

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der  
Medizinischen Fakultät  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Unterschiede im Migrationsverhalten und Metabolismus  
zwischen weiblichen und männlichen Endothelzellen der  
Nabelschnur (HUVEC)**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Christopher Blaschke

aus Köln

Datum der Promotion: 25.11.2022

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden Publikation bereits veröffentlicht:

Lorenz M, **Blaschke B**, Benn A, Hammer E, Witt E, Kirwan J, Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bartsch C, Vietzke A, Kramer F, Kappert K, Brunner P, Nguyen HG, Dreger H, Stangl K, Knaus P, Stangl V. Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs. *Atherosclerosis*. 2019;291:99-106.(1)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>II</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Zusammenfassung / Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
2.1 Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....	4
2.2 Das Geschlecht und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	5
2.2.1 Einfluss des Geschlechts auf Mortalität und Morbidität.....	5
2.2.2 Gründe für sexspezifische Unterschiede.....	7
2.2.2.1 Hormonelle Unterschiede .....	7
2.2.2.2 Intrinsische zelluläre Unterschiede .....	9
2.3 Mechanismen der zellulären Migration .....	11
2.3.1 Endotheliale Migration.....	11
2.3.2 Endothelialer Energiemetabolismus.....	16
2.4 Ziel der Arbeit und Fragestellung .....	18
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Materialien .....	20
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	20
3.1.2 Chemikalien und Substanzen.....	22
3.1.3 Zellkulturmedien .....	24
3.1.4 ELISA und Kits .....	25
3.1.5 Primer.....	25
3.1.6 Antikörper .....	26
3.1.7 Puffer und Lösungen .....	26
3.2 Methoden .....	27
3.2.1 Zellkultur .....	27
3.2.1.1 Präparation humaner Endothelzellen aus Umbilikalvenen .....	28
3.2.1.2 Trypsinieren und Passagieren der HUVECs .....	28
3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen der HUVECs .....	29
3.2.2 RNA-Isolation .....	29

3.2.3 Real-Time-RT-PCR .....	30
3.2.3.1 Das Prinzip der Real-Time-PCR.....	30
3.2.3.2 Umschreibung der Messenger-RNA in Copy-DNA.....	31
3.2.3.3 Durchführung der Real-Time-PCR .....	32
3.2.4 Bestimmung der Zellmigration.....	33
3.2.5 Der Seahorse XF Cell Mito Stress Test .....	35
3.2.5.1 Das Prinzip des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests.....	35
3.2.5.2 Durchführung des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests .....	39
3.2.6 Messung des intrazellulären cAMP-Gehalts .....	40
3.2.7 Messung des intrazellulären ATP-Gehalts .....	42
3.2.8 Western Blot.....	43
3.2.8.1 Proteinextraktion.....	43
3.2.8.2 Proteinbestimmung.....	44
3.2.8.3 Gelelektrophorese .....	44
3.2.8.4 Blotting.....	45
3.2.9 Statistische Auswertung .....	47
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1 Zellmigration .....	48
4.2 Messung der metabolischen Aktivität .....	49
4.2.1 Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung .....	50
4.2.2 Energiegewinnung durch Glykolyse .....	53
4.2.3 ECAR/OCR Ratio .....	54
4.3 Intrazelluläre ATP-Konzentration .....	55
4.4 cAMP-Konzentration.....	57
4.5 PFKFB3-Expression .....	59
4.6 Zelluläre VEGFR2-Proteinlevel.....	60
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>62</b>
5.1 Sexspezifische Unterschiede in der endothelialen Migration.....	63
5.2 Sexspezifische Unterschiede im endothelialen Metabolismus .....	66
5.3 Sexspezifische VEGFR2-Proteinmenge .....	73
5.4 Sexspezifische cAMP-Konzentration.....	74

5.5 Ausblick.....	76
5.5 Limitationen dieser Arbeit .....	77
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>78</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>94</b>
<b>Anteilerklärung .....</b>	<b>95</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>96</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>97</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil der Todesursachen an der Gesamtmortalität für Männer (A) und Frauen (B) in Europa (Stand 2017)(17).....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Angiogenese .....	12
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des VEGFR2-Signaling in Endothelzellen .....	14
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme (5-fache Vergrößerung) von HUVECs vor (links) und nach (rechts) VEGF-Stimulation .....	35
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion von Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A mit der oxidativen Phosphorylierung .....	37
Abbildung 6: Schematischer Seahorse Mito Stress Test mit Darstellung des Verlaufs der OCR in Abhängigkeit von Zeit und Injektionen .....	38
Abbildung 7: Spaltschluss nach 16 Stunden.....	49
Abbildung 8: Sexspezifische Unterschiede in der basalen Atmung .....	50
Abbildung 9: Sexspezifische Unterschiede in der respiratorischen Reservekapazität .....	51
Abbildung 10: Sexspezifischer Vergleich von Protonenleck (A), ATP-Produktion (B), Maximaler Atmung (C) und Nicht-mitochondrialer Atmung (D).....	53
Abbildung 11: Sexspezifischer Vergleich der ECAR vor (A) und nach (B) Oligomycin .....	54
Abbildung 12: Sexspezifischer Vergleich der basalen ECAR/OCR Ratios (A) und die Anzahl von HUVEC-Zwillingspaaren mit höherer ECAR/OCR Ratio für weibliche oder männliche Zellen (B) .....	55
Abbildung 13: Sexspezifische Unterschiede in der absoluten (A) und relativen (B) ATP-Konzentration sowie die Anzahl von HUVEC-Zwillingspaaren mit höherer ATP-Konzentration für weibliche oder männliche Zellen (C).....	57
Abbildung 14: Sexspezifische Unterschiede in der cAMP-Konzentration in Lysaten nach 3 (A) und 16 Stunden (B) sowie in Überständen (C) nach 16 Stunden Behandlung .....	59
Abbildung 15: Sexspezifischer Vergleich der relativen PFKFB3-Expression nach 16 Stunden bezogen auf die Baseline (A) und auf die Kontrolle (B) .....	60

Abbildung 16: <b>Sexspezifischer Vergleich in der VEGFR2-Proteinmenge nach VEGF (+) im Vergleich zur Kontrolle (-)</b> .....	61
Abbildung 17: <b>Kompartimentierung des Energiemetabolismus in Endothelzellen</b> .....	71

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: <b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b> .....	20
Tabelle 2: <b>Chemikalien und Substanzen</b> .....	22
Tabelle 3: <b>Vollmedium</b> .....	24
Tabelle 4: <b>Serumarmes Zellmedium</b> .....	24
Tabelle 5: <b>Seahorse Assay Medium</b> .....	25
Tabelle 6: <b>ELISA und Kits</b> .....	25
Tabelle 7: <b>Primer</b> .....	25
Tabelle 8: <b>Erstantikörper</b> .....	26
Tabelle 9: <b>Zweitantikörper</b> .....	26
Tabelle 10: <b>Puffer und Lösungen</b> .....	26
Tabelle 11: <b>Bestandteile des RT-Mastermix</b> .....	32
Tabelle 12: <b>Bestandteile von Trenngel und Sammelgel.</b> .....	44

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BPB	Bromphenolblau
C°	Celsius
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CNG	Cyclic-Nucleotide-Gated-Ion-Channels
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DHT	Dihydrotestosteron
DII4	Delta-like-ligand 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECAR	Extracellular Acidification Rate
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
EPAC	Exchange-Factor-Directly-Activated-By- cAMP
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ERK	Extracellular-Signal-Regulated-Kinase
FCCP	Carbonyl Cyanide-4- Trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor

HAEC	Human Aortic Endothel Cell
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HER	Heart and Estrogen/progestin Replacement
HMVEC	Human Microvascular Endothelial Cell
HRT	Hormon Replacement Therapy
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
M	Molar
mA	Miliampere
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
μM	Mikromolar
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	NanoMolar
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	No Template Control
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCR	Oxygen Consumption Rate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFKFB	Phosphofruktokinase-2/Fructose-2,6-Bisphosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKM2	Pyruvatkinase M 2

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCT	Randomized Controlled Trial
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Radical Oxygen Species
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
SRY	Sex-determining Region Y
TBS	Tris-Buffered-Saline
TEMED	N, N, N, N'Tetra-methyl- Ethylenediamine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organisation
XIST	X-Inactive Specific Transcript

# 1 Zusammenfassung / Abstract

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die Haupttodesursache für Männer und Frauen dar, jedoch erkranken Frauen erst wesentlich später. Neben hormonellen Einflüssen werden auch sexspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene als Grund dafür diskutiert. Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle für die Gefäßhomöostase. Eine Dysfunktion des Endothels korreliert mit der Entstehung der Atherosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzellen unter sexspezifischen Aspekten auf funktionelle und metabolische Unterschiede untersucht. Dafür wurden weitgehend weibliche und männliche Endothelzellen der Nabelschnur (HUVECs) von dizygoten Zwillingen verwendet, um Hormon- und Umwelteinflüsse auf sexspezifische Unterschiede zu minimieren.

In unbehandelten Zellen ergaben sich keine wesentlichen sexspezifischen Unterschiede. Nach Behandlung mit VEGF jedoch wurde eine stärkere Migration in weiblichen HUVECs beobachtet. Die intrazelluläre ATP-Konzentration war in weiblichen HUVECs nach VEGF signifikant höher. Serumreduktion führte in männlichen nicht jedoch in weiblichen HUVECs zu einer signifikanten Verminderung der ATP-Konzentration. Nach Behandlung mit VEGF war der Quotient aus Glykolyse und mitochondrialer Atmung in den meisten HUVEC-Zwillingspaaren höher bei weiblichen Zellen. Im Gegensatz dazu wurde nach Serumreduktion eine höhere basale mitochondriale Atmung in männlichen HUVECs gemessen. Ein wesentlicher sexspezifischer Unterschied in der PFKFB3-Expression (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase-3), ein Hauptregulierungsenzym der Glykolyse, zeigte sich jedoch nicht.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein Sexualdimorphismus im Migrationsverhalten sowie im Energiemetabolismus festgestellt werden. Eine höhere

ATP-Konzentration nach Serumreduktion und VEGF-Behandlung sowie eine stärkere VEGF-induzierte Migration deuten auf sexspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene hin. Eine bessere Energiebilanz sowie eine größere Glykolyse-Aktivität könnten im Zusammenhang mit einer besseren Migration weiblicher HUVECs stehen.

### Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are the main cause of death in men and women, however these develop later in women. In addition to hormonal influences, sex-specific differences at a cellular level could play a crucial role. The endothelium is responsible for maintaining vascular homeostasis and its dysfunction may lead to atherosclerosis und CVDs. The present study evaluated sex-specific functional and metabolic differences in endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) from dizygotic twins were used to reduce hormonal and environmental influences on sex-specific differences.

No sex-specific differences were observed in untreated cells. However, after VEGF stimulation, the migration in female HUVECs was significantly more pronounced after VEGF. Intracellular ATP levels were significantly higher in female cells after VEGF. Serum starvation resulted in a significant decrease of ATP levels in male but not in female HUVECs. After VEGF, the ratio of glycolysis/mitochondrial respiration was higher in female HUVECs in most twin pairs. In contrast, male HUVECs showed higher basal mitochondrial respiration after serum starvation. No sex-specific differences were observed in the expression of PFKFB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase-3), a rate-regulating enzyme of glycolysis.

In conclusion, this study identified sex-specific differences in cellular migration and metabolism. Higher ATP levels after VEGF and serum starvation, as well as a more pronounced VEGF-induced migration in female HUVECs, indicate sex-specific differences at the cellular level. A better energy balance and higher glycolytic activity could contribute to a stronger migration capacity in female HUVECs.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Die Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen**

Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) bezeichnet Herz-Kreislauf-Erkrankungen als die weltweit führende Ursache für Mortalität und Morbidität (2). Für ein Drittel aller Todesfälle werden Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Industrienationen verantwortlich gemacht (3). Die steigende Lebenserwartung und der damit einhergehende demographische Wandel führen trotz immer besserer medizinischer Versorgung zu einer Zunahme der kardiovaskulär-bedingten Todesfälle (4, 5). Durch die ansteigende Prävalenz von Übergewicht bzw. Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2, insbesondere in Entwicklungs- und Schwellenländern, wird davon ausgegangen, dass sich dieser Trend in Zukunft fortsetzen wird (2, 6).

Die Hauptursache für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist die Atherosklerose, eine chronisch-progressive Gefäßerkrankung, die die Entstehung von intraluminalen Plaques und Plaquerosionen mit nachfolgender Thrombose beschreibt (7). Die Entstehung der Atherosklerose ist multifaktoriell und wird durch eine Vielzahl von modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren begünstigt. Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren zählen unter anderem das Alter, der familiäre Hintergrund sowie das männliche Geschlecht (4). Modifizierbare Risikofaktoren umfassen Tabakkonsum, ungesunde Ernährung, geringe physische Aktivität und Adipositas.

## **2.2 Das Geschlecht und kardiovaskuläre Erkrankungen**

### **2.2.1 Einfluss des Geschlechts auf Mortalität und Morbidität**

In der Entstehung, Progression und dem Therapieerfolg von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bestehen sexspezifische Unterschiede (8-10). Sowohl für Männer als auch für Frauen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursachen in Industrienationen (11, 12). Da der Anteil der Frauen in den höheren Altersgruppen zunimmt und die Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Alter ansteigt, sind Frauen insgesamt häufiger von Herz-Kreislauf-Erkrankungen betroffen (13-16). In Europa verstarben 2017 49 % der Frauen an kardiovaskulären Erkrankungen während bei Männern Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 40 % zur Gesamtmortalität beitragen (17) (Abbildung 1). Obwohl die relative Mortalität durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei beiden Geschlechtern abnimmt, ist diese Tendenz bei Frauen langsamer als bei Männern (18, 19).

Eine genauere Betrachtung zeigt eine sexspezifische Altersverteilung in der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität. Frauen erkranken im Schnitt erst zehn Jahre später an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und sogar 20 Jahre später an einem Myokardinfarkt als Männer (11, 20). Im Alter unter 65 Jahren ist das Risiko an einer koronaren Herzerkrankung zu versterben für Männer 3- bis 4-mal größer als für Frauen. Insgesamt sind somit Frauen daher erst im höheren Alter von Herz-Kreislauf-Erkrankungen betroffen (21). Trotz zunehmender Prävalenz der Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Frauen im Alter liegt deren Lebenserwartung in Deutschland mit 83,2 Jahren knapp fünf Jahre über der Lebenserwartung von Männern (22).

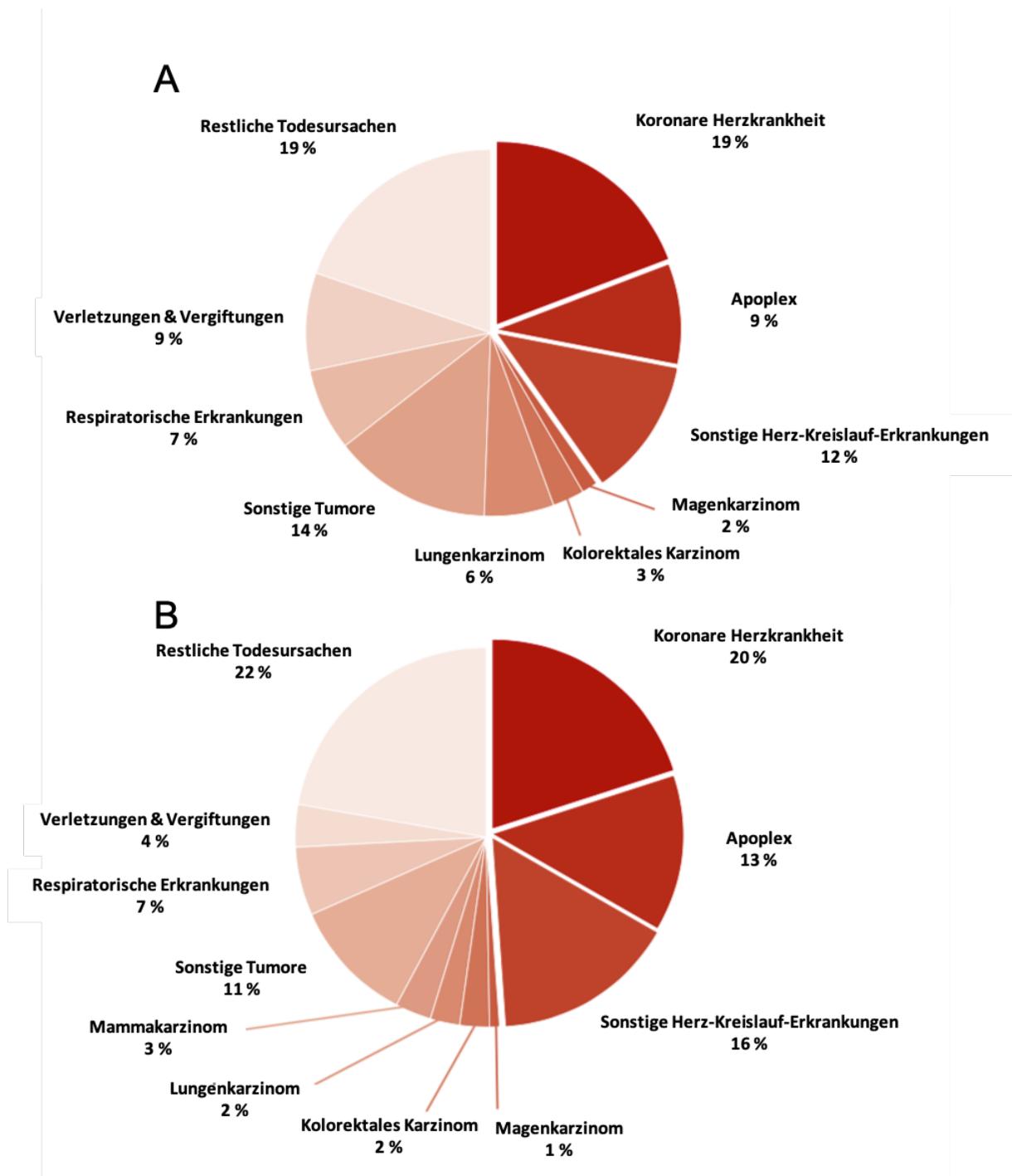


Abbildung 1: Anteil der Todesursachen an der Gesamtmortalität für Männer (A) und Frauen (B) in Europa (Stand 2017)(17). Mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press.

Weiterhin besteht ein sexspezifischer Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren. Nikotinkonsum steigert das relative KHK-Risiko bei Frauen um 25 % stärker als bei Männern (23). Sowohl bei Männern als auch bei Frauen nimmt im Alter die arterielle Hypertonie zu, jedoch ist die Prävalenz und Inzidenz der arteriellen

Hypertonie bei Frauen insbesondere nach der Menopause höher als bei Männern (24-26). Das KHK-Risiko steigt durch einen Diabetes mellitus in Frauen stärker als in Männern (27). Prämenopausal sind Frauen seltener von Fettstoffwechselstörungen betroffen, was sich in geringeren Triglycerid- und LDL (Low Density Lipoprotein)-Cholesterolverwerten sowie in einem erhöhtem HDL (High Density Lipoprotein)-Cholesterolverwert widerspiegelt (28). Zusätzlich zu den genannten Hauptrisikofaktoren sind Frauen speziell durch sexspezifische kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie dem Gestationsdiabetes und der Gestationshypertonie sowie endokrinen Störungen wie dem polyzystischen Ovar-Syndrom (PCOS), betroffen (5, 13).

## **2.2.2 Gründe für sexspezifische Unterschiede**

### **2.2.2.1 Hormonelle Unterschiede**

Frauen haben prä- und postmenopausal ein unterschiedliches kardiovaskuläres Risikoprofil. Demzufolge wurden sexspezifische Unterschiede bisher hauptsächlich durch den Einfluss von Östrogen erklärt. Eine frühe Menopause erhöht das Risiko kardiovaskulärer Risikofaktoren wie dem arteriellen Hypertonus (29). Das Risiko einer arteriellen Hypertonie ist in prämenopausalen Frauen geringer gegenüber nach der Menopause (30). Postmenopausal steigt in Frauen das Risiko einer Dyslipidämie und des Übergewicht (28).

Östrogen wirkt über den Östrogen Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  auf das Endothel. Endothelzellen sind spezialisierte Epithelzellen, welche die luminale Seite des Blut- und Lymphgefäßsystems auskleiden (31, 32). Als eines der Haupteffekte führt Östrogen zur endothelialen Freisetzung vasodilatatorischer Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO), und damit zu einer Gefäßrelaxation. Die Fähigkeit der endothelialen Vasodilatation beugt die Entstehung der Atherosklerose vor (33).

Weiterhin ist eine östrogene Hemmung vasokonstriktiver Substanzen sowie die Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) durch Hemmung der Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-Transkription bekannt (34-36).

Der ausschließlich positive kardiovaskuläre Effekt von Östrogen konnte sich in klinischen Studien bislang nicht bestätigen. In einer randomisierten kontrollierten Studie (Randomized Controlled Trial, RCT) der Women's Health Initiative (WHI) wurde die Wirkung von Östrogen plus Progestin bei postmenopausalen Frauen als Hormon-Ersatz-Therapie (Hormon Replacement Therapy, HRT) gegenüber Placebo untersucht. Dabei musste die Studie bereits nach fünf Jahren frühzeitig abgebrochen werden, da sich in der HRT-Gruppe ein erhöhtes Risiko für ein invasives Mammakarzinom zeigte. Das kardiovaskuläre Risiko wurde zudem in dieser Gruppe nicht signifikant gesenkt (37). Auch in der HER Studie (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) zeigte eine HRT keinen Vorteil auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos. In der HRT-Gruppe stieg außerdem das Risiko einer tiefen Venenthrombose (TVT) (38). Insgesamt stellten Sare et al. in ihrer Metaanalyse ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Apoplex, einer tiefen Venenthrombose und einer Lungenembolie nach HRT fest (39). Nicht zuletzt bleibt ungeklärt, warum Östrogen einerseits vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen in prämenopausalen Frauen schützt, jedoch andererseits mit einer erhöhten Prävalenz von anderen Gefäßerkrankungen wie Vaskulitiden und Kollagenosen in dieser Altersgruppe einhergeht (11, 40, 41), welche wiederum das kardiovaskuläre Risiko erhöhen (42-44). Warum ein früher Beginn einer HRT das kardiovaskuläre Risiko senkt, während ein später Beginn nach Menopause das kardiovaskuläre Risiko wiederum erhöht, ist bislang ebenfalls nicht bekannt(45).

### 2.2.2.2 Intrinsische zelluläre Unterschiede

Der sexspezifische Dimorphismus in kardiovaskulären Erkrankungen kann nach aktuellem Wissensstand nicht allein durch hormonelle Unterschiede erklärt werden. Neben Sexualhormonen kommen auch sexspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene in Betracht. Studien werden bislang jedoch hauptsächlich mit sexunspezifischen oder männlichen Zellen durchgeführt (46), so dass hier ein erhöhter Forschungsbedarf besteht.

Mehrere Studien konnten einen Einfluss des zellulären Geschlechts auf sexspezifische Unterschiede zeigen. In Mäusen wurde in embryonalen Zellen eine sexspezifische DNA-Methylierung festgestellt (47). Mitochondrien aus Kardiomyozyten weiblicher Ratten sind resistenter gegenüber Ischämie sowie nachfolgendem Reperfusionsschaden und produzieren weniger reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) als Mitochondrien männlicher Ratten (48). ROS werden wiederum mit der Entstehung der Atherosklerose und Alterungsprozessen in Zusammenhang gebracht (49-51). In Neuronen von Mäusen wurden eine sexspezifische Zellantwort und Apoptose auf zytotoxischen Stress festgestellt (52).

Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses (53), einem gestörten endothelialen Energiemetabolismus (54), sowie durch eine gestörte Aktivität der endothelialen Nitric Oxide Synthase (eNOS) (55). Da die endotheliale Dysfunktion zu Beginn der Atherogenese steht, werden insbesondere Endothelzellen in der kardiovaskulären Grundlagenforschung untersucht. Humane Endothelzellen der Umbilikalvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) haben sich als *in vitro* Modell für sexspezifische Unterschiede etabliert, da sich bei diesen Zellen der Einfluss der Sexualhormone zwischen männlichen und weiblichen Zellen nicht unterscheidet (56).

Auch in Endothelzellen sind hormonunabhängige sexspezifische Unterschiede bekannt. Die Größe und Morphologie unterscheidet sich zwischen männlichen und weiblichen Endothelzellen (57, 58). Bereits 1986 wurde in HUVECs eine höhere Prostaglandin-Synthese in männlichen Zellen festgestellt (59). Prostaglandine sind Vasokonstriktoren und mit der Entstehung der endothelialen Dysfunktion assoziiert (60). Hartmann et al. konnten demonstrieren, dass sexspezifische Unterschiede im Transkriptom in Endothelzellen bei Geburt und im Erwachsenenalter bestehen. Eine sexspezifische Genexpression wurde sowohl für gonodale als auch für autosomale Chromosome nachgewiesen. Gene, die in der Entstehung der KHK beteiligt sind, werden bereits bei Geburt sexspezifisch exprimiert (61).

In unserem kardiologischen Forschungslabor der Charité Mitte konnte gezeigt werden, dass weibliche HUVECs stärker Gene der Immun- und Stressantwort bilden als männliche. Diese Gene werden durch physiologischen Scherstress in weiblichen Zellen außerdem stärker aktiviert (62). Weiterhin werden weibliche Endothelzellen durch zellulären Stress weniger beeinträchtigt. Nach Serumentzug (62) sowie unter Hyperoxie (63) zeigten weibliche Endothelzellen eine höhere Zellviabilität gegenüber männlichen. Sauerstoff- und Glukoseentzug führte stärker in männlichen Endothelzellen zu Zellschädigung und Zelltod als in weiblichen (64).

Die Angiogenese beschreibt den Prozess der Gefäßbildung aus bereits vorhandenen Gefäßen und wird sowohl für Wundheilung als auch zur Deckung des Sauerstoff- und Metabolitenbedarf benötigt. Im pathologischen Kontext, wie zum Beispiel bei einer Myokardischämie, wird über die Angiogenese die beeinträchtigte Perfusion und Herzfunktion durch den Verschluss einer Koronararterie kompensiert und das Zellüberleben verbessert (65). Voraussetzung für die Angiogenese ist die gerichtete Fortbewegung von Endothelzellen, welche als zelluläre Migration bezeichnet wird. In unbehandelten Zellen wurde bereits eine stärkere Migration

weiblicher Endothelzellen festgestellt (58). Eine vermehrte Gefäßbildung wurde unter hyperoxischen Bedingungen in weiblichen HUVECs im Vergleich zu männlichen beobachtet (63). In unserem Forschungslabor zeigte sich, dass weibliche HUVECs vermehrt kapillar-ähnliche Strukturen bilden als männliche Zellen (62). Während die eNOS relevant für die Migration weiblicher HUVECs zu sein scheint, ist der Wirkung der eNOS auf die Migration männlicher Zellen deutlich geringer. In männlichen HUVECs wurde dagegen ein stärkerer Einfluss der Proliferation auf die Wundheilung und Gefäßbildung *in vitro* beschrieben als in weiblichen Zellen (55).

Die Mechanismen für diese sexspezifischen Unterschiede sind bisher weitestgehend unbekannt. In bisherigen Studien wurde die endotheliale Migration unter sexspezifischen Aspekten nur in unbehandelten Zellen untersucht. Die Angiogenese sowie die endotheliale Migration wird jedoch hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren stimuliert (31). Die Untersuchung sexspezifischer Unterschiede in der Migration unter pro-migratorischen Bedingungen könnte weitere Erkenntnisse über einen intrinsischen Sexdimorphismus erbringen. Im Folgenden werden daher relevante Mechanismen der Migration erläutert.

## **2.3 Mechanismen der zellulären Migration**

### **2.3.1 Endotheliale Migration**

Unter basalen Bedingungen liegen Endothelzellen als ruhende Phalanx-Zellen vor (66). Nährstoffmangel, Hypoxie oder Endothelverletzungen führen zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF leiten unter anderem die Umwandlung der inaktiven Endothelzellen in sogenannte Tip- oder Stalk-Zellen ein (31, 67, 68) (Abbildung 2). Die Richtung der endothelialen Migration folgt dabei der höchsten Stimulus-Konzentration (31). Tip-Zellen sind metabolisch sehr aktiv und

bilden Ausstülpungen wie Filopodien und Lamellipodien, um zum Zielort zu migrieren (31, 67, 68). Stalk-Zellen sind über Zell-Zell-Kontakte mit den Tip-Zellen verbunden und erweitern durch Proliferation das Gefäßnetz (31, 67, 68). Das Aufeinandertreffen von Tip-Zellen führt zur Anastomose zweier Gefäßstümpfe und zu einem neuen Gefäßzweig. Die Angiogenese erfolgt bis der Sauerstoff- bzw. Nährstoffbedarf gedeckt ist und keine pro-angiogenetischen Faktoren mehr ausgeschüttet werden. Anschließend erfolgt die Umwandlung in inaktive Phalanx-Zellen (68).

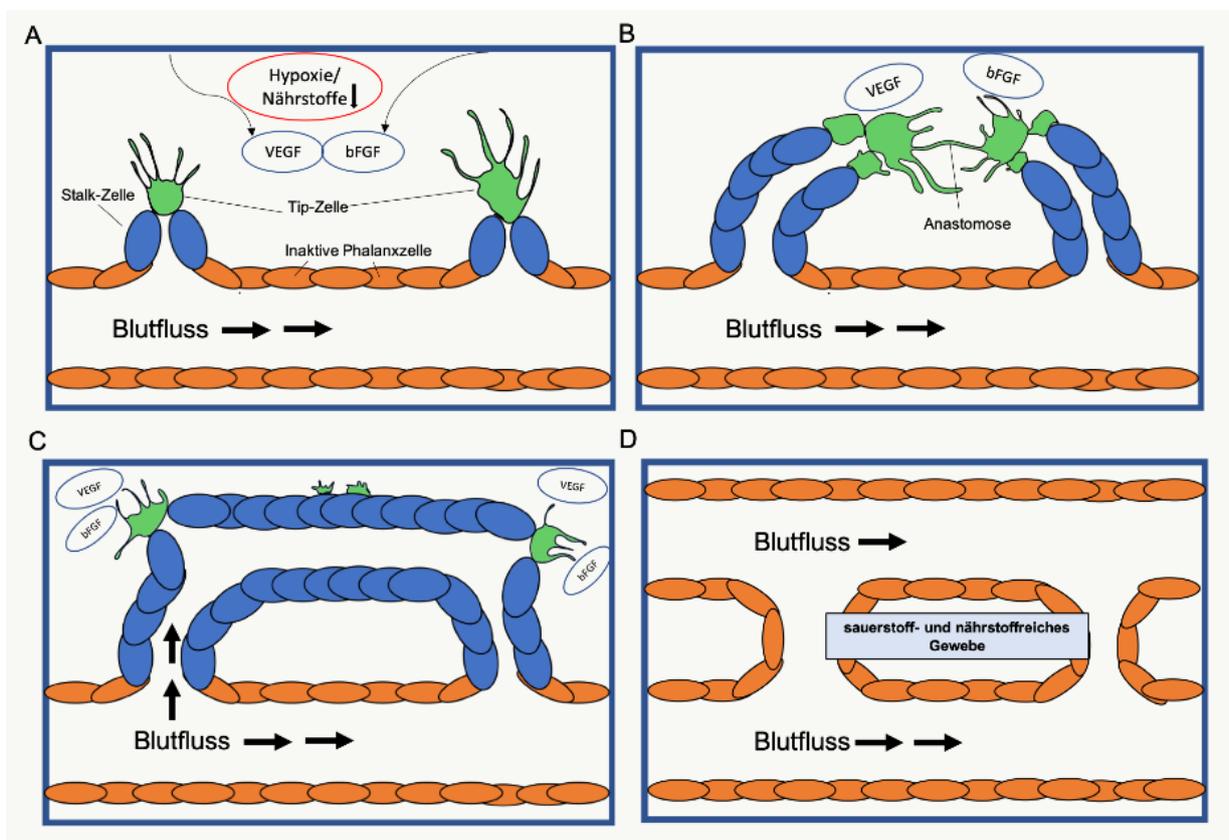


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Angiogenese.** Durch Sauerstoff- oder Nährstoffmangel werden Wachstumsfaktoren aus dem umliegenden Gewebe ausgeschüttet, welche Endothelzellen zu Tip- und Stalk-Zellen aktivieren (A). Tip-Zellen migrieren in Richtung des erhöhten Bedarfs und bilden Anastomosen mit anderen Tip-Zellen (B). Durch Proliferation der Stalk-Zellen entwickelt sich ein neuer Gefäßzweig (C), in dem nach Deckung des Bedarfes Endothelzellen wieder in inaktiver Form vorliegen (D). Modifiziert nach „The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism“(68). Mit freundlicher Genehmigung des Annual Reviews.

Einer der wichtigsten pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren ist VEGF. Er wird vor allem bei Hypoxie oder Inflammation durch Endothelzellen und weitere

parenchymale Zellen ausgeschüttet und besitzt eine starke pro-migratorische und proliferative Wirkung (69, 70). Auf vaskulären Endothelzellen bindet VEGF an den VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1) und den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) (69). Der VEGFR1 hat eine hohe Bindungsaffinität für VEGF, entfaltet aufgrund seiner geringen Kinase-Aktivität jedoch kaum eine pro-migratorische Wirkung. Dem Rezeptor wird bislang eine negative regulatorische Rolle auf Migration und Angiogenese zugeschrieben (71-73). Die Bindung von VEGF an VEGFR2 aktiviert mehrere Signalkaskaden unter anderem die Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK), Extracellular-Signal-Regulated-Kinase 1 und 2 (ERK1/2) sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (70, 74) (Abbildung 3). Über die Aktivierung dieser Signalwege wird die Endothelzellmigration und -proliferation sowie die Permeabilität gesteigert (68, 70). VEGF reguliert den Energiemetabolismus (68, 75) und fördert das Zellüberleben (69). Das Verhältnis von VEGFR2/VEGFR1 in Endothelzellen entscheidet über deren Funktion als Tip- oder Stalk-Zelle (76).

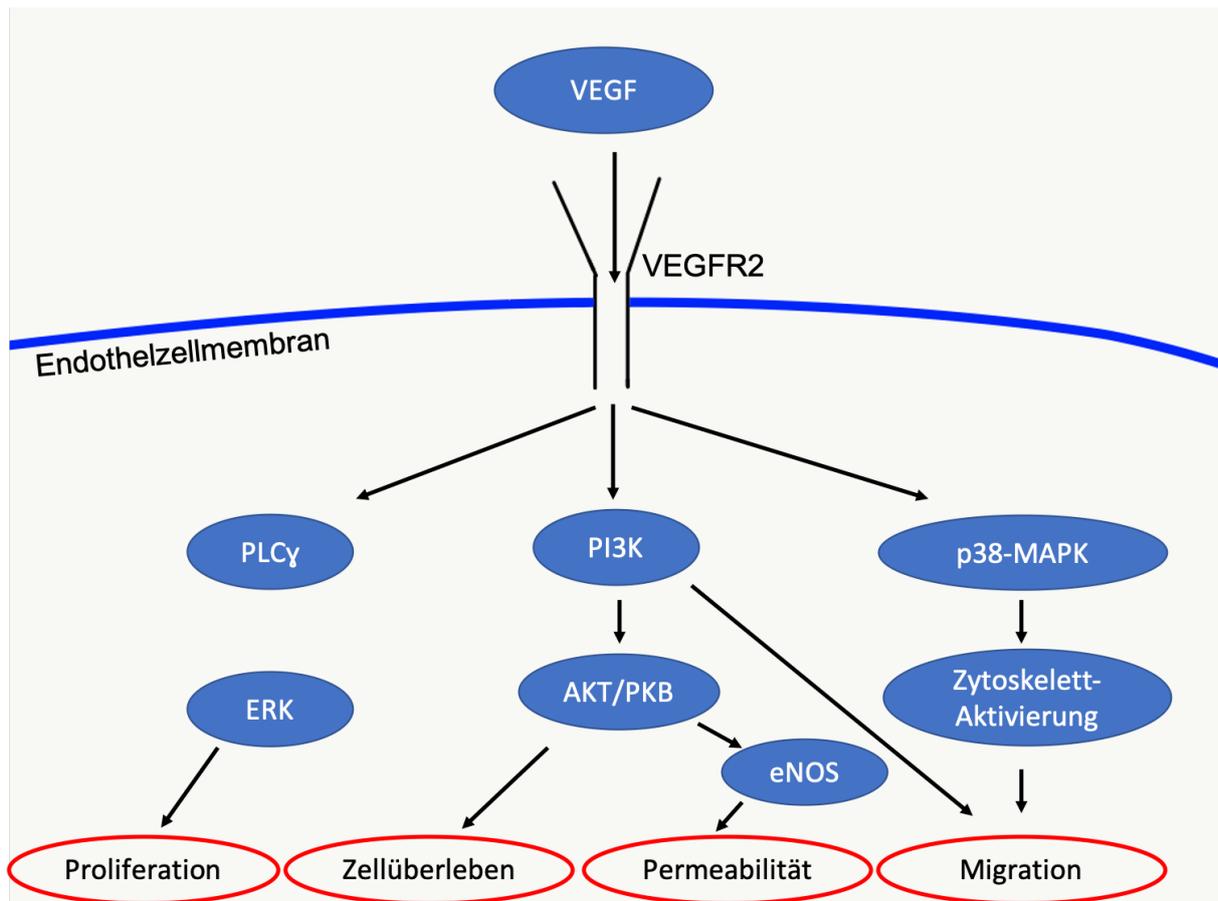


Abbildung 3: **Vereinfachte Darstellung des VEGFR2-Signaling in Endothelzellen.** Die Hauptwirkung von VEGF auf das Endothel erfolgt durch die Bindung an den VEGFR2, was die Aktivierung mehrerer Signalwege zur Folge hat. Letztendlich werden dadurch die Proliferation, das Zellüberleben sowie Migration und Permeabilität des Endothels gesteigert. Modifiziert nach "Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis" (74). Mit freundlicher Genehmigung des Medical University Publishing House Craiova.

Daneben ist VEGF an der Koordination der Migration beteiligt. Endothelzellen mit der stärksten VEGFR2-Aktivierung entwickeln sich zu Tip-Zellen und hemmen die VEGFR2-Expression von Nachbarzellen durch die Expression des Notch-Liganden Delta-like-ligand 4 (Dll4) (69, 77-79). Dll4 bindet an den Notch1-Rezeptor der benachbarten Zellen, was über ein negatives Feedback die VEGFR2-Expression und in dessen Folge die Migration und die Ausbildung von Protrusionen hemmt (78, 80, 81). Daraus resultiert eine klare Rollenteilung, in welcher den Tip-Zellen die gerichtete Migration und Stalk-Zellen die Proliferation und Ausdehnung des Gefäßstumpfes zukommt (68, 81). Durch Änderungen der Konzentrationen von

VEGFR, Dll4 und Notch1 verändern Endothelzellen während der Angiogenese fortlaufend die Bestimmung zwischen Tip- und Stalk-Zellen (76).

Einen zusätzlichen Einfluss auf Migration und Proliferation vermittelt VEGF durch die Stimulation von Phosphodiesterasen (PDEs) (82, 83). Die Wirkung der PDEs während der Angiogenese wird hauptsächlich durch die Hydrolyse von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) entfaltet (83-85). Als universaler Second Messenger spielt cAMP eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Regulation, indem es Genexpression, Zellmorphologie und -funktion beeinflusst (86, 87). Die Haupteffektoren von cAMP in Endothelzellen sind die Proteinkinase A (PKA), der exchange-factor-directly-activated-by-cAMP (EPAC) (86, 88-90) sowie die cyclic-nucleotide-gated-ion-channels (CNG) (88). Durch alle genannten Effektoren reguliert cAMP den Gefäßtonus (88). Über die Aktivierung der PKA und EPAC wirkt cAMP außerdem der VEGF-abhängigen Aktivierung von ERK und AKT entgegen und hemmt so Migration, Proliferation sowie das Zellüberleben (91). Mehrere Studien konnten belegen, dass erhöhte cAMP-Konzentrationen die Angiogenese inhibieren (82, 83, 91). In diabetischen Mäusen hemmt eine höhere cAMP-Konzentration die Transkription von VEGF in Endothelzellen (92). Damit übereinstimmend fördert cAMP die Integrität der endothelialen Barriere, indem es das Zytoskelett und Adhäsionskontakte stabilisiert (93-96).

Die FGF-Familie besteht aus 18 Liganden, welche mit vier verschiedenen FGF-Rezeptoren (FGFR) interagieren (97). Auf Endothelzellen wirken insbesondere FGF 1 (acidic FGF, aFGF) und 2 (basic FGF, bFGF) (97). Ähnlich wie VEGF fördert bFGF Migration, Proliferation und Zellüberleben in Endothelzellen. Über Tyrosinkinase aktiviert bFGF unter anderem die Proteinkinase C und ERK und fördert so die Migration und Proliferation. Weiterhin wird über ERK auch die

Expression von VEGFR2 gesteigert und so ein kumulativer Effekt auf die Migration erreicht (98, 99).

### **2.3.2 Endothelialer Energiemetabolismus**

Die Angiogenese setzt die Umwandlung von ruhenden Phalanx-Zellen zu aktiven Stalk- und Tip-Zellen voraus. Dies beruht auf dem Remodelling des Actin-Zytoskeletts und ist durch einen hohen Energieverbrauch durch die Actomyosin-Adenosintriphosphatase (ATPase) gekennzeichnet (100-103). Die Möglichkeit der Migration ist dadurch direkt an die Verfügbarkeit von ATP gekoppelt (100).

Zur ATP-Gewinnung nutzen Endothelzellen, insbesondere während der Angiogenese, überwiegend Glukose. Daneben werden für die Proliferation große Mengen an DNA und Protein benötigt, welche hauptsächlich aus der Verarbeitung von Fettsäuren und Aminosäuren bereit gestellt werden (103). Die Umwandlung von Glukose in ATP erfolgt in Zellen mithilfe der Glykolyse sowie durch die oxidative Phosphorylierung.

Mittels Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat metabolisiert und dabei zwei Moleküle ATP je Molekül Glukose generiert (104). Weiterhin werden Nebenprodukte der Glykolyse in metabolischen Nebenzweigen wie dem Pentose-Phosphat-Weg verwertet (103). Die Glykolyse-Rate (glycolytischer Flux) wird durch geschwindigkeitsbestimmende Enzyme bestimmt. Ein Hauptenzym für die Regulation der Glykolyse-Rate ist die Phosphofruktosekinase-2/Fruktose-2,6-bisphosphatase (PFKFB), welches die Reaktion von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat katalysiert (75). Da die PFKFB3 von allen PFKFB-Isoenzymen die höchste Bisphosphatase-Aktivität aufweist, kommt ihr als Hauptstimulator der Glykolyse eine besondere Rolle zu (105). Durch angiogenetische Stimuli wie VEGF wird die Glukose-Aufnahme und die PFKFB3-

Expression erhöht und in dessen Folge die Energiegewinnung durch die Glykolyse verstärkt (75, 106). Durch die erhöhte Expression von PFKFB3 wird die VEGF-vermittelte Migration und Proliferation gesteigert sowie die Tip-Zell-Konfirmation in Endothelzellen gefördert (75).

Die oxidative Phosphorylierung findet in den Mitochondrien statt und generiert je Molekül Glukose 36 Moleküle ATP (104). Neben der ATP-Produktion werden während der oxidativen Phosphorylierung ROS freigesetzt, welche als Signalmoleküle die Angiogenese fördern können, jedoch in höheren Konzentrationen zellschädigend sind (107). Während der Angiogenese wird der Sauerstoffverbrauch von Endothelzellen verdreifacht (108) und die mitochondriale Biosynthese durch VEGF stimuliert (109). Auch bei vorhandenem Sauerstoffangebot und obwohl durch die oxidative Phosphorylierung eine wesentlich effektivere Energiegewinnung möglich ist, generieren Endothelzellen bis zu 85 % der endothelialen ATP-Produktion aus der Glykolyse (75). Der Grund dafür ist, dass eine wesentlich schnellere ATP-Gewinnung möglich ist als durch die oxidative Phosphorylierung (110). Daneben sind energieaufwändige Prozesse wie die Migration unter hypoxischen Bedingungen möglich. Eine verminderte Glykolyse ist zudem mit einer eingeschränkten Angiogenese assoziiert und beeinflusst das Gleichgewicht von Tip- und Stalk-Zellen (75). Zusammenfassend hat eine gesteigerte glykolytische Energiegewinnung in Endothelzellen einen positiven Einfluss auf die Prozesse der Angiogenese.

## 2.4 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Die Ursachen für sexspezifische Unterschiede in Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind immer noch nicht ausreichend verstanden. Hormonelle Unterschiede können diesen Sexualdimorphismus bislang nicht vollständig erklären. Neben Hormonen kommen auch intrinsische zelluläre Unterschiede als Ursache hierfür in Betracht. Da das Geschlecht auf zellulärer Ebene in Studien kaum berücksichtigt wird, besteht hier ein erhöhter Forschungsbedarf.

Die endotheliale Migration bildet die Grundlage der Angiogenese und ist für die Aufrechterhaltung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wichtig. Sie wird durch Wachstumsfaktoren gesteuert und durch eine Steigerung des Energiemetabolismus ermöglicht. Studien konnten sexspezifische Unterschiede unter basalen Bedingungen in der endothelialen Migration bereits herausstellen. Die Mechanismen, die für diese Unterschiede verantwortlich sind, bleiben jedoch bislang unklar. Die Migration unter pro-migratorischen Bedingungen wurde bislang noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, sexspezifische Unterschiede im Migrationsverhalten unter pro-migratorischen Bedingungen sowie mögliche Einflussfaktoren, insbesondere beim Energiemetabolismus, in Endothelzellen zu untersuchen. Dazu wurden humane Endothelzellen der Umbilikalvene aus Nabelschnüren isoliert und kultiviert. Durch die Verwendung von HUVECs konnte der Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren reduziert werden. Um individuelle Unterschiede zu minimieren, wurden in dieser Arbeit größtenteils Zellen aus den Nabelschnüren von dizygoten Zwillingen verwendet. Die Verfügbarkeit von Zellen dizygoter Zwillinge war jedoch durch das seltenere Auftreten von Mehrlingsschwangerschaften begrenzt und deren Verwendung daher nicht durchgängig möglich.

Das Wissen von zellulären Geschlechtsunterschieden könnte zu einem besseren Verständnis für die sexspezifische Prävalenz, Prognose und Krankheitsverlauf von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen, sowie grundsätzlich die Aussagekraft von Daten aus der Grundlagenforschung verbessern.

In dieser Arbeit wurden im Einzelnen folgende Fragestellungen untersucht:

- 1.) Gibt es einen sexspezifischen Unterschied im Migrationsverhalten in HUVECs?
- 2.) Lassen sich anhand der ATP-Konzentration, der PFKFB3-Genexpression sowie der Art der Energiegewinnung (oxidative Phosphorylierung/Glykolyse) metabolische, sexspezifische Unterschiede nachweisen? Besteht des Weiteren eine Korrelation zwischen Energiemetabolismus und Migrationsverhalten?
- 3.) Hat das zelluläre Geschlecht einen Einfluss auf die VEGFR2-Expression und die cAMP-Konzentration? Besteht eine Korrelation zwischen diesen Faktoren und dem sexspezifischen Migrationsverhalten?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1,5 ml/2 ml Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
15 ml/ 50 ml Falcon-Tubes	Corning, New York, USA
6 cm Zellkulturschalen	Corning, New York, USA
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Corning, New York, USA
96 Well Mikroplatten, schwarz	Greiner Bio-One, Deutschland
96 Well Microarray-Platten	BD, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
AxioCam-MRc-Kamera	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 200M Foto-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
C-CHIP Zählkammer	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Combitips, diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland,
Kryo-Einfriergerät	Qualilab, Olivet, Frankreich
Culture-Insert-2-Well-Set	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Finnpipette	Labsystems Diagnostics, Vantaa, Finnland
Fusion Solo S Imaging System	Vilver Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle Fr, Schweiz
Gelelektrophoresekammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glasplatten	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr, Bulle Fr, Schweiz
Lichtmikroskop	Leica Service, Bensheim, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Instrument, Schwabach, Deutschland
PCR-Mastercycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Messzylinder, diverse	Schott, Mainz, Deutschland
Microplate-Reader	Molecular Devices, San José, USA
Mikrotiterschüttler	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mini Spin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipet Boy	Integra-Biosciences, Hudson, USA
Pipetten, diverse	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5-50 ml	Corning, New York, USA
Pipettenspitzen 0,5-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plattenschüttler	Heidolph Instrument, Schwabach, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Milipore, Burlington, USA
QuantStudio 7 Flex Real-Time-PCR-System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Reagenzflaschen, diverse	Schott, Mainz, Deutschland
Seahorse XFe 96 Analyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Seahorse XFe96 Cell Culture Microplates	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Seahorse XFe 96 Sensor Cartridges	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Semi-dry-Blotkammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Messer, Bad Soden am Taunus, Deutschland

Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Whatman-Papier	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
XF Prep Station	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Zellschaber	Corning, New York, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 400R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien und Substanzen

Tabelle 2: Chemikalien und Substanzen

Chemikalie/Substanz	Hersteller
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x Roti-Block	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid (40 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amido Black Staining Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) (# GF0039)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Ultra Tablets mini Easypack	Roche, Basel, Schweiz
DNase1 (2U/µl)	Ambion, Austin, USA
dNTP-Mix	Roche, Basel, Schweiz
Dulbecco's Phosphate Based Saline (DPBS)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Promocell, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Cell Applications Inc, San Diego, USA
Hepes	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hexamere (0,5 µg/µl)	TIB MOL BIOL, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase Typ II (1 U/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Kryokonservierungsmedium	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
N, N, N, N'-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	PanReac AppliChem, Chicago, USA
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Okada-Säure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies, Carlsbad, USA
PhosStop Easypack Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
RNase Inhibitor	Promega, Fitchburg, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (# 676472)	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.3 Zellkulturmedien

Tabelle 3: **Vollmedium**

	<b>Hersteller</b>
Medium 199, HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
20 % Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ascorbinsäure 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) 12 µg/ml	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Glutathion 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparin 5000 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamin 200 mM	Life Technologies, Carlsbad, USA
Amphotericin B 50 ng/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin 100 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Streptomycin 100 µg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 4: **Serumarmes Zellmedium**

	<b>Hersteller</b>
Medium 199, HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
0,5 % FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Ascorbinsäure 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECGS 12 µg/ml	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Glutamin 200 mM	Life Technologies, Carlsbad, USA
Glutathion 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparin 5000 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Medium 199, HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Amphotericin B 50 ng/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin 100 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Streptomycin 100 µg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 5: **Seahorse Assay Medium**

	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
0,5 % FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glukose 5,5 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin 2 mM	Life Technologies, Carlsbad, USA
Natriumchlorid 32 mM	PanReac AppliChem, Chicago, USA

### 3.1.4 ELISA und Kits

Tabelle 6: **ELISA und Kits**

<b>Assay</b>	<b>Hersteller</b>
ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Deproteinizing Sample Preparation Kit	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Direct cAMP ELISA Kit	Enzo Life Science, New York, USA
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Seahorse Mito Stress Test Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 3.1.5 Primer

Tabelle 7: **Primer**

<b>Primer</b>	<b>Assay ID</b>	<b>Hersteller</b>
PFKFB3	Hs00998700_m1	alle Applied Biosystems, Foster City, USA
Beta-actin	Hs01060665_g1	
Sex-determining Region Y	Hs00976796_s1	
X-inactive Specific Transcript	Hs00976796_m1	

### 3.1.6 Antikörper

Tabelle 8: Erstantikörper

<b>Erstantikörper</b>	<b>Verdünnung in Blocklösung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-VEGFR2	1:1000	Cell Signaling (#12599) (Danvers, MA, USA)

Tabelle 9: Zweitantikörper

<b>Zweitantikörper</b>	<b>Verdünnung in Blocklösung</b>	<b>Hersteller</b>
Goat-Anti-Rabbit	1:10000	Santa Cruz Biotechnology (sc-2004) (Santa Cruz, CA, USA)

### 3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Bestandteile</b>
10x SDS-Laufpuffer	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS gelöst in 1 L Aqua dest.
Blotpuffer	100 ml 10x SDS Laufpuffer 200 ml Methanol 700 ml Aqua dest.
20x TBS	1 M Tris 3 M Natriumchlorid gelöst in 1 L Aqua dest.
Western-Blot-Waschpuffer	100 ml Tris 4 ml 10 % Tween 20 gelöst in 2 L Aqua dest.
5x SDS Probenpuffer	655 µl 1 M Tris-Chlorid (pH 6,8) 1,13 ml 87 % Glycerol

Protein-Lysepuffer	2,3 ml 10 % SDS
	500 µl β-Mercaptoethanol
	10 mg Bromphenolblau (BPB)
	100 mM Natriumchlorid
	20 mM Hepes
	1 % Triton X-100
	4 mM Natriumpyrophosphat
	10 mM EDTA
	Phosphatase Inhibitor Cocktail
	PhosStop 25x (40 µl/ml)
	Phosphatase Inhibitor Cocktail Complete (40 µl/ml)
100 µM Okada-Säure	
Hypotonischer Waschpuffer	10 mM Tris
	1 mM EGTA
	1 mM EDTA
	10 mM KCL
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM DTT
	0,3 mM Natriumvanadat

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Für alle Versuche wurden ausschließlich Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen verwendet. Die Bereitstellung der Nabelschnüre erfolgte freundlicherweise durch die Klinik für Geburtsmedizin, Charité Mitte. Solange nicht gesondert erwähnt, wurden Nabelschnüre von dizygoten Zwillingen mit jeweils einem männlichen und einem weiblichen Zwillings verwendet. Die Geschlechtsbestimmung der HUVECs erfolgte mittels Real-Time-RT-PCR durch Messung der sexspezifischen

Genexpression des SRY Gens (Sex-determining Region Y) für männlich und des XIST Gens (X-inactive Specific Transcript) für weiblich.

### **3.2.1.1 Präparation humaner Endothelzellen aus Umbilikalvenen**

HUVECs wurden durch Kollagenase-Verdau aus humanen Umbilikalvenen gewonnen und anschließend in Vollmedium kultiviert. Zuerst wurde die Umbilikalvene mit 2 x 20 ml HBSS durchgespült. Um HBSS-Rückstände zu vermeiden, wurde die Vene anschließend vorsichtig mit Raumluft ventiliert. Die Vene wurde mit Klemmen verschlossen und mit 10 ml Kollagenase gefüllt. Darauf wurde die Vene für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnur mit 2 x 20 ml HBSS durchgespült und die Lösung mit den Zellen in einer Petrischale aufgefangen. Die gelösten Endothelzellen wurden in ein 50 ml Tube überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 20 ml Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche übertragen und kultiviert.

### **3.2.1.2 Trypsinieren und Passagieren der HUVECs**

Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei 80 % Konfluenz wurde das Vollmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit 10 ml warmem PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin bei 37 °C für 30 Sekunden behandelt und durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde per Lichtmikroskop kontrolliert. Zum Passagieren wurden die Zellen in 10 ml Vollmedium resuspendiert und auf mit 15 ml Vollmedium gefüllten Zellkulturflaschen aufgeteilt. HUVECs wurden bis maximal Passage 4 für alle Experimente verwendet.

### **3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen der HUVECs**

Den Zellen, die erst zu einem späteren Zeitpunkt verwendet wurden, wurde nach dem Trypsinieren 1,5 ml Kryokonservierungsmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden dann in ein Kryoröhrchen transferiert. Zur Schonung der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einen Einfrierbehälter mit Isopropanol gegeben, um eine schonende Kühlung von 1 °C/Stunde zu gewährleisten. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen für 2 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen transferiert und auf ein Gesamtvolumen von 15 ml mit warmem Vollmedium aufgefüllt. Spätestens nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, um das Kryokonservierungsmedium zu entfernen.

### **3.2.2 RNA-Isolation**

Die Isolation der RNA erfolgte für alle Zellen zur Geschlechtsbestimmung sowie zur Bestimmung der PFKFB3-Genexpression. Zur Geschlechtsbestimmung wurden RNA-Proben von Zellen in Vollmedium verwendet. Nach der Behandlung wurde das Zellkulturmedium entfernt und 1 ml Trizol je Zellkulturschale für wenige Sekunden hinzugegeben. Anschließend wurde das Zelllysat in ein 1,5 ml Tube überführt und 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und für wenige Sekunden inkubiert. Daraufhin wurden die Lysate für 15 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation bildeten sich im Tube drei Phasen, wobei die RNA in der obersten Phase in einer klaren Flüssigkeit gelöst war. Diese wurde in ein neues 1,5 ml Tube übertragen. Zur Reinigung der RNA wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt. Die Inkubation mit Isopropanol erfolgte über 30 Minuten bei

Raumtemperatur. Die Proben wurden dann bei 13000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen. Dafür wurde für jeden Waschschrift 1 ml 75 % Ethanol zum Pellet hinzugegeben und für 5 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das RNA-Pellet in 30 µl Aqua dest. gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Dafür wurde zuerst ein Referenzwert mit 1 µl Aqua dest. ermittelt. Anschließend wurde 1 µl einer RNA-Probe auf das Messinstrument pipettiert und die Absorption bei 260 nm gemessen.

### **3.2.3 Real-Time-RT-PCR**

#### **3.2.3.1 Das Prinzip der Real-Time-PCR**

Die Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und dient dem quantitativen Nachweis von DNA bzw. cDNA. Neben den Bestandteilen der klassischen PCR werden bei der Taqman-Real-Time-PCR neben dem PCR-Reaktionsansatz eine Taq-DNA-Polymerase mit Exonuklease-Aktivität sowie Sonden hinzugefügt, die jeweils über 2 Introns liegen, um Signale aus der DNA auszuschließen. Sie sind außerdem am 5'-Ende mit einem Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül versehen. Das Quencher-Molekül inhibiert durch die räumliche Nähe zum Fluorophor dessen Fluoreszenzemission. Nachdem die DNA in der Denaturierungsphase in Einzelsträngen vorliegt, binden Primer und Sonden an die DNA. Anschließend bindet die Taq-Polymerase an den 3'-Enden der Primer und elongiert den DNA-Strang. Dabei trifft sie auf das 5'-Ende der Sonden und degradiert das Fluorophor durch deren Exonucleaseaktivität. Dadurch entfällt die Inhibition der Fluoreszenzemission und das detektierte Fluoreszenzsignal wird

stärker. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgt nach jedem PCR-Zyklus. Zu Beginn eines PCR-Zyklus ändert sich der DNA-Gehalt aufgrund der vergleichsweise geringen Menge nur marginal und ist zu gering, um sie vom Hintergrund-Fluoreszenzsignal zu unterscheiden. Mit steigender Zykluszahl nimmt das Fluoreszenzsignal exponentiell zu und lässt sich von der Hintergrund-Fluoreszenz unterscheiden. Der Zeitpunkt, an dem die Zunahme der Fluoreszenzemission zum ersten Mal signifikant den Wert der Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt, wird als Schwellenwert bezeichnet. Der Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschreitet, wird als CT-Wert beschrieben. Der CT-Wert korreliert damit invers zu der initialen DNA-Menge und erlaubt Rückschlüsse auf den anfänglichen DNA-Gehalt.

### **3.2.3.2 Umschreibung der Messenger-RNA in Copy-DNA**

Zur Durchführung der Real-Time-PCR musste die isolierte Messenger-RNA (mRNA) in eine DNA-Kopie (copy-DNA, cDNA) umgewandelt werden. Dafür wurden 500 ng RNA mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 9 µl ergänzt. Im ersten Schritt wurden den RNA-Proben 0,5 µl DNase 1 (2 U/µl) hinzugegeben, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Dieser Schritt wurde für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Um die DNase im Anschluss zu deaktivieren, wurden die Proben für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gelegt, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden den Proben 2 µl Random-Hexamer-Primer (0,5 U/µl) hinzugefügt und für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert. Die Proben wurden danach für 5 Minuten auf Eis gelegt. Als letzten Schritt wurden 8,5 µl RT-Mastermix hinzugefügt. Die Bestandteile des RT-Mastermix sind aus Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Bestandteile des RT-Mastermix

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen</b>
5x First-Strand Puffer	4 $\mu$ l
DTT	2 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
RNase Inhibitor	0,5 $\mu$ l
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Nach 5-minütiger Inkubation bei 25 °C erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 60 Minuten. Die Proben wurden nach dem letzten Reaktionsschritt auf Eis gelegt. Alle Reaktionsschritte wurden in einem PCR-Cycler durchgeführt. Die nun gewonnene cDNA wurde im Verhältnis von 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

### 3.2.3.3 Durchführung der Real-Time-PCR

Pro Ansatz wurden 6  $\mu$ l cDNA-Proben (25 ng cDNA/Ansatz) auf ein MicroArray Optical 96 Well Reaction Plate aufgetragen. Je Ansatz wurden Duplikate verwendet. Außerdem wurde ein Ansatz ohne Template (No Template Control, NTC) mitgeführt, um unspezifische Fluoreszenzsignale zu detektieren. So konnte zwischen DNA-Amplifikation und Hintergrund-Fluoreszenz unterschieden werden. Es wurde ein Mastermix aus 6,5  $\mu$ l Genexpressionsmix und 0,5  $\mu$ l Sonden und Primern hergestellt und je Ansatz 7  $\mu$ l Mastermix hinzugegeben. Die 96 Well Platte wurde mit einer Folie versiegelt. Zur Durchmischung der cDNA-Proben mit dem Mastermix wurde die 96 Well Platte für 4 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Beta-Actin wurde als Homekeeping-Gen zur Bestimmung des basalen Expressionsniveaus verwendet. Als Zielgen wurde die Genexpression der

PFKFB3 bestimmt. PFKFB3 ist eines der Hauptregulierungsenzyme der Glykolyse und diente zur Ermittlung der zellulären Glykolyse-Aktivität unter verschiedenen Versuchsbedingungen sowie im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Zellen. Dazu wurden HUVECs auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Bei Konfluenz wurde das Vollmedium durch serumarmes Zellmedium ersetzt und die Zellen in diesem Medium für 5 Stunden kultiviert. Vor dem Mediumwechsel wurde mit der Rückseite einer 1000 µl Pipettenspitze ein Spalt gezogen. Zellen in Vollmedium ohne Spalt wurden als Baseline mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen entweder für 16 Stunden mit 2 nM VEGF oder 20 % FCS behandelt. Zellen in serumarmen Zellmedium dienten als Kontrolle. Der Nachweis der PFKFB3-Genexpression erfolgte in männlichen und weiblichen HUVECs von nicht-verwandten Spendern. Die Bestimmung der Genexpression von XIST und SRY diente zur Geschlechtsbestimmung aller verwendeten Zellen.

Die Real-Time-PCR wurde in einem QuantStudio 7 Flex Real-Time-PCR-System (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt und mittels QuantStudio Real-Time PCR-Software (Version 1.3) analysiert. Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten CT-Werte bzw. der Differenz aus Zielgen und Housekeeping-Gen als delta-CT. Das Expressionsniveau nach Behandlung wird relativ zur Expression in der Vergleichsgruppe (Baseline oder Kontrolle) angegeben.

### **3.2.4 Bestimmung der Zellmigration**

Für die Migrationsversuche wurden Doppelkammersysteme (Culture Insert 2 Well, Ibidi, Martinsried, Deutschland) verwendet. Das Kammersystem ermöglicht die Bildung von zwei getrennten Zellflächen, welche nach Abzug des Kammersystems von einem 500 µm breitem, zellfreiem Spalt getrennt sind. Durch Dokumentation des Spaltschlusses nach einer bestimmten Zeit (in dieser Arbeit nach 16 Stunden) kann

ein Rückschluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen gezogen werden. Pro Doppelkammersystem wurden in jede Kammer 40000 Zellen der gleichen HUVEC in 70 µl Vollmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kammersystem mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen. Das Vollmedium wurde entfernt und durch serumarmes Zellmedium ersetzt. Zwischen dem Mediumwechsel wurden die Zellen mit 1 ml serumarmem Zellmedium gespült. Nach 5 Stunden Serumentzug wurden die Zellen entweder mit 2 nM VEGF oder mit 6 nM bFGF für 16 Stunden behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen in serumarmem Zellmedium mitgeführt. Für jede Behandlungsgruppe bzw. Kontrolle wurden Duplikate verwendet. Die fotografische Dokumentation erfolgte zum Zeitpunkt 0 Stunden (Ausgangswert) und 16 Stunden (Endwert) der Behandlung bei einer fünffachen Vergrößerung mithilfe eines Axiovert Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Fotos wurden mit einer AxioCam MRc Kamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Es wurden drei Fotos über den kompletten Spalt pro Doppelkammersystem erstellt und mittels Axiovision Software (Version 4.8.2) zu einem Bild zusammengefügt. Außerdem wurden für die Ausgangswerte und Endwerte ein identisches Flächenareal erstellt. Die Flächen wurden mithilfe der Software Image J (Version 1.52a) ausgemessen. Als Zellmigration wurde der Spaltschluss innerhalb des Flächenareals in Prozent zum Ausgangswert gemessen.

Abbildung 4 zeigt beispielhaft den Spaltschluss vor und nach VEGF-Behandlung bei weiblichen HUVECs.

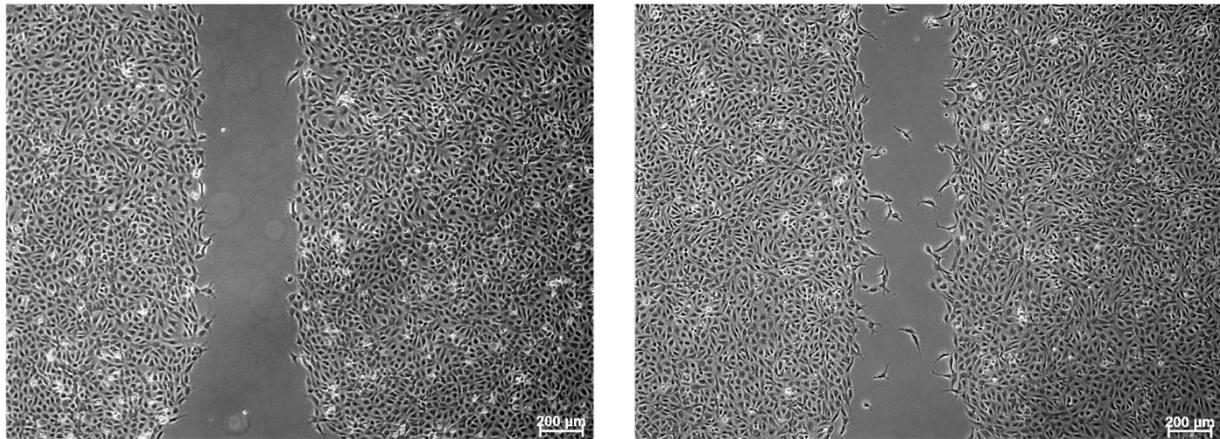


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme (5-fache Vergrößerung) von HUVECs vor (links) und nach (rechts) VEGF-Stimulation.

### 3.2.5 Der Seahorse XF Cell Mito Stress Test

#### 3.2.5.1 Das Prinzip des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests

Mithilfe des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests kann der Energieumsatz an lebenden Zellen gemessen werden. Durch die Messung verschiedener Parameter kann außerdem zwischen der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung und der Energiegewinnung durch Glykolyse differenziert werden. Die oxidative Phosphorylierung ist ein mitochondrialer Prozess, welcher sauerstoffabhängig ATP als Energieträger produziert. Sie ist hauptsächlich für den Sauerstoffverbrauch einer Zelle verantwortlich. Eine gesteigerte oxidative Phosphorylierung setzt daher auch einen erhöhten Sauerstoffbedarf voraus. Durch die Messung der Sauerstoffkonzentration bzw. dessen Verbrauch kann somit ein Rückschluss auf die Energiegewinnung der oxidativen Phosphorylierung gezogen werden. Die Sauerstoffkonzentration wird im Mito Stress Test als Sauerstoff-Verbrauchs-Rate (Oxygen Consumption Rate, OCR) gemessen.

Im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung ist die Glykolyse ein schneller und sauerstoffunabhängiger Prozess der Energiegewinnung und bildet neben ATP als Endprodukt Laktat. Eine gesteigerte Glykolyse-Aktivität führt durch die Produktion

von Laktat zu einer Ansäuerung der Zelle und ihres Milieus. Die daraus folgende Veränderung des pH-Wertes kann mittels Mito Stress Test als extrazelluläre Ansäuerungsrate (Extracellular Acidification Rate, ECAR) gemessen werden. Der Quotient aus ECAR und OCR (ECAR/OCR Ratio) beschreibt das Verhältnis von Glykolyse zu oxidativer Phosphorylierung an der Energiegewinnung.

Während eines Mito Stress Tests erfolgt die Messung von OCR und ECAR zu 12 Zeitpunkten. Zur Ermittlung verschiedener Parameter erfolgen nacheinander im zeitlichen Abstand Injektionen der Substrate Oligomycin, Carbonyl cyanide-4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) sowie gleichzeitig von Rotenon und Antimycin A. Diese Substrate interagieren mit den Komplexen der oxidativen Phosphorylierung und beeinflussen deren Aktivität. Abbildung 5 stellt die Interaktion der einzelnen Substrate mit der mitochondrialen Membran graphisch dar.

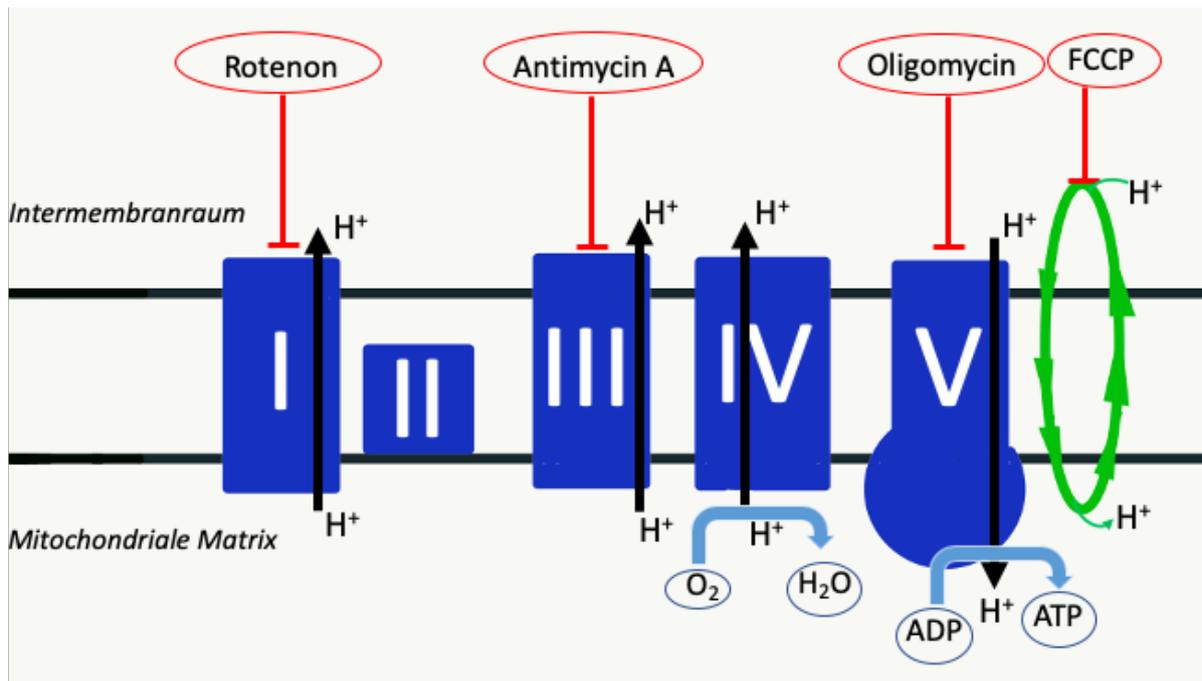


Abbildung 5: **Schematische Darstellung der Interaktion von Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A mit der oxidativen Phosphorylierung.** Der Protonentransport in den Komplexen I bis IV erzeugt einen Protonenkonzentrationsgradient zwischen Intermembranraum und Matrix und ermöglicht in Komplex V die ATP-Produktion. Durch Oligomycin wird die ATP-Synthase in Komplex V blockiert und die oxidative Phosphorylierung unterbrochen. Die Injektion von FCCP entkoppelt die ATP-Produktion von den Komplexen I-IV und simuliert die maximale mitochondriale Leistung. Rotenon und Antimycin A blockieren die Komplexe I und III und führen zu einem vollständigen Stillstand der oxidativen Phosphorylierung. Modifiziert nach Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide, Agilent Technologies (111). Mit freundlicher Genehmigung von Agilent Technologies.

Zu Beginn eines Mito Stress Tests erfolgt eine Basalmessung. Die Injektion von Oligomycin erfolgt nach Messpunkt 3 und wirkt am Komplex V der oxidativen Phosphorylierung. Dort wird die mitochondriale ATP-Synthase blockiert. Dadurch wird die ATP-Synthese inhibiert und der  $O_2$ -Verbrauch der Zelle nimmt ab. Nach Messpunkt 6 erfolgt die Injektion von FCCP, welches Protonen durch die mitochondriale Membran transportiert und somit die Komplexe I bis IV von der ATP-Produktion entkoppelt. Dadurch imitiert es die maximale mitochondriale Leistungsfähigkeit bzw. dessen maximalen Sauerstoffverbrauch. Gleichzeitig sorgt die Entkopplung für den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials. Nach Messpunkt 9 erfolgt die Injektion von Rotenon und Antimycin A. Rotenon

blockiert Komplex I der oxidativen Phosphorylierung, Antimycin A Komplex III. So wird die mitochondriale Aktivität vollständig aufgehoben. Alle weiteren OCR-Änderungen sind nun vollständig mitochondrienunabhängig.

Durch die 3 Injektionen lassen sich mithilfe des Mito Stress Tests folgende Messparameter ableiten und auswerten (Abbildung 6):

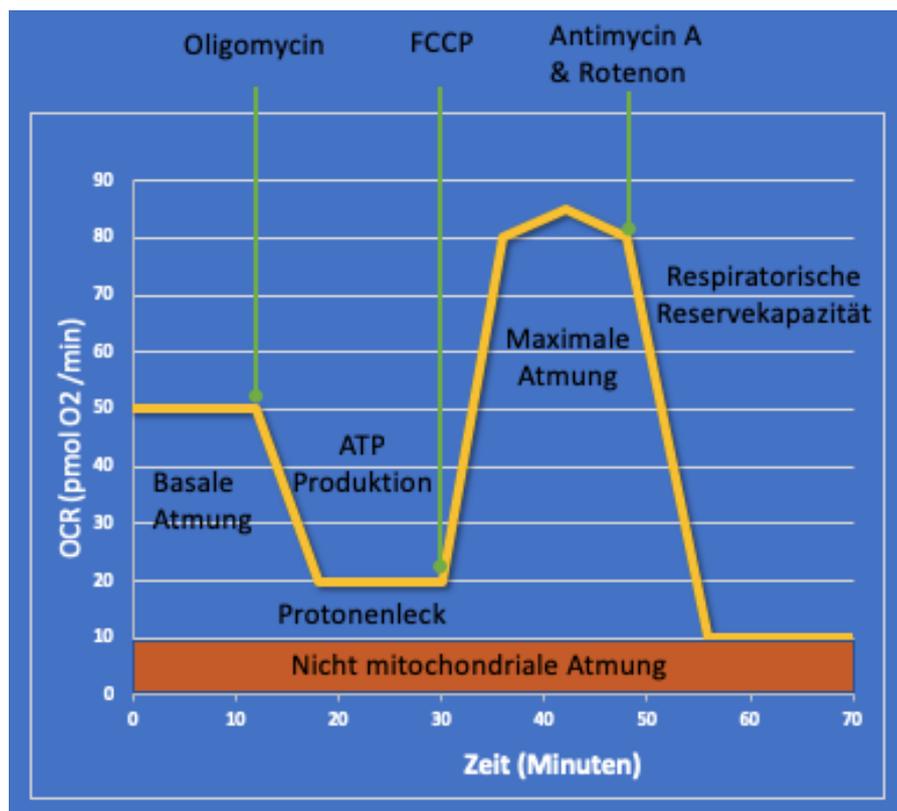


Abbildung 6: Schematischer Seahorse Mito Stress Test mit Darstellung des Verlaufs der OCR in Abhängigkeit von Zeit und Injektionen. Zu Beginn erfolgt die Messung des basalen, mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Durch Injektion von Oligomycin sinkt der Sauerstoffverbrauch ab. Die Entkopplung der ATP-Synthese durch FCCP führt zur maximalen Leistung der Komplexe I bis IV und zum Anstieg der OCR. Nach Antimycin A- und Rotenon-Injektion kommt die mitochondriale Aktivität vollständig zum Erliegen. Modifiziert nach Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide, Agilent Technologies (111). Mit freundlicher Genehmigung von Agilent Technologies.

**Basale Atmung:** Gibt den basalen, mitochondrialen Energieverbrauch der Zelle an.

**ATP-Produktion:** Darstellung der ATP-Menge, die mitochondrial unter basalen Zuständen in der Zelle generiert wird.

**Protonenleck:** Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, welcher nicht an die Atmungskette gebunden ist.

**Maximale Atmung:** Maximaler Sauerstoffverbrauch, der mitochondrial erzeugt werden kann.

**Respiratorische Reservekapazität:** Bezeichnet den Sauerstoffverbrauch, welcher bei Maximalleistung zusätzlich gewonnen werden kann und berechnet sich aus dem Quotienten von maximaler und basaler Atmung.

**Nicht-mitochondriale Atmung:** Sauerstoffverbrauch, welcher nicht durch Mitochondrien erzeugt wird.

### **3.2.5.2 Durchführung des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests**

Für den mitochondrialen Stress Test wurden HUVECs auf eine Seahorse 96 Well Platte ausplattiert. Es wurden 15000 Zellen pro Well verwendet. Die äußeren 36 Wells wurden wie vom Hersteller empfohlen nicht mit Zellen belegt und dienen bei der Messung als Background, um unspezifische Signale herauszurechnen. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch serumarmes Zellmedium ersetzt. Um Rückstände des Vollmedium zu entfernen, wurden die Wells zusätzlich mit 100 µl serumarmen Zellmedium gespült. Bei Zellen, die als Baseline (Zellen in Vollmedium) mitgeführt wurden, wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Die restlichen Zellen wurden für 5 Stunden in serumarmen Zellmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 2 nM VEGF, 6 nM bFGF oder mit 20 % FCS für 16 Stunden behandelt. Zellen ohne Behandlung in serumarmen Zellmedium wurden als Kontrolle mitgeführt. Für jede Behandlung bzw. Kontrolle standen 6 Wells pro 96 Well Platte zur Verfügung.

Eine Stunde vor der Messung wurde das entsprechende Zellmedium entfernt und durch das Seahorse Assay Medium ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für

eine Stunde bei 37 °C und 0 % CO<sub>2</sub> in einer XF Prep Station inkubiert. In dieser Zeit wurde die Behandlung mit 2 nM VEGF und 6 nM bFGF fortgeführt. Die Injektions-substanzen Oligomycin, FCCP sowie Rotenon und Antimycin A wurden zur Belegung der Injektions-Ports im Seahorse Assay Medium verdünnt. Die Konzentration betrug für Oligomycin 0,3 µM, für FCCP 1 µM und für Rotenon und Antimycin A jeweils 0,3 µM. Die Injektionen erfolgten alle 18 Minuten. Alle 6 Minuten wurden OCR und ECAR gemessen.

Für die Auswertung wurde zu jedem Messzeitpunkt das arithmetische Mittel aus den 6 Wells einer Behandlungsgruppe ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden auf die Proteinkonzentration normiert und mit dem Programm Wave (Version 2.1.3) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ausgewertet.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Zellmedium vorsichtig aus den Wells entfernt und 50 µl einer Lyselösung aus 50 mM NaOH und 1 % Triton X-100 pro Well hinzugefügt. Die Zellen wurden für 10 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung auf einem Plattenschüttler lysiert. Es wurden 10 µl Lysate pro Well anschließend auf eine neue 96 Well Platte aufgetragen. Die Proteinmenge wurde durch kolorimetrische Messung der Absorption bei 563 nm bestimmt und anhand einer Standardkurve quantifiziert. Die Datenauswertung erfolgte mittels Softmax Pro (Version 5.4).

### **3.2.6 Messung des intrazellulären cAMP-Gehalts**

HUVECs wurden auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert und in Vollmedium kultiviert. Bei Konfluenz, üblicherweise an Tag 2, wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellkulturschale zweimal mit 1 ml warmem PBS gewaschen. Zuvor wurde mittig ein Spalt mit der Rückseite einer 1000 µl Pipettenspitze gesetzt. Dadurch entstanden zwei durch den Spalt getrennte Zellflächen und es wurde so eine Verletzung imitiert.

Anschließend wurde den Zellen für 5 Stunden serumarmes Zellmedium hinzugegeben. Nach dem Serumentzug wurden die HUVECs entweder für 3 oder 16 Stunden mit 2 nM VEGF oder 6 nM bFGF behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen in serumarmen Zellmedium.

Nach der Behandlung wurde das Zellkulturmedium von den Zellkulturschalen abgenommen und als Überstand in ein 2 ml Tube übertragen. Die Überstände wurden bei 13000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Darauf wurden die Überstände in ein neues 2 ml Tube übertragen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml 0,1 M HCl für 20 Minuten lysiert. Die HCl-Lysate wurden in ein 1,5 ml Tube übertragen und für 5 Minuten bei 650 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Lysate wurden auf ein neues 1,5 ml Tube übertragen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die cAMP-Konzentrationsbestimmung wurde jeweils für die Überstände als auch für die HCl-Lysate durchgeführt. Sie erfolgte mit einem cAMP-Complete-ELISA Kit (Enzo Life Science GmbH, Lörrach, Deutschland). Mithilfe der vom Hersteller bereitgestellten Standards wurde eine Standardreihe erstellt und zusammen mit den Proben als Duplikate auf eine 96 Well Platte aufgetragen. Anschließend wurden nach Hersteller-Protokoll Assay-Puffer und Antikörper hinzugegeben. Die Bestimmung des intrazellulären cAMP erfolgte bei einer optischen Dichte von 405 nm mittels Microplate-Reader und wurde mittels Software Softmax Pro (Version 5.4) (Molecular Devices, San José, USA) ausgewertet. Alle Daten wurden im Anschluss auf ihren Proteingehalt normiert. Dafür wurde das Zellmedium vorsichtig entfernt. Pro Well wurden 50 µl einer Lyselösung aus 50 mM NaOH und 1% Triton X-100 hinzugegeben. Die 96 Well Platten wurden verschlossen und die Zellen für 10 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung auf einem Plattenschüttler lysiert. Anschließend wurden 10 µl Lysate pro Well auf eine

neue 96 Well Platte aufgetragen. Die Proteinmenge wurde durch kolorimetrische Messung der Absorption bei 563 nm bestimmt und anhand einer Standardkurve quantifiziert. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der Software Softmax Pro (Version 5.4).

### **3.2.7 Messung des intrazellulären ATP-Gehalts**

Die ATP-Bestimmung wurde mithilfe eines ATP Assay Kits (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Dafür wurden HUVECs auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert und in Vollmedium kultiviert. Bei Konfluenz wurde mit der Rückseite einer 1000 µl Pipettenspitze mittig ein Spalt durch die bewachsenen Zellkulturschalen gezogen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Schalen mit 1 ml warmem PBS gewaschen und den Zellen für 5 Stunden serumarmes Zellmedium hinzugegeben. Darauf wurden die Zellen entweder mit 2 nM VEGF, 6 nM bFGF oder 20 % FCS behandelt. Pro Behandlung wurde eine 6 cm Zellkulturschale verwendet. Zellen in serumarmen Zellmedium ohne Behandlung wurden als Kontrolle mitgeführt.

Nach 16 Stunden Behandlung wurde die ATP-Extraktion mittels des ATP Assay Kits durchgeführt. Pro 6 cm Zellkulturschale wurden 100 µl ATP-Assay-Puffer hinzugegeben. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde dem ATP-Puffer ein Proteinase-Inhibitor (Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hinzugefügt, um einen vorzeitigen Abbau des ATP zu verhindern. Die Lysate wurden auf ein 1,5 ml Tube übertragen und bei 13000 rpm und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden auf ein neues Tube transferiert. Da Enzyme und Proteine die ATP-Messung stören können, wurden die Proben nach der Extraktion mittels Deproteinizing-Sample-Kit-TCA (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) behandelt. Nach der Deproteinisierung wurden alle Proben in

flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Messung für kurze Zeit bei -80 °C gelagert. Für die Messung wurden die Lysate und die vom Hersteller bereitgestellten Standards als Triplikate auf eine 96 Well Platte aufgetragen und mittels Microplate-Reader gemessen. Die fluorometrische ATP-Bestimmung erfolgte anhand einer Standardkurve bei einer Extension/Emission von 535/587 nm und wurde mit der Software Softmax Pro (Version 5.4) ausgewertet.

### **3.2.8 Western Blot**

Mittels Western Blot wurde die Menge an VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) bestimmt. Dafür wurden die Extrakte von je 5 weiblichen und 5 männlichen, nicht-verwandten HUVECs verwendet.

#### **3.2.8.1 Proteinextraktion**

Proteine wurden aus Zellen von 6 cm Zellkulturschalen isoliert. In einem ersten Versuchsansatz wurde bei Konfluenz ein Spalt mit der Rückseite einer 1000 µl Pipettenspitze gezogen. Anschließend wurde ein Mediumwechsel zu serumarmen Zellmedium vollzogen und die Zellen für 5 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden mit 2 nM VEGF behandelt. Zellen in serumarmen Zellmedium dienten als Kontrolle. Nach der Behandlung wurde das entsprechende Zellmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml kaltem PBS und 1 ml hypotonischem Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 80 µl Protein-Lysepuffer benetzt und mittels Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Die Lysate wurden auf ein 1,5 ml Tube übertragen und für 10 Minuten auf Eis gelagert. Darauf wurden sie für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf ein neues Tube übertragen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.2.8.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinquantifizierung der Western Blot Proben wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Es wurden pro Well 3 µl Proteinlysate für die Proteinbestimmung verwendet und als Duplikate auf eine 96 Well Platte aufgetragen. Die Proteinmenge wurde durch kolorimetrische Messung der Absorption bei 563 nm bestimmt und anhand einer Standardkurve quantifiziert. Die Datenauswertung erfolgte mittels Softmax Pro (Version 5.4).

### 3.2.8.3 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden für die gewonnenen Proteinproben Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gele hergestellt. Jedes Gel bestand aus einem 8 % Trenngel und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel sind aus Tabelle 12 zu entnehmen. Der pH-Wert wurde mittels Salzsäure und Natriumhydroxid eingestellt.

Tabelle 12: Bestandteile von Trenngel und Sammelgel.

Bestandteil	8 % Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,28 ml	3,65 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,56 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	625 µl
10 % SDS	62,5 µl	50 µl
40 % Acrylamid	1,28 ml	625 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Zuerst wurde die Gelkammer bis zu zwei Drittel mit Trenngel befüllt. Anschließend wurde das restliche Drittel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte, luftblasenfreie Geloberfläche zu gewährleisten. Nach 30 Minuten Polymerisation

wurde das Isopropanol abgegossen und die Gelkammer mit Aqua dest. gespült. Das Sammelgel wurde eingegossen und der Gelkamm gerade eingeführt. Das Sammelgel wurde für eine weitere halbe Stunde polymerisiert. Bis zur Verwendung am Folgetag wurden die Gele bei 4 °C in 1x SDS-Laufpuffer gelagert. Für die Gelelektrophorese wurden die Gelkammern samt Gelen in die Gelelektrophoresekammer gespannt und der Gelkamm entfernt. Jeweils 20 µg Lysat wurden mit 8 µl Probenpuffer vermischt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und kurz bei 12000 rpm zentrifugiert. Jede Geltasche wurde mit einem Probenvolumen von 25 µl gefüllt. Außerdem wurden pro Gel 8 µl Proteinladder als Größenstandard hinzugegeben. Die Gelelektrophorese lief bei einer Stromstärke von 20 mA für circa 2 Stunden.

#### **3.2.8.4 Blotting**

Das Blotten beschreibt die Proteinübertragung von einem Gelelektrophoresegel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel den Platten entnommen. Das Sammelgel wurde vorsichtig abgetrennt und das Trenngel mit den Proteinproben in Blotpuffer geschwenkt. Für den Western Blot wurde ein Semi-dry-Blotter verwendet. Dafür wurden drei Whatman-Papiere in Blotpuffer getränkt und übereinander in die Blot-Kassette gelegt. Das Trenngel wurde auf das Whatman-Papier platziert. Vor dem Platzieren auf dem Trenngel wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zuerst in Methanol und anschließend in Blotpuffer getränkt. Auf die PVDF-Membran wurden drei weitere Whatman-Papiere platziert. Das Blotten wurde bei 4 Watt für 90 Minuten durchgeführt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran unmittelbar danach in einen Behälter mit 15 ml Blocklösung gegeben und bei 4 °C

über Nacht inkubiert. Für die Blocklösung wurde ein 10x Roti-Block-Konzentrat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis von 1:10 mit PBS verdünnt.

Am Folgetag wurde die Blocklösung abgegossen. Daraufhin erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers in der Blocklösung über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit Western-Blot-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper in der Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln hinzugegeben. Die Blocklösung mit Zweitantikörpern wurde entfernt und die Membran zuerst dreimal für jeweils 5 Minuten und darauffolgend dreimal für 10 Minuten mit Western-Blot-Waschpuffer gewaschen.

Die Entwicklung der Membran erfolgte mittels Chemilumineszenz-Verfahren. Mit diesem Verfahren wird durch die Interaktion eines Substrates mit der Meerrettich-Peroxidase des Zweitantikörpers ein Fluoreszenzlicht emittiert, welches durch einen Detektor gemessen werden kann. Dabei ist die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zur Proteinmenge auf der Membran. Für die Reaktion wurde in dieser Arbeit das Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrat (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Die beiden im Kit enthaltenen Lösungen wurden nach Herstellerangaben im Verhältnis von 40:1 gemischt und anschließend auf die Membran verteilt. Die Membran wurde für 5 Minuten abgedunkelt mit dem ECL-Substrat inkubiert. Das ECL-Substrat wurde entfernt und die Membran innerhalb einer Plastikfolie in eine Dunkelkammer gelegt. Die Expositionsdauer variierte in Abhängigkeit von der gewünschten Signalstärke und betrug einige Sekunden bis Minuten. Die Entwicklung und Aufnahme erfolgte mittels Fusion Solo S Imaging System (Vilver Lourmat, Eberhardzell, Deutschland).

### **3.2.9 Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden als arithmetischer Mittelwert +/- Standard Error of the Mean (SEM) oder als Einzelwerte angegeben. Daneben wurde zum besseren Vergleich die Darstellung als Vielfaches (Fold change) verwendet. Die Realtime-PCR-Daten wurden auf Grundlage der delta-delta-CT-Werte ausgewertet. Männliche und weibliche Zellen, die von der gleichen Mutter stammten, wurden mittels gepaarten T-Tests statistisch analysiert. Nicht-verwandte HUVECs wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Für die Auswertung und Darstellung wurden SPSS Statistics (IBM, Armonk, USA), Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) und GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als signifikant und ein p-Wert von  $< 0,01$  als hochsignifikant festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellmigration

Die endotheliale Zellmigration ist ein wichtiger Prozess für die Gefäßregeneration, Wundheilung und Angiogenese und ist an der Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion beteiligt (31). In dieser Arbeit wurden sexspezifische Unterschiede in der Migrationsfähigkeit von Endothelzellen nach der Stimulation durch VEGF und bFGF an getrenntgeschlechtlichen, dizygoten Zwillingen untersucht. Als Migration wurde die Verkleinerung des Spaltes zwischen den Zellreihen als relativer Spaltschluss zum Ausgangswert gewertet. Als Ausgangswert wurde die Spaltgröße vor Behandlung definiert.

Im Vergleich zum Ausgangswert änderte sich die Spaltgröße nach Serumreduktion sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Zellen nach 16 Stunden nur unwesentlich (Abbildung 7). Insgesamt nahm die Spaltgröße bei den weiblichen Zellen leicht zu. Nach VEGF war bei beiden Geschlechtern eine deutliche Migration zu erkennen. Dabei betrug der Spaltschluss bei den weiblichen Zellen verglichen mit den männlichen HUVECs mehr als das Doppelte. Der Unterschied war hochsignifikant. Interessanterweise wurde nach bFGF geschlechtsunabhängig keine wesentliche Migration gemessen. Sie war im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 7).

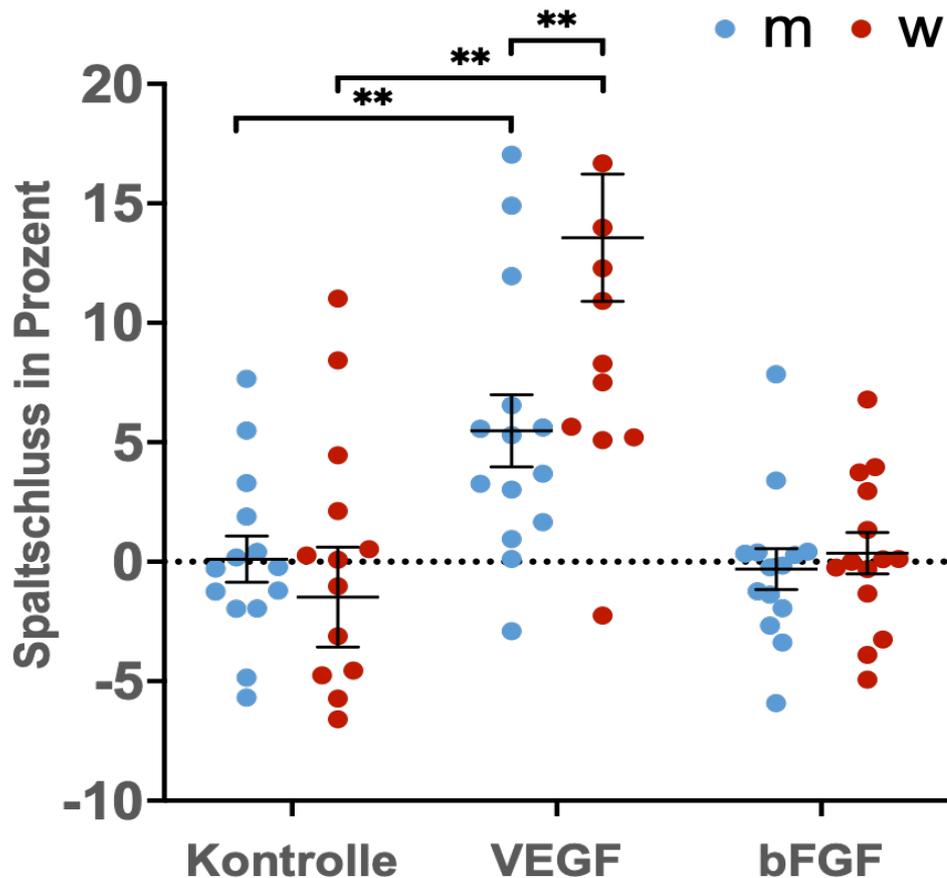


Abbildung 7: **Spaltschluss nach 16 Stunden.** Kontrolle: Serumreduktion. Nach Serumreduktion und nach bFGF zeigten sich kaum Veränderungen der Spaltgröße im Vergleich zum Ausgangswert. Nach VEGF reduzierte sich die Spaltgröße geschlechtsübergreifend. Der Spaltschluss war bei weiblichen Zellen signifikant höher. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0,01$  (gepaarter t-Test);  $n=14$  pro Geschlecht)

## 4.2 Messung der metabolischen Aktivität

Die endotheliale Migration ist ein energieaufwendiger Prozess, der die Produktion von ATP voraussetzt (112). Mithilfe des Seahorse Mito Stress Tests kann durch die Messung von OCR und ECAR Rückschlüsse auf den Energieverbrauch sowie das Verhältnis von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse in Zellen gewonnen werden. Im Folgenden werden die Resultate der einzelnen OCR-Parameter im Vergleich männlicher und weiblicher HUVECs dargestellt.

### 4.2.1 Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung

Die basale Atmung beschreibt den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und errechnet sich aus der Summe von mitochondrialer ATP-Produktion und Protonenleck. Abbildung 8 stellt die basale Atmung in den 5 Behandlungsgruppen dar. Nach Serumreduktion war sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Zellen der basale Sauerstoffverbrauch am geringsten. Nach VEGF war die basale Atmung bei den männlichen gegenüber den weiblichen Zellen signifikant höher. In allen anderen Behandlungsgruppen ergaben sich keine signifikanten, sexspezifische Unterschiede.

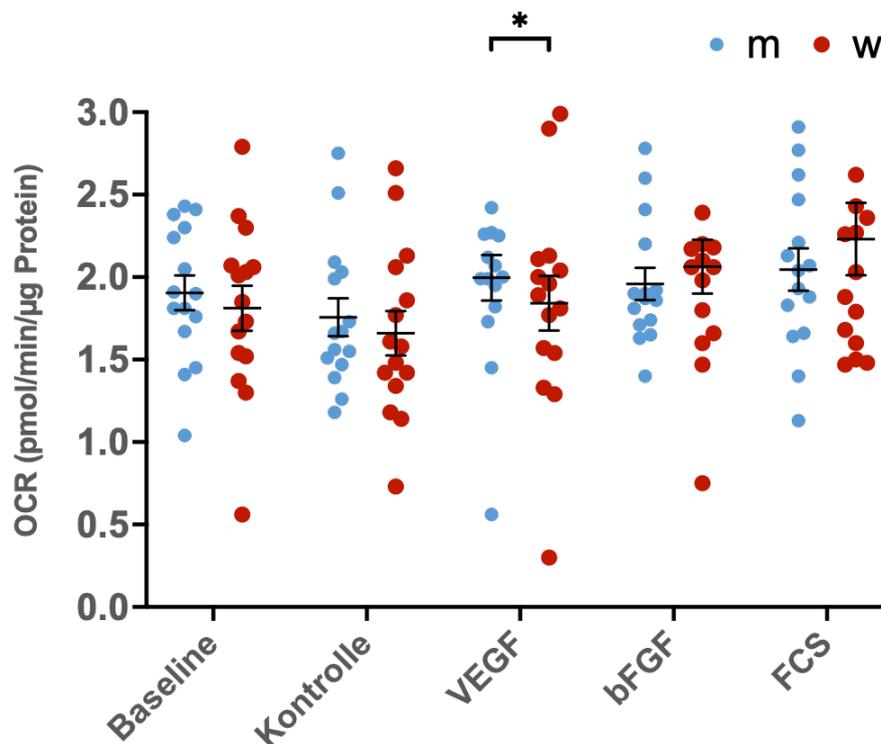


Abbildung 8: **Sexspezifische Unterschiede in der basalen Atmung.** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Verglichen mit der Kontrolle erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch in allen Behandlungen. Nach VEGF zeigte sich bei den männlichen Zellen eine erhöhte basale Atmung im Vergleich zu weiblichen Zellen. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  (gepaarter t-Test);  $n = 15$  pro Geschlecht)

Die respiratorische Reservekapazität beschreibt die Fähigkeit, die mitochondriale Aktivität bei erhöhtem Energiebedarf zu steigern und berechnet sich als Quotient aus

basaler und maximaler Atmung. Ermittelt wird dadurch der relative Zuwachs des Sauerstoffverbrauchs.

Nach VEGF wurde geschlechtsunabhängig die höchste respiratorische Reservekapazität gemessen (Abbildung 9). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere respiratorische Reservekapazität bei den weiblichen HUVECs. In den anderen Behandlungsgruppen bestanden keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede. Interessanterweise lag die respiratorische Reservekapazität in der Kontrolle leicht höher als nach FCS und im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Baseline).

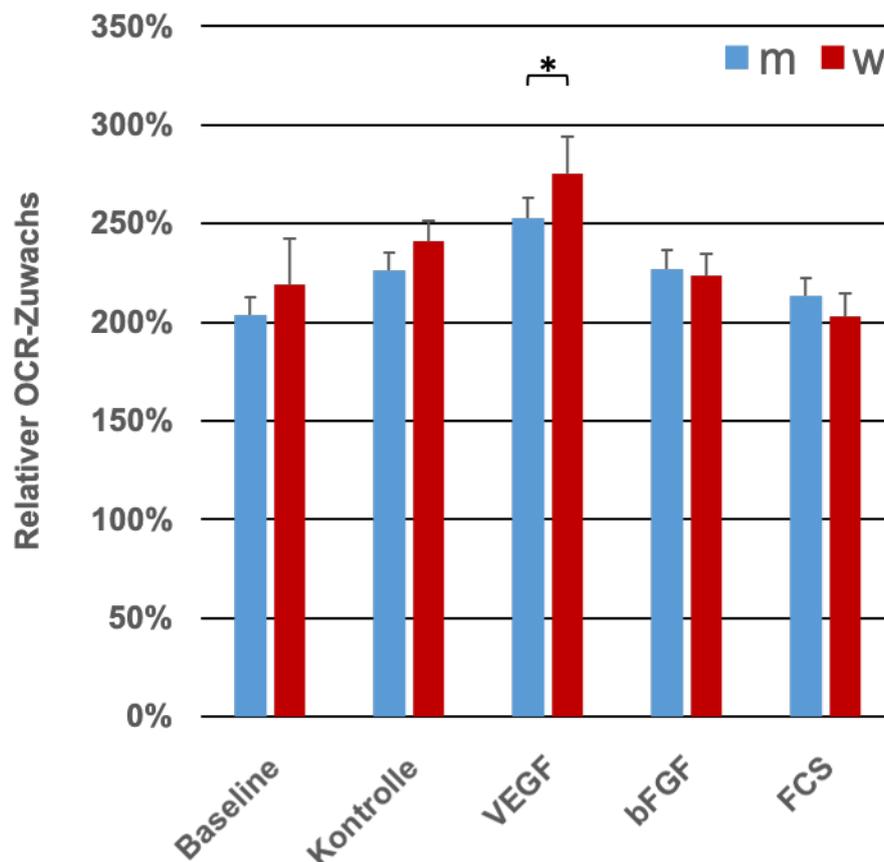


Abbildung 9: **Sexspezifische Unterschiede in der respiratorischen Reservekapazität.** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Nach VEGF war die respiratorische Reservekapazität in weiblichen HUVECs signifikant höher im Vergleich zu den männlichen Zellen. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  (gepaarter t-Test);  $n = 15$  pro Geschlecht)

In Abbildung 10 sind die anderen OCR-Parameter unter den verschiedenen Behandlungen dargestellt. Das Protonenleck (Abbildung 10A) beschreibt den Sauerstoffverbrauch, der nicht für die ATP-Produktion zur Verfügung steht. Die ATP-Produktion (Abbildung 10B) ist die Differenz aus basaler Atmung und Protonenleck. Bei beiden Parametern ergaben sich jedoch keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede. Die maximale Atmung (Abbildung 10C) war in männlichen und weiblichen HUVECs vergleichbar. Geschlechtsunabhängig kam es in allen Behandlungsgruppen mindestens zu einer Verdopplung der OCR im Vergleich zur basalen Atmung (Abbildung 8). Sie war nach VEGF am höchsten. In der nicht-mitochondrialen Atmung (Abbildung 10D) zeigten sich ebenfalls keine sexspezifischen Unterschiede.

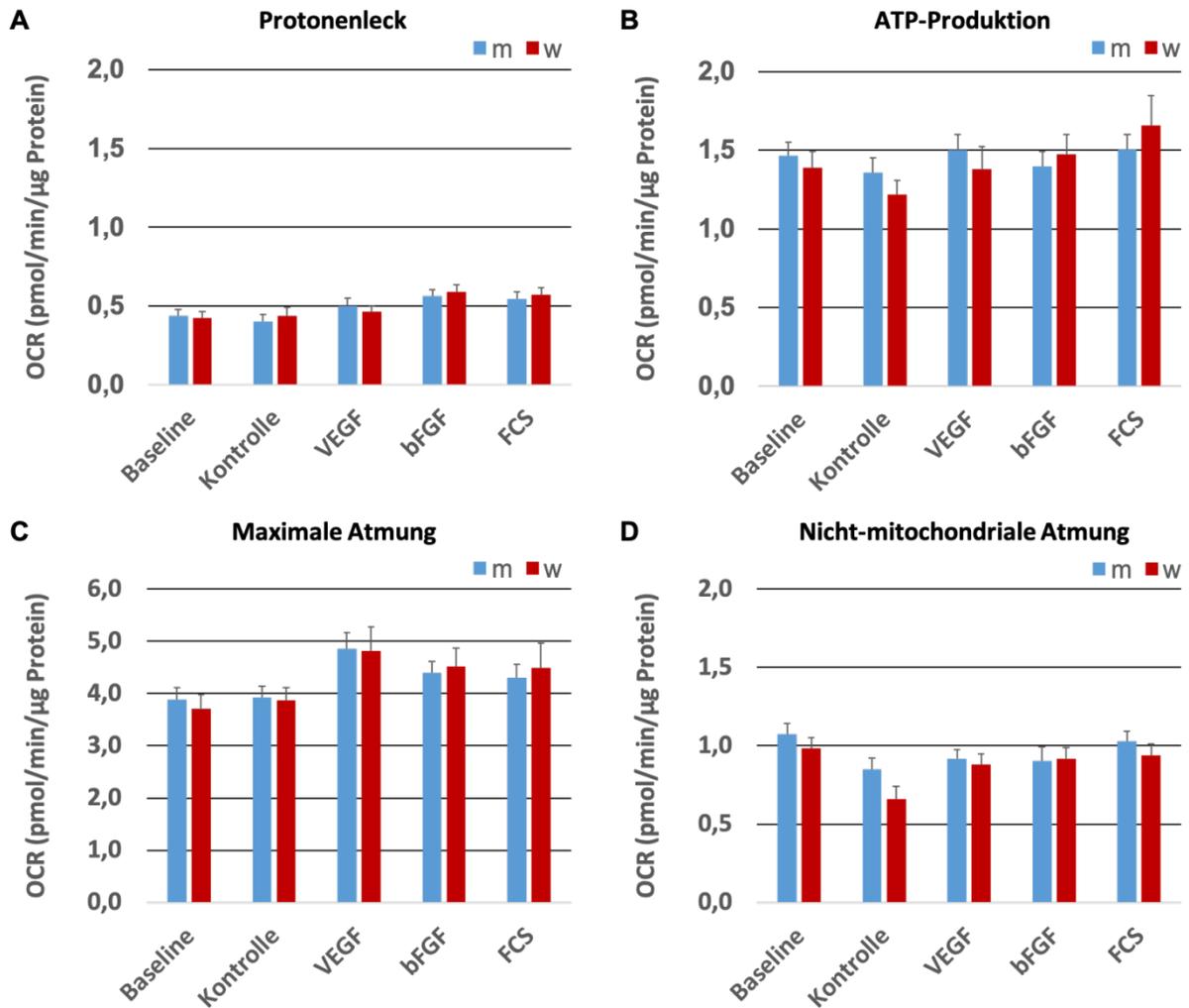


Abbildung 10: **Sexspezifischer Vergleich von Protonenleck (A), ATP-Produktion (B), Maximaler Atmung (C) und Nicht-mitochondrialer Atmung (D).** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Die Veränderungen der OCR in den jeweiligen Behandlungsgruppen zeigten keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=15 pro Geschlecht)

#### 4.2.2 Energiegewinnung durch Glykolyse

Als Maß für die pH-Wert Änderung des Zellmediums bietet die ECAR Rückschlüsse auf die Glykolyse-Aktivität. In allen Behandlungsgruppen gab es jedoch keine sexspezifischen Unterschiede in der basalen ECAR (Abbildung 11). Nach der Inhibition vom mitochondrialen Komplex V durch Oligomycin kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg der ECAR. Dabei ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVECs.

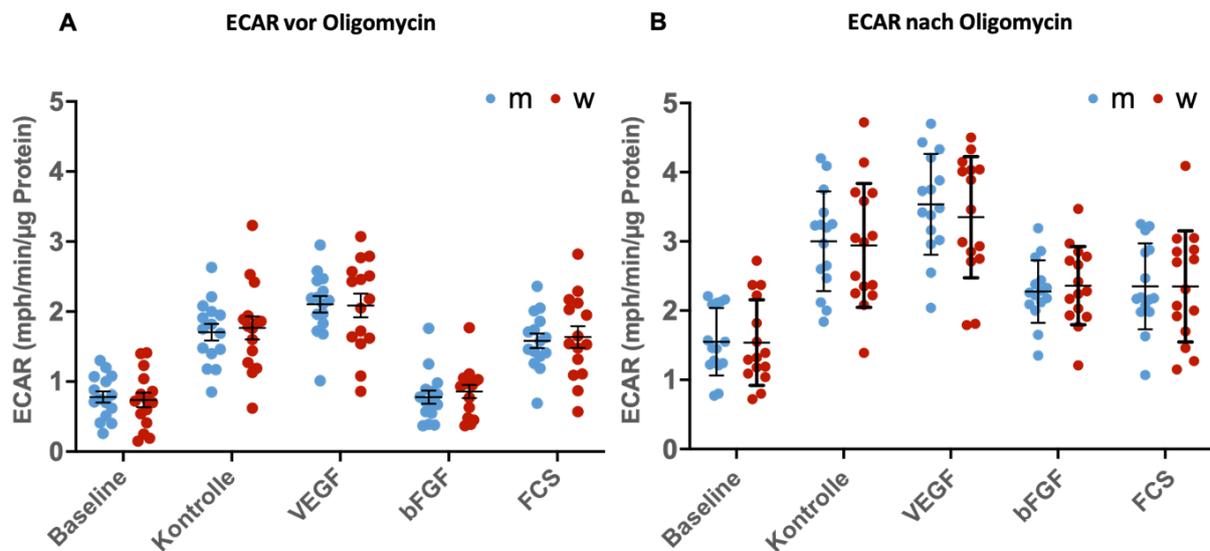


Abbildung 11: **Sexspezifischer Vergleich der ECAR vor (A) und nach (B) Oligomycin.** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Es zeigten sich keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede vor und nach Oligomycin. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. Nach Oligomycin stieg die ECAR in allen Behandlungsgruppen deutlich an. (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=15 pro Geschlecht)

#### 4.2.3 ECAR/OCR Ratio

Die ECAR/OCR Ratio stellt jeweils den Anteil von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse an der zellulären Energiegewinnung dar. Eine Erhöhung der ECAR/OCR Ratio spiegelt dabei eine erhöhte Energiegewinnung mittels Glykolyse wider. Die ECAR/OCR Ratio war nach Serumreduktion in weiblichen HUVECs im Vergleich zu männlichen erhöht (Abbildung 12A). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,053$ ). In 11 von 15 Zwillingspaaren zeigte sich nach Serumreduktion eine höhere ECAR/OCR Ratio bei den weiblichen Zellen und in 10 von 15 Zwillingspaaren nach VEGF (Abbildung 12B). Nach bFGF und FCS ergaben sich keine sexspezifischen Unterschiede.

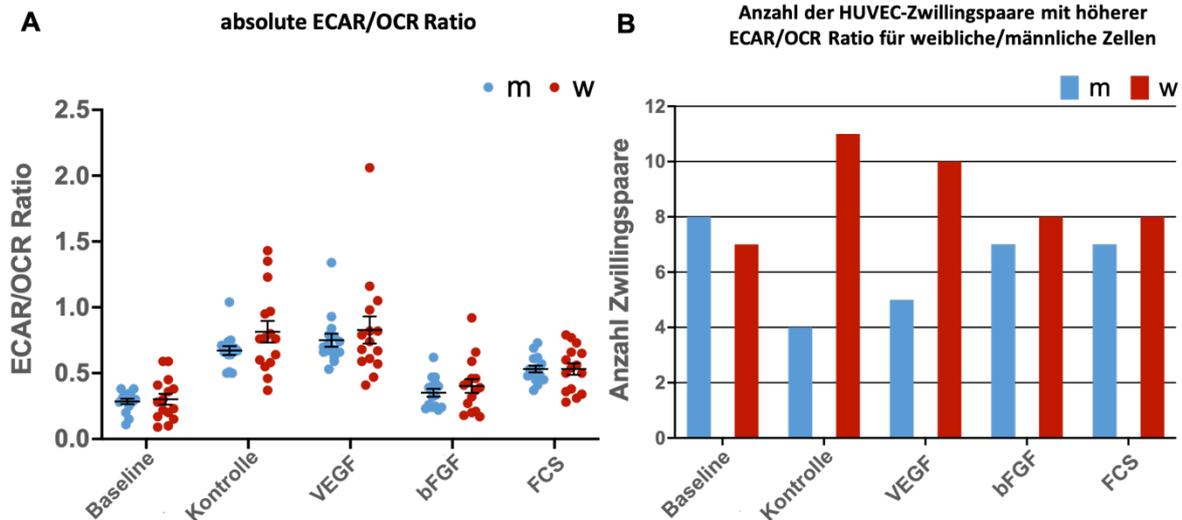


Abbildung 12: **Sexspezifischer Vergleich der basalen ECAR/OCR Ratios (A) und die Anzahl von HUVEC-Zwillingspaaren mit höherer ECAR/OCR Ratio für weibliche oder männliche Zellen (B)**. Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Die ECAR/OCR Ratio war nach Serumreduktion bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Zellen höher ( $p=0,053$  (gepaarter t-Test)). Dies gilt ebenfalls nach VEGF. Nach Serumreduktion wiesen in 11 von 15 Zwillingspaaren sowie nach VEGF in 10 von 15 Zwillingspaaren die weiblichen Zellen höhere OCR/ECAR Ratios gegenüber den männlichen Zellen auf. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet (Mittelwerte  $\pm$  SEM (A);  $n=15$  pro Geschlecht)

### 4.3 Intrazelluläre ATP-Konzentration

Als universeller Energieträger der Zelle ist ATP ein Endprodukt des anaeroben und aeroben Energiestoffwechsels und wird bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen benötigt. Da bei der Migration durch die Kontraktion des Zytoskeletts ebenfalls viel Energie benötigt wird, spielt ATP eine wesentliche Rolle bei der Migration von Endothelzellen (112). Daher wurde in dieser Arbeit die ATP-Konzentration in HUVECs von dizygotischen Zwillingen gemessen.

Männliche unbehandelte HUVECs hatten eine leicht höhere ATP-Konzentration gegenüber weiblichen Zellen (Abbildung 13A und B). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nach Serumreduktion sank der ATP-Gehalt bei den männlichen HUVECs im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant ab, während sich bei den weiblichen HUVECs die ATP-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen nur geringfügig reduzierte. Nach VEGF war die ATP-

Konzentration in weiblichen HUVECs im Vergleich zu den männlichen Zellen signifikant höher (Abbildung 13A). Der intrazelluläre ATP-Gehalt der weiblichen Zellen betrug dabei ca. das 1,5-Fache der männlichen HUVECs (Abbildung 13B). Nach bFGF wurde kein signifikanter sexspezifischer Unterschied beobachtet.

Es zeigte sich sowohl in der Kontrolle als auch nach VEGF bei weiblichen Zellen eine höhere ATP-Konzentration in 8 von 11 Zwillingspaaren (Abbildung 13C). Nach bFGF war nur in 4 von 11 Zwillingspaaren bei den weiblichen HUVECs die ATP-Konzentration höher gegenüber den männlichen Zellen. In unbehandelten Zellen wurde in 6 von 11 Zwillingspaaren bei weiblichen HUVECs eine größere ATP-Konzentration gemessen.

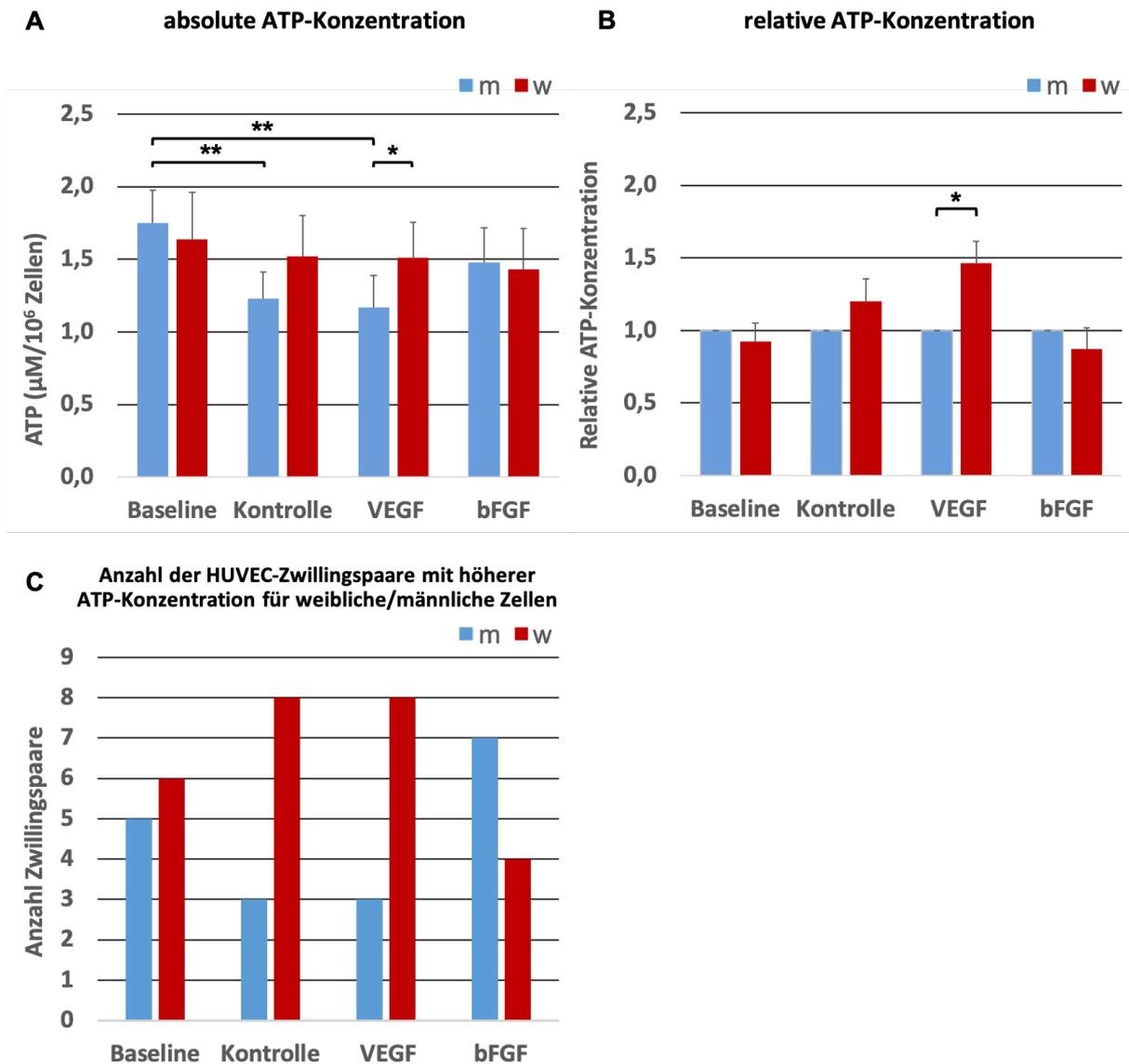


Abbildung 13: **Sexspezifische Unterschiede in der absoluten (A) und relativen (B) ATP-Konzentration sowie die Anzahl von HUVEC-Zwillingspaaren mit höherer ATP-Konzentration für weibliche oder männliche Zellen (C).** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Im Vergleich zur Baseline nahm die ATP-Konzentration nach Serumentzug und nach VEGF bei männlichen HUVECs signifikant ab. Die ATP-Konzentration war nach beiden Behandlungen in weiblichen HUVECs höher, der Unterschied war nach VEGF signifikant. Es wurden Zellen von dizygoten Zwillingen verwendet. (Mittelwerte  $\pm$  SEM (A und B); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (A und B (gepaarter t-Test));  $n = 11$  pro Geschlecht)

#### 4.4 cAMP-Konzentration

Als potenzieller Einflussfaktor auf die Migration (84) wurde die cAMP-Konzentration mittels ELISA gemessen. Nach 3 Stunden Serumreduktion war im Vergleich zu den männlichen Zellen die intrazelluläre cAMP-Konzentration der weiblichen HUVECs

signifikant höher (Abbildung 14A). Nach VEGF ergab sich dagegen kein wesentlicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen HUVECs. Im Vergleich zur Kontrolle stieg die cAMP-Konzentration nach VEGF bei den männlichen Zellen signifikant, wohingegen sie in weiblichen HUVECs leicht abnahm. Nach bFGF war die cAMP-Konzentration ebenfalls bei weiblichen HUVECs höher, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen (Abbildung 14A).

Nach 16 Stunden war in allen Behandlungsgruppen die intrazelluläre cAMP-Konzentration deutlich höher als nach 3 Stunden. Dabei wurde allgemein in männlichen HUVECs eine höhere cAMP-Konzentration beobachtet. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abbildung 14B). In den Zellkultur-Überständen konnten nach 16 Stunden nur sehr geringe Mengen cAMP nachgewiesen werden (Abbildung 14C). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter sexspezifischer Unterschied.

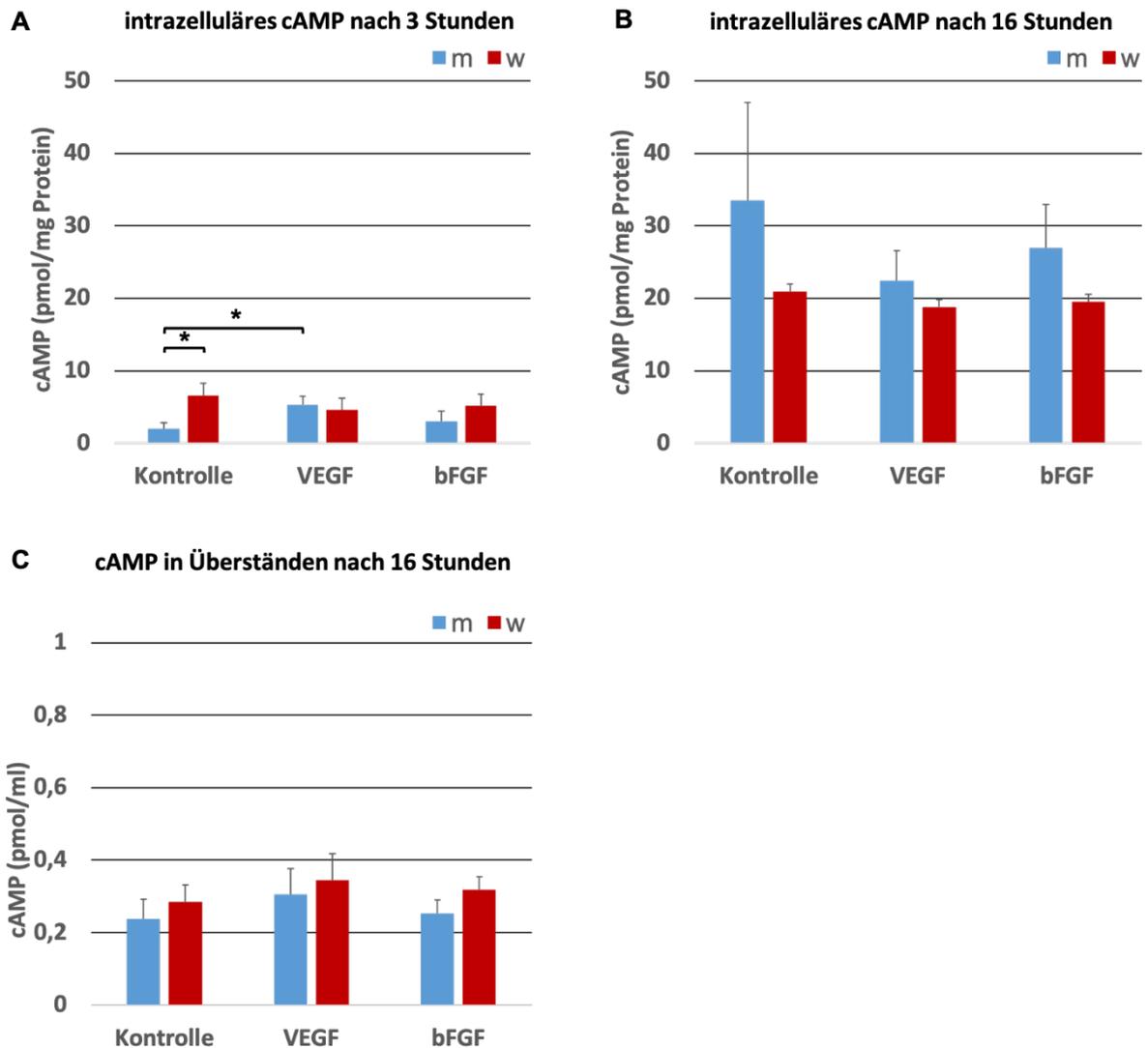


Abbildung 14: **Sexspezifische Unterschiede in der cAMP-Konzentration in Lysaten nach 3 (A) und 16 Stunden (B) sowie in Überständen (C) nach 16 Stunden Behandlung.** Kontrolle: Serumreduktion. Nach 3 Stunden Serumreduktion war die cAMP-Konzentration in weiblichen HUVECs signifikant höher als in männlichen Zellen. Nach VEGF stieg die cAMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle in männlichen Zellen signifikant an. Es wurden Zellen von nicht-verwandten Spendern verwendet. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  (Mann-Whitney-U-Test);  $n = 6$  pro Geschlecht)

#### 4.5 PFKFB3-Expression

Die 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase-3 (PFKFB3) ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Erhöhte PFKFB3-Level steigern die Glykolyse-Aktivität der Zelle und fördern die Migration und Angiogenese in Endothelzellen (75). In dieser Arbeit wurde die PFKFB3-Expression mittels Real-Time-RT-PCR in jeweils

5 männlichen und weiblichen, nicht verwandten HUVECs bestimmt (Abbildung 15). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen stieg die PFKFB3-Expression nach Serumreduktion in den männlichen Zellen auf das 1,2-Fache an (Abbildung 15A), wobei sich kein sexspezifischer Unterschied ergab. Nach Stimulation mit VEGF und FCS war die PFKFB3-Genexpression in weiblichen Zellen geringfügig höher, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen. Im Vergleich zur Kontrolle wurde nach VEGF in weiblichen HUVECs ein leichter Anstieg der PFKFB3-Expression beobachtet (Abbildung 15B).

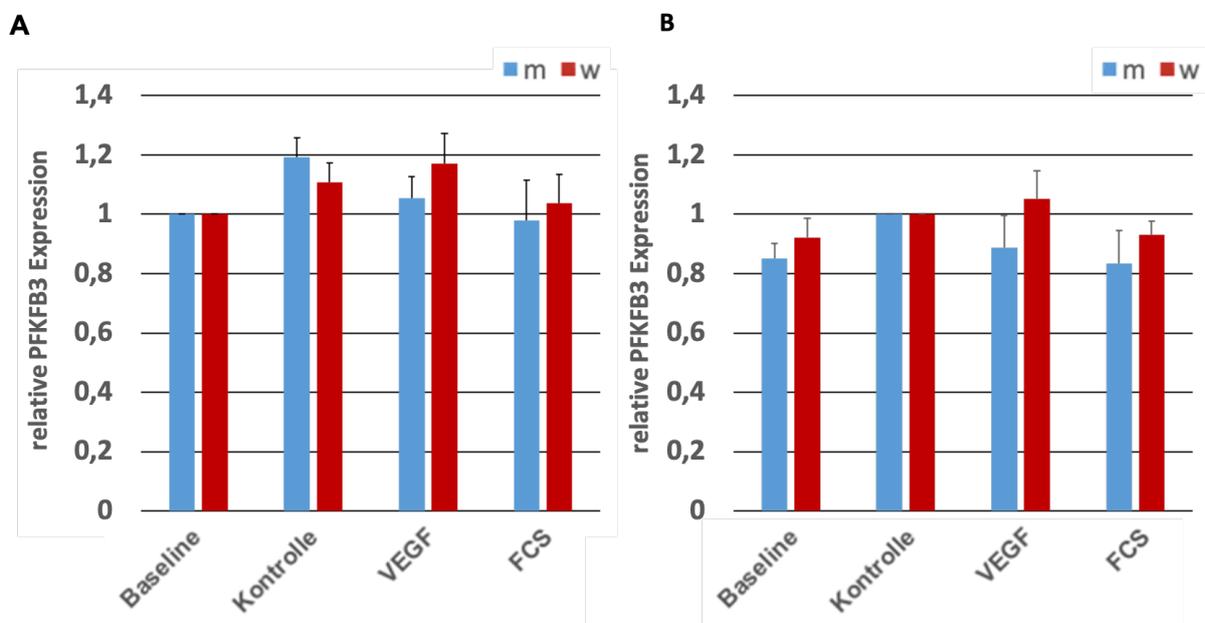


Abbildung 15: **Sexspezifischer Vergleich der relativen PFKFB3-Expression nach 16 Stunden bezogen auf die Baseline (A) und auf die Kontrolle (B).** Baseline: unbehandelte Zellen im Vollmedium. Kontrolle: Serumreduktion. Es wurden keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Es wurden Zellen von nicht-verwandten Spendern verwendet. (Mittelwerte  $\pm$  SEM; n=5 pro Geschlecht)

#### 4.6 Zelluläre VEGFR2-Proteinlevel

VEGF aktiviert über den VEGFR2 die Migration von Endothelzellen und steigert deren Energiemetabolismus (68, 70). Dabei wird der Rezeptor während der Stimulation intrazellulär abgebaut und so die VEGFR2-Menge reduziert (69).

Zur Untersuchung eines möglichen Geschlechtsunterschiedes der VEGFR2-Menge auf Proteinebene wurden Western Blots mit 5 nicht-verwandten, männlichen und weiblichen HUVECs durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach 16 Stunden Serumreduktion mit oder ohne VEGF-Behandlung untersucht (Abbildung 16). Die VEGFR2-Proteinmenge nahm nach VEGF geschlechtsübergreifend ab. Das Expressionsniveau variierte dabei stark zwischen einzelnen Zellen bzw. Spendern. Es ließen sich keine eindeutigen, sexspezifischen Unterschiede feststellen.

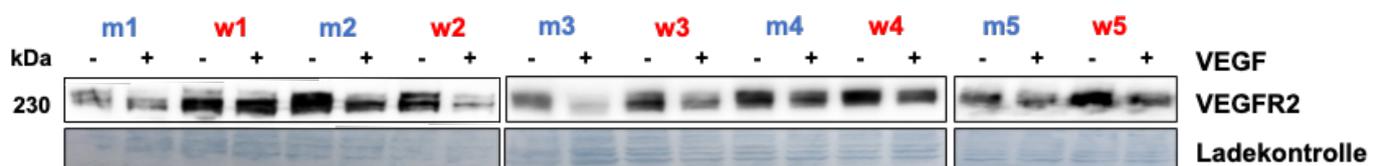


Abbildung 16: **Sexspezifischer Vergleich in der VEGFR2-Proteinmenge nach VEGF (+) im Vergleich zur Kontrolle (-).** VEGF führte zu einer Abnahme der VEGFR2-Menge. Jedoch wurden keine eindeutigen sexspezifischen Unterschiede festgestellt. Als Ladekontrolle wurde Amido Black verwendet. Es wurden Zellen von nicht-verwandten Spendern verwendet.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden sexspezifische Unterschiede im Migrationsverhalten von männlichen und weiblichen HUVECs sowie potenziell beteiligter Einflussfaktoren untersucht. In weiblichen HUVECs war die Migration nach VEGF stärker ausgeprägt. Des Weiteren zeigte sich ein Trend zu höheren ECAR/OCR Ratios in weiblichen HUVECs nach Serumreduktion und VEGF, was darauf hindeutet, dass der Glykolyse-Anteil der Energiegewinnung in diesen Zellen höher war. Die ATP-Konzentration nach VEGF und nach Serumreduktion war in weiblichen HUVECs höher. Dies spricht für einen geringeren Energieverbrauch oder eine höhere Energiegewinnung in weiblichen Zellen. Bei männlichen HUVECs wurde eine höhere mitochondriale Atmung nach VEGF festgestellt. Die respiratorische Reservekapazität war jedoch in weiblichen HUVECs größer, was auf ein höheres Steigerungspotenzial der mitochondrialen Atmung hindeutet. Die Bestimmung der PFKFB3-Expression sowie der VEGFR2-Proteinmenge ergab keine signifikanten sexspezifischen Unterschiede. Zusätzlich wurde cAMP als weiterer Einflussfaktor auf die Migration bestimmt. Nach kurzer Serumreduktion war die cAMP-Konzentration in weiblichen HUVECs im Vergleich zu männlichen Zellen signifikant höher, was dafür spricht, dass zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Hemmung der Migration vorliegt. Dieser Unterschied ergab sich nach 16 Stunden nicht. Im Folgenden werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit dem aktuellen Stand der Literatur diskutiert.

## 5.1 Sexspezifische Unterschiede in der endothelialen Migration

Als innerste Gefäßschicht sind Endothelzellen hauptverantwortlich für die Integrität und Permeabilität der Gefäße. Die endotheliale Migration ermöglicht die Modellierung der Permeabilität sowie die Anpassung an Nährstoffmangel und Hypoxie (31). Eine höhere Konzentration und eine bessere Migration von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem Blut wurde bei Frauen im Vergleich zu Männern festgestellt (113, 114). Bereits auf zellulärer Ebene konnten sexspezifische Unterschiede in der Migration gezeigt werden. Eine bessere Motilität und Migration wurde in weiblichen HUVECs unter Basalbedingungen nachgewiesen (55, 58). In diesem Zusammenhang wurde auch eine vermehrte Ausbildung von Lamellipodien in weiblichen Zellen gefunden (55). Unter hyperoxischen Bedingungen zeigten weibliche pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (HPMECs) eine stärker ausgeprägte Migration und vermehrte Gefäßbildung (115). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten weibliche HUVECs eine stärker ausgeprägte Migration nach VEGF im Vergleich zu männlichen. Für die Migration von Endothelzellen ist VEGF einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren (116). Die Entstehung von Filopodien und Tip-Zellen wird maßgeblich durch VEGF stimuliert (117). Eine deutliche Steigerung der Migration nach VEGF im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde beobachtet (118, 119). Es wird diskutiert, dass eine stärkere VEGF vermittelte Migration weiblicher Zellen *in vitro* Grundlage für eine bessere Angiogenese und Wundheilung *in vivo* ist. Rono et al. fanden in weiblichen Mäusen im Vergleich zu männlichen Tieren eine schnellere Wundheilung. Dabei blieb die bessere Wundheilung auch nach Ovariectomie erhalten (120).

Rudnicki et al. stellten im Fettgewebe von weiblichen Mäusen eine bessere Gewebedurchblutung fest. Diese bessere Durchblutung war mit einer besseren systemischen Insulin-Sensitivität in weiblichen Mäusen assoziiert (121). In aortalen

Endothelzellen aus Ratten wurde eine verzögerte Wundheilung bei männlichen Zellen im Vergleich zu weiblichen nachgewiesen (57).

Cattaneo et al. konnten zeigen, dass die Migration von weiblichen HUVECs unter Basalbedingungen stärker von eNOS abhängig ist als bei männlichen Zellen. Die eNOS-Expression und eNOS-Aktivität war in weiblichen HUVECs höher (55). Eine geringere eNOS-Aktivität wird mit einer schnelleren Progression atherosklerotischer Läsionen in Verbindung gebracht (122). In unserer Forschungsgruppe zeigte sich ebenfalls eine höhere eNOS-Proteinmenge in unbehandelten weiblichen HUVECs im Vergleich zu männlichen (1). Nach VEGF-Stimulation ergab sich dieser Unterschied jedoch nicht, was dafür spricht, dass andere Mechanismen für die Unterschiede in der VEGF-induzierten Migration verantwortlich sind.

In unserer Forschungsgruppe wurde die Funktionalität des Endothels unter Nährstoffentzug untersucht. Nach Serumentzug wurden vermehrt kapillar-ähnliche Strukturen in weiblichen HUVECs gebildet. Die Zellviabilität war nach Serumentzug in weiblichen Zellen ebenfalls größer im Vergleich zu männlichen (62). Die Zellviabilität und Proliferation ist unter Hyperoxie bei männlichen HPMECs eingeschränkt, wohingegen sie in weiblichen Zellen nur geringfügig beeinträchtigt wird (115). Daraus lässt sich ableiten, dass sich weibliche Endothelzellen unter zytotoxischen Bedingungen oder Nährstoffmangel besser adaptieren können als männliche Zellen. Unter serumarmen Bedingungen findet keine wesentliche Migration von Endothelzellen statt (123, 124). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Serumreduktion ebenfalls keine Migration beobachtet. Somit wurden auch keine sexspezifischen Unterschiede festgestellt.

Neben VEGF ist bFGF ebenfalls ein potenter Wachstumsfaktor. In mehreren Studien wurde eine pro-migratorische Wirkung von bFGF nachgewiesen (125-128).

Durch Aktivierung glykolytischer Enzyme steigert bFGF den Energiemetabolismus in Endothelzellen (106). Über bFGF wird zudem die VEGF-induzierte Migration durch Steigerung der VEGFR2-Expression erhöht (125). *In vivo* wurde durch bFGF eine Beschleunigung der Gefäßbildung und Wundheilung erreicht (127, 129, 130). Sexspezifische Unterschiede in der Migration nach bFGF wurden bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde nach bFGF in HUVECs keine relevante Migration beobachtet. Somit ließ sich ein möglicher sexspezifischer Unterschied in der Migration nicht untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von bFGF war vergleichbar mit anderen Arbeiten (106, 131). Arunkumar et al. konnten bereits nach kürzeren Zeitpunkten eine signifikante Steigerung der Migration durch bFGF im Vergleich zu unbehandelten Zellen feststellen (127). Die Messung zu anderen als in dieser Arbeit verwendeten Zeitpunkten könnte in HUVECs eine Migration durch bFGF besser dokumentieren.

Als Definition der Migration wurde in der vorliegenden Arbeit der Spaltschluss eines Doppelkammersystems gewählt. Eine Migration außerhalb des Spaltes wurde damit nicht berücksichtigt. Eine Verletzung als Migrationsreiz wie bei einem Wundheilungsassay war durch die gewählte Untersuchungsmethode nicht möglich. Die bFGF induzierte Migration könnte auch durch einen Chemotaxis Assay untersucht werden. In diesem Assay wäre die Migration durch Aufbau eines Konzentrationsgradienten gegebenenfalls besser messbar. Nach VEGF wurde für die Migration ein unterschiedliches Ergebnis für Chemotaxis- und Wundheilungs-Assay beschrieben (58).

## 5.2 Sexspezifische Unterschiede im endothelialen Metabolismus

Bei Migration, Angiogenese und Wundheilung steigern Endothelzellen ihren Energieverbrauch (68, 75). Für den Stoffwechsel stehen im Wesentlichen die oxidative Phosphorylierung sowie die Glykolyse zur Verfügung. Während die oxidative Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum effizient ATP produziert, kann durch die Glykolyse eine schnelle Steigerung der ATP-Konzentration erreicht werden (112). Im Vergleich zu eher oxidativen Zelltypen wie Neuronen, Kardiomyozyten und Hepatozyten ist der Anteil der mitochondrialen Atmung in Endothelzellen wesentlich geringer (75). Endothelzellen besitzen zudem in Relation zur Gesamtzellgröße einen geringeren Anteil an Mitochondrien (2-12 % im Vergleich zu Hepatozyten (28 %) und Kardiomyozyten (22-37 %) (132). Verglichen mit der Glukose-, Fettsäure- und Glutamin-Oxidation, ist die Energiegewinnung durch Glykolyse (glykolytischer Flux) in Endothelzellen um den Faktor 200 erhöht. Die Glykolyse stellt in Endothelzellen somit den wichtigsten Prozess der Energieerzeugung dar. Bis zu 85 % des ATPs werden in Endothelzellen aus der Glykolyse gewonnen. Dabei wird der glykolytische Flux durch VEGF weiter gesteigert (75).

Sexspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene im Energiemetabolismus sind bislang in Endothelzellen kaum untersucht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität von oxidativer Phosphorylierung und Glykolyse unter pro-migratorischen Bedingungen sexspezifisch bestimmt. Nach VEGF war die basale Atmung in männlichen HUVECs gegenüber weiblichen Zellen höher. Die mitochondriale ATP-Produktion unterschied sich jedoch nicht.

Während der oxidativen Phosphorylierung werden neben ATP auch ROS generiert, die als Signalmoleküle wirken und in geringen Konzentrationen

Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern (133, 134). In höheren Dosen sind ROS auch an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose beteiligt (49, 51, 135). In welcher Konzentration ROS als Signalmoleküle proangiogenetisch oder eher zellschädigend für das Endothel sind, ist bisher nicht eindeutig geklärt (136). Eine höhere ROS-Produktion konnte *in vitro* (58) und *in vivo* (137, 138) in männlichen Zellen im Vergleich zu weiblichen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde für männliche Zellen während der Angiogenese eine stärkere Aktivität der  $\beta$ -Oxidation beschrieben (139). Die  $\beta$ -Oxidation findet ebenso wie die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien statt und liefert Substrate, die für die Nukleotid-Synthese wichtig sind. Zusammenfassend findet sich somit eine Tendenz zu einer stärker ausgeprägten mitochondrialen Atmung in männlichen Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant höhere respiratorische Reservekapazität nach VEGF in weiblichen HUVECs gemessen. Die maximale Atmung unterschied sich dabei zwischen männlichen und weiblichen Zellen nicht. Dranka et al. zeigten, dass unter oxidativen Stress zunächst die respiratorische Reservekapazität in Endothelzellen reversibel reduziert wird. Bei zunehmender Zellschädigung kommt es schließlich zu einer irreversiblen Reduktion der basalen mitochondrialen Atmung (140). Der Verlust der respiratorischen Reservekapazität korreliert mit einer mitochondrialen Schädigung und Zelltod (141). Damit übereinstimmend besteht eine höhere Zellviabilität weiblicher Endothelzellen nach Hyperoxie (115) und nach Serumentzug (62). Während der Angiogenese wird bei der Umwandlung von ruhenden Phalanx-Zellen zu aktiven Stalk- und Tip-Zellen die Glykolyse zusätzlich stimuliert und die glykolytische ATP-Produktion verdoppelt (75). In Übereinstimmung dazu konnte in der vorliegenden Arbeit nach VEGF-Stimulation und Serumreduktion eine Steigerung der Glykolyse festgestellt werden. Es wurden

dabei aber keine wesentlichen sexspezifischen Unterschiede in der ECAR gefunden. Im Verhältnis von Glykolyse zu mitochondrialer Atmung (ECAR/OCR Ratio) wurde in unbehandelten Zellen ebenfalls kein sexspezifischer Unterschied beobachtet. Nach Serumreduktion und VEGF-Stimulation nahm jedoch die ECAR/OCR Ratio in weiblichen Zellen zu. Im Vergleich zu den männlichen Zellen wurde bei mehr weiblichen Zellen eine höhere ECAR/OCR Ratio gemessen. Ein höherer glykolytischer Flux in Endothelzellen ist mit einer stärker ausgeprägten Migration assoziiert. Die Entwicklung der Endothelzellen zu migratorischen Tip-Zellen wird durch die Aktivierung der Glykolyse gefördert. Eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung in Endothelzellen führt andererseits nicht zu einer Beeinträchtigung der Angiogenese (75). He et al. demonstrierten im Mausmodell, dass ein erhöhter Anteil der oxidativen Phosphorylierung an der zellulären Energiegewinnung und die Verringerung der Glykolyse in Endothelzellen mit einer Störung der Angiogenese assoziiert sind. Die erhöhte mitochondriale Aktivität steigerte außerdem die endotheliale ROS-Produktion sowie den Sauerstoffverbrauch (142). Longchamp et al. konnten nachweisen, dass die Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Hydrogensulfid zu einer kompensatorischen Erhöhung der Glykolyse und damit zu einer besseren Migration in HUVECs führte (143). In Osteosarkomzellen steigerte eine mitochondriale Dysfunktion ebenfalls Glykolyse und Migration (144).

Zusammenfassend ergeben sich in der vorliegenden Arbeit Hinweise für eine höhere Glykolyse-Aktivität in weiblichen Zellen, wohingegen männliche Zellen eine Tendenz zu einem stärker ausgeprägten mitochondrialen Energiemetabolismus zeigten. Zur weiteren Beurteilung wurde daher die PFKFB3-Genexpression auf sexspezifische Unterschiede untersucht. Die PFKFB3 ist eines der wichtigsten Schrittmacherenzyme der Glykolyse (75). Die Inhibition von PFKFB3 reduziert in Endothelzellen die Glykolyse um 35-40 % (67) und VEGF stimuliert die PFKFB3-

Expression und Glykolyse (75, 145). PFKFB3 selbst steigert die VEGF-Expression in Endothelzellen (142), wohingegen laminarer Scherstress die PFKFB3-Expression hemmt (146). PFKFB3 erhöht die Proliferation in Stalk-Zellen und das Migrationsverhalten in Tip-Zellen (67). In mehreren Studien wurde durch Inhibition von PFKFB3 in Endothelzellen die Migration *in vitro* und die Angiogenese *in vivo* reduziert (75, 145, 147).

Nach VEGF und Behandlung mit FCS war die PFKFB3-Genexpression in der vorliegenden Arbeit bei weiblichen Zellen leicht höher, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Die Tendenz eines höheren glykolytischen Flux in weiblichen Zellen konnte damit im Rahmen dieser Arbeit nicht durch eine erhöhte PFKFB3-Genexpression erklärt werden und korrelierte auch nicht mit der besseren Migration weiblicher HUVECs nach VEGF. Boscaro et al. fanden in unbehandelten Zellen ebenfalls keine sexspezifischen Unterschiede in HUVECs. Nach Östrogen-Stimulation war die PFKFB3-Expression in weiblichen HUVECs jedoch signifikant größer als in männlichen (148). Das könnte ein Hinweis sein, dass Sexualhormone einen größeren Einfluss auf die PFKFB3-Expression haben als intrinsische zelluläre Unterschiede.

Die PFKFB3-Genexpression könnte während der Migration zeitlichen Schwankungen unterliegen. Xu et al. stellten nach VEGF zwar eine signifikante Erhöhung der PFKFB3-Genexpression nach 12 Stunden, nicht jedoch nach 24 Stunden, fest. Weiterhin zeigten sich Unterschiede zwischen der PFKFB3-mRNA und Proteinexpression, wobei letztere nach 24 Stunden im Gegensatz zur Genexpression signifikant erhöht war (145). Eine sexspezifische Bestimmung der PFKFB3-mRNA und Proteinmenge sollte daher zu mehreren Zeitpunkten erfolgen. Ein Sexualdimorphismus im Energiemetabolismus könnte jedoch auch auf Unterschiede in anderen glykolytischen Enzymen zurückzuführen sein. Nach bFGF

wurde eine selektive Steigerung der Proteinmenge der Hexokinase 2 festgestellt, nicht jedoch der PFKFB3 (106). Eine Hemmung der Pyruvatkinase M 2 (PKM2) reduzierte die ATP-Produktion um 50 % sowie die Migration in Endothelzellen (149).

Neben der Höhe der PFKFB3-Expression könnte auch deren intrazelluläre Lokalisation von Bedeutung sein. Während der Migration verlagern sich glykolytische Enzyme und insbesondere PFKFB3 von perinukleär in die Lamellipodien und werden so direkt an die Aktinfilamente gekoppelt (75, 112, 150) (Abbildung 17). Durch diese Kompartimentierung könnten glykolytische Enzyme direkt mit dem Zytoskelett verknüpft und ihre Leistung gesteigert werden (112). Mitochondrien sind im perinukleärem Zytosol angesiedelt und eine Verlagerung in die Fortsätze ist aufgrund ihrer Größe nicht möglich (75). Die lokale ATP-Produktion in Lamellipodien und Filopodien ermöglicht die effektive Verwertung der Energie vor Ort und reduziert den Verlust durch Diffusion. Ein möglicher Sexualdimorphismus könnte sich daher auch aus subzellulären Konzentrationsunterschieden ergeben und müsste nicht auf die PFKFB3-Gesamtmenge zurückzuführen sein. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte die Untersuchung einer sexdifferenzierten Kompartimentierung einzelner Proteine weitere Informationen über den endothelialen Energiestoffwechsel liefern.

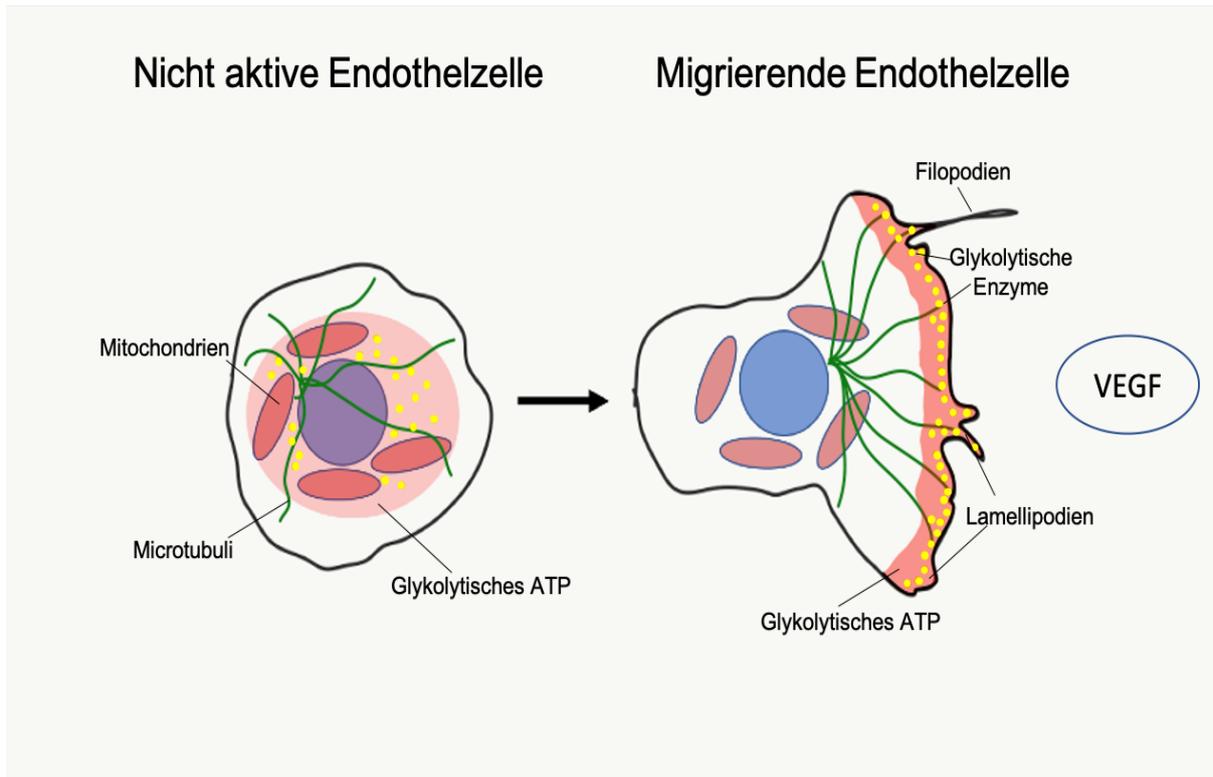


Abbildung 17: **Kompartimentierung des Energiemetabolismus in Endothelzellen.** In migrierenden Endothelzellen werden glykolytische Enzyme zugunsten einer besseren Energiegewinnung mit dem Zytoskelett verknüpft und in Filo- und Lamellipodien verlagert. Modifiziert nach „Metabolic pathway compartmentalization: an underappreciated opportunity?. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

ATP ist der wesentliche zelluläre Energieträger und wird in Endothelzellen hauptsächlich aus Glukose generiert (103). Während der Migration wird intrazelluläres ATP für die Kontraktion und Umbau des Zytoskeletts benötigt (149). Extrazellulär wirkt es als Signalmolekül über purinergische Rezeptoren (151). Sowohl intrazelluläres als auch extrazelluläres ATP führen zu einer gesteigerten Migration und Gefäßbildung in Endothelzellen (152-154).

Konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in unbehandelten HUVECs in einer anderen Studie kein signifikanter sexspezifischer Unterschied in der ATP-Konzentration festgestellt (139). Nach Serumreduktion wurde in der vorliegenden Arbeit durchgängig eine höhere ATP-Menge in weiblichen HUVECs nachgewiesen, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die ATP-Konzentration

war jedoch in den meisten HUVEC-Zwillingspaaren höher bei weiblichen Zellen. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen nahm die ATP-Konzentration nach Serumreduktion und VEGF bei männlichen Zellen signifikant ab, bei weiblichen HUVECs jedoch nicht. Eine höhere ATP-Produktion oder ein niedriger ATP-Verbrauch nach Serumentzug würde für eine bessere Energiebilanz weiblicher Zellen sprechen. Die ATP-Menge korreliert positiv mit Zellüberleben und Zellviabilität (154). In weiblichen Endothelzellen wurde eine höhere Zellviabilität im Vergleich zu männlichen bereits gezeigt (62, 115).

VEGF verdoppelt die glykolytische ATP-Produktion in migrierenden Endothelzellen (155). Eine schnellere Wundheilung nach ATP-Behandlung wurde in Mäusen beschrieben (156, 157). Sowohl Adenosin, ein Spaltprodukt von ATP, als auch extrazelluläres ATP steigern die VEGF-induzierte Migration (158, 159). In der vorliegenden Arbeit entsprach die ATP-Konzentration in weiblichen HUVECs nach VEGF-Stimulation in etwa der Konzentration unbehandelter Zellen. Bei männlichen HUVECs nahm nach VEGF die ATP-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant ab. Die geringere ATP-Konzentration nach VEGF könnte zu einer verminderten Migration männlicher Zellen in der vorliegenden Arbeit beitragen. Allerdings unterschied sich die ATP-Menge in männlichen Zellen nach VEGF und Serumreduktion nicht wesentlich. Da alle Zellen vor Behandlung mit VEGF für fünf Stunden in serumarmen Zellmedium kultiviert wurden, könnte ein vorangegangener Zelltod den geringen Effekt von VEGF auf Migration und ATP-Konzentration in männlichen Zellen erklären. Insbesondere in männlichen HUVECs wurde eine gesteigerte Apoptose und Zelltod nach Serumentzug festgestellt (160). Eine Bestimmung der Zellviabilität vor Behandlung wäre daher in weiteren Arbeiten zielführend. Weiterhin könnten Messungen zu mehreren Zeitpunkten einen Aufschluss über den zeitlichen Verlauf einer möglichen sexspezifischen

ATP-Freisetzung liefern. Müller et al. konnten nach 3 Stunden die höchste extrazelluläre ATP-Konzentration messen, während sie nach 6 Stunden bereits wieder deutlich abnahm (152). Nach Behandlung mit Calcium-Polyphosphat wurde die maximale intrazelluläre ATP-Konzentration nach 2 Stunden gemessen und nahm zu einem späteren Zeitpunkt wieder ab (161).

Ebenso wie VEGF stimuliert bFGF die Glykolyse und den endothelialen Energiemetabolismus (106). Damit übereinstimmend war in der vorliegenden Arbeit die ATP-Konzentration nach bFGF im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ein signifikanter sexspezifischer Unterschied wurde jedoch nicht beobachtet.

### **5.3 Sexspezifische VEGFR2-Proteinmenge**

Die Wirkung von VEGF auf das Endothel wird über die VEGF-Rezeptoren 1, 2 und 3 (VEGFR1, 2, 3) vermittelt (69). VEGFR3 wird hauptsächlich auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert und hat eine untergeordnete Rolle für vaskuläre Endothelzellen (69, 162). Die VEGF-Bindung an VEGFR1 bewirkt eine negative Rückkopplung und reduziert die Wirkung von VEGF über VEGFR2 (69). Sowohl Migration als auch Proliferation werden über den VEGFR2 in Endothelzellen stimuliert (163, 164). Das Verhältnis von VEGFR1 zu VEGFR2 determiniert den Übergang einer Zelle von Stalk- zur Tip-Zelle. Eine Reduktion von VEGFR2 in Endothelzellen führt jedoch nicht notwendigerweise zu einer verminderten Migration (76). Die Regulation des VEGFR2 erfolgt durch die Internalisierung und Degradierung des Rezeptors nach VEGF (69). In migrierenden Endothelzellen wurden geringe Mengen VEGFR2 gemessen, da VEGFR2 während der Migration schnell abgebaut wird (165). Damit übereinstimmend nahm in dieser Arbeit nach Behandlung der Zellen mit VEGF die VEGFR2-Proteinmenge ab. Die basale

Proteinmenge des VEGFR2 war individuell sehr unterschiedlich und ergab keine sexspezifischen Unterschiede. Auch der Gehalt vom löslichen VEGFR1 im Zellkulturüberstand ergab in einer Studie unserer Arbeitsgruppe nach VEGF-Stimulation keinen wesentlichen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Zellen (1). In der vorliegenden Arbeit konnte die VEGFR2-Proteinmenge aufgrund eingeschränkter Verfügbarkeit nur in Zellen von nicht-verwandten Spendern durchgeführt werden. Untersuchungen an Zellen von dizygoten Zwillingen könnten weitere Erkenntnisse erbringen, da hier individuelle Unterschiede reduziert werden.

#### **5.4 Sexspezifische cAMP-Konzentration**

Als universaler Second Messenger spielt cAMP eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Regulation, Genexpression, Zellmorphologie und Zellfunktion (86). Die Wirkungen von cAMP auf das Endothel sind vielfältig. Es unterstützt die endotheliale Barrierefunktion durch Senkung der Permeabilität und hemmt Entzündungsreaktionen und die Anheftung von Monozyten (86, 166, 167). Andererseits reduziert cAMP die Proliferation und Migration von Endothelzellen (151). Eine erhöhte Konzentration von cAMP wurde in mehreren Studien mit einer Einschränkung der endothelialen Migration in Zusammenhang gebracht (82, 83, 91, 168, 169). Die Phosphodiesterasen (PDE) 2, 3 und 4 sind hauptverantwortlich für die Regulierung der cAMP-Konzentration in Endothelzellen. In weiblichen Endothelzellen wurde eine höhere Konzentration und ein größerer Einfluss der PDE3 im Vergleich zu männlichen Zellen gefunden (170). Dadurch könnte sich ein vermehrter cAMP-Abbau durch PDE3 in weiblichen HUVECs positiv auf das Migrationsverhalten auswirken. Sexspezifische Unterschiede in der endothelialen cAMP-Konzentration sind nach aktueller Studienlage jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit ergab die

Bestimmung der cAMP-Konzentration kein eindeutiges Ergebnis. Während nach 3 Stunden Serumentzug eine signifikant niedrigere cAMP-Konzentration in männlichen Zellen vorlag, war nach 16 Stunden Behandlung kein signifikanter sexspezifischer Unterschied festzustellen. Zudem konnte die niedrigere cAMP-Konzentration in männlichen Endothelzellen nach Serumreduktion nicht mit einer besseren Migration in Zusammenhang gebracht werden. Die sexspezifischen Unterschiede in der cAMP-Konzentration nach Serumreduktion können ebenfalls nicht die bessere Migration der weiblichen HUVECs nach VEGF erklären. Der Grund dafür könnte in den komplexen und vielfältigen Aufgaben von cAMP liegen. Neben der anti-migratorischen Wirkung fördert cAMP über PKA auch die eNOS-Aktivität (171-173). Eine erhöhte eNOS-Aktivität ist in weiblichen HUVECs mit einer besseren Migration assoziiert (55). Daneben ist in HUVECs auch eine durch den cAMP/PKA-Signalweg vermittelte pro-migratorische Wirkung durch VEGF beschrieben worden (70, 172).

Nach aktueller Studienlage ist somit sowohl eine pro- wie auch eine anti-migratorische Wirkung von cAMP beschrieben. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die intrazelluläre Gesamtkonzentration von cAMP allein nicht entscheidend, sondern die subzelluläre Lokalisation von Bedeutung ist. Das cAMP-Signaling liegt in verschiedenen Kompartimenten vor (174, 175). Es konnte gezeigt werden, dass sich die cAMP-Wirkung je nach Lokalisation unterscheidet (176-179). Während cAMP in membrangebundenen Komplexen die endotheliale Barriere stabilisiert, wird durch zytosolisches cAMP die endotheliale Barriere gestört bzw. die zelluläre Permeabilität erhöht (180, 181). Die Bestimmung der cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von seiner Lokalisation (membrangebunden/zytosolisch) während der Migration könnte somit neue Hinweise über eine allgemeine und sexspezifische Wirkung liefern.

## 5.5 Ausblick

Bislang werden *in vitro* Studien überwiegend mit Zellen unbekanntes Geschlechts durchgeführt. Zunehmende Studien belegen klar, dass es sexspezifische Unterschiede auf zellulärer Ebene gibt. Bisher unbeachtete sexspezifische Unterschiede auf Zellebene könnten zu widersprüchlichen Ergebnissen in späteren *in vivo* Studien führen. Die Berücksichtigung des biologischen Geschlechts bereits auf zellulärer Ebene würde die Aussagekraft und Vergleichbarkeit dieser Studien verbessern.

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf sexspezifische Unterschiede im Migrationsverhalten und im Energiemetabolismus von humanen Endothelzellen. Eine bessere Energiebilanz sowie eine größere Glykolyse-Aktivität könnten in Zusammenhang mit einer besseren Migration weiblicher HUVECs stehen. Die genauen Mechanismen bleiben bisher unvollständig geklärt. In nachfolgenden Studien wäre eine detaillierte Untersuchung des Energiemetabolismus, insbesondere der Glykolyse, im Zusammenhang mit der Migration interessant. Ein Sexualdimorphismus könnte sich noch deutlicher unter Stresszuständen wie zum Beispiel bei Hypoxie oder Scherstress zeigen.

Aktuelle Erkenntnisse von Zecchin et al. heben weiterhin die Bedeutung der subzellulären Lokalisation von Metaboliten und Enzymen auf die Zellfunktion hervor. Unterschiede in der Lokalisation werden durch eine quantitative Messung wie in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erfasst. Eine sexspezifische Betrachtung der subzellulären Konzentration beispielsweise von ATP und glykolytischen Enzymen könnte Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Energiemetabolismus und Migration geben. In einem weiteren Schritt sollten die Erkenntnisse auch auf *in vivo* Modelle übertragen und überprüft werden.

## 5.5 Limitationen dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das sexspezifische Migrationsverhalten sowie den Energiemetabolismus in HUVECs untersucht. Wegen der individuellen Schwankungen ist die Fallzahl mit maximal n=15 pro Geschlecht eher gering. Somit spielten neben dem biologischen Geschlecht auch individuelle zelluläre Unterschiede eine größere Rolle

Die Migration erfolgt *in vivo* dreidimensional und in Wechselwirkung mit anderen Zellen, extrazellulären Matrix und einer Vielzahl weiterer Einflussfaktoren (31). Des Weiteren gibt es beim Metabolismus große Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* Modellen für verschiedene Zelltypen (103, 182). Inwieweit sich die Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragbar sind, ist daher nur schwer einzuschätzen. Es wurden HUVECs verwendet, um hormonelle Einflüsse zu reduzieren. Endothelzellen sind jedoch je nach Lokalisation sehr heterogen (183-185), so dass sexspezifische Unterschiede in einem Zelltyp nicht automatisch auch für andere Endothelzellen gelten müssen. Durch die Verwendung von dizygoten Zwillingenzellen in einem Teil der Untersuchungen konnten Umwelteinflüsse auf sexspezifische Unterschiede eines HUVEC-Zwillingspaares vermindert werden. Die Verfügbarkeit und Verwendung von Zellen dizygoter Zwillinge waren durch das seltenere Vorkommen von Mehrlingsschwangerschaften begrenzt. Damit konnten in der vorliegenden Arbeit diese Zellen nicht für alle Untersuchungen verwendet werden. Durch unterschiedliche Mütter tritt beim sexspezifischen Vergleich von Zellen von nicht-verwandten Spendern eine breitere genetische Variabilität auf.

## Literaturverzeichnis

1. Lorenz M, Blaschke B, Benn A, Hammer E, Witt E, Kirwan J, Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bartsch C, Vietzke A, Kramer F, Kappert K, Brunner P, Nguyen HG, Dreger H, Stangl K, Knaus P, Stangl V. Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs. *Atherosclerosis*. 2019;291:99-106.
2. World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva; 2018.
3. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F, Alvis-Guzman N, Amrock S, Ansari H, Arnlov J, Asayesh H, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Banerjee A, Barac A, Barnighausen T, Barregard L, Bedi N, Belay Ketema E, Bennett D, Berhe G, Bhutta Z, Bitew S, Carapetis J, Carrero JJ, Malta DC, Castaneda-Orjuela CA, Castillo-Rivas J, Catala-Lopez F, Choi JY, Christensen H, Cirillo M, Cooper L, Jr., Criqui M, Cundiff D, Damasceno A, Dandona L, Dandona R, Davletov K, Dharmaratne S, Dorairaj P, Dubey M, Ehrenkranz R, El Sayed Zaki M, Faraon EJA, Esteghamati A, Farid T, Farvid M, Feigin V, Ding EL, Fowkes G, Gebrehiwot T, Gillum R, Gold A, Gona P, Gupta R, Habtewold TD, Hafezi-Nejad N, Hailu T, Hailu GB, Hankey G, Hassen HY, Abate KH, Havmoeller R, Hay SI, Horino M, Hotez PJ, Jacobsen K, James S, Javanbakht M, Jeemon P, John D, Jonas J, Kalkonde Y, Karimkhani C, Kasaeian A, Khader Y, Khan A, Khang YH, Khera S, Khoja AT, Khubchandani J, Kim D, Kolte D, Kosen S, Krohn KJ, Kumar GA, Kwan GF, Lal DK, Larsson A, Linn S, Lopez A, Lotufo PA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Mazidi M, Meier T, Meles KG, Mensah G, Meretoja A, Mezgebe H, Miller T, Mirrakhimov E, Mohammed S, Moran AE, Musa KI, Narula J, Neal B, Ngalesoni F, Nguyen G, Obermeyer CM, Owolabi M, Patton G, Pedro J, Qato D, Qorbani M, Rahimi K, Rai RK, Rawaf S, Ribeiro A, Safiri S, Salomon JA, Santos I, Santric Milicevic M, Sartorius B, Schutte A, Sepanlou S, Shaikh MA, Shin MJ, Shishehbor M, Shore H, Silva DAS, Sobngwi E, Stranges S, Swaminathan S, Tabares-Seisdedos R, Tadele Atnafu N, Tesfay F, Thakur JS, Thrift A, Topor-Madry R, Truelsen T, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Vlassov V, Vollset SE, Wakayo T, Watkins D, Weintraub R, Werdecker A, Westerman R, Wiysonge CS, Wolfe C, Workicho A, Xu G, Yano Y, Yip P, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Vos T, Naghavi M, Murray C. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1-25.
4. Barquera S, Pedroza-Tobias A, Medina C, Hernandez-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res*. 2015;46(5):328-38.
5. Sharma S, Wood MJ. The Global Burden of Cardiovascular Disease in Women. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2018;20(10):81.
6. Mendis S, Chestnov O. The global burden of cardiovascular diseases: a challenge to improve. *Curr Cardiol Rep*. 2014;16(5):486.

7. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgozoglu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
8. Group EUCCS, Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Prescott E, Franconi F, Gerds E, Foryst-Ludwig A, Maas AH, Kautzky-Willer A, Knappe-Wegner D, Kintscher U, Ladwig KH, Schenck-Gustafsson K, Stangl V. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J*. 2016;37(1):24-34.
9. Leening MJ, Ferket BS, Steyerberg EW, Kavousi M, Deckers JW, Nieboer D, Heeringa J, Portegies ML, Hofman A, Ikram MA, Hunink MG, Franco OH, Stricker BH, Witteman JC, Roos-Hesselink JW. Sex differences in lifetime risk and first manifestation of cardiovascular disease: prospective population based cohort study. *BMJ*. 2014;349:g5992.
10. Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation*. 2011;124(19):2145-54.
11. Mathur P, Ostadal B, Romeo F, Mehta JL. Gender-Related Differences in Atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2015;29(4):319-27.
12. Statistisches Bundesamt. Todesursachen nach Krankheitsarten 2017: Statistisches Bundesamt; 2019 [06.05.2020]. Abgerufen von: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html).
13. Appelman Y, van Rijn BB, Ten Haaf ME, Boersma E, Peters SA. Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):211-8.
14. Murphy MO, Loria AS. Sex-specific effects of stress on metabolic and cardiovascular disease: are women at higher risk? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;313(1):R1-R9.
15. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2929.
16. Bundeszentrale für politische Bildung. Bevölkerung nach Altersgruppen und Geschlecht 2020 [25.10.2020]. Abgerufen von: <https://www.bpb.de/nachschlagen/zahlen-und-fakten/soziale-situation-in-deutschland/61538/altersgruppen>.
17. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. Brussels: European Heart Network; 2017.

18. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS, American Heart Association Council on E, Prevention Statistics C, Stroke Statistics S. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):e56-e528.
19. Cifkova R, Skodova Z, Bruthans J, Holub J, Adamkova V, Jozifova M, Galovcova M, Wohlfahrt P, Krajcoviechova A, Petrzilkova Z, Lanska V. Longitudinal trends in cardiovascular mortality and blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2007/2008. *J Hypertens*. 2010;28(11):2196-203.
20. Ladwig KH, Waller C. Geschlechtsspezifische Aspekte bei der koronaren Herzkrankheit. *Bundesgesundheitsblatt* 2014. 2014;57:1083-91.
21. Ladwig KH, Scheuermann W. Gender differences in the decline of mortality rates of acute myocardial infarction in West Germany. *Eur Heart J*. 1997;18(4):582-7.
22. Statistisches Bundesamt. Sterbetafel 2015/2017 - Methoden- und Ergebnisbericht zur laufenden Berechnung von Periodensterbetafeln für Deutschland und die Bundesländer. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt; 2018.
23. Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Lancet*. 2011;378(9799):1297-305.
24. Yanes LL, Reckelhoff JF. Postmenopausal hypertension. *Am J Hypertens*. 2011;24(7):740-9.
25. Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*. 2016;102(11):825-31.
26. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2018. Hyattsville, MD; 2019.
27. Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, Edelstein SL. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *Jama*. 1991;265(5):627-31.
28. Cifkova R, Krajcoviechova A. Dyslipidemia and cardiovascular disease in women. *Curr Cardiol Rep*. 2015;17(7):609.
29. Izumi Y, Matsumoto K, Ozawa Y, Kasamaki Y, Shinndo A, Ohta M, Jumabay M, Nakayama T, Yokoyama E, Shimabukuro H, Kawamura H, Cheng Z, Ma Y, Mahmut M. Effect of age at menopause on blood pressure in postmenopausal women. *Am J Hypertens*. 2007;20(10):1045-50.

30. Barton M, Meyer MR. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. *Hypertension*. 2009;54(1):11-8.
31. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(21):4131-48.
32. Vitorino P, Hammer M, Kim J, Meyer T. A steering model of endothelial sheet migration recapitulates monolayer integrity and directed collective migration. *Mol Cell Biol*. 2011;31(2):342-50.
33. Santos RL, Abreu GR, Bissoli NS, Moyses MR. Endothelial mediators of 17 beta-estradiol-induced coronary vasodilation in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(4):569-75.
34. da Silva LH, Panazzolo DG, Marques MF, Souza MG, Paredes BD, Nogueira Neto JF, Leao LM, Morandi V, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. Low-dose estradiol and endothelial and inflammatory biomarkers in menopausal overweight/obese women. *Climacteric*. 2016;19(4):337-43.
35. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. 1999;33(1 Pt 2):323-8.
36. Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet*. 1995;346(8967):89-90.
37. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, Writing Group for the Women's Health Initiative I. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288(3):321-33.
38. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama*. 1998;280(7):605-13.
39. Sare GM, Gray LJ, Bath PM. Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2008;29(16):2031-41.
40. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):347-69.
41. Gaubitz M. Epidemiology of connective tissue disorders. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45 Suppl 3:iii3-4.
42. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, Gabriel SE. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(2):402-11.

43. Warrington KJ, Kent PD, Frye RL, Lymp JF, Kopecky SL, Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R984-91.
44. Hermansen ML, Lindhardsen J, Torp-Pedersen C, Faurschou M, Jacobsen S. The risk of cardiovascular morbidity and cardiovascular mortality in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a Danish nationwide population-based cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(5):709-15.
45. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA.* 2007;297(13):1465-77.
46. Taylor KE, Vallejo-Giraldo C, Schaible NS, Zakeri R, Miller VM. Reporting of sex as a variable in cardiovascular studies using cultured cells. *Biol Sex Differ.* 2011;2:11.
47. Penalzoza CG, Estevez B, Han DM, Norouzi M, Lockshin RA, Zakeri Z. Sex-dependent regulation of cytochrome P450 family members Cyp1a1, Cyp2e1, and Cyp7b1 by methylation of DNA. *FASEB J.* 2014;28(2):966-77.
48. Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 2010;106(11):1681-91.
49. Pircher A, Treps L, Bodrug N, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism: A novel player in atherosclerosis? Basic principles and therapeutic opportunities. *Atherosclerosis.* 2016;253:247-57.
50. Giedt RJ, Yang C, Zweier JL, Matzavinos A, Alevriadou BR. Mitochondrial fission in endothelial cells after simulated ischemia/reperfusion: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(2):348-56.
51. Straface E, Vona R, Campesi I, Franconi F. Mitochondria can orchestrate sex differences in cell fate of vascular smooth muscle cells from rats. *Biol Sex Differ.* 2015;6:34.
52. Du L, Bayir H, Lai Y, Zhang X, Kochanek PM, Watkins SC, Graham SH, Clark RS. Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38563-70.
53. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
54. Theodorou K, Boon RA. Endothelial Cell Metabolism in Atherosclerosis. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:82.
55. Cattaneo MG, Vanetti C, Decimo I, Di Chio M, Martano G, Garrone G, Bifari F, Vicentini LM. Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):9612.

56. Clifton VL, Bisits A, Zarzycki PK. Characterization of human fetal cord blood steroid profiles in relation to fetal sex and mode of delivery using temperature-dependent inclusion chromatography and principal component analysis (PCA). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;855(2):249-54.
57. Huxley VH, Kemp SS, Schramm C, Sieveking S, Bingaman S, Yu Y, Zaniletti I, Stockard K, Wang J. Sex differences influencing micro- and macrovascular endothelial phenotype in vitro. *J Physiol.* 2018;596(17):3929-49.
58. Addis R, Campesi I, Fois M, Capobianco G, Dessole S, Fenu G, Montella A, Cattaneo MG, Vicentini LM, Franconi F. Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: characterisation of the phenotype of male and female cells. *Biol Sex Differ.* 2014;5(1):18.
59. Batres RO, Dupont J. Gender differences in prostacyclin and prostaglandin E2 synthesis by human endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Med.* 1986;22(2):159-71.
60. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2009;196(2):193-222.
61. Hartman RJG, Kapteijn DMC, Haitjema S, Bekker MN, Mokry M, Pasterkamp G, Civelek M, den Ruijter HM. Intrinsic transcriptomic sex differences in human endothelial cells at birth and in adults are associated with coronary artery disease targets. *Sci Rep.* 2020;10(1):12367.
62. Lorenz M, Koschate J, Kaufmann K, et al. Does cellular sex matter? Dimorphic transcriptional differences between female and male endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2015;1(61-72).
63. Zhang Y, Lingappan K. Differential sex-specific effects of oxygen toxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(2):431-7.
64. Gupta NC, Davis CM, Nelson JW, Young JM, Alkayed NJ. Soluble epoxide hydrolase: sex differences and role in endothelial cell survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1936-42.
65. Xie Q, Sun Z, Chen M, Zhong Q, Yang T, Yi J. IL-8 up-regulates proliferative angiogenesis in ischemic myocardium in rabbits through phosphorylation of Akt/GSK-3beta(ser9) dependent pathways. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(8):12498-508.
66. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
67. Teuwen LA, Draoui N, Dubois C, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism: an update anno 2017. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(3):240-7.
68. Potente M, Carmeliet P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:43-66.
69. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012;2(7):a006502.

70. Lu Q, Tong B, Luo Y, Sha L, Chou G, Wang Z, Xia Y, Dai Y. Norisoboldine suppresses VEGF-induced endothelial cell migration via the cAMP-PKA-NF-kappaB/Notch1 pathway. *PLoS One*. 2013;8(12):e81220.
71. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci*. 2006;11:818-29.
72. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(29):26969-79.
73. Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood*. 2002;99(7):2397-407.
74. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Miha C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Miha CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.
75. De Bock K, Georgiadou M, Schoors S, Kuchnio A, Wong BW, Cantelmo AR, Quaegebeur A, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Eelen G, Phng LK, Betz I, Tembuysen B, Brepoels K, Welte J, Geudens I, Segura I, Cruys B, Bifari F, Decimo I, Blanco R, Wyns S, Vangindertael J, Rocha S, Collins RT, Munck S, Daelemans D, Imamura H, Devlieger R, Rider M, Van Veldhoven PP, Schuit F, Bartrons R, Hofkens J, Fraisl P, Telang S, Deberardinis RJ, Schoonjans L, Vinckier S, Chesney J, Gerhardt H, Dewerchin M, Carmeliet P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154(3):651-63.
76. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S, Gerhardt H. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*. 2010;12(10):943-53.
77. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. 2008;4(4):241-6.
78. Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. 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(9):3219-24.
79. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a006569.
80. Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 6):1233-6.

81. Nedvetsky PI, Zhao X, Mathivet T, Aspalter IM, Stanchi F, Metzger RJ, Mostov KE, Gerhardt H. cAMP-dependent protein kinase A (PKA) regulates angiogenesis by modulating tip cell behavior in a Notch-independent manner. *Development*. 2016;143(19):3582-90.
82. Favot L, Keravis T, Holl V, Le Bec A, Lugnier C. VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost*. 2003;90(2):334-43.
83. Abusnina A, Keravis T, Zhou Q, Justiniano H, Lobstein A, Lugnier C. Tumour growth inhibition and anti-angiogenic effects using curcumin correspond to combined PDE2 and PDE4 inhibition. *Thromb Haemost*. 2015;113(2):319-28.
84. Favot L, Keravis T, Lugnier C. Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost*. 2004;92(3):634-45.
85. Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol*. 2012;165(5):1288-305.
86. Metrich M, Berthouze M, Morel E, Crozatier B, Gomez AM, Lezoualc'h F. Role of the cAMP-binding protein Epac in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pflugers Arch*. 2010;459(4):535-46.
87. Wamhoff BR, Bowles DK, Owens GK. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res*. 2006;98(7):868-78.
88. Roberts OL, Dart C. cAMP signalling in the vasculature: the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP). *Biochem Soc Trans*. 2014;42(1):89-97.
89. Yamamizu K, Yamashita JK. Roles of cyclic adenosine monophosphate signaling in endothelial cell differentiation and arterial-venous specification during vascular development. *Circ J*. 2011;75(2):253-60.
90. Surapisitchat J, Beavo JA. Regulation of endothelial barrier function by cyclic nucleotides: the role of phosphodiesterases. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(204):193-210.
91. Kim HJ, Cho YR, Kim SH, Seo DW. TIMP-2-derived 18-mer peptide inhibits endothelial cell proliferation and migration through cAMP/PKA-dependent mechanism. *Cancer Lett*. 2014;343(2):210-6.
92. Bitar MS, Al-Mulla F. Upregulation of CREM/ICER suppresses wound endothelial CRE-HIF-1 $\alpha$ -VEGF-dependent signaling and impairs angiogenesis in type 2 diabetes. *Dis Model Mech*. 2015;8(1):65-80.
93. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2005;25(1):136-46.

94. Cullere X, Shaw SK, Andersson L, Hirahashi J, Luscinikas FW, Mayadas TN. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood*. 2005;105(5):1950-5.
95. Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett*. 2005;579(22):4966-72.
96. Spindler V, Peter D, Harms GS, Asan E, Waschke J. Ultrastructural analysis reveals cAMP-dependent enhancement of microvascular endothelial barrier functions via Rac1-mediated reorganization of intercellular junctions. *Am J Pathol*. 2011;178(5):2424-36.
97. Oladipupo SS, Smith C, Santeford A, Park C, Sene A, Wiley LA, Osei-Owusu P, Hsu J, Zapata N, Liu F, Nakamura R, Lavine KJ, Blumer KJ, Choi K, Apte RS, Ornitz DM. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(37):13379-84.
98. Yang X, Liaw L, Prudovsky I, Brooks PC, Vary C, Oxburgh L, Friesel R. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Current atherosclerosis reports*. 2015;17(6):509.
99. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-7.
100. van Horsen R, Janssen E, Peters W, van de Pasch L, Lindert MM, van Dommelen MM, Linssen PC, Hagen TL, Franssen JA, Wieringa B. Modulation of cell motility by spatial repositioning of enzymatic ATP/ADP exchange capacity. *J Biol Chem*. 2009;284(3):1620-7.
101. Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*. 2008;88(2):489-513.
102. Culic O, Gruwel ML, Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1997;273(1 Pt 1):C205-13.
103. Eelen G, de Zeeuw P, Treps L, Harjes U, Wong BW, Carmeliet P. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev*. 2018;98(1):3-58.
104. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab*. 2013;18(5):634-47.
105. Telang S, Yalcin A, Clem AL, Bucala R, Lane AN, Eaton JW, Chesney J. Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*. 2006;25(55):7225-34.
106. Yu P, Wilhelm K, Dubrac A, Tung JK, Alves TC, Fang JS, Xie Y, Zhu J, Chen Z, De Smet F, Zhang J, Jin SW, Sun L, Sun H, Kibbey RG, Hirschi KK, Hay N, Carmeliet P, Chittenden TW, Eichmann A, Potente M, Simons M. FGF-dependent metabolic control of vascular development. *Nature*. 2017;545(7653):224-8.

107. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(9):505-13.
108. Coutelle O, Hornig-Do HT, Witt A, Andree M, Schiffmann LM, Piekarek M, Brinkmann K, Seeger JM, Liwschitz M, Miwa S, Hallek M, Kronke M, Trifunovic A, Eming SA, Wiesner RJ, Hacker UT, Kashkar H. Embelin inhibits endothelial mitochondrial respiration and impairs neoangiogenesis during tumor growth and wound healing. *EMBO Mol Med.* 2014;6(5):624-39.
109. Wright GL, Maroulakou IG, Eldridge J, Liby TL, Sridharan V, Tsiichlis PN, Muise-Helmericks RC. VEGF stimulation of mitochondrial biogenesis: requirement of AKT3 kinase. *FASEB J.* 2008;22(9):3264-75.
110. Vandekeere S, Dewerchin M, Carmeliet P. Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirculation.* 2015;22(7):509-17.
111. Agilent Technologies. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide. 2019.
112. Zecchin A, Stapor PC, Goveia J, Carmeliet P. Metabolic pathway compartmentalization: an underappreciated opportunity? *Curr Opin Biotechnol.* 2015;34:73-81.
113. Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, DeSouza CA. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol.* 2007;99(1):46-8.
114. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? *Int J Cardiol.* 2009;136(2):200-10.
115. Zhang Y, Dong X, Shirazi J, Gleghorn JP, Lingappan K. Pulmonary endothelial cells exhibit sexual dimorphism in their response to hyperoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315:1287-92.
116. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res.* 2010;31(1):158-75.
117. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163-77.
118. Panta S, Yamakuchi M, Shimizu T, Takenouchi K, Oyama Y, Koriyama T, Kojo T, Hashiguchi T. Low grade inflammation inhibits VEGF induced HUVECs migration in p53 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483(2):803-9.
119. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, Shaul PW, Melito L, Frantz DE, Kilgore JA, Williams NS, Terada LS, Nwariaku FE. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;301(3):C695-704.

120. Rono B, Engelholm LH, Lund LR, Hald A. Gender affects skin wound healing in plasminogen deficient mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e59942.
121. Rudnicki M, Abdifarkosh G, Rezvan O, Nwadozi E, Roudier E, Haas TL. Female Mice Have Higher Angiogenesis in Perigonadal Adipose Tissue Than Males in Response to High-Fat Diet. *Front Physiol*. 2018;9:1452.
122. Kawashima S. Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: endothelial nitric oxide (NO) synthase/NO system in atherosclerosis. *J Pharmacol Sci*. 2004;96(4):411-9.
123. Jia L, Zhou X, Huang X, Xu X, Jia Y, Wu Y, Yao J, Wu Y, Wang K. Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration. *FASEB J*. 2018;32(8):4534-43.
124. Zou Y, Wu F, Liu Q, Deng X, Hai R, He X, Zhou X. Downregulation of miRNA328 promotes the angiogenesis of HUVECs by regulating the PIM1 and AKT/mTOR signaling pathway under high glucose and low serum condition. *Mol Med Rep*. 2020;22(2):895-905.
125. Jin S, Yang C, Huang J, Liu L, Zhang Y, Li S, Zhang L, Sun Q, Yang P. Conditioned medium derived from FGF-2-modified GMSCs enhances migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):68.
126. Asano T, Kaneko E, Shinozaki S, Imai Y, Shibayama M, Chiba T, Ai M, Kawakami A, Asaoka H, Nakayama T, Mano Y, Shimokado K. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. *Circ J*. 2007;71(3):405-11.
127. Arunkumar P, Dougherty JA, Weist J, Kumar N, Angelos MG, Powell HM, Khan M. Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Encapsulated Polycaprolactone (PCL) Microspheres Promote Angiogenesis In Vivo. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(7):1037 (1-16).
128. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen PY, Zhuang ZW, Black BL, Simons M. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2668-78.
129. Matsumoto S, Tanaka R, Okada K, Arita K, Hyakusoku H, Miyamoto M, Tabata Y, Mizuno H. The Effect of Control-released Basic Fibroblast Growth Factor in Wound Healing: Histological Analyses and Clinical Application. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2013;1(6):e44.
130. Yamamoto N, Oyaizu T, Enomoto M, Horie M, Yuasa M, Okawa A, Yagishita K. VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration. *Sci Rep*. 2020;10(1):2744.
131. Zhu ZX, Cai WH, Wang T, Ye HB, Zhu YT, Chi LS, Duan YM, Sun CC, Xuan YH, Jin LT. bFGF-Regulating MAPKs Are Involved in High Glucose-Mediated ROS Production and Delay of Vascular Endothelial Cell Migration. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144495.

132. Barth E, Stammler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24(7):669-81.
133. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell.* 2009;16(2):167-79.
134. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2008;266(1):37-52.
135. Caja S, Enriquez JA. Mitochondria in endothelial cells: Sensors and integrators of environmental cues. *Redox Biol.* 2017;12:821-7.
136. Wellen KE, Thompson CB. Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol Cell.* 2010;40(2):323-32.
137. Khalifa AR, Abdel-Rahman EA, Mahmoud AM, Ali MH, Noureldin M, Saber SH, Mohsen M, Ali SS. Sex-specific differences in mitochondria biogenesis, morphology, respiratory function, and ROS homeostasis in young mouse heart and brain. *Physiol Rep.* 2017;5(6):e13125 (1-19).
138. Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(5):546-52.
139. Vanetti C, Bifari F, Vicentini LM, Cattaneo MG. Fatty acids rather than hormones restore in vitro angiogenesis in human male and female endothelial cells cultured in charcoal-stripped serum. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189528.
140. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(7):905-14.
141. Banerjee K, Keasey MP, Razskazovskiy V, Visavadiya NP, Jia C, Hagg T. Reduced FAK-STAT3 signaling contributes to ER stress-induced mitochondrial dysfunction and death in endothelial cells. *Cell Signal.* 2017;36:154-62.
142. He X, Zeng H, Chen ST, Roman RJ, Aschner JL, Didion S, Chen JX. Endothelial specific SIRT3 deletion impairs glycolysis and angiogenesis and causes diastolic dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;112:104-13.
143. Longchamp A, Mirabella T, Arduini A, MacArthur MR, Das A, Trevino-Villarreal JH, Hine C, Ben-Sahra I, Knudsen NH, Brace LE, Reynolds J, Mejia P, Tao M, Sharma G, Wang R, Corpataux JM, Haefliger JA, Ahn KH, Lee CH, Manning BD, Sinclair DA, Chen CS, Ozaki CK, Mitchell JR. Amino Acid Restriction Triggers Angiogenesis via GCN2/ATF4 Regulation of VEGF and H<sub>2</sub>S Production. *Cell.* 2018;173(1):117-29 e14.
144. Gaude E, Schmidt C, Gammage PA, Dugourd A, Blacker T, Chew SP, Saez-Rodriguez J, O'Neill JS, Szabadkai G, Minczuk M, Frezza C. NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction. *Mol Cell.* 2018;69(4):581-93 e7.

145. Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q, Li H, Zhang C, Caldwell RB, Fulton DJ, Su Y, Hoda MN, Zhou G, Wu C, Huo Y. Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(6):1231-9.
146. Doddaballapur A, Michalik KM, Manavski Y, Lucas T, Houtkooper RH, You X, Chen W, Zeiher AM, Potente M, Dimmeler S, Boon RA. Lamina shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):137-45.
147. Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquiere B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J, Bifari F, Wang X, Blanco R, Tembuysen B, Cornelissen I, Bouche A, Vinckier S, Diaz-Moralli S, Gerhardt H, Telang S, Cascante M, Chesney J, Dewerchin M, Carmeliet P. Partial and transient reduction of glycolysis by PFKFB3 blockade reduces pathological angiogenesis. *Cell Metab.* 2014;19(1):37-48.
148. Boscaro C, Trenti A, Baggio C, Scapin C, Trevisi L, Cignarella A, Bolego C. Sex Differences in the Pro-Angiogenic Response of Human Endothelial Cells: Focus on PFKFB3 and FAK Activation. *Front Pharmacol.* 2020;11:587221.
149. Gomez-Escudero J, Clemente C, Garcia-Weber D, Acin-Perez R, Millan J, Enriquez JA, Bentley K, Carmeliet P, Arroyo AG. PKM2 regulates endothelial cell junction dynamics and angiogenesis via ATP production. *Scientific reports.* 2019;9(1):15022.
150. Shiraishi T, Verdone JE, Huang J, Kahlert UD, Hernandez JR, Torga G, Zarif JC, Epstein T, Gatenby R, McCartney A, Elisseeff JH, Mooney SM, An SS, Pienta KJ. Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(1):130-43.
151. Avanzato D, Genova T, Fiorio Pla A, Bernardini M, Bianco S, Bussolati B, Mancardi D, Giraud E, Maione F, Cassoni P, Castellano I, Munaron L. Activation of P2X7 and P2Y11 purinergic receptors inhibits migration and normalizes tumor-derived endothelial cells via cAMP signaling. *Sci Rep.* 2016;6:32602.
152. Muller WEG, Ackermann M, Wang S, Neufurth M, Munoz-Espi R, Feng Q, Schroder HC, Wang X. Inorganic polyphosphate induces accelerated tube formation of HUVEC endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(1):21-32.
153. Jiang LH, Mousawi F, Yang X, Roger S. ATP-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(20):3697-710.
154. Wang X, Ackermann M, Neufurth M, Wang S, Li Q, Feng Q, Schroder HC, Muller WEG. Restoration of Impaired Metabolic Energy Balance (ATP Pool) and Tube Formation Potential of Endothelial Cells under "high glucose", Diabetic Conditions by the Bioinorganic Polymer Polyphosphate. *Polymers (Basel).* 2017;9(11):575 (1-14).
155. Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ Res.* 2015;116(7):1231-44.

156. Sarojini H, Billeter AT, Eichenberger S, Druen D, Barnett R, Gardner SA, Galbraith NJ, Polk HC, Jr., Chien S. Rapid tissue regeneration induced by intracellular ATP delivery-A preliminary mechanistic study. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174899.
157. Chiang B, Essick E, Ehringer W, Murphree S, Hauck MA, Li M, Chien S. Enhancing skin wound healing by direct delivery of intracellular adenosine triphosphate. *Am J Surg*. 2007;193(2):213-8.
158. Xu Y, Wang Y, Yan S, Zhou Y, Yang Q, Pan Y, Zeng X, An X, Liu Z, Wang L, Xu J, Cao Y, Fulton DJ, Weintraub NL, Bagi Z, Hoda MN, Wang X, Li Q, Hong M, Jiang X, Boison D, Weber C, Wu C, Huo Y. Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in endothelial cells to promote angiogenesis. *EMBO Mol Med*. 2017;9(9):1263-78.
159. Gerasimovskaya EV, Woodward HN, Tucker DA, Stenmark KR. Extracellular ATP is a pro-angiogenic factor for pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis*. 2008;11(2):169-82.
160. Cattaneo MG, Banfi C, Brioschi M, Lattuada D, Vicentini LM. Sex-dependent differences in the secretome of human endothelial cells. *Biol Sex Differ*. 2021;12(1):7.
161. Muller WEG, Wang S, Wiens M, Neufurth M, Ackermann M, Relkovic D, Kokkinopoulou M, Feng Q, Schroder HC, Wang X. Uptake of polyphosphate microparticles in vitro (SaOS-2 and HUVEC cells) followed by an increase of the intracellular ATP pool size. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188977.
162. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3566-70.
163. Farrokh S, Brillen AL, Haendeler J, Altschmied J, Schaal H. Critical regulators of endothelial cell functions: for a change being alternative. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(14):1212-29.
164. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004;23(2):434-45.
165. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC, Itoh N, Hirose T, Breier G, Vestweber D, Cooper JA, Ohno S, Kaibuchi K, Adams RH. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat Cell Biol*. 2013;15(3):249-60.
166. Smith MC, Hudson CA, Kimura TE, White SJ, Sala-Newby GB, Newby AC, Bond M. Divergent Regulation of Actin Dynamics and Megakaryoblastic Leukemia-1 and -2 (Mkl1/2) by cAMP in Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):3681.

167. Lorenowicz MJ, van Gils J, de Boer M, Hordijk PL, Fernandez-Borja M. Epac1-Rap1 signaling regulates monocyte adhesion and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1542-52.
168. O'Leary AP, Fox JM, Pullar CE. Beta-Adrenoceptor Activation Reduces Both Dermal Microvascular Endothelial Cell Migration via a cAMP-Dependent Mechanism and Wound Angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2015;230(2):356-65.
169. Netherton SJ, Maurice DH. Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol.* 2005;67(1):263-72.
170. Wang J, Bingaman S, Huxley VH. Intrinsic sex-specific differences in microvascular endothelial cell phosphodiesterases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(4):H1146-54.
171. Garcia-Morales V, Luaces-Regueira M, Campos-Toimil M. The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* 2017;145:94-101.
172. Namkoong S, Kim CK, Cho YL, Kim JH, Lee H, Ha KS, Choe J, Kim PH, Won MH, Kwon YG, Shim EB, Kim YM. Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling. *Cell Signal.* 2009;21(6):906-15.
173. Lu Y, Xiong Y, Huo Y, Han J, Yang X, Zhang R, Zhu DS, Klein-Hessling S, Li J, Zhang X, Han X, Li Y, Shen B, He Y, Shibuya M, Feng GS, Luo J. Grb-2-associated binder 1 (Gab1) regulates postnatal ischemic and VEGF-induced angiogenesis through the protein kinase A-endothelial NOS pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):2957-62.
174. Sayner SL. Emerging themes of cAMP regulation of the pulmonary endothelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;300(5):L667-78.
175. Maurice DH. Subcellular signaling in the endothelium: cyclic nucleotides take their place. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(6):656-64.
176. DiPilato LM, Cheng X, Zhang J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(47):16513-8.
177. Rich TC, Fagan KA, Tse TE, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW. A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(23):13049-54.
178. Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature.* 2005;437(7058):574-8.

179. Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol.* 2000;116(2):147-61.
180. Prasain N, Alexeyev M, Balczon R, Stevens T. Soluble adenylyl cyclase-dependent microtubule disassembly reveals a novel mechanism of endothelial cell retraction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(1):L73-83.
181. Sayner SL, Alexeyev M, Dessauer CW, Stevens T. Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier. *Circ Res.* 2006;98(5):675-81.
182. Davidson SM, Papagiannakopoulos T, Olenchock BA, Heyman JE, Keibler MA, Luengo A, Bauer MR, Jha AK, O'Brien JP, Pierce KA, Gui DY, Sullivan LB, Wasylenko TM, Subbaraj L, Chin CR, Stephanopolous G, Mott BT, Jacks T, Clish CB, Vander Heiden MG. Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Metab.* 2016;23(3):517-28.
183. Bierhansl L, Conradi LC, Treps L, Dewerschin M, Carmeliet P. Central Role of Metabolism in Endothelial Cell Function and Vascular Disease. *Physiology (Bethesda).* 2017;32(2):126-40.
184. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-73.
185. Franconi F, Rosano G, Basili S, Montella A, Campesi I. Human cells involved in atherosclerosis have a sex. *Int J Cardiol.* 2017;228:983-1001.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Benjamin Blaschke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Unterschiede im Migrationsverhalten und Metabolismus zwischen weiblichen und männlichen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung

Benjamin Blaschke hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

**Publikation:** Lorenz M, Blaschke B, Benn A, Hammer E, Witt E, Kirwan J, Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bartsch C, Vietzke A, Kramer F, Kappert K, Brunner P, Nguyen HG, Dreger H, Stangl K, Knaus P, Stangl V. Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs. *Atherosclerosis*. 2019;291:99-106.

**Beitrag im Einzelnen:** Durchführung und Auswertung Seahorse Mito Stress Test (Abbildungen 5-7 der Publikation), Durchführung der Experimente zur Bestimmung der ATP-Konzentration (Abbildung 8 der Publikation. Western Blot der VEGFR2 Expression (enthalten in Abbildung 3 A der Publikation)

---

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Lorenz M, **Blaschke B**, Benn A, Hammer E, Witt E, Kirwan J, Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bartsch C, Vietzke A, Kramer F, Kappert K, Brunner P, Nguyen HG, Dreger H, Stangl K, Knaus P, Stangl V. *Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs*. *Atherosclerosis*. 2019;291:99-106.

## **Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Verena Stangl und Herrn Dr. Mario Lorenz für die exzellente Betreuung und Unterstützung im Rahmen der gesamten Arbeit. Mein Dank gilt außerdem an Angelika Vietzke und Cornelia Bartsch für die ausführliche Einarbeitung der Laborarbeiten sowie dem Team des CCR für die gute Kooperation und Zusammenarbeit während meiner experimentellen Arbeit.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie, insbesondere meinen Eltern Beate und Christian, für die Unterstützung während des Studiums. Weiterhin möchte ich mich bei meinen Geschwistern Katja und Stefan für die wissenschaftlichen Ratschläge sowie moralische Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation bedanken. Ich danke meinen Freunden, insbesondere meinen ehemaligen Studienkollegen Abdou, Karina, Konny und Anton für die Aufmunterung und sozialen Beistand. Nicht zuletzt geht mein besonderer Dank an meine zukünftige Frau Cristina für die jahrelange Unterstützung und Motivation.