

# **Intrazelluläre Signaltransduktion bei der VEGF-induzierten Endothelzellproliferation**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nikolaos D. Iliopoulos

aus Athen

Giessen 2009

Aus dem physiologischen Institut  
des Fachbereichs Medizin  
Direktor: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz

Tag der Disputation: 10.09.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
2.1 Endothelzellen und Endothelfunktion.....	8
2.2 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	8
2.3 MAP-Kinase und Proliferation.....	10
2.4 Intrazelluläre Calcium Veränderung unter VEGF Stimulation.....	11
2.5 Die Funktion von ROS bei der Proliferation.....	11
2.6 Aufgabenstellung.....	12
<b>3. MATERIAL</b> .....	<b>13</b>
3.1 Chemikalien.....	13
3.2 Häufigverwendete Puffer und Medien.....	14
3.3 Geräte.....	16
<b>4. METHODEN</b> .....	<b>18</b>
4.1 Isolierung von humanen Nabelschnurendothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells ( HUVEC).....	18
4.2 Zellkultur.....	19
4.3 Zellproliferationsbestimmung.....	20
4.4 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration von Ca <sup>2+</sup> und Sauerstoffradikalen (Reactive oxygen species= ROS).....	20
4.5 Western Blot zum Nachweis der Aktivierung von p42 MAP- Kinase (Mitogen Activated Proteine Kinase).....	22
4.6 Antisense Transfektionsexperimente.....	28
4.7 Experimentelle Protokolle.....	28
4.8 Statistik.....	28

<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	Dosisabhängige VEGF Wirkung auf die Proliferationssteigerung.....	29
<b>5.2</b>	Die Rolle von p42 MAPK Kinase und NAD(P)H Oxidase bei der VEGF- vermittelten Endothelzellproliferation.....	31
<b>5.3</b>	VEGF-vermittelte Aktivierung der endothelialen Kinase ERK2.....	33
<b>5.4</b>	Zusammenhang zwischen VEGF und Sauerstoffradikalen (ROS).....	36
<b>5.5</b>	Rolle von ERK2 bei der VEGF vermittelten Freisetzung von ROS.....	38
<b>5.6</b>	Rolle von ROS bei der VEGF vermittelten ERK2 Aktivierung..	40
<b>5.7</b>	Wirkung von VEGF auf NAD(P)H-Oxidase und ERK2 bei Ca <sup>2+</sup> freien extrazellulären Bedingungen.....	42
<b>5.8</b>	Rolle der NAD(P)H-Oxidase bei den VEGF-vermittelten Ca <sup>2+</sup> -Veränderungen in der Endothelzelle.....	45
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>47</b>
<b>6.1</b>	Einwirkung von VEGF auf Endothelzellproliferation.....	47
<b>6.2</b>	Die Rolle von ERK2 bei der Endothelzellproliferation.....	47
<b>6.3</b>	Die NAD(P)H Oxidase bei der Endothelzellproliferation.....	48
<b>6.4</b>	Intrazelluläre Calciumveränderungen bei der Proliferation der Endothelzellen.....	49
<b>6.5</b>	Interaktion von Calciumveränderung mit MEK/ERK2.....	49
<b>6.6</b>	Interaktion von Calcium und NAD(P)H-Oxidase.....	50
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>51</b>
	Summary.....	52
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>61</b>

10. EKLÄRUNG.....	62
11. LEBENSLAUF.....	63

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (vol / vol)	Volumenprozent
% (wt / vol)	Gewichtsprozent
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Antisense
BCIP	5-Brom-4chlor-3-indolylphosphat
Bis	Bisacrylamid
BSA	Bovines Serumalbumin
DCF	Dichlorofluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyliumiodid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetat
ERK2	Extrazellulär regulierte Kinase 2 = MAPK
Fura-2-AM	Acetoxymethylester von Fura-2
Gluc	Glukose
H <sub>2</sub> DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein-diacetat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Ktr	Kontrolle
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase
MEK	Mitogene und extrazellulär regulierte Kinase
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Diphosphatnukleotid
NTB	Nitrattetrazoliumblau
NKS	Neugeborenen-Kälber-Serum
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NS	Nonesense

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	PD 98059
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ - Konzentration
PKC	Proteinkinase C
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidenflourid
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumduodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
x g	x-fache Erdbeschleunigung

## **2. EINLEITUNG**

### **2.1 Endothelzellen und Endothelzellfunktion**

Das Endothel ist eine einschichtige Zellschicht, welche die innere Auskleidung der Gefäße bildet. Es besitzt eine Masse von circa 1 kg und seine geschätzte Gesamtoberfläche beträgt etwa 6000 – 8000 m<sup>2</sup>. Das Endothel präsentiert eine bedeutende biologische Grenzfläche unseres Körpers. Aufgrund der Lage zwischen Blutstrom und solidem Gewebe erfüllt das Endothel eine Reihe von hochdifferenzierten Aufgaben. Zu diesen gehören die Regulation des vaskulären Tonus, die Regulation der Permeabilität und Thrombogenität der Gefäße.

Des Weiteren kann das Endothel inflammatorische und immunologische Prozesse modulieren. Eine entscheidende Rolle spielen Endothelzellen und deren Proliferation bei der Angiogenese. Einer der wichtigsten Stimulatoren der Endothelzellproliferation ist der Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF)

### **2.2 Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

VEGF ist ein Protein, das in 5 verschiedenen Isoformen im menschlichen Körper vorkommt. Aufgrund des Unterschiedes in der Anzahl der Aminosäuren werden die Isoformen als VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub> bezeichnet (Ferrara et al., 1991, Tischer et al. 1991, Poltorak et al. 1997). VEGF<sub>165</sub> oder VEGF-A ist die dominierende unter den Isoformen. In letzter Zeit sind neue Mitglieder der VEGF-Familie entdeckt worden, und zwar VEGF-B (Olofsson et al. 1996), VEGF-C (Joukov et al. 1996) und VEGF-D (Li et Eriksson 2001). Ihre Funktion wird noch erforscht.

Das VEGF-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert (Vincenti et al. 1996, Wei et al. 1996). Das Molekulargewicht von VEGF<sub>165</sub> als Dimer beträgt 46 kDa (Plouet et al. 1989, Ferrara et al. 1991).

VEGF wirkt hauptsächlich über parakrine Mechanismen; d.h. es wird vor allem von Nicht-Endothelzellen gebildet. Hauptsächlich wird VEGF in



Makrophagen, in glatten Gefäßmuskelzellen (Tischer et al. 1991), Myoblasten und Fibroblasten (Shweiki et al. 1992) gebildet.

Die Freisetzung von VEGF wird von einer Reihe inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert (Übersicht bei Kroll und Waltenberger, 2000). Es gibt einige Faktoren, die zu einer Inhibierung der VEGF-Expression führen, wie zum Beispiel IL-4, IL-10 und IL-13 (Parry et al. 2001), TNF- $\alpha$ , Dexamethason (Harada et al. 1994), Plättchenfaktor-4 (Gengrinovich et al. 1995),  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Soker et al. 1993) und Suramin (Nakajima et al. 1991).

Auf der anderen Seite stimulieren IL-1 $\beta$  (Li et al. 1995), Prostaglandin-E1 und E2 (Harada et al. 1994, ben-Av et al. 1995), Desferroxamin (Wang et Semenza 1993) sowie Hypoxie (Minchenko et al. 1994) die VEGF-Expression.

Die Wirkung von VEGF auf die Zielzellen wird über 2 Rezeptoren übertragen: Flt-1 (fms-like-tyrosine-kinase) (Ma et al. 2001) und KDR (kinase insert domain- containing receptor) (Joukov et al. 1996). Letzterer wurde auch in Versuchen an Mäusen als flk-1 (fetal liver kinase) bezeichnet (Dumont et al. 1995). Humane Endothelzellen tragen beide Rezeptoren (Namiki et al. 1995). Der proliferative Effekt von VEGF wird über den KDR Rezeptor, genannt auch VEGF Rezeptor 2 ausgeübt (Zeng et al. 2003).

VEGF hat am Endothel 3 Hauptwirkungen: Permeabilitätssteigerung, Migration und Proliferation. Dadurch kommt die Angiogenese zustande, d.h. die Neubildung von Gefäßen aus bereits vorhandenen.

Die entscheidende Rolle von VEGF für die embryonale Angiogenese wurde schon in mehreren Experimenten an transgenen Mäusen aufgezeigt (Dumont et al., 1995; Shalaby et al., 1995; Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Der Mechanismus der Angiogenese läuft in 4 Schritten ab (Folkman et Haudenschild 1980, Folkman et Shing 1992, Unemori et al. 1992):

1. Proteolytische Degeneration der Basalmembran
2. Migration der Endothelzellen
3. Proliferation der migrierten Endothelzellen
4. Schlauchformbildung

VEGF verursacht eine vorübergehende, reversible vaskuläre Permeabilitätserhöhung, die ungefähr 30 min anhält (Dvorak et al. 1995). Aus diesem Grund wurde VEGF in früheren Forschungsarbeiten als Vascular Permeability Faktor (VPF) bezeichnet (Sobel et al., 1977).

Der proliferierende Effekt von VEGF auf die Endothelzellen konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Ferrara et Henzel 1989, Gospodarowicz et al. 1989).

### **2.3 MAPK und Endothelzellproliferation**

Eine bedeutende Rolle in den Signalwegen der Endothelzellproliferation und Angiogenese spielt die Mitogen aktivierte Protein kinase (MAPK) (Berra et al., 2000). MAP-Kinasen gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen und werden ihrerseits durch zweifache Phosphorylierung an Tyrosin und Threonin aktiviert. Dies geschieht durch die spezifische Kinase MEK (oder MAPK-Kinase genannt), welche wiederum von der MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) aktiviert wird. Diese Signalkaskade, welche bemerkenswerterweise phylogenetisch nur geringe Modifikationen aufweist, ist bereits sehr ausführlich untersucht worden. Besondere Aufmerksamkeit wird den Isoformen p42 / p44, auch als Extrazellulär Signal-Regulierte Kinase (ERK) 2 / 1 benannt, zuteil. Sie spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Funktionen. Dazu gehören insbesondere die Kontrolle der Proteinsynthese, des Nukleotidstoffwechsels, der Zelldifferenzierung, der Angiogenese (Giuliani et al., 1999) und besonders der Zellproliferation (Suzuki et al., 2000).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass VEGF eine Aktivierung der MEK/ERK auslöst, die unabhängig von Calcium-Veränderungen ist (Faehling et al. 2002). Der proliferative Effekt von VEGF ist von der MEK/ERK Aktivierung abhängig (Woods et al. 2002).

## **2.4 Intrazelluläre Calcium Veränderungen bei der VEGF Stimulation**

Nach Bindung an seine Rezeptoren löst VEGF eine kaskadenartige Signalübertragung aus. Nach Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  und nachfolgender Hydrolyse von Phosphatidyl-inositol-4,5,-biphosphat zu Inosit-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) (McLaughlin et al. 2001) kommt es zu einer IP3- abhängigen Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Faehling et al. 2002). Im Anschluß kommt es zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium über die Plasmamembran (Garnier- Raveaud et al. 2001), vermittelt durch einen Mechanismus, der gegenwärtig Gegenstand eingehender Untersuchungen ist.

Eine Unterdrückung des intrazellulären Calcium-Anstiegs hemmt die proliferative Wirkung von VEGF (Schäfer et al. 2003, Munaron et al. 2002). Dadurch konnte es gezeigt werden, dass der intrazelluläre Calcium Anstieg unabdingbar für die Proliferation der Endothelzellen ist.

## **2.5 Die Funktion von Sauerstoffradikalen bei der Endothelzellproliferation**

Einen besonderen Stellenwert bei der Endothelzellproliferation hat die Produktion von Sauerstoffradikalen, die auch als Reactive Oxygen Species (ROS) bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal (OH) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Verschiedene intrazelluläre Quellen tragen zur Bildung dieser Sauerstoffradikale bei. Dazu gehören unter anderem Cyclooxygenasen, Cytochrom P450, endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS), Lipoxygenasen, Xanthinoxidase, die mitochondriale Atmungskette und die NAD(P)H-Oxidase.

Die endotheliale NAD(P)H-Oxidase besteht aus verschiedenen Untereinheiten, wie z.B. gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox und small G protein Rac 1 (Ushio-Fukai et al., 2004). Die Bedeutung der NAD(P)H-Oxidase für die Endothelzellproliferation wurde in früheren Arbeiten bereits beschrieben (Abid et al., 2000). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine intakte NAD(P)H-Oxidase für die Endothelzellproliferation unabdingbar ist.

Neuere Erkenntnisse belegen zudem, dass Sauerstoffradikale eine bedeutende Rolle als Signalübermittler für die durch Wachstumsfaktoren, wie VEGF induzierte Endothelzellproliferation spielen (Colavitti et al., 2002, Ushio-Fukai et al., 2002).

## **2.6 Aufgabenstellung**

Offensichtlich spielen bei der durch VEGF stimulierten Endothelzellenproliferation die intrazelluläre Calcium Homöostase, die Aktivierung von Kinasen sowie die Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen eine entscheidende Rolle. Bisläng ist jedoch nicht bekannt, ob und wie diese Schlüsselschritte im Rahmen einer proliferativen Antwort interagieren.

In HUVECS wurden unter Stimulation mit VEGF folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ist die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase von der ERK2 abhängig, beziehungsweise lässt sich die Aktivierung der ERK2 von der NAD(P)H-Oxidase beeinflussen?
2. Welche Rolle spielt das extrazelluläre Calcium für die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase sowie der ERK2, beziehungsweise gibt es einen Zusammenhang zwischen NAD(P)H-Oxidase und Influx vom extrazellulären Calcium in die Endothelzelle?

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS	Merck, Darmstadt
BCIP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Benzon-Nuklease(250/μl)	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA	Boehringer, Mannheim
Coomasie-Brilliant-Blue G 250	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DIDS	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EGTA-Natrium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
H2DCF-DA	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
H3-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HEPES	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtstandard (LDH/Fumarase)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NADH+H	Serva, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NBT	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
NKS	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
PD 98059	Calbiochem, Bad Soden

Penicillin-Streptomycin Lösung	GIBCO Life Technologies, Eggenstein
Ponceau-S-Lösung	Roche Diagnostics, Mannheim
Promocell medium	Recol, Langgöns
SDS	Riedel de Haen, Seelze
TEMED	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Thymidin	ALDI
TRIS	Merck, Darmstadt
Tritium	AKW, Krümmel
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA	GIBCO Life Technologies, Eggenstein

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## **3.2 Häufig verwendete Medien, Puffer und Lösungen**

### **3.2.1 Zellkulturmedien**

(Inkubation, +Serum,-serum, Trypsinisieren)

Promocellmedium:

EDTA-Trypsinlösung (pH 7,4; sterilfiltriert)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
Trypsin	0,05 % (wt/vol)
EDTA	0,02 % (wt/vol)

### 3.2.2 Gelelektrophorese

PBS-Lösung (pH 7,4):

NaCl	150 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 mM

TBS-Lösung (pH 7,4):

TRIS/ HCl	10 mM
NaCl	150 mM

### 3.2.3 Antikörper und Nukleotidsequenzen

Anti-p 42 MAPK- Antikörper (polyklonal, Kaninchen) ERK 2; C-14; sc 154	Santa Cruz Biotechnologie, USA
Anti-rabbit-IgG (mit alkalischer Phosphatase gekoppelt)	Amersham Pharmacia Biotech, USA
p22phox Antisensenukleotide 5`-TCTGTCCCATGGCGAT-3` 5`-TGTCCCATGGCGATGC-3`	Gibco, Life Technologies
Nonsensenukleotide 5`-TAGCGGTACCCTGTCT-3` 5`-CGTAGCGGTACCCTGT-3`	Gibco, Life Technologies

### 3.3 Geräte und Laborbedarf

#### 3.3.1 Verbrauchsmaterialien:

Zellkulturschalen Falcon 3001	Becton Dickinson, Heidelberg
Primaria- Zellkulturschalen Falcon 3803	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter(0,2 mm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsgefäße	Canberra-Packard, Frankfurt a.M.
Einweg-Zellschaber Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplattten Falcon 3910,	Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF-Blot-Membran Immobilon-P	Millipore, Bedford. USA
Transfer Membran	

#### 3.3.2 Zellkultur:

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Physiologisches Institut, Giessen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F, Nikon, Japan
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld



**3.3.3. SDS Gelelektrophorese:**

Netzgerät High Voltage Power Pack	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Blotkammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Filterpapier Universal Trockepapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen

**3.3.4. Fluoreszenzmessung:**

Fluoreszenzmikroskop IX 70,	Olympus, Hamburg
Video Imaging System	T.I.L.L Photonics, Martinsried

**3.3.5 Sonstige Geräte:**

Inkubator	Heraeus, Hanau
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weinheim
Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn

## **4. METHODEN**

### **4.1 Isolierung von HUVEC**

Die Endothelzellen wurden aus humanen Umbilikalvenen nach der Methode von Jaffe et al., 1973 isoliert, charakterisiert und kultiviert. Das Verfahren wird in 4.1.1, 4.1.2 und 4.2 beschrieben.

#### **4.1.1 Zellisolation**

Die Nabelschnüre wurden nach der Abnabelung in einen sterilen Becher gegeben. Mit einer sterilen Kompresse wurde die Nabelschnur gesäubert und anschließend auf Verletzungen untersucht. Mit einer Knopfkanüle wurde die Nabelschnurvene aufgesucht und zweimal mit 50 ml HEPES durchgespült. Wenn sich die Vene bei diesem Spülvorgang als dicht erwies, konnte sie am anderen Ende abgeklemmt werden. Als nächstes wurde die Vene mit 0.025% Kollagenaselösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und im Brutschrank bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, um die Endothelzellen aus ihrem Zellverband zu lösen. Inzwischen wurde in ein 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson, USA) 1 ml fetales Kälberserum vorgelegt.

Nach der Inkubation wurde die Nabelschnurvene mit 30 ml HEPES gespült. Die HUVEC enthaltende Spüllösung wurde in dem vorbereiteten Röhrchen aufgefangen und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Endothelial Basal Medium (EBM) inklusive der folgenden Aliquots (alle Promo Cell, Heidelberg, Deutschland): 0.4% ECGS/H, Epidermal Growth Factor 0.1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml, basic Fibroblast Factor 1 ng/ml; Amphotericin 50 ng/ml, Gentamycin 50 µg/ml und 20% FKS resuspendiert.

Die Zellen wurden abschließend auf ein mit 0.2% Gelatine vorbeschichtetes 25 cm<sup>2</sup> Plastik Kulturschälchen ausgesät.

#### **4.1.2 Zellidentifikation**

Die Identifikation der Zellen als Endothelzellen geschah zum einen durch lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie und zum anderen durch immunzytochemische Methoden.

Im Lichtmikroskop sah man die Endothelzellen als kopfsteinpflasterartig angeordneten Monolayer, das sog. „Cobblestone“-Phänomen. Fibroblasten oder glatte Muskelzellen imponieren als spindelförmige Zellen, die sich im Zellverband nicht als Monolayer sondern als sich gegenseitig überlappende Zellgruppierung darstellen.

Bei Anwendung der Immunfluoreszenzmethode wurden die Zellen zunächst auf einem Deckglas ausgesät, kultiviert und mit Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Es folgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen den von Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem fluoreszierenden Antikörper gegen den erstgenannten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland). Der von Willebrand-Faktor dient der Identifikation von Endothelzellen. Unter dem Mikroskop konnten dann durch die Fluoreszenz des zweiten Antikörpers, der an den Anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörper bindet, die Zellen eindeutig als Endothelzellen identifiziert werden.

## 4.2 Kultivierung

Die Kultivierung der HUVEC wurde in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit einem  $\text{CO}_2$ -Anteil von 5% durchgeführt. Die Zellen wurden aus der Primärkultur in mit Gelatine vorbeschichteten  $25\text{ cm}^2$  Plastikkulturflaschen überführt, sobald diese zu einem „Zellrasen“ zugewachsen waren.

Als Nährmedium wurde EBM verwendet. Jedoch wurden nur 10% FKS zugesetzt. Außerdem wurde auf die Gabe von Amphotericin B verzichtet. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Eine Passagierung der Zellen wurde immer dann durchgeführt, wenn sie ihre Kulturflasche konfluent bewachsen hatten. Um die Zellen zu passagieren wurden sie kurzzeitig mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop konnte beobachtet werden wie die Zellen sich abkugeln und von dem Boden der Kulturflaschen ablösen. Dieser Vorgang wurde durch die Gabe von FKS abgestoppt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Nährmedium resuspendiert und in mit 0.2% Gelatine vorbeschichteten Kulturflaschen in einer Dichte von ca. 3000 Zellen/ $\text{cm}^2$  erneut ausgesät.

Die Wachstumsdichte und die Zellmorphologie wurden durch tägliche Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Eventuelle Kontaminationen mit Bakterien konnten so ebenfalls erkannt werden. Kulturgefäße, die sich als mikrobiell kontaminiert herausstellten, wurden verworfen.

Die Zellaussaat für die Zellproliferationsexperimente und die Fura-2 Messungen wird in den jeweiligen Abschnitten gesondert beschrieben.

### **4.3 Zellproliferationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin vereinzelt und in einer Neubauer-Kammer gezählt

### **4.4 Fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Ermittlung der intrazellulären Ionenkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ , ROS)**

#### **4.4.1 Apparative Voraussetzungen**

Die Messungen wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskopes (Olympus IX 71) durchgeführt, welches an das Till-Photonics System (Gräfelfing, Germany) gekoppelt ist. Mit Hilfe eines Monochromators konnte das Anregungslicht entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes ausgewählt werden. Diese selektierten Wellenlängen trafen dann über Spiegel im Strahlengang auf das Objekt und führten zur Anregung des Farbstoffes. Das emittierte Licht gelangte über den dichroischen Spiegel zu der CCD-Kamera. Das eintreffende Signal wurde mit Hilfe der dazugehörigen Computersoftware (Till-Photonics) ausgewertet.

#### 4.4.2 Beladung der Zellen mit den Fluorochromen und Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

##### 4.4.2.1 Bestimmung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2

Um die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestimmen, wurden die Zellen für 60 min bei Raumtemperatur mit Fura-2 (2,5  $\mu\text{M}$ ) beladen. Fura-2 gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen, wird dort von zellulären Esterasen gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Nach der Beladung erfolgte ein Mediumwechsel mit HEPES-Medium 199 und eine 30minütige Nachinkubation.

Die Anregung von Fura-2 erfolgte mit den Wellenlängen 340 und 380 nm. Die Emission wurde bei 510 nm detektiert. In der Regel wurden die Daten der Fura-2-Messung als Ratio (340 nm / 380 nm) wiedergegeben. Im Falle einer Kalibrierung wurde diese nach dem von Li et al. (1987) beschriebenen Protokoll modifiziert durchgeführt. Die Zellen wurden mit Kalibrierungslösung, deren pH-Wert auf 6,5 bzw. 7,15 titriert war, perfundiert. Zur Kalibrierung wurde folgende Lösung benutzt:

Kalibrierungslösung: NaCl (10 mM), KCl (125 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM), HEPES (25 mM), Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  (3 mM) oder EGTA (5 mM); Ionomycin (5  $\mu\text{M}$ ); Nigericin (10 mg/L).

Zur Bestimmung des  $R_{\text{max}}$ -Wertes (maximales Ratio) wurde dem Perfusat 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , zur Bestimmung des  $R_{\text{min}}$ -Wertes (minimales Ratio) 5 mM EGTA zugesetzt. Die freie zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times b \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R).$$

Der Faktor  $b$  wurde bestimmt durch den Quotienten der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des  $R_{\text{min}}$ -Wertes und der Emissionsintensität der 380 nm Wellenlänge des  $R_{\text{max}}$ -Wertes. Der  $K_d$ -Wert ist ein Maß für die Affinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Dieser Wert variiert mit den experimentellen Bedingungen und ist vom pH-Wert abhängig. *In vitro* bestimmten Gryniewicz et al. (1985) einen  $K_d$ -Wert für Fura-2 von 224 nmol/l. In isolierten Zellen ermittelte sich bei einem intrazellulären pH-Wert

von 7.15 ein  $K_d$ -Wert von  $312 \pm 9$  nmol/L ( $n = 8$ ), bei einem intrazellulären pH-Wert von 6.5 ein  $K_d$ -Wert von  $337 \pm 4$  nmol/L ( $n = 6$ ) (Ladilov et al., 1997). Zur Bestimmung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration wurde das Fura-2-Ratio mit den von Ladilov et al. (1997) ermittelten  $K_d$ -Werten kalibriert.

#### **4.4.2.2 Ermittlung der intrazellulären ROS mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DCF**

Zur Quantifizierung der endothelialen Generierung freier Sauerstoffradikale wurde Dichlorofluorescein (DCF)-Fluoreszenz angewandt. Auf Deckgläsern (Durchmesser 25mm) kultivierte Endothelzellen (siehe 1) wurden für 30 Minuten in Perfusionsmedium mit  $5 \mu\text{mol} / \text{l}$  2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein-diacetat ( $H_2DCF\text{-DA}$ ) bei Raumtemperatur beladen. Danach wurden die Zellen in einer Temperaturkontrollierten Inkubationskammer in das Perfusionssystem eingebracht und je nach experimentellem Protokoll perfundiert. Das Inkubationsmedium enthielt zusätzlich  $5 \mu\text{mol} / \text{l}$   $H_2DCF\text{-DA}$ . Die Fluoreszenz wurde nun mittels der oben beschriebenen Apparatur ermittelt

### **4.5 Bestimmung der p42 MAP-Kinase-Aktivierung**

#### **4.5.1. Probengewinnung**

Die Endothelzellen wurden je nach Versuchsplan mit den jeweiligen Hemmstoffen inkubiert bzw. perfundiert. Zur vollständigen Beendigung der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen. Die Endothelzellen wurden mit denaturierendem Lysispuffer aufgeschlossen und bei Raumtemperatur für 5 Minuten unter Schütteln inkubiert. Der Lysispuffer setzte sich wie folgt zusammen:

Lysispuffer (SDS-PAGE) :

TRIS/ HCl 50 mM( pH 6,7)

SDS 2% (wt/vol)

Mercaptoethanol 2% (wt/vol)

Natrium-ortho.vanadat 1 mM

Natrium-ortho-vanadat diente zur Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Zum Verdau von Nukleinsäuren wurde für weitere 10 min Benzon-Nuklease (Endkonzentration 50 U/ ml) hinzugefügt. Anschließend wurde das Zellysate in Eppendorf-Gefäße überführt und zur vollständigen Denaturierung der Proteine im Eppendorf-Inkubator für 5 Minuten auf 65°C erhitzt. Danach wurden die Proben mit 10 %(vol/vol) einer Bromphenolblau(0,001 %wt/vol) Wasser/ Glycerin-Lösung (1/1 vol/vol) versetzt. Die Lysate konnten bei -20°C bis zur späteren Weiterverarbeitung eingefroren werden.

#### 4.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vom Gesamtproteinextrakt der Endothelzellen erfolgte nach Laemmli (1970). Alle für den Aufbau der Gelkammer benötigten Teile wurden vorher gründlich gereinigt und mit 100 %igem Alkohol entfettet. Die Gelkammer wurde seitlich von zwei Abstandshaltern (Spacer; Dicke: 1mm) und nach unten durch einen Silikonschlauch entsprechender Dicke abgedichtet. Es wurden ausschließlich diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, verwendet. Für die Untersuchungen zur Aktivierung der p42-Isoform der „Mitogen-Activated-Protein Kinase“ (MAPK) wurde folgende AA/Bis-Stammlösung verwendet:

AA/Bis Stammlösung(30/0,3):

Acrylamid 29,7 %(wt/vol)

Bisacrylamid 0,3%(wt/vol)

Die 12,5 % Trenngellösung setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngellösung:

14,0 ml H<sub>2</sub>O

10,5 ml TRIS/HCL, pH 8,8 1,5 M

17,5 ml AA/Biis Stammlösung(30/0,3)

450 µl SDS-Lösung 10%(wt/ vol)

30 µl TEMED  
200 µl APS 10%( wt/ vol)

Die Lösung wurde nach kurzem Mischen sofort in die Gelkassetten gegossen und mit Aqua demin. überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels(Dauer 60- 180 Minuten) wurde das überschichtete Wasser dekantiert und eine 6%ige Sammelgel-Lösung in der folgenden Reihenfolge zusammengesetzt:

Sammelgellösung:

10,4 ml H<sub>2</sub>O  
5,0 TRIS/HCLm, pH 6,8 0,5 M  
4,0 ml AA/Bis Stammlösung (30/0,3)  
200 µl SDS-Lösung 10%(wt/vol)  
20 µl TEMED  
200 µl APS 10%(wt/vol)

Die jeweils angegebenen Mengen sind für zwei Gele angegeben. Nach kurzem Mischen wurde mit der Sammelgel-Lösung das Trenngel überschichtet, und sofort der Gelkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels (Dauer 20 Minuten) wurde der Gelkamm gezogen, und der Silikonschlauch entfernt. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer folgender Zusammensetzung beschickt:

Laufpuffer:

Glycin 1,44% (wt/vol)  
TRIS 0,3 % (wt/vol)  
SDS 0,1 % (wt/vol)

Zur Untersuchung der MAPK-Aktivierung wurden die farbmarkierten Proteine Laktat-Dehydrogenase (42,7 kDa) und Fumarase (58,6 kDa) als Molekulargewicht-Marker verwendet. Hierdurch ließ sich die Position der 42 kDa-Isoform der MAPK schon während der Gelelektrophorese abschätzen.



Zur vollständigen Trennung der phosphorylierten von der nicht-phosphorylierten MAPK-Fraktion, konnte daher die gesamte Länge des Trenngels ausgenutzt werden. Die SDS-Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 50 V über Nacht bei Raumtemperatur statt

#### 4.5.3 Western-Blot-Verfahren

Die in den Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine wurden im "Semi Dry Blotting"-Verfahren elektrophoretisch nach KHYSE-ANDERSON (1984) auf Polyvinyliden-Difluorid- (PVDF-) Membranen transferriert. Dabei wurden in Puffer getränkte Filterpapiere als Pufferreservoir verwendet. Später konnten die somit fixierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Folgende Puffer wurden für das Western-Blot-Verfahren verwendet:

Kathodenpuffer:

TRIS / HCL 25 mM pH 9,4

6-Aminohexansäure 40 mM

Methanol 20 % (vol / vol)

Anodenpuffer :

TRIS / HCl 30 mM pH 10,4

Methanol 20 % (vol / vol)

Konz. Anodenpuffer :

TRIS / HCl 300 mM pH 10,4

Methanol 20 % (vol / vol)

Je vier in Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere wurden mit den oben angegebenen Puffern getränkt. Die PVDF-Membran (ebenfalls in Gelgröße zugeschnitten) wurde zunächst mit Methanol benetzt und dann für 30 Minuten mit Anodenpuffer equilibriert. Danach wurden zunächst die vier mit konz. Anodenpuffer getränkten, dann die mit Anodenpuffer getränkten Filterpapiere und die PVDF-Membran auf die Anode der Western-Blot-Apparatur gebracht. Das Trenngel wurde, an einer Glasscheibe der Gelkassette haftend, auf die

PVDF-Membran gelegt und die Glasscheibe durch Kippen vom Gel gelöst. Abschließend wurden die vier in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere und die Kathode der Apparatur aufgelegt. Der Elektrotransfer fand bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA} / \text{cm}^2$  für 4 Stunden bei Raumtemperatur statt.

Die Effizienz des Transfers wurde durch die (reversible) Ponceau-S-Färbung der PVDF-Membran überprüft.

#### **4.5.4 Proteinfärbung mit Ponceau S**

Durch die Ponceau-S-Färbung (KOHN, 1958) konnten die auf die PVDF-Membran transferierten und fixierten Proteine unspezifisch und reversibel rötlich angefärbt werden. Zur Färbung wurde die Blot-Membran für 5 Minuten mit Ponceau-S-Lösung versetzt.

Die so gefärbten PVDF-Membranen konnten durch Waschen mit Aqua demin. und TBS-Lösung wieder vollständig entfärbt werden.

#### **4.5.5 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot**

Die PVDF-Membran wurde nach erfolgtem Proteintransfer zunächst für mindestens 2 h mit einer 3 %igen BSA-Lösung in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Damit wurden unspezifische Bindungsstellen, für die später zum Einsatz kommenden Antikörper, abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in TBS wurde die PVDF-Membran für 2 h bei Raumtemperatur mit der Erst-Antikörper-Lösung inkubiert.

Zum Nachweis der MAPK-Aktivierung wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die 42 kDa-Isoform der MAPK verwendet.

Antikörper-Lösung MAPK:

Antikörper gegen p42 MAPK  $1 \mu\text{M} / \text{ml}$

BSA 3 % (wt / vol)

Triton X-100 0,1 % (vol / vol)

gelöst in TBS pH 7,4

Nach der Inkubation mit dem Erst-Antikörper wurde die PVDF-Membran zweimal mit TBS, das mit 0,1 % Triton X-100 (vol / vol) versetzt war, für jeweils 10 Minuten gewaschen und anschließend für weitere 2 Stunden mit der Zweit-Antikörper-Lösung inkubiert

Danach wurde die PVDF-Membran zunächst zweimal für 10 Minuten mit TBS / 0,5 % Triton X-100 (vol / vol) und anschließend zweimal (je 10 Minuten) mit TRIS / HCl (10 mM, pH 7,4) gewaschen. Zur Entwicklung der PVDF-Membran wurde ein Substratpuffer für die an den Zweit-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) verwendet. Dieser wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt und enthielt die beiden Substrate Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP). BCIP wurde durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase des Zweit-Antikörpers in ein violettes Präzipitat umgesetzt.

Substratpuffer AP:

TRIS / HCl 100 mM pH 9,5

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

NaCl 10 mM

NBT 0,0005 % (wt / vol)

BCIP 0,00025% (wt / vol)

Die Entwicklung der PVDF-Membran fand im Halbdunkeln bei Raumtemperatur solange statt, bis keine weitere Zunahme der Farbintensität zu beobachten war (1 - 20 Minuten). Durch mehrmaliges Waschen der Membran in Aqua demin. wurde die Entwicklung gestoppt. Anschließend wurde die Membran zum Trocknen zwischen zwei Filterpapiere gelegt und mit einem Scanner-System dokumentiert. Die densitometrische Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programmes Image Quant<sup>®</sup> (Molecular Dynamics, Krefeld)

#### **4.6 Antisense-Transfektionsexperimente**

Um die Expression der essentiellen Untereinheit p22<sup>phox</sup> der NAD(P)H-Oxidase herunterzuregeln, führten wir Antisense-Transfektionsexperimente

durch. Hierbei inkubierten wir die endothelialen Zellkulturen für 24 Stunden mit zwei verschiedenen 16-mer langen, sich überlappenden Sequenzen (500 nmol / l). Die Sequenzen waren phosphorothionisiert. Die Basenfolge der p22<sup>phox</sup> Antisensenucleotide war: 5'-TCTGTCCCATGGCGAT-3' und 5'-TGTCATGGCGATGC-3'. Die Abfolge der Basen in den Nonsense-Sequenzen war umgekehrt: 5'-TAGCGGTACCCTGTCT-3' und 5'-CGTAGCGGTACCCTGT-3'.

#### **4.7 Experimentelles Protokoll**

Vor Beginn der Experimente wurden die subkonfluenten Zellschichten, welche man aus dem unter 3.1 beschriebenen Kultivierungsverfahren gewonnen hatte, gewaschen und für 24 Stunden in Serum-freiem Promocell Medium inkubiert, um die Zellproliferation zu stoppen. Diese Zellschichten sind bei 35°C in Glukose-freier HEPES-Lösung inkubiert [zusammengesetzt von (in mM): 25 HEPES, 145 NaCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 2.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4]. Inhibitoren oder Glukose wurden 30 Minuten vor und während der Anwesenheit von VEGF dazugegeben. Nach einer Stunde experimenteller Inkubation in HBS, wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

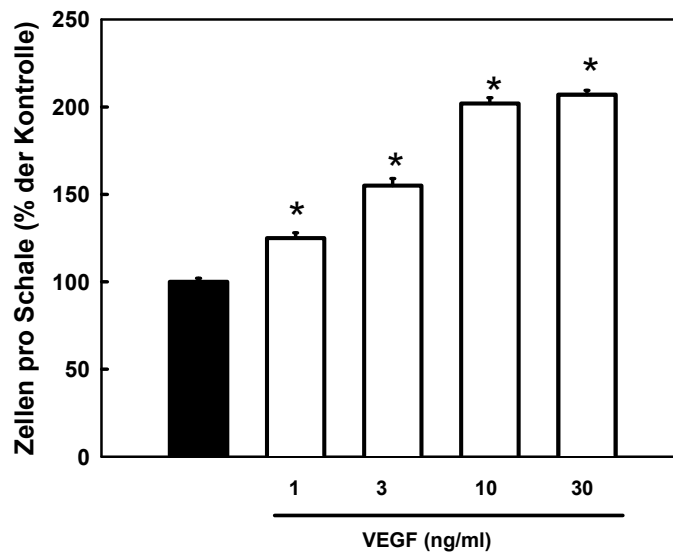
Die Meßwerte wurden als Mittelwerte  $\pm$  der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) unter Nutzung des Student–Newman–Keuls–Testes durchgeführt und das Signifikanzniveau wurde ermittelt (Godfrey et al., 1985; SAS/STAT., 1992). Differenzen mit  $p < 0,05$  galten als statistisch signifikant.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Konzentrationsabhängige VEGF Wirkung auf die Proliferationssteigerung

Unter der Einwirkung von VEGF-A (wird in allen Experimenten als VEGF bezeichnet) kommt es zu einer Proliferationssteigerung der Endothelzellen. Bei der Stimulation von Endothelzellen wurde mit zunehmenden Konzentrationen des Wachstumsfaktors VEGF eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation beobachtet.

**Abb. 1** zeigt, dass es bei zunehmender Konzentration des applizierenden VEGF zu einer Steigerung des proliferativen Effektes von den Endothelzellen kommt. Es wurde VEGF mit Konzentrationen von 1 ng/ml, 3ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml appliziert. Die größte Proliferationssteigerung wurde bei Konzentrationen von 30 ng/ml und 10 ng/ml registriert. Da die beiden letzten Konzentrationen einen annähernd gleichen proliferativen Effekt auslösten, wurde bei allen folgenden Versuchen die Konzentration von 10 ng/l VEGF benutzt.



**Abb. 1** Einfluß von verschiedenen VEGF Konzentrationen auf die Endothelzell-Proliferation. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 16$  Endothelzellkulturen von 4 unabhängigen Präparationen. \*P < 0,05 gegenüber der Kontrolle.

## 5.2 Die Rolle der ERK2 und NAD(P)H-Oxidase bei der Proliferation von Endothelzellen

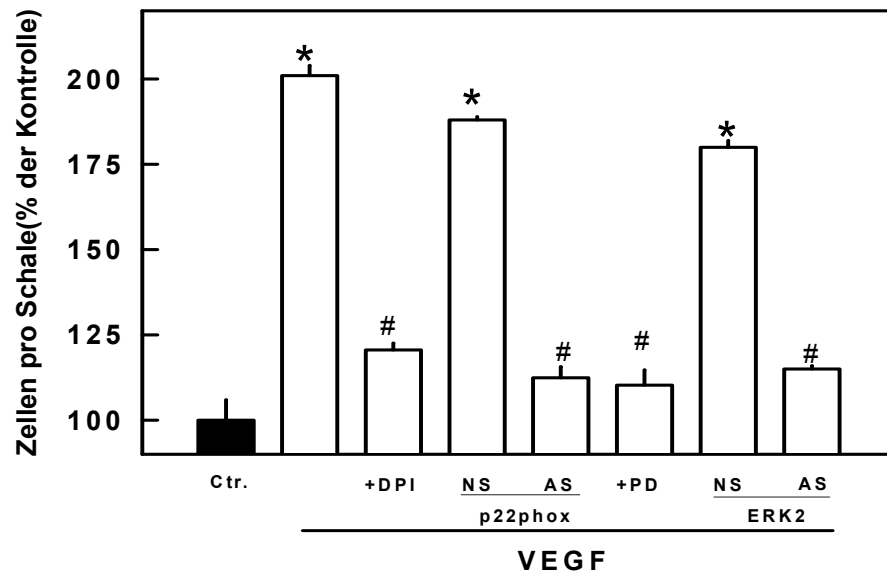
Vorübergehende Exposition von VEGF auf Endothelzellen über eine Stunde verursachte eine Proliferationssteigerung, die nach 24- stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrolle quantifiziert wurde (**Abb. 2**).

Die Rolle von NAD(P)H-Oxidase und ERK2 konnte unter Applikation von Inhibitoren oder Antisense Oligonukleotiden nachgewiesen werden. Endothelzellen, die mit dem Inhibitor der flavinhaltigen Oxidasen Diphenyliodonium Chlorid (DPI) (10  $\mu$ M) für 30 Minuten vorinkubiert wurden, konnten unter Einwirkung von VEGF keine Proliferationssteigerung aufweisen (**Abb. 2**).

Des Weiteren wurden die Endothelzellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen die Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase p22phox 24 Stunden lang inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 ng/mL VEGF stimuliert. Es konnte keine Proliferationssteigerung registriert werden. Letzterer Befund zeigte, dass die NAD(P)H-Oxidase ein wichtiger Baustein bei der Proliferation der Endothelzellen ist (**Abb. 2**).

Stimulation der Endothelzellen mit 10 ng/mL VEGF nach 24 stündiger Vorinkubation mit Nonsense Oligonukleotiden gegen die p22phox führte erwartungsgemäß zu einer unveränderten Proliferationssteigerung (**Abb. 2**).

Der proliferative Effekt von VEGF wurde gehemmt, wenn die Endothelzellen in Anwesenheit von dem MEK Inhibitor PD 98059 (10  $\mu$ M) mit VEGF stimuliert wurden. Eine Hemmung des proliferativen Effekts des VEGF zeigte sich auch nach 24h Vorinkubation der Zellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen die ERK2. Endothelzellen, die mit Nonsense Oligonukleotiden gegen die ERK2 24 Stunden lang vorinkubiert wurden, wiesen nach Stimulation mit 10 ng/mL VEGF eine ungehemmte Proliferationssteigerung auf (**Abb. 2**). Dieser Befund weist die wichtige Rolle der ERK2 für die Proliferation der Endothelzellen nach.

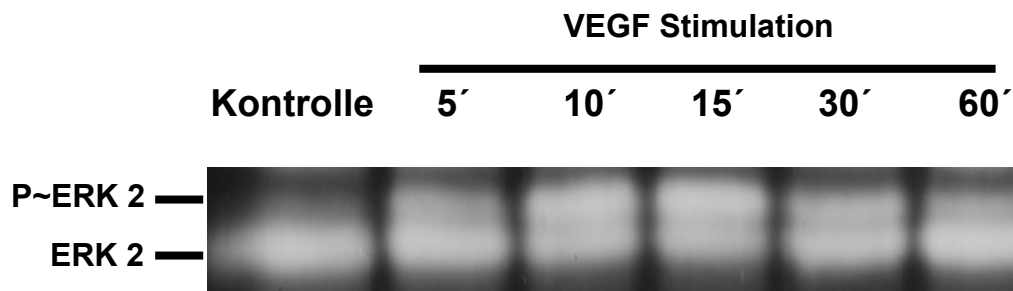


**Abb. 2** Einfluß von verschiedenen Inhibitoren auf die durch VEGF-vermittelte Proliferationssteigerung. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 16$  Endothelzellkulturen von 4 unabhängigen Präparationen. \* $P < 0,05$  gegenüber der Kontrolle. #  $P < 0,05$  gegenüber VEGF oder VEGF in Anwesenheit von Nonsense Oligonukleotiden gegen ERK2 (V+NS ERK2) und p22phox (V+NS p22phox).



### 5.3 VEGF vermittelte Aktivierung der endothelialen Kinase ERK2

Die Aktivierung von ERK2 erfolgt nach der Stimulation von VEGF durch Phosphorylierung. Diese Aktivierung konnte mittels densitometrischer Analyse in Western blots quantitativ gezeigt werden (**Abb. 3A**).



**Abb. 3A:** Der zeitliche Verlauf der ERK2- Phosphorylierung nach Stimulation mit VEGF zum Zeitpunkt 0, 5', 10', 15', 30', 60'.

Die serumfreie Vorinkubation der Endothelzellkulturen diente dazu, die basale Phosphorylierung der ERK2 von ca 30-40% auf ca 10% zu verringern.

Nach Stimulation mit VEGF kam es zu einer vorübergehenden Aktivierung der ERK 2 von ca 70% mit einem Maximum 15 min nach der VEGF Gabe (**Abb. 3B**). Nach ca 60 min lag die ERK2- Phosphorylierung auf Ausgangsniveau. Aus diesem Befund lässt sich zurückschließen, dass die durch VEGF-vermittelte ERK2 Aktivierung ein transientes Signal ist.

Bei der Signaltransduktion während der Proliferation kommt es zu einer Aktivierung der MEK/ERK2. Die Aktivierung der MEK/ERK konnte durch 20-minütige Vorinkubation mit 10  $\mu$ M PD 98059, einem spezifischen Inhibitor der MEK, ausgeschaltet werden (**Abb. 3B**).

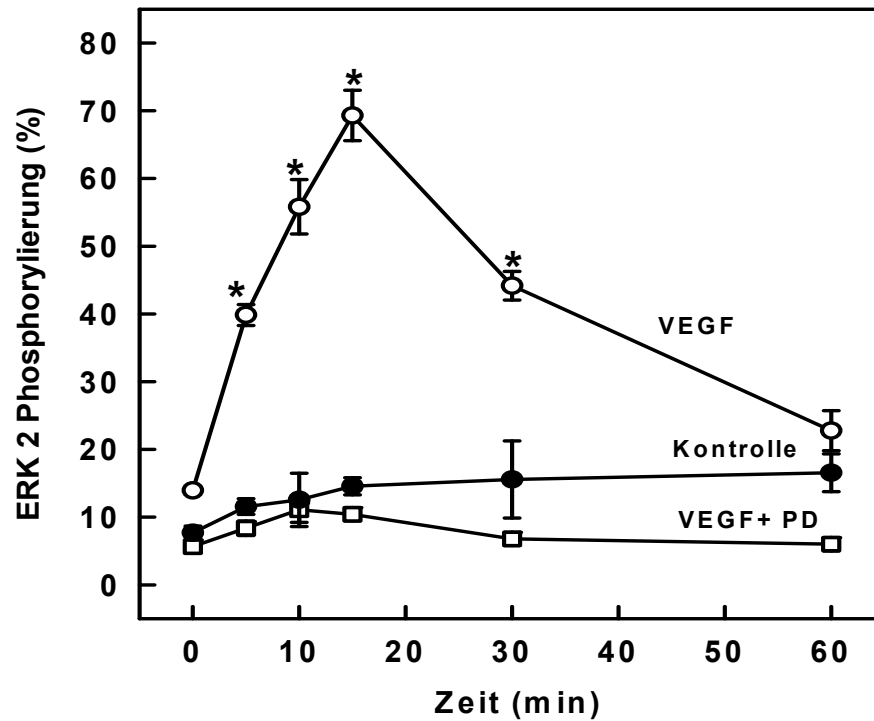
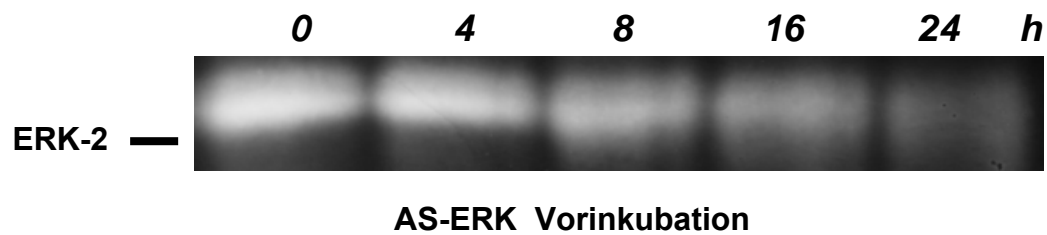


Abb. 3B: Densitometrische Analyse der ERK2 Phosphorylierung unter Kontrollbedingungen, in Anwesenheit von 10 ng VEGF oder VEGF nach Vorinkubation mit ERK-Inhibitor, PD 98059. Angegeben sind Mittelwerte  $\square$  SEM von  $n = 6$  unabhängigen Experimenten.  $*P < 0,05$  gegenüber der Kontrolle und PD 98059.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach Vorbehandlung mit Antisense Oligonukleotiden gegen ERK2 die Menge an zellulärer ERK2 reduzierte (**Abb. 3C**)



**Abb. 3C: Herunterregulierung der ERK2 nach Vorinkubation mit AS Oligonukleotiden**

#### 5.4 Zusammenhang zwischen VEGF und Sauerstoffradikalen

Um die Rolle von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) im Rahmen der VEGF vermittelten Endothelzellproliferation zu untersuchen, wurde zunächst ein Verfahren etabliert, um ROS zu bestimmen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff H<sub>2</sub>-DCF-DA für Videofluoreszenzmikroskopische Versuche eingesetzt.

Unter Kontrollbedingungen wurde keine signifikante Zunahme der DCF- Fluoreszenz gemessen. Nach Stimulation mit 10 ng/ml VEGF kam es nach ca 10 Minuten nach VEGF-Zugabe zu einem massiven Anstieg der DCF- Fluoreszenz mit einem Maximum nach ca. 30 Minuten, wie die **Abb. 4** zeigt.

Nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellkulturen mit Antisense Oligonukleotiden gegen die Untereinheit p22phox der NAD(P)H (AS-p22) führte die Zugabe von VEGF dagegen nur noch zu einem stark verminderten DCF-Fluoreszenz Anstieg.

Die 24-stündige Vorinkubation der Zellkulturen mit Nonsense Oligonukleotiden, die als Kontrolle der AS Versuche gelten, bewirkte dagegen keine Änderung bei der ROS Entstehung nach VEGF Stimulation.

Die Versuche zeigen, dass es nach VEGF Stimulation zu einer über die NAD(P)H Oxidase vermittelten Freisetzung von ROS kommt.

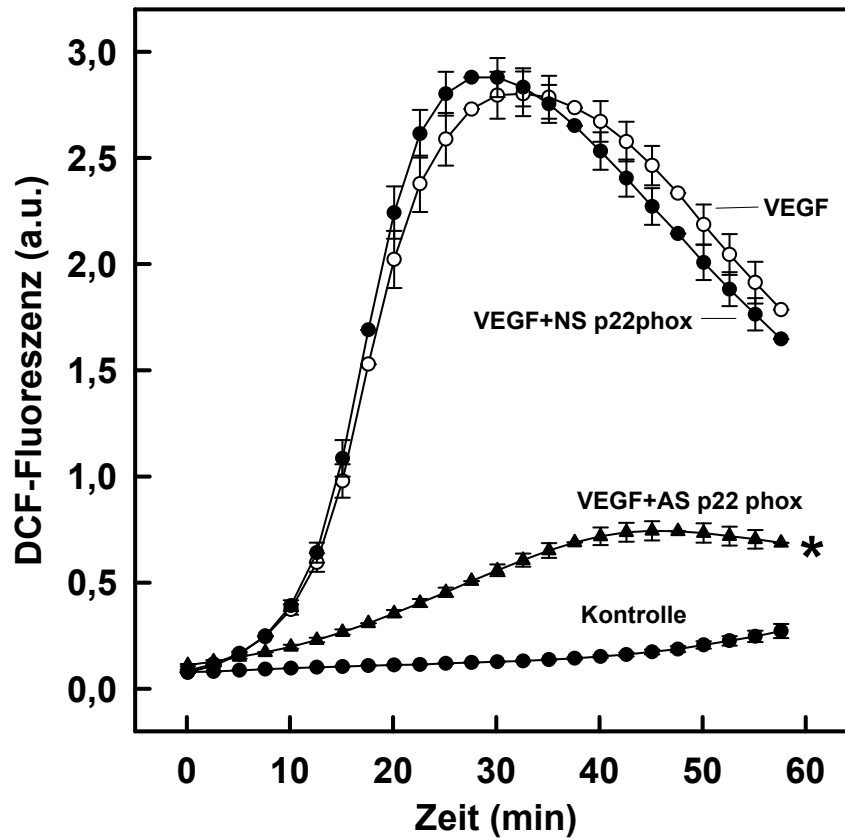


Abb. 4.: Bestimmung der ROS Produktion unter Kontrollbedingungen, unter VEGF-Stimulation und unter VEGF-Stimulation nach Vorinkubation mit Antisense Oligonukleotiden (AS p22phox) gegen die Untereinheit der NAD(P)H Oxidase p22phox oder Nonsense Oligonukleotiden (NS p22phox). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von = 60 Endothelzellen von 4 unabhängigen Zellkulturen. \*P < 0,05 gegenüber VEGF und VEGF+ NS p22phox.

## 5.5 Rolle von ERK2 bei der VEGF- vermittelten Freisetzung von ROS

Nach dem aktuellen Wissensstand ist es bekannt, dass die ROS Produktion durch die NAD(P)H-Oxidase sowie die Aktivierung der ERK2 wichtige Zwischenschritte für die VEGF vermittelte Proliferation der Endothelzellen sind. Es ist jedoch unklar, in welchem Zusammenhang die NAD(P)-Oxidase und die ERK2 untereinander stehen.

Zunächst wurde die ROS Produktion mit Hilfe des Fluoreszenzindikators DCF bestimmt. Unter Kontrollbedingungen lag die DCF-Fluoreszenz bei 100 Relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU). Nach Gabe von 10 ng/mL VEGF kam es zu einer deutlichen Erhöhung des DCF-Signals ca. um das 6-fache im Vergleich zu der Kontrolle (**Abb. 5**).

Um zu überprüfen ob die Generierung von ROS abhängig von der Aktivierung der ERK2 ist, wurde der Einfluss des MEK Inhibitors PD 98059 sowie von Antisense Oligonukleotiden gegen ERK2 auf die VEGF vermittelte ROS Generierung untersucht.

Nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen ERK2 (VEGF+AS-ERK) zeigte sich eine Unterdrückung der VEGF vermittelten ROS Produktion (**Abb. 5**). Im Gegensatz dazu ließ sich der Effekt von VEGF auf die ROS Produktion nach Vorinkubation der Zellen mit Nonsense Oligonukleotiden kaum beeinflussen (**Abb. 5**).

Die Gabe von 20 ng/mL PD 98059 zu den Endothelzellen eine halbe Stunde vor der VEGF Gabe schaltete den Effekt von VEGF ebenfalls aus (**Abb. 5**). Die Versuche zeigen, dass die VEGF- abhängige ROS Generierung über die ERK2 vermittelt wird.

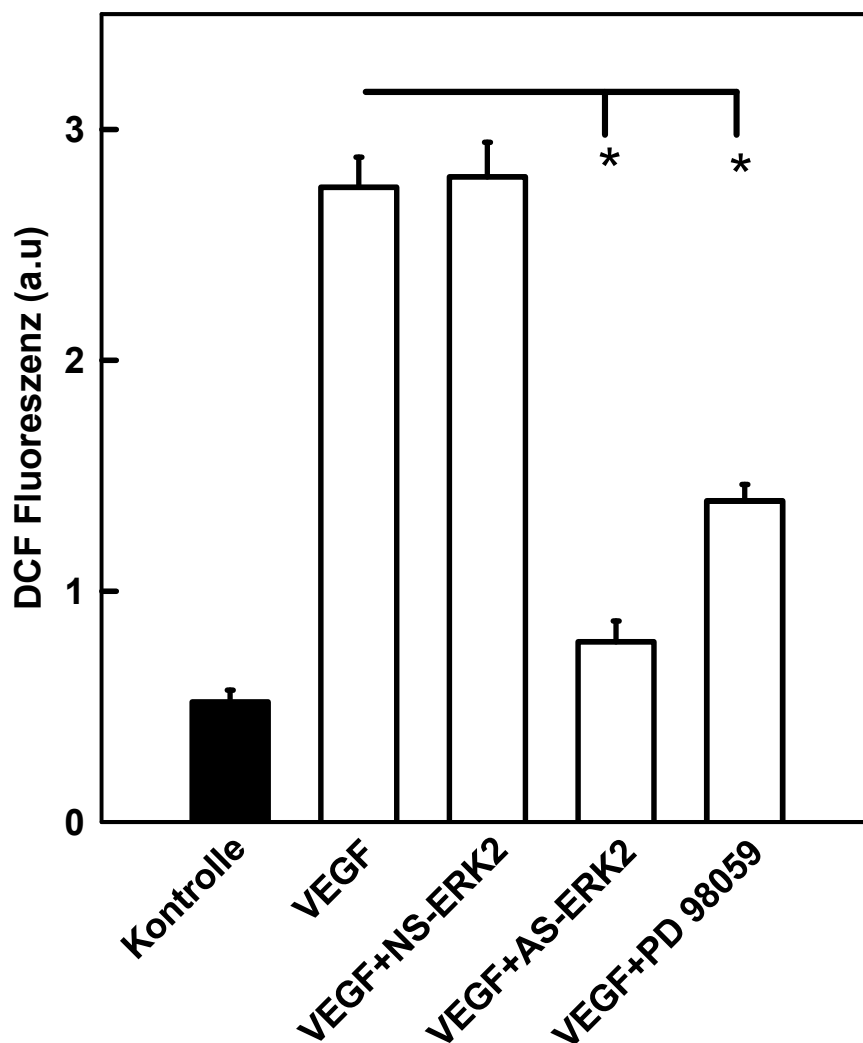


Abb. 5: DCF Fluoreszenz-Bestimmung (ROS) unter Kontrollbedingungen, nach VEGF Stimulation (VEGF), nach VEGF Zugabe und 24-stündiger Vorinkubation mit Nonsense Oligonukleotiden gegen ERK2 (VEGF+NS-ERK), unter VEGF Stimulation und Vorinkubation mit Antisense Oligonukleotiden gegen ERK2 (VEGF+AS-ERK) sowie VEGF und Gabe von PD 98059 (VEGF+PD). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 60$  Zellen von 4 unabhängigen Zellpräparationen. \* $P < 0,05$  gegenüber VEGF und VEGF nach Vorinkubation mit Nonsense Oligonukleotiden gegen ERK2 (VEGF+NS- ERK).

## 5.6 Rolle von ROS bei der durch VEGF vermittelten Aktivierung der ERK2

Die vorangegangenen Versuche legen nahe, dass es nach VEGF Stimulation zu einer über die ERK2 vermittelten Freisetzung von ROS kommt. Umgekehrt sollte daher die Aktivierung der ERK2 nicht über ROS vermittelt sein.

Um dies zu überprüfen, bestimmten wir die Phosphorylierung der ERK2 nach Ausschalten der NAD(P)H- Oxidase, die für die Generierung eines Großteils der ROS verantwortlich ist. Dies geschah nach 24- stündiger Vorinkubation der Endothelzellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen die Untereinheit p22phox der NAD(P)H- Oxidase. Die Aktivierung der ERK2 war nach VEGF Stimulation nach Herunterregulation der NAD(P)H- Oxidase unverändert (**Abb. 6**).

Zur Kontrolle wurden wiederum Nonsense Oligonukleotide gegen die p22phox Einheit eingesetzt. Auch hier war die ERK2 Aktivierung unverändert. Letztere Befunde zeigen, dass die ERK2 Aktivierung in der Sequenz der VEGF-vermittelten Signaltransduktion oberhalb der ROS-generierenden NAD(P)H-Oxidase steht.



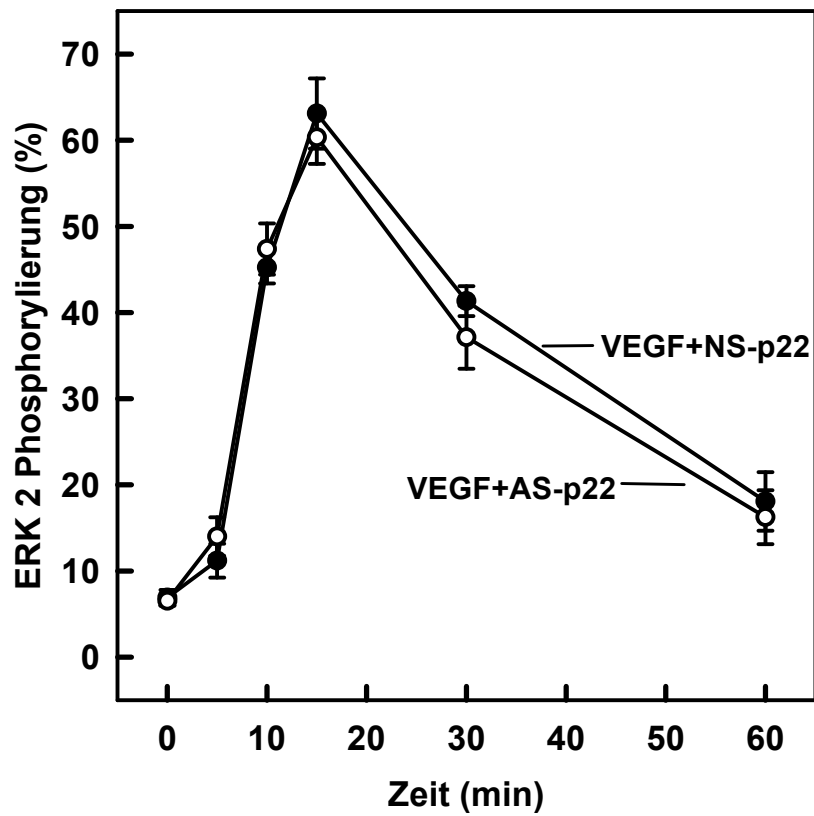


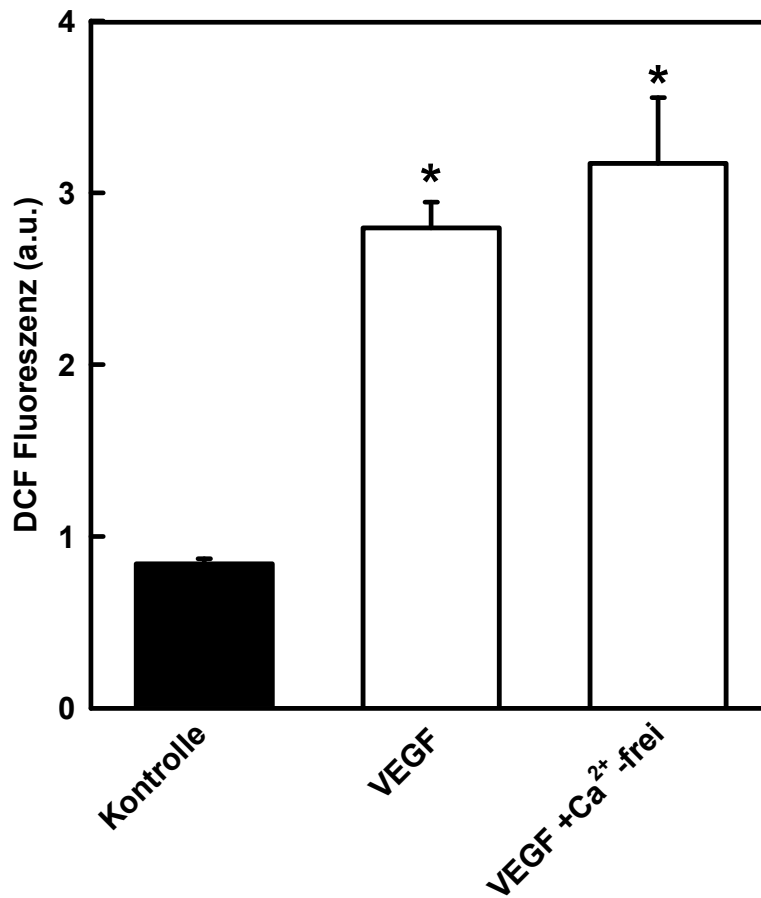
Abb. 6: Zeitverlauf der Aktivierung von ERK2 in Anwesenheit von VEGF nach Vorinkubation der Endothelzellen mit 1  $\mu$ M Antisense oder Nonsense Oligonukleotiden gegen p22phox der NAD(P)H-Oxidase für 24 Stunden. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 6 unabhängigen Experimenten.

### 5.7 Wirkung von VEGF auf die NAD(P)H-Oxidase und ERK 2 unter Ca<sup>2+</sup>- freien extrazellulären Bedingungen

Der Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Zelle ist für die Proliferation der Endothelzellen unabdingbar (Munaron et al 2002). Unklar ist jedoch, welche konkrete Rolle Calcium bei der Vermittlung des Proliferationssignals spielt. Um zu überprüfen, ob Calcium eine Rolle bei der Entstehung von ROS spielt, wurden Experimente unter extrazellulären Calcium-freien Bedingungen durchgeführt.

Unter Calcium-freien Bedingungen bestimmten wir die Produktion von Sauerstoffradikalen nach Stimulation mit VEGF. Wie **Abb. 7A** zeigt, ist die ROS Produktion nach VEGF-Stimulation unabhängig von der Anwesenheit extrazellulären Calciums und damit auch unabhängig von dem Calcium Einstrom in die Endothelzellen über die Plasmamembran.

**Abb. 7B** zeigt den zeitlichen Ablauf der ERK2 Phosphorylierung nach VEGF Stimulation unter normalen (calciumhaltigen) Bedingungen oder unter calciumfreien Bedingungen. Es ist deutlich, dass die Aktivierung der ERK2 in beiden Fällen gleich ist.



**Abb. 7A:** Die Entstehung von ROS ist unabhängig von der Anwesenheit von extrazellulärem Calcium. Bestimmung der DCF Fluoreszenz ohne VEGF Gabe (Kontrolle), mit VEGF sowie mit VEGF unter Calcium-freien extrazellulären Bedingungen (VEGF + Ca<sup>2+</sup>-frei). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 60 Zellen von 4 unabhängigen Zellpräparationen. \*P < 0,05 gegenüber der Kontrolle.

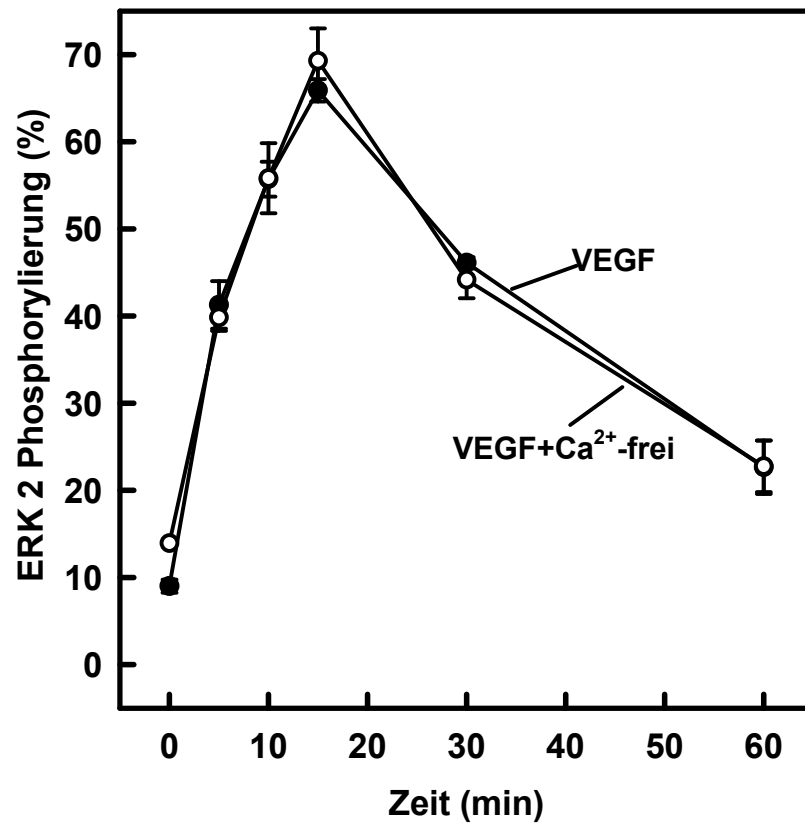


Abb. 7B: Bestimmung der ERK2 Aktivierung unter VEGF Stimulation sowie unter VEGF Simulation bei calciumfreien extrazellulären Bedingungen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von n = 6 unabhängigen Experimenten.

## 5.8 Rolle der NAD(P)H-Oxidase bei dem VEGF vermittelten Calcium-Signaling in Endothelzellen

Es wurde gezeigt, dass die Anwesenheit vom extrazellulären Calcium, d.h. der Einstrom von Calcium in die Zelle keinen Einfluss auf die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase hat. Die nächste Fragestellung war, ob der Calcium Influx von extrazellulär von der Funktion der NAD(P)H-Oxidase abhängig ist. Zunächst bestimmten wir die intrazellulären Calcium-Veränderungen in den Endothelzellen unter Stimulation von VEGF. Nach 10-minütiger Stimulation der Zellen mit 10 ng/mL VEGF kommt es zu einem biphasischen Anstieg des zytosolischen Calciums, d.h. zuerst zu einem Schnellen, der von einem zweiten trägeren Anstieg gefolgt war. (**Abb. 8A**).

Als nächstes wurde der Einfluss von VEGF auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  Kinetik in Endothelzellen untersucht, die mit Antisense Oligonukleotiden gegen die Untereinheit p22phox der NAD(P)H-Oxidase für 24 Stunden vorinkubiert waren. Unter diesen Bedingungen blieb der zweite langsame Calcium Anstieg aus (Abb. 8b). Damit konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Sauerstoffradikalen eine wichtige Voraussetzung für den Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Endothelzelle ist.

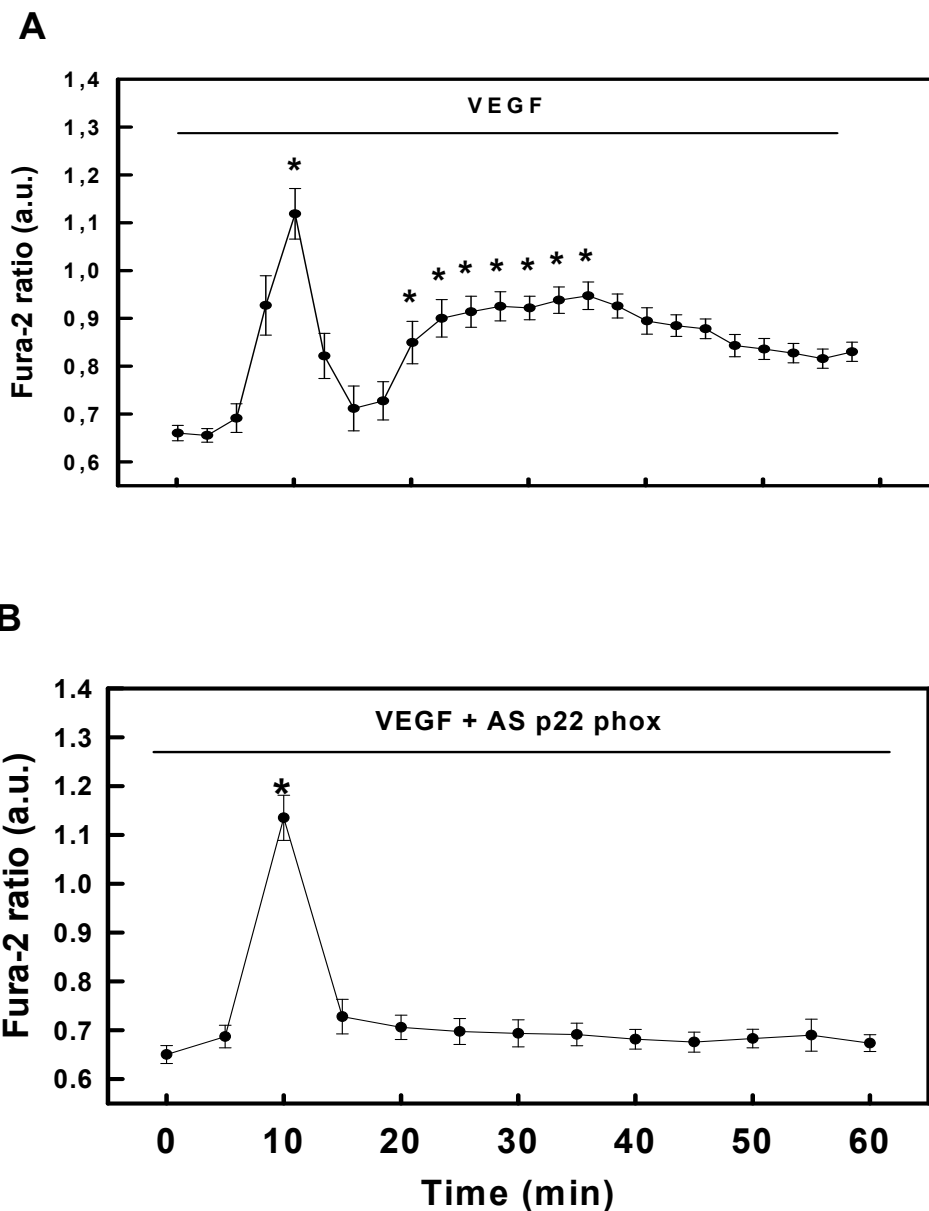


Abb. 8A: Biphasischer Calcium-Anstieg in die Endothelzelle nach VEGF Gabe. Nach ca 10 Min steiler Anstieg gefolgt vom einem trägen zweiten Anstieg. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 60$  Zellen von 4 unabhängigen Zellpräparationen. \* $P < 0,05$  vs.  $t = 0$

Abb. 8B: Monophasischer Calcium- Anstieg nach Vorinkubation der Zellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen p22phox der NAD(P)H Oxidase. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 60$  Zellen von 4 unabhängigen Zellpräparationen. \* $P < 0,05$  vs.  $t = 0$

## **6. DISKUSSION**

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren das zelluläre Signaling der VEGF-induzierten Proliferation in HUVEC zu analysieren. Im Focus stand die Wechselwirkung zwischen der NADP(H)-Oxidase, ERK2 und den intrazellulären Calcium-Veränderungen. Die zentrale Fragestellung der Arbeit war die Reihenfolge dieser Signalelemente (NADP(H)-Oxidase, ERK2 und intrazelluläre Calcium-Veränderungen) festzustellen.

Die entscheidenden Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

1. Die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) durch die NAD(P)H-Oxidase nach Stimulation mit VEGF erfordert erst eine Aktivierung der ERK2.
2. Die Stimulation von Endothelzellen mit VEGF führt zu einem biphasischen Calciumanstieg, wobei der zweite Anstieg von der Aktivierung der NAD(P)H Oxidase abhängt.

### **6.1 Einwirkung von VEGF auf die Endothelzellproliferation**

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst der proliferative Effekt von VEGF auf die Endothelzellen in verschiedenen Konzentrationen bestätigt werden. Maximale Effektivität wurde bei Experimenten mit 10 ng/ml VEGF erreicht.

### **6.2 Die Rolle von ERK2 bei der Endothelzellproliferation**

In dieser Arbeit wurde die Beziehung zwischen VEGF und der Protein Kinase ERK2 überprüft. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die MEK/ERK ein wichtiger Zwischenschritt bei der Proliferation der Endothelzellen ist (Faehling et al, 2002). Tatsächlich konnte diese Annahme bestätigt werden.

Inhibierung der MEK/ERK2 mit PD 98059 oder nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellen mit Antisense Oligonukleotiden gegen die ERK2 führte zu Unterdrückung des proliferativen Effektes von VEGF.

Des Weiteren konnte anhand des Western Blots die vorübergehende Aktivierung von ERK2 nach Stimulation mit VEGF nachgewiesen werden. Die

Phosphorylierung von ERK2 erreichte ein Maximum nach 15 Minuten. Nach einstündiger VEGF Exposition der Zellen erreichte die ERK2 Phosphorylierung wieder das Ausgangsniveau. PD 98059 reduzierte die ERK2 Aktivierung um ca 90 %. Die gesamte Expression des ERK2 Proteins wurde um ca 90% reduziert, wenn die Endothelzellen 24 Stunden mit Antisense Oligonukleotiden gegen die ERK2 vorinkubiert wurden. Danach ließ sich keine Proliferation mehr auslösen.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass VEGF die ERK2 aktiviert, welche ein wichtiger Baustein für die Proliferation der Endothelzellen ist.

### **6.3 Die NAD(P)H-Oxidase bei der Endothelzellproliferation**

Neuen Studien zufolge bewirkt VEGF eine Aktivierung der NAD(P)H Oxidase und die daraus resultierende Produktion von Sauerstoffradikalen ist für die Proliferation der Endothelzellen unabdingbar (Ushio-Fukai et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund reproduziert, indem Endothelzellen mit VEGF stimuliert und die Entstehung von Sauerstoffradikalen (ROS) mit Hilfe von Dichlorofluorescein (DCF) bestimmt wurden. Nach VEGF Stimulation kam es zu einer ROS Entstehung mit einem Maximum ca 30 Minuten nach der VEGF Gabe.

Nach dem aktuellen Wissensstand war noch ungenügend erforscht, ob die NAD(P)H-Oxidase von der MEK/ERK2-Aktivierung abhängig ist. Um diesen Punkt abzuklären, wurde die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase bestimmt, nachdem die ERK2 inhibiert wurde. Die Inhibierung der MEK/ERK2 erfolgte mit 2 verschiedenen Methoden; einerseits mit dem spezifischen MEK Inhibitor PD 98059 und andererseits mit Antisense Oligonukleotiden gegen die ERK2. In beiden Fällen war die ROS Produktion unterdrückt, ein indirektes Zeichen, dass die NAD(P)H-Oxidase nicht aktiviert werden konnte.

Umgekehrt wurde die Aktivierung von der ERK2 mit Hilfe von Western Blots bestimmt, nachdem die NAD(P)H-Oxidase ausgeschaltet worden war. Dies erfolgte entweder mit dem spezifischen Inhibitor der Flavoproteinen Diphenyliumiodid (DPI) oder mit Vorinkubation der Zellen mit Oligonukleotiden gegen die Untereinheit p22phox der NAD(P)H-Oxidase. Die Aktivierung der ERK2 nach VEGF Stimulation blieb in beiden Fällen unverändert.



Beide Versuche bewiesen die These, dass die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase unterhalb der MEK/ERK bei der Signaltransduktion nach VEGF Stimulation liegt.

#### **6.4 Intrazelluläre Calciumveränderungen bei der Proliferation der Endothelzellen**

In dieser Arbeit wurden die intrazellulären Calcium Veränderungen nach VEGF Stimulation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 bestimmt. Es konnte ein biphasischer Calcium Anstieg bestimmt werden. Nach ca 10 Minuten kam es zu einem ersten steilen Anstieg. Der zweite trägere Calcium-Anstieg beruhte auf Oszillationen, die durch Influx von extrazellulärem Calcium in die Endothelzelle zustandekamen. Entzug von extrazellulärem Calcium führt zu Unterdrückung der Oszillationen (Garnier- Reveaud et al., 2001).

Der Calcium Anstieg ist für die Proliferation der Endothelzellen unabdingbar. Eine Unterdrückung des intrazellulären Calcium Anstiegs hemmt die proliferative Wirkung von VEGF (Munaron et al., 2002).

#### **6.5 Interaktion von Calciumveränderung mit MEK/ERK2**

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK 2 von dem intrazellulären Calcium Anstieg unabhängig ist (Schäfer et al., 2003). Der Calcium Anstieg bewirkt lediglich eine Translokation der ERK2 in den Zellkern (Schäfer et al., 2003). Wir untersuchten, ob der Influx von extrazellulärem Calcium in die Endothelzelle einen Einfluss auf die Aktivierung von ERK2 ausübt.

In calciumfreien extrazellulären Bedingungen wurde die Aktivierung von ERK2 bestimmt. Erwartungsgemäß wies die Phosphorylierung von ERK2 keinen Unterschied im Vergleich zu den calciumhaltigen Bedingungen auf.

## **6.6 Interaktion von Calcium und NAD(P)H Oxidase**

Um die Interaktion zwischen NAD(P)H Oxidase und extrazellulärem Calcium zu überprüfen, wurde die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase bei calciumfreien Bedingungen bestimmt. Die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase blieb dabei unverändert im Vergleich zu calciumhaltigen Bedingungen.

Auf der anderen Seite wurde der intrazelluläre Calcium-Anstieg nach Inhibierung der Untereinheit der NAD(P)H Oxidase p22phox bestimmt. Es zeigte sich nur ein erster steiler Calcium Anstieg, d.h. der Calcium Anstieg erfolgte monophasisch. Der zweite langsame Calcium Anstieg, der unter Kontrollbedingungen erfolgte, blieb aus. Demzufolge zeigte sich, dass die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase eine wichtige Rolle bei dem Influx von extrazellulärem Calcium in die Endothelzelle spielt.

## **7. ZUSAMMENFASSUNG**

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein wichtiger Stimulator der Endothelzellproliferation. Bei der intrazellulären Signaltransduktion in der durch VEGF vermittelten Endothelzellproliferation sind verschiedene Kinasen und Enzyme beteiligt, wie die ERK2 und die NAD(P)H-Oxidase. Des Weiteren kommt es zu intrazellulären Calcium-Veränderungen, die eine wichtige Rolle bei der Endothelzellenproliferation spielen. VEGF bewirkt einen biphasischen Calcium Anstieg. Der erste Anstieg ist durch Calcium Freisetzung vom endoplasmatischen Retikulum bedingt; der zweite Anstieg erfolgt durch Einstrom vom extrazellulären Calcium über die Plasmamembran.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der intrazellulären Signaltransduktion die Aktivierung der MAP-Kinase oberhalb der Aktivierung der NAD(P)H Oxidase liegt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Calcium Einstrom über die Plasmamembran von der Produktion von Sauerstoffradikalen durch die NAD(P)H- Oxidase unmittelbar abhängig ist.

## SUMMARY

VEGF, a potent stimulator of endothelial cell proliferation, plays an important role in physiological and pathophysiological angiogenesis. Three principles of intercellular signaling have been shown to be involved. The VEGF induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase, the activation of the MEK/ERK pathway and a redox sensitive mechanism, which results in an activation of NAD(P)H oxidase. After VEGF- stimulation cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rises in a biphasic manner. The first part is due to  $\text{Ca}^{2+}$  release from an endogenous store, whereas the second part of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rise is due to a store operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx from outside medium.

The aim of the present study was to investigate whether these three components are in some sequential order in HUVEC. It could be shown that the activation of ERK2 is essentially involved in the intracellular signaling as an upstream step in the NAD(P)H-Oxidase activation.

Furthermore it was found that  $\text{Ca}^{2+}$  influx from outside medium depends on the generation of ROS by NAD(P)H-Oxidase.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Abid MR, Tsai JC, Spokes KC, Deshpande SS, Irani K, Aird WC. Vascular endothelial growth factor induces manganese- superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac 1- regulated NAD(P)H oxidase-dependent mechanism. *FASEB*, 52(2): 161-71. 2001

Ben-Av P, Crofford LJ, Wider RL and Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372: 83.87, 1995

Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Vinals F, Gothie E, Roux D, Pages G, Pouyssegur J. Singnaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Parmacol.*, 60(8) : 1171-8, 2000

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 383 (6595): 73-5, 1996

Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrelo S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor- 2/KDR. *J Biol. Chem.*, 277(5): 7-16. 2002

DvorakHF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability and Angiogenesis. *Am J Pathol*, 146(5): 1029-39, 1995

Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularisation of the mouse embryo: a study of flk- 1, tek, tie and vascular

endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn.*, 203(1): 80-92, 1995

Faehling M, Kroll J, Fohr KJ, Fellbrich G, Mayr U, Trischler G, Waltenberger J. Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J*, 16: 1805-7, 2002

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.*, 55: 15-35, 2000

Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 47: 211-18, 1991

Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J and Henzel WJ. Purification and Cloning of Vascular Endothelial Growth Factor Secreted by Pituitary Folliculostellate Cells. *Methods in Enzymology*, 198: 391- 405, 1991

Ferrara N and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin- binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161(2): 851-858, 1989

Folkman J and Shig Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16): 10931-34, 1992

Folkman J and Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature*, 288: 551-56, 1980

Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdetti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors*, 19(1): 35-48, 2001

Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, Levy BZ and Neufeld G. Platelet Factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*, 270(25): 15059-65, 1995

Gifford SM, Grummer MA, Pierre SA, Austin JL, Zheng J and Bird IM. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca<sup>2+</sup> signaling, ERK 1/2 activation, mitogenesis and vasodilator production. *J Endocrinol.*, 182(3): 485-99, 2004

Giuliani R, Bastaki M, Coltrini D, Presta M. Role of endothelial cell extracellular signal-regulated kinase1/2 in urokinase-type plasminogen activator upregulation and in vitro angiogenesis by fibroblast growth factor-2. *J Cell Sci*, 112: 2597-606, 1999

Godfrey K. Comparing the means of several groups. *N Eng J Med* , 313: 1450-1456, 1985

Gospodarowicz D, Abraham JA and Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary folliculo stellate cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 86: 7311-15, 1989

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260: 3440-3450, 1985

Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA Rodan SB. Induction of Vascular Endothelial Growth Factor expression by prostaglandin E<sub>2</sub> and E<sub>1</sub> in osteoblasts. *J Clin Invest* 93(6): 2490-96, 1994

Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 118: 1819-25, 2000

Hu Q, Yu ZX, Ferrans VJ, Takeda K, Irani K, Ziegelstein RC. Critical role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in generating  $Ca^{2+}$  oscillations in human aortic endothelial cells stimulated by histamine. *J Biol Chem* 277: 32546-51, 2002

Jaffe EA, Nachmann RK, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-56, 1973

Joukov V, Pajusola K and Kapainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15: 290-98, 1996

Kuhlmann CR, Schäfer M, Li F, Sawamra T, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J. Modulation of endothelial  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channel by oxidized LDL and its contribution to endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 60: 626-34, 2003

Li J, Perella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F and Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270(1): 308-12, 1995

Li Q, Altschuld A, Stokes BT. Quantification of intracellular free calcium in single adult cardiomyocytes by fura-2 fluorescence microscopy: calibration of fura-2 ratios. *Biochem Biophys Res Commun*, 47: 120-126, 1987



Li X and Eriksson U: Novel VEGF family members. VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *Int J Biochem Cell Biol* 33(4): 421-26, 2001

Ma L, Zhang Z, Wang X, Sun D, Zhou X, Chen A, Yao L. Screening of human vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 domain and study on its biological activity. *Sci China C Life Sci.* Oct;44(5):497-505, 2001

Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* 33(8): 1047-60, 2002

McLaughlin AP, De Vries GW. Role of PLCgamma and Ca(2<sup>+</sup>) in VEGF- and GF- induced choroidal endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C 1448-56, 2001

Minchenko A, Bauer T, Salceda S and Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71: 374-79, 1994

Munaron L. Calcium signalling and control of cell proliferation by tyrosine kinase receptors (review). *Int J Mol Med* 10(6): 671-6, 2002

Nakajima M, DeChavigny A, Johnson CE, Hamada J, Stein CA and Nicholson GL: Suramin: A potent inhibitor of melanoma heparanase and invasion. *J Biol Chem* 266(15): 9661-66, 1991

Namiki A, Brogi E, Kearny M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L and Isner JM: Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270(52): 31189-95, 1995

Olofsson B, Pajusola K, Kapainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana O, Petterson RF, Alitalo K and Eriksson U. Vascular Endothelial

Growth Factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2576- 81, 1996

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic property of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. J Clin Invest, 15; 100: 3131-9, 1997

Parry RG, Gillespie KM and Mathieson PW: Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells. Exp Nephrol 9: 275-83, 2001

Plouet J, Schilling J and Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. The Embo J 8(12): 3801-06, 1989

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Kshet E, Neufeld G: VEGF<sub>145</sub>, a secreted vascular Endothelial Growth Factor Isoform That Binds to Extracellular Matrix. J Biol Chem 272: 7151- 58, 1997

Robinson CJ, Scott PH, Allan AB, Jess T, Gould GW, Plevin R. Treatment of vascular smooth muscle cells with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides directed against p44 mitogen-activated protein kinases abolishes DNA synthesis in response to platelet-derived growth factor. Biochem J, 320:123-7, 1996

Schäfer M, Ewald N, Schäfer C, Stapler A, Piper HM, Noll T. Signaling of hypoxia-induced autonomous proliferation of endothelial cells. FASEB J, 17(3): 449-51, 2003

Schäfer M, Schäfer C, Ewald N, Piper HM, Noll T. Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. Circ Res, 92: 1010-5, 2003

Shahin V, Danker T, Enss K, Ossig R, Oberleithner H. Evidence for Ca<sup>2+</sup>- and ATP-sensitive peripheral channels in nuclear pore complexes. *FASEB J*, 15: 1895-901, 2001

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Development* 125(19): 3905-14. 1995

Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-45, 1992

Sobel AT, Branelec AI, Blanc CJ and Lagrue GA. Physicochemical characterisation of a Vascular Permeability Factor produced by con a-stimulated human lymphocytes. *J Immunol* 119(4): 1230-1234, 1977

Soker S, Svahn CM and Neufeld G. Vascular endothelial growth factor is inactivated by binding to  $\alpha$ 2-macroglobulin and the binding is inhibited by heparin. *J Biol Chem*, 268(11): 7685-91, 1993

Suzuki E, Nagata D, Yoshizumi M, Kakoki M, Omata M, Hirata Y. Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biol. Chem.* 275(5): 3637-44. 2000

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266 (18): 11947-54, 1991

Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC and Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165(3): 1198-206, 1989

Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA and Amento EP. Vascular Endothelial Growth Factor Induces Interstitial Collagenase Expression in Human Endothelial Cells. *J Cell Physiol*, 153(3): 557-62, 1992

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*, 91: 1160-7, 2002

Ushio-Fukai M, Alexander RW. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem*, 264(1-2):169-81, 2004

Vinals F, Pouyssegur J. Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol*, 19: 2763-72, 1999

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M and Persico MG. Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* 93(8): 1493-95, 1996

Wang GL and Semenza GL. Desferrioxamin induces Erythropoietin Gene Expression and hypoxia-inducible Factor 1 DNA-Binding Activity: Implications for Models of Hypoxia Signal Transduction. *Blood*, 82(12): 3610-15, 1993

Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ and Zimonjic DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at Chromosome 6p12. *Hum Genet* 97: 794-97, 1996

Woods SA, McGlade CJ, Guha A. Phosphatidylinositol 3'-kinase and MAPK/ERK kinase 1/2 differentially regulate expression of vascular

endothelial growth factor in human malignant astrocytoma cells. *Neuro-oncol* 4: 242-52, 2002

Zeng H, Zhao D, Yang S, Datta K, Mukhopadhyay D. Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling. *J Biol Chem*, 278: 20738-45, 2003

## **9. DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Dr. Klaus-Dieter Schlüter, der sehr zum Gelingen dieser Dissertationsschrift beigetragen hat.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Yaser Abdallah für die nette Zusammenarbeit, hilfreiche Betreuung und die angeregten Diskussionen. Ohne ihn wäre diese Dissertationsschrift nicht zustande gekommen.

Bei Herrn Dr. Matthias Schäfer bedanke ich mich herzlich für seine Betreuung und Unterstützung.

Dr. Christoph R. Kuhlmann danke ich für die einfallsreiche Hilfe und Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Calciumlabors, insbesondere Dr. Sascha Kasseckert, und allen technischen Mitarbeitern des physiologischen Instituts bedanken.

Meinen liebevollen Eltern, Dimitris und Maria, und meinem Bruder, Kostas, danke ich für das Verständnis und die liebevolle Unterstützung.

Meiner Lebensgefährtin danke ich für ihre Geduld.

## **10. ERKLÄRUNG**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

**Giessen, den 17.09.2009**

**Nikolaos D. Iliopoulos**

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**