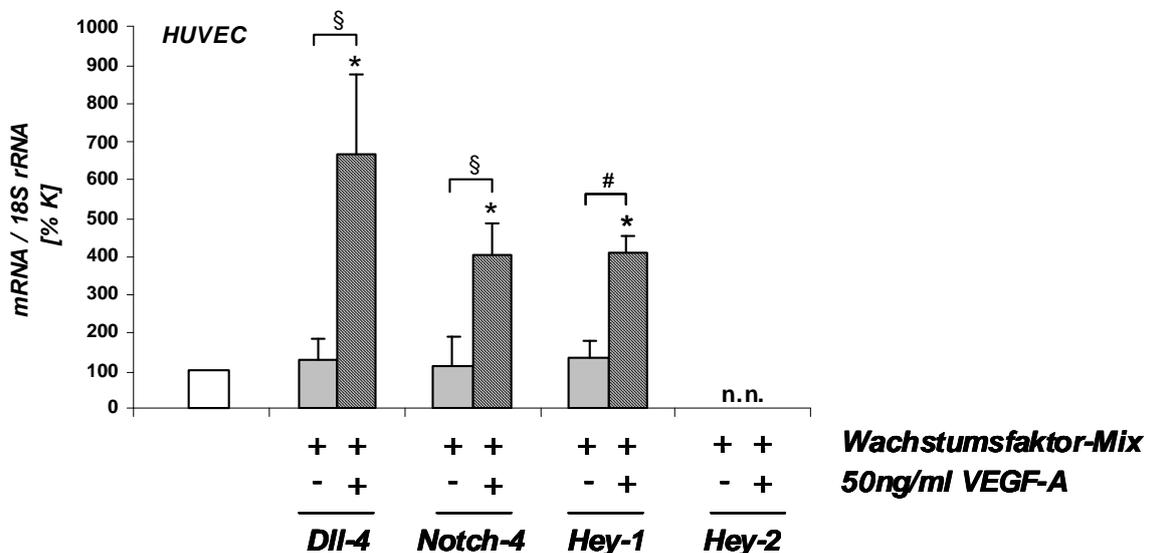


Abb. 3.28: Interaktion verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Expression von Genen des Notch-Signalwegs in HUVEC und HUAEC

Konfluente HUAEC (A) und HUVEC (B) wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorinkubiert. Danach erfolgte die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor-Mix (hEGF-1 0,1ng/ml, IGF-1 20ng/ml, PDGF-BB 10ng/ml, bFGF-2 1ng/ml) +/- VEGF-A (50ng/ml) für 24 Stunden. Für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle (K)  $\pm$  SEM (n = 3; \* p < 0,05 zur unbehandelten Kontrolle; # p < 0,05; § p < 0,1, n.n. nicht nachweisbar).

Obwohl die einzelnen Wachstumsfaktoren hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB oder bFGF-2 keinen nachweisbaren Effekt zeigten, konnte durch die Stimulation mit einem Mix dieser vier Wachstumsfaktoren die arterielle mRNA-Expression (Abb. 3.28 A) von Dll-4 leicht induziert werden ( $197\% \pm 22$ ). Die zusätzliche Stimulation mit VEGF-A verstärkte die Expression auf  $573\% \pm 178$  ( $p < 0,1$ ). Die Induktion von Dll-4 durch den Wachstumsfaktor-Mix in Kombination mit VEGF-A entsprach der Transkriptionsverstärkung der Stimulation mit VEGF-A alleine (Abb. 3.27 A:  $493\% \pm 180$ ).

Die mRNA-Expression des Rezeptors Notch-4 in den HUAEC wurde weder durch die Mischung der Wachstumsfaktoren alleine, noch durch die Kombination mit VEGF-A beeinflusst.

Die Transkription von Hey-1 konnte durch den Wachstumsfaktor-Mix alleine nicht reguliert werden. Erst durch die Zugabe von VEGF-A wurde die mRNA-Expression von Hey-1 unabhängig von den anderen Wachstumsfaktoren signifikant auf  $458\% \pm 73$  erhöht.

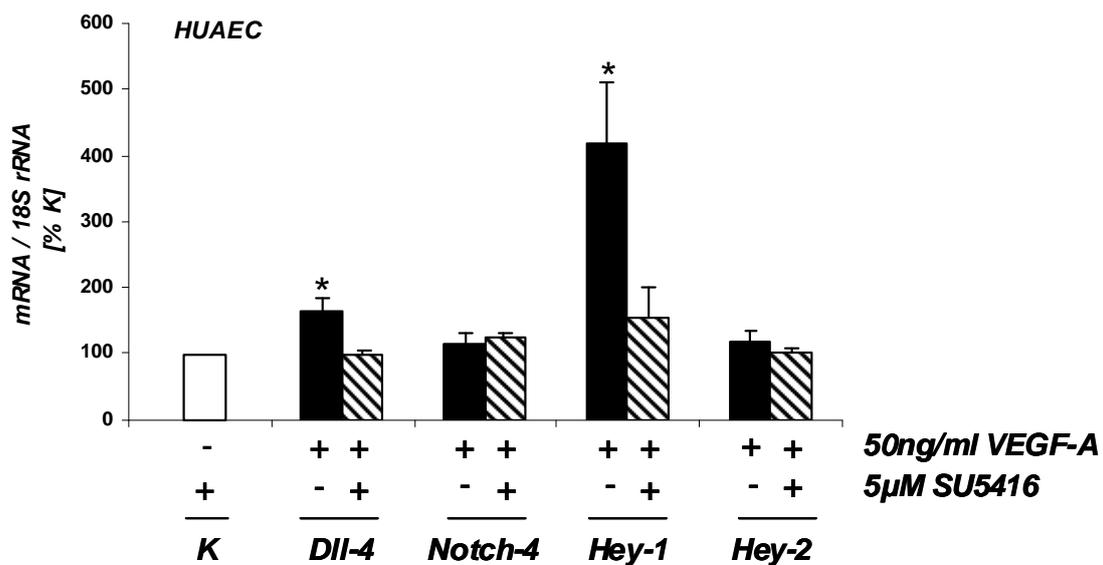
Auf die Expression der mRNA von Hey-2 konnten durch die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren keinerlei Effekte nachgewiesen werden.

In den HUVEC hatte der Wachstumsfaktor-Mix aus hEGF-1, IGF-1, PDGF-BB und bFGF-2 auf keines der untersuchten Moleküle des Notch-Signalwegs einen signifikanten Einfluss (Abb. 3.28 B). Dahingegen konnte durch die zusätzliche Stimulation mit VEGF-A eine massive Induktion der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4 und Hey-1 erzielt werden, die somit unabhängig von dem Wachstumsfaktor-Mix war. Die Expression von Hey-2 in den venösen Endothelzellen wurde nicht induziert.

Von den untersuchten Wachstumsfaktoren war nur VEGF-A allein in der Lage, die mRNA-Expression von Molekülen des Notch-Signalwegs zu regulieren. Diese Transkriptionskontrolle sollte mit einer Inhibitorstudie näher untersucht werden. Durch die Inhibierung des VEGF-Rezeptors 2 über die Blockade seiner spezifischen Kinase mit dem Inhibitor SU5416 sollte analysiert werden, ob VEGF-A über den VEGF-Rezeptor 2 die Gene des Notch-Signalwegs aktiviert.

Arterielle Endothelzellen der Nabelschnur wurden 16 Stunden mit Wachstumsfaktor-freien Endothelmedium vorbehandelt. Danach erfolgte die Zugabe von 50ng/ml VEGF-A und / oder 5 $\mu$ M des VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitor III (SU5416). In dem Kontrollansatz wurden Endothelzellen nur mit 5 $\mu$ M SU5416 behandelt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von Dll4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR untersucht. Als interner Abgleich wurde auf die mRNA-Expression der 18S rRNA normalisiert und auf die Inhibitor-Kontrolle abgeglichen.

Die Auswertung ergab, dass die durch VEGF-A vermittelte Induktion der mRNA-Expression von Dll-4 und Hey-1 durch die Inhibierung der VEGF-Rezeptor 2 Kinase vollständig verhindert werden konnte (Abb. 3.29). Dahingegen hatte weder die Inkubation mit VEGF-A, noch die Inkubation mit dem VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitor III einen Einfluss auf die Transkription von Notch-4 und Hey-2.



**Abb. 3.29: Einfluss des VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitors III auf die mRNA-Expression von Genen des Notch-Signalwegs**

Konfluente HUAEC der ersten Passage wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktor vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50ng/ml VEGF-A und / oder 5 $\mu$ M VEGF-Rezeptor 2 Kinase Inhibitor III (SU5416). Nach 24 Stunden wurde für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2, die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression in Prozent zur Inhibitorkontrolle  $\pm$  SEM (n = 2; \* p < 0,05).

### **3.4.2 Einfluss biomechanischer Kräfte auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen**

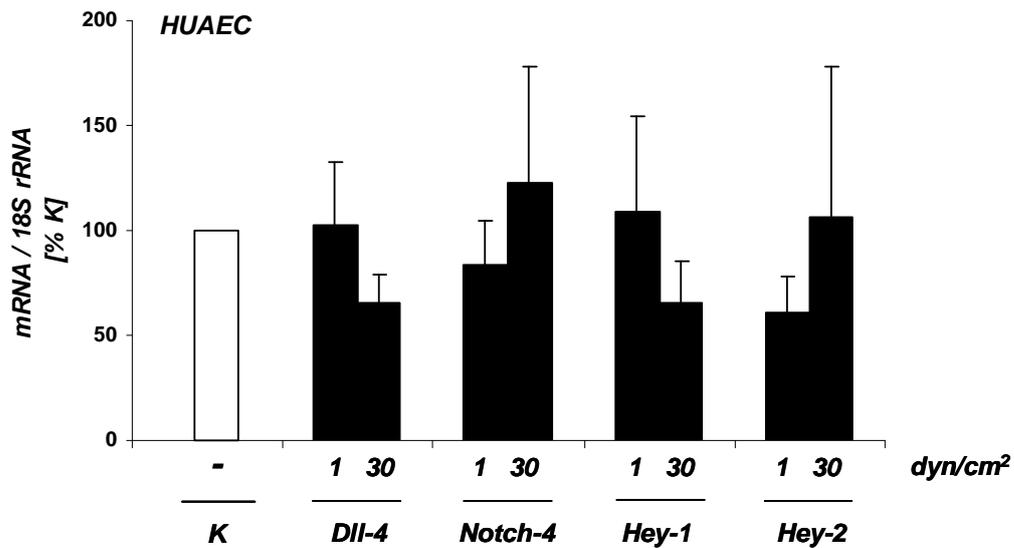
In Abhängigkeit von ihrer Lage und Funktion im Körper übt das strömende Blut unterschiedliche Schubspannungen auf die Blutgefäße aus, welche von den Zellen registriert werden. In den großen arteriellen Blutgefäßen herrscht ein um ein Vielfaches höherer Blutdruck, als in den venösen Blutstrombahnen. Es sollte daher untersucht werden, ob die Schubspannung ein manipulierbarer Parameter der arteriovenösen Differenzierung in humanen Endothelzellen ist.

In einem Plattenkegelviskosimeter wurde der Einfluss laminarer Schubspannung auf die Expression von Genen des Notch-Signalwegs in humanen arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur untersucht. Dabei wurden eine geringe venöse Schubspannung von  $1 \text{ dyn/cm}^2$  und eine hohe arterielle Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  näher untersucht. Die Versuche wurden auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen in (2) M199-Medium durchgeführt. Dem bei hohen Schubspannungswerten verwendeten Medium wurde 5% Dextran zugesetzt. Die Applikation von Schubspannung erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression durch RT-PCR ausgewertet. Die relativen Expressionen wurden auf die Expression der 18S rRNA normalisiert und auf die stationäre Kontrolle abgeglichen.

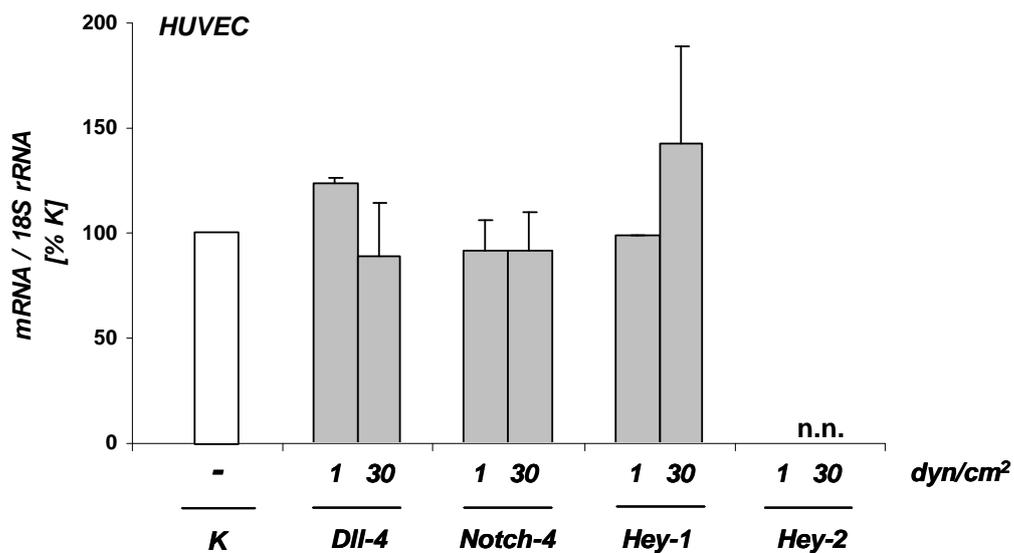
In der Auswertung zeigte sich, dass die langfristige Applikation laminarer Schubspannung in den HUAEC auf keines der untersuchten Moleküle des Notch-Signalwegs einen Einfluss hatte (Abb. 3.30 A). Weder mit der niedrigen Schubspannung, noch mit der hohen Schubspannung konnte die mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 oder Hey-2 reguliert werden.

Ebenso konnte durch die Applikation von Schubspannung die mRNA-Expression von Genen des Notch-Signalwegs in venöse Endothelzellen nicht beeinflusst werden (Abb. 3.30 B). Die mRNA-Expression von Hey-2 war auch unter Schubspannung nicht nachweisbar.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC



**Abb. 3.30: Einfluss venöser und arterieller laminarer Schubspannung auf die mRNA-Expression von Genen des Notch-Signalwegs**

Konfluente primäre HUAEC (A) und HUVEC (B) wurden auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen in (2) M199-Medium ausgesät. Dem Medium des Ansatzes der hohen Schubspannungswerte wurde zusätzlich 5% Dextran zugesetzt. Die Applikation laminarer Schubspannung von 1 dyn/cm<sup>2</sup> bzw. 30 dyn/cm<sup>2</sup> erfolgte für 24 Stunden. Für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der stationären Kontrolle ± SEM (n = 5, n.n. nicht nachweisbar).

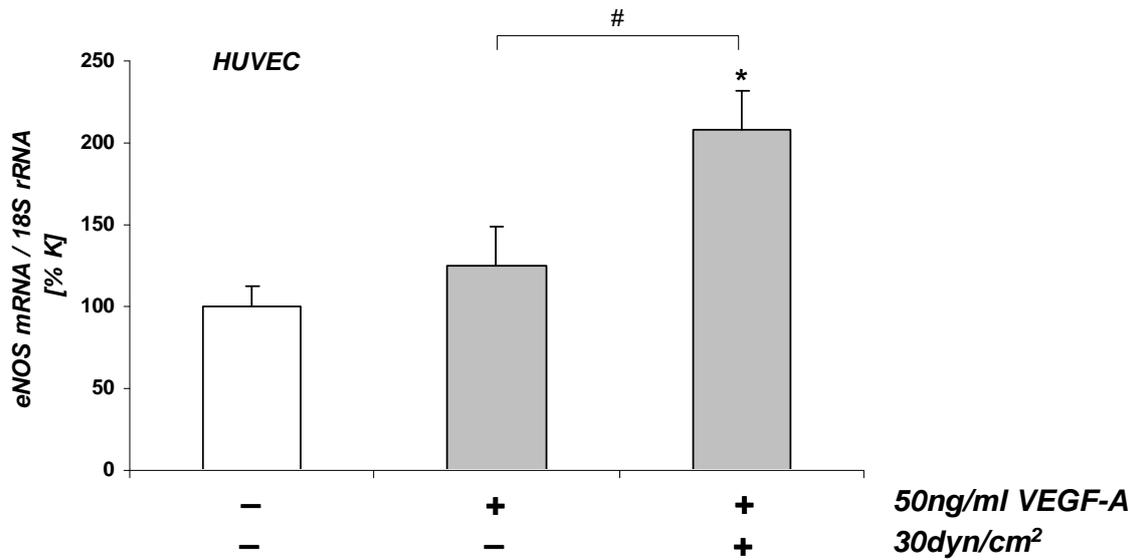
In einem weiteren Versuch wurden HUVEC bei gleichzeitiger Applikation arterieller laminarer Schubspannung mit VEGF-A stimuliert. Venöse Endothelzellen sollten so einem hohen „arteriellen Umgebungsdruck“ ausgesetzt werden, um die Transkription arterieller Gene zu induzieren. Dazu wurden primäre venöse Endothelzellen der Nabelschnur 16 Stunden vor dem Stimulationsversuch in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen in Endothelmedium + 5% Dextran umgesetzt. Die Applikation der laminaren Schubspannung von  $30\text{dyn/cm}^2$  erfolgte 30min nach Zugabe von  $50\text{ng/ml}$  VEGF-A. Die Kontrollen wurden ohne jegliche Applikation von VEGF-A oder von Schubspannung inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR ausgewertet.

Zunächst wurde die mRNA-Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) analysiert (Abb. 3.31 A). Die Auswertung zeigte, dass die Applikation der Schubspannung die Expression der eNOS wie erwartet induzierte, während der Wachstumsfaktor VEGF-A allein keinen Einfluss auf die Expression der eNOS hatte.

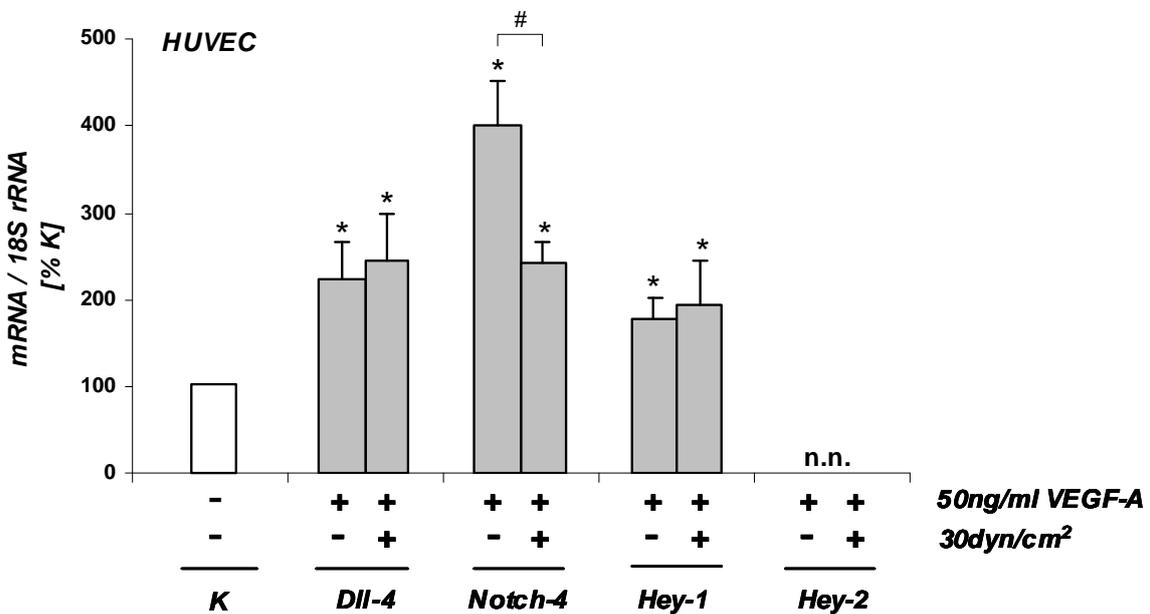
Die Analyse der Gene des Notch-Signalwegs ergab (Abb. 3.31 B), dass in Anlehnung an die Wachstumsfaktor-Stimulationsversuche, der Wachstumsfaktor VEGF-A in venösen Endothelzellen die Transkription von Dll-4 ( $223\% \pm 44$ ), Notch-4 ( $401\% \pm 51$ ) und Hey-1 ( $176\% \pm 26$ ) induzierte. Die durch VEGF-A induzierte mRNA-Expression von Notch-4 wurde durch die Applikation hoher Schubspannung partiell verhindert und erreichte nur noch ein Expressionsniveau von  $243\% \pm 23$ . Die VEGF-A-stimulierte mRNA-Expression von Dll-4 und Hey-1 wurde durch die Applikation arterieller Schubspannung nicht beeinflusst.

Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Hey-2 konnte auch durch die gleichzeitige Applikation von VEGF-A und hoher laminarer Schubspannung nicht nachgewiesen werden.

## (A) eNOS-mRNA-Expression



## (B) mRNA-Expression von Genen des Notch-Signalwegs



**Abb. 3.31: Einfluss der kombinierten Applikation von VEGF-A und arterieller Schubspannung auf die Expression von Genen des Notch-Signalwegs und eNOS in HUVEC**

Konfluente primäre HUVEC auf Gelatine-beschichteten Kulturschalen wurden 16 Stunden in Endothelmedium ohne Wachstumsfaktoren vorinkubiert. Die Applikation der laminaren Schubspannung von 30dyn/cm<sup>2</sup> erfolgte 30min nach Zugabe von 50ng/ml VEGF-A. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression (A) der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und (B) der Moleküle des Notch-Signalwegs Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR analysiert. Angabe der Expression erfolgt in Prozent der unbehandelten stationären Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n > 5$ ; \*  $p < 0,05$  zur unbehandelten stationären Kontrolle; #  $p < 0,05$ , n.n. nicht nachweisbar).

### **3.4.3 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die arteriovenöse Differenzierung**

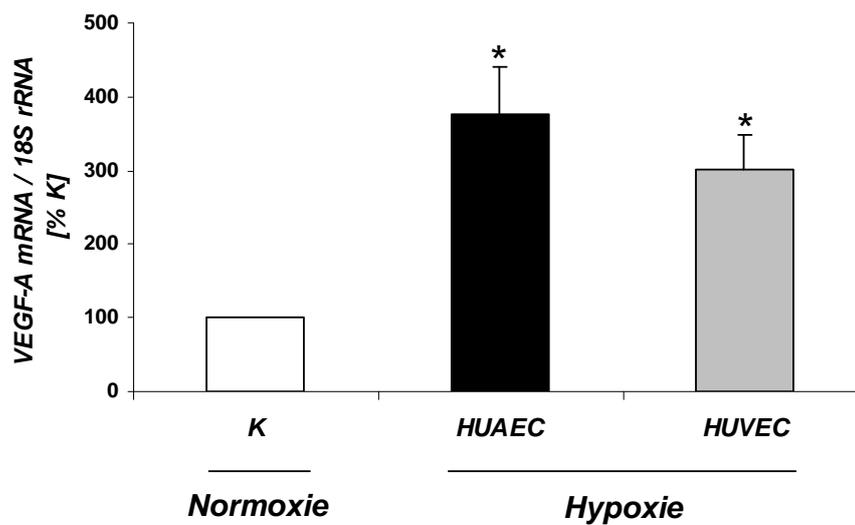
#### **3.4.3.1 Regulation des Notch-Signalwegs**

Im Körper herrschen entlang des Gefäßbaums unterschiedliche Sauerstoffpartialdrücke. Es sollte untersucht werden, ob der Sauerstoffpartialdruck allein die Expression von Markergenen der arteriovenösen Differenzierung beeinflussen kann.

Dazu wurden venöse und arterielle Endothelzellen der Nabelschnur unter hypoxischen Bedingungen kultiviert und die Genexpression auf mRNA-Ebene analysiert.

Konfluente HUAEC und HUVEC wurden in einer Hypoxiekammer bei einem Sauerstoffpartialdruck von 0,5% in (2) M199-Medium für 24 Stunden inkubiert. Parallel dazu wurde die Kontrolle unter normoxischen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Für die Auswertung wurde die relative Expression auf die 18S rRNA normalisiert und auf die normoxische Kontrolle bezogen.

Zunächst sollte durch die Analyse eines Hypoxie-Markers sichergestellt werden, dass das verwendete System hypoxische Bedingungen erreichte. Für den Versuch wurde VEGF-A als Markermolekül herangezogen, dessen mRNA-Expression sowohl in den HUAEC, als auch in den HUVEC durch Hypoxie massiv induziert wurde (Abb. 3.32). Die beobachtete Induktion von VEGF-A war dabei unter hypoxischen Bedingungen in arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur annähernd gleich stark (HUAEC 376% ± 64; HUVEC 301% ± 47). Somit konnten die Expression untersuchter Moleküle des Notch-Signalwegs auf den verringerten Sauerstoffpartialdruck zurückgeführt werden.



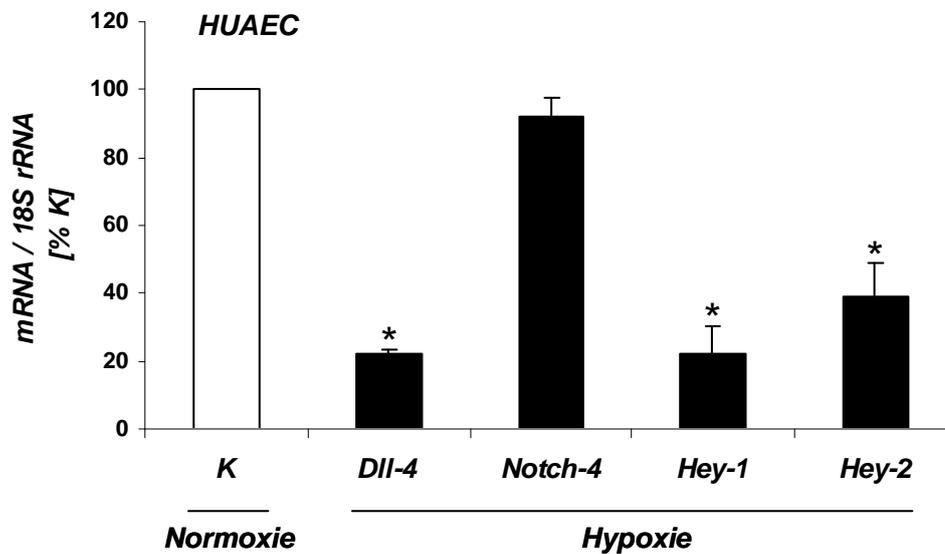
**Abb. 3.32: Einfluss von Hypoxie auf die mRNA-Expression von VEGF-A in humanen Endothelzellen**

Konfluente HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden in einer Hypoxiekammer bei einem Sauerstoffpartialdruck von 0,5% (N<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) für 24 Stunden kultiviert. Eine Kontrolle wurde parallel bei normoxischen Bedingungen im Brutschrank inkubiert (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Die Versuche wurden in (2) M199-Medium durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von VEGF-A durch RT-PCR analysiert. Angabe der Expression als Prozent der normoxischen Kontrolle  $\pm$  SEM (n = 3; \* p < 0,05 zur normoxischen Kontrolle).

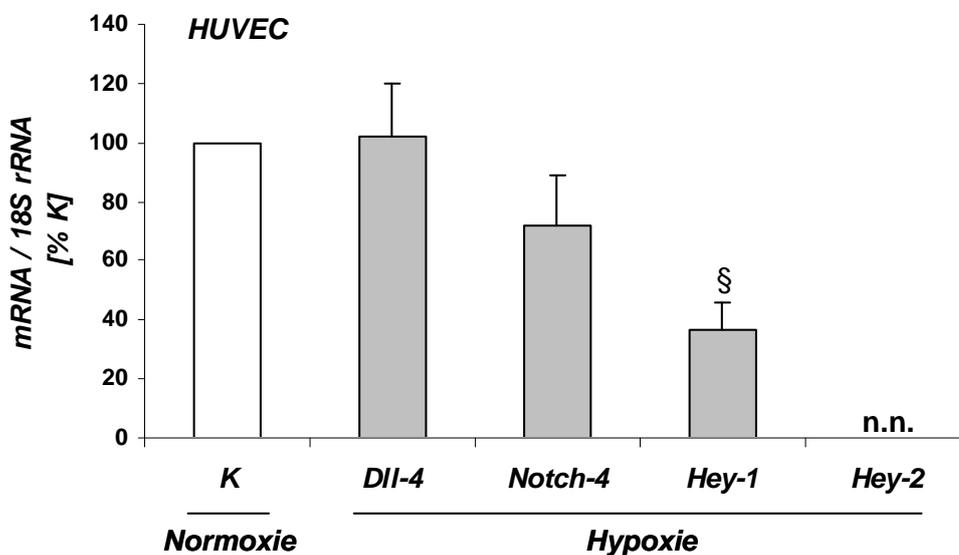
Die Auswertung der mRNA-Expression in arteriellen Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen ergab eine starke Regulation von Molekülen des Notch-Signalwegs (Abb. 3.33 A). Mit der Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks auf 0,5% verringerte sich signifikant das Expressionsniveau des Liganden Dll-4 sowie der beiden untersuchten Zielgene Hey-1 und Hey-2. Im Vergleich zur normoxischen Kontrolle wurde unter hypoxischen Bedingungen eine nachweisbare Herabregulation der mRNA-Expression um den Faktor 3 bis 4 beobachtet (Dll-4 22%  $\pm$  1, Hey-1 22%  $\pm$  7, Hey-2 39%  $\pm$  10). Die mRNA-Expression des Rezeptors Notch-4 wurde in den arteriellen Endothelzellen durch Hypoxie dagegen nicht beeinflusst.

Die Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks hatte auf die venöse mRNA-Expression von Dll-4 und Notch-4 keinen Einfluss (Abb. 3.33 B). Ebenso war die Expression von Hey-2 auch unter hypoxischen Bedingungen nicht nachweisbar. Dahingegen wurde die mRNA-Expression von Hey-1 durch Hypoxie herabreguliert. Durch die Verringerung des Sauerstoffpartialdrucks wurde die Expression in venösen Endothelzellen auf 37%  $\pm$  10 abgeschwächt.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



## (B) mRNA-Expression in HUVEC

**Abb. 3.33: Einfluss von Hypoxie auf die mRNA-Expression von Genen des Notch-Signalwegs**

Konfluente HUAEC (A) und HUVEC (B) wurden in einer Hypoxiekammer bei einem Sauerstoffpartialdruck von 0,5% (N<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) für 24 Stunden kultiviert. Eine Kontrolle wurde bei normoxischen Bedingungen im Brutschrank inkubiert (16% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Alle Versuche wurden in (2) M199-Medium durchgeführt. Für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der normoxischen Kontrolle ± SEM (n = 3; § p = 0,06 zur normoxischen Kontrolle, n.n. nicht nachweisbar).

### 3.4.3.2 Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die 3D-Co-Kultur

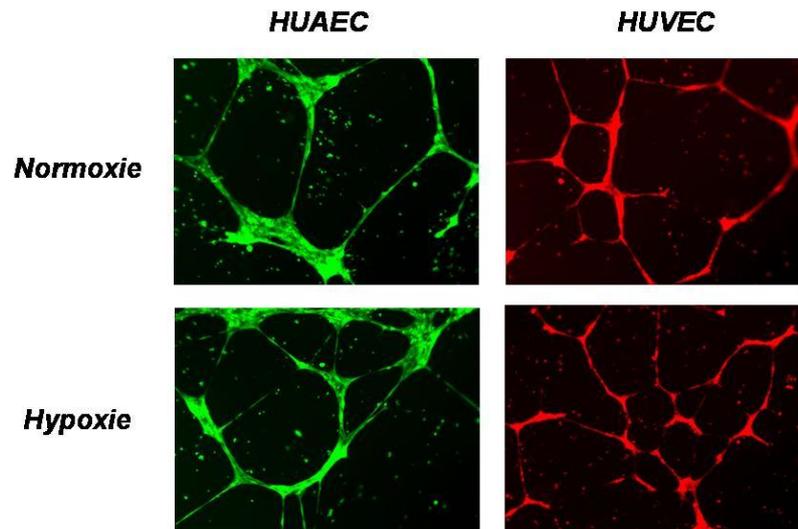
Neben der Genexpression sollte untersucht werden, welchen Einfluss der Sauerstoffpartialdruck auf die Netzwerkbildung von Endothelzellen hat.

Dazu wurden arterielle und venöse Endothelzellen der Nabelschnur sowohl alleine, als auch in einem gemeinsamen Co-Kultur-Ansatz im Matrigel ausgesät und die Netzwerkbildung unter Hypoxie beobachtet. Die Zellen wurden mit CellTracker Vitalfarbstoffen markiert und jeweils in einer Gesamtzahl von 400.000 Zellen pro Ansatz in 400µl Matrigel in (3) M199-Medium in 24-*well*-Kulturplatten ausgesät. Die Versuchsansätze wurden entweder in einer Hypoxiekammer unter  $pO_2$  0,5% kultiviert oder als normoxische Kontrolle im Brutschrank.

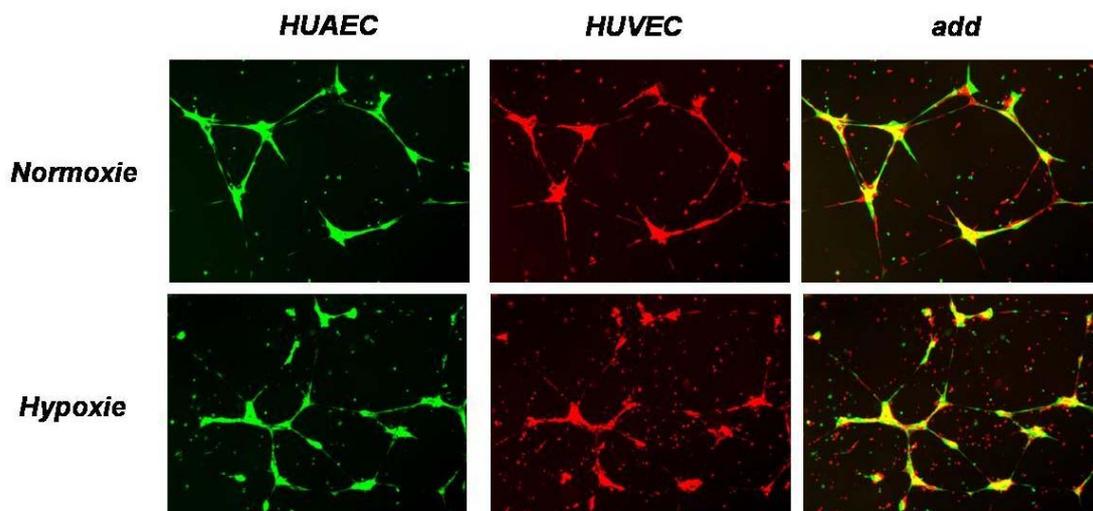
Die Netzwerkbildung sowohl der HUAEC, als auch der HUVEC zeigte in den separaten Ansätzen nach 24 Stunden unter verringertem Sauerstoffgehalt keine auffälligen Abweichungen von den unter normoxischen Bedingungen kultivierten Kontrolle (Abb. 3.34 A). Unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck kam es zur Ausbildung netzartiger Strukturen.

Auch die Co-Kultur arterieller und venöser Endothelzellen zeigte in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck keine besonderen Sortierungsphänomene (Abb. 3.34 B). Das unter hypoxischen Bedingungen gebildete Netzwerk ähnelte phänotypisch dem der normoxischen Kontrolle. In der detaillierten Betrachtung der beiden unterschiedlich markierten Zelltypen deuteten sich zwei separate Netzwerke an. Es konnten jedoch bisher keine Rückschlüsse gezogen werden, ob das Gesamtnetzwerk ein Produkt beider Zelltypen war oder nur der Eindruck durch die beiden parallelen, von einander unabhängig verlaufenden Netzwerke aus HUAEC bzw. HUVEC, entsteht.

## (A) 3D-Kultur



## (B) 3D-Co-Kultur



**Abb. 3.34: Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks auf die Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen im Matrigel-Assay**

HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden mit unterschiedlichen CellTracker Vitalfarbstoffen markiert, und (A) in separaten Ansätzen oder (B) in einer Co-Kultur mit einer Gesamtzellzahl von jeweils 400.000 Zellen pro Ansatz in 400µl Matrigel ausgesät. Die Aussaat erfolgte in (3) M199-Medium. Die Kultivierung erfolgte für 24 Stunden unter hypoxischen Bedingungen in einer Hypoxiekammer (0,5% pO<sub>2</sub>, 95% pN<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>). Die normoxische Kontrolle wurde parallel dazu im Brutschrank kultiviert (21% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>). Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### 3.4.4 Inhibition des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen

Aufgrund der präferenziellen Expression des Notch-Signalwegs in arteriellen Endothelzellen stellte sich die Frage, ob allein über diesen Signalweg die Ausprägung des arteriellen Phänotyps reguliert wird. Im Vordergrund stand dabei der Transkriptionsfaktor Hey-2, der ausschließlich in arteriellen Endothelzellen nachweisbar war, und möglicherweise durch seine Aktivierung über den Notch-Signalweg die arteriovenöse Differenzierung kontrolliert. Daher sollte die Expression von Hey-2 über die Deaktivierung des Notch-Signalwegs ausgeschaltet und mögliche Regulationseffekte auf andere „venöse“ Gene analysiert werden.

Der Notch-Signalweg wurde mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor X blockiert. Dieser aus der Alzheimer-Forschung bekannte Inhibitor blockiert spezifisch die Notch-4 aktivierende Gamma-Sekretase. Dadurch wird die Abspaltung der Notch-Intrazellulären Domäne nach einem Ligand-Rezeptor-Kontakt verhindert und weitere Zielgene in dieser Signalkaskade werden nicht induziert.

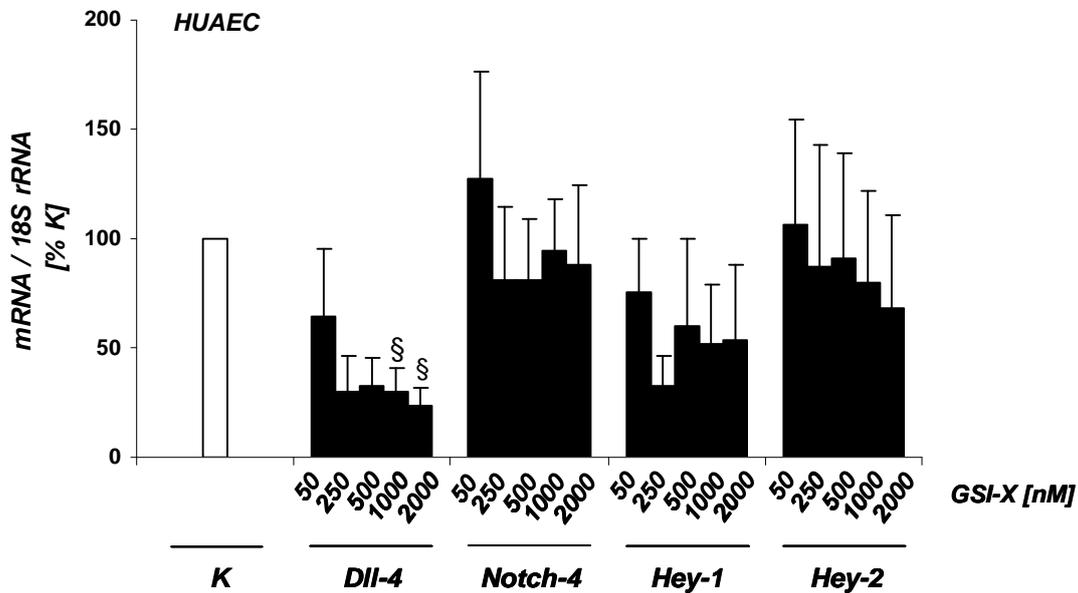
Die Inhibitorversuche wurden mit arteriellen und venösen Endothelzellen der Nabelschnur durchgeführt. Am Versuchstag wurden die konfluenten Zellen mit (3) M199-Medium versetzt und der Inhibitor in definierten Konzentrationen dazu gegeben. Da dieser in DMSO gelöst war, wurden die „unbehandelten“ Kontrollen ebenfalls mit DMSO versetzt. Am entsprechenden Versuchszeitpunkt wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression durch RT-PCR analysiert. Die relativen Expressionswerte wurden auf die jeweilige Expression der 18S rRNA normalisiert und in der Auswertung auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

In einem Dosiskurs wurden zunächst arterielle und venöse Endothelzellen mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen für 16 Stunden inkubiert. Die Analyse der mRNA-Expression in den HUAEC (Abb. 3.35 A) zeigte für keine der eingesetzten Konzentrationen in diesem Zeitraum eine signifikante Herabregulation der Transkription von Hey-1 oder Hey-2. Auch eine eventuelle Regulation der Notch-4-Rezeptor Expression durch die Wirkung des Inhibitors war nicht erkennbar. Für den Liganden Dll-4 deutete sich in hohen Konzentrationen von 1000nM und 2000nM ( $p < 0,1$ ) eine Herabregulation der mRNA-Expression auf nur noch  $30\% \pm 10$  bzw.  $23\% \pm 9$  durch den Inhibitor an.

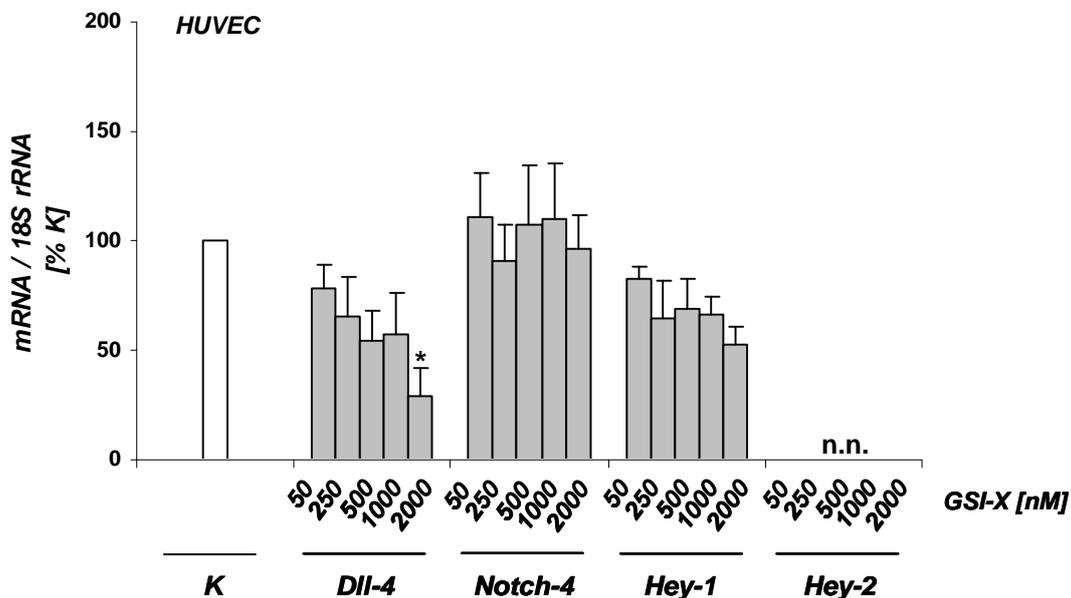
In den venösen Endothelzellen (Abb. 3.35 B) konnte die mRNA-Expression von Dll-4 in diesem Zeitraum durch die hohe Inhibitorkonzentration mit 2000nM signifikant inhibiert werden ( $29\% \pm 12$ ). Auf die mRNA-Expression der Moleküle Notch-4 und Hey-1 konnte mit

keiner der getesteten Konzentrationen ein Effekt erzielt werden. Die Expression von Hey-2 war in keinem der Versuchsansätze nachweisbar.

**(A) mRNA-Expression in HUAEC**



**(B) mRNA-Expression in HUVEC**



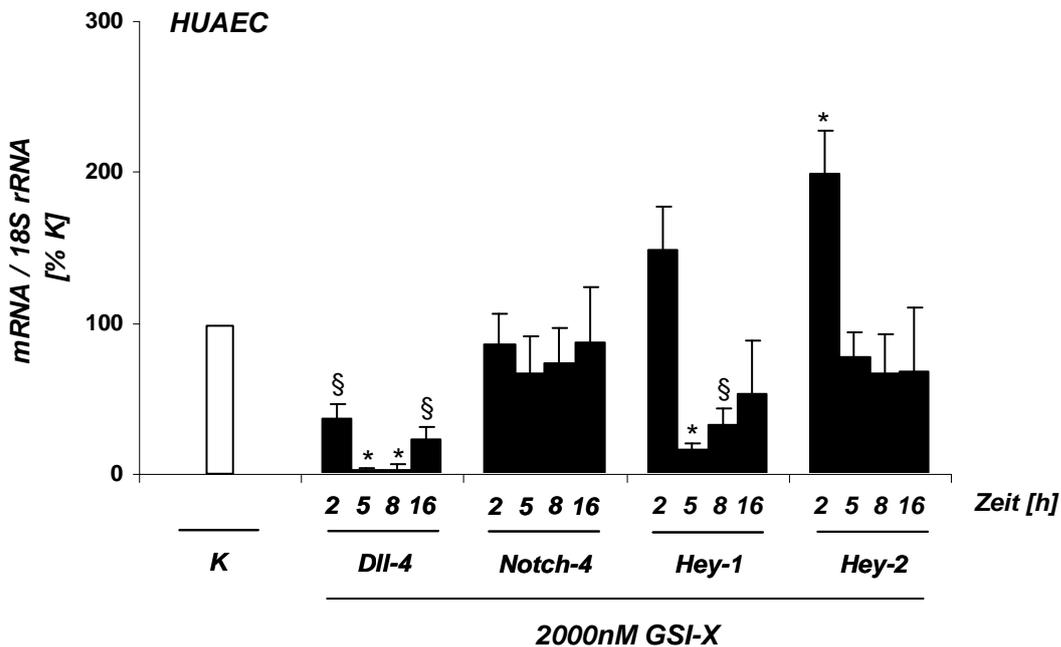
**Abb. 3.35: Expression der Gene des Notch-Signalwegs nach Inhibition des Notch-Signalwegs (Dosiskurs)**

Konfluente HUAEC (A) und HUVEC (B) der ersten Passage wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Gamma-Sekretase-Inhibitors X stimuliert. Die Versuche wurden in (2) M199-Medium durchgeführt. Für die Analyse der mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 wurde die Gesamt-RNA isoliert, durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$  zur unbehandelten Kontrolle; §  $p < 0,1$  zur unbehandelten Kontrolle, n.n. nachweisbar)

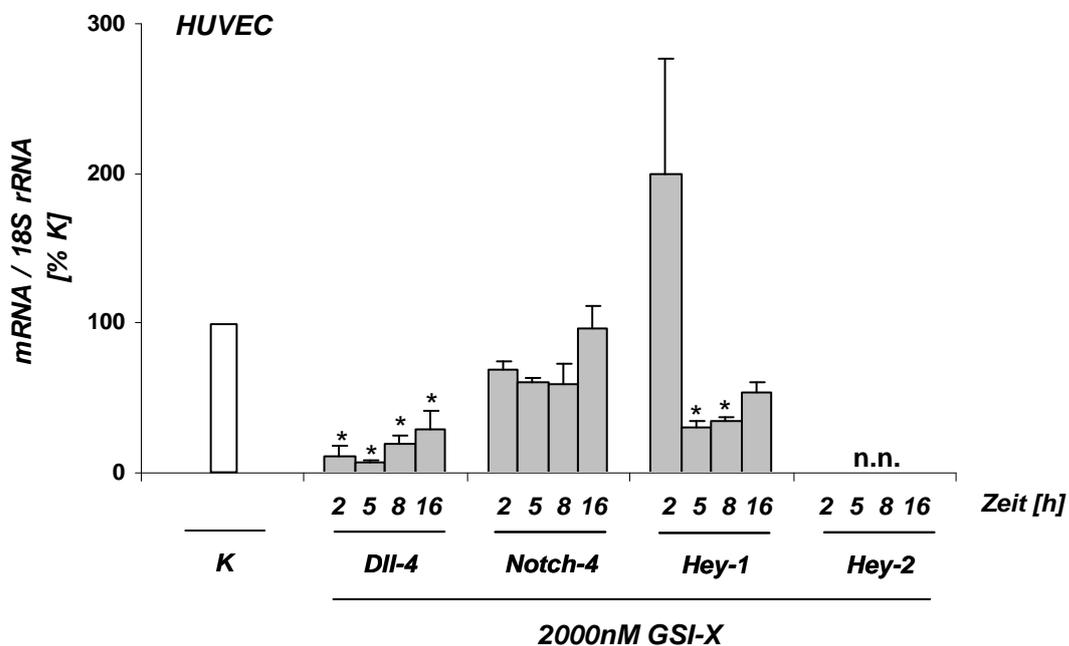
Um auszuschließen, dass zu dem nach Literaturangaben gewählten Endpunkt von 16 Stunden, die Wirkung des Inhibitors nicht herabgesetzt war, wurden die Endothelzellen in einem weiteren Versuch über kürzere Zeiträume mit der höchsten Konzentration von 2000nM inkubiert. Die mRNA-Expression wurde nach 2, 5 und 8 Stunden analysiert.

Die Auswertung zeigte (Abb. 3.36), dass sowohl die arterielle, als auch die venöse mRNA-Expression von Dll-4, schon nach zwei Stunden massiv durch den Inhibitor herabreguliert war und auch noch nach 5h und 8h wirkte. Die mRNA-Expression von Notch-4 wurde weder in den HUAEC noch in den HUVEC an keinem der untersuchten Zeitpunkte durch den Gamma-Sekretase-Inhibitor X inhibiert. Im Zeitverlauf von Hey-1 war zu erkennen, dass erst nach 5h Inkubation mit dem Inhibitor die mRNA-Expression fast vollständig blockiert wurde. Diese Inhibition war auch noch nach 8h wirksam. Die kürzere Stimulationszeit von 2h hatte dagegen keinen Effekt. Diese Regulation von Hey-1 konnte in HUAEC und auf deutlich niedrigerem Niveau in HUVEC gezeigt werden. Für die arterielle mRNA-Expression von Hey-2 war ein anderer Zeitverlauf nachweisbar. Nach 2 Stunden Stimulation mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor X wurde die Expression um den Faktor 2 signifikant induziert ( $199\% \pm 29$ ). Nach weiteren 3 Stunden Stimulation, am Zeitpunkt 5h, war die Expression von Hey-2 wieder auf Kontrollniveau herabreguliert und wurde auch am späteren Zeitpunkt von 8h nicht mehr reguliert. In den venösen Endothelzellen konnte an keinem der untersuchten Zeitpunkte die mRNA-Expression von Hey-2 nachgewiesen werden.

## (A) mRNA-Expression in HUAEC



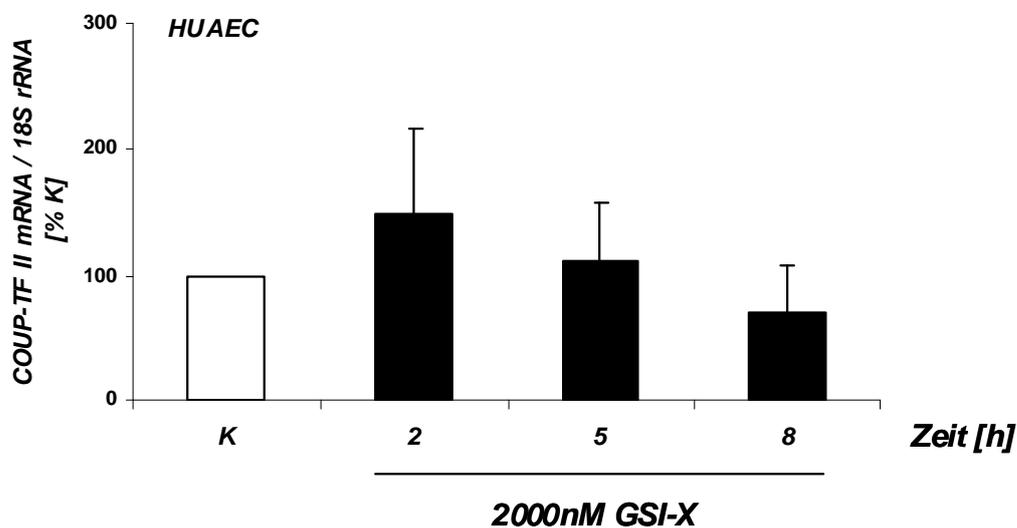
## (B) mRNA-Expression in HUVEC



**Abb. 3.36: Expression der Gene des Notch-Signalwegs nach Inhibition des Notch-Signalwegs (Zeitkurs)**

Konfluente HUAEC (A) und HUVEC (B) der ersten Passage wurden mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitors X in einer Konzentration von 2000nM inkubiert. Die Versuche wurden in (2) M199-Medium durchgeführt. Jeweils zu den Zeitpunkten 2h, 5h, 8h und 16 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert, die mRNA-Expression von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 durch RT-PCR bestimmt und auf die Expression der 18S rRNA abgeglichen. Angabe der Expression als Prozent der jeweils unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM (n = 3; \* p < 0,05 zur unbehandelten Kontrolle; § p < 0,1 zur unbehandelten Kontrolle, n.n. nicht nachweisbar)

Da in arteriellen Endothelzellen über den Gamma-Sekretase-Inhibitor X der Ligand Dll-4 zur Aktivierung der Signal-Kaskade abgeschaltet wurde und auch Hey-1 als ein regulierender Transkriptionsfaktor blockiert ist, wurde hier die mRNA-Expression des venösen Faktors COUP-TF II untersucht. HUAEC wurden mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitors X in einer Konzentration von 2000nM inkubiert. Jeweils zu den Zeitpunkten 2h, 5h und 8h wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von COUP-TF II durch RT-PCR analysiert. Die Analyse ergab (Abb. 3.37), dass an keinem der untersuchten Zeitpunkte die mRNA-Expression von COUP-TF II durch Inhibition des Notch-Signalwegs durch den Gamma-Sekretase-Inhibitor X signifikant reguliert wurde.

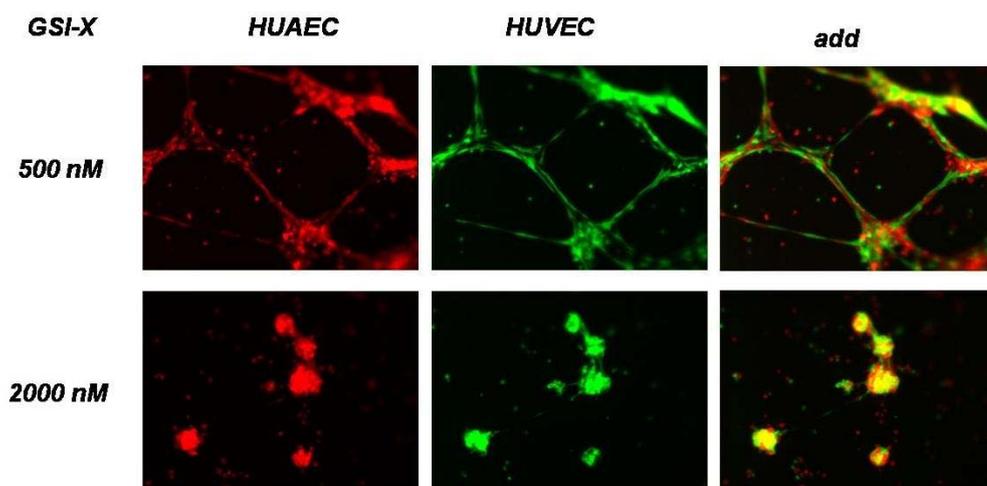


**Abb. 3.37: Einfluss der Inhibition des Notch-Signalwegs auf die mRNA-Expression von COUP-TF II**

Konfluente HUAEC der ersten Passage wurden mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitors X in einer Konzentration von 2000nM inkubiert. Die Versuche wurden in (3) M199-Medium durchgeführt. Jeweils zu den Zeitpunkten 2h, 5h und 8h wurde die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Expression von COUP-TF II durch RT-PCR analysiert. Angabe der Expression als Prozent der unbehandelten Kontrolle  $\pm$  SEM (n = 3).

### 3.4.4.1 Einfluss der Inhibierung des Notch-Signalwegs auf die 3D-Co-Kultur

Im Weiteren sollte die Frage geklärt werden, in wieweit sich die Inhibition des Notch-Signalwegs auf die Netzwerkbildung in einer Co-Kultur arterieller und venöser Endothelzellen auswirkt. Dazu wurde dem Matrigel vor dem Ausplattieren in die Kulturschale eine definierte Konzentration des Gamma-Sekretase-Inhibitors X zugesetzt. In Anlehnung an die Ergebnisse der Inhibitorstudien auf die Genexpression, wurde der Einfluss einer geringen Konzentration von 500nM und der einer hohen Konzentration von 2000nM untersucht. HUAEC und HUVEC wurden mit unterschiedlichen CellTracker Vitalfarbstoffen markiert, gemischt und in 400µl Matrigel + GSI-X in 24-well-Kulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte mit einer Gesamtzellzahl von 400.000 Zellen mit je 200.000 HUAEC und 200.000 HUVEC in EBM-Medium. Die Auswertung nach 16 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop spricht dafür (Abb. 3.38), dass die geringe Inhibitorkonzentration von 500nM die Netzwerkbildung nicht beeinflusste. Das Gesamtnetzwerk bestand aus einer heterogenen Mischung arterieller und venöser Endothelzellen. Die Trennung der beiden verschiedenen markierten Zellarten zeigte zwei separate Netzwerke, die sich von den unter 3.2.3.2 gezeigten „unbehandelten“ Netzwerken phänotypisch nicht unterschieden. Dahingegen konnte mit der hohen Inhibitorkonzentration die Netzwerkbildung in der Co-Kultur vollständig unterbunden werden. In keinem Ansatz konnte eine einzelne Struktur, bestehend aus arteriellen oder venösen Endothelzellen, gefunden werden.



**Abb. 3.38: Einfluss der Inhibition des Notch-Signalwegs auf die endotheliale Netzwerkbildung im Matrigel-Assay.**

HUAEC und HUVEC der ersten Passage wurden mit unterschiedlichen CellTracker Vitalfarbstoffen markiert, gemischt und in 400µl Matrigel + 500nM bzw. 2000nM Gamma-Sekretase-Inhibitor X in 24-well-Kulturplatten ausgesät. Die Aussaat erfolgte in einer Gesamtzellzahl von 400.000 Zellen mit je 200.000 HUVEC und 200.000 HUAEC in EBM-Medium. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte nach 16 Stunden.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen untersucht. Dazu wurden auf molekularer Ebene Markergenen gesucht, welche spezifisch die arterielle und venöse Identität determinieren. In einem nächsten Schritt wurde analysiert, inwieweit die genetische Determinierung durch die gefundenen Markergene endgültig ist. Versuche mit biomechanischen Parametern, der Sauerstoffverfügbarkeit und Wachstumsfaktoren sollten dabei zeigen, ob eine gezielte arteriovenöse Redifferenzierung der Endothelzellen möglich ist. Dazu waren neben den expressions-phänotypischen Analysen die physiologischen Eigenschaften arterieller und venöser Endothelzellen von Interesse. Es wurde daher weiterhin physiologischen Eigenschaften von venösen und arteriellen Endothelzellen verglichen.

### Arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen

Der Vergleich der mRNA-Expression arterieller und venöser Endothelzellen aus der Nabelschnur durch DNA-Microarray-Analysen konnte ein global differenzielles Genmuster nachweisen. Besonders auffällig war dabei die ausschließlich arterielle Expression des Transkriptionsfaktors Hey-2. Diese arterielle Expression von Hey-2 konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Ebene der Proteinexpression bestätigt werden. Das charakteristische arterielle Expressionsprofil von Hey-2 wurde parallel auch von Chi und Mitarbeiter (Chi, JT *et al.*, 2003) gefunden, die 53 unabhängige Endothelzellproben unterschiedlicher Gewebe mit DNA-Mikroarrays untersuchten. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hey-2 ein direktes Zielgen des Notch-Signalweg ist (Nakagawa, O *et al.*, 2000). Weitere, in der vorliegenden Arbeit über den DNA-Mikroarray identifizierte, prominente Gene des Notch-Signalwegs mit einem stark präferenziell arteriellen Expressionsmuster waren Dll-4, Notch-4 und Hey-1. Die mRNA-Expression dieser drei Moleküle war im Gegensatz zu der Expression von Hey-2 ebenfalls in venösen Endothelzellen nachweisbar, wenn auch auf einem deutlich niedrigerem Niveau. Da eine Aktivierung des Notch-Signalwegs durch sonic hedgehog und VEGF im Zebrafisch-Modell zu einer Arterialisierung führte (Lawson, ND *et al.*, 2002), wurden in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Kulturmedien untersucht, da diese in der Regel hohe Konzentrationen an VEGF zur Stimulation der endothelialen Proliferation enthalten.

### **Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen**

Die für die Kultivierung und Stimulationsversuche verwendeten Nährmedien hatten keinen Einfluss auf die differenzielle arteriovenöse Expression der Gene des Notch-Signalwegs in humanen Endothelzellen der Nabelschnur. Trotz der gefundenen Herabregulation von Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 im Minimalmedium blieb die präferentiell arterielle Expression dieser Gene erhalten. In venösen Endothelzellen wurde dabei die Expression von Dll-4, Notch-4 und Hey-1 an die Grenze des Detektionslimits reduziert. Die reduzierte Genexpression im Minimalmedium war nicht allein auf den Notch-Signalweg beschränkt, wie die Expressionsanalyse von Angiopoietin-2 zeigte. Dagegen zeigte die Induktion der mRNA-Expression des LOX-1-Rezeptors durch das Minimalmedium, dass ein Wechsel auf Wachstumsfaktor freies Medium nicht grundsätzlich die Transkriptionsaktivität aller Gene der Zellen reduziert. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass allein durch die Kultivierung der Zellen in Vollmedium unspezifische Aktivierungseffekte die spezifische arterielle endotheliale Expression des Notch-Signalwegs hervorrufen. Zusätzliche Mikroarray-Analysen mit ausschließlich in humanem Serum kultivierten primären Endothelzellen führten zu vergleichbaren Resultaten wie die initialen Mikroarray-Analysen. Die unspezifische Aktivierung der Notch-4 Expression durch endotheliales Wachstumsmedium konnten auch Wu und Mitarbeiter (Wu, J *et al.*, 2005) in nicht-endothelialen HeLa-Zellen nachweisen. Diese Aktivierung erfolgte durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Dabei wurden jedoch Endothel-spezifische Gene, wie die endotheliale NO-Synthase, der VEGF-Rezeptor 2 (Flk-1) oder der von-Willebrand-Faktor nicht aktiviert. Somit ist eine allgemeine AP-1-vermittelte wachstumsfaktorabhängige Aktivierung des Notch-Signalwegs von der spezifisch differenziellen Expression in arteriellen und venösen Endothelzellen zu unterscheiden.

Weitere Analysen zur Inaktivierung des Notch-Signalwegs durch Gamma-Sekretase-Inhibitoren führten zur erwarteten Herabregulation von Hey-1 und Dll-4. Dies bestätigt, dass Hey-1 ein Zielgen von Notch in humanen Endothelzellen ist. Die verringerte Transkription des Liganden Dll-4 nach Inhibition des Notch-Signalwegs wurde von Sainson und Mitarbeiter bestätigt (Sainson, RC *et al.*, 2005). Die Transkription dieser beiden Gene wurde durch die Blockade der Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD) fast vollständig abgeschaltet. Die Transkription des Notch-4-Rezeptors wurde durch die Behandlung der Zellen mit Gamma-Sekretase-Inhibitoren nicht reguliert. Überraschenderweise wurde auch die Transkription von Hey-2 durch die Inhibition des Notch-Signalwegs nicht beeinflusst.

Aufgrund der deutlichen arteriellen Expression der Moleküle des Notch-Signalwegs, aber auch ihrer geringen Expression in venösen Endothelzellen sollte im Weiteren die spezifische Funktion dieses Signalwegs in dem jeweiligen Zelltyp analysiert werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei der Transkriptionsfaktor Hey-2. Dieser konnte, obwohl er als eines der Zielgene des Notch-Signalwegs beschrieben ist, zu keinem Zeitpunkt in humanen venösen Endothelzellen sicher nachgewiesen werden. Daher war es von Interesse, ob durch die Induktion dieses Transkriptionsfaktors über den Notch-Signalweg die Ausbildung des arteriellen Phänotyps determiniert wird oder die arterielle Determinierung mit der Expression von Hey-2 abgeschlossen ist (*maker oder Marker*) (le Noble, F *et al.*, 2004).

Die Genexpression von Hey-2 wurde entgegen der Literaturangaben (Maier, MM and Gessler, M, 2000) durch die Inaktivierung des Notch-Signalwegs nicht wie erwartet herabreguliert. Im Gegensatz dazu wurde nach zwei Stunden sogar eine Induktion der mRNA-Expression beobachtet, die nach acht Stunden wieder auf das Ausgangsniveau sank. Dies spricht für eine wichtige Funktion des Repressors Hey-2 für die Aufrechterhaltung des arteriellen Phänotyps. Nach den vorliegenden Ergebnissen bleibt auch bei der kurzfristigen Abschaltung des Notch-Signalwegs durch die vermehrte Expression oder der verringerte Abbau der Hey-2-mRNA die Reprimierung venöser Gene, z.B. COUP-TF II gewährleistet. Lanner und Kollegen (Lanner, F *et al.*, 2007) konnten zeigen, dass endotheliale Vorläuferzellen, die über einen längeren Zeitraum mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor den Notch-Signalweg inaktiviert hatten, das für den venösen Phänotyp verantwortliche Gen COUP-TF II (You, LR *et al.*, 2005) exprimieren. Die generelle Herabregulation der mRNA-Expression der Moleküle des Notch-Signalwegs in arteriellen und venösen Endothelzellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren läßt auf eine durch Wachstumsfaktoren regulierte Transkription schließen. Die Stimulationsversuche zeigten, dass die Wachstumsfaktoren hEGF-1, PDGF-BB, IGF-1 keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der Notch-Komponenten in humanen Endothelzellen der Nabelschnur hatten. Dagegen induzierte die exogene Applikation des Wachstumsfaktors VEGF-A die Expression des Notch-Liganden Dll-4 und des Notch-Zielgens Hey1 in HUAEC. Durch die spezifische Inhibierung des VEGF-Rezeptor 2 konnte in HUAEC nachgewiesen werden, dass die Transkription der Notch-Moleküle Dll-4 und Hey-1 über Signalwege kontrolliert werden, die direkt über VEGF-A und dem VEGF-Rezeptor 2 ausgelöst werden. VEGF-A ist durch die spezifische Regulation der endothelialen Proliferation und Migration ein entscheidender Faktor in der Entwicklung und in der Aufrechterhaltung des Gefäßsystems. Neuere Studien diskutieren VEGF-A zudem in der endothelialen Differenzierung als „arterialisierenden Faktor“. An einem *in vitro* Modell

muriner embryonaler Stammzellen konnten Lanner und Kollegen die arteriovenöse Differenzierung durch unterschiedliche VEGF-A Konzentrationen manipulieren (Lanner, F *et al.*, 2007). Erfolgte die Kultivierung muriner Flk-positiver endothelialer Vorläuferzellen in Anwesenheit einer hohen VEGF-A Konzentration (50ng/ml) wurde die Expression der arteriellen Gene Ephrin-B2, Notch-4 und Dll-4 induziert. Im Gegensatz dazu konnte bei einer vergleichsweise geringen VEGF-A Konzentration (2ng/ml) die Expression des venösen Markers COUP-TF II (You, LR *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang muss der Differenzierungsgrad des experimentell untersuchten Zellsystems berücksichtigt werden. Während die Daten über die arterielle Spezifikation von Endothelzellen über den Notch-Signalweg sich ausschließlich auf die Embryonalentwicklung verschiedener Tiermodelle beziehen, wurden im Rahmen der experimentellen Arbeit adulte differenzierte humane Endothelzellen untersucht.

Die mRNA-Expression des Notch-4-Rezeptors wurde in humanen arteriellen Nabelschnur-Endothelzellen durch VEGF-A nachweislich nicht reguliert. In den HUVEC dagegen konnte die Transkription von Notch-4 durch die Stimulation mit VEGF-A signifikant erhöht werden. Inwieweit die Induktion der Notch-4 mRNA-Expression durch VEGF-A in den venösen Endothelzellen den arteriellen Expressionsstatus erreicht und zu einer signifikanten Proteinexpression führt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Aussagen über die Proteinexpression konnten aufgrund fehlender spezifischer Antikörper bisher nicht getroffen werden. Somit ist nicht klar, ob die verstärkte mRNA-Expression in den HUVEC auch eine vermehrte Rezeptor-Aktivierung bedeutete, oder ob in HUAEC der Aktivierungsstatus des Rezeptors durch VEGF-A verändert wurde. Die von Hainaud und Kollegen (Hainaud, P *et al.*, 2006) durchgeführten *in vitro*-Studien zum Einfluss von VEGF-A auf die Endothelfunktion zeigten in HUVEC eine VEGF-A-vermittelte Aktivierung von Notch-4. In der Folge ist in diesen adulten venösen Endothelzellen der arterielle Marker Ephrin-B2 nachweisbar. Des Weiteren unterstützen Arbeiten von Carlson und Mitarbeitern ebenfalls die Bedeutung des Notch-4-Rezeptors in der frühen embryonalen Determinierung. Sie zeigten an einem *in-vivo* Maus-Modell, dass die konstitutive Überexpression von Notch-4 die Endothelzellen zur Ausprägung arterieller Marker, wie Ephrin-B2 zwingt (Carlson, TR *et al.*, 2005). Neben dem Notch-4-Rezeptor wird auch der Notch-1-Rezeptor auf Endothelzellen exprimiert, allerdings ohne erkennbare arteriovenöse Spezifikation. Beide, mit redundanten Funktionen ausgestatteten Rezeptoren, können durch den Liganden Dll-4 aktiviert werden (Krebs, LT *et al.*, 2000, Shutter, JR *et al.*, 2000) und die mRNA-Expression von Hey-1 induzieren (Taylor, KL *et al.*, 2002). In der Bedeutung der Rezeptoren muss hier

wahrscheinlich der Entwicklungsstatus der Endothelzellen berücksichtigt werden. Während sich der Expressionslevel von Notch-1 im Gegensatz zu Notch-4 im Verlauf der Differenzierung von Flk-positiven embryonalen Stammzellen in Anwesenheit von VEGF-A nicht wesentlich ändert (Lanner, F *et al.*, 2007), können Liu und Kollegen (Liu, ZJ *et al.*, 2003) in adulten arteriellen Endothelzellen durch VEGF-A die Expression von Notch-1 steigern. Daher ist es interessant zu spekulieren, ob es neben der Redundanz der beiden Rezeptoren, auch eine gewisse zeitabhängige Konkurrenz beider Signalwege gibt.

Die mRNA-Expression des Liganden Dll-4 wurde unabhängig vom Zelltyp sowohl in arteriellen, als auch in venösen Endothelzellen der Nabelschnur durch VEGF-A induziert. Die *in vitro*-Regulation von Dll-4 über VEGF-A wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Neben den arteriellen Endothelzellen der Nabelschnur, wurde die VEGF-A-vermittelte Dll-4-Induktion in Endothelzellen der Iliac- und der Femoralarterie nachgewiesen (Liu, ZJ *et al.*, 2003, Patel, NS *et al.*, 2005). Über die venöse Expression gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen. Die Arbeitsgruppen von Murga und Patel (Murga, M *et al.*, 2005, Patel, NS *et al.*, 2005) konnten durch RT-PCR die Dll-4-Expression in HUVEC nachweisen. Hainaud und Kollegen (Hainaud, P *et al.*, 2006) wiederum beobachteten erst durch die Stimulation mit VEGF-A eine nachweisbare venöse Expression von Dll-4. Sainson und Mitarbeiter konnten eine Abhängigkeit der Dll-4-Expression von der physiologischen Funktion nachweisen. Die auf Petrischalen kultivierte HUVEC exprimierten den Notch-Liganden. Mit der Überführung der venösen Endothelzellen in das 3D-Matrigelsystem und der damit verbundenen Netzwerkbildung wurde die Dll-4-Transkription stark reduziert (Sainson, RC *et al.*, 2005). Diese Daten unterstützen neuere Erkenntnisse, die speziell diesen Notch-Liganden als ein wichtiges Molekül im angiogenen Sprossen von Endothelzellen postulieren (Suchting, S *et al.*, 2007).

Die über VEGF-A vermittelte transkriptionelle Verstärkung von Dll-4 ist in der weiteren Analyse der Signalmoleküle auch für den Notch-Effektor Hey-1 nachweisbar. Die über VEGF-A induzierte Hey-1 mRNA-Expression ist allerdings in arteriellen und venösen Endothelzellen zu beobachten. Es stellt sich somit die Frage, welche durch VEGF-A vermittelte Funktion Dll-4 und Hey-1 in den HUAEC haben, da dort die an sich schon hohe Basalexpression noch gesteigert wird. Andererseits konnte nicht geklärt werden, ob die deutliche Induktion des Notch-Signalwegs durch VEGF-A hinreichend für die Arterialisierung der HUVEC war. Dagegen spricht, dass der bisher eindeutigste arterieller Marker Hey-2 nicht induziert wurde. Auch in HUAEC wurde Hey-2, unabhängig von Hey-1, durch die transkriptionelle Erhöhung des Notch-Liganden Dll4 nicht reguliert. Für die

Funktion des Notch-Signalwegs in adulten Endothelzellen sind neuere Studien interessant, die Hey-1 und Dll-4 in der Angiogenese diskutieren. Arbeiten von Lobov und Kollegen haben die über VEGF-A vermittelte Dll-4-Induktion näher untersucht (Lobov, IB *et al.*, 2007) und diskutieren Dll-4 als eine „Bremse“ für ein durch VEGF-A hervorgerufenen extensives Sprossen. Weitergehend untersuchten Suchting und Mitarbeiter (Suchting, S *et al.*, 2007) speziell die für das Sprossen notwendige Ausbildung so genannter Führungszellen (*tip cells*), deren Phänotyp durch VEGF-A induziert wird. Suchting und Kollegen konnten an einem Retina-Modell der Maus zeigen, dass über einen aktivierten Dll4-Notch-1-Signalweg das Gleichgewicht in der Anzahl von *tip cells* und den nachfolgenden Endothelzellen kontrolliert wird.

Der für Proliferation und Migration verantwortliche VEGF-Rezeptor 2 ist ein Zielgen des Repressors Hey-1 (Henderson, AM *et al.*, 2001). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in einer 2D-Kultur von Endothelzellen aus Kapillaren des Fettgewebes die mRNA-Expression von Hey-1 nur schwach nachweisbar war. Dahingegen wurde die Expression kurzfristig massiv induziert, wenn die Zellen auf einem Kollagengel ausgesät wurden. In diesem Gel beginnen die Zellen mit der Ausbildung dreidimensionaler Kapillar-ähnlicher Strukturen. Im weiteren Verlauf der Netzbildung schwächte sich die Induktion wieder ab, blieb aber immer noch höher, als in dem Monolayer der 2D-Kultur. Ergänzend konnten Sainson und Kollegen (Sainson, RC *et al.*, 2005) eine verminderte Dll-4-Expression in 3D-Kultur nachweisen. Bezogen auf die Arbeit von Suchting (Suchting, S *et al.*, 2007) stellt sich die Frage, ob in einer 2D-Kultur zunächst jede Zelle durch VEGF-A in eine potentielle *tip cell* umgewandelt werden kann, um auf das folgende angiogene Sprossen vorbereitet zu sein. Gleichzeitig mit einer Hey-1-Überexpression wurde die VEGF-Rezeptor 2-Expression herabreguliert und damit die Sensitivität der Zellen gegenüber VEGF-A verringert. Henderson und Kollegen deuten dies so, dass im Verlauf der Netzbildung Hey-1 den Wechsel der Zellen von einem proliferativen und migratorischen Phänotyp zu einem differenzierten, ruhenden und reifen Gefäßphänotyp vermittelt (Henderson, AM *et al.*, 2001). Zusammen mit den Ergebnisse von Patel und Kollegen (Patel, NS *et al.*, 2005), die eine Induktion von Dll-4 und Hey-1 durch VEGF-A in arteriellen und venösen Endothelzellen nachweisen konnten, zeigt sich ein zeitliches Fenster für die Regulation des Notch-Signalwegs durch VEGF-A *in vivo* und *in vitro*, dass durch Induktion von Dll-4 im Rahmen einer negativen Rückkopplung über eine Reduktion der Expression des VEGF-Rezeptors 2 den Einfluss von VEGF-A limitiert. Die Stimulationsversuche wurden an einem konfluenten Monolayer durchgeführt. Aufgrund der Kontaktinhibition wäre eine weitere Proliferation pathologisch. Daher ist die

Induktion von Hey-1 durch eine Aktivierung des Notch-Signalwegs über Dll-4 und die folgende Herabregulation des VEGF-Rezeptors 2 eine Konsequenz zur möglichen Desensibilisierung gegenüber VEGF. Diese Endothelzellen können nicht mehr mit Proliferation auf VEGF-A reagieren. Unterstützend zeigen die Arbeiten von Nosedá und Kollegen, dass die Aktivierung des Notch-Rezeptors auch von der Zelldichte abhängt. In einem konfluenten Endothelzellrasen wird der Notch-Rezeptor massiv aktiviert und gewährleistet dort über antiproliferative Effekte die Kontaktinhibition (Nosedá, M *et al.*, 2004). Dazu wird durch Zell-Zell-Kontakte der Notch-Rezeptor aktiviert und der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21<sup>cip1</sup> reprimiert. Die Zellen verharren so in der G0-Phase und treten nicht in die proliferative S-Phase über.

Andere Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Funktion der Moleküle Notch-4, Dll-4 und Hey-1 beschäftigt haben, kommen zusammenfassend zu dem Ergebnis, dass sie das angiogene Sprossen adulter Endothelzellen regulieren (Henderson, AM *et al.*, 2001, MacKenzie, F *et al.*, 2004, Williams, CK *et al.*, 2006). Der Angriffspunkt ist dabei meist der VEGF-Rezeptor 2, der als ein Zielgen dieses Signalwegs herabreguliert wird. Aber auch die Regulation der Kontaktinhibition wird von Notch zumindest teilweise kontrolliert. Somit kann angenommen werden, dass in venösen und arteriellen Endothelzellen die Induktion des Notch-Signalwegs durch die Stimulation mit Serum und Wachstumsfaktoren für das Gleichgewicht von Proliferation und Kontaktinhibition eine Rolle spielt, um einem extensiven Sprossen entgegen zu wirken.

Die Aktivierung des Notch-Signalwegs über VEGF-A in den venösen Endothelzellen führte nicht zu der Induktion des arteriellen Markergens Hey-2. Genauso wenig führte die von Wu und Mitarbeitern beobachtete Serum-vermittelte Aktivierung des Notch-4 Rezeptors in HeLa-Zellen zu der Ausbildung endothelialer Merkmale (Wu, J *et al.*, 2005). Für die HeLa-Zellen ist eine durch Notch-4 vermittelte angiogene Antwort auf die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren wahrscheinlicher.

Dahingegen könnte Notch neben den angiogenen Prozessen in adulten arteriellen Endothelzellen zusätzlich die Aufrechterhaltung des arteriellen Phänotyps gewährleisten. In der Entwicklung des Zebrafischs kann *gridlock* am Endpunkt einer VEGF-Su(H)-Notch-Signalkaskade die Ausbildung des arteriellen Gefäßsystems steuern (Zhong, TP *et al.*, 2001). Dabei vermutet Zhong, dass *Gridlock* als Transkriptionsfaktor nicht selbst die Ausbildung arterieller Gene reguliert, sondern „nur“ die Ausbildung des venösen Phänotyps reprimiert. Auch in Maus-Modellen sind die Hey-Gene in der Entwicklung des Gefäßsystems von entscheidender Bedeutung (Fischer, A *et al.*, 2004). Darüber hinaus übernimmt Hey-2 in der

Herzentwicklung eine kritische Funktion. Hey-2 wird in der adulten Vaskulatur neben den arteriellen Endothelzellen auch von glatten Muskelzellen der Aorta und der Arterien exprimiert. In Bezug auf die Funktion von Hey-2 als Repressor bestimmter Entwicklungswege zu Gunsten eines bestimmten Phänotyps fanden Chin und Mitarbeiter (Chin, MT *et al.*, 2000) eine massive Hey-2-Expression in sich entwickelnden Kardiomyozyten, die mit fortschreitender Differenzierung herabreguliert wurde. Genetische Analysen von Doi und Kollegen (Doi, H *et al.*, 2005) zeigten, dass Hey-2 die Myocardin-vermittelte Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen inhibierte, indem durch eine direkte Interaktion mit dem *Serum-Response-Faktor*, die Expression von Myocardin verhindert wurde. In *in-vivo*-Modellen spielt diese Negativregulation in der Neointimabildung nach vaskulären Verletzungen eine große Rolle (Sakata, Y *et al.*, 2004). Dedifferenzierte Muskelzellen des synthetischen Phänotyps in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren migrieren und proliferieren, um die Wunde zu verschließen. Neben Myocardin werden auch GATA-Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung von glatten Muskelzellen diskutiert, die ebenfalls durch die Hey-Gene reguliert werden (Fischer, A *et al.*, 2005). *In vitro*-Experimente deuten an, dass alle drei Mitglieder der Familie, Hey-1, Hey-2 und Hey-L durch Bindung an den Promotor von GATA-4 und GATA-6 oder über eine direkte Protein-Protein-Interaktion die Funktion dieser Transkriptionsfaktoren reprimieren können. Insbesondere der atriale natriuretische Faktor (ANF), ein Zielgen der GATA-Faktoren, scheint durch Hey-2 reguliert zu werden. Hey-2 wird ausschließlich in den Ventrikeln des Herzen exprimiert. Bedingt durch diese exklusive Expression, wird die GATA-vermittelte ANF-Expression im Ventrikel reprimiert. ANF wird nur in den Vorhöfen und den Trabekular der Ventrikel nachgewiesen. Die schon erwähnte Regulation des synthetischen oder kontraktile Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen durch Myocardin kann ebenfalls als eine Hey-2-GATA-6-Interaktion diskutiert werden (Shirvani, S *et al.*, 2006). Durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit GATA-6 verhindert Hey-2 die Induktion der *smooth muscle myosin heavy chain*, ein Protein ausdifferenzierter Muskelzellen. In der arteriovenösen Determinierung humaner Endothelzellen kann Hey-2 in den arteriellen Endothelzellen durchaus als Repressor des venösen Phänotyps verstanden werden. Die Ausprägung des venösen Phänotyps selbst wird nach neuesten Arbeiten durch den Transkriptionsfaktor COUP-TF II reguliert (You, LR *et al.*, 2005). COUP-TF II wird ausschließlich im venösen Endothel exprimiert und ist in arteriellen Endothelzellen nicht nachweisbar. Die präferenzielle venöse Expression zeigt auch der Vergleich der mRNA-Expression arterieller und venöser Endothelzellen der Nabelschnur über den DNA-Mikroarray an (Tab 3.1). Die präferenzielle venöse Expression von COUP-TF II

konnte durch RT-PCR (Abb. 3.1) und durch Western Blot-Analyse auf Protein-Ebene (Abb. 3.2) bestätigt werden. Zusätzlich ist COUP-TF II in der Schicht glatter Muskelzellen nachweisbar, die die Arterien umschließt (You, LR *et al.*, 2005). Außerdem konnte COUP-TF II im Rahmen dieser Arbeit in mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1; Abb. 3.1) nachgewiesen werden. Ähnlich der Funktion von Hey-2, sehen You und Mitarbeiter COUP-TF II ebenfalls als einen Repressor in der embryonalen Entwicklung des Gefäßsystems an. Dieser Transkriptionsfaktor unterdrückt die Ausbildung des arteriellen Phänotyps, indem er auf der Ebene der VEGF-Regulation Neuropilin-1 blockiert, einen Co-Rezeptor im VEGF-VEGF-Rezeptor-Signalweg mit arterienspezifischer Expression (Herzog, Y *et al.*, 2001). Dadurch wird die VEGF-vermittelte Aktivierung des Notch-Signalwegs verhindert, an dessen Endpunkt die Expression arterieller Gene, wie z.B. der Hey-Gene, steht.

Es ist daher wahrscheinlich, dass die Expressionskontrolle von Hey-2 über den Notch-Signalweg in der embryonalen Gefäßentwicklung für die Determinierung des arteriellen Phänotyps von entscheidender Bedeutung ist. Ab einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung wird anscheinend diese Expressionskontrolle jedoch vom Notch-Signalweg abgekoppelt. Ähnliche Theorien vertreten Lawson und Kollegen (Lawson, ND *et al.*, 2001), die nicht ausschließen, dass Notch über *gridlock* zwar bestimmte arterielle Spezifikationen vermittelt, aber nicht die generelle Arterialisierung vornimmt. Fischer und Mitarbeiter vermuten, dass zumindestens eines der beiden Hey-Gene vorhanden sein muss, um eine korrekte Ausbildung des Gefäßsystems zu gewährleisten (Fischer, A *et al.*, 2004). Obwohl Hey-2 das humane und murine Homolog zu *Gridlock* im Zebrafisch ist, sind die im Zebrafisch und in der Maus beobachteten Defekte hinsichtlich des *knock-outs* verschieden. Im Zebrafisch ist die korrekte Ausbildung der Aorta gestört. Als Ursache wird dabei eine gestörte arterielle Spezifikation vaskularer Vorläuferzellen angesehen, so dass der arterielle Phänotyp unterdrückt wird. Da *gridlock* das einzige Mitglied der Hey-Familie ist, welches in den Blutgefäßen des Zebrafischs exprimiert ist, scheint ein Ausfall des Gens sich sofort auf das vaskuläre Remodeling auszuwirken. In der Maus wiederum sind alle drei Mitglieder im Gefäßsystem exprimiert, wodurch die Möglichkeit kompensatorischer Mechanismen besteht (Fischer, A *et al.*, 2002). Dafür spricht zum einen der *Hey-1-knock-out*, der keinerlei phänotypische Defekte aufweist. Der *knock-out* von Hey-2 ist zwar schwerwiegender in seine Folgen und postnatal letal, betrifft aber primär die Herzentwicklung und nicht das gesamte Gefäßnetzwerk. Erst der murine *Hey-1/Hey-2 Doppel-knock-out* ähnelt mit seinen globalen vaskulären Defekten dem *gridlock*-Phänotyp und ist embryonal letal (Fischer, A *et al.*, 2004). Hey-L kann hier nicht den Ausfall beider Gene kompensieren. In den adulten Endothelzellen

der Nabelschnur ist Hey-2 der konstante, für die Aufrechterhaltung des arteriellen Phänotyps verantwortliche Faktor, während Hey-1 flexibel in die Regulation der Angiogenese involviert ist.

Anders als Hey-1 wird in den untersuchten adulten Endothelzellen der Nabelschnur Hey-2 scheinbar durch Notch-unabhängige Signalwege reguliert. Interessante Hinweise ergibt hier das Expressionsmuster der Notch-Moleküle in den mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1 (Abb. 3.1). Obwohl der Ligand Dll-4 und der Rezeptor Notch-4 in den HMEC-1 die gleiche Expressionsstärke wie in HUAEC aufweisen, ist von den beiden prominenten Notch-Effektoren nur Hey-1, nicht aber Hey-2 nachweisbar. Untersuchungen von Villa und Mitarbeitern (Villa, N *et al.*, 2001) deuten in diesem Zusammenhang an, dass speziell Dll-4 und Notch-4 zusammen in der hierarchischen Differenzierung von Endothelzellen der großen Hauptgefäße und der Kapillaren eine Rolle spielen könnten. Als möglichen Notch-Effektor wurde in der Expressionsanalyse von Kapillaren des Fettgewebes ebenfalls nur Hey-1 beschrieben (Henderson, AM *et al.*, 2001). Besonders deutlich ist die Expression der beiden Hey-Gene im Herzen, wo Hey-1 ausschließlich im Vorhof und Hey-2 in den Ventrikeln exprimiert wird (Nakagawa, O *et al.*, 1999). Da es für die Notch-Rezeptoren oder Liganden keine Hinweise auf eine solche Kammer-spezifische Expression gibt, kann angenommen werden, dass im Herzen die Hey-Gene unabhängig von Notch reguliert werden. Ein weiterer interessanter Signalweg ist der BMP-Smad-Weg, über den Takizawa und Kollegen eine Induktion der Hey-Gene nachweisen konnten (Takizawa, T *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe um Itoh zeigten eine synergistische Induktion von Hey-1 über den Notch- und den BMP-Signalweg (Itoh, F *et al.*, 2004), welche die schon zuvor diskutierte reduzierte Migration der Endothelzellen zur Folge hatte. Dabei wurde gezielt die Degradation des durch den BMP-Signalweg kontrollierten Proteins Id1 durch Hey-1 gefördert. Weitere Notch-vermittelte Regulationsmechanismen könnten, in Abhängigkeit vom Zelltyp, über bestimmte Liganden-Rezeptor-Kombinationen gesteuert werden. Skelettmuskelzellen der C2C12-Zelllinie exprimieren die drei Notch-Rezeptoren Notch-1, -2 und -3. Co-Kultur-Experimente mit Dll-1 oder Jagged-1 präsentierenden Zellen konnten als physiologisches Zielgen nur Hey-1 stimulieren, nicht aber Hey-2 (Iso, T *et al.*, 2001). Dahingegen wurde in Muskelzellen der Aorta die mRNA-Expression sowohl von Hey-1, als auch von Hey-2 durch beide Liganden induziert (Iso, T *et al.*, 2002).

### **Einfluss von Schubspannung auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen**

In dem Versuch, den endothelialen Phänotyp zu manipulieren, wurde auch der Einfluss von Schubspannung untersucht. Obwohl in der Embryonalentwicklung arteriovenöse Marker noch vor dem Einsetzen der Blutzirkulation exprimiert werden (Wang, HU *et al.*, 1998, Adams, RH *et al.*, 1999, Gerety, SS and Anderson, DJ, 2002), konnten Le Noble und Kollegen (le Noble, F *et al.*, 2004) für den endothelialen Phänotyp eine gewisse Plastizität nachweisen. Somit stellt sich auch im Zusammenhang mit operativen Eingriffen wie Shuntanlagen oder Bypässen die Frage, inwieweit sich adulte venöse Zellen an eine arterielle Strömung adaptieren können. Eine Adaption kann sich auf phänotypische Merkmale, wie z.B. eine Umstrukturierung des Zytoskeletts beschränken, oder weiter greifende Änderungen in der Expression arterieller bzw. venöser Gene beinhalten.

Die Applikation laminarer Schubspannung allein hatte in den vorgelegten Untersuchungen auf das arteriovenöse Expressionsmuster des Notch-Signalwegs in Endothelzellen der Nabelschnur keinen Einfluss. In adulten venösen Endothelzellen konnte durch eine hohe arterielle Schubspannung weder die typische niedrige mRNA-Expression von Notch-4, Dll-4 oder Hey-1 gesteigert werden, noch wurde die mRNA-Expression von Hey-2 induziert. Auch die bisher unter statischen Bedingungen untersuchte arterielle Präferenz des Notch-Signalwegs wurde durch niedrige oder hohe Schubspannungen nicht verändert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Expressionskontrolle des Notch-Signalwegs in adulten primären Endothelzellen von den einwirkenden biomechanischen Kräften abhängig ist.

Die klinische Praxis zeigt, dass sich 30% der arteriovenösen Shunts wieder verschließen. Es wird angenommen, dass die arterielle Umgebung zu einer Dysfunktion der venösen Endothelzellen führt. Es ist jedoch noch ungeklärt, ob die Dysfunktion darauf beruht, dass sich venösen Endothelzellen nicht dem hohen Blutdruck anpassen können. Unklar ist auch, ob in funktionalen Shunts eine erfolgreiche Anpassung stattgefunden hat oder schon eine weitgehende Umdifferenzierung der venösen in arteriellen Endothelzellen erfolgt ist. Die in den Versuchen applizierte Schubspannung von 30 dyn/cm<sup>2</sup> war gerätebedingt nur für maximal 24 Stunden möglich. Eine Adaptation zur Redifferenzierung auf Transkriptionsebene benötigt womöglich mehr Zeit und war daher in dem experimentellen Zeitraum noch nicht nachweisbar.

*In vitro*-Experimente von Yamaoto und Kollegen zeigten, dass Flk-1-positive embryonale Stammzellen durch die Applikation laminarer Schubspannung in Endothelzellen differenzierten (Yamamoto, K *et al.*, 2005). In diesem Ergebnis zeigt sich die globale

funktionelle Bedeutung von Schubspannung für Endothelzellen, die *in vivo* permanent durch das fließende Blut biomechanischen Kräften ausgesetzt sind. Der nächste Schritt ist die Frage, ob erst durch die Differenzierung in arterielle und venöse Endothelzellen die Voraussetzungen gegeben werden, den unterschiedlichen Blutdrücken stand zu halten. Erst der arterielle Phänotyp beinhaltet die Expression von Genen, durch welche die endotheliale Funktion den hohen arteriellen Schubspannungskräften angepasst ist. Daher sind den Phänotyp determinierende Signalwege wie der Notch-Signalweg von äußeren Einflüssen unabhängig, während zelltypische Funktionen durch flexible sich den äußeren Einflüssen anpassende Signalwege reguliert werden. Zelltyp-determinierende Transkriptionsfaktoren wie Hey-2 in adulten arteriellen Endothelzellen werden möglicherweise durch Schubspannung nicht reguliert, um die Funktion nicht zu beeinträchtigen. Vielleicht können sich adulte venöse Endothelzellen schwer an hohe Schubspannungen anpassen, da die Schubspannung selbst eine Notch-vermittelte Adaptation verhindert. Die hohe Schubspannung unterdrückte nachweislich eine VEGF-vermittelte transkriptionelle Hochregulation des Notch-4-Rezeptors. Durch die Verminderung des Rezeptors werden von Notch-4-gesteuerte schubspannungssensitive Kaskaden deaktiviert, die andererseits arteriellen Endothelzellen ihre physiologische Funktion ermöglichen. Kudo und Mitarbeiter (Kudo, FA *et al.*, 2007) untersuchten an einem *in-vivo*-Modell im Menschen und in adulten Ratten die arteriovenöse Identität in Venen-Pfropfungen. Die Adaptation der aufgepfropften Venen in der arteriellen Umgebung beinhaltete nicht die Expression der arteriellen Markergene Ephrin-B2, Notch-4 und Dll-4. Dagegen war jedoch das venöse EphB4-Transkript herabreguliert. Wurde in einem nächsten Schritt zusätzlich der Einfluss von VEGF unterbunden, konnte in diesen Venen-Stücken ein größeres Verhältnis von Media zu Intima gemessen werden, einem Charakteristikum der Arterialisierung. Dennoch wurden arterielle Markergene nicht exprimiert (Kudo, FA *et al.*, 2007). In adulten Endothelzellen ist VEGF kein arterialisierender Faktor, sondern ein angiogen wirkender Wachstumsfaktor. Kudo und Mitarbeiter spekulieren, dass im adulten Organismus durch den Verlust der venösen Identität die Adaptation an eine arterielle Zirkulation möglich ist, ohne jedoch den arteriellen Phänotyp anzunehmen. Möglicherweise bringt diese unvollständige Identität einen weniger angepassten Phänotyp mit sich, der sich auf eine teilweise Funktion beschränkt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Herabregulation von Notch-4 nach Stimulation mit VEGF durch Schubspannung nachgewiesen werden. Während dies für eine Aktivierung von Proliferation und Migration sprechen würde, wird die angiogene Wirkung von Angiopoietin-2 und VEGF-A durch Schubspannung teilweise verhindert. Hinzu kommt, dass anders als der Notch-Rezeptor, die

VEGF-A vermittelte Induktion von Dll-4 und Hey-1 durch die Schubspannung nicht beeinflusst wird und somit die eingangs diskutierte Hemmung eines extensiven Sprossen gegenüber VEGF-A aufrechterhalten bleibt (Henderson, AM *et al.*, 2001, Lobov, IB *et al.*, 2007). Das deutet auf einen ruhenden, angepassten Endothelzellphänotyp hin, der entsprechend seiner biologischen Funktion unter Schubspannung Stickstoffmonoxid produziert. NO spielt eine wichtige Rolle in der VEGF-vermittelten Proliferation von Endothelzellen (Bouloumie, A *et al.*, 1999). Eine angiogene Aktivierung von differenzierten Endothelzellen ist somit nach derzeitiger Kenntnis nur durch das gezielte Zusammenwirken verschiedener Faktoren, wie dem Wegfall von Schubspannung, dem Vorliegen von Hypoxie oder VEGF-A und der Unterbrechung der Kontaktinhibition, *in vivo* möglich.

### **Einfluss von Hypoxie auf die arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen**

Genetische Marker werden in der Entwicklung noch vor dem Einsetzen von Schubspannung exprimiert. Es steht die Frage, ob dadurch weitere zellspezifische Gene induziert werden. Neben unterschiedlichen mechanischen Parametern wie der näher untersuchten Schubspannung sind arterielle und venöse Endothelzellen auch unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt. Diez und Kollegen (Diez, H *et al.*, 2007) können mit endothelialen Progenitorzellen (EPC) nachweisen, dass der Sauerstoffpartialdruck eine erhebliche Rolle in der Determinierung des arteriovenösen Phänotyps spielt. Die untersuchten endothelialen Vorläuferzellen der Maus (EPC) exprimierten unter normoxischen Bedingungen einen hohen Gehalt des venösen Transkriptionsfaktors COUP-TF II (You, LR *et al.*, 2005). Die für die Determinierung des arteriellen Phänotyps verantwortlichen Gene Dll-4 und Hey-2 waren unter diesen Bedingungen schwach exprimiert. Die Absenkung des Sauerstoffgehalts auf 1% führte zu einer transkriptionellen Induktion von Dll-4 und Hey-2, verbunden mit einer gleichzeitigen Repression der COUP-TF II Transkription. Hypoxie ist ein potenter Stimulus für die Aktivierung des Notch-Signalwegs. Zahlreiche molekulare Analysen stellen den Transkriptionsfaktor Hif-1 $\alpha$  in den Mittelpunkt der Hypoxie-vermittelte Genregulation. Die Hey-Promotoren weisen *Hif-1 $\alpha$  responsive elements* (HRE) auf, welche durch Bindung von Hif-1 $\alpha$  unter hypoxischen Bedingungen die Gene Hey-1 und Hey-2 direkt induzieren kann, zusätzlich zu der oben erwähnten Stimulierung über den Notch-Signalwegs. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten adulten Endothelzellen zeigten unter hypoxischen Bedingungen eine im Vergleich zu den EPCs abweichende Genexpression. Die Kultivierung arterieller Endothelzellen der Nabelschnur bei 0,5% Sauerstoff führte zu einer transkriptionellen Repression von Molekülen des Notch-Signalwegs, wie Dll-4, Hey-1 und

Hey-2. Ähnliche Beobachtungen mit murinen ausdifferenzierten arteriellen Endothelzellen unterstützen diese Hypothese (Claxton, S and Fruttiger, M, 2005). Neugeborene Mäuse wurden bei moderater Hypoxie mit 10% Atmosphärensauerstoff gezüchtet. Dabei beobachteten die Autoren in den Arterien der Retina eine Herabregulation von Dll-4 und seinem Target-Gen EphrinB2. Interessanterweise wurde die Dll-4-Expression in den endothelialen Tip-Zellen unter Hypoxie nicht gehemmt. Diese Daten werden teilweise mit der spezifischen VEGF-Konzentration erklärt. Unter normoxischen Bedingungen ist in den peripheren Regionen die VEGF-Konzentration höher, als im Zentrum des bereits vorhandenen Gefäßbetts (Stone, J *et al.*, 1995, Pierce, EA *et al.*, 1996). Unter hypoxischen Bedingungen verschwindet das VEGF-Konzentrationsgefälle und VEGF wird in allen Regionen exprimiert (Claxton, S and Fruttiger, M, 2005). Die unter Hypoxie erhöhte Expression von VEGF wurde auch in der vorliegenden Arbeit in den untersuchten Endothelzellen nachgewiesen. VEGF wurde dabei als Hypoxie-Marker verwendet. Ein Widerspruch besteht zu den unter normoxischen Bedingungen durchgeführten Wachstumsfaktor-Versuchen, in denen VEGF die Expression von Dll-4 und Hey-1 sowohl in HUAEC, als auch in HUVEC induziert. Die Notch-Signalmoleküle können die Angiogenese beeinflussen (Henderson, AM *et al.*, 2001, MacKenzie, F *et al.*, 2004, Williams, CK *et al.*, 2006). In der Adaptation der Endothelzellen an chronische Hypoxie über 24 Stunden wird der migratorische Phänotyp aktiviert. Die Dll-4 vermittelte Hemmung extensiver Sprossbildung wird aufgehoben und die Endothelzellen für den angiogenen Faktor VEGF sensitiviert. Dieser Effekt ist in den HUAEC stärker ausgeprägt, als in den HUVEC, da die physiologische Umgebung arterieller Endothelzellen durch höhere Sauerstoffpartialdrücke charakterisiert ist. Die Netzwerkbildung ist unter Hypoxie nicht behindert. Weitere Untersuchungen könnten die quantitative Analyse vorhandener Verzweigungsspunkte beinhalten. Das unter Hypoxie entstandene Netzwerk hatte augenscheinlich mehr Verzweigungen, als die normoxische Struktur.

Die Hey-2-Expression wurde dahingegen von keinem der Wachstumsfaktoren induziert. In Zusammenhang mit der Diskussion von Hey-2 als arterieller *marker* wurde die Expression von COUP-TF II analysiert. Trotz der Herabregulation arterieller Marker, die durch den Notch-Signalweg kontrolliert werden, wird COUP-TF II nicht induziert (Diplomarbeit Li Kaltaneker). Das arterielle Zellen keine venöse Identität annehmen, wurde auch von Claxton und Mitarbeitern (Claxton, S and Fruttiger, M, 2005) gezeigt. Sie nutzten dabei *msr/apj* als venösen Marker (Wang, HU *et al.*, 1998), der unter Hypoxie in arteriellen Retinagefäßen nicht exprimiert wurde. Auch in ihrem physiologischen Erscheinungsbild, untersucht an der

vom Zelltyp abhängigen Schicht der glatten Muskelzellen, wiesen die retinalen Arterien bzw. Venen keine veränderten Merkmale auf.

Die Ausreifung des Blutgefäßsystems im Embryo ist Hypoxie gesteuert (Forsythe, JA *et al.*, 1996). Möglicherweise ist hier die Adaptation an die Hypoxie durch angiogene Prozesse zu beobachten, den im Phänotyp determinierte Endothelzellen durchlaufen.

### **Proliferationseigenschaften humaner arterieller und venöser Endothelzellen**

Im Hinblick auf therapeutische Ansätze, wie z.B. die Besiedlung von Stents oder Implantaten, spielt die Proliferation isolierter Endothelzellen eine bedeutende Rolle. In einem Versuch unter statischen Bedingungen wurde das Proliferationsverhalten von Endothelzellen der Nabelschnur der ersten Passage verfolgt. Nach einer anfänglichen Phase der Anpassung, bedingt durch das Umsetzen, beschleunigte sich die Proliferation beider Zelltypen signifikant. Im weiteren Verlauf war die Proliferationsrate geringfügigen Schwankungen unterworfen, die jedoch keinen Unterschied zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen erkennen ließen. Das dem Medium zugesetzt VEGF-A wirkte auf beide Zelltypen gleichermaßen proliferativ. Die angiogene Wirkung wird zusätzlich durch die Induktion von Angiopoietin-2 unterstützt. Die statischen Bedingungen geben nicht die physiologische Umgebung der arteriellen und venösen Endothelzellen wieder. Daher sind Versuche mit weiteren Parametern wie Schubspannung oder Sauerstoffpartialdruck notwendig, um mögliche Unterschiede im Proliferationsverhalten zu erkennen. Interessant sind in dem Zusammenhang Studien mit Hyaluronsäure, die zeigten, dass hochmolekulare Hyaluronsäure die Proliferation von Endothelzellen verhindert, während niedermolekulare Hyaluronsäure (West, DC and Kumar, S, 1989, Slevin, M *et al.*, 2002) diese fördert. Weitere Versuche könnten die vermehrte arterielle CD44-Rezeptorexpression hinsichtlich der arteriovenösen Proliferation analysieren. Murphy und Kollegen (Murphy, JF *et al.*, 2005) zeigten, dass über eine CD44 Rezeptoraktivierung COX-2 und VEGF induziert werden, die die endotheliale Proliferation regulieren.

### **Physiologische Eigenschaften humaner arterieller und venöser Endothelzellen im Matrigel**

Weitergehend sollte untersucht werden, ob die arteriovenöse Identität die physiologischen Eigenschaften der Endothelzellen beeinflusst. Bereits You und Kollegen (You, LR *et al.*, 2005) zeigten, dass der Transkriptionsfaktor COUP-TFII in der Determinierung der venösen Identität eine Rolle spielt. Murine embryonaler Stammzellen mit einer Insertion von LacZ im COUP-TFII Gene waren im sich entwickelnden chimären Organismus in arteriellen Endothelzellen zu finden, jedoch nicht im venösen Endothel und in den glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße. Eine detaillierte Analyse ergab, dass in den Stammzellen mit inaktiviertem COUP-TFII arterielle Markergene wie Jag 1 oder EphrinB2 exprimiert werden. Aus diesem *in vivo*-Modell kann geschlossen werden, dass wahrscheinlich nur gleichartige Endothelzellen ein funktionsfähiges Endothel bilden. Die *in vitro*-Versuche mit Matrigel in dieser Arbeit unterstützen diese Annahme. Die gebildeten Netzwerke heterogener Mischungen aus arteriellen und venösen Endothelzellen erscheinen immer als zwei homogen nebeneinander liegende, deckungsgleiche Strukturen. In keinem dieser durchgeführten Versuche wurde eine separate rein arterielle bzw. venöse Struktur beobachtet. Beide Zellarten scheinen einen einmal gelegten Pfad für die Migration zu nutzen. In den Versuchen zu den Proliferationseigenschaften kann davon ausgegangen werden, dass die im Zeitraum von 24 Stunden entstandenen Netzwerke zunächst allein durch Migration der vorhandenen Zellen entstanden sind. Lücken wurden nicht durch proliferierende Zellen ausgefüllt.

Für die Ausbildung der Netze ist eine Mindestzellzahl erforderlich. Die homogenen Netzwerke entstehen bei Ausgatter gleicher Anzahl von venösen und arteriellen Zellen. Interessanterweise wurden bei Versuchen mit unterschiedlicher Zellzahl die in geringer Zahl ausgesäten Zellen scheinbar in ein Netzwerk der jeweiligen anderen Zellart integriert. Diese Diskrepanz zwischen dem *in vitro*-Modell und dem lebenden Organismus kann unter anderem mit den Versuchen von Moyon und Kollegen (Moyon, D *et al.*, 2001a) erklärt werden. In Wachtel-Huhn-Pfropfungsversuchen konnten vaskuläre Ringe bis zum Tag E7 unabhängig von ihrer Herkunft problemlos sowohl in Arterien wie auch Venen integrieren und entsprechende Markergene exprimieren. Dahingegen wurden ältere, scheinbar ausdifferenzierte Gefäßringe nur in Gefäße ihrer Herkunft integriert. Hier gibt es Übereinstimmungen zu den Arbeiten von You (You, LR *et al.*, 2005), dass eine einmal festgelegte Identität das weitere Schicksal der Zelle bestimmt. Dahingegen wurden mit aus Gefäßringen isolierten Endothelzellen, die älter als Tag E7 waren, in Matrigel-Netzwerken ähnliche Ergebnisse erzielt. Dabei konnten isolierte Endothelzellen unabhängig von ihrer

Herkunft sowohl arteriell, als auch venös integrieren. Moyon (Moyon, D *et al.*, 2001a) spekuliert, dass hier fehlende Signale der Gefäßwand den Endothelzellen die Orientierung erschweren. Die physiologische Eigenschaft der Netzbildung ist unabhängig vom arteriovenösen Endothelzelltyp. Isoliert von ihrem jeweiligen Gefäß, können Endothelzellen auch arteriovenöse Kontakte ausbilden. Dies zeigen die Versuche mit den unterschiedlichen Zellzahlen im Matrigel. Andererseits sind Kontakte zwischen typgleichen Zellen offensichtlich im Vergleich zu typfremden bevorzugt. Bei Anwesenheit beider Zellarten in gleicher Zellzahl werden daher die typeigenen Zellen bevorzugt und homogene Netzwerke ausgebildet. Erste Versuche zur Inhibition des Notch-Signalwegs durch Gamma-Sekretase-Inhibitoren zeigten, dass sich die Netzbildung konzentrationsabhängig beeinflussen lässt.

### **THP-1-Adhäsion unter dem Gesichtspunkt der arteriovenösen Differenzierung humaner Endothelzellen**

Ein wichtiger Schritt in der zellulären Antwort auf inflammatorische Prozesse, zu denen auch die Arteriosklerose zählt, ist die Adhäsion von Leukozyten an das aktivierte Endothel. Die Arteriosklerose betrifft hauptsächlich arterielle Gefäße. Es sollte daher untersucht werden, ob die Arterien schon allein auf Grund des Phänotyps der sie auskleidenden Endothelzellen für diese Krankheit prädestiniert sind. Unter diesem Gesichtspunkt zeigte der Vergleich der globalen mRNA-Transkription arterieller und venöser Endothelzellen der Nabelschnur eine ausgeprägte arterielle Expression des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44, der als ein Oberflächenrezeptor für die Leukozyten/Endothelzellen-Interaktion diskutiert wird (Lesley, J *et al.*, 1993). Die Inkubation von HUVEC und HUAEC mit monozytären Zellen der Zelllinie THP-1 unter statischen Bedingungen deutet nicht auf eine zelltypspezifische Adhäsion hin. Kalogeris und Mitarbeiter (Kalogeris, TJ *et al.*, 1999) fanden dahingehend sogar eine präferenzielle Anheftung von Monozyten an eine venösen Endothelzellkultur. Diese Beobachtung konnten Lanner und Kollegen (Lanner, F *et al.*, 2007) bestätigen. Die gezielt aus Flk-1-positiven embryonalen Vorläuferzellen differenzierten venösen Endothelzellen wiesen einen höheren Grad an adhärenenten Monozyten auf, als die arteriellen Endothelzellen. Vorversuche mit den monozytären Zellen der THP-1 Zelllinie hatten gezeigt, dass diese ohne jegliche Zytokinstimulation an einen Endothelzellrasen adhärirten (Daten nicht gezeigt). Womöglich ist diese Zelllinie daher für die Adhäsionsversuche ungeeignet, da eine Leukozyteninvasion im Organismus erst durch entsprechende Zytokine, die von den Endothelzellen bei Entzündungsprozessen ausgeschüttet werden, induziert wird.

Im Falle einer Immunantwort wird CD44 ebenfalls von den Leukozyten exprimiert und ermöglicht über die Bindung des primären Liganden Hyaluronsäure (Aruffo, A *et al.*, 1990) die Anheftung an das aktivierte Endothel. Diese Anheftung muss den wirkenden biomechanischen Kräften standhalten. So kommt es zu einer zusätzlichen Interaktion von endotheliale CD44 mit Hyaluronsäure der Leukozyten (Nandi, A *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen arteriellen Blutdrücke gewährleistet eine hohe CD44-Rezeptordichte die Anheftung an das arterielle Endothel. Die ausgeprägte arterielle Expression von CD44 wird nur von einer weiteren Arbeitsgruppe aufgegriffen, die CD44 ebenfalls als arteriellen Marker bezeichnet, dessen Expression in der Hey-1/Hey-2-*knock-out*-Maus reduziert ist (Fischer, A *et al.*, 2004). Die Expression des CD44-Rezeptors auf den arteriellen Endothelzellen hat möglicherweise nicht nur eine Funktion in der Leukozytenanheftung. Hyaluronsäure ist als ein Glycosaminglycan ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Als transmembraner Rezeptor übernimmt CD44 durch die Interaktion mit Hyaluronsäure ein weites Spektrum zellulärer Funktionen (Trochon, V *et al.*, 1996, Savani, RC *et al.*, 2001), zu denen auch die endotheliale Proliferation zählt, die Migration und die Adhäsion, ebenso die Röhrenbildung und Funktionen in der Angiogenese. Viele dieser Funktionen beruhen auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Krettek und Kollegen (Krettek, A *et al.*, 2004) stellen CD44 in einen Zusammenhang mit Krankheiten, die das arterielle Gefäßsystem betreffen. Sie können eine erhöhte CD44-Expression in menschlichen Atheromen und in abdominalen Aortenaneurysmen nachweisen. In diesen erkrankten Geweben wurde eine lösliche Form des CD44-Rezeptors gebildet, der durch proinflammatorische Zytokine von der Zelloberfläche des Endothels freigesetzt wird.

### **Angiopoietin-2 in der arteriovenösen Differenzierung humaner Endothelzellen**

Die Angiogenese ist während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus ein wesentlicher Prozess für die Bildung und Aufrechterhaltung des vaskulären Gefäßsystems. Das Angiopoietin-Tie/Ligand-Rezeptor-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation angiogener Prozesse. Dabei ist Angiopoietin-2 ein spezifisch vom Endothel freigesetzter und endothelspezifisch wirkender Angiogenesefaktor, der über die Blockierung des Tie-2-Rezeptors, Gefäß-destabilisierende Eigenschaften besitzt (Maisonpierre, PC *et al.*, 1997, Mandriota, SJ and Pepper, MS, 1998, Stratmann, A *et al.*, 1998, Holash, J *et al.*, 1999, Huang, YQ *et al.*, 2002, Zhang, L *et al.*, 2003). In ruhenden und reifen Gefäßen ist die Angiopoietin-2-Expression herabreguliert und wird erst während der Aktivierung der Endothelzellen stark induziert (Mandriota, SJ and Pepper, MS, 1998, Oh, H *et al.*, 1999, Huang, YQ *et al.*, 2002). Interessanterweise deutete das globale Expressionsprofil von Endothelzellen auf eine arteriovenös differenzielle Expression von Angiopoietin-2 hin. Sowohl die Transkription, als auch die Proteinfreisetzung war in arteriellen Endothelzellen signifikant höher als in venösen Endothelzellen. Der endothelspezifische Tie-2-Rezeptor zeigte dahingegen keine von der arteriovenösen Determinierung abhängige Expression (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen in der Zellkultur gleichen einer pathophysiologischen *in vivo* Situation. Die Schubspannungsversuche mit isolierten arteriellen und venösen Endothelzellen verdeutlichten, dass eine geringe Strömung die Angiopoietin-2-Expression induziert, während eine hohe laminare Strömung die Expression reprimiert. Ähnliche Beobachtungen belegen Studien von Bongrazio und Kollegen (Bongrazio, M *et al.*, 2000), die die strömungsbedingte Adaptation von venösen Endothelzellen untersuchten. Ausgehend von den *in vitro*-Daten, sind im Gefäßsystem ähnlich relevante strömungsbedingte Regulationen zu finden. In normal versorgten, gut durchströmten Gefäßen kann Angiopoietin-2 nicht nachgewiesen werden (Hanahan, D, 1997). Dahingegen bewirkte eine Reduktion des Blutflusses durch Ligation der Arterie eine Induktion der Angiopoietin-2-Expression (Goettsch, W *et al.*, 2008). Im Niederdrucksystem der Venen war eine permanente Angiopoietin-2-Expression nachweisbar. Die durch Schubspannung vermittelte Regulation der Angiopoietin-2-Expression ist somit unabhängig vom Zelltyp, jedoch in ihrer Intensität abhängig von der arteriovenösen Determinierung der Zellen. Unter pathophysiologisch statischen Bedingungen sind Arterien daher möglicherweise für inflammatorische Signale empfänglicher, als Venen. Die Wachstumsfaktorversuche zeigten, dass die Angiopoietin-2-Expression in beide Zelltypen durch VEGF-A und eine VEGF-Rezeptor 2 vermittelte Signalkaskade reguliert wird. Auf den Wachstumsfaktor bFGF-2 oder eine Mischung verschiedener Wachstumsfaktoren reagierten

dagegen nur die arteriellen Endothelzellen. Die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen bewirkten eine Freisetzung von Angiopoietin-2 in das Kulturmedium, nicht aber eine längerfristige Angiopoietin-2-mRNA-Expression. Angiopoietin-2 wird zusammen mit von-Willebrand-Faktor und P-Selektin in den Weibel-Palade-Körperchen an der Zelloberfläche gespeichert (Fiedler, U *et al.*, 2004). Diese können als schnelle Reaktion auf akute inflammatorische Signale entleert werden. So kann die Zelle direkt auf pathophysiologische Situationen reagieren.

Gefäßendothelzellen sind permanent mechanischen und chemischen Stimuli ausgesetzt. In der Hierarchie der natürlichen, auf die Endothelzellen einwirkenden Faktoren, ist eine hohe laminare Schubspannung dem Einfluss von VEGF-A überlegen. In den Strömungsversuchen konnte gezeigt werden, dass eine hohe arterielle Schubspannung in den Endothelzellen die Induktion von Angiopoietin-2 durch VEGF-A partiell verhinderte. Die durch eine hohe laminare Schubspannung bewirkten mechanoprotektive Mechanismen verhindern weiterhin die Proliferation (Akimoto, S *et al.*, 2000) und die Apoptose (Dimmeler, S *et al.*, 1996, Kaiser, D *et al.*, 1997, Bartling, B *et al.*, 2000) von Endothelzellen. Bezogen auf die verminderte Angiopoietin-2-Expression, die sowohl in arteriellen, als auch in venösen Endothelzellen nachgewiesen wird, bewirkt hohe laminare Schubspannung einen ruhenden, nicht-aktivierten Phänotyp. Die in dem Versuch gleichzeitige Stimulation mit VEGF-A sensibilisiert die Zellen zunächst. Angiogenetische Prozesse werden erst durch das Zusammenspiel weiterer proangiogener Faktoren in zell-pathologischen Situationen ausgelöst, zu denen auch eine Reduktion des Blutflusses zählt. In diesem Zusammenhang konnten Conklin und Mitarbeiter (Conklin, BS *et al.*, 2002) eine Induktion der VEGF-Expression durch verminderte Schubspannung zeigen, die weitergehend die Angiopoietin-2-Expression induziert und verstärkt.

Der detaillierte Mechanismus der Angiopoietin-2-Regulation wurde in Promotorstudien analysiert. Eine 2000 kb große DNA-Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts von Angiopoietin-2 wurde mit weiteren sukzessive Verkürzungen in mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Die von den Arbeitsgruppen um Hasegawa (Hasegawa, Y *et al.*, 2004) und Hegen (Hegen, A *et al.*, 2004) veröffentlichten Angiopoietin-2-Promotorkonstrukte und die hier klonierten Konstrukte können nicht direkt miteinander verglichen werden und sind teilweise widersprüchlich im Bezug auf den Startpunkt der Transkription. Die in der vorliegenden Arbeit als Promotor analysierte Sequenz zeigt Angiopoietin-2 als Gen mit einer klassischen TATA-Box aus. Dies wird von Hasegawa unterstützt (Hasegawa, Y *et al.*, 2004). Hegen und Mitarbeiter dahingegen charakterisierten die von ihnen untersuchte Sequenz als

Promotor ohne TATA-Box (Hegen, A *et al.*, 2004). Weitergehend ist der Startpunkt der mRNA bisher nicht eindeutig identifiziert.

Die Analyse der Promotorstudien bestätigte Angiotensinogenase-2 als einen endothelspezifischen Regulator (Maisonpierre, PC *et al.*, 1997). Während die mikrovaskulären Endothelzellen eine starke Promotoraktivität verzeichneten, war in der nicht-endothelialen Zelllinie HEK293 keine signifikante Aktivität nachweisbar. Die von Hegen und Kollegen (Hegen, A *et al.*, 2004) klonierten Angiotensinogenase-2-Promotorkonstrukte zeigten in der Zellkultur ebenfalls nur eine auf Endothelzelllinien beschränkte Aktivität, zu denen unter anderem Endothelzellen der Aorta, der Vene, sowie dermale mikrovaskuläre Endothelzellen zählen. Primäre Endothelzellen der Nabelschnur waren auf Grund einer nur sehr geringen Transfektionseffizienz ungeeignet für weitere Promotoranalysen.

Der Vergleich der einzelnen Promotorkonstrukte verdeutlichte, dass nur für die Konstrukte mit der 5'-nicht-translatierten Region (5'UTR), Angpt2Prom-1938, Angpt2Prom-985 und Angpt2Prom-593 eine Basalaktivität nachweisbar war. Eine Erklärung wäre die dort lokalisierte Ribosomenbindungsstelle (Pickering, BM and Willis, AE, 2005), die bei den anderen Konstrukten fehlt und daher eine Promotoraktivierung unmöglich macht.

Die Charakterisierung des Angiotensinogenase-2-Promotors deutete auf ein putatives Repressorelement in der Sequenz zwischen 1938 bp und 985 bp hin. Die Negativregulation des Angiotensinogenase-2-Promotors durch distinkte Repressorelemente unterstützt die strikte Kontrolle der Angiotensinogenase-2-Expression. Die Verkürzung des längsten Konstruktes auf 985 bp bewirkte eine Erhöhung der basalen Promotoraktivität. Hegen und Mitarbeiter (Hegen, A *et al.*, 2004) postulieren zudem ein zweites starkes Negativelement im ersten Intron, welches die Basalaktivität reguliert.

VEGF-A ist ein endothelspezifischer Wachstumsfaktor, der in allen getesteten Endothelzellen (HUVEC, HUAEC und HMEC-1) die mRNA-Expression von Angiotensinogenase-2 induziert. Diese eindeutige VEGF-A vermittelte Induktion der mRNA konnte auf Promotorebene nicht gleichermaßen nachvollzogen werden. Nur das kürzere Konstrukt mit 589 bp deutete auf ein VEGF-A-responsives Element hin und damit auf eine direkte Regulation des Promotors durch VEGF-A. Die längeren Promotorsequenzen reagierten nicht auf den Wachstumsfaktor, was die Lokalisation von Repressorelementen unterstützt. Eine mögliche, durch VEGF-A über den VEGF-Rezeptor 2 ausgelöste Signalkaskade zielt auf die Regulation der Ets-Transkriptionsfaktoren (Iwasaka, C *et al.*, 1996). Hasegawa und Kollegen identifizierten in der Promotorsequenz von Angiotensinogenase-2 mehrere potentielle Bindungsstellen der Ets-Transkriptionsfaktoren. In VEGF-A aktivierten Endothelzellen bindet dabei der

---

Transkriptionsfaktor Ets-1 direkt an den Promotor und induziert die Expression von Angiopoitin-2 (Hasegawa, Y *et al.*, 2004). Diese Ets-1 regulierte Promotoraktivierung konnten auch Hegen und Mitarbeiter (Hegen, A *et al.*, 2004) in ihren Promotorstudien nachweisen.

Die mechanosensitive Angiopoietin-2-Expression konnte durch die Promotorstudien zunächst nicht erklärt werden. Durch eine hohe arterielle Schubspannung wurde nicht wie erwartet die Promotoraktivität reduziert.

In der kritischen Betrachtung der Ergebnisse der Reporteranalysen ist ein technischer Nachteil des Versuchs die Stabilität der Luziferase, wodurch mögliche Regulationsphänomene am Promotor überdeckt werden können. Möglicherweise wird in den 4 Stunden nach Transfektion im MV-2 Medium der Promotor bereits maximal angeschaltet, so dass ein additiver Unterschied zu den Stimulationsversuchen, z.B. bedingt durch Wachstumsfaktoren, im Ergebnis nicht mehr erfasst werden kann. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass die unter statischen Bedingungen gebildete Luziferase nicht in den Maßen abgebaut wird, wie die applizierte Schubspannung den Promotor wieder abschaltet.

Vor diesem Hintergrund sind weitere Studien zur Regulation des Angiopoietin-2-Promotors notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Arterien und Venen sind aufgrund ihrer Funktion im Körper morphologisch, funktionell und genetisch unterschiedlich (Zhong, TP *et al.*, 2001). Schon die großen Blutgefäße auskleidende Endothelzellen zeigen eine arteriovenöse Determinierung. Ausgehend von einer Mikroarray-Analyse der mRNA-Expression arterieller und venöser Endothelzellen der Nabelschnur wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Moleküle des Notch-Signalwegs, Dll-4, Notch-4, Hey-1 und Hey-2 fokussiert, die präferenziell bis exklusiv arteriell exprimiert werden. Weitere Gene mit einem arteriellen Expressionsmuster, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, sind Angiopoietin-2 und CD44s. Die Genexpression von Hey-1, Hey-2 und CD44s konnte in HUVEC durch die Mikroarray-Analyse nicht nachgewiesen werden. Als ein weiteres Markergen in der arteriovenösen Charakterisierung humaner Endothelzellen wurde der Transkriptionsfaktor COUP-TF II ausgewählt, der eine signifikant höhere Expression in venösen Endothelzellen aufweist. Die nachgewiesene genetische Determinierung zeigte sich gegenüber den für die Kultivierung und die Stimulationsversuche verwendeten Medien stabil.

Trotz der genetisch definierten Unterschiede ließ der Vergleich physiologisch relevanter Funktionen keinen vom endothelialen Zelltyp abhängigen Unterschied erkennen. Die Fähigkeit zur Proliferation oder die Interaktion mit monozytären Zellen sind bei inflammatorischen oder pathophysiologischen Situationen von eminenter Bedeutung, um die Gefäßintegrität zu erhalten. Diese beiden Eigenschaften zeigten unter den gegebenen statischen Bedingungen in der Zellkultur keine arteriovenöse Präferenz. Der arteriell exprimierte CD44-Rezeptor konnte in diesem Zusammenhang zunächst nicht mit der Adhäsion von Monozyten korreliert werden.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von Endothelzellen ist die Ausbildung von Netzwerken und röhrenartigen Strukturen, eine Aufgabe, die eine Koordination und Interaktion der Zellen untereinander voraussetzt. Das in einer 2D-Co-Kultur beobachtete Migrationsverhalten arterieller und venöser Endothelzellen zeigte eine Mischung beider Zelltypen ohne spezifische Clusterbildung. In einer im Matrigel ausgesäten Mischkultur bildeten arterielle und venöse Endothelzellen homogene, eng beieinander liegende Netzwerke. Die homogenen Zellkontakte werden gegenüber den heterogenen Kontakten bevorzugt. Dennoch können die in geringer Zahl ausgesäten Zellen in das Netzwerk der jeweils anderen Zellart integrieren und arteriovenöse Kontakte ausbilden.

Das Molekül Angiopoietin-2 liegt in den HUAEC um den Faktor 2 höher exprimiert vor, als in HUVEC. Im Kulturmedium der HUAEC konnte unter statischen Bedingungen zudem eine höhere Angiopoietin-2-Proteinexpression nachgewiesen werden. Der Test unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zeigte, dass VEGF-A sowohl die mRNA-Expression von Angiopoietin-2, als auch die Freisetzung des Proteins in das Kulturmedium induzierte. Dabei wurde durch die Blockade des VEGF-Rezeptors 2 die VEGF-A vermittelte Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression vollständig verhindert. Während die Wachstumsfaktoren IGF-1, bFGF-2, PDGF-BB und hEGF-1 alleine oder in Kombination keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Angiopoietin-2 hatten, konnte die Angiopoietin-2-Proteinfreisetzung von HUAEC synergistisch durch die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren erhöht werden. Das deutet auf eine schnelle und sofort abrufbare Reaktion der arteriellen Endothelzellen auf angiogene Reize hin.

Endothelzellen stehen in einem ständigen Kontakt mit dem strömenden Blut. Trotz der physiologisch bedingten unterschiedlichen Blutdrücke in Arterien und Venen ist in der Zellkultur eine vergleichbare Adaptation der Angiopoietin-2-Expression zu beobachten. Die Applikation einer geringen laminaren Schubspannung von  $1 \text{ dyn/cm}^2$  hatte sowohl in HUAEC, als auch in HUVEC eine Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression zur Folge, die jedoch im Vergleich in HUAEC viel stärker ausfiel. Dahingegen konnte durch hohe arterielle Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 in beiden Zelltypen herabreguliert werden. Weiterhin konnte durch eine hohe arterielle Schubspannung die durch VEGF-A-vermittelte Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression teilweise verhindert werden. Die von der Schubspannung abhängige Angiopoietin-2-Expression spricht für eine schubspannungsvermittelte Regulation des endothelialen Phänotyps. Analysen am Angiopoietin-2-Promotor deuteten auf ein VEGF-responsives Element hin und unterstützen die VEGF-vermittelte Regulation.

Der evolutionär hoch konservierte Notch-Signalweg ist präferenziell arteriell exprimiert. Durch die Blockade des Notch-Rezeptors mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor X konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Expression von Dll-4 und Hey-1 über diesen Signalweg reguliert wird. Obwohl zahlreiche Studien belegen, dass Hey-2 ein Zielgen im Notch-Signalweg ist, so beschränkt sich diese Regulation scheinbar auf die arteriovenöse Differenzierung in der Embryonalentwicklung. In den adulten Endothelzellen wurde mit der Inhibierung des Notch-Signalwegs keine Herabregulation der Hey-2-Expression erzielt. Eine vom Notch-Signalweg unabhängige Hey-2-Regulation deutet auch das Expressionsmuster der mikrovaskulären Endothelzellen an. Diese exprimieren die Notch-Moleküle Notch-4, Dll-4

und Hey-1, jedoch nicht Hey-2. Die Inhibierung des in der arteriellen Determinierung diskutierten Notch-Signalwegs in HUAEC hatte umgekehrt keine Induktion des venösen Transkriptionsfaktors COUP-TFII zur Folge.

Durch Manipulation des Notch-Signalwegs sollte die arteriovenöse Differenzierung näher untersucht und beeinflusst werden. Bei Analyse der Stimulation mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren konnte ausschließlich eine VEGF-vermittelte transkriptionelle Regulation der Notch-Moleküle gezeigt werden. Diese ist sowohl in arteriellen, als auch in venösen Endothelzellen über den VEGF-Rezeptor 2 vermittelt. Während die venöse Expression von Notch-4, Dll-4 und Hey-1 durch VEGF induziert wird, wurde nur die arterielle Dll-4 und Hey-1-mRNA-Expression durch die VEGF-Stimulation weiter verstärkt.

Als ein biomechanischer Parameter wurde der Einfluss laminarer Schubspannung näher untersucht. Die Genexpression der Notch-Moleküle war von der Simulation unterschiedlicher Blutströmung in der Zellkultur unabhängig. Einzig die VEGF-vermittelte Induktion des Notch-4-Rezeptors in HUVEC konnte durch die Applikation einer hohen laminaren Schubspannung von  $30 \text{ dyn/cm}^2$  partiell verhindert werden.

Zu den weiteren, das Mikromilieu arterieller und venöser Endothelzellen kennzeichnenden Parametern gehört der Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke. Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich in HUAEC eine starke Regulation von Molekülen des Notch-Signalwegs. Mit der Absenkung des Sauerstoffpartialdrucks auf 0,5% verringerte sich signifikant das Expressionsniveau des Liganden Dll-4 und der Zielgene Hey-1 und Hey-2. In Übereinstimmung mit den HUAEC wurde die venöse Hey-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen vollständig abgeschaltet, während die Dll-4-Expression von den hypoxischen Bedingungen unbeeinflusst blieb. Die dramatische Reduktion der Notch-Moleküle zeigte zunächst keine physiologische Beeinträchtigung.

Die Auswertung der Daten in der vorgelegten Arbeit lässt vermuten, dass die einmal festgelegte genetische Determinierung adulter Endothelzellen fixiert und äußeren Einflüssen gegenüber stabil und unumkehrbar ist. Die in der Zellkultur durchgeführten Manipulationen, wie der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren oder die Applikation unterschiedlicher Schubspannungen, erreichten in Bezug auf die Expression der beiden untersuchten Markergene keine tiefer greifende Redifferenzierung des jeweiligen endothelialen Phänotyps. Dennoch ist eine gewisse Anpassungsfähigkeit der Endothelzellen an bestimmte Situationen möglich, die zwar die Ausprägung von Merkmalen des jeweilig anderen Phänotyps beinhaltet, jedoch nicht eine vollständige Redifferenzierung.

## 6. Literatur

- Adams R. H. Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* 2003, 202, 105-12.
- Adams R. H., Wilkinson G. A., Weiss C., Diella F., Gale N. W., Deutsch U., Risau W. and Klein R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999, 13, 295-306.
- Ades E. W., Candal F. J., Swerlick R. A., George V. G., Summers S., Bosse D. C. and Lawley T. J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 1992, 99, 683-90.
- Aghi M. and Chiocca E. A. Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors. *Mol Ther* 2005, 12, 994-1005.
- Akimoto S., Mitsumata M., Sasaguri T. and Yoshida Y. Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circ Res* 2000, 86, 185-90.
- Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D. and Lake R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999, 284, 770-6.
- Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C. B. and Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990, 61, 1303-13.
- Ausubel F. M., *Current Protocols in Molecular Biology* (1987) Brooklyn, NY: Media, Pa. Greene Publishing Associates J. Wiley
- Bartling B., Tostlebe H., Darmer D., Holtz J., Silber R. E. and Morawietz H. Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 278, 740-6.
- Beatus P., Lundkvist J., Oberg C. and Lendahl U. The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* 1999, 126, 3925-35.
- Becker B. F., Heindl B., Kupatt C. and Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000, 89, 160-7.
- Bongrazio M., Baumann C., Zakrzewicz A., Pries A. R. and Gaehtgens P. Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc Res* 2000, 47, 384-93.
- Bouloumie A., Schini-Kerth V. B. and Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 1999, 41, 773-80.
- Brennan J., Karl J. and Capel B. Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol* 2002, 244, 418-28.
- Carlson T. R., Yan Y., Wu X., Lam M. T., Tang G. L., Beverly L. J., Messina L. M., Capobianco A. J., Werb Z. and Wang R. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102, 9884-9.
- Chambers R. C., Leoni P., Kaminski N., Laurent G. J. and Heller R. A. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol* 2003, 162, 533-46.
- Chi J. T., Chang H. Y., Haraldsen G., Jahnsen F. L., Troyanskaya O. G., Chang D. S., Wang Z., Rockson S. G., van de Rijn M., Botstein D. and Brown P. O. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 10623-8.

- Chien K. R. and Olson E. N. Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell* 2002, 110, 153-62.
- Chin M. T., Maemura K., Fukumoto S., Jain M. K., Layne M. D., Watanabe M., Hsieh C. M. and Lee M. E. Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. *J Biol Chem* 2000, 275, 6381-7.
- Claxton S. and Fruttiger M. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Dev Dyn* 2005, 233, 822-8.
- Cleaver O. and Melton D. A. Endothelial signaling during development. *Nat Med* 2003, 9, 661-8.
- Coffin J. D. and Poole T. J. Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development. *Anat Rec* 1991, 231, 383-95.
- Conklin B. S., Zhong D. S., Zhao W., Lin P. H. and Chen C. Shear stress regulates occludin and VEGF expression in porcine arterial endothelial cells. *J Surg Res* 2002, 102, 13-21.
- Davis R. L. and Turner D. L. Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 2001, 20, 8342-57.
- De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J. S., Schroeter E. H., Schrijvers V., Wolfe M. S., Ray W. J., Goate A. and Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999, 398, 518-22.
- del Amo F. F., Gendron-Maguire M., Swiatek P. J., Jenkins N. A., Copeland N. G. and Gridley T. Cloning, analysis, and chromosomal localization of Notch-1, a mouse homolog of Drosophila Notch. *Genomics* 1993, 15, 259-64.
- Detmar M., Brown L. F., Schon M. P., Elicker B. M., Velasco P., Richard L., Fukumura D., Monsky W., Claffey K. P. and Jain R. K. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 1998, 111, 1-6.
- Diez H., Fischer A., Winkler A., Hu C. J., Hatzopoulos A. K., Breier G. and Gessler M. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res* 2007, 313, 1-9.
- Dimmeler S., Haendeler J., Rippmann V., Nehls M. and Zeiher A. M. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 1996, 399, 71-4.
- Doi H., Iso T., Yamazaki M., Akiyama H., Kanai H., Sato H., Kawai-Kowase K., Tanaka T., Maeno T., Okamoto E., Arai M., Kedes L. and Kurabayashi M. HERP1 inhibits myocardin-induced vascular smooth muscle cell differentiation by interfering with SRF binding to CA<sub>2</sub>G box. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25, 2328-34.
- Donovan J., Kordylewska A., Jan Y. N. and Utset M. F. Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in Hey2 mutant mice. *Curr Biol* 2002, 12, 1605-10.
- Dumont D. J., Gradwohl G., Fong G. H., Puri M. C., Gertsenstein M., Auerbach A. and Breitman M. L. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 1994, 8, 1897-909.
- Eguchi M., Masuda H. and Asahara T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol* 2007, 11, 18-25.
- Ekman N., Lymboussaki A., Vastrik I., Sarvas K., Kaipainen A. and Alitalo K. Bmx tyrosine kinase is specifically expressed in the endocardium and the endothelium of large arteries. *Circulation* 1997, 96, 1729-32.
- Ferrara N. and Henzel W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 161, 851-8.
- Fiedler U., Scharpfenecker M., Koidl S., Hegen A., Grunow V., Schmidt J. M., Kriz W., Thurston G. and Augustin H. G. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 2004, 103, 4150-6.

- Fischer A., Klattig J., Kneitz B., Diez H., Maier M., Holtmann B., Englert C. and Gessler M. Hey basic helix-loop-helix transcription factors are repressors of GATA4 and GATA6 and restrict expression of the GATA target gene ANF in fetal hearts. *Mol Cell Biol* 2005, 25, 8960-70.
- Fischer A., Leimeister C., Winkler C., Schumacher N., Klamt B., Elmasri H., Steidl C., Maier M., Knobloch K. P., Amann K., Helisch A., Sendtner M. and Gessler M. Hey bHLH factors in cardiovascular development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002, 67, 63-70.
- Fischer A., Schumacher N., Maier M., Sendtner M. and Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev* 2004, 18, 901-11.
- Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 1984, 51, 601-4.
- Forsythe J. A., Jiang B. H., Iyer N. V., Agani F., Leung S. W., Koos R. D. and Semenza G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996, 16, 4604-13.
- Fortini M. E. and Artavanis-Tsakonas S. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 1994, 79, 273-82.
- Gale N. W., Thurston G., Hackett S. F., Renard R., Wang Q., McClain J., Martin C., Witte C., Witte M. H., Jackson D., Suri C., Campochiaro P. A., Wiegand S. J. and Yancopoulos G. D. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002, 3, 411-23.
- Gerety S. S. and Anderson D. J. Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development* 2002, 129, 1397-410.
- Gerety S. S., Wang H. U., Chen Z. F. and Anderson D. J. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 1999, 4, 403-14.
- Gessler M., Knobloch K. P., Helisch A., Amann K., Schumacher N., Rohde E., Fischer A. and Leimeister C. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2<sup>-/-</sup> mice. *Curr Biol* 2002, 12, 1601-4.
- Gimbrone M. A., Jr., Topper J. N., Nagel T., Anderson K. R. and Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 902, 230-9; discussion 239-40.
- Goetsch W., Gryczka C., Korff T., Ernst E., Goetsch C., Seebach J., Schnittler H. J., Augustin H. G. and Morawietz H. Flow-dependent regulation of angiopoietin-2. *J Cell Physiol* 2008, 214, 491-503.
- Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 1998, 12, 1751-62.
- Hainaud P., Contreres J. O., Villemain A., Liu L. X., Plouet J., Tobelem G. and Dupuy E. The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res* 2006, 66, 8501-10.
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997, 277, 48-50.
- Hasegawa Y., Abe M., Yamazaki T., Niizeki O., Shiiba K., Sasaki I. and Sato Y. Transcriptional regulation of human angiopoietin-2 by transcription factor Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316, 52-8.
- Hegen A., Koidl S., Weindel K., Marme D., Augustin H. G. and Fiedler U. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24, 1803-9.
- Henderson A. M., Wang S. J., Taylor A. C., Aitkenhead M. and Hughes C. C. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 2001, 276, 6169-76.

- Herreman A., Hartmann D., Annaert W., Saftig P., Craessaerts K., Serneels L., Umans L., Schrijvers V., Checler F., Vanderstichele H., Baekelandt V., Dressel R., Cupers P., Huylebroeck D., Zwijsen A., Van Leuven F. and De Strooper B. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 11872-7.
- Herzog Y., Kalcheim C., Kahane N., Reshef R. and Neufeld G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* 2001, 109, 115-9.
- Hirashima M. and Suda T. Differentiation of arterial and venous endothelial cells and vascular morphogenesis. *Endothelium* 2006, 13, 137-45.
- Hirschi K. K., Rohovsky S. A. and D'Amore P. A. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* 1998, 141, 805-14.
- Holash J., Maisonpierre P. C., Compton D., Boland P., Alexander C. R., Zagzag D., Yancopoulos G. D. and Wiegand S. J. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999, 284, 1994-8.
- Hrabe de Angelis M., McIntyre J., 2nd and Gossler A. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 1997, 386, 717-21.
- Huang Y. Q., Li J. J., Hu L., Lee M. and Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 2002, 99, 1646-50.
- Irvine K. D. Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Curr Opin Genet Dev* 1999, 9, 434-41.
- Iso T., Chung G., Hamamori Y. and Kedes L. HERP1 is a cell type-specific primary target of Notch. *J Biol Chem* 2002, 277, 6598-607.
- Iso T., Hamamori Y. and Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23, 543-53.
- Iso T., Sartorelli V., Chung G., Shichinohe T., Kedes L. and Hamamori Y. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Mol Cell Biol* 2001, 21, 6071-9.
- Itoh F., Itoh S., Goumans M. J., Valdimarsdottir G., Iso T., Dotto G. P., Hamamori Y., Kedes L., Kato M. and ten Dijke P. Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *EMBO J* 2004, 23, 541-51.
- Iwasaka C., Tanaka K., Abe M. and Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996, 169, 522-31.
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. and Minick C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973, 52, 2745-56.
- Joutel A., Corpechot C., Ducros A., Vahedi K., Chabriat H., Mouton P., Alamowitch S., Domenga V., Cecillion M., Marechal E., Maciazek J., Vayssiere C., Cruaud C., Cabanis E. A., Ruchoux M. M., Weissenbach J., Bach J. F., Bousser M. G. and Tournier-Lasserre E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996, 383, 707-10.
- Kaiser D., Freyberg M. A. and Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 231, 586-90.
- Kalogeris T. J., Kevil C. G., Laroux F. S., Coe L. L., Phifer T. J. and Alexander J. S. Differential monocyte adhesion and adhesion molecule expression in venous and arterial endothelial cells. *Am J Physiol* 1999, 276, L9-L19.

- Krebs L. T., Xue Y., Norton C. R., Shutter J. R., Maguire M., Sundberg J. P., Gallahan D., Closson V., Kitajewski J., Callahan R., Smith G. H., Stark K. L. and Gridley T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 2000, 14, 1343-52.
- Krettek A., Sukhova G. K., Schonbeck U. and Libby P. Enhanced expression of CD44 variants in human atheroma and abdominal aortic aneurysm: possible role for a feedback loop in endothelial cells. *Am J Pathol* 2004, 165, 1571-81.
- Kudo F. A., Muto A., Maloney S. P., Pimiento J. M., Bergaya S., Fitzgerald T. N., Westvik T. S., Frattini J. C., Breuer C. K., Cha C. H., Nishibe T., Tellides G., Sessa W. C. and Dardik A. Venous identity is lost but arterial identity is not gained during vein graft adaptation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27, 1562-71.
- Kullander K. and Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3, 475-86.
- Lanner F., Sohl M. and Farnebo F. Functional arterial and venous fate is determined by graded VEGF signaling and notch status during embryonic stem cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27, 487-93.
- Lawson N. D., Scheer N., Pham V. N., Kim C. H., Chitnis A. B., Campos-Ortega J. A. and Weinstein B. M. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001, 128, 3675-83.
- Lawson N. D., Vogel A. M. and Weinstein B. M. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 2002, 3, 127-36.
- le Noble F., Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Djonov V., Matthijsen R., Breant C., Fleury V. and Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 2004, 131, 361-75.
- Lesley J., Hyman R. and Kincade P. W. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993, 54, 271-335.
- Lewis J. Notch signalling. A short cut to the nucleus. *Nature* 1998, 393, 304-5.
- Liu Z. J., Shirakawa T., Li Y., Soma A., Oka M., Dotto G. P., Fairman R. M., Velazquez O. C. and Herlyn M. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2003, 23, 14-25.
- Lobov I. B., Renard R. A., Papadopoulos N., Gale N. W., Thurston G., Yancopoulos G. D. and Wiegand S. J. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 3219-24.
- MacKenzie F., Duriez P., Larrivee B., Chang L., Pollet I., Wong F., Yip C. and Karsan A. Notch4-induced inhibition of endothelial sprouting requires the ankyrin repeats and involves signaling through RBP-Jkappa. *Blood* 2004, 104, 1760-8.
- Maier M. M. and Gessler M. Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275, 652-60.
- Maisonpierre P. C., Suri C., Jones P. F., Bartunkova S., Wiegand S. J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T. H., Papadopoulos N., Daly T. J., Davis S., Sato T. N. and Yancopoulos G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997, 277, 55-60.
- Mall J. W. (2003). *In-vitro, in-vivo* und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit des Angiogenehemmers Thalidomid. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin, 2003

- Mandriota S. J. and Pepper M. S. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 1998, 83, 852-9.
- Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 2003, 196, 430-43.
- Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Breant C. and Eichmann A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 2001a, 128, 3359-70.
- Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Breant C. and Eichmann A. Selective expression of angiopoietin 1 and 2 in mesenchymal cells surrounding veins and arteries of the avian embryo. *Mech Dev* 2001b, 106, 133-6.
- Mukoyama Y. S., Shin D., Britsch S., Taniguchi M. and Anderson D. J. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* 2002, 109, 693-705.
- Murga M., Fernandez-Capetillo O. and Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 2005, 105, 1992-9.
- Murphy J. F., Lennon F., Steele C., Kelleher D., Fitzgerald D. and Long A. C. Engagement of CD44 modulates cyclooxygenase induction, VEGF generation, and proliferation in human vascular endothelial cells. *FASEB J* 2005, 19, 446-8.
- Muskavitch M. A. Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol* 1994, 166, 415-30.
- Nakagawa O., McFadden D. G., Nakagawa M., Yanagisawa H., Hu T., Srivastava D. and Olson E. N. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97, 13655-60.
- Nakagawa O., Nakagawa M., Richardson J. A., Olson E. N. and Srivastava D. HRT1, HRT2, and HRT3: a new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments. *Dev Biol* 1999, 216, 72-84.
- Nandi A., Estess P. and Siegelman M. H. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem* 2000, 275, 14939-48.
- Noden D. M. Origins and patterning of avian outflow tract endocardium. *Development* 1991, 111, 867-76.
- Nosedá M., Chang L., McLean G., Grim J. E., Clurman B. E., Smith L. L. and Karsan A. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004, 24, 8813-22.
- Nye J. S. and Kopan R. Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch. *Curr Biol* 1995, 5, 966-9.
- Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M. and Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999, 274, 15732-9.
- Othman-Hassan K., Patel K., Papoutsis M., Rodriguez-Niedenfuhr M., Christ B. and Wilting J. Arterial identity of endothelial cells is controlled by local cues. *Dev Biol* 2001, 237, 398-409.
- Palmer R. M., Ferrige A. G. and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, 327, 524-6.
- Patel N. S., Li J. L., Generali D., Poulosom R., Cranston D. W. and Harris A. L. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res* 2005, 65, 8690-7.
- Pickering B. M. and Willis A. E. The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2005, 16, 39-47.
- Pierce E. A., Foley E. D. and Smith L. E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1996, 114, 1219-28.

- Rajantie I., Ekman N., Iljin K., Arighi E., Gunji Y., Kaukonen J., Palotie A., Dewerchin M., Carmeliet P. and Alitalo K. Bmx tyrosine kinase has a redundant function downstream of angiopoietin and vascular endothelial growth factor receptors in arterial endothelium. *Mol Cell Biol* 2001, 21, 4647-55.
- Risau W. Embryonic angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991, 51, 371-6.
- Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995, 9, 926-33.
- Risau W. and Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11, 73-91.
- Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal für Kardiologie* 2002, 9, 556-562.
- Ross R. and Glomset J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976a, 295, 369-77.
- Ross R. and Glomset J. A. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 1976b, 295, 420-5.
- Sainson R. C., Aoto J., Nakatsu M. N., Holderfield M., Conn E., Koller E. and Hughes C. C. Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *FASEB J* 2005, 19, 1027-9.
- Sakata Y., Kamei C. N., Nakagami H., Bronson R., Liao J. K. and Chin M. T. Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 16197-202.
- Sakata Y., Xiang F., Chen Z., Kiriya Y., Kamei C. N., Simon D. I. and Chin M. T. Transcription factor CHF1/Hey2 regulates neointimal formation in vivo and vascular smooth muscle proliferation and migration in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24, 2069-74.
- Sambrook J. and Russell D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sato T. N., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg-Buchholz K., Fujiwara Y., Gendron-Maguire M., Gridley T., Wolburg H., Risau W. and Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995, 376, 70-4.
- Savani R. C., Cao G., Pooler P. M., Zaman A., Zhou Z. and DeLisser H. M. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001, 276, 36770-8.
- Schaper W. and Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res* 1999, 43, 835-7.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L. and Schuh A. C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995, 376, 62-6.
- Shirvani S., Xiang F., Koibuchi N. and Chin M. T. CHF1/Hey2 suppresses SM-MHC promoter activity through an interaction with GATA-6. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 339, 151-6.
- Shutter J. R., Scully S., Fan W., Richards W. G., Kitajewski J., Deblandre G. A., Kintner C. R. and Stark K. L. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 2000, 14, 1313-8.
- Slevin M., Kumar S. and Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* 2002, 277, 41046-59.
- Stone J., Itin A., Alon T., Pe'er J., Gnessin H., Chan-Ling T. and Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 1995, 15, 4738-47.
- Stratmann A., Risau W. and Plate K. H. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998, 153, 1459-66.

- Suchting S., Freitas C., le Noble F., Benedito R., Breant C., Duarte A. and Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 3225-30.
- Suma H. Arterial grafts in coronary bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 1999, 5, 141-5.
- Suri C., Jones P. F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P. C., Davis S., Sato T. N. and Yancopoulos G. D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996, 87, 1171-80.
- Suri C., McClain J., Thurston G., McDonald D. M., Zhou H., Oldmixon E. H., Sato T. N. and Yancopoulos G. D. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998, 282, 468-71.
- Takizawa T., Ochiai W., Nakashima K. and Taga T. Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic Acids Res* 2003, 31, 5723-31.
- Taylor K. L., Henderson A. M. and Hughes C. C. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* 2002, 64, 372-83.
- Thurston G., Suri C., Smith K., McClain J., Sato T. N., Yancopoulos G. D. and McDonald D. M. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999, 286, 2511-4.
- Torres-Vazquez J., Kamei M. and Weinstein B. M. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res* 2003, 314, 43-59.
- Trochon V., Mabilat C., Bertrand P., Legrand Y., Smadja-Joffe F., Soria C., Delpech B. and Lu H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1996, 66, 664-8.
- Uyttendaele H., Marazzi G., Wu G., Yan Q., Sassoon D. and Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* 1996, 122, 2251-9.
- Vikkula M., Boon L. M., Carraway K. L., 3rd, Calvert J. T., Diamonti A. J., Goumnerov B., Pasyk K. A., Marchuk D. A., Warman M. L., Cantley L. C., Mulliken J. B. and Olsen B. R. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996, 87, 1181-90.
- Villa N., Walker L., Lindsell C. E., Gasson J., Iruela-Arispe M. L. and Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 2001, 108, 161-4.
- Wang H. U., Chen Z. F. and Anderson D. J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998, 93, 741-53.
- Weinmaster G. The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 1997, 9, 91-102.
- Weinmaster G. Notch signaling: direct or what? *Curr Opin Genet Dev* 1998, 8, 436-42.
- Weinstein B. M., Stemple D. L., Driever W. and Fishman M. C. Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nat Med* 1995, 1, 1143-7.
- Weiswasser J. M., Kellicut D., Arora S. and Sidawy A. N. Strategies of arteriovenous dialysis access. *Semin Vasc Surg* 2004, 17, 10-8.
- West D. C. and Kumar S. The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial cell proliferation and monolayer integrity. *Exp Cell Res* 1989, 183, 179-96.
- Wilkinson D. G. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* 2001, 2, 155-64.
- Williams C. K., Li J. L., Murga M., Harris A. L. and Tosato G. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 2006, 107, 931-9.

- Wu J., Iwata F., Grass J. A., Osborne C. S., Elnitski L., Fraser P., Ohneda O., Yamamoto M. and Bresnick E. H. Molecular determinants of NOTCH4 transcription in vascular endothelium. *Mol Cell Biol* 2005, 25, 1458-74.
- Xue Y., Gao X., Lindsell C. E., Norton C. R., Chang B., Hicks C., Gendron-Maguire M., Rand E. B., Weinmaster G. and Gridley T. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 1999, 8, 723-30.
- Yamaguchi Y., Gunji Y., Nakamura M., Hayakawa K., Maeda M., Osawa H., Nagayoshi K., Kasahara T. and Suda T. Expression of c-kit mRNA and protein during the differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1993, 21, 1233-8.
- Yamamoto K., Sokabe T., Watabe T., Miyazono K., Yamashita J. K., Obi S., Ohura N., Matsushita A., Kamiya A. and Ando J. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288, H1915-24.
- Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J. S., Wiegand S. J. and Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407, 242-8.
- Yla-Herttuala S., Rissanen T. T., Vajanto I. and Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007, 49, 1015-26.
- You L. R., Lin F. J., Lee C. T., DeMayo F. J., Tsai M. J. and Tsai S. Y. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* 2005, 435, 98-104.
- Zakrzewicz A., Secomb T. W. and Pries A. R. Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci* 2002, 17, 197-201.
- Zhang L., Yang N., Park J. W., Katsaros D., Fracchioli S., Cao G., O'Brien-Jenkins A., Randall T. C., Rubin S. C. and Coukos G. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res* 2003, 63, 3403-12.
- Zhong T. P., Childs S., Leu J. P. and Fishman M. C. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001, 414, 216-20.
- Zhong T. P., Rosenberg M., Mohideen M. A., Weinstein B. and Fishman M. C. gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* 2000, 287, 1820-4.
- Zhu L. J., Cullinan-Bove K., Polihronis M., Bagchi M. K. and Bagchi I. C. Calcitonin is a progesterone-regulated marker that forecasts the receptive state of endometrium during implantation. *Endocrinology* 1998, 139, 3923-34.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe von mir erstellt wurde. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus Publikationen und Werken entnommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, auch nicht veröffentlicht.

Erfolgreiche Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung vom 16.04.2003 erkenne ich in allen Teilen an.

Corina Gryczka

Dresden, den

---

## Lebenslauf

Name: Corina Gryczka

Geburtstag: 31. Juli 1978

Geburtsort: Bernburg/Saale

09/1985 – 08/1991 Polytechnische Oberschule „Valentina Tereschkova, Bernburg

09/1991 – 07/1997 Gymnasium „Hermann Hellriegel“, Bernburg

07/1997 Abitur

10/1997 – 07/2003 Biotechnologie-Studium an der Universität Braunschweig

Thema der Diplomarbeit:

„Regulation der Schwermetallassimilation in Pflanzen,„

seit 09/2003

Promotion am Bereich Gefäßendothel und Mikrozirkulation der  
Medizinischen Fakultät Dresden Carl Gustav Carus der  
Technischen Universität Dresden

Thema der Promotion:

Arteriovenöse Differenzierung humaner Endothelzellen:  
Einfluss von Wachstumsfaktoren, Hypoxie und Biomechanik

---

## Publikationen

### Originalarbeiten

Douchkov D, **Gryczka C**, Stephan UW, Hell R, Baumlein H (2005)  
Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco.  
*Plant Cell Environ.* 28: 365-374

Vorwieger A, **Gryczka C**, Czihal A, Douchkov D, Tiedemann J, Mock HP, Jakoby M, Weisshaar B, Saalbach I, Bäumlein H (2007)  
Iron assimilation and transcription factor controlled synthesis of riboflavin in plants.  
*Planta* 226:147-58

Goettsch W, **Gryczka C**, Korff T, Ernst E, Goettsch C, Seebach J, Schnittler HJ, Augustin HG, Morawietz H (2008)  
Flow-dependent regulation of angiopoietin-2  
*J. Cell. Physiol.*, 214:491-503

**Gryczka C**, Korff T, Morawietz H, Goettsch W (2008)  
Genes of the Notch pathway as markers of human arterial endothelial cells: modulation by VEGF-A  
*submitted*

### Abstracts

1) Goettsch W, **Gryczka C**, Ellinghaus P, Morawietz H (2005)  
Identification of marker genes of human arterial endothelial cells  
*Pflügers Arch. (Eur. J. Physiol.)*, 449: S58

2) Goettsch W, Ellinghaus P, **Gryczka C**, Morawietz H (2005)  
Die Notch-Zielgene Hey1 und Hey2 vermitteln einen arteriellen Phänotyp in humanen Endothelzellen  
*Z. Kardiol. (German J. Cardiol.)*, 94 (Suppl. 1):V253

3) **Gryczka C**, Goettsch W, Morawietz H (2005)  
Regulation of Angiopoietin-2 by shear stress involves VEGF  
*J. Vasc. Res.*, 42 (Suppl. 2): II/60

4) Goettsch W, **Gryczka C**, Ellinghaus P, Morawietz H (2005)  
Identification of marker genes of human arterial endothelial cells  
*5th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Dresden, Abstracts: 51*

5) **Gryczka C**, Goettsch W, Augustin HG, Morawietz H (2005)  
Shear stress-dependent regulation of Angiopoietin-2 involves VEGF in human endothelial cells  
*5th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Dresden, Abstracts: 53*

- 
- 6) Goettsch W, **Gryczka C**, Morawietz H (2006)  
Shear stress regulation of Ang-2 involves VEGF  
*Acta Physiol. (Oxf)*, 186 (Suppl 1):203
- 7) **Gryczka C**, Goettsch W, Morawietz H (2006)  
Die Regulation von Angiopoietin-2 durch Schubspannung ist VEGF-vermittelt  
72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung,  
Mannheim, Abstracts: V796
- 8) Goettsch W, Brux M, **Gryczka C**, Morawietz H (2007)  
FOXO1 translocation after shear stress regulates Ang-2 expression in human endothelial cells  
*Acta Physiol. (Oxf)*, 189 (Suppl 653): 141
- 9) Brunssen C, Goettsch W, **Gryczka C**, Brux M, Korff T, Ernst E, Goettsch C, Seebach J,  
Schnittler HJ, Augustin HG, Morawietz H (2007)  
Regulation of Angiopoietin-2 in human endothelial cells by shear stress  
1st International Kloster Seeon Meeting of the DFG SPP1190 "The tumor - vessel interface:  
Cellular and molecular mechanisms of tumor progression and metastasis", Kloster Seeon,  
Germany, Abstracts: 31
- 10) Goettsch W, **Gryczka C**, Korten S, Korff T, Ernst E, Goettsch C, Seebach J, Schnittler  
HJ, Augustin HG, Morawietz H (2007)  
Shear stress-dependent regulation of angiopoietin-2  
Joint Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology and the 6th  
International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Heidelberg, Germany,  
Programme and Abstracts: 146
- 11) Goettsch W, **Gryczka C**, Korff T, Ernst E, Goettsch C, Seebach J, Schnittler HJ,  
Augustin HG, Morawietz H (2007)  
Flow-dependent regulation of angiopoietin-2  
*Circulation*, 116 (Suppl.): II-73
- 12) **Gryczka C**, Brunssen C, Korten S, Morawietz H, Goettsch W (2008)  
Genes of the Notch pathway as markers of human arterial endothelial cells: modulation by  
VEGF-A  
*Acta Physiol (Oxf)*, 192 (Suppl 663): 80
- 13) Göttisch W, **Gryczka C**, Ellinghaus P, Morawietz H (2008)  
Genes of the Notch pathway as markers of human arterial endothelial cells: Modulation by  
VEGF-A  
*International Congress of Genetics 2008, Berlin, Abstracts, in Press*

---

## **Danksagung**

Die Arbeit wurde von August 2003 bis November 2006 am Bereich Gefäßendothel und Mikrozirkulation der Medizinischen Klinik der TU-Dresden unter Leitung von Prof. Dr. Morawietz und unter der Betreuung von Dr. Winfried Götttsch durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Vollmer für die Betreuung meiner Promotion am Institut für Zoologie der TU-Dresden.

Bei Prof. Dr. Morawietz bedanke ich mich für die Überlassung des Themas. Sein Interesse am Fortgang der Arbeit, die konstruktiven Gespräche und besonders die (manchmal notwendige) Motivation habe ich sehr geschätzt.

Dr. Winfried Götttsch danke ich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung. Seine produktiven Ideen und Ratschläge gaben der Arbeit immer wieder neue Impulse.

Einen großen Dank an alle MIZ'ler (Gefäßendothel und Mikrozirkulation), die durch ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft ein angenehmes Arbeiten ermöglichten. Dazu gehören aus den „Anfangstagen“ Dr. Rusan A. Catar, Annika Frenzel und Dr. Gregor Müller. Ich bedanke mich bei Kathrin Borgwald, Kathrin Genauck und Melanie Brux, ebenso bei Li Kaltanekar und Boba Korten, sowie bei Esther Parisius-Liebstein, Coy Brunsen, Anja Leuner und Claudia Bodenstein.

Weiterhin bedanke ich mich bei David Poitz für die Zusammenarbeit mit der Hypoxie-Kammer, sowie bei Dr. Jochen Seebach für die Hilfe mit den Matrigel-Videoaufnahmen.